

Journal für
Urologie und Urogynäkologie

Zeitschrift für Urologie und Urogynäkologie in Klinik und Praxis

**Ist die Sekretion der humanen
Samenblase durch Stickoxid (NO)
reguliert?**

Machtens St, Becker A, Jonas U
Kuczyk M, Stanarius A, Stief Ch G
Wolf G, Ückert St

*Journal für Urologie und
Urogynäkologie 2001; 8 (3) (Ausgabe
für Schweiz), 13-20*

*Journal für Urologie und
Urogynäkologie 2001; 8 (4) (Ausgabe
für Österreich), 15-22*

Homepage:

www.kup.at/urologie

Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche

Indexed in Scopus

Member of the



www.kup.at/urologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P. b. b. 022031116M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

IST DIE SEKRETION DER HUMANEN SAMENBLASE DURCH STICKOXID (NO) REGULIERT?

IST DIE
SEKRETION DER
HUMANEN
SAMENBLASE
DURCH NO
REGULIERT?

Summary

Aim of the study: About 60 % of the seminal plasma is secreted by the seminal vesicles. Investigations, which were carried out most recently, have underlined the significance of nitric oxide (NO) in the seminal plasma for sperm capacitation and viscosity. Functional studies demonstrated a high concentration of the enzyme Nitric Oxide Synthase (NOS) in the human seminal vesicle. It was the aim of our study to show the distribution of the different isoforms of NOS by means of light- and electronmicroscopic immunohistochemical investigations in order to draw conclusions from the morphological results towards possible functional impact of NO for this organ.

Material and method: The seminal vesicles of 15 patients undergoing radical prostatectomy or cystectomy because of tumors, were examined immunohistochemically using a NADPH-d assay, representing unspecific NOS activity and monoclonal antibodies against the neuronal (nNOS) and endothelial (eNOS) isoforms.

Results: In light microscopy an intensive reaction of NADPH-d was seen in the glandular epithelial structures of the seminal vesicle, whereas stromal parts showed only a minor reaction. In electron microscopy a significant reaction of NADPH-d was detected at the endoplasmic and mitochondrial membrane as well as at the nuclear envelope of glandular epithelial cells. In comparison to this reaction the response to the specific antibodies nNOS and eNOS was of minor intensity.

Conclusion: The electron microscope investigations for NADPH-d in particular support the hypothesis of an NO-regulated secretion of the human seminal vesicles. In contrast to prior speculations, the seminal vesicles appear to be the site of production of NO necessary for spermiogenesis and sperm function. The sparse colocalization between NADPH-d, nNOS and eNOS might be a hint to the existence of a so far unidentified NOS isoform.

Enzyms evtl. Rückschlüsse zur Funktion von NO für dieses Organ ziehen zu können.

Material und Methode: Die Samenblasen von 15 Patienten, die sich tumorchirurgischen Operationen (Prostatektomie, Cystektomie) unterzogen, wurden immunohistochemisch durch NADPH-d Färbung und mit monoklonalen Antikörpern gegen die neurogene (nNOS) und endotheliale (eNOS) Isoform untersucht.

Ergebnisse: Lichtmikroskopisch zeigte sich eine intensive Reaktion der NADPH-d in den glandulär epithelialen Strukturen der Samenblasen, wogegen die stromalen Organanteile nur gering reagierten. Elektronenmikroskopisch fand sich eine markante membranständige Immunreaktion für NADPH-d an endoplasmatischem Retikulum, Mitochondrien und Nucleus. Im Vergleich zu dieser Reaktion war eine wesentlich geringere Immunantwort auf die spezifischen Antikörper gegen nNOS und eNOS nachweisbar.

Schlußfolgerung: Die elektronenmikroskopische NADPH-d Reaktion unterstützt die Annahme einer NO-regulierten Sekretion der humanen Samenblasen. Weiterhin ist entgegen früherer Annahmen die humane Samenblase der Produktionsort für in der Spermiogenese und Spermienfunktion benötigtes NO. Die nur teilweise nachzuweisende Colokalisation zwischen NADPH-d und nNOS bzw. eNOS-Reaktion könnte auf die Existenz einer spezifischen, bisher nicht identifizierten NOS-Isoform hinweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Fragestellung: Etwa 60 % des Seminalplasmas wird durch die Samenblasen sezerniert. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen weisen auf die Bedeutung von Stickstoffoxid (NO) im Seminalplasma für die Spermienkapazität und -viskosität hin. Funktio-

nelle Untersuchungen zeigten eine hohe Konzentration des NO-produzierenden Enzyms Stickstoffoxidsynthase (NOS) in der humanen Samenblase. Aufgabe der hier vorgestellten Untersuchung war es, die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Verteilung der Isoformen der NOS immunhistochemisch zu untersuchen, um über die morphologische Distribution des

¹Medizinische Hochschule Hannover, Urologische Klinik, Hannover

²Institut für Medizinische Neurobiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Am 12.10.1998 wurde Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad für ihre Forschungsergebnisse im Bereich des Stickstoffoxids (NO) der Nobelpreis für Medizin in Stockholm verliehen. Schon vor 100 Jahren war erkannt worden, daß Nitroglyzerin die Symptome der Angina pectoris bessern kann. Aber erst Mitte der 1980er Jahre gewann die Forschung über das eigentlich zugrunde liegende Agens, das organische Stickstoffoxid, eine neue Dynamik.

Im Jahr 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki, daß die durch Acetylcholin induzierte Gefäßrelaxation von der Existenz eines intakten Endothels abhängig ist [1]. Somit wurde angenommen, daß es einen Stoff mit gefäßrelaxierender Wirkung, der im Endothel gebildet wird, geben müsse, der folglich „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) genannt wurde. Erst 1986 war es wiederum Furchgott, der annahm, daß es sich beim EDRF um Stickstoffoxid (NO) handeln könne [2]. Diese Hypothese wurde von Ignarro et al. unterstützt [3]. Untersuchungen, die mittels Chemolumineszenz nachwiesen, daß nach Gabe von Bradykinin zu endothelialen Schweine-aortazellen in gleicher Menge EDRF und NO freigesetzt wurden und daß die Konzentration des produzierten NO ausreichte, um vaskuläre Organstreifen zu relaxieren und eine suffiziente Thrombozytenaggregation und -adhäsion zu induzieren, bewiesen schließlich, daß es sich beim

EDRF und NO um die gleiche Substanz handelt [4–6].

Seit dieser Zeit sind zahlreiche biologische Prozesse identifiziert worden, an denen NO substantiell beteiligt ist. Der Stickstoffoxid (NO)/cGMP Regelkreis, der eine NO-vermittelte Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) beinhaltet, ist ein wichtiger Mediator der Signaltransduktion zwischen Zellverbänden verschiedenster Gewebe. Als „second messenger“ hat cGMP eine ähnliche Wirkung wie 3', 5'-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Diese beiden Nukleotide aktivieren u.a. spezifische Proteinkinase, die den Kontraktilitätsstatus glatter Muskelzellen ändern können, indem sie die Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins katalysieren [7]. Weiterhin wurde NO als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark nachgewiesen, wo es die Freisetzung von Glutamat und Acetylcholin reguliert. Im peripheren Nervensystem hat die Substanz ihre größte Bedeutung in der Funktion als Neurotransmitter der nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Erregung [8–13]. Als weitere Bildungsorte für NO wurden das vegetative periphere Nervensystem und das Darmnervensystem identifiziert. So wurde eine NO-vermittelte reflektorische Magenerweiterung auf die Speisezufuhr gefunden [14]. Ein relaxierender Effekt an der Darmperistaltik ist ebenfalls NO gesteuert [15].

Auch Immunzellen wie Makrophagen und Granulozyten können NO, nach Stimulation der induzierbaren Stickstoffoxidsynthase (i-NOS) durch bakteriel-

le Lipopolysaccharide oder Zytokine, produzieren, welches dann zytotoxische Wirkung hat. Einen hemmenden Effekt hat NO auf die Thrombozytenaggregation und -adhäsion über die vermehrte Produktion von cGMP, wobei Thrombozyten über einen autokrinen Prozeß Stickstoffoxid-vermittelt durch die induzierbare NOS (i-NOS) selbst regenerieren [16]. Auch die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und die Proliferation glatter Muskelzellen werden inhibiert. In Verbindung mit einigen Autoimmun- und Immunkomplexerkrankungen ist NO ebenfalls von Bedeutung. Durch eine Konzentration aktivierter Makrophagen, die sich in den betroffenen Geweben ansammeln, kommt es über eine überhöhte Stickstoffoxid-Ausschüttung zur Entstehung chronischer Entzündungen. Exemplarisch werden diese Mechanismen für chronische Arthritiden, Nephritiden, Vaskulitiden und den Typ I-Diabetes mellitus diskutiert. Es bestehen Hinweise, daß immunologisch aktivierte Makrophagen über die Vermittlung von NO einen nicht-spezifischen zytostatischen bzw. zytotoxischen Effekt auf in den Organismus eindringende Mikroorganismen haben [17].

Die funktionelle Bedeutung von NO im Urogenitaltrakt wurde in den letzten Jahren wiederholt experimentell belegt. So wurden relaxierende Wirkungen von NO an der glatten Harnröhrenmuskulatur als auch am Blasenhalss insbesondere tierexperimentell nachgewiesen [18, 19].

Ob Stickoxid ein wesentlicher funktioneller Neurotransmitter in der Detrusormuskulatur ist, wird

zur Zeit noch kontrovers diskutiert. Experimentell war aber ein relaxierender Effekt an der Detrusormuskulatur durch exogenes und endogenes NO induzierbar [20, 21].

Die Bedeutung von NO als Transmitter der Relaxation des glattmuskulären Corpus cavernosum und damit der Erektion gilt als unstrittig und hat durch den intrakavernösen Einsatz von NO-Donatoren bereits Einzug in die Therapie der erektilen Dysfunktion gehalten [22, 23].

Nachdem an zahlreichen Organen des Urogenitaltrakts, hauptsächlich bei Tieren, die morphologische und funktionelle Bedeutung des L-Arginin/NO/cGMP-Regelkreises nachgewiesen worden war, sollte es Aufgabe dieser Arbeit sein, die Verteilung der Isoformen der NOS in der humanen Samenblase anhand immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen aufzuklären.

MATERIAL UND METHODEN

Das humane Samenblasengewebe wurde im Rahmen von tumorchirurgischen Eingriffen wie radikalen Prostatovesikulektomien und Zystoprostatovesikulektomien bei Patienten mit Prostata- und Harnblasenkarzinomen direkt von den Operationspräparaten unter geringstmöglicher mechanischer Alteration scharf reseziert. Die Zeitspanne zwischen Entfernung des Präparates aus dem menschlichen Situs und der Präparation der Samenblasen überschritt in keinem Fall dreißig

Minuten. Die Samenblasen wurden nur teilweise entfernt, da durch histopathologische Aufarbeitung des verbliebenen Organanteils die Tumorfreiheit des jeweils untersuchten Organs sichergestellt werden sollte. Nur tumorfreie Organe wurden den verschiedenen Untersuchungen zugeführt.

Insgesamt wurden 30 Samenblasen bei 15 Patienten, die durch radikale Prostatovesikulektomie und durch radikale Zystoprostatovesikulektomie therapiert wurden, untersucht. Eine hormonablativ neoadjuvante Therapie war bei keinem der radikal prostatektomierten Patienten im Vorfeld der operativen Intervention durchgeführt worden.

Das Alter der Patienten lag zwischen 39 und 73 Jahren.

Licht- und Elektronenmikroskopie

Für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden direkt nach der Entnahme der Samenblasen aus dem menschlichen Situs die vorgesehenen Organe in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Mit dem Kryostat wurden 10–20 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger (super frost/plus, Menzel-Gläser) aufgetragen wurden und mit eisgekühltem Azeton für 10 Minuten und anschließend mit einer Mischung aus Paraformaldehyd (PFA, 4 %) und Glutaraldehyd (GA, 0,4 %) zwischen 10 Minuten und 3 Stunden fixiert wurden.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der NADPH-d-Aktivität wurden die Schnitte für 20 min

bei 37 °C in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), welche 0,2 mg/ml Nitroblau-Tetrazolium (NBT; Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 1 mg/ml b-NADPH (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,3 % Triton X-100 (pH 7,4) enthielt, inkubiert. Die histochemische Reaktion wurde durch das Waschen mit PBS bei Raumtemperatur terminiert [18].

Die Präparation des Gewebes zur histochemischen Untersuchung der NADPH-d im Elektronenmikroskop erfolgte in den gleichen Schritten wie zur Lichtmikroskopie, aber die Reaktionszeit wurde auf 90 min verlängert und anstelle des NBT wurde Tetrazolium-Salz BSPT (Sigma, St. Louis, USA, gelöst in 20 µl Dimethylformamid) verwendet, um ein osmiophiles Formazan zu erhalten. Die Schnitte wurden anschließend mit 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert, en bloc kontrastiert, mit 1 % Uranylacetat dehydriert und flach in Durcupan eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultracut MT 7000 (RMC, USA) angefertigt und mit einem Zeiss 900 Elektronenmikroskop untersucht (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Verschiedene monoklonale Antikörper für die eNOS, welche von verschiedenen Firmen erhältlich sind, wurden hinsichtlich ihrer Spezifität mittels Western Blots und immunzytochemischer Reaktion an Rinderaorta untersucht. Für die immunzytochemische Untersuchung der Samenblasen wurde schließlich der monoklonale Antikörper von Transduction Laboratories (Lexington, USA) ausgewählt. Dieser Antikörper wurde korrespondierend zu einem 20,4 kDa Fragment herge-

stellt, das den Aminosäuren 1030–1209 der humanen eNOS entspricht.

Für die immunchemische Untersuchung durch konventionelle Lichtmikroskopie wurde der Antikörper im Verhältnis 1:10.000 verdünnt und die Schnitte bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zur Sichtbarmachung des eNOS Proteins wurde ein indirekter TSA-Kit (DuPont NEN Boston, USA) in Kombination mit dem Vectastain ABC „Elite“ Kit (Vector Laboratories Burlingame, USA) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Sigma Deishagen, Deutschland) eingesetzt.

Für die elektronenmikroskopische eNOS Immunzytochemie wurde die Inkubation an frei flottierenden Vibratomschnitten vorgenommen, die entsprechend der NADPH-d Untersuchung eingebettet wurden. Für die nNOS-immunzytochemische Untersuchung wurde der polyklonale Antikörper der Fa. Eurodiagnostica (B-220, Malmö, Schweden) aus einer größeren Anzahl von bezogenen Antikörpern verschiedener Firmen nach mehrfachen Spezifitätsuntersuchungen (Western Blot und immunzytochemische Untersuchungen an Gehirngewebe) ausgewählt.

Der immunhistochemische Nachweis der nNOS wurde mittels der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode geführt.

ERGEBNISSE

Die intensivste NADPH-d-Reaktion fand sich im Bereich des se-

retorischen Epithels der glandulären Strukturen der Samenblase. Die Reaktion zeigte sich besonders in Einfaltungen und Krypten des Epithels. In etwa 40–50 % der Präparationen zeigte sich eine Reaktion in subepithelialen Strukturen. Diese Reaktion entsprach weitestgehend subepithelial gelegenen Nervenbündeln, wogegen intramuskuläre Neurone nur sehr schwach reagierte. Die Muskulatur blieb fast ausschließlich ungefärbt. Das Gefäßendothel zeigte eine ebenfalls schwache Positivität.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die schon lichtmikroskopisch gesehene Verteilung der NADPH-d Reaktion in den glandulären Epithelzellen. Die BSPT-Formazan-Ablagerungen fanden sich vornehmlich in den Membranen von Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und in Anteilen der Kernmembran (Abb. 1).

Auf Grund der technisch schwierigen Schnittführung an Nervenbündeln für die Elektronenmikroskopie konnte eine positive NADPH-d Reaktion nur an einzelnen Nervenfasern nachgewiesen werden. Die Muskulatur zeigte sich komplett negativ. Eine schwache Positivität zeigte sich korrespondierend zu den lichtmikroskopischen Ergebnissen am Gefäßendothel.

Die lichtmikroskopische Reaktion der eNOS war, obwohl verschiedene Antikörper unterschiedlicher Anbieter verwendet wurden und zahlreiche technische Varianten in der Herstellung der histochemischen Präparationen erprobt wurden, als nur sehr schwach festzustellen. Es zeigte

sich eine nur geringfügige Positivität in Drüsenepithelzellen. Weiterhin war eine schwache Reaktion von Endothelzellen intramuskulär gelegener Gefäße zu finden.

Die histochemische Reaktion mit dem eNOS-Antikörper wurde für die Elektronenmikroskopie mittels der zuvor beschriebenen TSA-Methode optimiert. Dabei bestätigte sich die lediglich auf einzelne Gefäße beschränkte Reaktion, die zuvor bereits in der Lichtmikroskopie gesehen worden war. Die elektronenmikroskopisch gesehene war intensiver als die lichtmikroskopische Reaktion. Innerhalb der Gefäßstrukturen zeigte sich eine fleckhaft unregelmäßige Verteilung der histochemischen Reaktion innerhalb des Gefäßendothels. Die Reaktion zeigte sich nicht membrangebunden (Abb. 2).

Die immunhistochemische Reaktion für den nNOS-Antikörper zeigte eine stärkere Positivität als die für den eNOS-Antikörper. Anteile des glandulären Epithels zeigten eine teils intensive Färbereaktion. Allerdings konnte diese Positivität nicht für alle Drüsenepithelien gefunden werden. Auch vereinzelte subepithelial gelegene Nerven zeigten eine intensive immunhistochemische Reaktion. Intramuskuläre Nervenbündel zeigten eine vergleichsweise schwächere Reaktion.

Die lichtmikroskopisch gesehene Reaktion des Epithels auf den nNOS-Antikörper war elektronenmikroskopisch nicht nachvollziehbar. Bei der Darstellung von nNOS-positiven Nervenbündeln ergaben sich ähnliche technische Probleme in der Schnittführung

wie beim NADPH-Nachweis an Nerven in der Elektronenmikroskopie. Nur an vereinzelt Nervenfibrillen konnte eine positive nNOS-Reaktion identifiziert werden.

DISKUSSION

Die NADPH-d-Reaktion wurde durch Vincent eingeführt, der zeigte, daß neuronale Zellen im Cerebellum anfärbbar sind [24]. Erst als sich zeigte, daß die Diaphorase-Reaktion erst erfolgt, wenn eine reduzierte Form der NOS in der Gegenwart des Elektronenakzeptors Tetrazoliumblau und NADPH reoxidiert und damit ein Nachweis für das Vorliegen einer NOS zu führen ist, wurde diese Technik zur Identifizierung nitrogener Nerven in verschiedenen Geweben eingesetzt [25].

Es ist bekannt, daß die NADPH-d-Reaktion verschiedener Isoformen der NOS stark von dem verwendeten Fixationsprotokoll abhängig ist [26]. Mit der Verwendung des optimierten Protokolls konnte aber bereits in Vorversuchen eine komplette Koinzidenz zwischen NADPH-d-Reaktion und der eNOS-Immunreaktion an Rinder- und Rattenaorta nachgewiesen werden [27]. Unter diesen optimierten Bedingungen sah man lichtmikroskopisch die intensivste NADPH-d-Reaktion im Bereich des glandulären Epithels und der glandulären Krypten. Dies entspricht kürzlich berichteten Untersuchungen an Meerschweinchen- und humanem Gewebe, dagegen war die NADPH-d-Reaktion an Samenblasen der Ratte nicht nachweisbar [28, 29].

Die etwa 40–50 %ige Positivität für NADPH-d im subepithelial gelegenen Nervenplexus konnte ebenfalls an der menschlichen

Samenblase gesehen werden [30].

Auch die Aktivität der NOS wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen durch funktionelle Assays, die die Umwandlung von L-[U-¹⁴C] Arginin zu L-[U-¹⁴C] Citrullin und von [³H]-L-Arginin zu [³H]-L-Citrullin bestimmten, sowohl an humanen als auch an Samenblasen von Ratten und Meerschweinchen untersucht. Dabei wurde die höchste NOS-Aktivität im gesamten Urogenitaltrakt an humanen Samenblasen beschrieben [31]. Während eine hohe NOS-Aktivität auch an Meerschweinchensamenblasen gefunden wurde, war dieses bei der Ratte nicht möglich [28, 32].

Die immunhistochemisch gesehene intensive NADPH-Diaphorase-Reaktion im Bereich des Drüsenepithels deckt sich mit den histochemischen Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen,

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der NADPH-d Reaktion. BSPT-Formazan-Ablagerungen finden sich innerhalb der epithelialen Zellen an endoplasmatischen (Pfeile) und mitochondrialen (gebogene Pfeile), sowie an Teilen der Kernmembran (kleine Pfeile). Col = Kollagen, L = Drüsenlumen, N = Zellkern, S = Sekretgranula; Balken: 2,5 µm

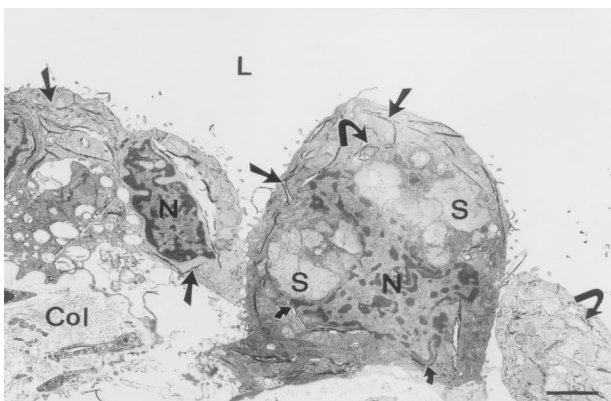
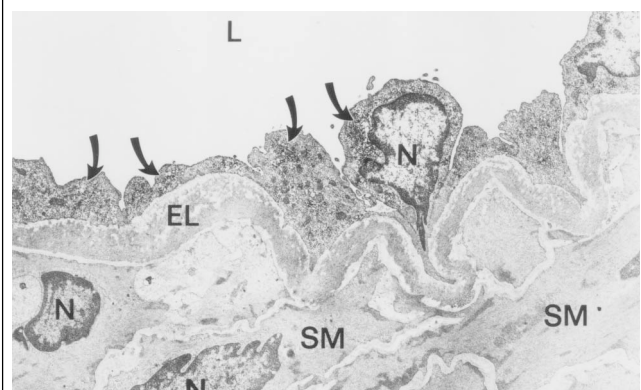


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Reaktion mit dem eNOS-Antikörper kombiniert mit der TSA-Methode. Die endothelialen Zellen einer Arterie zeigen eine fleckförmige Positivität (Pfeil). EL = Elastische Lamina, L = Gefäßlumen, N = Zellkern, SM = glatte Muskelzelle. Balken: 2 µm.



die mit dem generalisierten Nervenmarker „Protein Gen Produkt 9,5 (PGP)“ die neurochemisch aktiven Nervenbündel in der Samenblase analysierten.

Dabei zeigten sich dichte Nervenplexi innerhalb der Muskelschichten, sowie in einem subepithelial gelegenen Nervenplexus. Die intramuskulär gelegenen Plexi zeigten die intensivste Immunreaktion auf Tyrosin-Hydroxylase (TH) Antikörper, einem Marker für noradrenerge Nerven. Alle TH-positiven Nerven zeigten eine gleichzeitige Reaktion für Dopamin- β -Hydroxylase (D β H). Ein Großteil der TH-positiven Nerven zeigte eine co-lokalisierte Reaktion auf NOS-Antikörper. Ein Teil der intramuskulär gelegenen Nervenbündel zeigte sich darüber hinaus Neuropeptid Y (NPY)-positiv. Die Mehrzahl der subepithelial gelegenen Nervenbündel zeigte eine positive Immunreaktion auf NPY und dabei eine Co-Lokalisation mit dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) und NOS. Perivaskulär gelegene Nerven zeigten die intensivste immunhistochemische Reaktion für TH und Calcitonin gene related peptide (CGRP), co-lokalisiert zu NPY. NOS dagegen zeigte sich hier nur selten mit TH co-lokalisiert [32, 33].

Die Lokalisation cholinergischer Rezeptoren in den Samenblasen verschiedener Spezies wurde ebenfalls mit Hilfe der Acetylcholinesterase (AChE) untersucht, und die Co-Lokalisation mit der NOS wurde beschrieben. Dabei zeigte sich die stärkste Konzentration von AChE-positiven Nerven im Bereich eines subepithelialen Plexus beim Kaninchen, Meerschweinchen und Menschen [29,

34]. Dagegen zeigte die glatte Muskulatur der Samenblase von Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen eine nur geringe oder fehlende Positivität für AChE [35, 36]. Diesen Nerven werden sekretomotorische Funktionen zugeordnet [37]. Diese Hypothese wird durch jüngste Untersuchungen unterstützt, die an Samenblasen von Meerschweinchen eine NO-vermittelte Sekretion von Fruktose nach Stimulation muskarinergischer Rezeptoren nachwies [29]. Die Ergebnisse der hier beschriebenen elektronenmikroskopischen NADPH-d-Reaktion, die sich hauptsächlich membranengebunden an Zellorganellen in epithelialen Zellen zeigte, die für die Sekretion verantwortlich sind (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien), unterstützen die angenommene sekretoregulatorische Funktion von NO für dieses Organ.

In der Literatur existieren teilweise divergierende Angaben zur Verteilung der endothelialen Isoform der Stickstoffoxydsynthetase (eNOS) in den Organen des männlichen Urogenitaltraktes [28, 38]. Aus diesem Grunde wurde die Lokalisation dieses Isoenzym mittels immunzytochemischer Untersuchungen und der NADPH-Diaphorase-Reaktion für die humane Samenblase reevaluiert. Da die eNOS zuerst an der Rinderaorta isoliert und charakterisiert wurde, diente dieses Gewebe zur Beurteilung verschiedener Fixations- und Färbeprotokolle, um eine Optimierung des verwendeten Verfahrens zu ermöglichen [39]. Nur die mit einer Mischung aus Azeton und Aldehyden immersionsfixierten Kryoschnitte zeigten eine eindeutige Immunreaktion.

Die Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) zeigte sich als geeignete Methode, um die Sensitivität der immunzytochemischen Reaktion zu erhöhen. Nach Einführung dieser Methode durch Bobrow et al. [40, 41] zeigten Untersuchungen die Überlegenheit dieses Verfahrens gegenüber der konventionellen Immunoperoxidasefärbung für die Lichtmikroskopie [42, 43]. Die Methode verwendet Rettich-Peroxidase, die an einen sekundären Antikörper gebunden ist, um die kovalente Bindung von biotin gebundenem Tyramid möglichst nah an der Antigen-Antikörper-Bindungsstelle zu ermöglichen. Im Anschluß wird fluoreszenz- oder enzymgelabeltes Streptavidin zur Bindung am Biotin eingesetzt, um das Antigen darzustellen. Unter Verwendung dieser optimierten Methodik ließ sich die eNOS lichtmikroskopisch in nur sehr abgeschwächter Form im Bereich des glandulären Epithels und am Endothel intramuskulär gelegener Arteriolen nachweisen. Elektronenmikroskopisch war die eNOS dann nur noch im Gefäßendothel darstellbar, ohne membrangebunden zu sein.

In der Literatur ließen sich keine Berichte über den Nachweis der eNOS-Isoform an humanem Samenblasengewebe finden. Immunhistochemische Untersuchungen an Samenblasen von Ratten zeigten aber ebenfalls nur eine geringe Reaktion, sowohl für die eNOS, als auch für die NADPH-d-Reaktion [28]. Die gesehene intensive NADPH-d-Reaktion ließ sich nicht mit der Reaktion der eNOS co-lokalisieren. Die positive Reaktion fast ausschließlich des intramuskulären Gefäßendothels gibt Hinweise auf die Bedeutung dieses Isoen-

zyms für die haemodynamischen Vorgänge in diesem Organ. Um eine Co-Lokalisation der NADPH-d-Reaktion mit einer weiteren Isoform der NOS zu untersuchen, wurde auch die immunhistochemische Expression der nNOS lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei zeigte sich lichtmikroskopisch eine intensive Reaktion im Bereich glandulär epithelialer Zellen und subepithelial gelegener Nervenplexi.

Intramuskuläre Neurone waren nur sehr vereinzelt positiv gefärbt. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung ergab sich das technische Problem, daß auf Grund der Ultradünnschnitttechnik nur vereinzelt Nervenfibrillen zur Darstellung kamen. Aber auch hier zeigte sich eine Positivität in subepithelial gelegenen Nervenbündeln, wogegen sich intraepitheliale Zellstrukturen nicht positiv zeigten. Die lichtmikroskopisch dokumentierten Befunde entsprechen weitgehend kürzlich publizierten Untersuchungen an urogenitalen Organen bei Säuglingen und Kleinkindern, bei denen der gleiche Antikörper der Fa. Eurodiagnostica eingesetzt wurde [32]. Damit zeigte sich die nNOS in einem höheren Maße mit der NADPH-d-Reaktion co-lokalisiert als die eNOS. Die intensive Reaktion des subepithelialen Nervenplexus deutet auf eine Funktion der NOS bei sekretoregulatorischen Prozessen hin. Die NOS-positiven intramuskulären Nervenplexi, die in anderen Untersuchungen eine ausgeprägte Co-Lokalisation mit der Tyrosin-Hydroxylase als Marker für die adrenerge Innervation zeigten [32], lassen auf die NO-vermittelte myoinhibitorische Funktion schließen.

Literatur:

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–6.
2. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM (ed). *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. Raven Press, New York, 1988; 401–14.
3. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM (ed). *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. Raven Press, New York, 1988; 427–36.
4. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond.)* 1987; 327: 524–6.
5. Randski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639–46.
6. Randski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 1482–9.
7. Kamm KE, Stull JT. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messenger. *Ann Rev Physiol* 1989; 51: 299–313.
8. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14: 60–7.
9. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683–706.
10. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3–11.
11. Rand MJ. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19: 147–69.
12. Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992; 262: G379–G392.
13. Sneddon P, Graham A. Role of nitric oxide in the autonomic innervation of smooth muscle. *J Auton Pharmacol* 1992; 12: 445–56.
14. Lefebvre RA, Baert E, Barbier AJ. Influence of N^G-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 13–7.
15. Maggi CA, Barbanti G, Turini D, Giuliani S. Effect of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG) on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1970–2.
16. Randski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine:nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193–7.
17. Wiseman CL Jr., Waddell A. Interferon like factors from antigen- and mitogen-stimulated human leukocytes with antirickettsial and cytolytic actions on *Rickettsia prowazekii*. Infected human endothelial cells, fibroblasts, and macrophages. *J Exp Med* 1983; 157: 1780–93.
18. Persson K, Andersson KE. Nitric oxide and relaxation of pig trigone and urethral smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 416–20.
19. Dokita S, Smith SD, Nishimoto T, Wheeler MA, Weiss RM. Involvement of nitric oxide and cyclic GMP in rabbit urethral relaxation. *Eur J Pharmacol* 1994; 266: 269–75.
20. James MJ, Birmingham AT, Hill SJ. Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical field stimulation. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 35: 366–72.
21. Chung BH, Seung KC, Ki CC. Effects of nitric oxide on detrusor relaxation. *J Urol* 1996; 155: 2090–3.
22. Stief CG, Holmquist F, Djamilian M, Krah H, Andersson KE, Jonas U. Preliminary results with the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate in the treatment of human erectile dysfunction. *J Urol* 1992; 148: 1437–40.
23. Pickard RS, Powell PH, Zar MA. Nitric oxide and cyclic GMP formation following relaxant nerve stimulation in isolated human corpus cavernosum. *Br J Urol* 1995; 75: 516–22.
24. Vincent SR. NADPH-diaphorase histochemistry and neurotransmitter coexistence. In: Pannula P, Päävräntä H, Sononila S (eds). *Neurohistochemistry: Modern methods and application*. Liss, New York, 1986; 375.
25. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 797–801.

Dr. med. Stefan Machtens

Geboren 1965 in Münster/Westfalen. Studium der Humanmedizin von 1985–1992 in Pecs/Ungarn, Bochum, Köln. Ausbildungsaufenthalte in Sydney, Atlanta, Dumaguete/Philippinen. 1992 Ärztliche Prüfung. 1993 United States Medical Licensing Examination. Als Arzt im Praktikum Ausbildung an der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Unfallchirurgie und Gefäßchirurgie am Knappschafts-Krankenhaus Dortmund-Brackel bei Prof. Zühlke zwischen 1992 und 1994. Seit 1994 Wissenschaftlicher Assistent an der Urologischen Universitätsklinik Hannover bei Prof. Udo Jonas. Untersuchungen zu biologischen Prognosefaktoren bei urologischen Tumoren im Labor für Experimentelle Urologische Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Experimentelle Untersuchungen zur Fertilitätsphysiologie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Neurobiologie, Otto von Guericke-Universität Magdeburg (Leitung: Prof. Wolf) und dem Institut für Peptidforschung in Hannover (Leitung: Prof. Forssmann). 1999 Facharzt für Urologie.

Mitgliedschaft in zahlreichen wissenschaftlichen Fachgesellschaften. Seit 1999 Benennung als „Young Innovator in Urology“. Herausgeber „Jahrbuch der Urologie“. Managing Editor des „World Journal of Urology“.

Wissenschaftliche Preise (u.a. Peter Bischoff-Preis der Vereinigung Norddeutscher Urologen (1998), Paul Mellin-Preis der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie (2000), Forschungspreis des Arbeitskreises Experimentelle Urologie (2000), Posterpreis der European Association of Urology (1996)).

Zur Zeit klinische und wissenschaftliche Schwerpunkte in den Bereichen Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms, Jod 125-Brachytherapie des lokalisierten Prostatakarzinoms und Chemokinrezeptordetektion am lokalisierten Prostatakarzinom.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. Stefan Machtens
Abteilung für Urologie, MH Hannover
D-30625 Hannover, Carl-Neuberg Str.1



26. Gonzales-Hernandes T, Angeles Perez de la Cruz M, Mantolan-Sarmiento B. Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1399–413.
27. Stanarius A, Töpel I, Schulz S, Noack H, Wolf G. Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta histochem* 1997; 99: 411–29.
28. Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Brecht DS, Snyder SH, Chang TSK. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod* 1995; 52: 1–7.

29. Sjöstrand NO, Ehren I, Eldh J, Wiklund P. NADPH-diaphorase in glandular cells and nerves and its relation to acetylcholinesterase positive nerves in the male reproductive tract of man and guinea-pig. *Urol Res* 1997; 25: 456–62.
30. Ehren I, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urol Res* 1994; 22: 287–90.
31. Ehren I, Sjöstrand NO, Hammarström M, Wiklund NP. Is glandular formation of nitric oxide a prerequisite for muscarinic secretion of fructose in the guinea-pig seminal vesicle? *Urol Res* 1997; 25: 433–8.
32. Jen PYP, Dixon JS, Gearhart JP, Gosling JA. Nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase are co-localized in nerves supplying the postnatal human male genitourinary organs. *J Urol* 1996; 155: 1117–21.

33. Jen PYP, Dixon JS, Gosling JA. Co-localization of nitric oxide synthase, neuropeptides and tyrosine hydroxylase in nerves supplying the human postnatal vas deference and seminal vesicle. *Br J Urol* 1997; 80: 291–9.
34. Elbadawi A, Goodman DC. Autonomic innervation of accessory male genital glands. In: Spring-Mills E, Hafez ESE (eds). *Male accessory sex glands*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980; 101–28.
35. Moss HE, Crowe R, Burnstock G. The seminal vesicle in eight and 16 week streptozotocin-induced diabetic rats: adrenergic, cholinergic and peptidergic innervation. *J Urol* 1987; 138: 1273–8.
36. Yuri K. Immunohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic, aminergic and cholinergic nerve fibres in the rat seminal vesicle. *J Urol* 1990; 143: 194–8.
37. Sjöstrand NO, Hammarström M. Sympathetic regulation of fructose secretion in the seminal vesicle of the guinea-pig. *Acta Physiol Scand* 1995; 153: 189–94.
38. Klotz T, Bloch W, Loch C, Engelmann U, Addicks K. Distribution of the constitutive NO-synthase isoforms (bNOS and eNOS) in the normal and hyperplastic human prostate. *Urologe [A]* 1997; 36: 318–22.
39. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Mand N, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factors synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10480–4.
40. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Meth* 1989; 125: 279–85.
41. Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to immunoassays. *J Immunol Meth* 1991; 137: 103–12.
42. Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE. cFOS immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1635–42.
43. Raap AK, van de Corput MEC, van Gijlswijk RPM, Tanke HJ, Wiegant J. Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Human Mol Genet* 1995; 4: 529–34.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)