

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
ARIA	acetylcholine receptor inducing activity
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BFGF	basic fibroblast growth factor
CAM	cell adhesion molecule
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CRG	controlled release glass
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extracellular matrix molecule
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum
GDNF	glia cell derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	glial fibrillary acid protein
GGF	glial growth factor
GGF	glial growth factor
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HRG	Heregulin
HS	horse serum
Ig	Immunglobulin
IGF1	insulin like growth factor
LCAM	liver cell adhesion molecule
MAG	myelin associated glycoprotein
MBP	myelin basic protein
MC	Melanocortin
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger-RNA
MSH	Melanocyten stimulierendes Hormon
NCAM	neuronal cell adhesion molecule
NDT	neu differentiation factor
NF	Neurofilament
NGF	nerve growth factor
NS	Nervensystem
NT	Neurotrophin
OEC	olfactory ensheathing cell
PA	Paraformaldehyd
PAN/PVC	Acrylbuitril/Polyvinylchlorid
PBS	Phosphor Buffered Saline
PDGF	platelet derived growth factor
PEX	pituitary extract
PGA	Polyglycolsäure

PLGA	Polyglycolsäureacid
PLL	Poly-L-Lysin
PLLA/PLL	Poly-L-Lactid-Co-6-Caprolacton
PNS	Peripheres Nervensystem
PtdInsP2	Phosphatidylinositoldiphosphat
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
SC	Schwannsche Zelle
TGF $\alpha$	transforming growth factor $\alpha$
TrK	Tyrosinkinase
VIP	vasoactive intestinal peptide
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **I. Einleitung**

Zur chirurgischen Behandlung peripherer Nervenläsionen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die trotz aller Bemühungen bisher nicht in jedem Falle zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Um die Regenerations- sowie die funktionellen Ergebnisse zu verbessern, wird in der Humanmedizin seit einiger Zeit unter anderem verstärkt über den Einsatz eines Nervenimplantates mit Beteiligung autologer Schwannscher Zellen (SC) als Regenerationsförderer geforscht.

Ziel dieser Arbeit ist, Voraussetzungen für die Entwicklung eines solchen Nervenimplantates für den Hund zu untersuchen. Es soll eine ausreichend große, möglichst reine Population adulter, sekretorisch aktiver caniner Schwannscher Zellen aus einer wenige Zentimeter messenden Nervenbiopsie kultiviert werden.

## **II. Literaturübersicht**

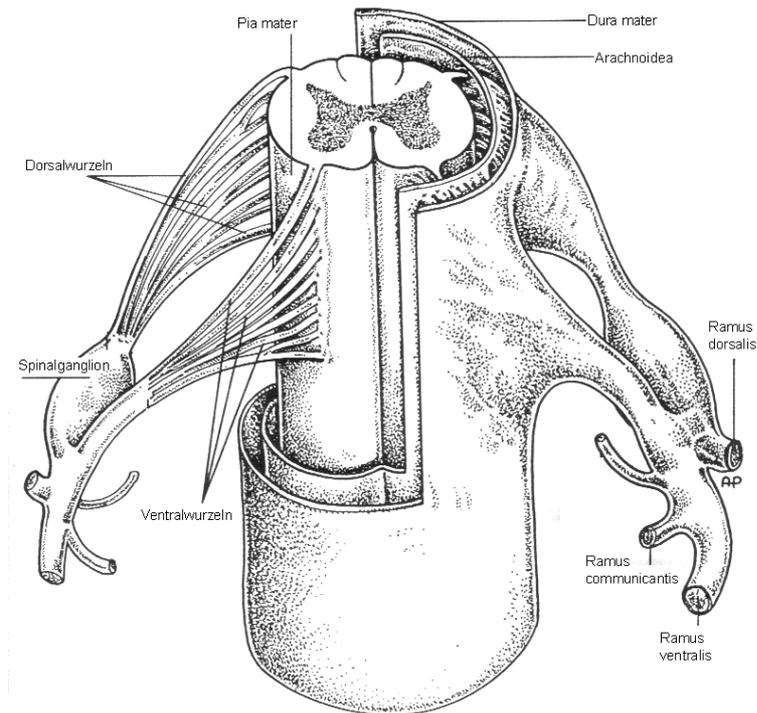
### **1. Übersicht über das Nervensystem der Säuger**

Das Nervensystem (NS) wird in ein zentrales (ZNS) und ein peripheres Nervensystem (PNS) eingeteilt. Das ZNS beinhaltet Gehirn und Rückenmark einschließlich ihrer Hüllen, das PNS alle Strukturen, die außerhalb dieser Hüllen liegen. Hierzu gehören das somatische sowie das vegetative oder auch autonom genannte NS.

Das somatische NS setzt sich zusammen aus einem sensorischen (afferenten) und einem motorischen (efferenten) Anteil. Die Erregung wird durch afferente Neuronen von den peripher gelegenen Nervenendigungen der Haut (sensible Nerven) oder von den Sinneszellen (sensorische Nerven) über meist lange Dendriten zu den Nervenzellkörpern geleitet. Diese liegen in den Spinalganglien nahe dem RM im For. intervertebrale, außerhalb des ZNS. Von hier gelangt die Erregung über das kurze Axon in der Dorsalwurzel zur Dorsalsäule der grauen Substanz des Rückenmarks. Von den im Ventralhorn der grauen Substanz, zentral gelegenen Nervenzellkörpern der efferenten Neuronen aus erfolgt die Erregungsleitung über die Ventralwurzel in die Peripherie (Abb. 1).

Die Spinalnerven können in Segmental- und Plexusnerven unterteilt werden.

Die Segmentalnerven verlaufen isoliert und annähernd parallel zueinander. Sie gliedern sich in Dorsal- und Ventral- sowie weiterhin in Dorsomedial- und Dorsolateral- bzw. Ventromedial- und Ventrolateraläste.



**Abb. 1: Schema des somatischen Nervensystems**

(modifiziert aus: Le Point Veterinaire 27; 171, 1995)

Die Plexusnerven gehen aus Nervengeflechten hervor, die aus dem Zusammenfluß der Ventraläste mehrerer Spinalnerven entstehen. Innerhalb des Plexus findet ein Faseraustausch der einzelnen Ventralnervenäste statt (BUDRAS et al., 1996).

Das autonome NS innerviert mit efferenten Neuronen u.a. die glatte Muskulatur, die Eingeweide sowie die exokrinen Drüsen. Es koordiniert und steuert die Funktion der inneren Organe. Diese Vorgänge laufen unbewußt ab. Der efferente Teil des autonomen NS teilt sich in zwei Teilstrecken-Neuronen. Die Nervenzellkörper des proximalen Anteils liegen im ZNS in der Zona intermedia des thorakolumbalen (Sympathikus) bzw. sakralen (Parasympathikus) Rückenmarks. Von ihnen aus ziehen die präganglionären, markhaltigen Fasern im Ramus communicans albus zu den peripher gelegenen autonomen Ganglien, wo die synaptische Verschaltung zu den postganglionären, marklosen Fasern erfolgt. Diese ziehen entweder direkt zu den Effektorstrukturen oder in den Rami communicantes grisei zu den peripheren Spinalnerven.

Die afferenten, viserosensiblen Neuronen des autonomen NS leiten die Erregung von der Peripherie zum ZNS. Ihre Zellkörper liegen in der Nähe des ZNS in autonomen Ganglien (BROWN, 1991).

Das autonome NS, besonders der sympathische Anteil, neigt zur Plexusbildung. Diese Plexus sind bevorzugt um große Arterienstämme angeordnet (KANDEL et al., 1996).

## 2. Neuron und Nerv

Die eigentliche Nervenzelle, die für die Erregungsleitung zuständig ist, ist das Neuron. Es besteht aus dem Zellkörper oder Soma, das den Zellkern und Organellen enthält, zahlreichen darin mündenden Dendriten sowie dem Axon, das gemeinsam mit seinen Hüllen die Nervenfaser bildet. Soma und Dendriten stellen den rezeptiven Teil der Zelle dar, auf dessen Oberfläche zahlreiche Synapsen anderer Neuronen enden, während das Axon den efferenten Teil bildet. Das Axon kann von wenigen Zehntel Mikrometern bis zu mehreren Metern (in sehr großen Tierarten) lang sein. An seinem Ende weist es mehrfache Verzweigungen auf, die letztlich in ihren Telodendria synaptische Boutons bilden. Hier erfolgt die Erregungsweiterleitung an die postsynaptische Membran.

Der von mehreren Nervenfaserbündeln gebildete periphere Nerv ist oberflächlich vom Epineurium überzogen. Von hier aus strahlt lockeres Bindegewebe mit Fettgewebe als Paraneurium in die Umgebung aus und dient zur Fixation an Nachbarstrukturen.

Ein Nervenfaserbündel ist umgeben vom Perineurium, das in eine äußere Pars fibrosa und eine innere Pars epithelioidalis unterteilt werden kann. Das Endoneurium stellt lockeres, feinfaseriges Bindegewebe zwischen den einzelnen Axonen dar (Abb.10 A).

Die Nervenfasern werden in Abhängigkeit von ihrer Leitungsgeschwindigkeit folgendermaßen eingeteilt (KANDEL et al., 1996):

A-Fasern sind myelinisierte somatische Fasern mit einem Durchmesser zwischen 2 und 20  $\mu\text{m}$ . Ihre Leitungsgeschwindigkeit beträgt zwischen 5 und 120m/sek. Es erfolgt innerhalb der Gruppe A eine Unterteilung in alpha-, beta-, gamma- und delta-Fasern, womit eine absteigende Geschwindigkeit beschrieben wird.

B-Fasern sind ebenfalls myelinisiert. Sie stellen efferente, präganglionäre autonome Fasern mit einem Durchmesser von 1 bis 3  $\mu\text{m}$  und einer Geschwindigkeit von 3 bis 14 m/sek dar.

C-Fasern sind nichtmyelinisierte Fasern. Sie können sowohl afferent als auch efferent sein. Beispielsweise zählen dazu die postganglionären Fasern des autonomen NS oder thermo- und nociceptive Afferentien aus der Haut.

### 3. Neuroglia

#### a. Definition

Gliazellen machen den Großteil der Zellen im Nervensystem aus. Ihr Name leitet sich von dem griechischen Wort für „Leim“ ab. Sie nehmen nicht unmittelbar an der Fortleitung von Nervenimpulsen teil, da sie keine Natriumkanäle haben, übernehmen aber eine Vielzahl anderer Funktionen (BRADFORD, 1986), darunter z. B.:

- mechanische Stabilisierung der Neuronennetzwerke
- Phagocytose
- Regulation der Kalium-Ionengehalte in der extrazellulären Flüssigkeit
- Transmitterbeseitigung
- Myelinscheidenbildung
- Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke
- Narbenbildung im Rahmen der reaktiven Gliosis nach Verletzungen des Nervensystems sowie
- die Leitschienenbildung bei der Nervenentwicklung und Nervenregeneration

Der wichtigste Gliazelltyp im PNS sind die Schwannzellen, die hier unter anderem für die Myelinbildung zuständig sind (BROWN, 1991; NICHOLLS, 1994; KANDEL et al., 1996; ).

#### b. Die Schwannsche Zelle und die Myelinogenese im PNS

Die Schwannschen Zellen bilden im PNS die Myelinscheiden. Das Myelin wurde von Rudolf Virchow im Jahre 1864 nach dem griechischen Wort „myelos“ für Mark benannt, da er im Mark des Gehirns besonders viel von dieser Substanz gefunden hatte.

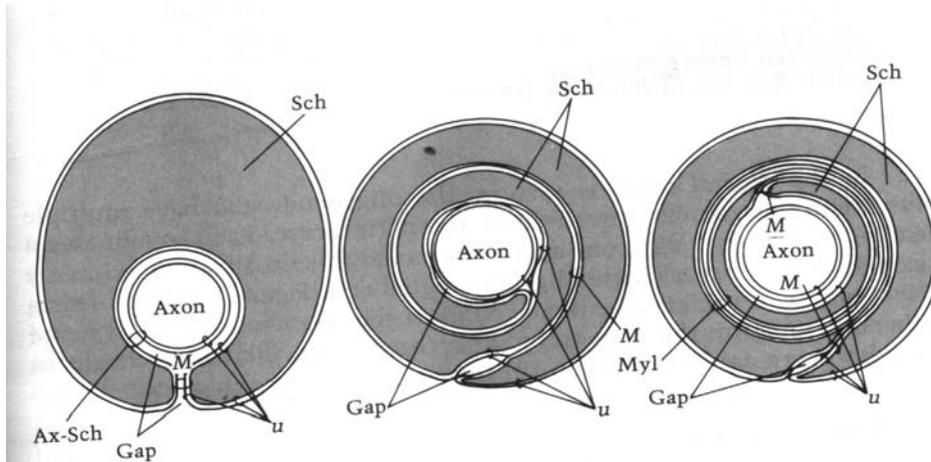
Im Querschnitt betrachtet stellt das Myelin eine kompakte Ansammlung 12nm breiter, konzentrisch um das Axon herumgewickelter Lamellen dar (BRADFORD, 1986).

Der Hauptanteil seines Trockengewichtes sind Lipide (ca.75%), die restlichen ca.25% bestehen aus Proteinen. Die fettigen Elemente setzen sich zusammen aus 60% Glycolipiden sowie Phospholipiden und Cholesterol. Die Hauptmasse der Proteine im PNS stellt die Gruppe der MBP (myelin basic proteins). Es handelt sich dabei um mindestens sieben verwandte Proteine, die von einem einzigen Gen durch alternatives RNA-Splicing entstanden

sind (MORELL und NORTON, 1980). Das basische Protein P0 macht den größten Anteil aus, die verbleibenden 10-20% nehmen die Proteine P1 und P2 ein.

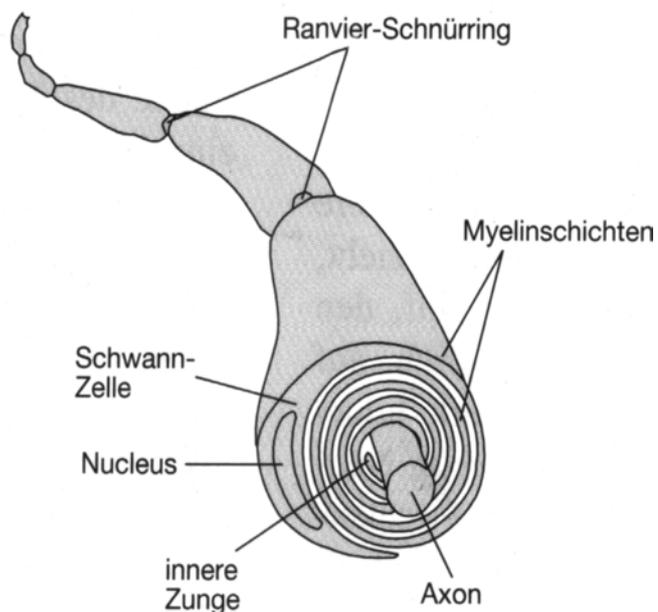
Eine Myelinlamelle besteht aus kondensierten Membranen mit wechselnder Protein-Lipid-Schichtung. Die Lipidschicht ist ca. 5,5nm, die Proteinschicht ca. 3nm dick. Der Aufbau entspricht dem Bau von Zellmembranen. Auch im Myelin findet man eine Lipiddoppelschicht zwischen einer inneren und einer äußeren Proteinschicht. Der Unterschied zu normalen Zellmembranen liegt in der molekularen Zusammensetzung. Zellmembranen enthalten weniger Lipide, dafür einen größeren Anteil und auch eine größere Variation an Proteinen (BROWN, 1991). Der hohe Lipidanteil im Myelin ist wichtig für seine isolierende Funktion an der Nervenfaser durch Abstoßung von Wasser und wasserlöslichen Ionen wie Natrium und Kalium.

Man unterscheidet im PNS myelinisierte und nichtmyelinisierte Nervenfasern. Bei der myelinisierten Faser ist eine SC mit einem Axon assoziiert (Abb. 2). Sie bildet dabei einen Zytoplasmaausläufer, der zunächst das Axon umfließt. Es entsteht eine aus einer Doppelmembran bestehenden Struktur, das Mesaxon. Dieses bildet eine flache, breite „Zunge“, die kaum noch Cytoplasma enthält. Die Zunge wickelt sich mehrfach um das Axon herum. Jede Windung besteht somit aus zwei Zellmembranen. Die Innenseiten der Zellmembranen, d.h. die Proteinschichten, verschmelzen miteinander. Im Querschnitt stellen sie im Mikroskop eine dunkle Linie dar. Die Außenseiten bleiben getrennt und sehen im Querschnitt aus wie helle Linien. Innerhalb der Myelinscheiden im PNS gibt es Kanäle, die von der innersten Wicklung bis zum Zellkörper der SC verlaufen. Es handelt sich um die Schmidt-Lantermanschen- Inzisuren. Ihre Aufgabe ist noch nicht geklärt. Möglich wäre sowohl eine Funktion als Gangsystem für Metaboliten und deren Zugang in den periaxonalen Raum als auch eine Schutzwirkung gegen Zugkräfte, da die Inzisuren eine leichte Elongation der Myelinschicht zulassen.



**Abb. 2: Myelinogenese im PNS; Ax-Sch=Axon- bzw. Schwannzell-Membranen, u=Membranen, die Mesaxon bilden, Gap=Lücke zwischen den Membranen, Sch=Schwannzelle, M=Mesaxon, Myl=Myelin**  
(aus: Bradford et al.: Chemical Neurobiology. New York, 1986)

Über die Länge eines myelinisierten Axons betrachtet ist die Myelinscheide segmental in einer Serie von Internodien angelegt. Diese werden getrennt durch die Ranvierschen Schnürringe, wo das Axolemm nicht von Myelin bedeckt ist (Abb 3). Ein Internodium stellt die Länge des Myelins dar, das von einer einzelnen SC gebildet wird. Die Schnürringe entsprechen den Abständen zwischen den einzelnen SC, die gemeinsam an der Myelinscheide eines Axons beteiligt sind.



**Abb. 3: Axon mit Schwannscher Scheide**

(aus: Kandel et al.: Neurowissenschaften. Heidelberg, 1996)

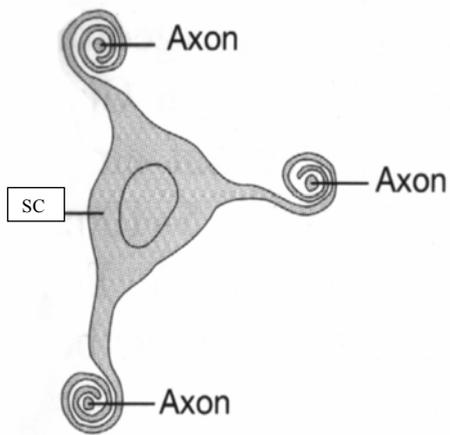
Die Aufgabe der Myelinschicht ist die Isolierung des Axolemm. Sie bedingt, daß eine Signalfortpflanzung nur saltatorisch, d.h. von Ranvierschem Schnürring zu Schnürring stattfinden kann. Nur an diesen Stellen steht das Axolemm mit dem Extrazellularraum in Verbindung. Nur hier kann eine Depolarisierung der Membran stattfinden. An diesen Stellen ist die Dichte der Natrium-Kanäle erhöht.

Die Erregungsleitung ist in myelinisierten Fasern aufgrund der Saltation sehr schnell. Zusätzlich ist ein geringerer Natrium-Influx ausreichend für eine Depolarisierung, da nur kleine Membranbezirke freiliegen. Dies wiederum bedeutet einen geringeren Energieverbrauch, um die Ionen nach dem Aktionspotential wieder aus der Zelle hinauszupumpen.

Die auslösenden Mechanismen und der genaue Vorgang der Myelinogenese ist noch nicht ausreichend untersucht. Während der frühen Myelinisierung der peripheren Nerven läßt sich bei SC das MAG (myelin associated glycoprotein) nachweisen. MAG ist in der voll entwickelten Myelinscheide vor allem in der an das Axon angrenzenden Membran lokalisiert. Das Glycoprotein gehört zur Proteinsuperfamilie der Immunglobuline und weist außerdem strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Zelladhäsionsmolekülen auf, z.B. mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM (s.u.) und mit Proteinen des MHC (major histocompatibility complex). Diese strukturellen Ähnlichkeiten, seine frühe Expression sowie seine Lokalisation in der Zelle lassen vermuten, daß MAG eines der Adhäsionsmoleküle ist, das für die Einleitung der Myelinogenese wichtig ist.

Auch nichtmyelinisierte Nervenfasern sind mit SC assoziiert. Hierbei bedient eine einzelne SC mehrere Axone (Abb. 4). Beim Pferdennerv können dies bis zu 14 Axone sein. Die SC liegen in langen Reihen, wobei sie mehrfache Aufzweigungen und Anastomosen bilden und letztlich die Axone darin einbetten (SUMMERS et al., 1995).

Offenbar sind SC bipotent. Unter bestimmten Bedingungen können sie entweder eine Myelinscheide bilden oder unmyelinisierte Axone als zytoplasmatische Scheiden umgeben. Welche Funktion sie übernehmen hängt u.a. vom axonalen Kontakt ab (HALL, 1978).



**Abb. 4: nicht myelinisierte Axone im PNS**

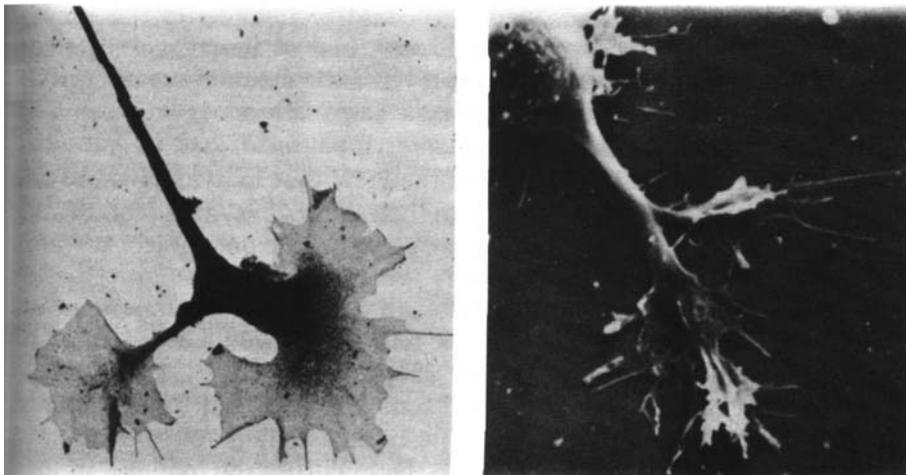
(modifiziert aus: Kandel et al.: Neurowissenschaften. Heidelberg, 1996)

#### 4. Die Regeneration peripherer Nerven

##### a. Prinzip des axonalen Auswachsens

Das Prinzip des Auswachsens eines Axons gilt gleichermaßen für die Entwicklung des PNS wie für die axonale Regeneration nach Verletzungen.

Beide Vorgänge laufen über die Ausbildung eines Wachstumskegels (Abb. 5a,b). Seine Bedeutung liegt u.a. in der Wirkung als „Rammbock“, d.h. er bahnt einen Weg durch das dichte Neuroepithel, indem seine Filo- und Lamellopodien sich ständig vorstrecken und wieder zurückziehen.



**Abb. 5a,b: Wachstumskegel**

(aus: Bradford et al.: Chemical Neurobiology. New York, 1986)

Der Wachstumskegel scheint sich geordnet und direkt zum Zielort zu bewegen.

ROGER SPERRY (1943) versuchte hierfür eine Erklärung zu finden. Am Sehsystem der Molche, dessen Besonderheit die erhaltengebliebene Regenerationsfähigkeit der Neuronen ist, untersuchte er die Axonregeneration nach der Sehnervdurchtrennung, nachdem das Auge in seiner Höhle um 180° gedreht worden war. Die visuelle Welt des Molches war daraufhin, seinem Verhalten nach zu urteilen, umgekehrt. SPERRY (1943) schloss daraus, daß die Axone der retinalen Ganglienneuronen wieder Kontakt mit ihrem ursprünglichen Zielort im Tectum opticum aufgenommen hatten. Man stellte die Hypothese auf, daß die Regenerationsrichtung abhängig ist von spezifischen chemischen Affinitäten zwischen individuellen Neuronen.

Den neurotrophen Einfluß des distalen Stumpfes durchtrennter peripherer Nerven auf die axonale Regeneration stellten auch ABERNETHY et al. (1992) fest. Sie ließen den durchtrennten N. ischiadicus von Ratten durch eine Y-förmige Silikonröhre regenerieren, wobei nur ein Schenkel des Y mit dem distalen Stumpf verbunden war, während im anderen Schenkel ein Fettpolster befestigt war. Sie stellten eine eindeutige Präferenz der Axone fest, in Richtung des distalen Stumpfes zu regenerieren.

### **b. Hintergründe des axonalen Auswachsens**

Zur Erklärung dienen drei Hypothesen. Vermutlich kommt ein Zusammenspiel der drei Mechanismen dem tatsächlichen Geschehen am nächsten.

Die folgenden Zusammenhänge gelten wiederum sowohl für die Entstehung axonaler Bahnen in der Entwicklung als auch für die Regeneration von Axonen nach Läsionen.

### **Galvanotropismus**

Erwiesenermaßen wächst ein Axon in vitro in einem elektrischen Feld schneller in Richtung der Kathode. Dabei ist ein Gradient von 7mV/mm ausreichend (PURVES und LICHTMAN, 1985).

Folgende Zusammenhänge könnten hinter diesem Phänomen stehen:

- eine elektrophoretische Bewegung von Plasmalemm-Molekülen
- eine lokale Akkumulation von NGF-Rezeptoren und anderen Liganden wie z.B. Calcium-Kanälen
- eine lokale Beeinflussung des Membranpotentials
- eine Modulation der Ionen-Leitfähigkeiten

(JAFFE, 1979; PATEL und POO, 1982; SHIBIB et al., 1988)

### **Chemoaffinitätshypothese**

Die einzelnen Neuronen erhalten in der Frühphase ihrer Entwicklung spezifische molekulare Marker, die zur Ausbildung von Verknüpfungen zwischen zwei Neuronen führen, abhängig vom Zusammenpassen der Oberflächenmoleküle auf der prä- und postsynaptischen Membran. Es kann sich gleichzeitig auch um lokale Leitmoleküle im Umfeld des Axons handeln. Hierzu zählen die **CAM** (**cell adhesion molecules**), die den Zell-Zell-Kontakt zwischen dem Wachstumskegel und der Oberfläche von Nachbarzellen oder Molekülen der extrazellulären Matrix (**ECM**) herstellen.

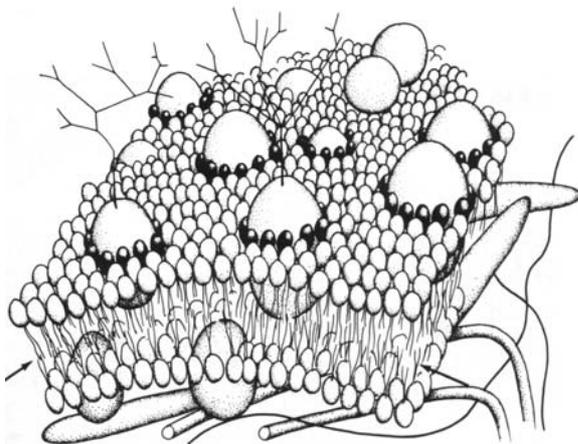
Die **CAM** werden von drei Glycoproteingruppen gebildet:

- **Immunoglobulin-Superfamilie**
- **Cadherine**
- **Integrine**

Zu den **ECM**-Molekülen zählen Glycoproteine wie Kollagen (Typ I, III und IV), Laminin, Fibronectine u.a.

### **CAM (cell adhesion molecules)**

Allen CAM ist gemeinsam, daß es sich um transmembranöse axon-assoziierte Proteine handelt, die z.B. auf der Oberfläche des Wachstumskegels liegen und dadurch das Axonwachstum und seine Regeneration unterstützen (Abb. 6). Es sind vielfache Interaktionen zwischen den verschiedenen CAM untereinander sowie zwischen CAM und ECM-Molekülen nachgewiesen worden.



**Abb. 6: Lipiddoppellayer mit transmembranösen Proteinen**

(aus: Bradford et al.: Chemical Neurobiology. New York, 1986)

Beispiele für CAM:

**MAG** ist ein von Oligodendrocyten und SC produziertes membranassoziertes Glykoprotein, ein Transmembranprotein. Es gehört zur Oberfamilie der Immunglobuline. Es existieren zwei Isoformen von 67 bzw. 72 kDa mit unterschiedlich großen cytoplasmatischen Domänen. MAG wird während des Myelinisierungsprozesses gebildet und bleibt im adulten Organismus in myelinbildenden Zellen nachweisbar. MAG regelt über Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen bzw. Gliazellen untereinander die Bildung des Myelins, bestimmt die Dicke der Myelinschicht, moduliert das Axonwachstum bei der Regeneration u.a.. Im adulten peripheren Nerv ist MAG ein Inhibitor der Axonregeneration.

MAG hat einen hohen Homologieanteil mit **NCAM** (neuronal cell adhesion molecule). Während der Myelinogenese findet man hohe Konzentrationen von NCAM und geringere von MAG (BRADFORD, 1986). In der adulten myelinisierten Nervenfasern liegt das Verhältnis andersherum. Hieraus wurde geschlossen, daß MAG die normale periaxonale Struktur aufrechterhält, indem es als Verleimung bzw. Platzhalter fungiert.

Am Beispiel des N. opticus fand man heraus, daß die Myelinisierung in MAG-defizienten Mäusen nicht so fein reguliert wird wie in der Kontrollgruppe. Der Anteil an unmyelinisierten Fasern steigt. Z.T. findet man überschüssiges, freies Myelin oder auch mehrfach myelinisierte Fasern. Die Ursache wurde in einer verzögert einsetzenden Myelinogenese bei MAG-Mangel vermutet (LI et al., 1998).

NCAM tritt im frühen Entwicklungsstadium bei Blastodermzellen auf. Zu diesem Zeitpunkt ist auch **LCAM** nachweisbar (liver cell adhesion molecule) (EDELMAN et al., 1985).

Auf Neuroektodermzellen tritt NCAM verstärkt auf, während LCAM nur noch auf nichtneuronalen Ektodermzellen zu finden ist. Während der Migration der neuralen Zellen ist NCAM gar nicht vertreten (PURVES und LICHTMAN, 1985). Auf den Neuronen der am Zielort gebildeten Ganglien findet eine de novo Expression in einer adulten Form, dem **NgCAM (=L1)** statt (GALLIN et al., 1983). NgCAM wird nicht von Gliazellen ausgebildet. Es ist zuständig für Zellkontakte zwischen Neuronen und Glia.

Zu weiteren CAM zählen **Neurofascin**, **F11(=Contactin=F3)**, **Axonin** u.a..

Die Existenz repellenter Moleküle, die den Wachstumskegel abstoßen können, wird ebenfalls diskutiert. Zu diesen zählen beispielsweise **Tenascin C** oder **Aggrecans**, die auch zu den ECM gehören.

### **Chemotropismus**

Axone werden durch Faktoren angezogen, die von den Zielzellen oder von Zellen, die auf dem Weg zum Zielgewebe liegen, sezerniert werden: **Neurotrophine**. Es entsteht ein Konzentrationsgefälle, dem das Axon folgt. Werden über Neurotrophin-Rezeptoren Signale von der Axonmembran empfangen, werden verschiedene Regulatoren der Rho-GTPasen hochreguliert. Eine Rho-GTPase liegt in ihrer aktivierten Form vor, wenn sie an GTP gebunden ist. Sie ist inaktiv, wenn durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität das gebundene GTP zu GDP und P hydrolysiert wird. Die aktivierte Rho-GTPase interagiert mit Effektorproteinen, zu denen z.B. die Phosphatidylinositolmonophosphatkinase gehört.

Diese dient der Bildung von Second Messengers wie Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphat (PtdInsP2). PtdInsP2 kontrolliert das Wachstum und die Verformungen des Wachstumskegels, indem es die Aktivität der aktinbindenden Proteine Profilin, Gelsolin und Vinculin beeinflusst. Außerdem dient PtdInsP2 der regulierten Exocytose und erleichtert dadurch das Wachstum (PALANIVELU und PREUSS, 2000).

### **•Neurotrophine**

Neurotrophine (NT) stellen eine Proteinfamilie dar, die die Entwicklung und das Überleben von Neuronen sichert.

### **Der Nerve growth factor: NGF**

NGF ist das am besten bekannte, da am längsten erforschte Neurotrophin. Es wurde 1948 von Rita Levi-Montalcini entdeckt (COWAN, 2001). In drei Tage alten Kükenembryonen ersetzte sie die Gliedmaßenknospen durch ein Stück Vogel- oder Säugertumor. Nur eine Tumorart wuchs daraufhin aus, das Sarkom 180 von der Maus. Der Embryo innervierte den Tumor mit Nervenfasern aus benachbarten sensorischen Ganglien, die sich stark vergrößerten. Außerdem entwickelte sich das sympathische Nervensystem insgesamt überdimensional stark. Der Tumor mußte eine Substanz an die Blutbahn abgeben, die einen entsprechenden Einfluß auf das sympathische Nervensystem ausübte. Diese Substanz wurde als NGF bezeichnet.

NGF wird sowohl während der Entwicklung als auch während der Nervenregeneration durch das Zielgewebe ausgeschüttet. Das Zielgewebe wirkt so auf die auswachsenden Axone neurotrop. Die Spitze der wachsenden Nervenfasern orientiert sich am Konzentrationsgefälle von NGF.

NGF ist ein Protein-Dimer mit drei Disulfidbrücken über die Aminosäure Cystein. Sein Molekulargewicht beträgt 140000. Man kann eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit differenzieren. Die biologische Aktivität liegt in der  $\beta$ -Untereinheit, die aus zwei identischen, 118

Aminosäuren zählenden Ketten besteht. Die  $\alpha$ -Untereinheit wirkt regulatorisch, die  $\gamma$ -Untereinheit stellt eine potente Peptidase dar.

- In der normalen neuralen Entwicklung gehen bis zu 50% aller ursprünglich gebildeten Neuronen verloren. Es handelt sich hierbei um programmierten Zelltod, die Apoptose.

NGF erhöht die Zahl der Neuronen in den sympathischen Ganglien, indem es unreife Neuronen, die normaler Weise im Laufe der Entwicklung absterben würden, überleben lässt. Möglicherweise gelingt dies über die Unterdrückung eines Zelltodprogrammes bei postmitotischen Zellen.

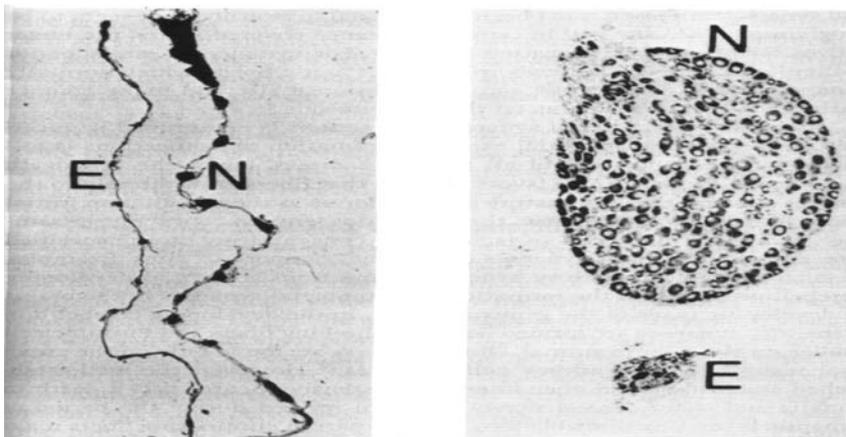
- NGF vergrößert die Neuroblastenzahl sowie die Neuronen-Größe.

- In sensorischen Ganglien erhöht es die Synthese von Neurotransmittern, wenn es nach der Synapsogenese appliziert wird.

- Werden NGF-Antikörper in neonatale Nager injiziert, so degeneriert die sympathische Ganglienkette, und auch die Neuronenzahl in den sensorischen Spinalganglien verringert sich. Das Überleben sowohl sympathischer als auch sensorischer Neuronen ist also NGF abhängig.

- Altersunabhängig induziert NGF eine erhöhte Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase und der beta-Dopamin-Hydroxylase in den sympathischen Neuronen und in den Zellen des Nebennierenmarks auf posttranskriptioneller Ebene. Dadurch steigen die Konzentrationen von Acetylcholin und Noradrenalin.

- NGF verstärkt das Wachstum peripherer sympathischer Axone und sensorischer Ganglien sowohl in vitro als auch in vivo (Abb. 7a,b).



**Abb. 7a,b: Effekt des NGF: N: normale Ganglienkette bzw. Querschnitt durch normales Ganglion, E: Ganglienkette bzw Querschnitt durch Ganglion nach dreitägiger Behandlung mit Antiserum gegen NGF**

(aus: Bradford et al.: Chemical Neurobiology. New York, 1986)

Die Höhe und die Dauer der Signalwirkung von NGF allgemein ist abhängig vom Verhältnis der zwei Rezeptoren für dieses Molekül, die auf Zelloberflächen existieren (TWISS et al. 1998).

Man unterscheidet einen low affinity-Rezeptor, bezeichnet mit p75LNTR, der schnell „an- und abschaltet“, sowie einen high affinity-Rezeptor namens TrkA, der langsamer „an- und abzuschalten“ ist. Die maximale Antwort wird erreicht bei einem Verhältnis von 5:1.

P75LNTR ist nicht in der Lage, in Abwesenheit von TrkA eine Antwort zu provozieren. Man vermutet eine modulierende Rolle des p75LNTR.

TrkA enthält eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Dieser Rezeptor ist stark spezifisch für die verschiedensten Neurotrophine. So gibt es neben dem TrkA für NGF auch TrkB für BDNF (brain derived neurotrophic factor) und TrkC für NT3 (Neurotrophin 3).

Neben NGF gibt es eine große Zahl weiterer Neurotrophine (NT), z.B. **BDNF** (brain derived neurotrophic factor), **GDNF** (glial cell line derived neurotrophic factor), **bFGF** (basic fibroblast growth factor), **TGF $\alpha$**  (transforming growth factor), **IGF1** (insulin like growth factor), **PDGF** (platelet derived growth factor), **IL6** (Interleukin6), **NT3** (Neurotrophin3) sowie **NT4/5** und **CNTF** (ciliary neurotrophic factor).

Strukturell ist allen Neurotrophinen gemeinsam, daß es sich um sekretorische Proteine handelt. Die Sekretion findet in Form von nicht-kovalent gebundenen Homodimeren statt, die über drei Disulfidbrücken verfügen. Der Molekülteil, der die biologische Aktivität codiert, liegt immer in der Carboxylhälfte des Moleküls (BRADFORD, 1986; KANDEL et al., 1996).

Abgesehen von diesen Ausführungen, die das axonale Auswachsen generell betreffen, werden zwei Vorgänge beschrieben, die spezifisch sind für die Reaktion eines peripheren Neurons nach einer Verlaufstrennung des Axons. Dies sind die retrograde Antwort und die Wallersche Degeneration.

### **c. Die retrograde Antwort des Zellkörpers**

Nach Verlaufstrennung eines peripheren Axons treten Veränderungen sowohl in den beiden Stümpfen als auch in dem dazugehörigen Zellkörper ein. Die Reaktion des Zellkörpers nennt man retrograde Antwort, axonale Reaktion oder auch zentrale Chromatolyse (GRAFSTEIN, 1975). Sie besteht in einer massiven Reorganisation der Nucleolus-Struktur sowie des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (rER).

Die Veränderungen im Zellkörper sind ab dem 2./3. Tag nach der Verletzung erkennbar. Sie erreichen ihr Maximum nach 1-3 Wochen. Der Zellkörper erscheint geschwollen mit abgerundeten Konturen. Die basophilen Nissl-Körperchen im Zellzentrum sind zu einem wolkig aussehenden Material reduziert, was eine zentrale Blässe nach sich zieht. Der Nucleolus nimmt an Größe zu. Die Kernmembran ist nicht mehr deutlich zu erkennen, z.T. erscheint sie auch irregulär mit einer basophilen Kappe aus Polysomen und rauhem Endoplasmatischem Retikulum. Ein Hauptgeschehen ist die Desintegration des rauhen Endoplasmatischen Retikulums, das zusammen mit freien Polysomen die Nisslsubstanz der Neuronen bildet. Der Zusammenbruch der Nisslsubstanz geht einher mit einer vermehrten Zahl freier Polyribosomen.

Funktionell gesehen führt dies zu einem erhöhten RNA-Gehalt und einer gesteigerten selektiven Proteinbiosynthese im Zellkörper. Erhöht wird unter anderem die Produktion von  **$\alpha$ -Tubulin** (SKENE, 1986) und **Actin**molekülen, die das Längenwachstum des Axons bewirken.

Auch die Expression des **GAP-43** Proteins (growth associated protein) wird verstärkt (SKENE, 1986). SHADIACK et al. (1998) haben im Rahmen ihrer Untersuchungen am Ggl. cervicale craniale adulter Ratten über die Modifikationen der Gen-Expression nach peripheren axonalen Verletzungen feststellen können, daß einerseits die Verfügbarkeit des vom Zielgewebe stammenden NGF verringert ist, während andererseits die Bildung des **LIF** (leukemia inhibitory factor) in nichtneuronalen Zellen induziert wird. Diese beiden synergistisch wirkenden Veränderungen haben zur Folge, daß die Expression von **Galanin** durch betroffene Neuronen stimuliert wird (SAIKA et al., 1991; WYNICK, 2001).

Galanin wiederum spielt eine Rolle in der peripheren Nervenregeneration. Es wird vermutet, daß es einen trophischen Effekt auf Neuronen ausübt, die ihre vom Zielgewebe stammenden trophischen Faktoren entbehren. Der Wirkungsmechanismus des Galanins ist noch unbekannt. Man weiß weder ob der mitogene Effekt über Neuronen, SC, Makrophagen oder andere Zellen zustande kommt, noch ob sich die Wirkung im Zellkörper oder am Wachstumskegel abspielt. Ein anterograder Transport von Galanin nach Nervenläsionen in Form von Vesikeln gilt allerdings als erwiesen (SHADIACK et al., 1998).

Neben Galanin steigt nach Nervenverletzungen auch die Produktion anderer Proteine durch die Neuronen, z.B. von **VIP** (vasoactive intestinal peptide).

Verringert wird hingegen die Synthese von Neurofilamenten. Da die Neurofilamente für das Dickenwachstum des Axons zuständig sind, führt ihre Verringerung dazu, daß regenerierte Axone im Durchmesser kleiner sind als zuvor.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß auch der Gruppe der Melanocortine (MC), in der das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) mit seinen Analoga sowie die Melanozyten stimulierenden Hormone (MSH) zusammengefasst werden, ein regenerationsfördernder Einfluß auf verletzte periphere Nerven zugesprochen wird. Dieser manifestiert sich hauptsächlich im Stadium des initialen Aussprossens. Es entwickelt sich bei Applikation der MC eine größere Anzahl von Sprossen, während die Wachstumsgeschwindigkeit unverändert bleibt (VERHAAGEN et al., 1987). Der Durchmesser der Axone nimmt jedoch ab. MSH existiert im peripheren Nervengewebe nicht, auch nicht nach Nervenverletzungen. Wohl aber fand man MSH-ähnliche Aktivität nach einer Nervenläsion (VERHAAGEN et al., 1988).

Die Quelle dieses endogenen,  $\alpha$ -MSH-ähnlichen Peptids, das auch bei hypophysektomierten Ratten nach Nervenläsion auftritt, steht inzwischen fest. Es entsteht bei der Hydrolyse des intermediären Neurofilaments NF150 im degenerierenden Nervenstumpf, wo es seinen regenerationsfördernden Einfluß optimal ausüben kann (EDWARDS et al., 1984). Der Wirkungsmechanismus des neurotrophischen Effekts der MC ist bis heute unbekannt.

Auch die Produktion von Transmitterenzymen in der geschädigten Nervenfasern sinkt.

Zur retrograden Antwort gehört außerdem eine Zunahme der Lysosomenzahl, die mit einer erhöhten Aktivität der sauren Phosphatase einhergeht. Während der ersten Woche nach Axotomie ist diese auf Makrophagen beschränkt, während sie ab der zweiten Woche, in der der chemische Abbau des Myelins erfolgt, auch in SC gefunden werden kann (WELLER und MELLICK, 1966).

#### **d. Die Wallersche Degeneration des Axons**

Als Wallersche Degeneration bezeichnet man den Degenerationstyp, der nach einer Nervendurchtrennung oder -quetschung im distal der Läsion gelegenen Nervenstumpf erfolgt (THOMAS und KING, 1974).

In **myelinisierten Fasern** beginnt sie mit einer geringfügigen Retraktion des Myelins an den Ranvierschen Schnürringen. 12-36 Stunden nach dem Trauma fangen die Internodien an, sich in lineare Serien von Ellipsoiden aufzuteilen. Es entstehen segmentierende Konstriktionen an den Schmidt-Lantermann-Inzisuren. Die Schwellung innerhalb des internodalen Myelins wird verursacht durch periinzisurale Dilatationen, während die cytoplasmatischen Spiralen der Inzisuren intakt bleiben. Die Dilatationen werden auch als „Verdauungskammern“ bezeichnet, da sie mit Myelintrümmern und axonalen Fragmenten gefüllt sind. Im Zuge der axonalen Degeneration stellen die SC die Produktion von Myelinmembrankomponenten ein. Die

Basallamina, die SC und Myelin umgibt, bleibt um das desintegrierende Myelin und das Axon herum erhalten, ebenso wie das mit ihr assoziierte endoneurale Kollagen.

Im distalen Stumpf beginnen ca. 3 Tage nach der Verletzung die SC zu proliferieren. Je mehr große Fasern der Nerv enthält, umso stärker ist ihre Proliferation. Die proliferierten SC legen sich in longitudinalen Ketten aneinander und bilden die sogenannten Büngner Bänder aus, die die regenerierenden Nervenfasern, die vom proximalen Stumpf kommen, empfangen und dirigieren.

Die NGF-Produktion in den SC wird innerhalb der ersten 6 Stunden post laesionem stark erhöht und bleibt für mehrere Wochen auf erhöhtem Niveau (HALL, 1989).

Innerhalb der ersten zwei Wochen steigt außerdem die Expression des p75LNTR auf der Membran von SC des distalen Stumpfes um ein 50Faches an (TANIUCHI et al., 1988).

NGF induziert dabei die Synthese der eigenen Rezeptoren auf der SC-Oberfläche. Durch dieses Zusammenspiel sowie durch die verstärkte Produktion weiterer Neurotrophine durch die SC wie BDNF (ACHESON et al., 1991), NT3 (SCHECTERSON und BOTHWELL, 1992) und PDGF (ECCLESTON et al., 1993) kommt es zu einem starken neurotrophen Einfluß des distalen Stumpfes auf die proximal regenerierenden Axone.

Das axonale Aussprossen per se ist unabhängig vom distalen Stumpf. Ein Axon kann erwiesenermaßen über eine gewisse Länge regenerieren, wenn der neurotrope Einfluß des Stumpfes auf verschiedene Weisen unterbrochen wird. Nach 5mm sistiert jedoch die Regeneration (DANIELSEN et al., 1983).

Phagocyten entfernen den Großteil der Zelltrümmer. Den Hauptteil der phagocytierenden Zellen machen vermutlich hämatogen eingewanderte Makrophagen aus, die die SC-Basallamina penetrieren und so eine intratubale Position einnehmen. Normalerweise beträgt der Anteil an Makrophagen endoneural <5% (HALL, 1989). Während der ersten Woche nach axonaler Verletzung steigt ihre Anzahl stark an.

Einen anderen Teil der phagozytierenden Zellen stellen die SC dar. Über den relativen Anteil an der Phagocytose ist man sich noch nicht einig (THOMAS et al., 1972; MATTHEWS, 1973).

Ab dem 2. Tag sprossen vom proximalen Stumpf her Axonknospen aus. Bei Axonotmesis beträgt die Regeneration 1-3mm pro Tag. Die wachsenden Neuriten überqueren den Defekt mit Hilfe der sie begleitenden, ebenfalls aus dem proximalen Stumpf auswachsenden SC, um distal von den Büngner Bändern aufgenommen zu werden.

Je größer die zu überbrückende Lücke, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Sprosse missgeleitet werden und nicht auf die Büngner Bänder treffen. Dies kann zur Neuombildung führen.

Die Myelinisierung der neu gesprossenen Axone beginnt nach ca. 1 Woche. Die Hüllenbildung wird vermutlich eingeleitet durch den Kontakt mit Anteilen der Basallamina wie Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat u.a..

Das Verhältnis von SC und Axonen beträgt auch nach der Regeneration wieder 1:1, aber die Internodien sind jetzt kürzer als vorher, der Axondurchmesser ist kleiner und die Myelinscheiden sind dünner.

BOWE et al. (1989) untersuchten die morphologischen und physiologischen Unterschiede von Neuronen nach Kurzzeit- und Langzeitregeneration der Axone. Sie beziehen sich auf Langzeitalterationen, die noch bestehen, nachdem regenerierte Axone schon Verbindung mit ihrem Zielgewebe aufgebaut haben. Sie fanden bei kurzzeitig regenerierten Axonen kleinere Durchmesser, dünnere Myelinscheiden und kürzere Internodien. Dies bedingt eine herabgesetzte Leitungsgeschwindigkeit auf  $< 2,5\text{m/sek.}$  Auch sind die Amplituden der Aktionspotentiale kleiner als vor der Regeneration. Eine Rolle spielen hierbei die schnellen, spannungsabhängigen Kalium-Kanäle, deren Zahl offenbar zunimmt. Dadurch wird die Repolarisierung beeinflusst. Normalerweise liegen diese Kaliumkanäle in der Internodienmembran und sind von Myelin bedeckt. Möglicherweise sind sie bei regenerierten Axonen freiliegend.

Die Langzeitalterationen regenerierter Axone bestehen aus verkürzten Abständen zwischen den Internodien, teilweise kurzen Internodien und irregulären Paranodien. Die Axondurchmesser sind nur noch geringfügig verringert. Die Leitungsgeschwindigkeit beträgt 75%. Die Perikarya sind vergrößert (bis zu  $2000\mu\text{m}$  groß), unregelmäßig angeordnet und liegen enger nebeneinander. Z.T. besteht regelrechte Haufenbildung, und man findet prominente dendritische Verzweigungen. Die Sensitivität gegenüber Kaliumkanal-Blockern nimmt zu. Dies beruht vermutlich auf der erwähnten Abnormität des paranodalen Myelins und dem dadurch freigelegten Zugang zu den dortigen Kaliumkanälen.

Im Zusammenhang mit der Wallerschen Degeneration steigt die Expression des sogenannten neu-Gens im peripheren Nerv von Ratten an (COHEN et al., 1992). Die Expression findet in den Schwannschen Zellen statt. Das neu-Gen codiert einen mutmaßlichen Rezeptor für Wachstumsfaktoren auf den Schwannschen Zellen, der eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität enthält. Er wird umschrieben mit dem Ausdruck p185neu. Die

Expression des neu-Gens ist besonders hoch an den postnatalen Tagen 1 bis 7 und sinkt bis zum Erwachsenenalter erheblich ab. Interessant ist die Tatsache, daß die Schwannzellen diese Expression nach einer Durchtrennung des N. ischiadicus im adulten Tier progressiv verstärken. Auch wird die Transkription der neu-mRNA in vitro stark erhöht durch eine Behandlung der Kultur mit Forskolin und GGF (glial growth factor), durch deren Zugabe der intrazelluläre cAMP-Spiegel ansteigt. Schwann Zellen im allgemeinen scheinen die Transkription des neu-Gens im Laufe der Entwicklung des PNS einzustellen sobald ihre mitotische Phase abgeschlossen ist und sie ein Verhältnis von 1:1 mit den Axonen erreicht haben. Durch den Verlust dieses engen axonalen Kontaktes während der Wallerschen Degeneration jedoch taucht das p185neu wieder auf.

In **unmyelinisierten Axonen** beginnt die Degeneration mit einer prominenten axonalen Schwellung proximal und distal der Verletzung. Es handelt sich um eine Anhäufung von Mitochondrien und Membrankonfigurationen. Distal erfolgt ein Verlust von Neurotubuli und Neurofilamenten und ein Zusammenbruch des Endoplasmatischen Retikulums. Auffallend sind SC-Fortsätze, die 2-3 Tage nach der Verletzung fingerförmig innerhalb der Grenzen der Basallaminae ausgebildet werden und plattenförmige Arrangements oder ein aufzweigendes Profil formen. Ab dem 5./6. Tag beginnen regenerierende Axonsprosse die Lücke zu überqueren, wobei sie von der bestehen gebliebenen Basallamina geleitet werden. Anfangs übertrifft die Zahl der Axone die der SC, nach 2-3 Monaten verringern sich die Axone jedoch wieder, und nach 6 Monaten besteht auch hier wieder ein Verhältnis von 1:1. Das degenerierte Material wird vermutlich sowohl von SC als auch von Makrophagen entfernt. Die Makrophagen befinden sich sowohl im Endoneurium als auch innerhalb der SC-Basallaminae. Nach 15 Tagen sind die meisten Trümmer beseitigt.

Der entscheidende Unterschied zur Degeneration myelinisierter Fasern ist die Tatsache, daß keine kompakten Säulen aus SC als Analog zu den Büngner Bändern ausgebildet werden (THOMAS und KING, 1974).

#### **e. Der Stofftransport in Nervenzellen**

Da nur der Nervenzellkörper Ribosomen enthält und folglich fähig ist zur Proteinbiosynthese, nicht aber das Axon, ist dieses bei Wachstum und Regeneration angewiesen auf den Molekültransport vom Zellkörper aus nach distal. Man unterscheidet einen langsamen Transport, auch axoplasmatischer Fluß genannt, sowie einen schnellen, axonalen Transport.

Letzterer kann anterograd und retrograd stattfinden, während der axoplasmatische Fluß nur anterograd verläuft.

### **Langsamer Transport (slow axoplasmic flow)**

Die Geschwindigkeit beträgt 1-3mm/Tag. Objekte für diesen Transport sind hauptsächlich Elemente des Cytoskeletts, also die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin- Untereinheiten der Mikrotubuli, die Actinmoleküle der Mikrofilamente sowie die Untereinheiten der Neurofilamente. Da alle Elemente vom Zellkörper aus nach distal geliefert werden müssen, ist die axonale Regeneration durch den langsamen axoplasmatischen Transport auf eine maximale Geschwindigkeit von 1-3mm/Tag limitiert.

### **Schneller anterograder Transport (fast axonal transport, anterograd)**

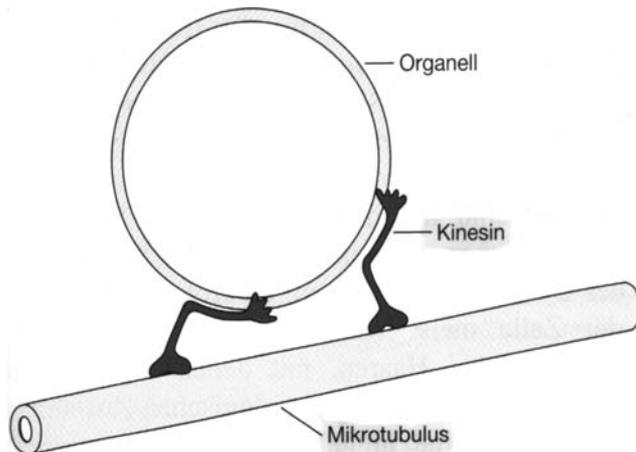
Hierbei beläuft sich die Geschwindigkeit bei ausgewachsenen Warmblütern auf bis zu 400mm/Tag. Es handelt sich um einen aktiven Transport, d.h. er ist ATP-abhängig. Transportiert werden Membranteile, Vesikel u.a.

Für seinen Mechanismus bestanden anfangs zwei Theorien:

- Die Organellen werden in spezifischen Kanälen (z.B. aus Mikrotubuli bestehend) durch wandernde Wellen oder Verengungen (hervorgerufen z.B. durch Actin-Myosin-Interaktionen) bzw. durch Wimpernschlag transportiert.
- Mikrotubuli bilden Gleitschienen, die als Einbahnstraßen funktionieren. Kontraktile Fasern (aus Actin und Myosin z.B.) haften zeitgleich an den Schienen und den zu transportierenden Teilchen. Bei Kontraktur werden die Teilchen verschoben.

Die Zellgifte Colchicin und Vinblastin, die zu einer Depolymerisierung von Mikrotubuli führen, hemmten den schnellen anterograden Transport, womit die Beteiligung der Mikrotubuli an diesem Phänomen bewiesen war. Die Entdeckung von mikrotubuliassoziierten ATPasen, hauptsächlich des Kinesins, verfestigte die zweite Theorie: Offenbar wird die Verbindung zwischen den zu transportierenden Organellen und den Mikrotubuli durch Kinesin hergestellt. Seine globulären Köpfe binden an die Mikrotubuli, sein fächerförmiger Schwanz nimmt Kontakt mit den Organellen auf (Abb. 8). Komplettiert wird das Ganze durch einen zentralen scharnierartigen Bereich. Die Ähnlichkeit im Aufbau mit dem Myosin legt die

Vermutung nahe, daß die Bewegung durch das Gleiten von Kinesinmolekülen entlang der Mikrotubuli entsteht.



**Abb. 8: Kinesinmodell für den schnellen anterograden Transport**

(aus: Kandel et al.: Neurowissenschaften. Heidelberg, 1996)

### **Schneller retrograder Transport (fast axonal transport, retrograd)**

Die Geschwindigkeit erreicht ca. die Hälfte bis Zweidrittel des schnellen anterograden Transportes. Auch hier bewegen sich die Partikel entlang von Mikrotubuli. Antriebsmolekül ist eine Form des Dyneins, die auch eine assoziierte ATPase darstellt. Der retrograde Transport dient zum Beispiel dem Transport von Wachstumsfaktoren zum Zellkörper oder von Abbauprodukten, die wiederaufgearbeitet werden sollen. Er birgt insofern Gefahren, als auch Viren (z.B. Polio-, Herpes- und Tollwutviren) oder Toxine (z.B. Tetanustoxin) zum Soma gelangen können.

### **f. Das neuronale Zytoskelett**

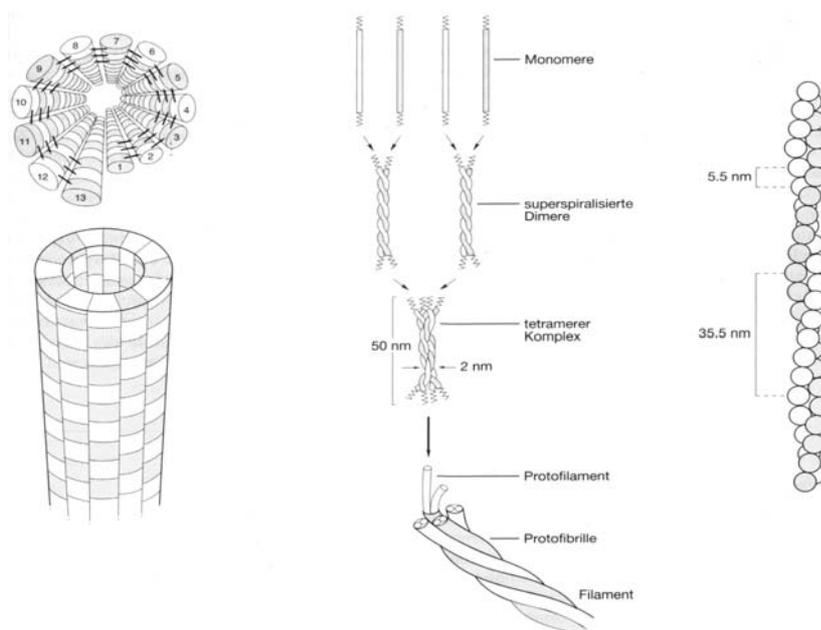
Die nervale Regeneration basiert auf dem langsamen Transport von Bausteinen des Zytoskeletts nach distal.

Man unterscheidet drei Komponenten des neuronalen Zytoskeletts (Abb. 9).

**Mikrotubuli:** Sie setzen sich aus 13 Protofilamenten aus Tubulin-Dimeren ( $\alpha$ - und  $\beta$  Untereinheiten) zusammen, die linear angeordnet sind und einen hohlen Zylinder bilden. Sein Durchmesser beträgt ca. 25nm.

**Neurofilamente:** Die Neurofilamente entsprechen den Intermediärfilamenten in Nichtnervenzellen. Ihr Durchmesser beträgt ca. 10 nm. Sie bestehen aus drei Peptid-Untereinheiten mit unterschiedlichem Molekulargewicht: NF-L bildet die Axis, NF-M und NF-H bilden gemeinsam die Periaxis. Die Neurofilamente sind tetragonal aufgebaut. Sie durchziehen das Axoplasma helikal gewunden, sind aber auch im Zellkörper und in Dendriten zu finden. Ihre Funktion wird einerseits in einer mechanischen Verstärkung gesehen, andererseits wird ihnen auch eine Rolle im axoplasmatischen Transport zugesprochen.

**Mikrofilamente:** Ihr Durchmesser beträgt 3-5 nm. Sie bestehen aus zwei helikalen Strängen polymerisierter globulärer Aktinmoleküle. Bei Säugern sind mindestens sechs verschiedene, eng miteinander verwandte Aktine bekannt. Häufig stehen die Mikrofilamente mit der Plasmamembran in Verbindung. Eine kontraktile Interaktion mit Myosin wird vermutet. In Gewebekulturen hat man eine Anhäufung von Mikrofilamenten in den auswachsenden Spitzen von Axonen, d.h. in den Wachstumskegeln, entdeckt. Offenbar spielen sie eine Rolle im axonalen Längenwachstum indem sie die Bewegungen der Filo- und Lamellopodien koordinieren (KANDEL et al., 1996).



**Abb. 9: neuronales Zytoskelett: links Mikrotubulus, Mitte Neurofilament, rechts Mikrofilament**  
(modifiziert aus: Kandel et al.: Neurowissenschaften. Heidelberg, 1996)

## 5. Periphere Nervenverletzungen

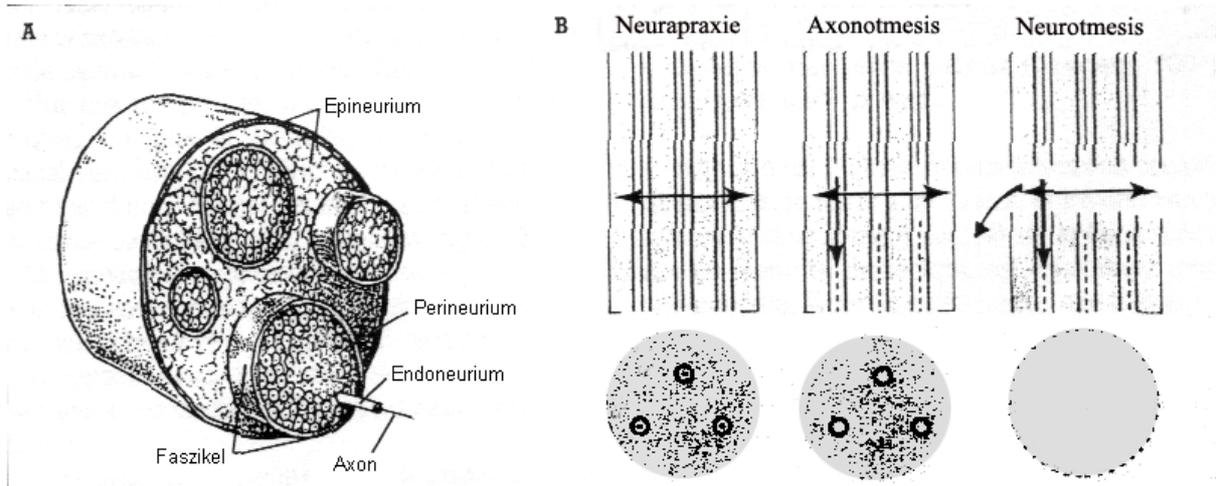
### a. Definitionen

Nach SEDDON (1943) unterscheidet man 3 Typen der Nervenläsion (Abb. 10 B).

Die **Neurapraxia** bedeutet einen lokalisierten Fortleitungsblock ohne degenerative Veränderungen an den Nervenfasern, häufig verursacht durch Durchblutungsstörungen z.B. bei Kompression des Nervengewebes. Die Prognose ist gut, und die Zeit bis zur vollständigen funktionellen Wiederherstellung beträgt unter Umständen nur Tage bis Wochen, maximal drei Monate.

Unter **Axonotmesis** verstehen wir eine Unterbrechung des Axonverlaufes ohne daß Endo- und Perineurium und die Basalmembranen der SC betroffen sind. Es findet eine Wallersche Degeneration statt. Eine komplette funktionelle Wiederherstellung ist daher möglich, tritt jedoch später ein als bei der Neurapraxia, entsprechend einer nervalen Regenerationsgeschwindigkeit von maximal 3mm/d. Innerhalb von drei Monaten wird eine Verbesserung der Funktionalität deutlich.

Die **Neurotmesis** beinhaltet eine partielle oder komplette Zusammenhangstrennung des Nervs einschließlich seiner Hüllen und führt ebenfalls zur Wallerschen Degeneration. Meistens handelt es sich um offene Verletzungen des entsprechenden Gebietes, so daß die Diagnosestellung in Bezug auf das Ausmaß der Nervenverletzung hier einfach ist. Eine Verbesserung der Funktionalität kann ohne chirurgischen Eingriff nicht eintreten. Die regenerierenden Fasern scheitern häufig bei dem Versuch, eine korrekte Verbindung zu den funktionellen Endigungen wiederherzustellen. Ein Neurom entsteht.



**Abb. 10: A: Nerv mit Hüllen**

**B: Verletzungsarten Nerv**

(modifiziert aus: Le Point Veterinaire 27; 171. 1995)

Eine Erweiterung dieser Klassifikation nach SEDDON (1943) wurde 1970 von SUNDERLAND vorgenommen. Er legt seiner detaillierteren Klassifikation fünf verschiedene Verletzungsmuster zugrunde, die sich an den jeweils betroffenen nervalen Strukturen orientieren. Er bezeichnet Neurapraxia und Axonotmesis als Grad I bzw. Grad II, Neurotmesis als Grad V, und fügt einen Grad III und IV dazwischen ein.

**Grad III:** In diesem Fall sind sowohl Endoneurium als auch die SC-Basallaminae verletzt, während das Epineurium intakt geblieben ist. Es kann keine vollständige Erholung stattfinden, da die regenerierenden Axone sich ihren Weg durch Narbengewebe bahnen müssen.

**Grad IV:** Hier sind Myelin, Endoneurium, Perineurium und Axone betroffen, das Epineurium ist unverletzt. Auch hier kommt es zu intraneuraler Narbenbildung, und eine Wiederherstellung der motorischen und sensorischen Funktionen ist nicht möglich. Die Ursache ist meistens starke Dehnung oder Traktion. Falls nach einer drei Monate dauernden Beobachtungsphase keine klinische Verbesserung eingetreten ist, wird eine chirurgische Versorgung angeraten.

Periphere Nervenverletzungen beim Kleintier sind vor allem traumatisch bedingt. Nicht selten aber liegt auch ein iatrogenes Verschulden vor.

### **b. Traumatische Nervenverletzungen**

Als Trauma kommen in der Regel Verkehrsunfälle, Frakturen, Schuß- oder Bißverletzungen vor. Die häufigste traumatisch bedingte Nervenläsion an der Vordergliedmaße des Hundes ist ein kompletter oder partieller Abriss des Plexus brachialis.

An der Hintergliedmaße ist ein Trauma des aufgrund seiner Lage prädisponierten N. ischiadicus am häufigsten.

## **Plexus brachialis-Verletzungen**

### **Anatomie des Plexus brachialis**

Die zwischen zwei Wirbeln durch das For. intervertebrale austretenden Nerven werden Segmentalnerven genannt. Sie bilden die dorsale und die ventrale Nervenwurzel, durch die die afferenten bzw. efferenten Nervenimpulse ein- bzw. austreten. Wenig distal des dorsalen Ganglion spinale, in dem die Nervenzellkörper der sensorischen Neuronen liegen, fließen dorsale und ventrale Wurzeln zum Truncus zusammen. Dieser teilt sich auf in einen dorsalen, ventralen, meningealen und kommunizierenden Ramus. Der dorsale und ventrale Ast teilt sich wiederum in einen dorsolateralen und dorsomedialen bzw. einen ventrolateralen und ventromedialen Ast. Die Anteile der Rami ventrales der verschiedenen nun Spinalnerven genannten Nerven fließen zusammen, vermischen ihre Fasern und bilden so einen Plexus. Die aus dem Plexus hervorgehenden Nerven enthalten dementsprechend Faseranteile aus mehreren verschiedenen Rückenmarkssegmenten. (BUDRAS et al., 1996)

Der Plexus brachialis liegt medial der Scapula. Er erhält Zuflüsse aus den ventralen Ästen der Rückenmarksegmente der Hals- und Brustwirbelsäule. Die Zusammensetzung der Segmente, die den Plexus bilden, ist von Spezies zu Spezies verschieden, kann sich aber auch innerhalb einer Spezies unterscheiden.

Bei der elektrophysiologischen Plexusuntersuchung von 58 Hunden erhielten SHARP et al. (1991) folgende vier Muster in absteigender Häufigkeit: C6-T1 > C5-T1 > C6-T2 > C5-T2. Der Anteil von T2-Fasern war dabei immer nur gering. Man kann innerhalb des Plexus brachialis bei der Verteilung der Nervenwurzelanteile auf die Muskulatur der Vordergliedmaße eine von kranial nach kaudal gerichtete Organisation erkennen. Dies bedeutet, daß die proximal liegende Muskulatur die Hauptimpulse von den kranial liegenden Spinalwurzeln erhält, während die weiter distal liegende Muskulatur ihre Inputs hauptsächlich aus den weiter kaudal gelegenen Spinalwurzeln erhält.

Genauer betrachtet ergibt sich folgendes Verteilungsmuster:

- N. radialis: C6-T2 (44,6% C8)
- N. suprascapularis: C6+C7 (Hauptanteil C6)
- N. subscapularis: C6+7 (Hauptanteil C6) N. brachiocephalicus: C6+7 (Hauptanteil C6)
- N. axillaris: C6-C8 (89,7% C7)
- N. musculocutaneus: C6-T1

- N. thoracodorsalis: C7-T1 (Hauptanteil C7+8)
- Nn. pectorales crann et caudd.: C8-T1
- N. thoracicus lateralis: C8-T2 (Hauptanteil T1)
- N. ulnaris: C8-T2
- N. medianus: C8-T2

### **Definition Plexusabriß**

Die Ursache eines Plexusabrisses ist meistens ein Unfall im Straßenverkehr. Prallt ein Fahrzeug im Oberarm- oder Halsbereich auf dem Hund auf, geht dies einher mit einer maximalen Abduktion oder Streckung der Vordergliedmaße nach kaudal. Die Nervenwurzeln bzw. die peripheren Nervenanteile werden dabei extrem gedehnt (GRIFFITHS, 1974).

Die Bezeichnung Plexusabriß ist irreführend, da die am häufigsten betroffenen Teile die Nervenwurzeln an ihrem Abgang vom Rückenmark sind, bevor die Aufteilung der Segmentalnerven in die verschiedenen Äste sowie der Zusammenfluß der ventralen Äste zum Plexus brachialis stattgefunden hat. Eine Verletzung im Bereich des Truncus oder des ventralen Astes ist viel seltener. Das Gleiche gilt für den peripheren Nerven. Dieser ist eher sekundär durch Degenerationsprozesse betroffen (GRIFFITHS, 1974; KNECHT et al., 1977).

Die Nervenwurzeln sind anfälliger für Zugkräfte, da sie nicht von Perineurium umgeben sind (SUNDERLAND, 1979). Die Ventralwurzeln sind empfindlicher als die Dorsalwurzeln. Man unterscheidet den kompletten Abriß, bei dem beide Wurzeln betroffen sind, vom partiellen, bei dem nur eine, meistens die ventrale Wurzel vom RM abgerissen ist. Zudem differenziert man zwischen intraduralen, d.h. präganglionären Abrissen und peripheren, d.h. postganglionären Abrissen, jeweils bezogen auf das Ganglion spinale.

### **N. ischiadicus-Verletzungen**

Der **N. ischiadicus** ist am häufigsten betroffen im Zusammenhang mit einer Luxation der Articulatio iliosacralis und mit einer Darmbeinsäulenfraktur (GILMORE, 1982; JACOBSON und SCHRADER, 1987). Auch Frakturen im kaudalen Bereich des Acetabulums (BENNETT und VAUGHAN, 1976; JACOBSON und SCHRADER, 1987) und des Os ischii (CHAMBERS und HARDIE, 1986) spielen eine Rolle. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Axonotmesis verursacht durch ein progressives Wuchern von Bindegewebe und Kallusbildung im Frakturbereich.

### **Sakrokaudale Frakturen und Avulsionen**

Vor allem bei der Katze kommt es nach Fraktur oder Luxation im sakrokokkzygealen Bereich häufiger zu klinischen Ausfällen, die auf Schädigungen von Anteilen des Plexus sacralis zurückzuführen sind, die Rektum, Genitalien und Blase bzw. Anus, Perineum und Schwanz innervieren (Nn. pelvini, N. pudendus und N. rectalis etc.). Je nach Funktion der Schwanzmotorik, der Blasenfunktion, und des Analtonus ist die Prognose sehr gut bis mäßig (WELCH, 1996).

Hunde, die nach einem Verkehrsunfall verringerte Schwanzmotorik, fehlenden Analtonus und behinderte Blasenfunktion aufweisen, leiden unter Nervenschädigungen der Cauda equina in Zusammenhang mit Frakturen des Os sacrum. Die Prognose ist auch für Patienten mit einem Ausfall des Analtonus oder der Blasenfunktion gut (WELCH, 1996).

### **c. Iatrogene Nervenverletzungen**

Betrachtet man die iatrogen verursachten Verletzungen peripherer Nerven, so überwiegen beim Kleintier die Fälle, in denen der N. ischiadicus betroffen ist.

Oft kommt die iatrogene Verletzung des N. ischiadicus im Rahmen einer intramedullären Fixation von Frakturen des Os femoris (WITHROW und AMIS, 1977; FANTON et al., 1983; GILMORE, 1982; PALMER et al., 1988;) vor. In diesem Zusammenhang spielt einerseits die Achtsamkeit beim Einbringen des Nagels eine Rolle und andererseits die Länge des Nagelanteiles, der aus der Fossa trochanterica herausragt, der Abstand zwischen der Spitze des Nagels und dem Acetabulum sowie deren Austrittsstelle in der Fossa trochanterica, die nicht zu weit medial liegen darf.

Iatrogene Läsionen des N. ischiadicus können auch durch Austreten von Zement beim Einsetzen einer Hüftgelenksendoprothese entstehen. Der Nerv wird durch die exotherme Reaktion während der Aushärtung des Zements geschädigt.

Ebenso können Injektionen in die lange Sitzbeinmuskulatur eine N. ischiadicus-Paralyse nach sich ziehen (SWAIM, 1978). Die Komplikation ergibt sich durch direkte Nervenverletzung per Kanüle, durch den Einfluß des injizierten Mittels oder durch sekundäre Fibrosierungen im und um den Nerv herum.

Selten kommt es zur Ischiadicusparalyse nach längeren Operationen infolge falscher Fixation und Hyperextension. GILMORE (1982) berichtet von dieser Komplikation nach Ovariohysterektomie, und BURROWS und HARVEY (1973) im Zusammenhang mit der Versorgung von Perinealhernien.

## 6. Konventionelle Methoden zur chirurgischen Behandlung peripherer Nervenläsionen

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, den Defekt eines peripheren Nerven zu versorgen.

### a. Die Nervennaht

Obwohl die Erfolge in der funktionellen Wiederherstellung trotz Entwicklungen von Nahtmaterialien und Nahttechniken auch heute noch nicht zufriedenstellend sind, ist die Naht mangels Alternativen die Methode der Wahl. Voraussetzung ist ein Defekt, dessen Größe noch eine spannungsfreie Adaptation der Nervenstümpfe zulässt.

Neben der Standardmethode der epineuralen Naht gibt es die faszikuläre (=perineurale) sowie die interfaszikuläre Naht (MILLES, 1981). Der Nachteil der epineuralen Naht kann ein Fehlwachstum sensorischer Fasern in motorischen Bahnen sein, wobei keine funktionellen Synapsen gebildet werden (KARPATI et al., 1981; BERTELLI et al., 1997). Deswegen wird bei größeren Nerven die faszikuläre Naht empfohlen (FORTERRE et al., 2001).

Vorteil der interfaszikulären Nahttechnik soll die exakte Rekonstruktion des Verlaufs der einzelnen Faszikel sein und weiterhin, daß nur die tatsächlich betroffenen Fasern behandelt werden. Nachteilig kann sich eine Störung der Blutzufuhr sowie eine verstärkte Narbengewebsbildung durch die tiefergehende Präparation des Nervs auswirken, weshalb inzwischen von dieser Methode Abstand genommen wurde.

Generell wird ein 9/0 oder 10/0 Nylon Faden empfohlen (STEVENSON et al., 1994; RODKEY, 1993).

### b. Muskeltransposition

Voraussetzung für eine Muskeltransposition ist zum einen die Verfügbarkeit eines entsprechenden Muskels, zum anderen dessen intakte Innervation und eine Lage, die eine physikalische Transposition ermöglicht. Diese Voraussetzungen sind nicht häufig gegeben. Beim Hund wird vor allem die isolierte N.radialis-Paralyse mit Muskelsehnentranspositionen behandelt.

Beispiele am Hund (BENNETT und VAUGHAN, 1976):

- Relokation des M. biceps brachii: Bei einer Radialisparalyse ist die Streckung des Ellbogengelenks nicht möglich, da die Funktion des M. triceps ausgefallen ist. Als Therapie wird die Endsehne des M.biceps brachii postero-medial an das Periost des Olecranon genäht. Der Biceps fungiert nun als Strecker.

- Relokation des M. flexor carpi radialis / ulnaris: Die Endsehne des jeweiligen Muskels wird per Seit-zu-Seit-Anastomose auf die Endsehne des M. extensor digitalis communis genäht und ermöglicht so eine Extension des Gelenks.

Die Autoren kamen bei drei Patienten zu zufriedenstellenden Ergebnissen, waren bei 2 Patienten jedoch erfolglos.

### c. Neurotisation

Man unterscheidet zwischen muskulärer und nervaler Neurotisation.

Im Falle der **muskulären Neurotisation** wird ein gesunder Muskel transponiert und leitet dem denervierten Muskel seine Kontraktionsfähigkeit weiter (FREY et al., 1982). In der Tiermedizin gibt es wenige Beispiele hierzu im Zusammenhang mit der Versorgung einer Radialislähmung (CANO et al., 1986; CALVO et al., 1989; CASAUS et al., 1991). Sowohl die klinischen als auch die histologischen und elektromyographischen Ergebnisse unterlagen denen bei epineuraler Nahttechnik (CALVO et al., 1989).

Die **nervale Neurotisation** im engeren Sinne bedeutet den Transfer eines gesunden Nerven zum distalen Abschnitt eines proximal irreversibel geschädigten Nerven (FREY et al., 1998). In der Humanmedizin existieren zahlreiche Studien zur nervalen Neurotisation.

Als Donornerven werden bei einer Pl. brachialis-Läsion folgende Nerven benutzt:

- Interkostalnerven: Sie werden zur Wiederherstellung der Ellenbogenflexion empfohlen.
- N. accessorius: Mit diesem rein motorischen Nerv erhält man gute Ergebnisse bei der Wiederherstellung der Motorik. Seine Transposition verursacht evt. eine Paralyse der unteren Teile des M. trapezius.
- Plexus cervicalis: Hierbei wird eine Instabilität der Skapula riskiert.
- N. phrenicus: Mit diesem Nerv erzielt man gute Ergebnisse, weil ausschließlich motorische Fasern enthalten sind. Das Risiko einer respiratorischen Fehlfunktion ist groß.
- Kontralaterale C7-Wurzel: Diese wird nur eingesetzt, wenn kein anderer Donornerv zur Verfügung steht.
- N. ulnaris: Dieser kann nur gebraucht werden, wenn die Wurzeln von C7 bis T2 unverletzt sind.

Die Prognose der Neurotisation ist in der Humanmedizin abhängig vom Alter des Patienten. Beim Menschen besteht eine bessere Prognose für Patienten unter 30 Jahren. Auch das

Zeitintervall zwischen Unfall und Operation spielt eine große Rolle Die Erfolgsaussichten sind größer, wenn der Eingriff innerhalb von 3 Monaten nach dem Trauma durchgeführt wird. Der Atrophiegrad des zu reinnervierenden Muskels lässt dann eine erfolgreiche Reinnervation noch zu (ZHASNG et al. 1986; HATTORI et al. 1997; SAMII et al. 1997; BERTELLI et al. 1997; NAGANO 1998; MALESSY et al., 1998; LEECHAVENGVONGS et al., 1998; WAIKAKUL et al. 1999).

In der Tiermedizin gibt es eine Studie über Radialislähmungen, die die muskuläre mit der nervalen Neurotisation vergleicht (CASAUS et al., 1991). Die Autoren transplantierten den M. flexor carpi ulnaris bzw. den palmaren Ast des N. ulnaris in den denervierten M. extensor digitorum communis. Die Ergebnisse der beiden Methoden waren vergleichbar.

FORTERRE et al. (2001) erreichten mit der nervalen Neurotisation zufriedenstellende Ergebnisse. Bei Patienten mit Radialisläsion reinnervierten sie den M. triceps brachii und M. extensor carpi radialis mit dem muskulären Ende des N. ulnaris bzw. N. medianus. Bei Patienten mit Fibularisläsion konnten sie den M. tibialis cranialis mit Hilfe des N. tibialis reinnervieren. Sie empfehlen die nervale Neurotisation für Verletzungen einzelner Nerven, so z.B. isolierter N. radialis-, N. ischiadicus- oder N. fibularis-Läsionen, nicht aber für komplexe Pl. brachialis Abrisse. Die Neurotisation sollte in diesen Fällen innerhalb von 6 Wochen bis 3 Monaten nach dem Trauma vorgenommen werden.

#### **d. Nerventransplantate**

Beim Einsatz von Nerventransplantaten unterscheidet man Auto- und Allotransplantate.

##### **• Autotransplantate**

Die Gewinnung von Autotransplantaten ist stark eingeschränkt und eignet sich daher nicht für komplexe Verletzungsmuster. Außerdem bedeutet sie immer eine zusätzliche Operationsstelle, eventuelle Ausfälle andernorts sowie häufig nicht zueinander passende Durchmesser des Donor- und des Rezipientennervs. Im Falle eines Pl. brachialis-Abrisses werden als Donornerven insbesondere Hautnerven, der N. suralis und der N. ulnaris ipsilateral benutzt. Damit werden in der Humanmedizin relativ gute Ergebnisse bei der Wiederherstellung von Ellenbogenflexion und –extension sowie der Schulterfunktionen erzielt, nicht aber Unterarm- und Handmotorik (SAMII et al., 1997; NAGANO, 1996).

Generell hat man mit kürzeren Transplantaten größere Erfolge als mit langen. Durch die Einschränkung des Regenerationspotentials eines Nerven auf einen Zeitraum von ca. 4 Monaten beträgt die maximal mögliche Länge der zu überbrückenden Läsion 15cm.

Beim Menschen sind jedoch auch mit bis zu 25cm langen Nerventransplantaten vom N. ulnaris Erfolge verzeichnet worden (NAGANO et al., 1996).

#### • **Allotransplantate**

Eine Allotransplantation ist mit starken Immun- und Abstoßungsreaktionen verbunden und erfordert entsprechend eine immunsuppressive Therapie.

IDE et al. (1988) benutzten die Technik des wiederholten Einfrierens und Auftauens allogener Nerventransplantate. Der Vorteil dieses Vorgehens ist die resultierende Azellularität, die eine geringere Antigenität mit sich bringt. So gelang es, einen 5cm großen Defekt auch ohne den Einsatz von Immunsuppressiva zu überbrücken. Durch die Applikation von bFGF (basic fibroblast growth factor) konnte die Anzahl der regenerierten Axone gesteigert werden.

Die geschaffene Azellularität bringt jedoch Nachteile mit sich.

HALL (1986) untersuchte die Axonregeneration mikroskopisch anhand von Autotransplantaten vom N. ischiadicus, die teilweise durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder durch Detergentien-Extraktion zellfrei gemacht worden waren. Die Axone wuchsen in frische Autotransplantate hinein und bildeten schnell eine funktionelle Verbindung mit lebenden SC aus, die in Form von Büngner Bändern innerhalb des Transplantates lagen. Die Penetration in azelluläre Transplantate hinein war weit weniger effizient. Dies galt besonders während der ersten zwei Wochen. Letztlich erfolgte auch hier eine Reinnervation. Auffallend war eine verringerte Effizienz in der Beseitigung der Zelltrümmer nach der Nervendurchtrennung. In den azellulären Transplantaten persistierten Massen von Trümmern im Endoneuralraum, da die Phagozytose durch die SC fehlte.

NADIM et al. (1990) untersuchten die Unterstützung der axonalen Regeneration bei Ratten durch 4cm lange, per Gefriertrocknung azellulär gemachte Transplantate vom N. tibialis bzw. N. plantaris. Sie fanden, daß die Regenerationsstrecke in den azellulären Transplantaten nur maximal 50% betrug, während in lebenden Nerventransplantaten schnell die gesamte Strecke durch regenerierende Axone überbrückt wurde. Die Autoren gehen davon aus, daß intrinsische Faktoren wie das Fehlen von SC in den azellulären Transplantaten Ursache für die begrenzte Regenerationsfähigkeit der Axone ist.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen GULATI et al. (1988), in deren Experimenten die Axonregenerate in azellulären Nerventransplantaten nur die Hälfte der 4cm langen Strecke überbrückten, während für die komplette Strecke die Anwesenheit lebender SC nötig war. Die trotz der Azellularität bestehenbleibenden Basallamina-Schläuche fungieren als Wegbereiter sowohl für die Axonregeneration als auch für die SC-Migration, sind aber nicht essentiell.

Nach OSAWA et al. (1990) dienen die Basallaminae der SC als optimale Leitschienen für die Neuritenregenerationen. Die besten Ergebnisse erzielte er mit prädegenerierten, azellulären Transplantaten.

DUBOVY et al. (2001) untersuchten den Einfluß von aus dem distalen Nervenstumpf einwandernden SC auf die Regeneration in azelluläre Transplantate hinein. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der Migration von SC, dem Auftreten von durch SC gebildetes Laminin als Teil der Basallaminae und dadurch gesteigerter SC-Migration und Axonregeneration fest.

### **e. Die nichtnervale Defektüberbrückung**

Die Idee einer Defektüberbrückung mit nichtneuralem Gewebe ist alt. Experimentelle Arbeiten an Tieren wurden bereits im Jahre 1880 von GLÜCK sowie 1882 von VANCLAIR durchgeführt. Beide beschäftigten sich mit dem Einsatz von entkalkifiziertem Knochenmaterial.

Seitdem sind diverse Versuche mit Amniongewebe, Faszien, Nervensegmenten von Kadavern und Muskelfasern als Allo- oder Xenotransplantate in Verbindung mit einer Immunsuppression gemacht worden. Komplikationen ergaben sich hauptsächlich aus entstehendem Narbengewebe, das das Wachstum der Neuriten verhinderte, sowie aus Neuombildungen, die häufig mit Allodynie verbunden waren.

ENVER und HALL (1994) untersuchten die axonale Regeneration in muskuläre Autotransplantate hinein an Ratten. Sie benutzten Muskelfasern, die zuvor einem mehrmaligen Prozess des Einfrierens und Auftauens unterzogen worden waren. Azelluläre Muskeltransplantate haben ein inneres Gerüst aus Basallaminae, die viele Komponenten wie Laminin, Fibronectin, Kollagen Typ IV und Heparansulfat enthalten, die in vitro das Neuritenwachstum unterstützen. Durch eine zusätzliche Behandlung mit der antimittotischen Substanz Mitomycin C wurde die Proliferation der SC innerhalb des Endoneuriums für 3-4 Wochen unterdrückt. Dies hatte zur Folge, daß die Axonregeneration um 2-3 Wochen herausgezögert wurde, d.h. so lange, bis die Schwannzell-Populationen in den Nervenstümpfen sich vom antimittotischen Effekt erholt hatten. Diese Beobachtung legt nahe, daß die Anwesenheit proliferierender Schwannzellen für die Regeneration entlang des Muskeltransplantates notwendig ist, während der Muskelfaser selber vermutlich die Aufgabe zukommt, die auswachsenden Axonsprosse in Richtung des distalen Stumpfes zu dirigieren.

## 7. Problematik der Nervenheilung

Die Erstellung eines operativen Konzeptes sowie die Prognosestellung für eine Nervenläsion hängen von mehreren Punkten ab.

- Die neurogene Muskelatrophie entwickelt sich weitaus schneller als eine Inaktivitätsatrophie. Ein denervierter Muskel beginnt bereits nach wenigen Tagen zu atrophieren.

FLORES et al. (2000) beschreiben folgende Veränderungen am denervierten Muskel: Die Zellgröße nimmt ab; Peri- und Epimysium verdicken sich; eine komplette Muskelzellatrophie findet innerhalb von 2-6 Wochen statt; eine Fibrose zwischen den einzelnen Muskelfasern entwickelt sich nach 12-24 Monaten; eine vollständige Desintegration erfolgt nach ca. 2 Jahren.

Je länger die Denervation besteht, desto degenerierter sind folglich die Muskelrezeptoren (CHRISMAN, 1993). Die Reinnervation wird dadurch erschwert oder unmöglich gemacht. Das Zeitintervall zwischen Läsion und Versorgung sollte daher kürzer als 6-9 Monate sein (FREY et al., 1998; FLORES et al., 2000). MACKINNON et al. (1988) geben für die Humanmedizin einen Zeitraum von maximal 12-18 Monaten an. Danach ist die Reinnervierbarkeit des Muskels erheblich herabgesetzt (FREY et al., 1998). Dies trifft zumindest auf die Regeneration motorischer Fasern und damit die motorischen Funktionen zu. In einer vergleichenden Studie über die Regenerationsergebnisse bei Tubulisation und epineuraler Naht am N. ischiadicus von Ratten stellten MADORSKY et al. (1997) eindeutige intrinsische Differenzen im Regenerationspotential zwischen sensorischen und motorischen Fasern des selben Nervs fest. Durch retrograde Färbung mit Meerrettichperoxidase konnten sie die Zellkörper der regenerierten motorischen bzw. sensorischen Axone im RM bzw. in den Spinalganglien sichtbar machen und auszählen. Sie zählten deutlich mehr regenerierte sensorische als motorische Axone.

- Im Zusammenhang mit dem Zeitintervall zwischen Trauma und Versorgung stellt sich das Problem der Sehnenkontrakturen, dem mit regelmäßiger Physiotherapie entgegengewirkt werden muß. Dies bedeutet ca. viermal tägliches Beugen und Strecken aller Gelenke der betroffenen Gliedmaße für etwa 10 Minuten.
- Weiterhin spielt die Distanz zwischen Läsion und Zielmuskel eine große Rolle.

Nach 4 Monaten sind die physiologischen Neurotisationsmöglichkeiten des Körpers erschöpft. Da die optimale Regenerationsfähigkeit eines Nervs basierend auf dem langsamen axonalen Stofftransport auf 1-3mm pro Tag limitiert ist, reicht dieser Zeitraum bei großen

Distanzen nicht aus, um eine muskuläre Verbindung zu erzielen (MOISSONIER et al., 1995). Die Prognose verschlechtert sich aufgrund dieser Zusammenhänge bei einer Distanz von mehr als 10-15 cm (CHAMBERS und HARDIE, 1986; WELCH, 1996). Tatsache ist, daß ein Großteil der nervalen Verletzungen, mit denen man in der Tiermedizin zu tun hat, weit proximal liegt. So handelt es sich bei einem Pl. brachialis Abriß hauptsächlich um einen proximalen Wurzelausriß, und auch der N. ischiadicus weist oft in seinem proximalen Anteil Läsionen auf, die mit Frakturen oder Manipulationen im Beckenbereich zusammenhängen.

Ein weiterer Nachteil der weit proximal gelegenen Nervenläsionen liegt in der Gefahr der Schädigung des Zellkörpers durch retrograde traumatische Degeneration. Diese traumatische Degeneration findet nach Verletzungen im proximalen Stumpf statt. Sie erscheint histologisch ähnlich wie die Wallersche Degeneration im distalen Stumpf, beschränkt sich jedoch in der Regel auf maximal 3 Ranviersche Schnürringe. Ihr Ausmaß ist abhängig vom Verletzungsmechanismus (WELCH, 1996).

Nicht zuletzt aufgrund dieser aus der Physiologie der Nervenheilung entstehenden Problematik bleibt die Versorgung peripherer Nerven nach Trauma eine der größten Herausforderungen der Neurochirurgie. Trotz der vielen unterschiedlichen in Kapitel 6 beschriebenen Bemühungen und Herangehensweisen an diese Thematik in den letzten 25 Jahren, sind die klinischen Ergebnisse in Hinblick auf die Wiederherstellung der motorischen Funktionalität bis heute enttäuschend geblieben.

- Die epineurale Naht, die noch immer Mittel der Wahl ist, bietet trotz Weiterentwicklung von Nadeln, Nahtmaterial, Instrumenten und Mikroskopen nicht in jedem Fall zufriedenstellende Ergebnisse. Nachteilige Auswirkungen der Naht können eine Verringerung der Perfusion des Wundgebietes sowie eine Behinderung der Regeneration durch die Entstehung einer entzündlichen Reaktion sein. Am negativsten wirkt sich jegliche Spannung an der Nahtstelle aus (MILLESII, 1981; AUSTIN und WALKER, 1986; GIBSON et al., 1991; SAMII et al., 1997). Der Defekt des Nervs ist häufig zu groß, um eine spannungsfreie Readaptation zuzulassen.

- Die Muskeltransposition ist in der Tiermedizin selten durchgeführt worden. Mit ihrer Hilfe umgeht der Chirurg die Probleme, die sich aus der Physiologie der Nervenheilung ergeben, da eine Reinnervierung des denervierten Muskels nicht sein Ziel ist. Die Erfolge dieser Methode waren bisher bescheiden (BENNETT und VAUGHAN, 1976).

- Auch die muskuläre und die nervale Neurotisation vermeiden die Probleme der Nervenregeneration. Erstere scheint gegenüber der epineuralen Naht unterlegen zu sein (CALVO et al., 1989). Bei der nervalen Neurotisation gibt es einige Nachteile. Zunächst bedeutet sie nicht zu unterschätzende Ausfälle im ursprünglichen Innervationsgebiet des transferierten Nervs. Hinzu kommt, daß ein transferierter Nerv und der zu ersetzende Nerv nicht immer die gleichen Anteile an motorischen und sensorischen Fasern beinhalten, so daß die optimale Funktionalität des Muskels trotz Reinnervierung nicht erreicht werden kann. Das Hauptproblem bei komplexeren Verletzungsmustern wie beispielsweise einem Pl. brachialis-Abriss ist, daß das Reservoir an Donornerven sehr schnell erschöpft ist.

- Ähnlich sehen die Probleme bei der Nerventransplantation aus. Handelt es sich um Autotransplantate, nimmt man immer einen Ausfall des Donornervs im ehemaligen Innervationsgebiet sowie ein zusätzliches Operationsgebiet in Kauf. Auch hier ist das Reservoir nicht unerschöpflich. Unterschiedliche Durchmesser von Donor- und Rezipientennerv können zusätzliche Schwierigkeiten bergen. Die Erfolge dieser Methode beschränken sich bisher auf kurze Defekte von ca. 10cm. Der Gebrauch von Allotransplantaten bedeutet den Einsatz von Immunsuppressiva mit dem erhöhten Infektionsrisiko.

- Die Möglichkeiten der nichtnervalen Defektüberbrückung mit Allo- oder Xenotransplantaten sind ebenso wegen der Immunsuppression eingeschränkt. Hinzu kommt das Fehlen neurotropher und neurotroper Einflüsse.

In den letzten Jahren hat man sich besonders mit der Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge und der molekularbiologischen Mechanismen beschäftigt, die dem Regenerationsprozess eines Nervs zugrundeliegen. Man erhofft sich, über den Einsatz neurotropher und neurotroper Faktoren fördernd eingreifen zu können.

Wie sich herausgestellt hat, spielen die SC dabei eine entscheidende Rolle als Regenerationspromotoren. Ohne sie ist das Reparationspotential eines Nerven deutlich herabgesetzt (HALL, 1986; GULATI et al., 1988; NADIM et al., 1990; MORRISSEY et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 1992; KIM et al., 1994; XU et al., 1995; DUBOVY et al., 2001; KELLEHER et al., 2001)

Neben ihren bei der Wallerschen Degeneration beschriebenen Aufgaben wie die Ausbildung der **Büngner Bänder** als Leitschienen und die **Phagozytose** von Myelindetritus synthetisieren sie als Teil ihrer Basallaminae viele **ECM-Moleküle** wie Laminin, Fibronectin und Kollagen. Diese üben einen neurotrophen Einfluß aus indem sie mit dem Wachstumskegel direkt über dessen CAM Kontakt aufnehmen können. Die SC bilden ebenfalls **CAM** auf ihrer Oberfläche aus (s. z.B. MAG, L1, N-CAM). Auch bestimmte **Proteasen** und **Proteaseinhibitoren** werden von SC produziert. Sie bedingen Veränderungen der Verankerung der axonalen Membran in der Umgebung. Eine weitere wichtige Aufgabe der SC im distalen Nervenstumpf ist die Synthese von **Neurotrophinen** wie NGF, BDNF und CNTF, wodurch die proximal aussprossenden Axone vom distalen Ende per Chemotropismus angelockt werden.

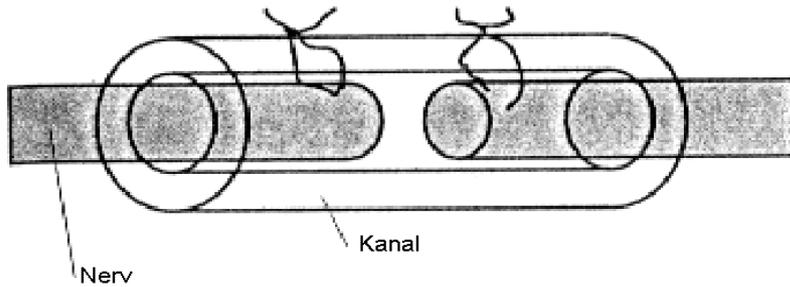
Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde nach Behandlungsmethoden gesucht, die SC therapeutisch als Regenerationspromotoren einzusetzen. Man erhofft sich durch die Präformierung einer Leitschiene aus SC das „Überspringen“ des initialen Regenerationsgeschehens und eine schnellere Regeneration, wodurch auch längere Defekte in der gleichen, durch die Physiologie limitierten Zeitspanne überwunden werden könnten (GUENARD et al., 1992). Auch für kleinere Defekte sollen SC-Implantate sinnvoll genutzt werden, um bessere klinische Ergebnisse zu erzielen (HADLOCK et al., 2000).

## **8. Neuere Methoden zur Behandlung peripherer Nervenläsionen**

### **a. Tubulisation**

In der Humanmedizin wurden vermehrt Führungskanäle zur Überbrückung eines Nervendefektes eingesetzt.

Bei der Tubulisation werden der proximale sowie der distale Stumpf eines durchtrennten peripheren Nervs in je ein Ende einer präformierten Röhre eingesetzt und mit wenigen epineuralen Einzelheften befestigt (Abb. 11). Ursprünglich wurde diese Technik als chirurgische Methode entwickelt, um die Nahtstelle nach Nervenreparation zu schützen (WEISS, 1944).



**Abb. 11: Schema Tubulisation**

(aus: Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122; 1. 1995)

Die Vorzüge der Tubulisation sind:

- Leitschienenbildung für regenerierende Axone, die geradlinig und damit schneller den Defekt überbrücken können,
- Verhinderung des Einwanderns von narbengewebsbildenden Zellen,
- Verhinderung des Auswanderns regenerierender Axone aus dem Läsionsgebiet, wodurch eine Neuombildung ausgeschlossen wird,
- Verringerung der Traumatisierung des Nervs durch weniger Nahtmaterial,
- Weitestgehende Immobilisierung der Nervenstümpfe, was bessere Heilungschancen bedeutet,
- Verminderung des Drucks, der durch Hämatombildung auf Läsionsstellen lastet,
- Akkumulation von Neutrophinen und anderer intrinsischer regenerationsfördernder Moleküle in einem künstlich geschaffenen Umfeld,
- Möglichkeit der Applikation unterschiedlicher neurotrophischer Faktoren.

Die Funktionalität applizierter Neurotrophine ist allerdings zeitlich limitiert. Deswegen wurden Führungskanäle mit einer Suspension Schwannscher Zellen gefüllt, die neben den zuvor beschriebenen regenerationsfördernden Einflüssen auch eine zeitlich nicht begrenzte Zufuhr von Neurotrophinen sicherstellen (GUENARD et al., 1992; KIM et al., 1993; XU et al., 1995; STEUER et al., 1999; HADLOCK et al., 2000).

Ziel ist es, einen Führungskanal herzustellen, der

- biokompatibel,
- vom Körper abbaubar also zeitlich begrenzt ist,
- unterschiedliche Durchmesser und geometrische Variationen erlaubt sowie
- unterschiedliche Halbwertszeiten haben kann.

Außerdem soll der Führungskanal

- maximale Stärke der Verbindungsstelle der Nervensegmente garantieren und
- minimalinvasiv eingesetzt werden können.

Der Erfolg eines Führungskanals ist unter anderem von seinem Material abhängig. Dieses sollte semipermeabel, flexibel und nicht antigen sein.

Man unterscheidet natürliche und synthetische Materialien.

### **Natürliche Materialien**

- Als natürliche Kanäle werden häufig autologe **Arterien** oder **Venen** eingesetzt, weil die Entnahme einfach ist. Hingegen wird die gegebenenfalls durch die Gefäßresektion sowie längere Operationsbelastung entstehende Behinderung des Patienten. Ein weiteres Problem ist eine gewisse Labilität der Venenwand und die Gefahr eines Kollapses noch bevor die Läsion durch regenerierende Axone überbrückt werden konnte. Eine Behinderung der Regeneration durch die Venenklappen konnte inzwischen ausgeschlossen werden (KELLEHER et al., 2001).

Durch den Einsatz invaginierter Venen versprach man sich lange Zeit eine regenerationsfördernde Wirkung. Der direkte Kontakt der Axone mit den Kollagen- und Lamininmolekülen der Adventitia einerseits sowie der Einfluß der zahlreichen in den sympathischen und parasympathischen Nervenfasern der Adventitia enthaltenen Schwannschen Zellen andererseits wurden dafür verantwortlich gemacht.

Die Regenerationsergebnisse peripherer Nerven in konventionelle und invaginierte Venen hinein zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede (KELLEHER et al., 2001).

Der Vorzug der Invagination wird dadurch in Frage gestellt.

- Den größten Anteil an der Literatur über Kanalmaterialien haben die Studien über den Einsatz von **Kollagen**. Dieses ist vollständig abbaubar, in Variationen permeabel zu gestalten, ebenso variabel stabil aber dennoch flexibel, nicht toxisch, nicht antigen und zudem ein Förderer der axonalen Regeneration.

Erste Versuche mit Kollagen unternahmen LOTHEISSEN (1901), WEISS (1943), BRAUN (1966) sowie METZ und SEEGER (1969).

Mit Kollagen Typ IV-Kanälen von 4mm Länge konnten inzwischen in Bezug auf die motorische und die sensorische Regeneration Ergebnisse erzielt werden, die äquivalent zu denen von Anastomose und nervalem Autotransplantat sind (LI et al., 1992). Voraussetzung

dafür ist eine Permeabilität des Kollagen, die Moleküle bis zur Größe bovines Serumalbumins (68kDa) durchtreten lässt.

In einer weiteren Studie wurde die unterschiedliche Permeabilität von Kollagen genauer untersucht. Man erhielt die besten Ergebnisse bei Macropore-Kanälen (KIM et al., 1993). Die Erklärung hierfür ist, daß sowohl regenerationsfördernde Makromoleküle wie NGF, Laminin und Fibronectin durch die Kanalwand durchtreten können, als auch die Blutversorgung des Regenerationsgebietes durch Neovaskularisation vom umgebenden Gewebe aus besser ist.

Der Einfluß von Schwannschen Zellen, die innerhalb des Kollagenkanals in Kollagen gel in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter suspendiert waren, wurde vergleichend autologen Nervenimplantaten bei Ratten gegenübergestellt. Das Schwannzellimplantat entsprach bezüglich der elektrophysiologischen Daten in seiner Wirksamkeit dem Transplantat und übertraf den Kollagenkanal ohne Zellsuspension (KIM et al., 1993).

MADORSKY et al. (1997) konnten eine Äquivalenz von einfachem Kollagenkanal und epineuraler Naht feststellen. Bedingung war, daß die Nervenenden innerhalb des Kanals adaptiert waren und keine Lücke aufwiesen.

Eine Verbesserung bezüglich der Wirksamkeit eines Kollagen-Führungskanals konnte durch Füllung der Kollagen-Führungskanäle mit Kollagen-Gel erreicht werden, dessen Fibrillen zuvor mit Hilfe von magnetischen Feldern parallel aliniert worden waren (DUBEY et al., 1999). Verglichen mit nichtaliniertem Kontrollgel bewirkte diese Prozedur eine deutlich gesteigerte Nervenregeneration. Dahinter steht die direkte Kontaktleitung der einwachsenden Axone und Schwannschen Zellen entlang der ausgerichteten Kollagenfibrillen. Die Tiefe der Axonregeneration in den Kanal hinein wuchs mit Zunahme der Stärke des elektrischen Feldes, mit der das Kollagen-Gel behandelt worden war.

### **Synthetische Materialien**

Bei den zahlreichen Beispielen für synthetische Kanalmaterialien handelt es sich hauptsächlich um Polymere. Man unterscheidet zwischen resorbierbaren und nichtresorbierbaren Verbindungen.

Nichtresorbierbares Material kann eine Fremdkörperreaktion in Form einer chronischen Entzündung hervorrufen.

Auch von chronischer Kompression und dadurch behinderter Nervenregeneration wird berichtet. Die Kompression wird hervorgerufen durch eine Hyperplasie im Rahmen der Wundheilung in Verbindung mit der relativen Starre des Kanalmaterials (SMAHEL et al., 1993). Die erfordert eine zweite Operation zur Entnahme des Implantats.

Übereinstimmend werden resorbierbare Materialien bevorzugt. Die zelluläre Aktivität während des Abbauprozesses kann jedoch auch eine extra- oder intraneurale Fibrose verursachen.

Beispiele:

- **Silikon (=Polydimethylsiloxan):** Silikon ist ein nicht resorbierbares, sehr wenig permeables und wenig poröses Material. Probleme ergeben sich einerseits aus einem defizitären Sauerstoffzustand innerhalb der Silikonkammer und andererseits häufig aus einer chronischen Nervenkompression (LUNDBORG et al., 1994).
- **Silastic (=Silikon-Gummi):** Silastic ist ein nichtresorbierbares, nichtpermeables Material. Zur Vermeidung einer kompressiven Neuropathie ist dieses Implantat zwischen dem 24. und 90. Tag nach dem Einsetzen wieder zu entfernen (GIBSON et al., 1991).
- **CRG (controlled release glass):** Dieses neurartige anorganische Material wurde von GILCHRIST et al. (1998) vorgestellt. Die Polymere ( $\text{Na}_2\text{O}-(\text{CaMg})\text{-O-P}_2\text{O}_5$ ), bei  $1000^\circ\text{C}$  geschmolzen, lösen sich vollständig in Wasser, sind biokompatibel und nicht toxisch. Im Schafkörper war der Abbau nach 10 Monaten komplettiert. Die Regenerationsergebnisse des N. facialis der Schafe können sich mit denen anderer Kanalmaterialien messen. Ein direkter Vergleich wurde jedoch nicht vorgenommen.
- **Polyglactin (Vicryl):** GIBSON et al. (1991) nahmen in einer vergleichenden Studie an Nn. ischiadici von Ratten auch das Polyglactin auf. Trotz Permeabilität und Resorptionsfähigkeit rät er davon ab, dieses Material zu gebrauchen, da es zu einer starken neutrophilen Entzündung führte.
- **Polypropylen (Marlex®):** Beim Einsatz von Polypropylen stellten GIBSON et al. (1991) im Vergleich die besten Erholungsergebnisse fest, empfahlen dieses nicht resorbierbare Material aufgrund einer sich einstellenden starken Gewebereaktion jedoch nicht.
- **Polyethylen:** Sowohl STEVENSON et al. (1994) als auch LANGONE und DA-SILVA (1990) untersuchten die Regeneration von Rattennerven durch Polyethylen-Röhren über einen Defekt von 4mm hinweg. Die Ergebnisse entsprachen bei STEVENSON et al. (1994) denen einer epineuralen Naht. LANGONE und DA-SILVA (1990) konnten weiterhin den positiven Einfluß einer exogenen Gangliosidzufuhr auf das axonale Aussprossen, nicht aber auf die axonale Maturation nachweisen.
- **Polyglycolsäure (PGA):** PGA ist als Nahtmaterial im Urogenitaltrakt, an Faszien, Arterien und Nerven im Gebrauch und erfährt dort innerhalb von 6 bis 12 Wochen einen kompletten Abbau. Die Ergebnisse von elektrophysiologischen Untersuchungen nach Regeneration durch

PGA-Kanäle im Vergleich zur epineuralen Naht waren signifikant besser mit der Tubulationsmethode (PHAM et al., 1990).

- **Polyglycolsäurelactid (PLGA):** Der Vergleich zwischen Autotransplantaten und PLGA Führungskanälen bei Ratten und Makakenaffen ergab keine signifikanten Unterschiede bei der Regeneration des N. ischiadicus (HADLOCK et al., 2000). Auch die Beimpfung des Führungskanals mit Schwannschen Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/Milliliter brachte keinen weiteren Vorteil.

STEUER et al. (1999) untersuchten die Fähigkeit von mit SC ummantelten Polylactid-Polymeren, das axonale Wachstum von Dorsalwurzelganglien in vitro zu unterstützen. Eine dauerhafte Applikation von Neurotrophinen, beispielsweise von NGF, an die Nervenstümpfe erübrigte sich durch die Anwesenheit der SC, die eine permanente NT-Quelle darstellten.

- **Poly-L-Lactid-co-6-Caprolacton (PLLA/PCL):** Der Einsatz dieses synthetischen, langsam resorbierbaren Materials wurde an Rattennerven geprüft (DEN DUNNEN et al., 1993; GIARDINO et al., 1995). Beide kamen zu guten Ergebnissen. Die Reaktion des Körpers auf den Fremdkörper war sehr gering, und auch ein chronisches Kompressionssyndrom wurde nicht beobachtet.

- **Acrylbutil/Polyvinylchlorid (PAN/PVC):** GUENARD et al. (1992) beschreiben den Einsatz synthetischer Führungskanäle aus 60% Acrylbutil und 40% Polyvinylchlorid mit einem inneren Durchmesser von 1,12mm und einer Wanddicke von  $0,126 \mu\text{m}$ . Es befinden sich SC in einer Konzentration von  $120 \times 10^6$  /ml in einer Suspension aus DMEM:Matrigel (70:30). Der Autor unterstreicht die Abhängigkeit des Erfolges von einer möglichst hohen Konzentration von SC in der Suspension.

In Anlehnung an diese Studie beschäftigten sich XU et al. (1995) mit der axonalen Regeneration in SC-gefüllte Führungskanäle im durchtrennten Rückenmark von Ratten.

Auch sie benutzten dabei eine SC-Suspension in DMEM:Matrigel (70:30). Als Material für die Führungskanäle setzten sie ebenfalls eine Kombination aus PAN und PVC (60:40) ein. Der innere Durchmesser der Kanäle betrug 2,6mm. Die Dichte der SC bei Implantation betrug  $120 \times 10^6$ /ml. Der Autor hebt die Bedeutung der Semipermeabilität des Kanalmaterials hervor, die bei einer Grenze von 50-100kDA liegen sollte.

## **b. Die Kultivierung Schwannscher Zellen**

Um Führungskanäle mit einer SC-Suspension füllen zu können, muß es gelingen, innerhalb von kurzer Zeit eine möglichst reine, große, stabile Population adulter, voll funktionsfähiger

SC zu kultivieren. Die Grundpopulation soll aus einer autologen Nervenbiopsie von geringer Größe stammen und *in vitro* vervielfacht werden. Damit vermeidet man die Suche nach kompatibelem Donormaterial sowie Abstoßungsreaktionen und immunsupprimierende Medikationen.

In der Literatur findet man zahlreiche Arbeiten über die Isolierung und Vermehrung Schwannscher Zellen aus Nervenmaterial. Dabei handelt es sich bis auf eine Studie zu SC von Katzen ausschließlich um Zellmaterial von Mäusen, Ratten oder Menschen. Trotz intensiver Literaturrecherche konnte keine Arbeit über canine Schwannszellen gefunden werden. Die in „Material und Methode“ beschriebenen Vorgehensweisen orientieren sich hauptsächlich an 5 Studien. Die für unsere Methodik wichtigsten Schritte aus diesen Studien sollen hier wiedergegeben werden und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

MORRISSEY, KLEITMAN, BUNGE (1991):

Die Autoren dieser Studie nahmen eine Gegenüberstellung vor zwischen der Zellausbeute nach sofortiger Verdauung des Nervenmaterials und nach längerem Reexplantieren. Im Falle des Reexplantierens wurden die von Nn. ischiadici aus Ratten gewonnenen, ca. 1mm<sup>2</sup> großen Explantate zu je 10 bis 15 Stück in 35mm Durchmesser zählenden Petrischalen mit serumhaltigem Medium bei 37°C und 7%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Nach 7 – 10 Tagen, wenn sich ein konfluierender Monolayer auswandernder Zellen um die Explantate herum gebildet hatte, wurden diese in neue Petrischalen mit neuem Medium umgesetzt. Dies geschah 4 – 5 Wochen lang. Es schloss sich die Verdauung mit 1,25 U/ml Dispase und 0,05% Collagenase an. Die Inkubation mit diesen Enzymen erfolgte über Nacht im Wärmeschrank. Am folgenden Tag triturierte man vorsichtig mit einer per Flamme verengten Pipette. Nach der Dissoziation wurde die Zellsuspension auf Poly-L-Lysin- (PLL) beschichtete Deckgläschen verteilt und auf diesen weiter expandiert. Nach einer Nacht, die die Zellen zum Anheften nutzen sollten, gab man als Mitogene 20µg/ml GGF und 2µM Forskolin in das Nährmedium. Nach 7 – 10 Tagen hatte die Zellkultur Konfluenz erreicht und wurde abtrypsiniert, wobei eine HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)-Lösung mit 0,02% EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zum Einsatz kam. Nach Umsetzen auf neue PLL-beschichtete Deckgläschen folgte die Anti-S100-Färbung. Diese begann mit 10 minütiger Fixierung der Zellen in 4% PA (Paraformaldehyd). Danach behandelte man die Zellen mit Permeabilisierungspuffer, der 0,02% TritonX-100-Lösung enthielt, sowie mit Blockpuffer, der 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum enthielt. Die Inkubation mit dem S100-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Der zweite, mit Fluoreszin konjugierte goat-anti-rabbit-

Antikörper wirkte am folgenden Tag bei Raumtemperatur 30 Minuten lang ein. Für die Eindeckung der Deckgläschen benutzte man Citifluor, dem 5 $\mu$ M Hoechst Färbelösung zugefügt waren. Mit dieser Kultivierungsmethode erreichten die Autoren eine Zellausbeute von  $2 \times 10^4$  Zellen pro mg Ausgangsmaterial und eine SC-Reinheit von 97%. Die sofortige Dissoziation hingegen erbrachte nur  $1 \times 10^3$  Zellen pro mg mit 10 – 40 % SC-Anteil.

Als Vorteile der Explantiermethode generell nennen die Autoren:

- die Verringerung der Fibroblastenzahl, die durch deren schnelles Auswandern aus den Explantaten und stetiges Umsetzen bewirkt wird,
- die Verringerung des SC-Verlustes, der bei sofortiger Dissoziation dadurch entsteht, daß die SC zu diesem frühen Zeitpunkt noch sehr eng mit axonalen Segmenten verbunden sind, und
- das Stattfinden einer Wallerschen Degeneration in vitro, deren Produkte einen intrinsischen Proliferationsreiz für die SC darstellen.

RUTKOWSKY, GIHAN, TENNEKOON, MC GILLICUDDY (1992):

In dieser Studie dienten Nervensegmente aus Pl. brachialis-Operationen bei Menschen als Material. 10mg von Epineurium befreites Gewebe wurde jeweils in Explantatform mit 1ml Medium inkubiert, dem neben 10% FCS (fetal calf serum) auch 0,1 $\mu$ g Choleratoxin zugesetzt waren.

Das Enterotoxin **Choleratoxin** bewirkt eine irreversible oder nur sehr langsam reversible Hemmung der Adenylatcyclase der Zellen (CASSEL und PFEUFFER, 1978) und soll bei angemessener Dosierung die mitotische Aktivität der Fibroblasten eindämmen, ohne die SC in bedeutendem Maße zu schädigen.

Nach maximal 14 Tagen fand die Verdauung mit 80IE/ml Collagenase und 0,8IE/ml Dispase pro 20mg Nervengewebe über 18 Stunden bei 37°C und 10%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre statt. Dabei wurde der Verdauungsansatz permanent sanft geschüttelt. Nach der Verdauung suspendierte man die Zellen in serumfreiem Medium und verteilte diese Suspension in einer Konzentration von ca.  $4-5 \times 10^5$  Zellen pro PLL-beschichteter Petrischale. Nach einer Anheftungszeit von 2 Tagen wurden die Zellen mit verschiedenen Mitogenen behandelt. Folgende Kombination erwies sich als optimal für die weitere Expansion: 0,1 $\mu$ g/ml Choleratoxin, 1mM Forskolin, 5 $\mu$ g/ml GGF (glial growth factor). Nach dem Abtrypsinieren fand die Färbung mit diversen Antikörpern auf PLL-beschichteten Deckgläschen in üblicher Weise statt. Die verschiedenen Antikörper (Antikörper gegen NGF- (nerve growth factor) Rezeptor / S-100 Protein / Galactocerebroside / GFAP (glial fibrillary acid protein) / Laminin / Fibronectin / Thy-1) wirkten 30min lang bei 37°C ein. Zum Eindecken benutzte man

Citifluor mit 2 $\mu$ M Hoechst Färbelösung. Als Ergebnis erhielten die Autoren eine Zellzahl von 2-10 $\times$ 10<sup>4</sup> Zellen pro Milligramm Nervenmaterial bei 90%iger SC-Reinheit bzw. 2 $\times$ 10<sup>6</sup> Schwanzzellen pro 100mg Ausgangsmaterial. Im Vergleich kamen sie bei sofortiger Dissoziation nur auf 700-800 lebende Zellen/mg Nervengewebe.

GUENARD, KLEITMAN, MORRISSEY, BUNGE, AEBISCHER (1992):

Als Material kamen Nn. ischiadici ausgewachsener Ratten zum Einsatz. Die 1mm<sup>3</sup> großen Explantate wurden in Collagen-beschichtete Petrischalen verbracht und mit serumhaltigem Medium versorgt. Alle 5 Tage fand eine Umsetzung statt. Die Dissoziation wurde 2 Stunden lang bei 37°C durchgeführt mit 0,3% Trypsin, 0,1% Collagenase und 0,1% Hyaluronidase. Daraufhin erfolgte nach einem weiteren Tag der Wechsel zum Mitogenmedium mit 2 $\mu$ M Forskolin und 10mg/ml bovinem PEX (pituitary extract), das 4 –6 Tage lang beibehalten wurde. Eine weitere Expansion wurde in dieser Studie nicht vorgenommen. Für die Färbung benutzte man Antikörper gegen den NGF-Rezeptor und gegen das S-100 Protein in üblicher Weise. Die SC-Reinheit betrug 97%. Eine absolute Zellzählung wurde nicht durchgeführt.

MORRISSEY, BUNGE, KLEITMAN (1995):

Morrissey, Kleitman und Bunge stellten Ratten- und humane Schwanzzellkulturen einander gegenüber. Die Autoren hielten sich eng an die Methodik von MORRISSEY et al. (1991). Die Explantate wurden 4 – 8 Wochen lang reexplantiert und mit serumhaltigem Medium bedeckt. Die Verdauung erfolgte ebenso wie bei MORRISSEY et al. (1991). Die folgende Expansion der Rattenzellen erfolgte in PLL-beschichteten Petrischalen mit dem Zusatz von 2mM Forskolin und 20mg/ml PEX. Circa alle 7 –10 Tage fand eine Passagierung statt. Für die Expansion der humanen SC kamen neben Forskolin (1 $\mu$ M) auch Cholera toxin (100ng/ml) und Heregulin (HRG $\beta$ 1, 10nM) zum Einsatz.

Die Anzahl und Folge der Passagierungen entsprach denen bei Rattenzellen. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des low-affinity-NGF-Rezeptors. Die Autoren sprechen von einer 99%igen SC-Reinheit der humanen Zellkulturen. Eine absolute Zellzahl wurde nicht ermittelt.

Das Protein **Heregulin** gehört in eine Gruppe von axonalen Mitogenen, die Neureguline genannt werden. Hierzu gehören neben Heregulin (HRG) auch dessen Isoformen glial growth factor (GGF), neu differentiation factor (NDF) sowie acetylcholine receptor inducing activity (ARIA). Ihr Angriffspunkt sind die transmembranösen Klasse I Rezeptor Tyrosinkinasen auf Zelloberflächen. Man unterscheidet die Rezeptoren HER2, HER3 und HER4, die codiert werden durch die Gene erbB2, erbB3 und erbB4. Spezifisch auf SC wirkt das HRG $\beta$ 1, das die

Phosphorylierung des Heterodimer-Rezeptorkomplexes HER2/HER3, auch p185 genannt, bewirkt. Diese zieht eine Kaskade verschiedener weiterer Phosphorylierungen und Aktivierungen von Proteinen nach sich. Diese Aktivierungen finden in der Zellkultur auch ohne die zusätzliche Zugabe direkter Adenylatcyclaseaktivatoren wie Forskolin statt. Zur Steigerung der SC-Proliferation kommt es aber erst durch längeres synergistisches Wirken von HRG und Forskolin (RAMATHULLAH et al., 1998).

Neureguline spielen eine wichtige Rolle im gesamten Leben von SC. Ihr Einfluß als Neurotrophine während der frühen Entwicklung der SC-Linie und als Proliferationsförderer gilt als gesichert (BUNGE, 1994; MORRISSEY et al., 1995; LEVY et al., 1995; GARRAT et al., 2000; ZANAZZI et al., 2001). Ihre spätere Rolle in der korrekten Myelinisierung oder in der Regeneration und Reparatur von Myelindefekten ist hingegen umstritten. GARRAT et al. (2000) schreiben den Neuregulinen einen positiven Einfluß in Bezug auf Myelinisierung und Reparatur zu, während ZANAZZI et al. (2001) eine Demyelinisierung und eine Dedifferenzierung der SC beschreiben.

CASELLA, BUNGE, WOOD (1996):

Diese Studie beschäftigt sich mit der Expansion humaner SC. Das Nervenmaterial stammte von Organspendern (N. phrenicus / N. intercostalis / Pl. lumbosacralis-Anteile). Die 2mm<sup>3</sup> großen Explantate wurden in Petrischalen von 35mm Durchmesser mit serumhaltigem Medium bedeckt, so daß sie darin schwebten. Es wurde kein Transfer der Explantate vorgenommen, sondern 2 – 3 x wöchentlich das Medium gewechselt. Nach maximal 28 Tagen verdaute man die Explantate über 18 Stunden mit 0,05% Collagenase und 0,25% Dispase.

Die Wirkung folgender Mitogene wurde untersucht:

- a) Den Explantaten wurden 2µM Forskolin und 10nm Heregulin zugegeben.
- b) Nach der Verdauung wurden pro ml Medium 100ng Choleratoxin zugesetzt.

Die Färbung mit Anti-S-100 Protein erfolgte in gewohnter Weise, die Eindeckung mit Citifluor und 5µM Hoechst Färbelösung.

Auch diese Autoren beschreiben einen Vorteil der Explantatmethode gegenüber dem sofortigen Verdauen des Nervenmaterials. Sie halten eine 2 – 4 wöchige Explantierdauer für ausreichend. Sie stellen den Gebrauch von Mitogenen bereits vor der Verdauung (Forskolin und Heregulin) hervor, während sie dem Zusatz von Choleratoxin nach der Verdauung keinen weiteren positiven Einfluß zuschreiben. Die Zellsuspension sollte in Collagen-beschichteten Petrischalen für 8 Wochen expandiert werden.

Die Autoren erreichten so eine Expansion von 3000x und eine SC-Reinheit von 95%. Aus einem 1cm großen Stück des N. intercostalis gewannen sie mit dieser Methode innerhalb von 10 Wochen  $3 \times 10^9$  Zellen.

Neben den bisher aufgeführten Mitogenen werden in der Zellkulturforschung diverse, üblicher Weise in der Krebsbekämpfung als Zytostatika eingesetzte Mittel verwendet. Hierzu gehören z.B. **Fluorodeoxyuridin**, ein Metabolit des oralen Zytostatikums Capecitabin (KIM et al., 1994), und **Cytosinarabinosid**. Cytosinarabinosid ist ein in der Humanmedizin häufig bei verschiedenen Leukämieformen eingesetzter DNA-Polymerase-Hemmer. Es soll in der Zellkultur die DNA-Replikation und somit die Teilungsaktivität der Fibroblasten herabsetzen (BROCKES et al., 1979; ASSOULINE et al., 1989). ASSOULINE et al. (1989) setzten diese antimitotische Substanz in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M für 24-48 Stunden der Zellkultur nach der Verdauung zu und konnten damit in Verbindung mit PEX (pituitary extract) (500µg/ml) und Cholera toxin (0,5µg/ml) ihre Ergebnisse verbessern.

**Tabelle 1:**

## Zusammenfassung von Material und Methode der fünf Studien

Autoren	Methode	Zellart	Zellzahl (Z/ml)	SC (%)	Verdauung	Mitogene	Gesamtzeit (Wochen)
Morrissey et al., 1991	Reexplantieren	Rattenz.	$2 \times 10^4$	97	1,25IU/ml Dispase, 0,05% Collagenase, über Nacht	nach Verd.: 20mg/ml GGF, 2µM Forskolin	10
	sofortige Dissoziation	Rattenz.	$1 \times 10^3$				
Rutkowski et al., 1992	Reexplantieren	Humane Zellen	$2-6 \times 10^4$	90	80IU/ml Collagenase, 0,8IU/ml Dispase, 18h	zu Expl.: 0,1µg/ml Cholera toxin; nach Verd.: 0,1µg/ml Cholera toxin	3 bis 4
	sofortige Dissoziation	Humane Zellen	700-800				
Guenard et al., 1992	Reexplantieren	Humane Zellen		97	0,3% Trypsin, 0,1% Collagenase, 0,1% Hyaluronidase, 2h	nach Verd.: 2µM Forskolin, 10mg/ml PEX	ca. 4
Morrissey et al., 1995	Reexplantieren	Humane Zellen		99	s. Morrissey et al., 1991	nach Verd.: 1µM Forskolin, 100ng/ml Cholera toxin, 10nM Heregulin	8 bis 12
	Reexplantieren	Rattenz.				nach Verd.: 2µM Forskolin, 20µg/ml PEX	
Casella et al., 1996	Reexplantieren über 14d	Humane Zellen	$3 \times 10^9$	95	0,05% Collagenase, 0,25% Dispase über 18h	zu Expl.: 2µM Forskolin, 10nM Heregulin; nach Verd.: 100ng/ml Cholera toxin	ca 10

## c. Schwanzzellen-Marker

Um den Erfolg der Schwanzzellzüchtung quantitativ auswerten zu können, bedarf es einer spezifischen Kenntlichmachung, d.h. Anfärbung der SC durch Marker.

Die Darstellung der Schwannschen Zellen gelingt über die indirekte Immunfluoreszenz. Es sind mehrere Antikörper bekannt, mit deren Hilfe SC zu markieren sind. Myelinscheidenbildende SC können z.B. durch die Markierung der Myelin-Proteine P0, MAG, MBP oder Galactocerebroside dargestellt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Anfärbung des GFAP (glial fibrillary acid protein), des NCAM (**n**eural **c**ell **a**dhesion **m**olecule) (s.u.), des NgCAM (s.u.) des low affinity-NGF (**n**erve **g**rowth **f**actor)-Rezeptors namens p75LNTR sowie des S-100Proteins.

Der laut Literatur am häufigsten für die Färbung gebrauchte Antikörper ist das Anti-S-100 Protein.

#### • **S-100 Protein**

Den Namen erhielt dieses Protein, weil es in gesättigter Ammoniumsulfatlösung bei pH 7 komplett löslich ist. Es handelt sich um ein kleines Molekül mit geringer Antigenität, das im NS aller Wirbeltiere und auch einiger Nichtvertebraten vorkommt. Aufgrund eines großen Anteils an Glutamat- (19%) und Aspartat-Resten (11%) ist es sehr sauer.

Es besteht aus drei Untereinheiten mit jeweils ca. 7000wt Molgewicht.

Pro Molekül kann es 8-10 Kalziumionen binden. Dabei macht es eine Konformationsänderung durch und exponiert die hydrophoben Regionen. Dies bewirkt eine verstärkte Wanderung von Kationen durch Model-Bilayers. Man hat aus diesen Zusammenhängen geschlossen, daß das S100 Protein eine Rolle im Kationentransport spielt. Eine zweite Funktion, die einer genomischen Regulation, wird angenommen aufgrund einer Beteiligung des S-100 Proteins an den sauren Proteinen des nukleären Chromatins.

#### • **P75**

Seltener wird laut Literatur der p75-Antikörper gebraucht. Er markiert den low affinity-Rezeptor des NGF (nerve growth factor), der auch p75LNTR genannt wird. Als Membranprotein ist er in der Zellmembran von Schwanzzellen vertreten (s. a. 4.b). Der NGF-Rezeptor befindet sich in besonderer Häufung in den distalen Bereichen der SC-Ausläufer. Hier spielt er vermutlich eine besondere Rolle im Rahmen der SC-Migration und der Axonumscheidung.