

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
und der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Effektive Kultivierung caniner Schwanzzellen
unter Einsatz von VEGF und FGF-2
zur Rekonstruktion peripherer Nervenverletzungen**

INAUGURAL - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anna Parotat
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2009

Journal-Nr: 3357

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Angelika Richter

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dogs, nervous system, regeneration, cultivation, growth factors, vascular endothelial growth factor a [MeSH], fibroblast growth factor 2 [MeSH], schwann cells [MeSH]

Tag der Promotion: 08.04.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-813-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>8</u>
<u>2</u>	<u>Literaturübersicht</u>	<u>10</u>
2.1	Das periphere Nervensystem	10
2.1.1	Entwicklung des peripheren Nervensystems	10
2.1.2	Neurone	11
2.1.3	Gliazellen	13
2.1.3.1	Schwannzellen	14
2.1.3.1.1	Differenzierung der Schwannzellen	14
2.1.3.1.2	Beeinflussung durch Neureguline	15
2.1.3.1.3	Myelinisierung	17
2.1.3.1.3.1	Zusammensetzung des Myelins	19
2.1.3.1.3.1.1	Glykoproteine des Myelins	20
2.1.3.1.3.1.2	Basische Proteine des Myelins	21
2.1.4	Aufbau peripherer Nerven	22
2.2	Relevante periphere Nervenerkrankungen	22
2.2.1	Definitionen der Schweregrade peripherer Nervenverletzungen	23
2.2.2	Verletzungen peripherer Nerven	24
2.2.2.1	Läsion des Nervus ischiadicus	24
2.2.2.2	Plexus brachialis-Abriss	25
2.2.3	Periphere Nervenscheidentumore	25
2.3	Regeneration peripherer Nerven	25
2.3.1	Wallersche Degeneration	26
2.3.2	Schwannzellen und Nervenregeneration	28
2.3.2.1	Neurotrophe Faktoren	29
2.3.2.1.1	Neurotrophine und ihre Rezeptoren	29
2.3.2.1.1.1	Nerve Growth Factor (NGF)	30
2.3.2.1.1.2	Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	31
2.3.2.1.1.3	Neurotrophin-3 und Neurotrophin-4/5 (NT-3 und NT-4/5)	31
2.3.2.1.2	Neurokine, Neuropoetische Zytokine, Neuropoetine	32
2.3.2.1.3	Transforming Growth Factor Family	33
2.3.2.1.4	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	33
2.3.2.1.5	Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)	34
2.3.2.2	Zelladhäsionsmoleküle (Cell Adhesion Molecules, CAM)	36
2.3.2.3	Moleküle der extrazellulären Matrix (Extracellular Matrix, ECM)	37

2.3.3	Axonale Regeneration	37
2.4	Chirurgische Behandlungsmöglichkeiten peripherer Neuropathien	39
2.4.1	Nervennaht, Neurorrhaphie, Koaptation	39
2.4.2	Muskeltransposition	39
2.4.3	Neurotisation	40
2.4.4	Nerventransplantation	41
2.5	Neue Behandlungsmöglichkeiten peripherer Nervenläsionen	42
2.5.1	Natürliche Materialien	43
2.5.2	Synthetische nicht resorbierbare Materialien	45
2.5.3	Synthetische resorbierbare Materialien	46
2.6	Isolierung und Kultivierung von Schwannzellen	48
2.6.1	Identifizierung von Schwannzellen	50
2.6.2	Methoden zur Maximierung der Reinheit von Schwannzell-Kulturen	51
2.6.2.1	Magnetisch aktivierte Zelltrennung (MACS)	51
2.6.2.2	Cold Jet	52
<u>3</u>	<u>Zellen und Materialien</u>	<u>53</u>
3.1	Zellen	53
3.2	Lösungen für die Zellkultur	53
3.3	Zusammensetzungen verwendeter Kulturmedien und des Verdauungsansatzes	54
3.3.1	Erhaltungsmedium DMEM+	54
3.3.2	Melanozyten-Wachstums-Medium + (MM+)	54
3.3.3	Selektivmedium nach J. Pauls	54
3.3.4	Einfriermedium	55
3.3.5	Verdauungsansatz zur Dissoziation der Nervenexplantate	55
3.4	Chemikalien und Reagenzien	55
3.5	Zusammensetzung verwendeter Gebrauchslösungen zur Erstellung der Semidünnschnitte	56
3.5.1	Cacodylat-Puffer	56
3.5.2	Karnovsky-Lösung	57
3.6	Antikörper und Kontrollseren	57
3.6.1	Primärantikörper	57
3.6.2	Sekundärantikörper	57
3.6.3	Kontrollseren	57

3.7	Proliferations-Assays	58
3.8	Verbrauchsmaterialien	58
3.9	Geräte	59
<u>4</u>	<u>Methoden</u>	<u>60</u>
4.1	Entnahme von Nervenbiopsien	60
4.2	Histologische Untersuchungen	62
4.2.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE)	62
4.2.2	Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Färbung	63
4.3	Isolierung, Kultivierung und Purifikation caniner Schwanzzellen	63
4.3.1	Präparation der Nervenbiopsien	63
4.3.2	Explantieren der Nervenbiopsien	64
4.3.3	Passagieren der Explantate	65
4.3.4	Dissoziation der Explantate	65
4.3.5	Trypsinierung der aus den Explantaten gewonnenen Zellen	66
4.3.6	Kryokonservierung der aus den Explantaten gewonnenen Zellen	66
4.4	Immunzytochemischer Nachweis von p75-NTR, VEGFR-2 und FGFR-3	66
4.5	Quantitative Analyse des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen	76
4.5.1	Prinzipien der verwendeten Proliferations-Assays	76
4.5.1.1	BrdU-Assay	76
4.5.1.2	Resazurin-Resorufin-Assay (CellTiter-Blue-Assay ®)	79
4.5.2	Quantifizierung des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen	81
<u>5</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>85</u>
5.1.	Identifizierung von Nervengewebe und caninen Schwanzzellen	85
5.1.1	Identifizierung des Nervengewebes	85
5.1.2	Identifizierung der Schwanzzellen innerhalb des Nervengewebes	88
5.2	Gewinnung von caninen Schwanzzell-Kulturen	90
5.2.1	Morphologische Identifizierung caniner Schwanzzellen in vitro	90

5.2.1.1	Morphologische Identifizierung caniner Schwanzzellen bei Kultivierung in DMEM+	92
5.2.1.2	Morphologische Identifizierung caniner Schwanzzellen bei Kultivierung in MM+	93
5.2.2	Immunzytochemische Identifizierung caniner Schwanzzellen in vitro	95
5.2.3	Purifikation caniner Schwanzzell-Kulturen	98
5.2.3.1	Purifikation caniner Schwanzzellen durch Inkubation in MM+	98
5.2.3.2	Purifikation caniner Schwanzzellen durch kurzzeitige Trypsinierung	99
5.2.4	Morphologie und Vitalität caniner Schwanzzellen vor und nach Kryokonservierung	103
5.3	Morphologie und Proliferation caniner Schwanzzellen durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2	104
5.3.1	Nachweis der Expression der Rezeptoren für die eingesetzten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2	104
5.3.2	Morphologie caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss der eingesetzten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2	107
5.3.3	Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss der eingesetzten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2	108
5.3.3.1	Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss von VEGF	108
5.3.3.2	Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss von FGF-2	114
5.3.3.3	Proliferation caniner Schwanzzellen: VEGF versus FGF-2	120
5.3.3.4	Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss von VEGF und FGF-2	120
5.3.3.5	Proliferation caniner Schwanzzellen: VEGF und FGF-2 versus Kombinationen von VEGF und FGF-2	129
<u>6</u>	<u>Diskussion</u>	<u>130</u>
6.1	Von der Nervenbiopsie zur Schwanzzell-Kultur	130
6.1.1	Gewinnung der Biopsien – Gefahr der Kontamination	130
6.1.2	Identifizierung der Biopsien – Nachweis des charakteristischen strukturellen Aufbaus des Nervengewebes	131
6.1.3	Explantation der Nervenbiopsien mit anschließender Dissoziation - Vor- und Nachteile gegenüber der sofortigen Dissoziation	132
6.1.4	Purifikation der aus den Nervenexplantaten hervorgegangenen Mischkulturen - Gewinnung reiner Schwanzzell-Kulturen	134

6.2	Einfluss von VEGF und FGF-2 auf die Morphologie und Proliferation caniner Schwannzellen	136
6.2.1	Der VEGF-Rezeptor VEGFR-2 und FGF-2-Rezeptor FGFR-3 werden von caninen Schwannzellen exprimiert	137
6.2.2	VEGF und FGF-2 stabilisieren die charakteristische bipolare Morphologie caniner Schwannzellen in vitro	138
6.2.3	VEGF und FGF-2 stimulieren die Proliferation caniner Schwannzellen	138
6.2.3.1	Eingesetzte canine Schwannzell-Kulturen zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2	139
6.2.3.2	Eingesetzte Methoden zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2	141
6.2.3.3	Eingesetzte Konzentrationen von VEGF und FGF-2 zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2	142
6.2.3.4	Eingesetzte Kombinationen von VEGF und FGF-2 zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2	146
6.3	Leitschema zur Isolierung und Expansion caniner Schwannzell-Kulturen unter Einsatz von VEGF und FGF-2	147
6.4	Tissue-Engineering zur Herstellung artifizierlicher Nervenimplantate – Vorteile gegenüber der autologen Nerven transplantation	148
<u>7</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>152</u>
<u>8</u>	<u>Summary</u>	<u>154</u>
<u>9</u>	<u>Abkürzungen</u>	<u>156</u>
<u>10</u>	<u>Zitierte Literatur</u>	<u>160</u>
<u>11</u>	<u>Danksagung</u>	<u>207</u>
<u>12</u>	<u>Publikationsverzeichnis</u>	<u>209</u>
<u>13</u>	<u>Selbstständigkeitserklärung</u>	<u>210</u>

1 Einleitung

Periphere Nervenerkrankungen des Hundes können traumatisch, z.B. einerseits durch Verkehrsunfälle, Frakturen oder Bissverletzungen und andererseits durch Operationen, aber auch durch Neoplasien bedingt sein. Zu unterscheiden sind außerdem Quetschungen oder Durchtrennungen einzelner Nerven von Verletzungen ganzer Nerven-Plexus wie z.B. dem Abriss des Plexus brachialis (WITHROW und AMIS, 1977; SWAIM, 1978; FANTON et al., 1983; GILMORE, 1984; JACOBSON und SCHRADER, 1987; FORTERRE et al., 2003a; FORTERRE et al. 2003b). Im Gegensatz zum zentralen Nervensystem ist bei peripheren Nervenverletzungen theoretisch eine Regeneration mit vollständiger Funktionswiederherstellung möglich (STOLL et al., 2002). Die verschiedenen chirurgischen Behandlungsmöglichkeiten peripherer Nervenläsionen liefern bisher trotz aller Bemühungen nicht zuverlässig zufrieden stellende Ergebnisse.

Den Goldstandard zur Überbrückung eines peripheren Nervendefekts stellt die autologe Nerventransplantation dar (MILLES, 2000; EVANS, 2001; BATTISTON et al., 2005; REYES et al., 2005; LOHMEYER et al., 2007; MUIR, 2009). Dabei dient das Transplantat als Leitschiene für die regenerierenden Axone, da es ein Gerüst darstellt und gleichzeitig neurotrophe Faktoren produzierende Schwannzellen und die Schwannzell-Basalmembran als ideales Wachstumssubstrat für regenerierende Axone liefert (LUNDBORG, 2003). Die autologe Nerventransplantation birgt allerdings einige Nachteile wie die limitierte Verfügbarkeit von Transplantaten sowie einen möglicherweise komplikationsbehafteten zusätzlichen operativen Eingriff (HEATH und RUTKOWSKI, 1998; EVANS, 2000; WEBER et al., 2000; FANSA et al., 2003; WIBERG und TERENCE, 2003; CIARDELLI und CHIONO, 2006).

Aufgrund der genannten Problematik wird mit großer Intensität an Alternativen zur Behandlung von peripheren Nervenläsionen geforscht. Beachtliche Erfolge wurden dabei mit in Tissue-Engineering-Verfahren hergestellten, artifiziellen Nervenimplantaten erzielt. Dabei stellen besonders mit Schwannzellen beladene Implantate eine Erfolg versprechende Strategie dar (MAY et al., 2005; DE RUITER et al., 2009; HOOD et al., 2009;).

Schwannzellen synthetisieren neurotrophe Faktoren und deren Rezeptoren (FROSTICK et al., 1998). Dadurch beschleunigen sie den Regenerationsprozess und ermöglichen im Vergleich mit azellulären Nervenimplantaten eine Nervenregeneration über längere Distanzen (RODRIGUEZ et al., 2000) sowie eine verbesserte morphologische und funktionelle Wiederherstellung des Nerven (BATTISTON et al., 2005).

Wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung solcher artifizieller Nervenimplantate ist die Isolierung reiner autologer Schwannzell-Kulturen und deren Expansion in vitro. Zahlreiche

Arbeiten beschreiben die Isolierung, Vermehrung und Identifizierung von Schwannzellen aus Nervengewebe von Ratten (z.B. MORRISSEY et al., 1991; GUENARD et al., 1992; ANSSELIN et al., 1995; ANSSELIN et al., 1997; VROEMEN und WEIDNER, 2003; MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2007), Mäusen (z.B. VERDU et al., 2000), Kaninchen (z.B. STRAUCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002) und Menschen (z.B. ASKANAS et al., 1980; RUTKOWSKI et al., 1992; MORRISSEY et al., 1995a; MORRISSEY et al., 1995b; CASELLA et al., 1996; TURNBULL, 2005; HAASTERT et al., 2006b; HAASTERT et al., 2007). Schwannzellen des Hundes wurden erstmals von PAULS (2003) isoliert, identifiziert und kultiviert.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer effektiven Methode zur Isolierung, Purifikation und Expansion caniner Schwannzell-Kulturen. Dazu wurde Nervengewebe entnommen und daraus Zellen isoliert, bei denen es sich zunächst um Mischkulturen handelte. Die folgenden wichtigen Schritte bestanden in der Purifikation dieser Mischkulturen zu reinen Schwannzell-Kulturen und in deren Vermehrung durch Inkubation in Wachstumsfaktoren.

In den letzten Jahren wurden viele Parallelen zwischen dem Gefäß- und dem Nervensystem aufgedeckt, so dass sich das Bild der Wachstumsfaktoren, die ehemals aufgrund ihrer Wirkung auf das eine oder das andere System entdeckt wurden, verändert hat (ZACHARY, 2005).

VEGF und FGF-2 sind Zytokine, für die proliferative Effekte sowohl auf die Zellen des Gefäß- als auch des Nervensystems beschrieben sind. Von besonderem Interesse für die eigene Arbeit war deshalb ob VEGF und FGF-2, für welche in der Literatur eine proliferative Wirkung auf Schwannzellen beschrieben wird (SONDELL et al., 1999a; SONDELL et al., 1999b; SCHRATZBERGER et al., 2000; DAVIS und STROOBANT 1990; HAASTERT et al., 2007), zur Expansion der caninen Schwannzell-Kulturen geeignet sind.

Als Resultat der eigenen Untersuchungen sollte ein Leitschema zur Isolierung und Expansion caniner Schwannzell-Kulturen unter Einsatz von VEGF und FGF-2 entwickelt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Das periphere Nervensystem

Zum peripheren Nervensystem (PNS) werden alle Anteile des Nervensystems außerhalb des Gehirns und des Rückenmarks gezählt. Gehirn und Rückenmark werden als zentrales Nervensystem (ZNS) zusammengefasst. Beim Hund umfasst das PNS 12 paarige Gehirnnerven und 36 spinale Nerven sowie die prae- und postganglionären Fasern des vegetativen Nervensystems. Die Spinalnerven werden in Segmental- und Plexusnerven unterteilt. Segmentalnerven teilen sich nach Austritt aus dem Foramen intervertebrale zuerst in einen Dorsal- und einen Ventralast, die sich dann in einen dorsolateralen und einen dorsomedialen Ast bzw. in einen ventrolateralen und ventromedialen Ast verzweigen. Plexusnerven gehen aus Nervengeflechten ventraler Spinalnervenäste hervor. Dabei findet innerhalb des Plexus ein Faseraustausch der Spinalnervenäste statt.

Das Nervengewebe des PNS besteht aus drei Grundstrukturen: den Neuronen, den Gliazellen und dem umgebenden Bindegewebe.

2.1.1 Entwicklung des peripheren Nervensystems

Als erste Anlage des Nervensystems entsteht im Ektoderm durch Zellproliferation eine „schuhsohlenförmige“ Verdickung, die so genannte Neuralplatte, deren Ränder sich durch weitere Zellvermehrung zu den Neuralwülsten (Neuralfalten) aufwölben, die die Neuralrinne begrenzen. Schließlich verschmelzen die Neuralwülste miteinander und bilden so das Neuralrohr mit Zentralkanal (RÜSSE und SINOWATZ, 1998; SCHNORR und KRESSIN, 2006). Während der Verschmelzung der Neuralwülste verlieren die am Rande gelegenen Ektodermzellen den Kontakt zu ihren benachbarten Zellen und ordnen sich zwischen Neuralrohr und Oberflächenektoderm an. Dieses zunächst zusammenhängende Zellmaterial teilt sich dann in einen rechten und einen linken Anteil, aus dem sich die rechte und die linke Neuralleiste entwickeln. Die Neuralleisten liefern eine pluripotente Zellpopulation, die im Embryo weite Strecken wandern kann und an der Bildung verschiedener Organe beteiligt ist. Zu unterscheiden sind Kopf- und Rumpfneuralleiste, aus denen Spinalganglien, Ganglien des vegetativen Nervensystems, Ganglien des V., VII., IX. und X. Gehirnnerven, periphere Gliazellen, Pigmentzellen, Zellen des Nebennierenmarks sowie des Kopfskeletts und der Kopfmuskeln hervorgehen (RÜSSE und SINOWATZ, 1998; SCHNORR und KRESSIN, 2006).

In der Gesamtheit entwickelt sich das periphere Nervensystem aus verschiedenen Anlagen. Alle afferenten Neurone sowohl des somatischen als auch des vegetativen Nervensystems gehen aus der Neuralleiste hervor. Die Zellkörper der Neurone der efferenten Nervenfasern sind im zentralen Nervensystem lokalisiert. Die Zellkörper der sensiblen Neurone werden von speziellen Gliazellen, den Mantel- oder Satellitenzellen, die sich aus den der Neuralleiste entstammenden Glioblasten differenzieren, umgeben. Während der Embryogenese wandern und proliferieren die Schwannzell-Vorläufer entlang der neu gebildeten Axone an den Ort ihrer Bestimmung und umhüllen schließlich alle Axone (SYROID et al., 1996; RÜSSE und SINOWATZ, 1998; GARRATT et al., 2000a). Bereits am 10. Tag können bei Mäuseembryonen in den primären Axonbündeln Schwannzell-Vorläufer gesehen werden (GARRATT et al., 2000a). Bei Rattenembryonen sind Schwannzell-Vorläufer am 14./15. Tag innerhalb eines Nerven und an dessen Rand zu finden. Zu diesem Zeitpunkt ist der Nerv noch von keinem signifikanten Bindegewebe umgeben. Zwischen dem 15. und 17. Tag der embryonalen Entwicklung konvertieren die Schwannzell-Vorläufer zu unreifen Schwannzellen, gleichzeitig beginnen sich das Perineurium und die Gefäßversorgung der Nerven zu entwickeln (JESSEN und MIRSKY, 2005).

Schwannzellen und ihre Progenitoren sind aktive Regulatoren der Entwicklung des peripheren Nervensystems, da ihre Signale sowohl die eigene Entwicklung als auch die Differenzierung der Neurone und die Anordnung des umgebenden Bindegewebes beeinflussen (JESSEN und MIRSKY, 1999a).

In der Entwicklung, Funktion und Regeneration des peripheren Nervensystems spielen die neurotrophen Faktoren eine große Rolle. Sie werden in drei große Familien eingeteilt (FROSTICK et al., 1998; FANSA und KEILHOFF, 2003; BOYD und GORDON, 2003b): die **Neurotrophine** einschließlich Nerve Growth Factor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5), die **Neurokine** bzw. **Neuropoetischen Zytokine**, zu denen Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und der leukämiehemmende Faktor (Leukemia Inhibitory Factor (LIF)) gehören und die **Transforming Growth Factor Familie** bzw. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Familie, die TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 und GDNF umfassen.

2.1.2 Neurone

BILZER et al. (2005) bezeichnen Neurone als die höchst differenzierten somatischen Zellen. Wesentliche strukturelle Elemente der Neurone sind das Perikaryon, die Dendriten und das Axon.

Das Perikaryon beinhaltet den Kern der Nervenzelle mit Nukleolus und den um den Kern gelegenen Zytoplasmabereich. Hier liegt das Zentrum für den Erhaltungs- und Funktionsstoffwechsel der Nervenzelle, in dem sämtliche Zellbestandteile einschließlich der Membranstrukturproteine synthetisiert werden. Dendriten sind baumartig verzweigte Fortsätze, die den Nervenzellen ermöglichen Reize aus einem Netzwerk von Nervenzellen aufzunehmen. Sie empfangen die elektrischen Impulse aus der Peripherie und leiten diese zum Zellkörper weiter. Ihre Leitungsrichtung wird afferent genannt. Das Axon ist der unverzweigte Fortsatz einer Nervenzelle, der die Erregung vom Perikaryon weg in die Peripherie, also efferent leitet. Jede Nervenzelle besitzt nur ein Axon (NICHEL et al., 1992; LIEBICH, 2004).

Als Ausdruck der Synthese und Abgabe von Sekreten in die Nervenzellfortsätze ist der Golgiapparat im Perikaryon stark entwickelt, ebenso wie das ribosomenbesetzte endoplasmatische Retikulum (rER). Mitochondrien, Lysosomen, Golgiapparat und rER sind im Perikaryon als Nissl-Schollen zusammengefasst (BILZER et al., 2005). Während sich das rER in den Dendriten fortsetzt, fehlt es im Axon. Die Austrittsstelle des Axons aus dem Perikaryon wird als Axonhügel bezeichnet (LIEBICH, 2004). Das Zytoskelett innerhalb eines Axons besteht aus drei Arten von fibrillären Strukturen unterschiedlichen Durchmessers, den Mikrofilamenten (5 bis 7 nm), Neurofilamenten (10 nm) und Mikrotubuli (25 nm) (NAVES et al., 1996).

Perikaryon, Dendriten und Axon besitzen Mitochondrien zur aeroben Energieversorgung. Da im Axon das rER zur Proteinbiosynthese weitgehend fehlt, müssen sämtliche Proteine und Enzyme über axonalen Transport an ihre Wirkungsstätte gelangen (ROSS et al., 1995). Nach der Geschwindigkeit unterscheidet man einen schnellen axonalen Transport (200 bis 500 mm/Tag) und eine langsame axonale Strömung (zwei bis fünf mm/Tag) (LIEBICH, 2004). Der schnelle axonale Transport wird weiterhin anhand der Richtung in einen anterograden (vom Perikaryon weg) und einen retrograden Transport (zum Perikaryon hin) unterteilt, während die langsame axonale Strömung nur anterograd gerichtet ist (ROSS et al., 1995). Mit Hilfe des schnellen anterograden Transports werden alle neu synthetisierten Membranorganellen wie Mitochondrien, synaptische Vesikel aber auch niedermolekulare Stoffe wie Zucker, Aminosäuren, Nukleotide, Neurotransmitter und Kalzium vom Perikaryon zu den Axonendigungen geleitet (ROSS et al., 1995).

Der schnelle retrograde Transport erreicht maximal die halbe Geschwindigkeit des anterograden Transports. Durch ihn werden viele der gleichen Materialien, aber auch Proteine und andere Moleküle, die endozytotisch in die terminalen Axone aufgenommen wurden, in Richtung des Perikaryon geleitet. Der Zellkörper wird auf diesem Weg über Ereignisse an den entfernten Nervenenden informiert. So wird z.B. NGF von den Nervenendigungen aufgenommen, um nach retrogradem axonalen Transport zum

Perikaryon das Neuronenwachstum zu stimulieren (KANDEL et al., 1996). Über diesen Weg gelangen auch Toxine und Viren, (z.B. Rabies) von den Nervenendigungen ins ZNS. Zytoskelettelemente und lösliche Proteine werden durch langsame axonale Strömung weitergeleitet (ROSS et al., 1995).

2.1.3 Gliazellen

Gliazellen sind zeitlebens teilungsfähig. Sie stehen in direktem Kontakt mit den Neuronen und bilden mit diesen eine enge funktionelle Einheit, ohne die die neuronale Reizleitung und damit die Funktion des Nervensystems nicht aufrechterhalten werden könnte (NICKEL et al., 1992; LIEBICH, 2004; SALOMON et al., 2005).

Die am intensivsten untersuchte Funktion von Gliazellen in adulten Nerven ist die Bildung der Myelinscheiden um die Axone (NDUBAKU und BELLARD, 2008), welche die schnelle saltatorische Erregungsleitung ermöglicht. Des Weiteren erhalten Gliazellen die erforderlichen Konzentrationen von Ionen und Neurotransmittern in der Umgebung der Neurone aufrecht. Sie haben eine wichtige Rolle bei der Bildung, Aufrechterhaltung und Funktion der Synapsen. Während der embryonalen Entwicklung weisen Gliazellen den sich entwickelnden Neuronen den Weg. Auch an der Reaktion des Nervensystems auf Krankheiten und Traumata sind Gliazellen wesentlich beteiligt (JESSEN, 2004; NDUBAKU und BELLARD, 2008). Aufgrund struktureller und funktioneller Kriterien wird die Neuroglia in Gliazellen des zentralen Nervensystems und Gliazellen des peripheren Nervensystems unterteilt.

Die Gliazellen des peripheren Nervensystems sind die Schwannzellen, die Satelliten- oder Mantelzellen und die enterischen Gliazellen (JESSEN, 2004). Während die Schwannzellen die peripheren Nervenzellfortsätze umhüllen, sind die Satelliten-/Mantelzellen für die Umhüllung der Zellkörper in den Ganglien des peripheren Nervensystems verantwortlich. Die enterischen Gliazellen stehen im Kontakt mit den Zellkörpern und -fortsätzen des gastrointestinalen Nervensystems. Eine spezielle Kategorie der Gliazellen bilden die olfaktorischen Hüllzellen, die nicht-myelinisierenden Schwannzellen ähneln und sowohl mit dem zentralnervösen als auch mit dem peripheren Anteil des ersten olfaktorischen Gehirnnerven assoziiert sind (JESSEN, 2004).

2.1.3.1 Schwannzellen

2.1.3.1.1 Differenzierung der Schwannzellen

Schwannzellen bilden den größten Anteil der peripheren Gliazellen. Im adulten PNS werden myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwannzellen unterschieden. Die Entwicklung einer Schwannzelle verläuft über definierte Zwischenstufen. Aus den Neuralleistenzellen differenzieren sich Schwannzell-Vorläufer, aus denen dann unreife Schwannzellen hervorgehen. Die Entwicklung zu einer reifen Schwannzelle verläuft entweder über die Zwischenstufe einer Promyelin-Zelle zu einer myelinisierenden Schwannzelle oder direkt zu einer nicht-myelinisierenden Schwannzelle (JESSEN und MIRSKY, 1999a; JESSEN, 2004).

Ein weit verbreiteter Signaltransduktionsweg in der Entwicklung verschiedener Gliazellen des ZNS ist der Notch-Signalweg, benannt nach seinem Rezeptor „Notch“, einem Transmembranprotein, welches den Liganden „Delta“ bindet. In der embryonalen Entwicklung von Schwannzellen fördert Notch die Differenzierung zu Schwannzell-Vorläufern ebenso wie die weitere Differenzierung zu unreifen Schwannzellen (WOODHOO et al., 2009).

Drei Transkriptionsfaktoren sind in die Differenzierung von Schwannzellen und in die Myelinisierung involviert: Sox-10, Oct-6 (auch bekannt als SCIP oder Tst-1) und Krox-20 (JESSEN und MIRSKY, 2002; D'ANTONIO et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor Sox-10 wird von allen auswandernden Neuralleistenzellen exprimiert und lenkt die Entwicklung der Neuralleistenzelle hin zur Gliazelle (BRITSCH et al., 2001; JESSEN und MIRSKY, 2002; JESSEN, 2004). In Sox-10 defizienten Mäusen sind keine Schwannzell-Vorläufer und später auch keine Schwannzellen zu finden (JESSEN, 2004). Mutationen im Sox-10-Gen bewirken außerdem Defizite in der Pigmentierung und im enterischen Nervensystem.

Oct-6 wird von späten Schwannzell-Vorläufern und promyelinisierenden Schwannzellen, nicht aber von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert (MONUKI et al., 1989; MONUKI et al., 1990; SCHERER et al., 1994), während Krox-20 nur von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (JAEGLE et al., 1996; JAEGLE et al., 2003). In Oct-6 defizienten Mäusen tritt die Myelinisierung verspätet ein, während sie bei Krox-20 defizienten Mäusen ganz ausbleibt (BERMINGHAM et al., 1996; JAEGLE et al., 1996).

Die Differenzierung zu myelinisierenden Schwannzellen wird durch das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren Oct-6 und Krox-20 induziert (NICKOLS et al., 2003). Dabei fungiert Oct-6 als Repressor der Expression myelinspezifischer Gene wie Protein Zero (P0) und Myelin Basic Proteins (MBP) (MONUKI et al., 1990; HE et al., 1991; MONUKI et al., 1993). Die sich entwickelnden Zellen werden durch diesen Transkriptionsfaktor im unreifen Phänotyp gehalten und erst die reduzierte Expression von Oct-6 ermöglicht die Differenzierung zum myelinisierenden Phänotyp. Synergistisch zu Oct-6 unterdrückt Sox-10 die Krox-20-Aktivität

(KUHLEBRODT et al., 1998a; KUHLEBRODT et al., 1998b). Folglich wird die Myelinisierung durch die Aufhebung der inhibierenden Signale zusammen mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Krox-20 induziert (JESSEN und MIRSKY, 2005). Krox-20 ist für die Myelinisierung durch Schwannzellen unabdingbar.

Myelinisierende Schwannzellen synthetisieren große Mengen von Membranen, um die Myelinscheiden zu bilden (JESSEN und MIRSKY, 1999a; GARBAY et al., 2000; QUARLES, 2002). Während die Myelinproteine P0, MBP und Peripheral Myelin Protein-22 (PMP-22) verstärkt produziert werden, reduzieren myelinisierende Schwannzellen die Expression von anderen Proteinen wie z.B. Zelladhäsionsmolekülen (CAM), Neurotrophinen und ihren Rezeptoren, die verstärkt von unreifen und nicht-myelinisierenden Schwannzellen synthetisiert werden (JESSEN et al., 1990; CORFAS et al., 2004).

In Abwesenheit axonaler Signale gehen Schwannzell-Progenitoren zugrunde, während unreife sowie myelinisierende und nicht-myelinisierende reife Schwannzellen ohne Axone überleben können. Um den Zeitpunkt der Geburt herum entwickeln Schwannzellen autokrine Signale, die ihnen die axonunabhängige Überlebensfähigkeit ermöglichen (CHENG et al., 1998). Zu diesem autokrinen Überlebenskreislauf der Schwannzellen gehört die Sekretion von Insulin Like Growth Factor-2 (IGF-2), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Neurotrophin-3 (NT-3) (JESSEN und MIRSKY, 1999b; MEIER et al., 1999).

Die Differenzierung zur myelinisierenden Schwannzelle ist nicht endgültig, sie ist zeitlebens reversibel (JESSEN, 2004). Dies ist für die Regeneration peripherer Nerven, in der Schwannzellen eine zentrale Rolle spielen, von entscheidender Bedeutung. Wenn der axonale Kontakt in Folge einer Nervenverletzung verloren geht, dedifferenzieren und proliferieren Schwannzellen, die Expression von Myelinproteinen wird reduziert, während die Expression von Adhäsionsmolekülen, Neurotrophinen, Zytokinen und ihren Rezeptoren gesteigert wird, um für das axonale Wiederauswachsen ein förderliches Umfeld zu schaffen. Zwischen der embryonalen Entwicklung und der Regeneration peripherer Nerven existieren viele Parallelen, folglich erscheint das Wissen um die embryonalen Vorgänge hilfreich, um die Nervenregeneration besser zu verstehen.

2.1.3.1.2 Beeinflussung durch Neureguline

Das Überleben von Schwannzell-Vorläufern ist von axonalen Signalen abhängig. Eine Hauptkomponente dieses axonalen Signals ist β -Neuregulin-1 (JESSEN und MIRSKY, 1997; BRITSCH, 2004; JESSEN, 2004). Neureguline sind eine Gruppe von Faktoren, die Homologien zum Epidermal Growth Factor (EGF) aufweisen und transmembranöse Tyrosinkinase-Rezeptoren der ErbB-Familie aktivieren (GARRATT et al., 2000b). Vier unterschiedliche

Neureguline sind bis heute bekannt: NRG-1, NRG-2, NRG-3 und NRG-4. Während über die biologischen Funktionen von NRG-2, 3 und 4 sehr wenig bekannt ist, gilt NRG-1 mittlerweile als gut charakterisiert (BRITSCH, 2004; BRITSCH, 2007).

NRG-1-Proteine sind Wachstumsfaktoren, die u.a. im peripheren und im zentralen Nervensystem vorkommen und für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen eine wichtige Rolle spielen (RAABE et al., 2004; BRITSCH, 2007). Es gibt verschiedene NRG-1-Isoformen, die alle von einem Gen codiert werden und durch unterschiedliche Promotoren und alternatives Spleißen entstehen. Die Isoformen unterscheiden sich teilweise beachtlich, gemeinsam ist ihnen allen jedoch die EGF-ähnliche Domäne, mit der sie an den Rezeptor binden.

Die erste charakterisierte Isoform ist Typ I Neuregulin-1 (Synonyme: Heregulin (HRG), Neu Differentiation Factor (NDF), Acetylcholine Receptor Inducing Activity (ARIA)). Sie wird vor allem in der frühen Entwicklung exprimiert. Typ II Neuregulin-1 (häufig bezeichnet als Glial Growth Factor (GGF)) findet sich v.a. im ZNS während der späten Embryogenese und postnatal. Die vorwiegend von sensorischen und motorischen Neuronen sowie im Gehirn exprimierte Neuregulin-1-Isoform ist Typ III Neuregulin-1 (Synonyme: Sensory and Motoneuron Derived Factor (SMDF), Cysteine-rich Domain-Neuregulin-1 (CRD-NRG-1)) (GARRATT et al., 2000a; BRITSCH, 2004).

Die ErbB-Familie umfasst vier Mitglieder: ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 (BRITSCH, 2007).

Funktionelle Neuregulin-1-Rezeptoren sind Heterodimere, bestehend aus ErbB2 in Kombination mit entweder ErbB3 oder ErbB4. Sowohl ErbB3 als auch ErbB4 binden NRG-1 mit hoher Affinität. In der Entwicklung der Neuralleistenzellen und der Schwanzzell-Vorläufer spielt die Neuregulin-1-Wirkung via Bindung an ErbB2/ErbB3 die bedeutendste Rolle.

Die Signaltransduktion des Liganden Neuregulin-1 durch die Rezeptoren ErbB2 und ErbB3 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung der Neuralleistenzellen, in der Expansion der Schwanzzell-Vorläufer und in der Myelinisierung. Neuregulin-1 beeinflusst die Entwicklung der Schwanzzellen als eines der wesentlichen axonalen Signale (GARRATT et al., 2000a). Während der Differenzierung von Schwanzzellen existiert eine Phase, in der ihr Überleben und Wachstum von Neuregulin-1 synthetisierenden Neuronen abhängig ist. Diese Phase beginnt mit dem Übergang der Neuralleistenzelle zu Schwanzzell-Vorläufern und endet mit der Entwicklung zur myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Schwanzzelle (JESSEN und MIRSKY, 1999b).

In vitro fördert der Einsatz von GGF bei der Kultivierung multipotenter Neuralleistenzellen deren Differenzierung zu Gliazellen, während die Differenzierung zu Neuronen gehemmt wird (SHAH et al., 1994). Der Zusatz von GGF hat außerdem einen signifikant stimulierenden Effekt auf die Proliferation und Migration von denervierten Schwanzzellen in vitro (LI et al., 1998). Während sich der Zusatz von GGF auf die Proliferation von Schwanzzellen fördernd

auswirkt, wird das Wachstum von Fibroblasten unterdrückt (RUTKOWSKI et al., 1995). Außerdem kann GGF spezifische morphologische Veränderungen der Zellen bewirken (SYROID et al., 1996). In einer Neuronen-Schwanzzell-Ko-Kultur hemmt GGF die Myelinisierung und führt bei etablierten myelinisierenden Kulturen zu einer dosisabhängigen Demyelinisierung, die von einer Dedifferenzierung der Schwanzzellen begleitet wird (ZANAZZI et al., 2001). Der ebenfalls zu den Neuregulinen zählende Faktor Heregulin kann die Proliferation humaner Schwanzzellen stimulieren (BAEK und KIM, 1998).

In ErbB2- und ErbB3-defizienten Mäusen schlägt die Schwanzzellentwicklung fehl (GARRATT et al., 2000b). Periphere Nerven in Mäusen mit Mutationen im Neuregulin-1-Signalsystem weisen abnorm dünne Myelinscheiden auf. Diese Tiere zeigen einen auffälligen Gang und Muskelzittern. Insbesondere ErbB2-Mutanten zeigen umfassende periphere Neuropathien aufgrund von abnormal dünnen Myelinscheiden mit deutlich reduzierter Anzahl an Myelinlamellen. Anstelle eines von einem einzigen Perineurium umhüllten Nervenfaserbündels entstehen schmalere Nervenfaserbündel, die jeweils von einem Perineurium umschlossen werden (GARRATT et al., 2000a).

Differenzierte Schwanzzellen überleben und proliferieren unabhängig von Neuregulin-1, sprechen aber weiterhin auf diesen Faktor an (JESSEN und MIRSKY, 1999a).

2.1.3.1.3 Myelinisierung

Die isolierenden Hüllen um die peripheren Axone werden von myelinisierenden Schwanzzellen gebildet. Damit sind sie für die elektrische Isolierung und die saltatorische Erregungsleitung markhaltiger Nerven, die einen großen Anteil der Nervenfasern des peripheren Nervensystems ausmachen, unerlässlich.

Bei markhaltigen Nerven bilden Schwanzzellen um das zentral gelegene Axon eine Hülle, die als Markscheide bezeichnet wird (LIEBICH, 2004). Die Entwicklung der Nervenscheiden um ein Axon wird als Myelinisierung bezeichnet und ist ein langsamer Prozess, der um den Zeitpunkt der Geburt herum beginnt und postnatal fortgesetzt wird (CHENG et al., 1998; JESSEN UND MIRSKY, 2002). Eine Schwanzzelle ist nur an der Umhüllung eines Axons beteiligt. Der Prozess, bei dem eine Schwanzzelle ein spezielles Axon auswählt, wird „radial sorting“ genannt, an seiner molekularen Grundlage wird gegenwärtig intensiv geforscht (CHAN, 2007; GROVE et al., 2007). Das Zytoplasma einer Schwanzzelle legt sich einem Axon außen an, stülpt sich um dieses herum und verlagert es so nach innen. Die gegenüberliegenden Zellmembranen der Schwanzzellen nähern sich einander an und bilden das Mesaxon. Durch die fortschreitende Verlängerung der Schwanzzell-Plasmamembran werden immer mehr spiralig um das Axon herum verlaufende Myelinlamellen gebildet

(QUARLES, 2002). Die Gesamtheit der Myelinlamellen wird als Myelinscheide (Markscheide) bezeichnet (LIEBICH, 2004). Sie zeigt elektronenoptisch eine regelmäßige Abfolge von Hauptlinien (major dense lines), die aus den verschmolzenen inneren Lamellen der Plasmamembran bestehen und im Querschnitt als dunklere Ringe erkennbar sind sowie Zwischenlinien (intermediate lines), den hellen Ringen des Axonquerschnitts, welche die aneinander gelagerten äußeren Lamellen der Plasmamembran repräsentieren. Der Hauptanteil des Zytoplasmas und der Kern der Schwanzzelle liegen der Außenseite der Myelinscheide an und werden als Schwannscheide bezeichnet. Axon, Myelinscheide und Schwanzzelle befinden sich innerhalb einer Basalmembran (LIEBICH, 2004).

Zum genauen Ablauf der Myelinbildung bestehen verschiedene Theorien. Zum einen wurde angenommen, dass die Lamellenlagen durch Rotation der Schwanzzelle um das Axon entstehen, zum anderen gab es die Vorstellung, das Axon selbst rotiere um seine Längsachse. Nach WEBSTER (1971) führt die Rotation des inneren Mesaxons um das Axon zur Entstehung der Myelinlamellen. Erwiesen wurde die aktive Wanderung der sich bildenden innere Zunge um das zentral gelegene Axon als Prinzip der Myelinisierung von BUNGE et al. (1989b).

An einigen Stellen bleiben Zytoplasmareste zwischen den Myelinlamellen bestehen, die im mikroskopischen Bild als quer zur Faserrichtung verlaufende Spalten (Schmidt-Lantermann-Inzisuren) sichtbar sind. Nach CAMPANA (2007) dienen sie der Passage von Molekülen zwischen der Myelinscheide und dem Axon.

Die Dicke der Myelinscheide ist im gesunden Organismus stets proportional zur Stärke der Nervenfasern (SHERMAN und BROPHY, 2005). Die Anzahl der Myelinlamellen, die eine Schwanzzelle um ein Axon bildet, ist abhängig vom Durchmesser des zu umhüllenden Axons und vom Ausmaß der axonalen Signale (MARTINI und SCHACHNER, 1997). Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die Proportionalität zwischen Nervenfasern und Myelinscheide durch Neuregulin-1 Typ III reguliert wird. Die Expression von NRG-1 Typ III von unmyelinisierten Axonen ist gering, während myelinisierte Fasern NRG-1 Typ III in hohen Konzentrationen exprimieren (TAVEGGIA et al., 2005). Abhängig von der oberflächenassoziierten Expression des Neuregulin-1 auf den Nervenzellfortsätzen kommt es zur Proliferation der Schwanzzellen und zur verstärkten Synthese von Myelinproteinen und Myelinlipiden. Dickere Axone besitzen eine größere Oberfläche und exprimieren mehr Neuregulin-1 als dünnere, woraus die dickere Myelinschicht resultiert (MICHAÏLOV et al., 2004).

Eine myelinisierende Schwanzzelle hüllt ein Axonsegment in einer Länge von 0,2 bis 1,5 mm ein, an den Enden der Schwanzzelle bleibt das Axon unbedeckt, zwischen benachbarten Schwanzzellen liegt ein Zwischenraum von 0,5 µm, der Ranvierknoten (Schnürring) (RÜSSE und SINOWATZ, 1998). Im Gegensatz dazu verläuft die Basalmembran zwischen

benachbarten Schwannzellen kontinuierlich, auch an den Ranvierknoten (IDE, 1996). Zwischen Ranvierknoten und Internodien liegen die paranodalen Regionen.

Im Bereich der Internodien ist durch das Myelin der elektrische Widerstand stark erhöht, außerdem finden sich an den marklosen Ranvierschen Schnürringen hohe Konzentrationen spannungsabhängiger Natriumkanäle. Dies bewirkt, dass ein elektrischer Impuls bei markhaltigen Nervenfasern von Schnürring zu Schnürring springt. Dieser Typ der Erregungsleitung wird als saltatorische Erregungsleitung bezeichnet.

Im Gegensatz zu den markhaltigen Nervenfasern liegen bei marklosen Nervenfasern die Axone im Zytoplasma der Schwannzellen, ohne dass eine Wicklung des Mesaxons erfolgt. Häufig liegen mehrere Axone von einer Schwannzelle umgeben nebeneinander und bilden einen Komplex, den man auch Remak-Bündel oder -Faser nennt. Axone mit einem Durchmesser von weniger als einem μm sind grundsätzlich marklos, da die saltatorische Erregungsleitung in diesem Fall keine Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit bewirkt (FFRENCH-CONSTANT et al., 2004).

2.1.3.1.3.1 Zusammensetzung des Myelins

Das Myelin des PNS wird durch die Differenzierung der Schwannzell-Plasmamembran gebildet, welche sich von anderen biologischen Membranen vor allem durch ihr hohes Lipid-Protein-Verhältnis unterscheidet (SHERMAN und BROPHY, 2005). Der Lipidanteil liegt bei 70-80%, während die Proteine mit 20-30% vertreten sind. Es gibt keine spezifischen Myelinlipide. Wie in anderen Membranen enthält auch das Myelin der Schwannzellen hauptsächlich Neutralfette, Phosphoglyceride und Sphingolipide (GARBAY et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind jedoch einige spezifische Myelinproteine bekannt, die im zentralen und peripheren Nervensystem variieren (PIETRUCHA-DUTCZAK et al., 2003).

Die peripheren Myelinproteine umfassen zu ca. 60% Glykoproteine, 20 bis 30% sind basische Myelinproteine und ca. 10% andere Proteine. Zu den Glykoproteinen des peripheren Myelins gehören das Protein Zero (P0), das Periphere Myelinprotein-22 (PMP-22), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das Periaxin und das epitheliale Cadherin (E-Cadherin). Aber auch basische Proteine wie die Myelin-Basic-Proteins (MBP) und das Fettsäure-Transporterprotein P2 sind im peripheren Myelin zu finden. Weitere periphere Myelinproteine sind das Connexin 32, die 2,3-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase und das Plasmolipin (GARBAY et al., 2000).

2.1.3.1.3.1.1 Glykoproteine des Myelins

P0, Periaxin und das PMP-22 sind die Hauptkomponenten des peripheren Myelins (GARBY et al., 2000; QUARLES, 2002).

P0 ist ein 28-kDa Glykoprotein, das 50 bis 70% des totalen Myelinproteins des peripheren Nervensystems ausmacht (SONG et al., 2006). Es handelt sich dabei um ein Typ-1 Transmembran-Protein (QUARLES, 2002), welches als Membran-Adhäsions-Molekül der Membranen in der spiralig gewickelten Myelinscheide fungiert. Die extrazelluläre Domäne von P0 besitzt eine Tetramer-Struktur, die mit P0-Tetrameren der anliegenden Myelinschichten interagiert (SHAPIRO et al., 1996). Damit ist P0 wichtig für die Stabilität des kompakten Myelins. Geringe Mengen von P0 werden durch Schwanzzell-Vorläufer und Neuralleistenzellen früh in der embryonalen Entwicklung und damit vor der Myelinisierung exprimiert. P0 ist folglich ein früher Gliazellen-Differenzierungs-Marker (LEE et al., 1997; SOMMER und SUTER, 1998; JESSEN und MIRSKY, 1999a; QUARLES, 2002). P0 wird über den Transkriptionsfaktor Sox-10 reguliert (PEIRANO et al., 2000). BRITSCH et al. (2001) vermuten, dass Sox-10 die Voraussetzungen schafft zur frühen Ansprache der Gliazellen auf Neuregulin-1.

Periaxin ist ein 170 kDa und für das periphere Nervensystem spezifisches Glykoprotein, das 5% des peripheren Myelinproteins darstellt (SHUMAN et al., 1983). Es wird nur von myelinisierenden Schwanzzellen exprimiert, lässt sich aber bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Myelinisierung nachweisen, noch vor den anderen charakteristischen Myelinproteinen (SCHERER et al., 1995).

PMP-22 ist ein kleines 22-kDa Glykoprotein, welches weniger als 2 bis 5% des peripheren Myelinproteins bildet (PAREEK et al., 1993). Während P0 nervenspezifisch ist, kommt PMP-22 auch in anderen Organgewebe wie Lunge, Darm und Herz vor. Wie bei anderen Myelinproteinen auch, wird die Expression von PMP-22 im Zusammenhang mit der Schwanzzellproliferation nach einer Nervenläsion reduziert (QUARLES, 2002).

Im Gegensatz zu P0 und PMP-22 ist das 100 kDa schwere MAG nicht im kompakten Myelin lokalisiert, sondern in der periaxonalen Schwanzzellmembran, im inneren und äußeren Mesaxon und in den paranodalen Regionen konzentriert. MAG macht nur 0,1% des Myelinproteins aus (QUARLES et al., 1973; STERNBERGER et al., 1979; FIGLEWICZ et al., 1981). Die Funktionen des MAG liegen in der Erkennung und Adhäsion der Axone, in der Signaltransduktion während der Differenzierung der Gliazellen und in der Regulierung des axonalen Auswachsens im Zuge der Nervenregeneration (GARBY et al., 2000; GUPTA et al., 2006; QUARLES, 2007).

Ebenfalls zu den Glykoproteinen des Myelins im peripheren Nervensystem gehört das 120 kDa schwere E-Cadherin. Cadherine sind kalziumabhängige Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle,

die zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten und bei der Morphogenese von Zellen eine Rolle spielen (GARBY et al., 2000). E-Cadherin ist das häufigste Adhäsions-Glykoprotein in den nicht-kompakten Regionen der Myelinscheide (FANNON et al., 1995).

2.1.3.1.3.1.2 Basische Proteine des Myelins

Die Gruppe der basischen Myelinproteine (Myelin Basic Proteins, MBP) besteht aus mindestens sieben verwandten Proteinen, die durch alternatives RNA-Spleißen entstehen (KANDEL et al., 1996). MBP sind im Myelin des PNS und des ZNS anzutreffen, wobei 5 bis 15% des Myelins aus diesen bestehen.

Des Weiteren ist P2 den peripheren Myelinproteinen zugehörig. Es ist überwiegend auf der zytoplasmatischen Seite des kompakten Myelins lokalisiert und dient als Lipid-Carrier bei der Aufnahme und beim Weitertransport von Fettsäuren zu intrazellulären Organellen (TRAPP et al., 1984; NARAYANAN et al., 1988). Der Anteil von P2 im Myelin variiert speziesabhängig sehr stark, bei Ratte und Maus liegt er bei nur 1%, während bei Mensch, Rind und Kaninchen 5 bis 12% gefunden werden (GREENFIELD et al., 1973; MILEK et al., 1981; (GREENFIELD et al., 1982; KADLUBOWSKI et al., 1984).

2.1.4 Aufbau peripherer Nerven

Periphere Nerven haben einen konstanten histologischen Aufbau. Die kleinste Einheit stellt die Nervenfaser dar, sie wird gebildet aus dem Axon mit umhüllenden Schwannzellen und Basalmembran (GIANNINI und DYCK, 1990). Um die Nervenfaser ist das Bindegewebe in drei verschiedenen Hüllen organisiert: dem Endoneurium, Perineurium und Epineurium (ROSS et al., 1995). Die Nervenfaser ist im Endoneurium eingebettet. Mehrere Nervenfasern werden durch das Perineurium zu Nervenfaserbündeln, so genannte Faszikel, zusammengefasst. Das Epineurium stellt die Bindegewebsschicht um mehrere Faszikel dar und umhüllt den gesamten Nerv (ROSS et al., 1995; LIEBICH, 2004; PAVELKA und ROTH, 2005; MUIR, 2009).

Im zarten Bindegewebe des Endoneuriums, das aus längsverlaufenden Kollagenfasern, einer glukosaminoglykanreichen extrazellulären Matrix und wenigen Fibroblasten besteht, sind einzelne Kapillaren zu finden (PAVELKA und ROTH, 2005). Das Perineurium entspricht der peripheren Fortsetzung der Arachnoidea und besteht aus mehreren Schichten flacher, epithelähnlicher Zellen, die durch Kollagenschichten voneinander getrennt sind. Es führt Kapillaren und stellt eine Diffusionsbarriere dar, die das Axon und die Schwannzellen im Endoneurium schützt (BUNGE et al., 1989a; ROSS et al., 1995). Das Epineurium setzt sich

aus straffem Bindegewebe, bestehend aus Kollagen und elastischen Fasern, zusammen, das besonders in dickeren Nerven häufig mit Fettgewebe assoziiert ist. Parallel zum Nerven verlaufen im Epineurium Arterien, Venen und Lymphgefäße (ROSS et al., 1995). Für die korrekte Ausbildung des Endo-, Peri- und Epineuriums ist Desert Hedgehog, ein Gen, das in Schwanzzellen für sezernierte Proteine kodiert, notwendig (PARMANTIER et al., 1999).

In Säugetieren sind zurzeit drei Hedgehog-Proteine bekannt: Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog und Desert Hedgehog. Die Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie werden häufiger als Morphogene bezeichnet, da sie die Morphogenese während der embryonalen Entwicklung steuern (GRITLI-LINDE et al. 2001; GOETZ et al., 2002). Desert Hedgehog wird von den Sertolizellen des sich entwickelnden Hodens, den Schwanzzellen des peripheren Nervensystems und den Endothelzellen der Gefäße sowie des Endokards exprimiert. (HAMMERSCHMIDT et al., 1997). Das Hedgehog-Signal wird durch die Interaktion von zwei transmembranösen Proteinen vermittelt: Patched und Smooth. In Abwesenheit eines Hedgehog-Liganden unterdrückt Patched dauerhaft die Aktivität von Smooth. Diese Hemmung wird durch die Bindung eines Hedgehog-Proteins an Patched aufgehoben, folglich kann das Signal über Smooth ins Zellinnere weitergeleitet werden (FUCCILLO et al., 2006). In Desert-Hedgehog-knockout-Mäusen weist das Epineurium weniger Kollagen auf, das Perineurium erscheint unphysiologisch dünn sowie desorganisiert und die Basalmembran ist diskontinuierlich (PARMANTIER et al., 1999).

2.2 Relevante periphere Nervenerkrankungen

55,3% der Hunde, die aufgrund einer peripheren Nervenerkrankung vorgestellt werden, leiden an traumatisch bedingten Läsionen (FORTERRE et al., 2003b). Verkehrsunfälle, Frakturen, Schusswunden, Bissverletzungen aber auch Druckstellen von Verbänden können mögliche Ursachen für traumatische Nervenläsionen sein (WITHROW und AMIS, 1977; SWAIM, 1978; FANTON et al., 1983; GILMORE, 1984; JACOBSON und SCHRADER, 1987; FORTERRE et al., 2003a; FORTERRE et al., 2003b). Auch chirurgische Eingriffe mit Durchtrennung von Nervenfasern sowie die Überdehnung bei Manipulationen unter Narkose ebenso wie Injektionen von reizenden Substanzen in oder in die Nähe von wichtigen motorischen Nerven und die chronische Beschädigung durch Implantate können zu traumatischen Läsionen peripherer Nerven führen (FORTERRE et al. 2003a; FORTERRE et al., 2003b; FAISSLER et al. 2005). Traumatische Quetschungen oder Durchtrennungen einzelner Nerven sind von Verletzungen ganzer Nerven-Plexus wie z.B. dem Abriss des Plexus brachialis zu unterscheiden.

2.2.1 Definitionen der Schweregrade peripherer Nervenverletzungen

Traumata können unterschiedliche Grade von Nervengewebsschäden verursachen, die in folgende Gruppen unterteilt werden: Neuropraxie, Axonotmesis, Neuronotmesis und Avulsion der Nervenwurzel (FAISLER et al., 2005; FORTERRE, 2005). Der Heilungserfolg peripherer Nerven hängt in hohem Maße vom Verletzungsgrad der Nervenhüllen ab (FORTERRE et al., 2003a; FORTERRE, 2005).

Prinzipiell können verschiedene Schweregrade peripherer Nervenverletzungen unterschieden werden:

Die Neuropraxie stellt eine Schädigung des Nervs dar, bei der es zu keiner Unterbrechung der Kontinuität der Axone oder Hüllgewebe kommt und folglich keine Wallersche Degeneration auftritt. Bei der Neuropraxie tritt in der Regel ohne Behandlung eine vollständige Wiederherstellung der Funktion in einem Zeitraum von ein bis acht Wochen ein. Ursache der Neuropraxie ist häufig eine Durchblutungsstörung durch Kompression oder Dehnung des Nervengewebes (FAISLER et al., 2005).

Bei der Axonotmesis sind Axone durchtrennt, aber das Epi- und Perineurium sowie die Basalmembran der Schwannzellen intakt. Die Axonotmesis führt zur Wallerschen Degeneration. Die Nervenleitung im distalen Abschnitt geht drei bis fünf Tage nach Einwirkung der Noxe verloren (FAISLER et al., 2005). Die funktionelle Wiederherstellung ist möglich, nimmt aber entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit des regenerierenden Axons von ein bis zwei mm pro Tag einen längeren Zeitraum in Anspruch. Innerhalb von sechs Wochen zeigt sich eine funktionelle Besserung (FORTERRE et al., 2003a; FORTERRE, 2005).

Die Neuronotmesis beschreibt die vollständige Durchtrennung des Nervs, je nach Schweregrad einschließlich des Endoneuriums, Perineuriums und Epineuriums. Bei der Neuronotmesis kann ohne operative Behandlung keine Regeneration mit funktioneller Wiederherstellung stattfinden (FORTERRE et al., 2003a; FORTERRE et al., 2003b). Auch in diesem Fall läuft im distalen Nervenstumpf die Wallersche Degeneration ab. Die Zerstörung der Basalmembran der Schwannzellen senkt die Chance einer erfolgreichen Regeneration erheblich, da einerseits die regenerierenden Fasern keinen Anschluss an das Erfolgsorgan finden und andererseits reaktive Bindegewebszubildungen stenoseartig den Fasern den Weg versperren (FAISLER et al., 2005).

Eine Avulsion der Nervenwurzeln bedeutet die Zerreißung der ventralen Nervenwurzeln einschließlich der Neurone im Rückenmark oder die Durchtrennung ventraler sowie dorsaler Nervenwurzeln nahe dem Rückenmark. Bei einer partiellen Avulsion sind ein Teil der Nervenwurzeln und bei einer vollständigen Avulsion alle Wurzeln, die sich zu einem Nerv zusammenfinden, betroffen. Die Nervenwurzelavulsion ist in der Regel mit einer ungünstigen

Prognose verbunden. Verletzte Nervenwurzeln haben eine geringe Fähigkeit zur Regeneration. Eine klinische Verbesserung ist meist die Folge der Kompensation durch noch intakte Nervenwurzelanteile (FAISLER et al., 2005).

Im Hinblick auf die Prognose einer Nervenverletzung ist außerdem die Distanz zwischen Läsion und Zielorgan von entscheidender Bedeutung. Je weiter distal an der Gliedmaße eine Nervenverletzung lokalisiert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Regeneration. Die besten Chancen für eine funktionelle Regeneration bestehen bei Distanzen zwischen Läsion und distalem Gliedmaßenende von unter 15 cm. Die meisten Nervenverletzungen sind jedoch sehr weit proximal an der Gliedmaße lokalisiert (z.B. Plexus brachialis-Abriss, Nerventumore, iatrogene Verletzungen des N. ischiadicus), das bedeutet v.a. bei größeren Hunderassen eine Distanz von über 20 cm bis zum Zielorgan (FORTERRE, 2005).

2.2.2. Verletzungen peripherer Nerven

An der Vordergliedmaße ist der partielle oder vollständige Plexus-Abriss die häufigste neurologische Erkrankung (GRIFFITHS, 1974; FORTERRE et al., 2003a; FORTERRE et al., 2003b). An der Hintergliedmaße ist eine Läsion des N. ischiadicus die häufigste traumatische Läsion (FORTERRE et al., 2003b).

2.2.2.1 Läsion des Nervus ischiadicus

Der N. ischiadicus ist ein wichtiger Nerv sowohl für die Fortbewegung als auch für die Lastaufnahme des Körpergewichts, so dass sein Funktionsverlust zu einer weitgehenden Beeinträchtigung führt (FORTERRE et al., 2007). Seine Fasern entstammen den Rückenmarkssegmenten L5, L6, L7 und S1. Oberhalb der Kniekehle (Fossa poplitea) teilt sich der N. ischiadicus in den N. tibialis und den N. fibularis communis. Traumatische Schädigungen des N. ischiadicus können vielfältige Ursachen haben, eine erhöhte Gefahr besteht v. a. bei Frakturen des Os ileum, des Acetabulum und des proximalen Femur. Doch auch das Risiko einer iatrogenen Schädigung des N. ischiadicus, z.B. durch Injektionen oder den Einsatz von intramedullären Pins sowie durch die operative Korrektur von Hüftgelenkdysplasien oder Perinealhernien, darf nicht unterschätzt werden. Unter den Kleintierpatienten mit peripheren Nervenläsionen sind iatrogene Verletzungen des N. ischiadicus mit 26,2% zu verzeichnen (FORTERRE et al., 2007).

2.2.2.2 Plexus brachialis-Abriss

Der Plexus brachialis wird beim Hund von den Ventralästen des 6., 7. und 8. Halsnerven sowie des 1. und 2. Brustnerven gebildet. Die aus dem Armgeflecht hervorgehenden Nerven versorgen die Schultergliedmaße sowie Teile der Schultergürtelmuskulatur und der Rumpfwand (NICKEL et al., 1992). Die Avulsion des Plexus brachialis ist häufig die Folge eines Verkehrsunfalls. Wird durch den Zusammenstoß mit einem Fahrzeug im Oberarm- bzw. Halsbereich des Tieres die Vordergliedmaße maximal abduziert oder nach kaudal gestreckt, so entsteht ein massiver Zug auf die Nervenstränge und die Nerven reißen an der schwächsten Stelle (GRIFFITHS et al., 1974; FORTERRE et al., 2003b; FAISLER et al., 2005). Dies ist die ventrale Nervenwurzel nahe des Rückenmarks, die dorsale Nervenwurzel proximal des sensorischen Ganglions oder die ventrale und dorsale Wurzel distal des sensorischen Ganglions. Seltener als Wurzelavulsionen sind Schädigungen der proximalen Plexusnervenabschnitte oder innerhalb des Nervenplexus (FAISLER et al., 2005).

Je nach Ausdehnung unterscheidet man einen kranialen Plexus-Abriss (C6, C7, N. suprascapularis, N. subscapularis, N. musculocutaneus, N. axillaris) von einem kaudalen Plexus-Abriss (C8, Th1, Th2, N. radialis, N. ulnaris, N. medianus und N. thoracodorsalis) sowie eine totale Avulsion (C6-Th2).

Nur ca. 15% der Hunde mit Avulsionen oder Läsionen des Plexus brachialis erlangen eine normale Funktion der betroffenen Gliedmaße zurück (FAISLER et al., 2005).

2.2.3 Periphere Nervenscheidentumore

Tumore peripherer Nerven beim Hund sind selten, die Mehrzahl entstammt den Hüllstrukturen. Der Häufigkeit nach handelt es sich dabei um Neurofibrome, Schwannome, spinale Meningeome und maligne Lymphome (FORTERRE et al., 2004). Trotz einer gegebenenfalls möglichen chirurgischen Behandlung ist die Prognose beim Hund ungünstig, weil die Diagnose meist zu spät gestellt wird. Die Tumore lassen sich dann nicht vollständig entfernen und die Rezidivrate innerhalb eines Jahres nach der Operation ist sehr hoch (BREHM et al., 1995; FORTERRE et al., 2004).

2.3 Regeneration peripherer Nerven

Im Gegensatz zum zentralen Nervensystem ist bei peripheren Nervenverletzungen eine Regeneration mit vollständiger Funktionswiederherstellung möglich (STOLL et al., 2002). Die

erfolgreiche Regeneration beinhaltet die Formation von axonalen Sprouts, das Auswachsen von regenerierenden Axonen und die Reinnervation der ursprünglichen Zielstrukturen (IDE, 1996).

Voraussetzung für die Regeneration einer Nervenfasern ist das Überleben der Nervenzelle (MUIR, 2009). Dieses ist von verschiedenen Faktoren, wie der Lokalisation der Verletzung, des Alters und der Art der Nervenzelle abhängig (FANSA und KEILHOFF, 2003). Je dichter am Zellkörper die Läsion lokalisiert ist, desto geringer ist die Überlebenschance der Nervenzelle. Adulte Neurone sind widerstandsfähiger als juvenile. Spinale Motoneurone sind weniger anfällig als Motoneurone der Gehirnnerven und sensible Neurone (FU und GORDON, 1997). So gehen nach einer Läsion die Nervenzellen des N. facialis und des N. hypoglossus häufiger zugrunde als die von spinalen Neuronen (FANSA und KEILHOFF, 2003). Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Prognose haben, sind der Verletzungsmechanismus (scharfe Durchtrennungen heilen deutlich besser als stumpfe Zerreibungen), die Zeitspanne zwischen Trauma und chirurgischem Eingriff sowie das Alter und der Gesundheitszustand des Patienten (FORTERRE, 2005).

2.3.1 Wallersche Degeneration

Wenn bei einer peripheren Nervenverletzung das Axon vom Zellkörper getrennt wird, degeneriert der distale Nervenstumpf schrittweise. Dieser Prozess wird als Wallersche Degeneration bezeichnet (WALLER, 1851) und beinhaltet den Abbau des Axons und die Phagozytose des Myelins. Während der Wallerschen Degeneration wird durch eine Umgestaltung des distalen Nervensegments ein Umfeld geschaffen, das ein erfolgreiches Wiederauswachsen der regenerierenden Nervenfasern erlaubt (BOSSE et al., 2001).

Am Anfang der Wallerschen Degeneration steht die schnelle Degradation des Axoplasmas und des Axolemmas durch die Aktivierung von Proteasen (FANSA und KEILHOFF, 2003). Initial schwillt das Axon an, dann zerfällt es in einzelne membranumgebene Fragmente (JOHNSON et al., 2005). Die Fragmentation der Axone beginnt nahe der Läsion und schreitet nach distal mit einer Geschwindigkeit fort, die mit der Dicke der Nervenfasern und der Länge der Internodien korreliert. Sehr dünne Nervenfasern zeigen zuerst Degenerationserscheinungen, dicke Fasern häufig erst wenn alle dünnen Fasern bereits in Ovoide zerfallen sind (LUBINSKA, 1977).

Der Zerfall des Myelins in Ellipsoide oder Ovoide beginnt nach 24 bis 48 Stunden (KOEPPEN, 2004). Die initialen Ovoide entstehen in der Mitte der Internodien, während die Nervenfasern an den Schnürringen noch länger ihre physiologische Gestalt beibehalten (LUBINSKA, 1977). Nach 10 bis 21 Tagen erstreckt sich die Wallersche Degeneration bis zum Endorgan, z.B.

der motorischen Endplatte, wo infolge der Denervierung die Muskelfasern atrophisch werden (MUMENTHALER et al., 2007).

Bei der Wallerschen Degeneration spielen inflammatorische Zytokine, insbesondere TNF- α , Interleukin (IL)-1 α und IL-1 β , Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) und IL-10 eine wichtige Rolle. TNF- α und IL-1 α sind die ersten Proteine, die von den Schwannzellen unmittelbar nach einer Nervenverletzung verstärkt synthetisiert und sezerniert werden (AHMED et al., 2005). Sie leiten die molekularen und zellulären Abläufe der Wallerschen Degeneration ein (SHAMASH et al., 2002). Bereits innerhalb der ersten fünf Stunden nach der Nervenverletzung ist außerdem die Produktion des Makrophagen und Schwannzellen aktivierenden GM-CSF erhöht (BE'ERI et al., 1998). TNF- α , IL-1 α und IL-1 β tragen zur Rekrutierung der Makrophagen bei, die im intakten peripheren Nervensystem spärlich und erst ab dem dritten Tag nach der Nervenverletzung reichhaltig vorhanden sind (PERRY et al., 1987; REICHERT et al., 1994). Die rekrutierten Makrophagen produzieren nun ihrerseits TNF- α , IL-1 α und IL-1 β (SHAMASH et al., 2002).

Da die Produktion von IL-10 nach der Nervenläsion schwach ist und sich erst ab dem dritten Tag mit einem Maximum am siebten Tag steigert, wird IL-10 eine Funktion in der Beendigung der Wallerschen Degeneration zugeschrieben (BE'ERI et al., 1998).

Es gibt Mutanten (wld), bei denen es durch eine verlangsamte Invasion von Makrophagen zu einer verlangsamten Wallerschen Degeneration kommt (slow wallerian degeneration). Bei wld-Mäusen ist die Produktion von GM-CSF nach einer Nervenläsion gering (BE'ERI et al., 1998) und die mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 α und IL-1 β erhöht (SHAMASH et al., 2002). Daraus resultieren möglicherweise die fehlende Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und die damit einhergehende verzögerte Myelinphagozytose. Eine axonale Regeneration kann jedoch auch bei wld-Mäusen stattfinden. Die Zelltrümmer und der myelinale Debris werden im Zuge der Wallerschen Degeneration sowohl von Schwannzellen als auch von Makrophagen phagozytiert und somit beseitigt (REICHERT et al., 1994; FERNANDEZ-VALLE et al., 1995; HIRATA und KAWABUCHI, 2002).

Damit periphere Nerven vollständig regenerieren können, müssen erst die beschriebenen degenerativen Prozesse ablaufen. Wenn die Degeneration gestört ist, unterbleibt oder verzögert sich die Regeneration. Dabei spielt MAG eine Rolle, ein integraler Bestandteil jeder Myelinscheide, welcher das Aussprossen der Axone aktiv verhindert (TANG et al., 2001; QUARLES, 2007). Neue Ergebnisse zeigen, dass durch die reduzierte MAG-Synthese infolge einer chronischen Nervenkompression innerhalb von peripheren Nerven die Formierung von axonalen Sprouts gefördert wird (GUPTA et al., 2006).

2.3.2 Schwanzzellen und Nervenregeneration

Die axonunabhängige Überlebensfähigkeit reifer Schwanzzellen ist für die erfolgreiche Regeneration peripherer Nerven nach einer Verletzung von entscheidender Bedeutung (MEIER et al., 1999). Infolge einer Nervenverletzung verlieren die Schwanzzellen im distalen Stumpf den axonalen Kontakt und durchlaufen phänotypische Veränderungen, d.h. sie dedifferenzieren zu prae- oder nicht myelinisierenden Schwanzzellen und beginnen zu proliferieren (TORIGOE et al., 1996; FROSTICK et al., 1998; FANSA und KEILHOFF, 2003). Über welchen Mechanismus eine Nervenverletzung die Aktivierung von Schwanzzellen induziert, ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wird vermutet, dass die Aktivierung spezifischer Immunantworten eine besondere Rolle spielt (LEE et al., 2006).

Dedifferenzierte Schwanzzellen steigern die Expression des p75-Neurotrophin-Rezeptors und regenerationsassoziiertes Proteine wie NGF, BDNF, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), NgCAM (Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule), auch genannt L1, Laminin, Tenascin C und Fibronektin. Gleichzeitig wird ihre Produktion von Myelinkomponenten herabgesetzt (HIRATA et al., 2001). Die proliferierenden Schwanzzellen bilden Zellsäulen innerhalb der Basalmembran aus, die sogenannten Büngnerschen Bänder (BÜNGNER, 1891). Diese dienen den regenerierenden Axonen als Leitschienen und dirigieren sie in ihrem Wachstum.

Es wird vermutet, dass die Proliferation der Schwanzzellen im distalen Nervensegment in der frühen Phase der Wallerschen Degeneration möglicherweise durch von einwandernden Makrophagen sezernierte Zytokine wie IL-1, PDGF, FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und TGF- β induziert wird (FROSTICK et al., 1998; FANSA und KEILHOFF, 2003). Neben der Proliferation fördert IL-1 auch die Synthese von NGF durch Schwanzzellen. Im proximalen Segment stellt der Verlust des axonalen Kontakts den Hauptstimulus für die Schwanzzellproliferation dar (FROSTICK et al., 1998).

Die Proliferation der Schwanzzellen erreicht ihr Maximum zwischen dem dritten und siebten Tag (FANSA und KEILHOFF, 2003). HALL et al. (1997) untersuchten die sich ändernde Anzahl von Schwanzzellen während der Wallerschen Degeneration. Dabei betrug die absolute Zahl der Schwanzzellen pro einem mg feuchtem Gewebe eine Woche nach der Nervendurchtrennung 5×10^4 und nach sechs Monaten $1,3 \times 10^3$. Der Mechanismus der Eliminierung der Schwanzzellen ist noch nicht geklärt.

Um ein der Regeneration förderliches Umfeld zu schaffen, synthetisieren Schwanzzellen neurotrophe Faktoren und deren Rezeptoren (FROSTICK et al., 1998). RNA-Transkripte von NGF, BDNF, NT3, CNTF und GDNF konnten in Schwanzzell-Kulturen nachgewiesen werden (FROSTICK et al., 1998).

2.3.2.1 Neurotrophe Faktoren

In intakten Nerven werden neurotrophe Faktoren in der Peripherie produziert und retrograd zum Nervenzellkörper transportiert (IDE, 1996). Wenn die Kommunikation des Axons mit dem Nervenzellkörper durch eine Läsion unterbrochen wird, werden die Faktoren von den Schwanzzellen produziert (IDE, 1996).

2.3.2.1.1 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Sechs Neurotrophine wurden mittlerweile isoliert: NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 und NT-7. NT-6 und NT-7 wurden bislang nur in Fischen identifiziert und spielen daher vermutlich bei Säugetieren keine Rolle (GOTZ et al., 1994; NILSSON et al., 1998). Neurotrophine sind kleine basische Polypeptide, die zwei unterschiedliche Klassen von Rezeptoren aktivieren. Einerseits binden sie an high-affinity Tyrosinkinase-Rezeptoren (trkA, trkB und trkC Tropomyosin-Related Kinase) und andererseits an einen low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (LNGFR, LNTR, p75-NTR). Der p75-NTR ist ein 75 kDa schweres Transmembranprotein. Er zählt zu den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (CHAO, 1994; FRADE und BARDE, 1998). Charakteristisch für diese Gruppe von Rezeptoren sind cysteinreiche Extrazellulärdomänen, die aus drei bis sechs über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten bestehen. Über viele Jahre wurde der p75-NTR als ein nieder-affiner spezifischer NGF-Rezeptor eingestuft, mittlerweile hat sich jedoch gezeigt, dass er alle Neurotrophine mit der gleichen Affinität bindet (RODRIGUEZ-TEBAR et al., 1991; CARTER et al., 1996). Schwanzzellen exprimieren NGF-Rezeptoren sowohl in vitro als auch in vivo (TANIUCHI et al., 1986). Sowohl myelinisierende als auch nicht-myelinisierende canine Schwanzzellen weisen den p75-NTR auf (BOCK et al., 2007), während die trk-Tyrosinkinase-Rezeptoren von Schwanzzellen nicht exprimiert werden (FRADE und BARDE, 1998).

Im Zuge des axonalen Auswachsens und der Migration von Schwanzzellen während der embryonalen Entwicklung sowie bei der Regeneration peripherer Axone nach einer Nervenläsion spielt der p75-NTR eine wichtige Rolle (BENTLEY und LEE, 2000). Nach einer Nervenläsion ist die Expression von Neurotrophinen und dem p75-NTR in den aktivierten Schwanzzellen deutlich erhöht (TANIUCHI et al., 1988; ANTON et al., 1994). Fünf Tage nach der Nervenverletzung steigt die Konzentration abrupt an, während die Schwanzzellen ihre parallele Anordnung verlassen und zu migrieren beginnen (HIRATA et al., 2001). Die Abwesenheit von p75-NTR verhindert sowohl axonales Wachstum in vitro als auch axonales Wachstum und die Innervation der Zielorgane in vivo (BENTLEY und LEE, 2000). Auch in die Remyelinisierung regenerierender Axone ist der p75-NTR involviert. Nach Verletzung des N.

ischiiadicus bei p75-NTR defizienten Mäusen kommt es zu einer beeinträchtigten axonalen Regeneration und Remyelinisierung (TOMITA et al., 2007). Diese Tiere weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen dünnere Myelinscheiden der regenerierten Axone mit niedrigerem Gehalt an P0 auf (SONG et al., 2006). Durch Blockierung des p75-NTR wird die Myelinisierung von Neuronen in vitro gehemmt, während sie durch Hemmung von trkC gesteigert wird (COSGAYA et al., 2002).

Im Gegensatz zu den genannten Effekten kann die Bindung von Liganden an den p75-NTR auch neuronale Apoptose induzieren (FRADE und BARDE, 1998; FRIEDMAN, 2000; BLÖCHL und BLÖCHL, 2007). Die genannten gegenteiligen Effekte lassen sich durch die Vielzahl der möglichen Signaltransduktionswege erklären. Die Aktivierung von p75-NTR durch NGF führt zur Sphingomyelinhydrolyse und damit zur Produktion des zu den Sphingolipiden gehörenden second messengers Ceramid (DOBROWSKY, 1994; DOBROWSKY, 1995). Infolge dessen kann der nukleäre Faktor Kappa B (NF- κ B) aktiviert werden (HIRATA et al., 2001), was wiederum die Apoptose bedingt. Fünf Untereinheiten bilden die homo- oder heterodimeren NF- κ B Faktoren: RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2) (CHEN und GREENE, 2004). Typischerweise erfolgt die Aktivierung von NF- κ B durch hintereinander geschaltete Phosphorylierungsschritte (VIATOUR et al., 2005). Dadurch entstehende freie NF- κ B Dimere können dann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription zahlreicher Zielgene regulieren. Nur die Bindung von NGF an den p75-NTR führt zu einer Aktivierung von NF- κ B (CARTER et al., 1996). Obwohl NGF, BDNF und NT-3 mit der gleichen Affinität an p75-NTR binden, induziert folglich nur NGF in hoher Konzentration die schnelle Apoptose (HIRATA et al., 2001). Die Aktivierung von NF- κ B in Schwanzzellen unmittelbar nach experimentell induzierter Verletzung des N. ischiadicus wird außerdem in Verbindung gebracht mit einer Hemmung des anschließenden axonalen Auswachsens (SMITH et al., 2009).

2.3.2.1.1.1 Nerve Growth Factor (NGF)

NGF stellt den Prototyp der Neurotrophine dar. Er wurde in den 50er Jahren entdeckt, als ein Faktor, der das Überleben von sympathischen und sensorischen spinalen Neuronen in vitro ermöglicht (LEVI-MONTALCINI, 1987). Heute ist bekannt, dass die Apoptose von Neuronen über die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase trkA durch NGF verhindert wird. Im Gegensatz dazu führt NGF während der embryonalen Entwicklung über die Aktivierung des p75-NTR zur Apoptose von Neuronen (FRADE und BARDE, 1998; FRIEDMAN, 2000). Ein intakter peripherer Nerv weist nur sehr geringe Konzentrationen von NGF und NGF-Rezeptoren auf (FAWCETT und KEYNES, 1990). NGF wird aber sowohl während der axonalen

Entwicklung als auch während der axonalen Regeneration vom Zielgewebe ausgeschüttet und beeinflusst so das Auswachsen des Axons, das sich am Konzentrationsgefälle von NGF orientiert. Die Konzentration von NGF zeigt ein Maximum zwischen dem zweiten und dem dritten Tag nach der Verletzung. Dies korreliert mit der Invasion von Makrophagen und wird durch das von den Makrophagen sezernierte IL-1 gesteuert (FROSTICK et al., 1998). An der Stelle der Nervenläsion tragen auch die dort lokalisierten Schwannzellen zu der erhöhten NGF-Konzentration bei (ABE et al., 2004).

2.3.2.1.1.2 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Physiologischerweise findet die stärkste BDNF-Synthese im ZNS statt. Nach einer peripheren Nervenverletzung ist jedoch auch eine gesteigerte Expression von BDNF in Schwannzellen zu beobachten. Das Maximum der BDNF-Konzentration im Bereich der Nervenläsion wird nach drei bis vier Wochen erreicht und beträgt das Zehnfache der NGF-Konzentration (FROSTICK et al., 1998). Im distalen Nervensegment wurden zwei Wochen nach der Verletzung erhöhte Gehalte von BDNF gefunden (BARDE et al., 1982).

Die Aktivierung des p75-NTR durch BDNF fördert die Myelinisation von Neuronen in vitro und in sich entwickelnden peripheren Nerven in vivo (BENTLEY und LEE, 2000; CHAN et al., 2001; COSGAYA et al., 2002) sowie die Differenzierung von Schwannzellen und die Myelinisierung von regenerierenden Axonen (ZHANG et al., 2000). Die Blockierung von endogenem BDNF beeinträchtigt die Myelinisierung regenerierender Nerven und führt zu einer verschlechterten Nervenregeneration (ZHANG et al., 2000; CHAN et al., 2001; COSGAYA et al., 2002). Außerdem wirkt BDNF über den p75-NTR hemmend auf die Migration von Schwannzellen (YAMAUCHI et al., 2004).

2.3.2.1.1.3 Neurotrophin-3 und Neurotrophin-4/5 (NT-3 und NT-4/5)

Neurotrophin-3 wirkt im Gegensatz zu BDNF hemmend auf die Myelinisierung peripherer Nerven und stimulierend auf die Schwannzell-Migration (CHAN et al., 2001). Dieser Effekt wird über trkC vermittelt (COSGAYA et al., 2002; YAMAUCHI et al., 2003; YAMAUCHI et al., 2004). Neurotrophin-5 wurde nach seiner Entdeckung und Benennung als identisch mit Neurotrophin-4 erkannt, aus diesem Grund wird in der Literatur häufig die Bezeichnung NT-4/5 verwendet. Mehrere in vitro und in vivo Untersuchungen haben gezeigt, dass NT-3 und NT-4/5 zu den wichtigsten Überlebensfaktoren von Motoneuronen gehören (SENDTNER et al.,

1996). NT-4/5 wird ähnlich wie BDNF ca. zwei Wochen nach einer Verletzung verstärkt exprimiert (FROSTICK et al., 1998).

2.3.2.1.2 Neurokine, Neuropoetische Zytokine, Neuropoetine

Neurokine gehören in die Familie der Zytokine. Sie bewirken eine gesteigerte Proliferation von Zellen und fördern so nicht nur das Wachstum von Axonen, sondern sichern auch das Überleben von Neuronen (FANSA und KEILHOFF, 2003). Zu den Neurokinen zählen der Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und der Leukemia Inhibitory Factor (LIF).

Neurokine spielen eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen, die auch wesentlich an der Wallerschen Degeneration beteiligt sind (SHAMASH et al., 2002).

In den Schwanzzellen intakter adulter Nerven liegt CNTF in hohen Konzentrationen vor (FROSTICK et al., 1998). CNTF ist 30 bis 60 Tage nach einer Denervierung in Schwanzzellen nicht mehr nachzuweisen und tritt erst mit der Reinnervation wieder auf. Es wird vermutet, dass Schwanzzellen den axonalen Kontakt benötigen um CNTF zu synthetisieren (SMITH et al., 1993). CNTF unterstützt das Überleben und die Differenzierung einer Vielzahl von Neuronen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem (IDE, 1996; FANSA und KEILHOFF, 2003).

2.3.2.1.3 Transforming Growth Factor Family

Zu dieser Familie gehören mittlerweile 30 Faktoren. Unterschieden werden die Gruppe der TGF- α - und TGF- β -Proteine. TGF- α wurde in Menschen und Nagetieren nachgewiesen. Die transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β) stellen eine Superfamilie von Proteinen dar, die in der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems unterschiedlichste Funktionen erfüllen (HEUPEL, 2007).

Aufgrund ihrer Bedeutung bei immunologischen Vorgängen werden TGF- β zur Klasse der Zytokine gezählt (PREHN et al., 1993). Außerdem spielen TGFs eine Rolle in der Proliferationskontrolle verschiedener Zellen, weshalb sie auch den Wachstumsfaktoren zugeordnet werden (MASSAGUÉ, 1990). Zusammen mit den in den letzten Kapiteln vorgestellten Mitgliedern anderer Proteinfamilien gehören sie zur Gruppe der Neurotrophen Faktoren (HEFTI, 1997).

Bislang wurden 3 verschiedenen Isoformen (TGF- β 1 bis 3) bei Säugetieren identifiziert (KINGSLEY, 1994). Im PNS von Säugetieren sind TGF- β 1 bis 3 in verschiedenen

Konzentrationen in den Zellen des neuromuskulären Systems, also in Motoneuronen, Muskelzellen und Schwannzellen zu finden (MCLENNAN und KOISHI, 2002). Schwannzellen sezernieren TGF- β 1 bis 3 und exprimieren alle drei TGF- β -Rezeptoren (EINHEBER et al., 1995; JIANG et al., 2000). Dabei wird die Menge der TGF- β -Isoformen in vitro differentiell durch die Interaktion von Nerv und Schwannzellen reguliert, sodass die Konzentration von TGF- β 1 in Neuronen-Schwannzell-Ko-Kulturen im Gegensatz zu Schwannzell-Monokulturen erniedrigt, die Konzentration von TGF- β 3 erhöht und die Menge an TGF- β 2 unverändert ist (HEUPEL, 2007). Zu den etablierten Funktionen der Unterfamilie der TGF- β -Isoformen 1 bis 3 im Nervensystem gehören die Kontrolle von Überleben und Apoptose in Neuronen (KRIEGLSTEIN, 2006).

TGF- β besitzt neben seiner Wirkung auf dopaminerge Neurone und auf Astrozyten Einfluss auf die Proliferation (EINHEBER et al., 1995), Differenzierung (DAY et al., 2003) und Apoptose von Schwannzellen (PARKINSON et al., 2001). Den einzelnen Isoformen lassen sich bestimmte Funktionen zuweisen. So besitzt beispielsweise TGF- β 1 einen ausgeprägten Einfluss auf die Myelinisierung durch Schwannzellen (EINHEBER et al., 1995). TGF- β 1-defiziente Mäuse weisen abnorme Myelinscheiden auf (DAY et al., 2003).

2.3.2.1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist insbesondere als endogener proangiogener Faktor bekannt. In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass VEGF nicht nur spezifisch auf Endothelzellen wirkt, sondern auch positive Effekte auf Neuronen und Schwannzellen ausübt (BROCKINGTON et al., 2004; NAMIECINSKA et al., 2005).

Die VEGF-Genfamilie umfasst sechs Faktoren: VEGF-A, häufig auch nur VEGF genannt, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und Placenta Growth Factor (PlGF). Während VEGF, VEGF-B, VEGF-D, VEGF-E und PlGF hauptsächlich die Blutgefäßbildung beeinflussen, wirkt VEGF-C überwiegend auf die Entwicklung und Erhaltung der Lymphgefäße. VEGF, VEGF-B und VEGF-C werden außerdem ein Effekt auf Zellen des Nervensystems zugesprochen (RAAB und PLATE, 2007).

Sieben VEGF-Isoformen sind bislang identifiziert worden: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆. Sie entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA und bestehen jeweils aus der entsprechenden Anzahl Aminosäuren. In den meisten Geweben ist VEGF₁₆₅ die überwiegende Form (NEUFELD et al., 1999; LANGE et al., 2003; FERRARA, 2004).

VEGF interagiert mit zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1, KDR), während VEGF-C und VEGF-D auch an VEGFR-3 binden (BROCKINGTON et al., 2004; RAAB und PLATE, 2007).

Des Weiteren fungieren die Neuropiline (NRP) -1 und -2, so genannte Nicht-Tyrosinkinase-Rezeptoren als VEGF-Rezeptoren (ZACHARY, 2005). Über NRP-1 fördert VEGF das Auswachsen von Neuronen und verhindert deren Apoptose. Auch in der neuronalen Entwicklung spielt VEGF via NRP-1 eine wesentliche Rolle (ROSENSTEIN und KRUM, 2004).

An Endothelzellen werden mitogene und angiogene Effekte von VEGF hauptsächlich über VEGFR-2 vermittelt, gleiches gilt für die proliferationsfördernde Wirkung von VEGF auf Neurone und Gliazellen (BROCKINGTON et al., 2004). Neben VEGFR-2 gilt Neuropilin-1 als hauptsächlicher VEGF-Rezeptor im Nervensystem (ZACHARY, 2005).

VEGF stimuliert axonales Wachstum, erhöht die Überlebensrate und Proliferation von Schwanzzellen und aktiviert deren Invasion in azelluläre Nerventransplantate (SONDELL et al., 1999a; SONDELL et al., 1999b). Nach peripheren Nervenläsionen ist VEGF verantwortlich für die Wiederherstellung der Blutzufuhr und unterstützt das Überleben und die Regeneration der Neurone (BROCKINGTON et al., 2004). Die Supplementierung von VEGF führte bei Ratten nach Läsionen des N. ischiadicus zu einer verbesserten intraneuralen Angiogenese und beschleunigten axonalen Regeneration sowie einer gesteigerten Schwanzzell-Migration (HOBSON et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass VEGF im Gebiet chronischer Nervenkompressionen exprimiert wird. Während der frühen Phase chronischer Nervenkompressionen kommt es nicht zu axonaler Degradation, vielmehr ist eine starke Proliferation der Schwanzzellen zu beobachten, allerdings gefolgt von deren Apoptose und vaskulären Veränderungen (GUPTA et al., 2005). Unterschiedliche VEGF-Konzentrationen wurden zur Kultivierung von Neuronen-Schwanzzell-Ko-Kulturen aus verschiedenen Ganglien erprobt. Dabei zeigte sich ein maximaler Effekt hinsichtlich der Länge der auswachsenden Axone und der Anzahl der vorhandenen Schwanzzellen bei einer VEGF-Konzentration von 10 bis 50 ng/ml. Bei den Spinalganglien erwies sich die VEGF-Konzentration von 100 ng/ml am erfolgreichsten (SONDELL et al., 1999a).

2.3.2.1.5 Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) gehört zur FGF-Familie, zu der gegenwärtig 23 verschiedene Polypeptide gezählt werden. Diese Wachstumsfaktoren haben während der embryonalen Entwicklung großen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Differenzierung diverser Zellen. Sie spielen auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung und Regeneration verschiedener Gewebe wie z.B. bei der Wundheilung,

der Angiogenese und der Nervenregeneration (GROTHER und NIKKHAH, 2001; ORNITZ und ITOH, 2001; MALECKI et al., 2004).

Bei Ratten existieren Isoformen mit einem Gewicht von 18 kDa, 21 kDa und 23 kDa, bei denen es sich um verschiedene Translationsprodukte der gleichen mRNA handelt (FLORKIEWICZ und SOMMER 1989). FGF-2 signalisiert über zwei Klassen von Rezeptoren: niedrig-affine Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) und hoch-affine Tyrosin-Transmembranrezeptoren (FGFR-1 bis 4) (ASPLIN et al., 2001; GROTHE et al., 2006). FGF-2 und seine Rezeptoren FGFR-1 bis 3 werden von Spinalganglien, sensorischen Neuronen und Schwanzzellen des sich entwickelnden und adulten peripheren Nervensystems exprimiert (GROTHE et al., 2001). FGFR-1 gilt als der wichtigste FGF-Rezeptor des Nervensystems, da die meisten Funktionen über ihn vermittelt werden sollen (STACHOWIAK et al., 1996; MEISINGER et al., 1996). Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression der FGFR-1 bis 4 in unterschiedlichen Zellen und Geweben wiesen in Schwanzzellen allerdings nur die Expression von FGFR-1 und FGFR-3 nach, während FGFR-2 und FGFR-4 nicht gefunden wurden (HUGHES, 1997). Andere Studien zeigen, dass nach einer peripheren Nervenverletzung die Konzentration von FGF-2 ebenso wie die Expression von FGFR-3 auf der Seite der Läsion deutlich ansteigen (GROTHE et al., 1997; GROTHE et al., 2001; SCARLATO et al., 2001). FGFR-3-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zum Wildtyp im gesunden N. ischiadicus die gleiche Anzahl myelinisierter Fasern auf, die Axone und die Myelinscheiden haben allerdings einen geringeren Durchmesser (JUNGNICKEL et al., 2004). FGF-2-defiziente Mäuse dagegen zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl regenerierender Axone sowie erhöhte Durchmesser von Axonen und Myelinscheiden, während FGF-2-überexprimierende Mäuse eine deutliche Hypomyelinisierung aufweisen (JUNGNICKEL et al., 2004). Im proximalen Nervenstumpf konnte bei FGF-2-überexprimierenden Mäusen außerdem eine gesteigerte Schwanzzellproliferation verbunden mit einer beschleunigten Nervenregeneration nachgewiesen werden (JUNGNICKEL et al., 2006). Diese Beobachtung korreliert mit der proliferationsfördernden Wirkung von FGF-2 auf Schwanzzellen in vitro (DAVIS und STROOBANT 1990; HAASSTERT et al., 2007). Die positive Wirkung von FGF-2 auf die Nervenregeneration konnte auch durch die Implantation von FGF-2-überexprimierenden Schwanzzellen nach einer Nervenverletzung gezeigt werden. Ratten, die FGF-2-transfizierte Schwanzzellen erhalten hatten, zeigten eine signifikant größere Anzahl regenerierender Nervenfasern und myelinisierter Axone. Die Nervenregeneration war gegenüber der Kontrollgruppe beschleunigt (TIMMER et al., 2003; TIMMER et al., 2004). In Untersuchungen der verschiedenen FGF-2-Isoformen hinsichtlich möglicher unterschiedlicher Effekte in der Nervenregeneration zeigte 21/23 kDa FGF-2 eine besonders förderliche Wirkung auf sensorische Neurone (HAASSTERT et al., 2006a).

2.3.2.2 Zelladhäsionsmoleküle (Cell Adhesion Molecules, CAM)

CAM sind Membranproteine, die interzelluläre Kontakte regulieren und mit den Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren. Sie vermitteln z.B. die Axon-Schwanzzell-Anheftung während des Auswachsens regenerierender Axone entlang der Schwanzzellsäule (IDE, 1996). Die Gene, die für CAM codieren, werden von sich entwickelnden Neuronen verstärkt exprimiert. Postnatal wird die Expression reduziert und findet nur im Zuge der axonalen Regeneration nach einer Nervenverletzung verstärkt statt (ZHANG et al., 2000).

Im Nervensystem gibt es drei Familien von Adhäsionsmolekülen: die Immunglobulin-Superfamilie einschließlich NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), NgCAM (Neuronglia Cell Adhesion Molecule), auch genannt L1, P0 und MAG; die Cadherine und die Integrine (IDE, 1996; FANSA und KEILHOFF, 2003).

Die Axon-Schwanzzell-Adhäsion wird von Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie wie N-CAM, L1 und P0 vermittelt. N-CAM und L1 sind sowohl auf den regenerierenden Axonen einschließlich ihrer Wachstumskolben sowie auf der Oberfläche von Schwanzzellen lokalisiert und interagieren miteinander (MARTINI et al., 1994). N-CAM vermittelt kalziumunabhängige Zelladhäsion und wird im peripheren Nervensystem von schmalen und nicht-myelinisierten Neuronen und nicht myelinisierenden Schwanzzellen exprimiert (LE FORESTIER et al., 1993).

Die Expression von N-CAM und L1 ist im reifen myelinisierten Nerv vermindert, während sie in unmyelinisierten Nerven kontinuierlich exprimiert werden. Im Zuge der Regeneration peripherer Nerven werden N-CAM und L1 sowohl auf den Oberflächen der Schwanzzellen reexprimiert, an denen sie miteinander in Kontakt stehen und die Büngnerschen Bänder bilden, als auch auf den Oberflächen, die an das regenerierende Axon angrenzen. Es wird allerdings auch diskutiert, ob die gesteigerte L1-Expression nach einer Nervenverletzung die Proliferation von Schwanzzellen negativ reguliert (GUSEVA et al., 2009).

In vitro fördern L1 und N-Cadherin das Wachstum von Neuronen auf der Oberfläche von Schwanzzellen (BIXBY et al., 1988; SEILHEIMER und SCHACHNER, 1988). N-Cadherin wird von Schwanzzellen nach einer Nervenläsion verstärkt gebildet und ist sowohl für die Adhäsion der Schwanzzellen untereinander als auch für den Kontakt zwischen Schwanzzellen und regenerierenden Axonen verantwortlich. So trägt es zur Stabilisierung der Büngnerschen Bänder bei.

Integrine sind Transmembran-Glykoproteine, die im Zellinneren mit dem Zytoskelett und nach außen mit der extrazellulären Matrix interagieren. Die β 1-Integrin-Familie umfasst Rezeptoren für Kollagen, Fibronectin, Laminin und Tenascin. β 1-Integrine sind wichtige Regulatoren der Zellmorphologie, Proliferation und Differenzierung (ROCHE et al., 1997).

In den letzten Jahren wurden noch einige weitere von Schwannzellen synthetisierte Adhäsionsproteine gefunden, diese sind jedoch noch nicht vollständig identifiziert worden. Zu diesen zählt u.a. Ninjurin1, das nach peripheren Nervenverletzungen in Schwannzellen deutlich induziert wird und ebenfalls das axonale Auswachsen fördert (ARAKI et al., 1996).

2.3.2.3 Moleküle der extrazellulären Matrix (Extracellular Matrix, ECM)

Die extrazelluläre Matrix der Nervenfasern besteht aus zwei Hauptkomponenten: der Basalmembran, die jede reife Schwannzelle umhüllt und dem im Endoneurium befindlichen Kollagen. Die Basalmembran enthält Typ IV und Typ V Kollagen (SHELLSWELL et al., 1979), Laminin, Fibronectin, Entaktin und Heparansulfat-Proteoglykan (BUNGE, 1993). Das Kollagen des Endoneuriums gehört dem Typ I, III, IV und V an (CAREY et al., 1983).

Moleküle der extrazellulären Matrix werden von Schwannzellen, Fibroblasten und den Neuronen gebildet und dirigieren auswachsende Axone in ihrer Wegfindung.

Nach früheren Studien ist die Basalmembran Voraussetzung für die Myelinisierung im peripheren Nervensystem, neue Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Lamininsignale die Myelinisierung einleiten (PODRATZ et al., 2001; FELTRI und WRABETZ, 2005). Die Aktivierung des Integrin $\beta 1$ -Rezeptors durch Laminin initiiert die Myelinisierung (PODRATZ et al., 2001). Die Blockierung dieses Rezeptors bewirkt eine Hemmung der Myelinisierung in Schwannzell-Neuronen-Ko-Kulturen (FERNANDEZ-VALLE et al., 1994). Bei Säugetieren existieren 15 Laminin-Isoformen, von denen verschiedene von Schwannzellen exprimiert werden (COLOGNATO et al., 2005). Die Basalmembran von Schwannzellen enthält Laminin 2 und Laminin 8, während im Bereich der Ranvierknoten und in den paranodalen Regionen nur Laminin 10 zu finden ist.

Laminin und Fibronectin fördern das Neuronenwachstum in vitro (FAWCETT und KEYNES, 1990). Die positive Wirkung von Fibronectin auf die Nervenregeneration kann durch Tenascin blockiert werden. Dieses wachstumshemmende Molekül wird nach einer Verletzung von Schwannzellen des distalen Nervenstumpfs verstärkt gebildet. Es wird vermutet, dass es Fehlansprossungen vermeiden soll (PROBSTMEIER et al., 2001).

2.3.3 Axonale Regeneration

Wenn nach einer peripheren Nervenverletzung die Nervenzelle überlebt, so laufen verschiedene morphologische und molekulare Veränderungen ab, die die Wandlung vom ruhenden zum auswachsenden Axon bewirken (FANSA und KEILHOFF, 2003). Das verletzte

Neuron stellt seine Proteinsynthese um, ähnlich wie während der embryonalen Entwicklung werden Zytoskelettproteine, Neurotrophine, Neurokine, neuronale Zelladhäsionsmoleküle und Moleküle der extrazellulären Matrix verstärkt synthetisiert (FU und GORDON, 1997; STOLL und MULLER, 1999; MAKWANA und RAIVICH, 2005).

Das Growth-Associated-Protein-43 (GAP-43) beispielsweise wird nur von Schwannzell-Vorläufern und reifen nicht-myelinisierenden Schwannzellen während des Wachstums und während der Regeneration peripherer Nerven synthetisiert (CURTIS et al., 1992). Nach einer Axotomie steigt die Expression des GAP-43 in motorischen und sensorischen Neuronen innerhalb kurzer Zeit stark an und nimmt erst fünf bis sechs Wochen später wieder ab, wenn die Reinnervation des Zielgewebes stattgefunden hat (ZHANG et al., 2000). Im Gegensatz zur verstärkten Synthese der Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin werden Neurofilamente während der Nervenregeneration reduziert synthetisiert (FANSA und KEILHOFF, 2003). Begleitet werden die genannten molekularen Veränderungen von einer Umstrukturierung der zellulären Organisation. Stellenweise lösen sich die Nissl-Schollen auf, der Nukleus verlagert sich in die Peripherie des Perikaryons, die Nukleoli vergrößern sich, die Zelle schwillt an, es kommt zur Chromatolyse (LIEBERMAN, 1971).

Die Regeneration peripherer Nerven geht von den im proximalen Nervenstumpf gelegenen Axonen aus. Innerhalb von Stunden beginnen Fasern aus dem Bereich des terminalen Ranvierschen Schnürrings des proximalen Nervenstumpfs auszuwachsen (FAWCETT und KEYNES, 1990; SJÖBERG und KANJE, 1990), wobei die von Schwannzellen gebildeten Büngnerschen Bänder als Leitschienen dienen (IDE, 1996). Im distalen Nervenstumpf werden einige Moleküle wie z.B. NGF, BDNF und NT-3 verstärkt gebildet, die das Auswachsen der Axone nach distal fördern und chemotaktisch die Richtung dieses Auswachsens angeben. Je größer der zu überbrückende Defekt im Nerven ist, desto eher kommt es zur Bildung von ungerichteten Kollateralen, die ihr Ziel nicht erreichen und wieder degenerieren.

Das Auswachsen der Axone erfolgt über die Ausbildung eines Wachstumsendkolbens (Wachstumskegel). Der Wachstumsendkolben ist sehr beweglich und besitzt zahlreiche Filopodien, die sich in verschiedene Richtungen vorstrecken und wieder zurückziehen können. Er ist mit Rezeptoren für Zelladhäsionsmoleküle ausgestattet und interagiert mit den Zelladhäsionsmolekülen der Umgebung. Die Richtung des Wachstums hängt von den Interaktionen zwischen den Rezeptoren und den entsprechenden Adhäsionsmolekülen ab. Mit Hilfe des Wachstumsendkolbens werden außerdem neurotrophe Faktoren aufgenommen und via retrograden axonalen Transport zum Nervenzellkörper befördert (FROSTICK et al., 1998).

Die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration beträgt nach einem Nervenschnitt zwei bis drei mm pro Tag und drei bis vier mm pro Tag nach einer Nervenquetschung (STOLL und MULLER, 1999).

Wenngleich das Axon bei einer Nervenquetschung beschädigt wird, kann die Kontinuität der Schwannzellen, der Basalmembran und des Perineuriums erhalten bleiben. Dies erleichtert die Nervenregeneration erheblich (JOHNSON et al., 2005). Die Remyelinisierung des regenerierten Axons beginnt ungefähr acht Tage nach der Nervenläsion (FAWCETT und KEYNES, 1990).

2.4 Chirurgische Behandlungsmöglichkeiten peripherer Neuropathien

Verletzungen, Tumore und Quetschungen des peripheren Nervengewebes können neurochirurgische Eingriffe beim Hund erforderlich machen. Dabei sind die am häufigsten betroffenen Nerven der N. radialis und der N. ischiadicus (FORTERRE, 2005).

2.4.1 Nervennaht, Neurorrhaphie, Koaptation

Wenn die beiden Nervenenden ohne Spannung aneinander gebracht werden können, ist die direkte Adaptation der beiden Nervenstümpfe durch eine Nervennaht der Therapiestandard. Dies wird auch als Neurorrhaphie oder Koaptation bezeichnet (LOHMEYER et al., 2007).

Die häufigsten Indikationen für eine Neurorrhaphie in der Veterinärmedizin sind Verletzungen des N. radialis auf Höhe des distalen Drittels des Humerus und des N. ischiadicus kaudal des Os femoris (FORTERRE, 2005). Durch Mobilisierung der Nervenenden kann ein Defekt von zwei cm ohne Spannung überbrückt werden, die Nähte erfassen nur das Epineurium. Das Ergebnis hängt zum einen von der guten Apposition der Nervenenden ab, jedoch in höherem Maße von der Lokalisation der Läsion (FORTERRE, 2005).

2.4.2 Muskeltransposition

Bei der Muskeltransposition wird die Endsehne eines gesunden Muskels an den Ort der Verletzung versetzt, die Funktion dieses Muskels wird dadurch derart verändert, dass sie funktional den Verlust des gelähmten Muskels ersetzt. Die Muskeltransposition kann bei Plexus brachialis- und N. ischiadicus-Verletzungen eingesetzt werden. BENNETT und VAUGHAN (1976) erzielten mit dieser Methode bei drei Hunden mit Verletzungen des N.

radialis bzw. des N. fibularis zufrieden stellende Ergebnisse, bei zwei Patienten blieb die Therapie jedoch erfolglos.

2.4.3 Neurotisation

Unter Neurotisation versteht man das Einbringen von Axonsprossen in ein vorher denerviertes Gewebe (MUMENTHALER et al., 2007). Unterschieden werden die Nerv-Nerv-Neurotisation, bei der ein proximaler innervierter Nervenstumpf an ein distales denerviertes Nervenende transferiert wird, die Nerv-Muskel-Neurotisation (Verbindung eines proximalen innervierten Nervenstumpfes mit einem denervierten Muskel), die Muskel-Muskel-Neurotisation und die Muskel-Nerv-Neurotisation. Verletzungen des N. radialis und des N. ischiadicus sowie Plexusverletzungen sind in der Tiermedizin die häufigsten Indikationen für eine Neurotisation (FORTERRE, 2005).

Die Muskel-Muskel-Neurotisation wurde in der Tiermedizin erfolgreich bei Funktionsausfall des M. extensor digitorum communis infolge einer Radialislähmung angewandt. In einem Fall wurde der M. pronator teres (CANO et al., 1986) und im anderen Fall der M. flexor carpi radialis transpositioniert. CALVO et al. (1989) zeigten, dass die Ergebnisse der muskulären Neurotisation makroskopisch, mikroskopisch und elektromyographisch den Ergebnissen der primären Nervennaht unterlegen sind.

Bei der nervalen Neurotisation, bei der ein gesunder Nerv zum distalen Abschnitt eines im proximalen Teil irreversibel geschädigten Nervs transferiert wird (FREY et al., 1998), müssen zuerst das distale Segment des lädierten Nerven und der Spendernerv dargestellt und freigelegt werden. Dann werden beide Nerven durchtrennt und anschließend das proximale Ende des Spendernerven mit dem distalen Ende des lädierten Nervs anastomosiert wie bei der Neurorrhaphie. Als Spendernerven gelten N. accessorius, N. phrenicus und Nn. intercostales bei Plexus brachialis-Rekonstruktionen, N. medianus und N. ulnaris bei Neurotisationen des N. radialis und der N. tibialis bei Neurotisationen des N. fibularis. Grundlage der Neurotisation ist die Plastizität des Nervensystems: die Funktion eines Nerven wird von seinem Zielorgan bestimmt, sie ist anpassungsfähig. Der Umwandlungsprozeß wird von einer zentralen Reorganisation im Gehirn begleitet und dauert drei bis sechs Monate (FORTERRE, 2004). FORTERRE et al. (2001) erreichten mit dieser Methode zufrieden stellende Ergebnisse bei der Behandlung von Läsionen einzelner Nerven, nicht jedoch bei komplexen Nervenläsionen (Plexus brachialis-Abriss). In einer experimentellen Studie von CASAUS et al. (1991) wurden die nervale Neurotisation und die muskuläre Neurotisation zur Behandlung von Radialislähmungen verglichen. Die Ergebnisse beider Techniken waren ähnlich. Bei einem Vergleich zwischen Neurorrhaphie,

Nerventransplantation und muskulärer Neurotisation in einer anderen Studie wurden mit der Neurorrhaphie und der Nerventransplantation die besten Ergebnisse erzielt (FREY et al., 1982).

2.4.4 Nerventransplantation

Eine Nerventransplantation ist beim Hund indiziert nach schweren Nervenverletzungen mit Substanzverlust und nach Tumorexzisionen. Sie dient üblicherweise der Überbrückung des Defekts eines Hauptnervs wie des N. radialis oder N. ischiadicus (FORTERRE, 2005).

Ihrer Herkunft nach werden Nerventransplantate in Allo- und Autotransplantate unterteilt. Die allogene Nerventransplantation (Transplantation körperfremder Nerven) führt zu starken Immunreaktionen, die nur durch eine kontinuierliche immunsuppressive Therapie unterdrückt werden können. Eine Immunsuppression sollte in traumatischen oder onkologischen Situationen jedoch nicht erfolgen (EVANS, 2000), da sie zu teilweise lebensbedrohlichen Nebenwirkungen führen kann (FANSA et. al., 2002). Die Heilungserfolge allogener Nerventransplantate sind überwiegend unbefriedigend (HEATH und RUTKOWSKI, 1998). Bei einigen Patienten konnte jedoch eine vollständige Wiederherstellung der Sensibilität erzielt werden (MACKINNON und HUDSON, 1992). In tierexperimentellen Studien wurden Allotransplantationen unter medikamenteller Immunsuppression mit Cyclosporin, Sirolimus (Rapamycin) und Tacrolimus (FK506) durchgeführt (MYCKATYN und MACKINNON, 2004), welchen neben der immunsuppressiven Wirkung auch neuroregenerative Eigenschaften zugesprochen werden (UDINA et al., 2004).

Bei der autologen Nerventransplantation wird ein funktionstüchtiger körpereigener Nerv, dessen Entnahme vertretbare Defizite hinterlässt, für die Überbrückung des Nervendefekts verwendet. Wenn eine spannungsfreie Naht nicht möglich ist, stellt die autologe Nerventransplantation den Goldstandard zur Überbrückung eines Nervendefekts dar (MILLES, 2000; EVANS, 2001; BATTISTON et al., 2005; REYES et al., 2005; LOHMEYER et al., 2007; MUIR, 2009). Für die funktionelle Wiederherstellung ist dabei die Größe des Defekts entscheidend. Bei Patienten mit Nervenläsionen < 20 mm ist eine moderate Regeneration zu erwarten, Läsionen zwischen 20 und 40 mm führen meist zu einer schwachen Funktionserholung und bei Substanzverlusten > 40 mm bleibt die Regeneration gewöhnlich aus (REYES et al., 2005).

Ein Nerventransplantat stellt eine ideale Leitschiene für die regenerierenden Axone dar, da es als Gerüst dient und gleichzeitig neurotrophe Faktoren produzierende Schwanzzellen und die Schwanzzell-Basalmembran als ideales Wachstumssubstrat für regenerierende Axone liefert (LUNDBORG, 2003). Trotzdem erlangen nur 50% der Patienten durch eine

autologe Nerven transplantation die Funktionalität des Versorgungsgebiets wieder (LEE und WOLF, 2000).

Die Nachteile der autologen Nerven transplantation sind die begrenzte Anzahl der zur Gewinnung von Autotransplantaten zur Verfügung stehenden Spendernerven und ihr meist geringes Kaliber sowie eine zusätzliche Operation, neurologische Ausfälle an der Stelle der Nervenentnahme, einhergehend mit Narben- und möglicherweise schmerzhafter Neuombildung (HEATH und RUTKOWSKI, 1998; EVANS, 2000; WEBER et al., 2000; FANSA und KEILHOFF, 2003; WIBERG und TERENCEHI, 2003; CIARDELLI und CHIONO, 2006).

2.5 Neue Behandlungsmöglichkeiten peripherer Nervenläsionen

Aufgrund der genannten Nachteile der Nerven transplantation wird mit großem Interesse nach Alternativen in Form von geeigneten Nervenimplantaten gesucht, die als Führungskanäle zur Überbrückung von Nervendefekten dienen sollen.

In das Ende eines präformierten Röhrchens wird auf einer Seite der proximale und auf der anderen Seite der distale Stumpf eines durchtrennten Nervs eingesetzt und mit wenigen epineuralen Einzelheften befestigt. Dieses Verfahren wird auch Tubulisation genannt.

Neue Ergebnisse haben gezeigt, dass Nervenimplantate, die mit Schwannzellen beladen sind, eine Erfolg versprechende Strategie bei der Rekonstruktion peripherer Nerven darstellen (MAY et al., 2005; DE RUITER et al., 2009; HOOD et al., 2009). Schwannzellen beschleunigen den Regenerationsprozess und ermöglichen im Vergleich mit azellulären Leitschienen eine Nervenregeneration über längere Distanzen (RODRIGUEZ et al., 2000) sowie eine verbesserte morphologische und funktionelle Wiederherstellung des Nerven (BATTISTON et al., 2005). Zusätzlich kann die Nervenregeneration durch Injektion oder gentherapeutische Überexpression neurotropher Faktoren verbessert werden (WEIDNER et al., 1999; DE RUITER et al., 2009).

Verschiedene Materialien in unterschiedlichen Ausführungen (hohl, gefüllt, mit oder ohne Zellen, teilweise zusätzlich mit neurotrophen Faktoren ausgestattet) wurden als artifizielle Leitschienen zur Überbrückung von unterschiedlich großen Nervendefekten in zahlreichen experimentellen Studien, in Tierversuchen und teilweise auch in klinischen Studien erprobt (DE RUITER et al., 2009). Am häufigsten wurde die periphere Nervenregeneration mit Hilfe von Leitschienen am Ischiasnerv der Ratte untersucht (CIARDELLI und CHIONO, 2006). Einen entscheidenden Parameter bei der Untersuchung der peripheren Nervenregeneration stellt die Länge des Nervendefekts dar. Bei der Ratte traten gelegentlich spontane

Regenerationen bei Nervendefekten über eine Länge von 10 mm auf, die bei Defekten von 10 bis 15 mm ausblieben (LOHMEYER et al., 2007).

Zum klinischen Einsatz bei peripheren Nervendefekten sind inzwischen mehrere Produkte aus verschiedenen abbaubaren Materialien erhältlich (LOHMEYER et al., 2007), z.B. aus Salubria Hydrogel (SaluBridge®; Salu Medica, Allanta, GA), Kollagen (NeuraGen®; Integra LifeScience, Plainsboro, NJ) und Polyglykolsäure (GEM Neurotube®; Synovis Micro Companies Alliance, St. Paul, MN) (LIETZ et al., 2006). Allgemein wurden gute Ergebnisse bei Nervendefektstrecken unter 30 mm erzielt (IGNATIADIS et al., 2007, DE RUITER et al., 2009). In Europa sind in der Humanmedizin momentan Nervenimplantate von bis zu 40 mm Länge und einem Innendurchmesser von 10 mm zur Überbrückung von Nervendefektstrecken bis 30 mm zugelassen (LOHMEYER et al., 2007)

Als mögliche Nervenleitschienen wurden natürliche und synthetische, sowohl resorbierbare als auch nicht resorbierbare Materialien, erprobt. Die in jüngerer Zeit favorisierten Nervenröhrchen aus synthetischen Polymeren und Kollagen lieferten ebenbürtige Erfolge zu autologen Nerventransplantaten, die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien sind jedoch schwer miteinander zu vergleichen, da sich die Tiermodelle, die Größe der Nervendefekte und die Evaluierungstechniken unterschieden (LOHMEYER et al., 2007; DE RUITER et al., 2009).

2.5.1 Natürliche Materialien

Den ersten beschriebenen Versuch der Rekonstruktion verletzter Nerven unternahm GLÜCK (1880). Jedoch blieb der Versuch, Nervendefekte beim Huhn und beim Kaninchen mit einem ausgehöhlten Knochenstück zu überbrücken, erfolglos. VANLAIR (1882) hingegen konnte in seinen Experimenten bereits eine erfolgreiche Nervenregeneration durch den Einsatz eines 30 mm langen dekalzifizierten Knochenstückes erzielen (BATTISTON et al., 2005).

Die erste Dokumentation der erfolgreichen Regeneration eines zehn mm langen resezierten Teilstücks des N. ischiadicus beim Hund durch den Einsatz einer menschlichen Oberarmarterie stammt von BÜNGNER (1891). Der Einsatz von Arterien zur Tubulisation ist limitiert, da sie in der erforderlichen Größe von demselben Individuum meistens nicht ohne ernsthafte Konsequenzen entnommen werden können. Daher wurden in weiteren Studien meist Venen eingesetzt. WREDE (1909) erzielte als erster eine funktionelle Wiederherstellung des N. medianus bei einem Menschen durch den Einsatz eines 45 mm langen Venenstücks. In experimentellen und klinischen Studien konnten autologe Venentransplantate erfolgreich zur Überbrückung von kleinen Nervendefekten unter 30 mm eingesetzt werden (CHIU et al.,

1982; WALTON et al., 1989; CHIU und STRAUCH, 1990). Nachteil der Venentransplantate ist ihr geringer mechanischer Widerstand, durch den sie leicht kollabieren.

Um eine erfolgreiche Regeneration bei größeren Defekten zu erreichen, wurden Venen mit Nervengewebe (TANG, 1995; KESKIN et al., 2004;) oder Skelettmuskulatur (BRUNELLI et al., 1993; DI BENEDETTO et al., 1998; BATTISTON et al., 2000a; BATTISTON et al., 2000b) kombiniert und so verschiedene so genannte „kombinierte Venentransplantate“ entwickelt. Klinische Studien mit kombinierten Venentransplantaten zeigten zufrieden stellende funktionelle Ergebnisse bei über 30 mm großen Nervendefekten sensibler und gemischter Neurone (BATTISTON et al., 2005).

In Studien am Kaninchen von ZHANG et al. (2002) und STRAUCH et al. (2001) gelang es durch Venentransplantate, in die vorher eine Schwanzzell-Suspension injiziert worden war, bis zu 40 mm bzw. 60 mm große Nervendefekte erfolgreich zu überbrücken.

Auf der Suche nach neuen Erfolg versprechenden Materialien zur Nervenrekonstruktion wurden azelluläre Venentransplantate mit Spinnenseide gefüllt und mit Schwanzzellen beschickt. In vitro konnte eine erfolgreiche Adhäsion und hohe Vitalität der Schwanzzellen erzielt werden, Versuche in vivo stehen noch aus (ALLMELING et al., 2006).

Der erste bekannte Einsatz von Skelettmuskel zur Überbrückung peripherer Nervendefekte erfolgte 1940. In Tierexperimenten führten Leitschienen aus frischem Muskelgewebe und aus denaturiertem Muskelgewebe zu einer erfolgreichen Nervenregeneration (KRAUS und REISNER, 1940). Autologe Sehnen wurden bei Ratten erfolgreich zur Überbrückung von zehn mm großen Läsionen des N. ischiadicus eingesetzt (BRANDT et al., 1999). Durch die Anreicherung der Sehnenimplantate mit autologen Schwanzzellen wurde dabei das Auswachsen der regenerierenden Axone signifikant beschleunigt (BRANDT et al., 2005).

Unter den natürlichen Polymeren wurden v.a. Moleküle der extrazellulären Matrix erprobt, allen voran Kollagen. In Kaninchen (KIM et al., 1993), Mäusen (NAVARRO et al., 1996), Ratten (KIM et al., 1994) und Affen (ARCHIBALD et al., 1995, LI et al., 1992; MACKINNON und DELLON, 1990) wurden Kollagenröhrchen zur Überbrückung von Nervendefekten eingesetzt. Bei Affen konnten Defekte von bis zu 50 mm Länge erfolgreich überbrückt werden (ARCHIBALD et al., 1995). An Ratten wurde die Wirkung von Schwanzzellen, die in einem Kollagenröhrchen kultiviert wurden, auf die Nervenregeneration untersucht. zehn mm große Defekte des N. ischiadicus wurden entweder mit einem autologen Nervenimplantat oder mit einer mit Schwanzzellen ausgestatteten Leitschiene überbrückt. Die funktionellen Ergebnisse waren vergleichbar, in den Schwanzzellimplantaten war eine größere Anzahl myelinisierter Axone auszumachen (KIM et al., 1994). ANSSELIN et al. (1997) zeigten, dass die Förderung der Nervenregeneration auch von der Dichte der Schwanzzellen im Implantat abhängt. Sie rekonstruierten Nervendefekte von 18 mm Länge am erfolgreichsten mit

Kollagenleitschienen, die mehr als $0,5 \times 10^6$ Schwanzzellen enthielten. Schwanzzellen der Ratte wurden erfolgreich dreidimensional innerhalb eines Kollagengels kultiviert. Eingebettet in Silikonröhrchen ordneten sich die Schwanzzellen innerhalb des Gels selbstständig longitudinal an und führten über eine Defektstrecke von fünf mm im N. ischiadicus zu einer verbesserten Nervenregeneration (PHILLIPS et al., 2005). Auch die Füllung der Röhrchen mit Laminin (KAUPPILA et al., 1993) und Fibronectin (WHITWORTH et al., 1995) führte zur erfolgreichen Nervenregeneration.

Mit gutem Erfolg wurden Chitosanröhrchen, die mit längsorientierten Polyglykolsäurefasern gefüllt waren, eingesetzt, um 30 mm große Defekte des N. ischiadicus bei Hunden zu überbrücken (WANG et al., 2005).

In zwei Studien an Katzen wurde Alginat zur Regeneration peripherer Nerven verwendet. Mit gefriergetrocknetem Alginatgel wurde bei der Überbrückung von 50 mm großen Defekten des N. ischiadicus eine erfolgreiche Regeneration erzielt (SUZUKI et al., 1999). Ebenso führte der Einsatz von Alginat-Schwämmen bei gleich großen Defekten des N. facialis zu einer funktionellen Wiederherstellung (WU et al., 2002).

Poly-3-Hydroxybutyrat (PHB) ist ein biodegradierbares Polymer natürlichen Ursprungs, welches als artifizielle Leitschiene in einer Studie an Kaninchen zur Überbrückung von bis zu 40 mm großen Defekten des N. fibularis untersucht wurde. Die Nervenregeneration war den autologen Nerventransplantaten überlegen (YOUNG et al., 2002). Durch die Füllung der PHB-Leitschienen mit in Alginat-Hydrogel suspendiertem GGF wurde die Nervenregeneration des N. fibularis über Defektstrecken von 20 mm und 40 mm weiter verbessert (MOHANNA et al., 2003; MOHANNA et al., 2005).

2.5.2 Synthetische nicht resorbierbare Materialien

Vom ersten Einsatz synthetischer Leitschienen zur Rekonstruktion von Verletzungen des N. radialis beim Menschen berichtete GARRITY (1955). Der Versuch der Nervenrekonstruktion mit Hilfe von Polyethylen, Polyvinyl und Gummi bei über 70 mm großen Nervendefekten verlief allerdings erfolglos (FIELDS et al., 1989; BATTISTON et al., 2005). Seitdem sind viele synthetische, nicht resorbierbare Produkte in unterschiedlichen Modellen und teilweise im klinischen Einsatz erprobt worden.

Silikon ist in dieser Stoffgruppe das am weitest häufigsten verwendete Material. DAHLIN und LUNDBORG (2001) demonstrierten eine erfolgreiche Nervenregeneration durch Silikonröhrchen bei der Überbrückung kleiner Defekte von unter fünf mm im menschlichen N. ulnaris und N. medianus. Bei längeren Strecken jedoch war diese Technik selten erfolgreich (LUNDBORG et al., 1982a; LUNDBORG et al., 1982b). Es gibt allerdings Fallberichte über den

erfolgreichen klinischen Einsatz von Silikonröhrchen, um bis zu 30 mm große Nervendefekte zu überbrücken (BRAGA-SILVA, 1999). Eine positive Beeinflussung der Nervenregeneration ließ sich durch die Füllung von Silikonröhrchen mit longitudinal angeordneten Laminin- und Kollagengelen bei sechs mm großen Defekten des N. ischiadicus in Mäusen (VERDU et al., 2002) erzielen, ebenso wie mit kollagen-, laminin- und fibronectingefüllten Silikonröhrchen zur Überbrückung von zehn mm langen Defektstrecken des N. ischiadicus bei Ratten (CHEN et al., 2000). Am gleichen Modell bewirkte die Injektion von Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ), einem zu den B-Vitaminen zählenden Antioxidans in das Silikonröhrchen, eine verbesserte Nervenregeneration gegenüber leeren Silikonröhrchen (LIU et al., 2005).

CASPERS (2004) untersuchte die Regeneration erektiler Nerven von Ratten durch Silikonleitschienen, die mit autologen Schwanzzellen gefüllt waren, im Vergleich zu leeren Silikonröhrchen und Transplantaten des N. genitofemoralis. Die Ratten, denen Silikonprothesen mit Schwanzzellen eingesetzt wurden, zeigten gegenüber den Vergleichsgruppen deutlich bessere Erektionsraten (Erektionen bei 91% der Stimulationen im Vergleich zu 30 bis 50% in den Kontrollgruppen) und in histologischen Untersuchungen deutlich dickere und in ihrem Aufbau kompaktere regenerierte Nerven.

In einem neuartigen System wurden Schwanzzellen in Matrigel dreidimensional kultiviert. Silikonröhrchen, die mit diesen Schwanzzellen befüllt waren, bewirkten im N. ischiadicus der Ratte über eine Defektstrecke von zehn mm eine verbesserte Nervenregeneration gegenüber Implantaten aus Silikon, gefüllt mit Matrigel und herkömmlich kultivierten Schwanzzellen (2D) (KIM et al., 2007).

Nicht resorbierbare synthetische Materialien können zu Problemen wie Entzündungen und Fibrosen (Fremdkörperreaktionen) sowie Kompressionen der Nervenenden führen (LIETZ et al., 2006; CIARDELLI und CHIONO, 2006). Aus diesem Grund müssen nicht resorbierbare Transplantate häufig in einer zweiten Operation wieder entfernt werden (DELLON, 1994; WANG et al., 2005).

2.5.3 Synthetische resorbierbare Materialien

Gegenüber nicht resorbierbaren Materialien stellen synthetische resorbierbare Materialien im Hinblick auf ihre Eignung als artifizielle Nervenimplantate gegenwärtig die Erfolg versprechende Alternative dar. Verschiedene synthetische Polymere wie Polyglykolsäure (PGA), Polylactid (PLA), Polylactid-co-polyglykolsäure (PLPG), Poly- ϵ -caprolacton (PCL) und Polylactid- ϵ -caprolacton (PLC) wurden in zahlreichen Studien experimentell und klinisch erprobt.

In experimentellen Studien an Kaninchen wurde PGA bereits vor über 20 Jahren erfolgreich zur Überbrückung von Nervendefekten des N. tibialis eingesetzt (MOLANDER et al., 1982; MOLANDER et al., 1983). Ebenfalls erfolgreich wurden mit PGA bei Affen 30 mm große Defekte des N. ulnaris überbrückt (DELLON und MACKINNON, 1988) und bei Menschen mit gleich großen Defekten digitaler Nerven zufrieden stellende, der Nerven transplantation vergleichbare Ergebnisse erzielt (MACKINNON und DELLON, 1990). Der Einsatz von PGA-Leitschienen mit und ohne Schwanzzellen im Vergleich zu autologen Nerven transplantaten an Ratten brachte keine den autologen Nerven transplantaten äquivalenten Ergebnisse (EVANS et al., 2002, HADLOCK et al., 2000). An Hunden dagegen wurden mit Kollagen gefüllte PGA-Röhrchen zur Überbrückung von 15 mm großen Nervendefekten mit gegenüber autologen Transplantaten überlegenem Ergebnis eingesetzt (NAKAMURA et al., 2004). Gleichartige Implantate gewährleisteten bei Hunden zur Überbrückung acht mm großer Nervendefekte ebenfalls eine zufrieden stellende Nervenregeneration (MATSUMOTO et al., 2000).

Der Einsatz eines mit einem Kollagen-Schwamm gefüllten PGA-Röhrchens zur Überbrückung von Nervendefekten erwies sich bei zwei Menschen als erfolgreich. Die Eingriffe führten bei einem 20 mm Defekt des N. digitalis proprius und bei einer 65 mm großen Läsion des N. peroneus superficialis zu einer erfolgreichen Wiederherstellung der Funktion (INADA et al., 2004). Auch in einer größeren klinischen Studie mit 98 Patienten und 136 Durchtrennungen digitaler Nerven erwies sich der Einsatz von PGA zur Nervenrekonstruktion als sehr effektiv. In dieser Untersuchung wurden die Läsionen vergleichend entweder mit einer End-zu-End-Anastomose, einem Nerven transplantat oder einer PGA-Leitschiene (Neurotube®) behandelt. Bei Nervendefekten unter vier mm und über acht mm waren die Ergebnisse der Behandlung mit der PGA-Leitschiene denen der End-zu-End-Anastomose und der Nerven transplantation überlegen (WEBER et al., 2000).

Im in vitro und in vivo Rattenmodell wurden PLA-Leitschienen mit Mikrorillen in der inneren Oberfläche im Vergleich zu glatten PLA-Röhrchen sowie gerillten und glatten Chitosanröhrchen getestet. Es wurde deutlich, dass die Schwanzzellen in vitro eine bessere Ausrichtung in den gerillten Röhrchen zeigten und die Nervenregeneration bei den gerillten PLA-Röhrchen im Vergleich zu den glatten PLA-Röhrchen überlegen war (HSU et al., 2007).

Der Einsatz von autologen Schwanzzellen in einer Leitschiene aus PLC zur Überbrückung von sechs mm langen Defekten im N. ischiadicus von Mäusen führte zu einer guten Nervenregeneration, die im Vergleich zu autologen Nerven transplantaten jedoch knapp unterlag (RODRIGUEZ et al., 2000).

In einer anderen Studie an Ratten wurden bei der Überbrückung von zehn mm langen Defektstrecken des N. ischiadicus mit hohlen PCL-Implantaten den autologen

Nerventransplantaten vergleichbare Ergebnisse erzielt, während lamininbeschichtete PCL-Implantate deutlich schlechtere Ergebnisse lieferten (CHIANG et al., 2005).

2.6 Isolierung und Kultivierung von Schwanzzellen

Zahlreiche Studien zeigen, dass geeignete Trägermatrices, die als Leitschienen dienen und mit autologen Schwanzzellen beladen sind, die Nervenregeneration nachhaltig verbessern können. Voraussetzung zur Entwicklung eines solchen Implantats ist es, in einem kurzen Zeitraum eine ausreichend große und möglichst reine Population von funktionell aktiven, autologen Schwanzzellen zu kultivieren.

Zahlreiche Arbeiten beschreiben die Isolierung, Vermehrung und Identifizierung von Schwanzzellen aus Nervengewebe von Ratten (z.B. MORRISSEY et al., 1991; GUENARD et al., 1992; ANSSELIN et al., 1995, ANSSELIN et al., 1997; VROEMEN und WEIDNER, 2003; MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2007), Mäusen (z.B. VERDU et al, 2000), Kaninchen (z.B. STRAUCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002) und Menschen (z.B. ASKANAS et al., 1980; RUTKOWSKI et al., 1992; MORRISSEY et al., 1995a; MORRISSEY et al., 1995b; CASELLA et al., 1996; TURNBULL, 2005; HAASTERT et al., 2006b; HAASTERT et al., 2007).

Schwanzzellen des Hundes wurden erstmals an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU-Berlin von PAULS (2003) isoliert, identifiziert und kultiviert. Die von PAULS (2003) entwickelte Reexplantier-Methode zur Kultivierung caniner Schwanzzellen stützt sich im Wesentlichen auf die Protokolle der Kultivierung von Schwanzzellen aus folgenden Arbeiten: MORRISSEY et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 1992; GUENARD et al., 1992; MORRISSEY et al., 1995a; MORRISSEY et al., 1995b und CASELLA et al., 1996.

MORRISSEY et al. (1991) demonstrierten die Überlegenheit der Reexplantier-Methode gegenüber der sofortigen Dissoziation des Nervenmaterials im Hinblick auf die erzielte Zellausbeute. Im Zuge der Reexplantier-Methode wurden in dieser Untersuchung ca. 1 mm² große Nervenexplantate aus Nn. ischiadici von Ratten gewonnen, in Petrischalen mit 35 mm Durchmesser explantiert (10 bis 15 pro Schale) und mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bei 37° und 7% CO₂ inkubiert. Die Explantate wurden über vier bis fünf Wochen, immer wenn sich ein gleichmäßiger Zellrasen um sie herum gebildet hatte (alle sieben bis zehn Tage), in neue Petrischalen mit frischem Medium umgesetzt. Anschließend erfolgte die Verdauung der Explantate durch Inkubation mit 1,25 U/ml Dispase und 0,05% Kollagenase über Nacht im Wärmeschrank. Nach der Dissoziation wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin (PLL) beschichtete Deckgläschen ausgesät und dem Medium 20 µg/ml GGF und 2 µM Forskolin zugegeben.

Weitere sieben bis zehn Tage später wurden die Zellen trypsiniert, auf neue PLL-beschichtete Deckgläschen umgesetzt und anti-S100 immunzytochemisch markiert.

Mit dieser Reexplantier-Methode wurde in einem Zeitraum von fünf bis sechs Wochen eine Zellausbeute von 2×10^4 Zellen pro einem mg Ausgangsmaterial und 97% Schwannzellen erzielt, während die sofortige Dissoziation nur 1×10^3 Zellen pro einem mg Ausgangsmaterial mit einem Schwannzell-Anteil von 10-40% erbrachte.

Die Reexplantier-Methode wurde von ASKANAS et al. (1980) entwickelt. Damals konnte bereits gezeigt werden, dass durch das wiederholte Umsetzen der Nervenexplantate sowohl die Zellausbeute wie auch der Schwannzell-Anteil erheblich gesteigert werden kann.

Die Gründe hierfür liegen in der Verringerung der Fibroblasten-Anzahl durch das stetige Umsetzen der Explantate in frische Petrischalen und das damit verbundene Verbleiben der ausgewanderten Fibroblasten in den alten Petrischalen. Zusätzlich verringerte sich der Verlust an Schwannzellen, der bei sofortiger Dissoziation auf die enge Bindung der Schwannzellen mit den axonalen Segmenten zurückzuführen ist. Außerdem ermöglicht die Reexplantier-Methode den Ablauf der Wallerschen Degeneration in vitro. Dies wirkt stimulierend auf die Proliferation der Schwannzellen (MORRISSEY et al., 1991).

Der Nachteil dieser Methode ist der lange Zeitraum, der benötigt wird, um diese Kulturen zu etablieren. Aus diesem Grund wurden zur Optimierung der Isolierung und Vermehrung humaner Schwannzellen die direkte Dissoziation und die Reexplantier-Methode miteinander kombiniert. Hierbei werden die Nervenexplantate nach ein bis zwei Wochen Inkubation dissoziiert. Dieser Zeitraum hat sich als ausreichend erwiesen, um die Proliferation der Schwannzellen durch die Wallersche Degeneration zu stimulieren und gleichzeitig die schnell aus den Explantaten auswandernden Fibroblasten zu eliminieren (TURNBULL, 2005).

RUTKOWSKI et al. (1992) isolierten humane Schwannzellen aus Biopsien des N. suralis. Um die Proliferation der Fibroblasten zu hemmen und gleichzeitig die Vermehrung der Schwannzellen zu fördern, wurde den Nervenexplantaten vor der Dissoziation sieben Tage $0,1 \mu\text{g/ml}$ Cholera toxin zugesetzt. Dies führte zu einer 25-fachen Steigerung der Zellausbeute gegenüber der sofortigen Dissoziation.

Cholera toxin bewirkt eine Aktivierung der Adenylatzyklase und führt so zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Der Zusatz von cAMP-erhöhenden Agenzien hat sich als eine effektive Methode erwiesen, um das Fibroblastenwachstum in humanen Zellkulturen zu hemmen (ESPINOZA und WHARTON, 1986). Ähnliche Effekte wurden bei anderen Substanzen, die ebenfalls die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, wie Forskolin, Isobuthylmethylxanthine (IBMX) und 8-Bromo-cAMP, beobachtet (RUTKOWSKI et al., 1995). Auch zur Förderung der Proliferation von Schwannzellen der Ratte wurden diese Agenzien erfolgreich eingesetzt (RAFF et al., 1978).

Die maximale Schwanzzellproliferation erzielten RUTKOWSKI et al. (1992) mit dem gleichzeitigen Einsatz von Cholera-toxin, Forskolin und GGF. Mit dieser Methode konnte eine Zellausbeute von 2 bis 6×10^4 Zellen pro einem mg Ausgangsgewebe mit einem Schwanzzell-Anteil von 90% erreicht werden.

In Anlehnung an die Technik von MORRISSEY et al. (1991) kultivierten GUENARD et al. (1992) Schwanzzellen aus Nn. ischiadici von adulten Ratten. Am Tag nach der Dissoziation wurde das serumhaltige Medium durch ein Mitogen-Medium bestehend aus DMEM, FBS, Forskolin ($2 \mu\text{M}$) und Pituitary Extract (PEX) ($10 \mu\text{g/ml}$) ersetzt, in dem die Zellen weitere vier bis sechs Tage kultiviert wurden. Zur Identifizierung wurden die Schwanzzellen mit dem 217C-Antikörper, einem selektiven Marker für NGF-Rezeptoren und dem S-100-Antikörper markiert. Der Schwanzzell-Anteil betrug 97%.

MORRISSEY et al., (1995) kultivierten Schwanzzellen aus der Ratte und dem Menschen. Die Methodik orientierte sich an MORRISSEY et al. (1991). Den Ratten-Schwanzzellen wurde 2 mM Forskolin und 20 mg/ml PEX zugesetzt, die humanen Schwanzzellen wurden mit Forskolin ($1 \mu\text{M}$), Cholera-toxin (100 ng/ml) und Heregulin (10 nM) kultiviert.

Die Identifizierung der Schwanzzellen erfolgte durch die immunzytochemische Markierung des p75-NTR, die Reinheit der humanen Schwanzzell-Kulturen betrug 99%.

CASELLA et al. (1996) isolierten und vermehrten humane Schwanzzellen aus adulten peripheren Nerven (Nn. intercostales, N. phrenicus und Nerven des Plexus lumbosacralis). Die Kultivierung erfolgte nach der Reexplantier-Methode. Die Nervenexplantate wurden in serumhaltigem DMEM mit Zusatz von $2 \mu\text{M}$ Forskolin und 10 nM Heregulin inkubiert. Die Explantate wurden nach maximal 28 Tagen mit 0,05% Kollagenase und 0,25% Dispase über 18 Stunden verdaut. Nach der Dissoziation wuchsen die Schwanzzellen in Heregulin- und Forskolin-haltigem Medium auf Kollagen- und Laminin-beschichtetem Untergrund besser als auf Poly-L-Lysin.

2.6.1 Identifizierung von Schwanzzellen

Die Identifizierung von Schwanzzellen in vitro erfolgt häufig über die immunzytochemische Markierung des S-100-Proteins. Hierdurch lassen sich Schwanzzellen von anderen nicht-neuronalen Zellen, die in peripheren Nerven vorkommen, unterscheiden. S-100 ist eine Gruppe von recht kleinen Proteinen (Molekülmasse 9-13 kDa), die Kalzium-Ionen binden und in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration andere Proteine z.B. durch Phosphorylierungen aktivieren. Während andere Proteine ausfallen, bleiben S-100-Proteine in 100% gesättigter Ammoniumsulfatlösung löslich, von dieser Eigenschaft leitet sich ihr

Name ab. Von den S-100-Proteinen sind die Monomere α und β bekannt. Da die meisten S-100-Proteine als Dimere vorliegen, ergeben sich die Kombinationen $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ und $\beta\beta$.

Während die verschiedenen S-100-Proteine jeweils in vielen Geweben gefunden werden, ist die Expression von S-100 β v.a. auf das Nervensystem (Schwannzellen, Astrozyten) beschränkt.

Der zur Markierung von Schwannzellen sehr häufig eingesetzte S-100-Antikörper führte bei caninen Schwannzellen zu keiner spezifischen immunopositiven Reaktion (PAULS, 2003; PAULS et al., 2004). Er konnte folglich zur Identifizierung caniner Schwannzellen bisher nicht etabliert werden.

Ein weiteres Protein, das von Schwannzellen, aber von keinen anderen Zellen innerhalb des peripheren Nervs exprimiert wird, ist der p75-NTR (siehe 2.3.2.1.1). Im Gegensatz zur Detektion des S-100-Proteins erlaubte die Markierung dieses Rezeptors eine sichere Identifizierung von caninen Schwannzellen in vitro. In den Untersuchungen von PAULS (2003) konnte ein monoklonaler AK aus dem Kaninchen, der gegen den humanen p75-NTR gerichtet war, erfolgreich für canine Schwannzellen etabliert werden.

2.6.2 Methoden zur Maximierung der Reinheit von Schwannzell-Kulturen

2.6.2.1 Magnetisch aktivierte Zelltrennung (MACS)

Eine schnelle und effektive Methode individuelle Zellpopulationen aus einer gemischten Zellpopulation zu selektieren, ist die magnetisch aktivierte Zelltrennung (magnetic-activated cell separation, MACS). Spezifische Oberflächenantigene werden mit entsprechenden Antikörpern, die mit magnetischen Perlen konjugiert sind, markiert, anschließend erfolgt die Separation entlang einer magnetischen Säule, an der die konjugierten Zellen haften bleiben (MILTENYI et al., 1990).

VROEMEN und WEIDNER (2003) untersuchten die Effizienz der MACS zur Aufreinigung von Schwannzell-Kulturen aus Nervenbiopsien von adulten Ratten. Nach einer Woche Kultivierung wurden die Nervenexplantate dissoziiert. Durch Inkubation der Mischkultur mit dem spezifischen p75-NTR-Antikörper und einem magnetisch konjugierten Sekundär-Antikörper wurden die Schwannzellen separiert und 95% reine Schwannzell-Kulturen erzielt. Die Eliminierung der Fibroblasten mit Hilfe eines spezifischen α -Thy1 Antikörpers und einem magnetischen Zweitantikörper erbrachte in einer anderen Studie 99% reine Schwannzell-Kulturen, ebenfalls aus adulten Ratten (HAASTERT et al., 2006b)

2.6.2.2 Cold Jet

Eine schon ältere, relativ einfache Methode, um Schwanzzell-Kulturen mit einem hohen Reinheitsgrad zu gewinnen, stellt der „Cold Jet“ (JIRSOVA et al., 1997) dar. Diese Technik basiert auf der Beobachtung, dass Schwanzzellen und Fibroblasten unterschiedlich auf einen Kälteschock reagieren und unterschiedliche Adhäsionseigenschaften besitzen. Primäre Zellkulturen wurden aus fötalen Spinalganglien von Ratten gewonnen. Nach sechs Tagen wurden die Zellen erst behutsam mit 4°C kaltem PBS gewaschen und dann mit 4°C kaltem Medium überschichtet (Bottenstein-Sato-Medium). Durch drei- bis fünfmalige Triturierung lösten sich die Schwanzzellen und nur wenige Fibroblasten vom Schalenboden, sie konnten mit dem Medium in neue Kulturschalen überführt werden. Auf diese Weise ließen sich 95% reine Schwanzzell-Kulturen gewinnen, nach einem weiteren Durchgang lag die Reinheit der Kulturen bei ca. 99%. Das Bottenstein-Sato-Medium erwies sich als besonders geeignet, da die fötalen Schwanzzellen der Ratte in serumfreiem Medium wuchsen, die fötalen Fibroblasten jedoch nicht. Die beschriebene Methode konnte erfolgreich auf die Kultivierung von adulten Schwanzzellen des Menschen und der Ratte übertragen werden. Als serumfreies Medium wurde in diesen Studien allerdings ein Melanozyten-Wachstums-Medium eingesetzt (HAASTERT et al., 2006b; HAASTERT et al., 2007).

3 Zellen und Materialien

3.1 Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Laufe der eigenen Untersuchungen aus insgesamt 15 Nervenbiopsien von 9 verschiedenen Hunden isoliert und expandiert.

3.2 Lösungen für die Zellkultur

Lösungen	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MP Biomedicals, Eschwege
DNase	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Hyaluronidase	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Kollagen G	Biochrom AG, Berlin
Kollagenase	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Melanocyte Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg
Partricin	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Phosphate Buffered Salt Solution (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Poly-L-Lysin (PPL)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypsin-Neutralisierungslösung	PromoCell GmbH, Heidelberg

3.3 Zusammensetzungen verwendeter Kulturmedien und des Verdauungsansatzes

3.3.1 Erhaltungsmedium DMEM+

Komponente	Menge
Fetales Bovines Serum	5,0 ml
L-Glutamin	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	0,5 ml
Partricin	0,5 ml
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	ad 50 ml

3.3.2 Melanozyten-Wachstums-Medium + (MM+)

Komponente	Menge
Partricin	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	0,5 ml
Melanocyte Growth Medium	ad 50 ml

3.3.3 Selektivmedium nach J. Pauls

Komponente	Menge
Forskolin	50 μ l
PEX	5 μ l
Choleratoxin	10 μ g
Heregulin	10 nM
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	ad 50 ml

3.3.4 Einfriermedium

Komponente	Menge
DMEM+	9ml
DMSO	1ml

3.3.5 Verdauungsansatz zur Dissoziation der Nervenexplantate

Faktoren	Menge
Hyaluronidase 0,1%ig	300 µl
Kollagenase 0,1%ig	30 µl
DNase 0,1%ig	100 µl
Trypsin 0,1%ig	30 µl
PBS	ad 3 ml

3.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
Aceton	Biesterfeld, Dahlwitz-Hoppegarten
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Tabletten (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Eosinlösung	Eosin gelblich, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Epon-Glycidether	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formalin 37%ig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Essex, England
Glycerin-Gelatine	Th. Geyer Berlin GmbH, Berlin
Hämalaun nach Mayer (Hämatoxylin)	Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz
HCl (0,1 M)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Kaliumdichromatlösung	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumferrocyanid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Kanadabalsam	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Th. Geyer Berlin GmbH, Berlin
Methylenblau	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Chem Pur, Karlsruhe
Paraplast	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Propylenoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Proteinblockierungsreagenz, serumfrei	DAKO, Glostrup, Dänemark
SteptABComplex/HRP	DAKO Diagnostika, Hamburg
Trypanblaulösung	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
TRIS-Puffer	Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.5 Zusammensetzung verwendeter Gebrauchslösungen zur Erstellung der Semidünnschnitte

3.5.1 Cacodylat-Puffer

Faktoren	Menge
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 ml
HCl (0,1 M)	auf pH 7,2 - 7,4 einstellen

3.5.2 Karnovsky-Lösung

Faktoren	Menge
Paraformaldehyd	2,0%
Glutaraldehyd	2,5%
Cacodylatpuffer 0,1 M	ad 100%

3.6 Antikörper und Kontrollseren

3.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Human p75 pAb, monoklonal, aus dem Kaninchen	Promega, Madison, USA
Anti-Human Flk-1 (A-3), monoklonal, aus der Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-Human FGFR-3 (C-15), monoklonal, aus dem Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

3.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Ziege anti-Kaninchen, Biotin-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Schaf anti-Maus, Biotin-konjugiert	DAKO Diagnostika, Hamburg

3.6.3 Kontrollseren

Serum	Bezugsquelle
Mausserum (Negative Control)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Kaninchenserum (Negative Control)	DAKO, Glostrup, Dänemark

3.7 Proliferations-Assays

Assay	Bezugsquelle
BrdU-Assay	GE Healthcare Bio-Sciences GmbH, München
CellTiter Blue®, Resazurin-Resorufin-Assay	Promega, Madison, USA

3.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
6-Lochplatten (pro Vertiefung 34,6 mm)	Iwaki, Tokyo, Japan
24-Lochplatten (pro Vertiefung 15,5 mm)	Iwaki, Tokyo, Japan
96-Lochplatten	Iwaki, Tokyo, Japan
Beemkapseln	PLANO, Marburg
Deckgläser, rund, 12 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glaspetrischalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pinzetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Serologische Pipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Skalpellklingen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Superfrostobjektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co, Braunschweig
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.9

Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Absaugvorrichtung für Zellkulturen	NeoLab Migge Laborbedarf, Berlin
Feuchtkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Invertmikroskop	Zeiss, Jena
Kohlendioxid-Begasungsbrutschrank (Heraeus)	Heraeus Holding GmbH, Berlin
Mikrotom (Leica Histoslide 2000 R)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Hämozytometer	GLW, Würzburg
Pipette 2-20µl	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Pipette 20-200µl	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Pipette 100-1000µl	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
8-Kanalpipette 20-200µl	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Plattenreader FLUOROstar OPTIMA	BMG-Labtech, Jena
Reinraumwerkbank (BDK-S100)	Laborteam Schultheiss GmbH & Co. KG, München
Stickstofftank (RS SERIES)	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Wasserbad (1083)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge (Varifuge RF)	Heraeus Sepatech, Osterode

4 Methoden

4.1 Entnahme von Nervenbiopsien

Von insgesamt neun Hunden unterschiedlichen Alters wurden unmittelbar nach dem Tod Biopsien des N. radialis und des N. ischiadicus in einer Länge von ca. vier cm entnommen (Tabelle 1).

Die Entnahme der Nervenbiopsien und die Präparation des Nervengewebes erfolgten in geschlossenen Räumen und unter sterilen Bedingungen. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt.

	Rasse	Alter	Geschlecht	Todesursache	Material
1	Schäferhund	10 Jahre	weiblich	euthanasiert Osteosarkom	N. radialis
2	Terrier-Mischling	0 Tage	weiblich	bei der Geburt verstorben	N. radialis N. ischiadicus
3	Terrier-Mischling	0 Tage	männlich	bei der Geburt verstorben	N. radialis N. ischiadicus
4	Rottweiler	5 Jahre	weiblich	euthanasiert Diskopathie	N. radialis
5	Irischer Wolfshund	6 Jahre	männlich	euthanasiert Lymphom	N. radialis N. ischiadicus
6	Staffordshire- Mischling	0 Tage	weiblich	bei der Geburt verstorben	N. radialis N. ischiadicus
7	Flatcoated Retriever	11 Jahre	männlich	euthanasiert Osteosarkom	N. radialis N. ischiadicus
8	Golden Retriever	2 Jahre	männlich	euthanasiert Hydrocephalus	N. radialis N. ischiadicus
9	Schäferhund	8 Jahre	männlich	euthanasiert Diskopathie	N. radialis

Tabelle 1:

Übersicht über die neun Hunde, von denen unmittelbar nach dem Tod Biopsien des N. radialis und des N. ischiadicus in einer Länge von ca. vier cm entnommen wurden



Abb.1 (a und b):

- a) Zugang zum N. radialis durch Fenestration des Caput laterale des M. triceps brachii nach Entfernung der Haut im Bereich des Oberarmes
- b) Entnahme einer Biopsie des N. radialis

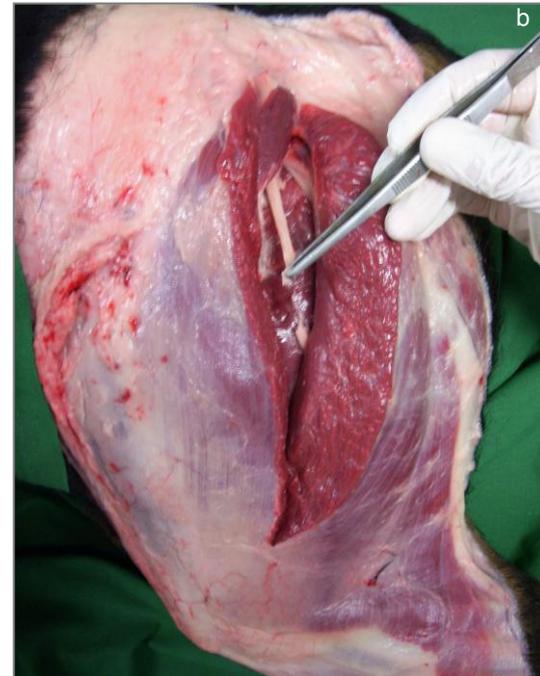


Abb. 2 (a und b):

- a) Zugang zum N. ischiadicus durch Fenestration des M. biceps femoris nach Entfernung der Haut im Bereich des Oberschenkels
- b) Entnahme einer Biopsie des N. ischiadicus

Bis auf drei Hunde, von denen nur Biopsien des N. radialis genommen werden konnten, wurden stets Parallelansätze beider Nerven durchgeführt. vier Hunde waren weiblich, fünf Hunde männlich. Das Alter der Tiere variierte von 0 Tagen (bei der Geburt verstorben) bis zu 11 Jahren, so dass sowohl Zellkulturen neonataler/juveniler als auch adulter Tiere gewonnen werden konnten.

Die Nervenbiopsien wurden nur von Tieren entnommen, die an keiner offensichtlichen peripheren Neuropathie oder systemischen Erkrankung bzw. Infektionskrankheit, die mit einer peripheren Neuropathie einhergehen könnte, litten.

4.2 Histologische Untersuchungen

4.2.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE)

Bei den in dieser Arbeit verwandten Gewebeproben handelte es sich zum einen um das auf die beschriebene Weise entnommene canine Nervengewebe und zum anderen um canine Sohlenballen als Kontrollgewebe. Die Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme in 5%igem Formalin fixiert. Zur Entwässerung durchliefen die Proben zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%), ein Alkohol-Xylol-Zwischenmedium und Xylol. Anschließend wurden sie manuell in Paraplast eingebettet. Die Aushärtung der Paraplastblöckchen fand bei 4° C über 24 Stunden im Kühlschrank statt.

Mit einem Mikrotom wurden von den angefertigten Paraplastblöckchen Gewebeschnitte mit einer Dicke von fünf µm hergestellt, auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und bei 37° C getrocknet. Die Paraplastschnitte dienten den histologischen und immunhistochemischen Färbungen, die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

Die HE-Färbung erfolgte nach einem in der Routinediagnostik verwendeten Standardprotokoll: Zunächst wurden die Schnitte zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (100%, 95%, 80%, 70%) und destilliertes Wasser rehydratisiert. Der nächste Schritt war die Kernfärbung. Hierfür wurden die Präparate für fünf Minuten in Hämalun nach Mayer gefärbt und anschließend in Leitungswasser gebläut. Dann erfolgte die Gegenfärbung der Präparate mit einer 0,1%igen wässrigen Eosinlösung für fünf Minuten. Nach der Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 100%) und Xylol wurden die Schnitte mit Kanadabalsam eingedeckt.

4.2.2 Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Färbung

Von jedem Nerven wurden aus einer präparierten Nervenfasern Semidünnschnitte zur Darstellung der Feinstruktur angefertigt. Dazu wurden die präparierten Fasern über Nacht in Karnovsky-Lösung bei 4°C eingelegt. Am nächsten Tag folgte nach einem 30-minütigen Waschen der Proben in 0,1 M Cacodylat-Puffer die Fixierung und Kontrastierung mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrocyanid (in 0,1 M Cacodylat-Puffer) für zwei Stunden bei 4°C. Nach erneutem Spülen der Fasern für ca. zehn Minuten in 0,1 M Cacodylat-Puffer wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50%, 70%, 80%, 90% und 100% und Propylenoxid jeweils 15 Minuten dehydratisiert. Dann folgte die Einbettung in Epon, hierfür wurden die Proben in einem Propylen-Epon-Gemisch (1:1) für zwei Stunden und anschließend in reinem Epon über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. In Beemkapseln eingebettet wurden die Proben am nächsten Tag in frischem Epon bei 60°C polymerisiert. Von den auspolymerisierten Epon-Blöckchen wurden mit einem Ultramikrotom ein µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

Zur Darstellung der Markscheiden wurde die Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Methode, eine spezielle, sehr empfindliche Markscheidenfärbung nach O. SCHULTZE (1968), durchgeführt. Dazu wurden feine Nervenfasern nach der Präparation in 4%igem Formalin über Nacht fixiert und am nächsten Tag dreimal in destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte eine Nachfixierung und Kontrastierung mit 1%iger Osmiumtetroxidlösung. Anschließend wurden das Osmiumtetroxid aus den Proben in 1%iger Kaliumdichromatlösung über 24 Stunden ausgewaschen und die Fasern in 50%igen Alkohol übertragen. Nach 30 Minuten wurden die Nerven dann für drei Tage in eine 0,5%ige Hämatoxylinlösung bei Raumtemperatur eingelegt. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Nervenfasern in 70%igem Alkohol für jeweils zehn Minuten und eine Dehydratisierung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100% und Propylenoxid). Die Einbettung in Epon erfolgte in der Weise, wie sie bei der Erstellung von Semidünnschnitten beschrieben wurde.

4.3 Isolierung, Kultivierung und Purifikation caniner Schwanzzellen

4.3.1 Präparation der Nervenbiopsien

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Nervenbiopsien in steriles, gekühltes (4°C) PBS überführt und gekühlt zügig zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert.

Zur Präparation wurden die Nerven in Glaspetrischalen gegeben, mit HBSS (4°C) überschichtet und unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von feinen Pinzetten und Kanülen unter dem Lichtmikroskop bei Lupenvergrößerung weitestgehend vom Bindegewebe befreit und mit einer Skalpellklinge in ca. ein bis zwei mm große Explantate zerteilt.



Abb. 3 (a bis d):

- a: Die Nervenbiopsie wird in HBSS überführt
- b: Entfernung des Epineuriums
- c: Zerteilung der präparierten Nervenfasern in ca. ein bis zwei mm große Explantate
- d: Verteilung der Explantate auf die Vertiefungen einer kollagenbeschichteten

4.3.2 Explantieren der Nervenbiopsien

Die Nervenexplantate einer jeden Nervenbiopsie wurden auf die Vertiefungen einer kollagenbeschichteten 6-Lochplatte in den Konzentrationen 10 bis 15 Explantate pro Vertiefung verteilt. Für die Beschichtung wurde ein ml einer 2:1-Lösung aus destilliertem Wasser und Kollagen in jede Vertiefung gegeben und diese 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und die Beschichtung zweimal mit

PBS gewaschen. Um die Anheftung der Explantate am kollagenbeschichteten Boden zu gewährleisten, wurden diese erst zehn Minuten nach Überführung in die Platten vorsichtig mit einem ml Medium (DMEM+) überschichtet.

Vergleichend wurde außerdem die Kultivierung der Explantate in einem serumfreien Melanozyten-Wachstums-Medium (MM+) erprobt.

Die mit dem Medium überschichteten Explantate wurden unter Standardbedingungen bei 37,0°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

4.3.3 Passagieren der Explantate

Im wöchentlichen Abstand und nachdem sich um die Explantate ein konfluenter Monolayer aus migrierenden Zellen gebildet hatte, wurden diese in neue kollagenbeschichtete Vertiefungen von 6-Loch-Platten umgesetzt und wiederum nach zehn Minuten vorsichtig mit einem ml Medium überschichtet. Die nach dem ersten und nach dem zweiten Umsetzen der Explantate ausgewanderten Zellkulturen wurden erhalten und gemäß der Beschreibung unter 4.3.6 aufgereinigt.

In Anlehnung an die Isolierung humaner Schwanzzellen wurden die Explantate eine Woche nach dem zweiten Umsetzen, also nach 21 Tagen, dissoziiert.

4.3.4 Dissoziation der Explantate

Zur Dissoziation wurden alle Explantate einer Vertiefung in ein Zentrifugenröhrchen mit drei ml Verdauungsansatz, bestehend aus Hyaluronidase (0,1%ig), Kollagenase (0,1%ig), DNase (0,1%ig), Trypsin (0,1%ig) und PBS gegeben und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Alle 15 Minuten erfolgte ein manuelles leichtes Schütteln der Röhrchen. Nach zwei Stunden wurden die Ansätze bei 800 rpm zehn Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Röhrchen erneut bei 800 rpm für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Abschließend wurden die Zellen eines Röhrchens mit einem ml DMEM+ oder MM+ durchmischt und in eine kollagenbeschichtete Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät.

4.3.5 Trypsinierung der aus den Explantaten gewonnenen Zellen

Vor der Trypsinierung wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 0,5 ml Trypsin pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und dieses ca. eine Minute zur Einwirkung überlassen. Dabei wurde der Kulturplattenboden von unten mit den Fingern beklopft und unter dem Mikroskop beobachtet, wie sich die aufgrund ihrer Morphologie identifizierten Schwanzzellen vom Boden lösten, während der größte Teil der morphologisch als Fibroblasten identifizierten Zellen noch haften blieb. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion gestoppt. Dies geschah bei Kultivierung der Zellen in DMEM+ durch die Zugabe von 0,5 ml Medium bzw. nach erfolgter Kultivierung im serumfreien MM+ durch die Zugabe von 0,5 ml Trypsin-Neutralisierungslösung pro Vertiefung. Die vom Zellkulturschalenboden abgelösten Zellen wurden mit der Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 1050 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen dann wieder in DMEM+ bzw. MM+ suspendiert und in neue kollagenbeschichtete Kulturschalen ausgesät. Nach drei bis zehn Tagen wurden die Zellen erneut kurzzeitig trypsinisiert. Durch wiederholte kurzzeitige Trypsinierungen wurden aufgereinigte canine Schwanzzell-Kulturen gewonnen.

4.3.6 Kryokonservierung der aus den Explantaten gewonnenen Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann mit 0,5 ml Trypsin vom Kulturschalenboden gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem das Röhrchen bei 1050 rpm fünf Minuten zentrifugiert worden war, wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen im Einfriermedium (siehe 3.3.4) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einem Styropor-Behälter langsam auf -70°C herunter gekühlt und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

4.4 Immunzytochemischer Nachweis von p75-NTR, VEGFR-2 und FGFR-3

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Zellen in mit kollagenbeschichteten Glasplättchen bestückten Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät und zehn Tage kultiviert.

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann folgte eine fünf Minuten dauernde Fixierung mit gekühltem Methanol-Aceton (1:1) und anschließender Entfernung der Fixierlösung, danach fand ein erneutes zweimaliges

Waschen mit PBS statt. Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase durch die Inkubation der Zellen mit 0,3% H₂O₂ in Methanol über fünf Minuten blockiert, anschließend erfolgte wieder ein zweimaliges Spülen der Zellen mit PBS. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die Zellen anschließend für 20 Minuten mit einem Proteinblocker bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Proteinblockers erfolgte eine Überschichtung der Zellen mit 150 µl des jeweiligen Primärantikörpers (anti-p75-NTR, anti-VEGFR-2 oder anti-FGFR-3).

Als optimale Verdünnung des monoklonalen, gegen den humanen p75-NTR gerichteten Antikörper aus dem Kaninchen zur immunzytochemischen Markierung caniner Schwanzzellen, wird eine Konzentration von 1:150 angegeben (PAULS, 2003; PAULS et al., 2004). Aus diesem Grund wurden im ersten Versuchsdurchgang für den genannten Primärantikörper die Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 gewählt. Hierbei war eine immunopositive Reaktion aller Zellen zu beobachten. Um eine Unterscheidung zwischen Schwanzzellen und Fibroblasten zu gewährleisten, erfolgte in weiteren Versuchen eine höhere Verdünnung des AK auf die Konzentrationen 1:400, 1:800, 1:1000, 1:1500 und 1:2000. Eine eindeutige, selektive Markierung der Schwanzzellen wurde mit der Verdünnung 1: 1500 erzielt (Tabelle 2).

Der monoklonale humane VEGFR-2-Antikörper aus der Maus kam an den caninen Schwanzzellen in den Konzentrationen 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 zum Einsatz. Da auch bei einer Verdünnung von 1:400 eine deutliche immunopositive Reaktion der Zellen zu erkennen war, wurde diese Konzentration als ausreichend angesehen (Tabelle 2).

In den Konzentrationen 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 wurde der humane polyklonale FGFR-3-Antikörper aus dem Kaninchen eingesetzt. Auch die höchste Verdünnung des Antikörpers bewirkte eine deutliche immunopositive Reaktion der Schwanzzellen. Daher wurde diese für die Untersuchungen verwendet (Tabelle 2).

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-Human p75 pAb, monoklonal, aus dem Kaninchen	1:1500
Anti-Human Flk-1 (A-3), monoklonal, aus der Maus	1:400
Anti-Human FGFR-3 (C-15), polyklonal, aus dem Kaninchen	1:400

Tabelle 2:

Auflistung der verwendeten Primärantikörper (anti-p75-NTR, anti-VEGFR-2 und anti-FGFR-3) und ihrer eingesetzten Konzentrationen bei den immunzytochemischen Untersuchungen in vitro

Die Zellen wurden in einer feuchten Kammer bei 4°C unter Lichtausschluss über 24 Stunden mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden diese dreimal mit PBS gewaschen

und dann mit dem jeweiligen biotinylierten Sekundärantikörper (150 µl pro Vertiefung) inkubiert.

Die Sekundärantikörperverdünnung betrug in allen Fällen 1:200 (Tabelle 3).

Sekundärantikörper	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:200
Schaf anti-Maus, biotinyliert	1:200

Tabelle 3:

Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper und ihrer eingesetzten Konzentrationen bei den immunzytochemischen Untersuchungen in vitro

Nach 30 Minuten Einwirkzeit bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von 150 µl Streptavidin-Biotin-Komplex pro Vertiefung mit wiederum 30 Minuten Einwirkzeit. Es folgten zwei weitere PBS-Waschungen und die Reaktion wurde mit Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Der Ansatz hierfür entstand durch Vermischung von 10 mg DAB mit 50 ml TRIS-Puffer (pH 7,6) und 25 µl H₂O₂ (30%ig). Eine Überprüfung des Endes der Reaktion fand durch lichtmikroskopische Kontrolle nach fünf Minuten statt. Im Anschluss wurden die Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer farblich kontrastiert.

Zum Abschluss wurden die Zellen einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit einer Pinzette vorsichtig aus der Kulturschale abgehoben und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt. Als Einbettmedium für die bewachsenen Glasplättchen diente Glycerin-Gelatine.

Parallel zu den immunzytochemischen Untersuchungen wurden zur Überprüfung der eindeutigen Bindung des Sekundärantikörpers stets Kontrollen des Detektionssystems durchgeführt. Dazu wurden die Zellen anstelle des Primärantikörpers mit Kaninchenserum bzw. Mausserum oder PBS inkubiert. Die Zellen zeigten keine unspezifischen Bindungsreaktionen (Abb. 4 bis 9).

Neben den Untersuchungen in vitro wurden die Detektionssysteme (anti-p75-NTR, anti-VEGFR-2, anti-FGFR-3) an histologischen Schnitten von caninem Nervengewebe und caninem Sohlenballen als Positivkontrolle erprobt.

An den Gewebeschnitten wurden die Primärantikörper in den Verdünnungen 1:100 und 1:200 eingesetzt (Tabelle 4).

Die Sekundärantikörper kamen wieder in der Konzentration 1:200 zum Einsatz (Tabelle 5).

Alle Konzentrationen führten zu einer eindeutigen Markierung.

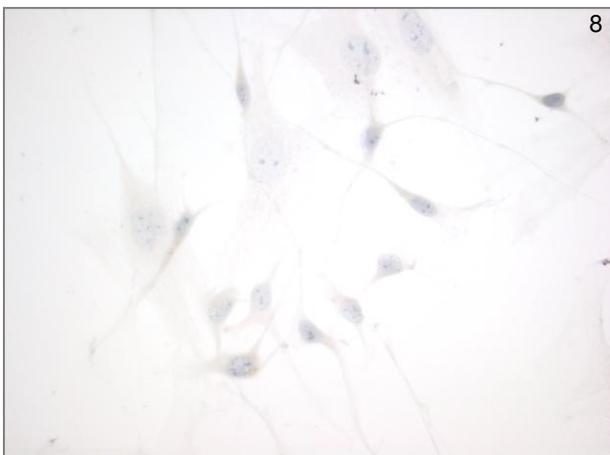
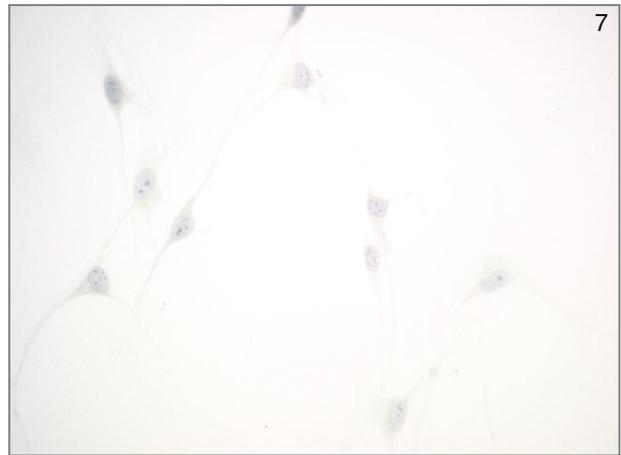
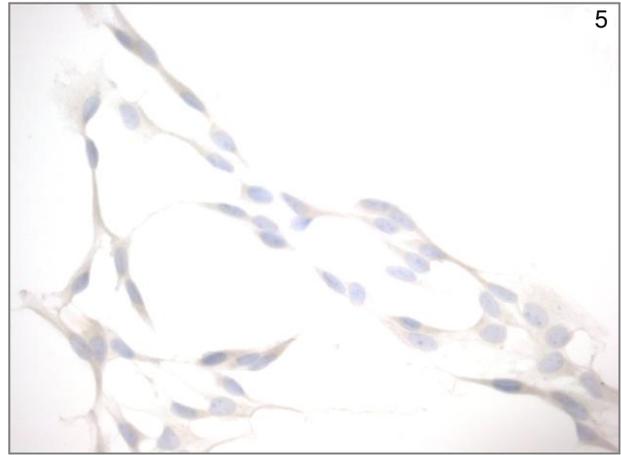


Abb. 4 bis 9:

Abb. 4/5: Kontrollen des p75-NTR-AK an caninen Schwanzzellen, Lichtmikroskop 400 x, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 4) bzw. PBS (Abb. 5) anstelle des Primärantikörpers

Abb. 6/7: Kontrollen des VEGFR-2-AK an caninen Schwanzzellen, Lichtmikroskop 400 x, Einsatz von Mausserum (Abb. 6) bzw. PBS (Abb. 7) anstelle des Primärantikörpers

Abb. 8/9: Kontrollen des FGFR-3-AK an caninen Schwanzzellen, Lichtmikroskop 400 x, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 8) bzw. PBS (Abb. 9) anstelle des Primärantikörpers

In Abb.4 und 5 zeigen die Zellen minimale unspezifische Bindungsreaktionen, in den Abb. 6 bis 9 sind die Zellen frei von unspezifischen Reaktionen.

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-Human p75 pAb, monoklonal, aus dem Kaninchen	1:100, 1:200
Anti-Human Flk-1 (A-3), monoklonal, aus der Maus	1:100, 1:200
Anti-Human FGFR-3 (C-15), polyklonal, aus dem Kaninchen	1:100, 1:200

Tabelle 4:

Auflistung der verwendeten Primärantikörper und ihrer eingesetzten Konzentrationen bei den immunhistochemischen Untersuchungen an caninem Nervengewebe und caninem Sohlenballen

Sekundärantikörper	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:200
Schaf anti-Maus, biotinyliert	1:200

Tabelle 5:

Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper und ihrer eingesetzten Konzentrationen bei den immunhistochemischen Untersuchungen an caninem Nervengewebe und caninem Sohlenballen

Zur Kontrolle des Detektionsystems wurden die Gewebeschnitte von Nerv und Sohlenballen parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen anstelle des Primärantikörpers mit Kaninchenserum bzw. Mausserum oder PBS inkubiert.

Die Kontrollen der Gewebeschnitte zeigten keine unspezifischen Reaktionen (Abb. 10 bis 15).

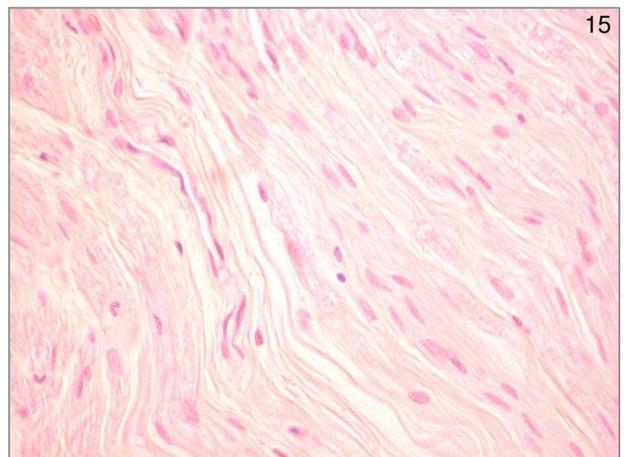
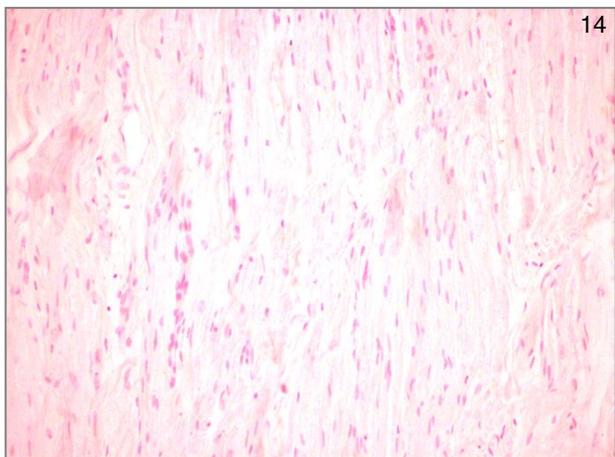
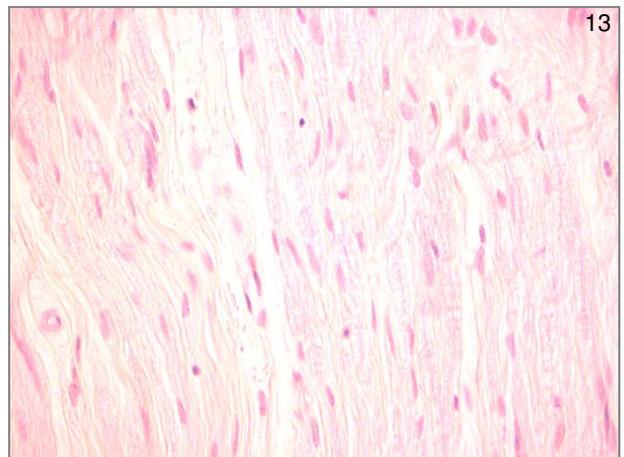
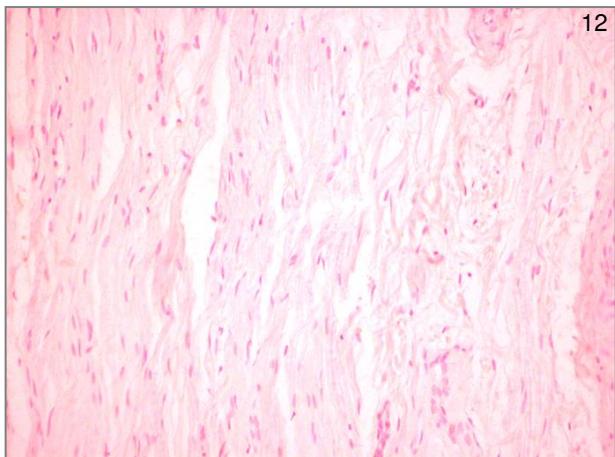
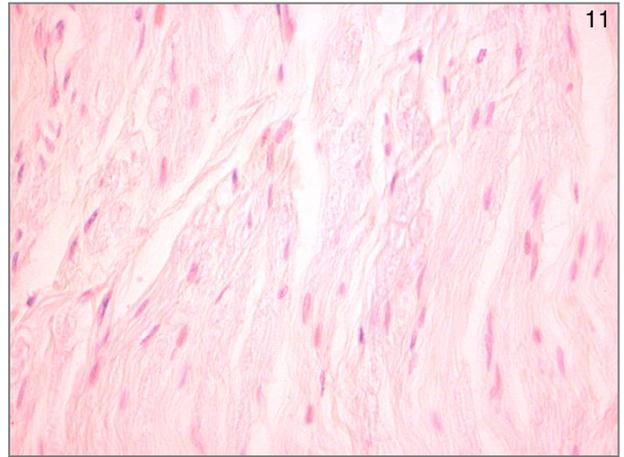
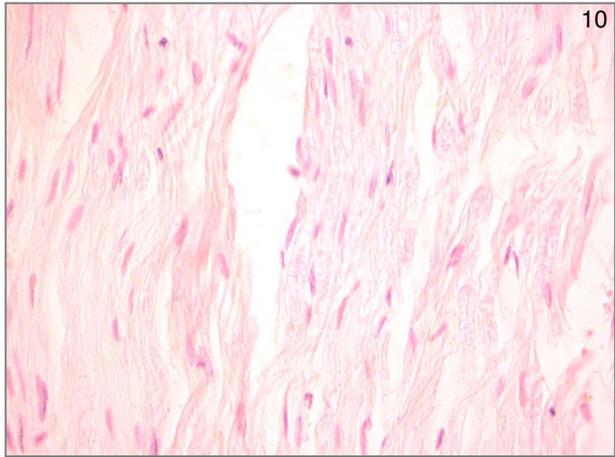


Abb. 10 bis 15:

Abb. 10/11: Kontrollen des p75-NTR-AK am histologischen Längsschnitt caninen Nervengewebes, Lichtmikroskop 400 x, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 10) bzw. PBS (Abb. 11) anstelle des Primärantikörpers

Abb. 12/13: Kontrollen des VEGFR-2-AK am histologischen Längsschnitt caninen Nervengewebes, Einsatz von Mauserum (Abb. 12), Lichtmikroskop 200 x oder PBS (Abb. 13), Lichtmikroskop 400 x anstelle des Primärantikörpers

Abb. 14/15: Kontrollen des FGFR-3-AK am histologischen Längsschnitt caninen Nervengewebes, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 14), Lichtmikroskop 200 x oder PBS (Abb. 15), Lichtmikroskop 400 x anstelle des Primärantikörpers

Die Zellen zeigen keine unspezifischen Bindungsreaktionen.

Die immunhistochemische Markierung caniner Schwanzzellen durch den p75-NTR-Antikörper wurde am Nervenschnitt am Semidünnschnitt der caninen Nervenfasern erprobt. Bei den immunzytochemischen Untersuchungen an den Zellen hatte sich die Verdünnung des Primärantikörpers von 1:1500 bewährt, aus diesem Grund wurde diese Verdünnung auch für die Untersuchungen an den Semidünnschnitten gewählt. Der Sekundärantikörper kam wieder in der Konzentration 1:200 zum Einsatz.

Auch hier wurden parallel zu den immunzytochemischen Untersuchungen Kontrollen des Detektionssystems durchgeführt und die Semidünnschnitte anstelle des Primärantikörpers mit Kaninchenserum oder PBS inkubiert.

Die Kontrollen zeigten geringgradige unspezifische extrazelluläre Reaktionen, aber keine unspezifischen zellulären Reaktionen (Abb. 16 und 17).

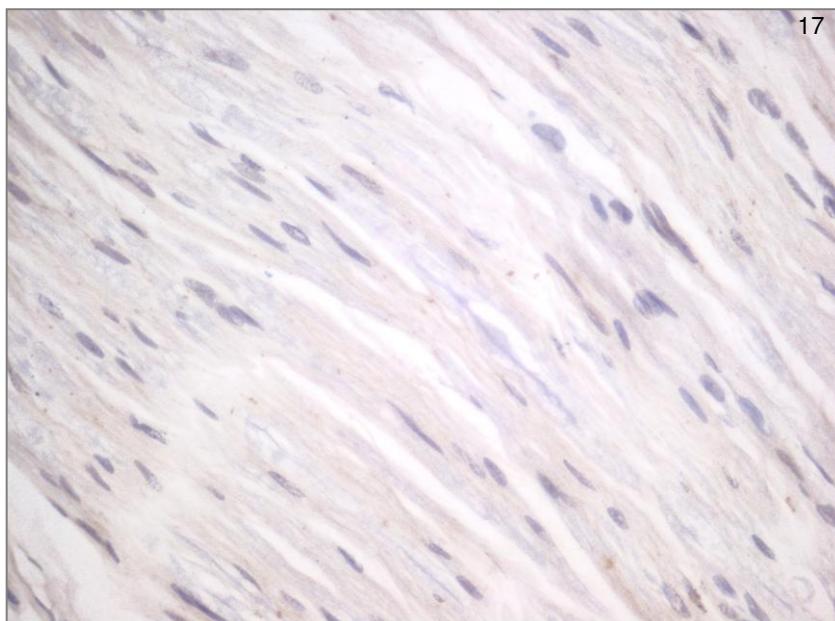
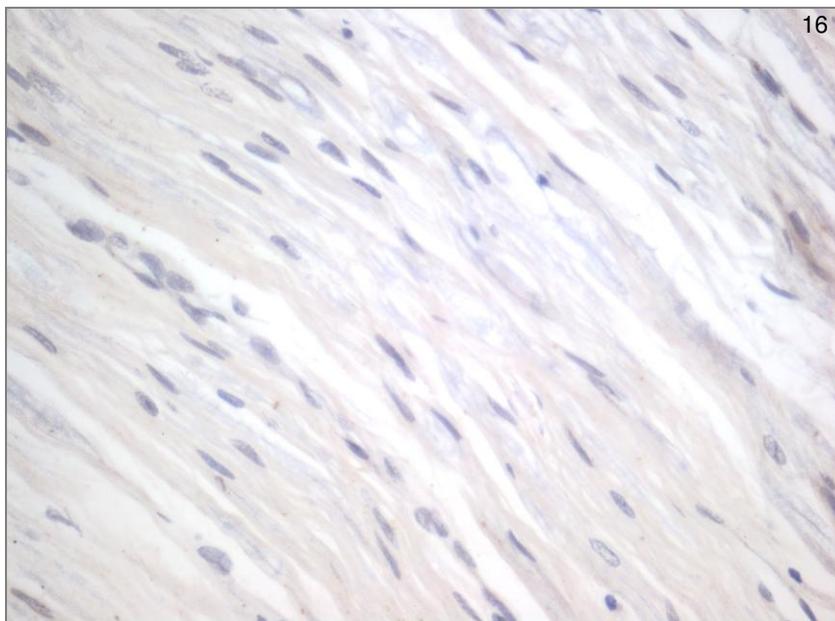


Abb. 16/17:
Kontrollen des p75-NTR-AK an Semidünnschnitten einer Nervenfasern des caninen N. radialis, Lichtmikroskop 400 x, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 16) bzw. PBS (Abb. 17) anstelle des Primärantikörpers, keine unspezifischen zelluläre Bindungsreaktionen

Beim Einsatz des p75-NTR-Antikörpers am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens wurde eine spezifische immunopositive Reaktion der Gefäße sowie eine unspezifische Färbung der Keratinozyten in der Epidermis deutlich (Abb. 18).

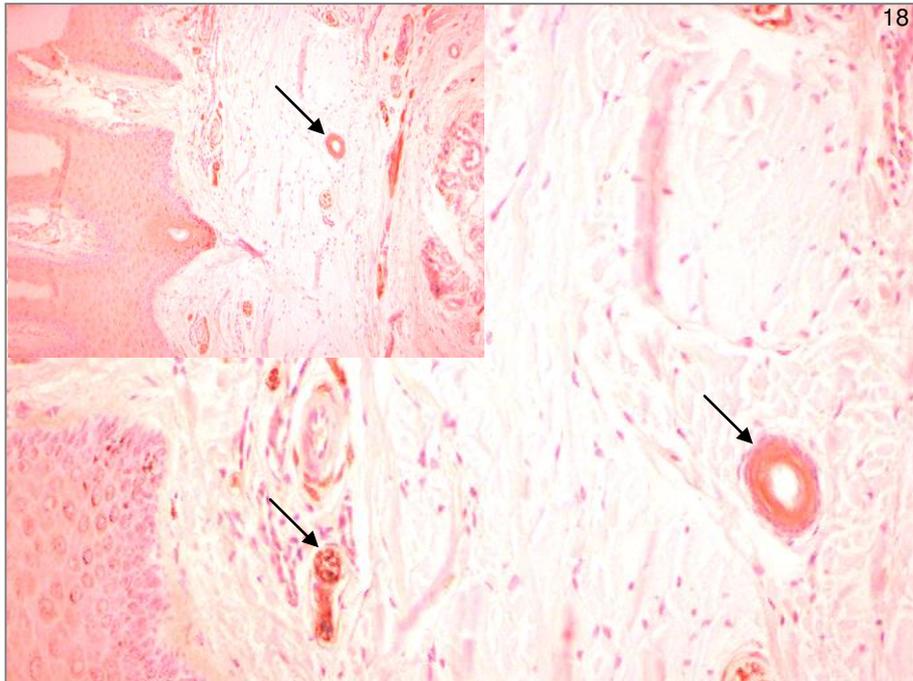


Abb. 18: Histologischer Schnitt eines caninen Sohlenballens, immunhistochemische Markierung des p75-NTR, spezifische immunopositive Reaktion der Gefäße und der Keratinozyten der Epidermis (Pfeile), Konzentration des Primärantikörpers 1:200, Lichtmikroskop 100 x und 200 x

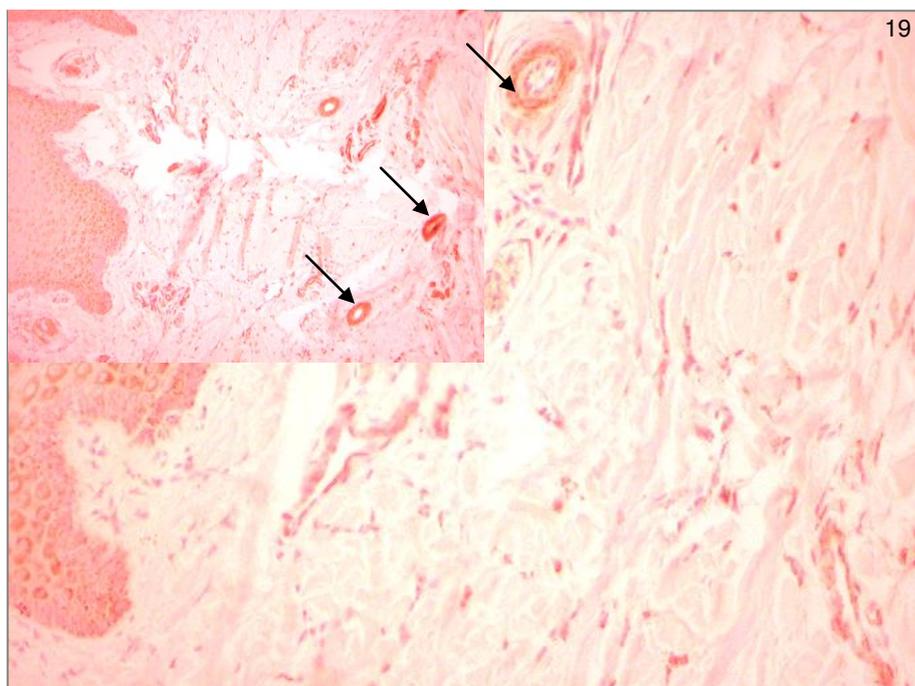


Abb. 19: Histologischer Schnitt eines caninen Sohlenballens, immunzytochemische Markierung des VEGFR-2, spezifische immunopositive Reaktion der Endothelzellen und Keratinozyten, Konzentration des Primärantikörpers 1:200, Lichtmikroskop 100 x und 200 x

Mittels VEGFR-2-Antikörper wurde eine spezifische immunopositive Reaktion der Endothelzellen der Gefäße ersichtlich, auch die Keratinozyten der Epidermis wurden markiert (Abb. 19).

Der Einsatz des FGFR-3-Antikörpers führt zu einer spezifischen Markierung der Epidermis und der in der Lederhaut gelegenen merokrinen Drüsen (Abb. 20).

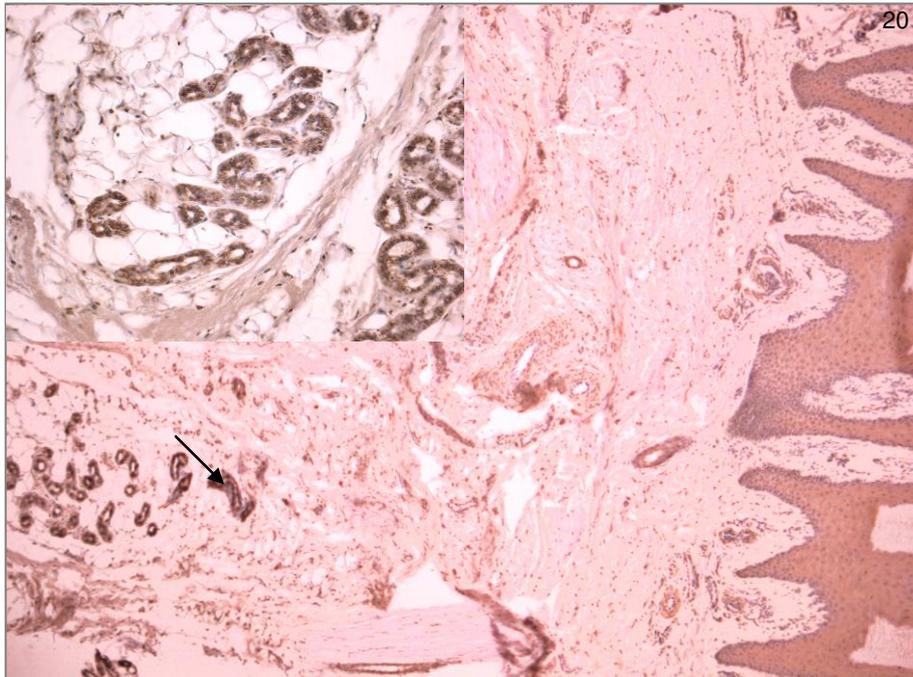


Abb. 20:
Histologischer Schnitt eines caninen Sohlenballens, anti-FGFR-3-Markierung, immunopositive Reaktion der Gefäße, der merokrinen Drüsen in der Dermis und der Keratinozyten in der Epidermis, Konzentration des Primärantikörpers 1:200, Lichtmikroskop 50 x und 100 x

Auch am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens erfolgten Kontrollen des Detektionsystems, bei denen anstelle des Primärantikörpers Mausserum bzw. Kaninchenserum oder PBS eingesetzt wurden, die Kontrolle zeigte keine unspezifischen Bindungen (Abb. 21 bis 26).

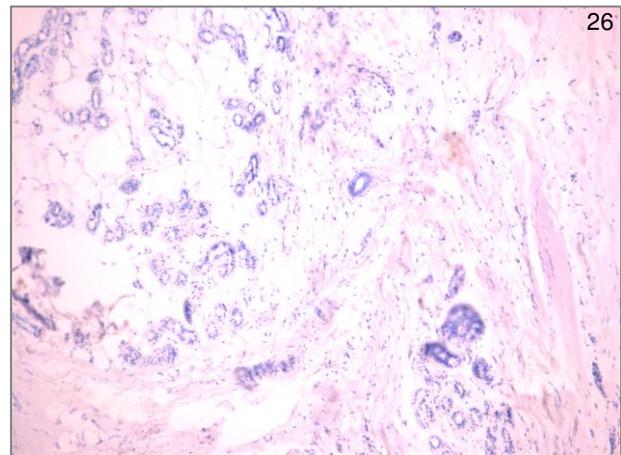
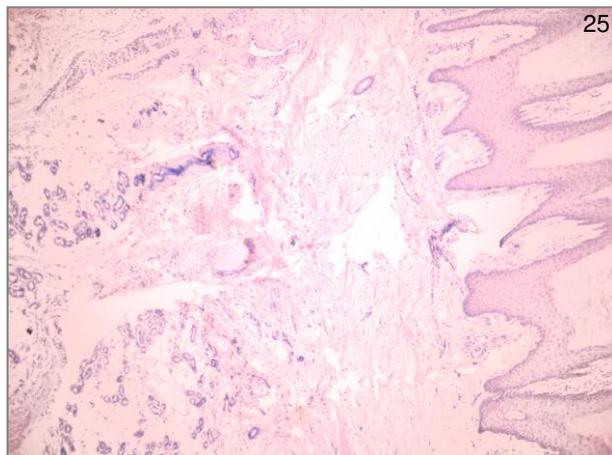
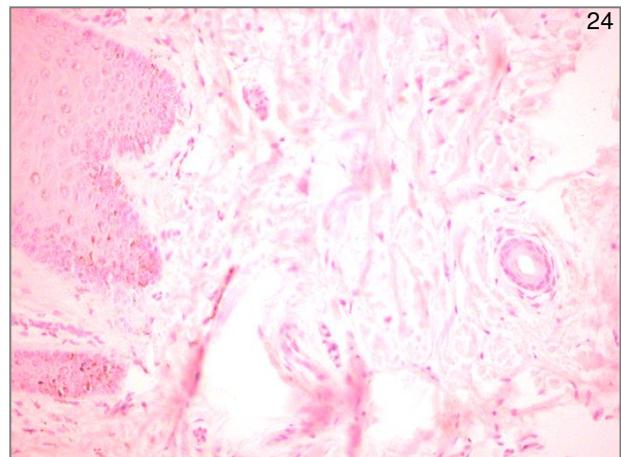
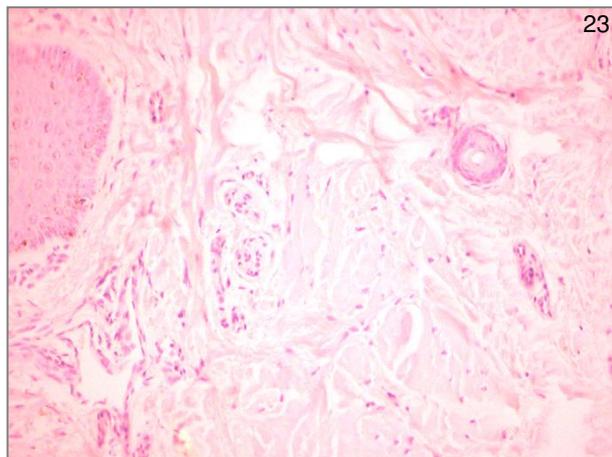
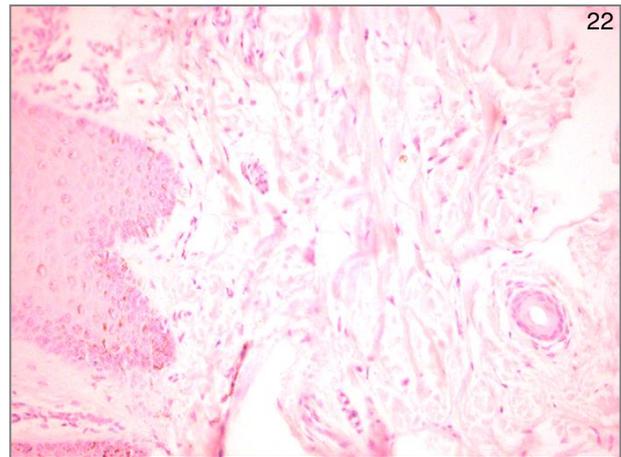
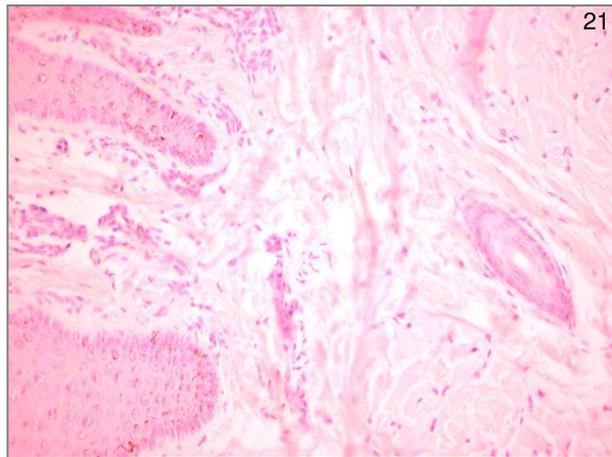


Abb. 21 bis 26:

Abb. 21/22: Kontrollen des p75-NTR-AK am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens, Lichtmikroskop 200 x, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 21) oder PBS (Abb. 22) anstelle des Primärantikörpers

Abb. 23/24: Kontrollen des VEGFR-2-AK am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens, Lichtmikroskop 200 x, Einsatz von Mausserum (Abb. 23) oder PBS (Abb. 24) anstelle des Primärantikörpers

Abb. 25/26: Kontrollen des FGFR-3-AK am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens, Lichtmikroskop 100 x, Einsatz von Kaninchenserum (Abb. 25) bzw. PBS (Abb. 26) anstelle des Primärantikörpers

Die Kontrollen zeigen keine unspezifischen Bindungen.

4.5 Quantitative Analyse der proliferativen Effekte von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen

Die quantitativen Analysen wurden in den aufgereinigten und kryokonservierten Kulturen durchgeführt. Als Wachstumsfaktoren wurden die proangiogenen Faktoren VEGF und FGF-2 gewählt. Die quantitative Analyse ihrer proliferativen Effekte erfolgte mit Hilfe verschiedener Proliferations-Assays, die nachstehend genauer beschrieben werden.

4.5.1 Prinzipien der verwendeten Proliferations-Assays

4.5.1.1 BrdU-Assay

Zellproliferation erfolgt durch Zellteilung, wobei grundsätzlich der Teilung von Zellen die Replikation ihrer DNA vorausgeht. Die Messung neu synthetisierter DNA gibt deshalb Auskunft über die Zellproliferation.

Zur DNA-Synthese benötigt die Zelle verschiedene Einzelbausteine wie z.B. das Nukleotid Thymidin. In diesem Assay wird den Zellen 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) mit dem Medium angeboten, welches nun während der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird.

Das in den eigenen Untersuchungen verwendete BrdU-Assay enthält alle im Folgenden angegebenen Lösungen. Nach Inkubation mit 10 µM BrdU pro Vertiefung bei 37° C im Brutschrank wurden die Zellen 24 Stunden später durch Zugabe von 200 µl Fixierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und denaturiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Blockpuffer (200 µl/Vertiefung). Dann wurde der Puffer entfernt, 100 µl 1:100 verdünnte Antikörperlösung auf die Zellen gegeben und diese 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der verwendete Antikörper ist Peroxidase-konjugiert und markiert spezifisch das in die DNA eingebaute BrdU. Nach dreimaligem Waschen mit Pufferlösung wurden 100 µl Substrat (Tetramethylbenzidin (TMB)) zugegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur abgewartet, bis sich eine hellblaue Färbung entwickelt hatte. Die Reduktion des Tetramethylbenzidins wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure beendet. Durch die Schwefelsäure schlug die Farbe in ein helles gelb um, die Absorption wurde innerhalb von fünf Minuten im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und als optische Dichte (OD) angegeben, welche sich unter standardisierten Bedingungen proportional zur Zellzahl verhält.

Um aus den gemessenen OD-Werten auf die Zellzahl schließen zu können, wurde ein Standard erstellt. Hierfür wurden zunächst in einem Vorversuch per Neubauer-Zählkammer gezählte Zellen in der Konzentration 1000, 2000, 3000, 4000 und 5000 Zellen/ml ausgesät. Nach 12 Stunden wurden diese Zellen wieder abtrypsiniert und erneut per Neubauer-Zählkammer gezählt. Die ermittelten Zellzahlen waren annähernd unverändert. Dieser Vorversuch diente der Überprüfung, ob die ausgesäte Zellzahl mit der 12 Stunden später mit dem BrdU-Assay zu bestimmenden Zellzahl gleichzusetzen ist.

Zur Erstellung des Standards wurden die caninen Schwanzzellen nach der Aussaat drei Tage in DMEM+ kultiviert. Dann wurden dem Medium BrdU zugegeben und die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in den Konzentrationen 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, bzw. 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 und 9000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät. Diesen Zellen wurde unter Zugabe von DMEM+ über 12 Stunden die Möglichkeit gegeben, am Kulturschalenboden zu haften. Danach wurde das Assay nach den Angaben des Herstellers vollendet und bei 450 nm die OD bestimmt.

Da diese Versuche im Plattenreader als Standard-Messungen durchgeführt wurden, konnte aus den gemessenen Werten der optischen Dichte und den dazu gehörigen bekannten Standardkonzentrationen der ausgesäten Zellen einer gemessenen OD eine errechnete Zellzahl zugeordnet werden.

Der Zusammenhang zwischen der Standardkonzentration (Concentration) und der gemessenen OD ist in der folgenden Grafik dargestellt. Der Korrelationskoeffizient dieser beiden Variablen beträgt $r = 0,946821$.

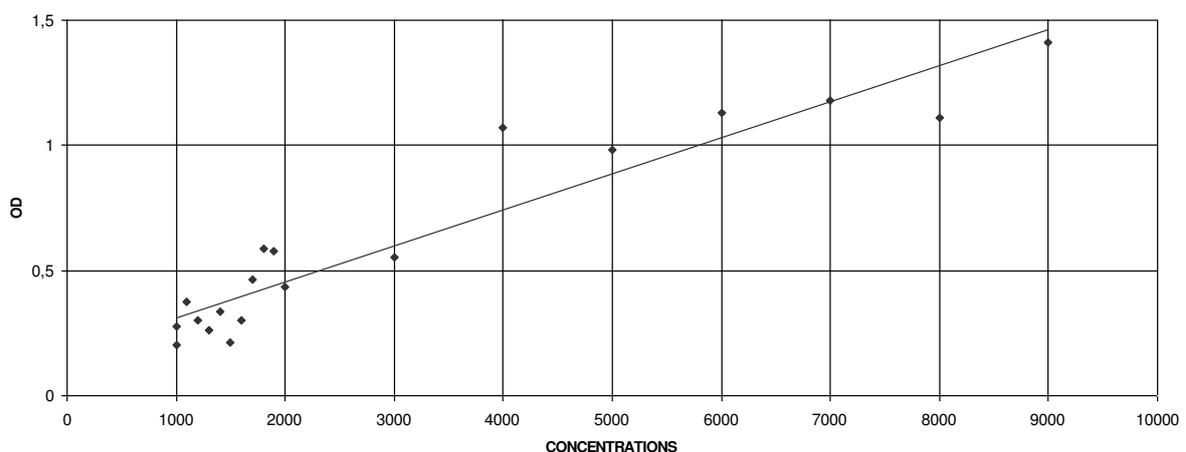


Diagramm 1:

Auf der Y-Achse ist die OD (optische Dichte) aufgetragen, die X-Achse gibt die Standardkonzentration (Concentration), also die Zellzahl an, der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,946821$.

Prinzipiell schwankt der Korrelationskoeffizient zwischen -1 und 1 . Bei einem Wert von $+1$ (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen.

Wenn $r = 1$, liegen alle Punkte auf einer steigenden Geraden (die Steigung ist beliebig, aber positiv). Wenn $r = -1$, liegen sie auf einer fallenden Geraden (Steigung beliebig, negativ).

Wenn r nahe bei 1 liegt (z.B. $r = 0.9$), liegen alle Punkte eng um eine steigende Gerade.

Wenn r nahe bei -1 liegt (z.B. $r = -0.9$), liegen alle Punkte eng um eine fallende Gerade.

Standardkonzentration (in 1000er Schritten)	errechnete Zellzahl
1000	759,358
2000	1829,224
3000	2679,827
4000	6288,971
5000	5656,240
6000	6688,518
7000	7036,555
8000	6556,960
9000	8641,005

Standardkonzentration (in 100er Schritten)	errechnete Zellzahl
1000	240,783
1100	1417,845
1200	909,014
1300	635,457
1400	1172,826
1500	306,910
1600	899,965
1700	2045,007
1800	2897,002
1900	2838,532

Tabelle 6:

Gegenüberstellung der Standardkonzentrationen (per Neubauer-Zählkammer ausgezählte Zellzahl) und den zugehörigen aus den OD-Werten des BrdU-Assay errechneten Zellzahlen

Die bei der Etablierung des Standards für den BrdU-Assay ausgesäten Standardkonzentrationen und die daraus errechnete Zellzahlen sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Dieser Standard wurde in allen unter Anwendung des BrdU-Assay durchgeführten Versuchen transferiert, um in den unterschiedlichen Proliferations-Versuchen aus den gemessenen OD-Werten die entsprechenden Zellzahlen zu errechnen.

4.5.1.2 Resazurin-Resorufin-Assay (CellTiter-Blue-Assay ®)

Grundlage dieses Proliferations-Assay ist eine Redox-Reaktion. Resazurin ist ein ungiftiger, wasserlöslicher, blauer Farbstoff mit niedriger intrinsischer Fluoreszenz, der von lebenden Zellen aufgenommen und durch die mitochondriale Laktat-Dehydrogenase irreversibel zum pinkfarbenen Resorufin reduziert wird, welches eine hohe Fluoreszenz besitzt.

Die Menge des gemessenen Resorufins lässt auf die metabolische Aktivität der Zellen schließen und unter standardisierten Bedingungen auch eine Aussage über die Zellzahl zu. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz des Resorufins bei einer Wellenlänge von 544 nm (Exzitation) bzw. 590 nm (Emission) gemessen und in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben.

Wichtig war dabei, diese Messungen beim gleichen „Gain“, also derselben Verstärkung durchzuführen wie bei der Erstellung des Standards für das Resazurin-Resorufin-Assay (CellTiter-Blue ® (CTB)), damit mit Hilfe eines Standardtransfers aus den gemessenen RFE auf die Zellzahl geschlossen werden konnte.

Auch bei der Etablierung eines Standards für den CTB-Assay wurden canine Schwanzzellen in DMEM+ in definierten Konzentrationen von 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 bzw. 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 und 9000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät.

Am nächsten Tag wurden 20 µl Resazurin in jede Vertiefung gegeben und die Zellen weitere vier Stunden inkubiert. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz des Resorufins bei einer Wellenlänge von 544 nm (Exzitation) bzw. 590 nm (Emission) gemessen.

Da diese Versuche im Plattenreader wieder als Standard-Messungen durchgeführt wurden, ließen sich aus den gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten und den dazu gehörigen bekannten Standardkonzentrationen der ausgesäten Zellen die entsprechenden Zellzahlen errechnen.

Der Zusammenhang zwischen der Standardkonzentration (Concentration) und der gemessenen RFE (Units) ist im Folgenden grafisch dargestellt. Der Korrelationskoeffizient dieser beiden Variablen beträgt $r = 0,989808$.

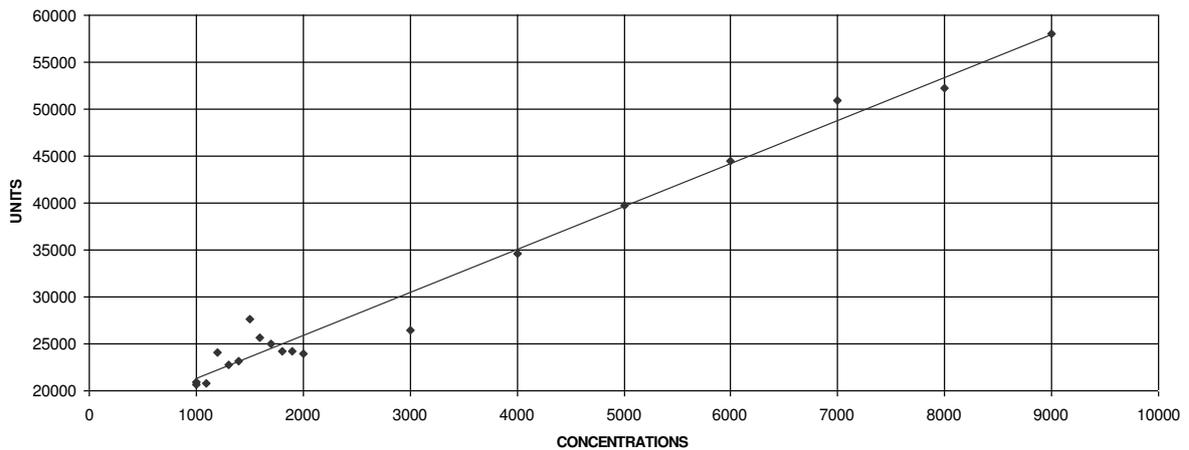


Diagramm 2:

Auf der Y-Achse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten RFE (Units) aufgetragen, die X-Achse gibt die Standardkonzentration (Concentration), also die Zellzahl an, der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,989808$.

Der Standard wurde in allen unter Anwendung des CTB-Assay durchgeführten Versuchen transferiert, um in den unterschiedlichen Proliferations-Versuchen aus den gemessenen RFE Zellzahlen zu errechnen. Damit solch ein Standardtransfer möglich war, mussten die Versuche und der zugehörige Standard immer beim selben „Gain“ durchgeführt werden. Die bei der Etablierung des Standards für den Resazurin-Resorufin-Assay ausgesäten Standardkonzentrationen und die daraus errechneten Zellzahlen sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Standardkonzentration (in 1000er Schritten)	errechnete Zellzahl
1000	917,353
2000	1577,567
3000	2126,507
4000	3913,239
5000	5030,794
6000	6086,918
7000	7480,582
8000	7757,347
9000	9027,931

Standardkonzentration (in 100er Schritten)	errechnete Zellzahl
1000	878,877
1100	894,399
1200	1611,890
1300	1325,068
1400	1422,789
1500	2386,220
1600	1959,267
1700	1804,270
1800	1656,268
1900	1642,714

Tabelle 7:

Gegenüberstellung der Standardkonzentrationen (per Neubauer-Zählkammer ausgezählte Zellzahl) und den zugehörigen aus den RFE des CTB-Assay kalkulierten Zellzahlen

4.5.2 Quantifizierung des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen

Zur Ermittlung der jeweiligen Konzentration, die zu einer maximalen Proliferation von Schwanzzellen führt, wurden zunächst separat unterschiedliche Verdünnungen von VEGF und FGF-2 getestet. In Anlehnung an Untersuchungen von SONDELL et al. (1999a, 1999b), in denen VEGF zur Kultivierung von Schwanzzellen der Ratte erfolgreich in einer Konzentration von 50 ng/ml und FGF-2 mit 10 ng/ml (MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2007) Verwendung fand, wurden in dieser Untersuchung VEGF und FGF-2 jeweils in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden dann Kombinationen von verschiedenen Konzentrationen von VEGF und FGF-2 untersucht. Zum Einsatz kamen 10 ng/ml VEGF kombiniert mit 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml VEGF kombiniert mit 50 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml VEGF kombiniert mit 100 ng/ml FGF-2, 50 ng/ml VEGF kombiniert mit 10 ng/ml FGF-2, 50 ng/ml VEGF kombiniert mit 50 ng/ml FGF-2, 50 ng/ml VEGF kombiniert mit 100 ng/ml FGF-2, 100 ng/ml VEGF kombiniert mit 10 ng/ml FGF-2, 100 ng/ml VEGF kombiniert mit 50 ng/ml FGF-2 und 100 ng/ml VEGF kombiniert mit 100 ng/ml FGF-2 (Tabelle 8).

VEGF-Konzentration in ng/ml	FGF-2-Konzentration in ng/ml
5	
10	
50	
100	
	5
	10
	50
	100
10	10
10	50
10	100
50	10
50	50
50	100
100	10
100	50
100	100

Tabelle 8:

Tabellarische Darstellung der eingesetzten Konzentrationen und Kombinationen von VEGF und FGF-2 zur Untersuchung des proliferativen Effekts dieser beiden Wachstumsfaktoren auf canine Schwanzzellen

Die Versuche zur Proliferation caniner Schwanzzellen erfolgten mit den isolierten, aufgereinigten und kryokonservierten caninen Schwanzzell-Kulturen in den Passagen 4 bis 6. Um ein möglichst schnelles Auftauen der Zellen ohne Schaden zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C geschwenkt, bis sich die Zellsuspension verflüssigte. Diese wurde dann vorsichtig in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit 10 ml DMEM+ überführt und bei 1050 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml DMEM+ gelöst. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte nun die Zellzahl pro ml ermittelt werden, die Zellen wurden sodann in einer Dichte von 10^3 Zellen pro Vertiefung in kollagenbeschichtete 96-Loch-Platten ausgesät.

Nachdem die Zellen sich über Nacht am Kulturschalenboden angeheftet hatten, wurde das Erhaltungsmedium durch 100 µl der unterschiedlichen Wachstumsmedien mit den genannten Konzentrationen von VEGF und FGF-2 (Tabelle 8) ersetzt.

In den Wachstumsmedien wurden die Zellen drei Tage kultiviert. Jede Wachstumsfaktoren-Konzentration wurde stets gleichzeitig in sechs Vertiefungen erprobt und alle Versuche wurden dreimal mit jedem Proliferations-Assay wiederholt.

Bei Anwendung des BrdU-Assay wurde am Morgen des dritten Tages die BrdU-Lösung des Kits mit dem jeweiligen Medium auf 1:1000 verdünnt und davon 100 µl in jede Vertiefung

gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Assay (wie unter 4.5.1.1 beschrieben) vollendet. Durch den Transfer des erstellten Standards für das BrdU-Assay in die Ergebnisse der Proliferationsversuche konnten aus den gemessenen OD-Werten die Zellzahlen ermittelt werden.

Bei Anwendung des CTB-Assay wurde am Morgen des vierten Tages 20 µl Resazurin in jede Vertiefung gegeben. Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank fand die Auswertung (wie unter 4.5.1.2 beschrieben) statt. Durch den Transfer des erstellten Standards für den CTB-Assay in die Ergebnisse der Proliferationsversuche konnten aus den gemessenen RFE die Zellzahlen ermittelt werden.

Die Auswertung der Ergebnisse aller Untersuchungen zum proliferativen Effekt von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 14.0).

Weil davon auszugehen ist, dass Zellzahlen im Allgemeinen nicht symmetrisch verteilt sind, wurden die in den Proliferationsversuchen erzielten Zellzahlen auf logarithmischer Ebene betrachtet (lgZZ), dies erlaubt die Anwendung der parametrischen Statistik.

Für die einzelnen Wachstumsfaktoren und ihre Kombinationen wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse, die die Variablen „Proliferations-Assay“, „Versuchsdurchgang“ und „Wachstumsfaktor-Konzentration“ enthielt, durchgeführt. Dabei zeigten sich jeweils signifikante Wechselwirkungen zwischen Assay und Durchgang sowie zwischen Assay und Konzentration ($p < 0.001$). Aus diesem Grund wurden die Daten anschließend pro Assay bzw. pro Durchgang mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalysen untersucht.

Diese Analysen zeigten jedoch ebenfalls, dass die Zellzahlen in den interessierenden Konzentrationsstufen in den drei Durchgängen und den beiden Assays so unterschiedlich waren, dass die Faktoren Durchgang und Assay nicht sinnvoll zusammengefasst werden konnten. Folglich wurde der Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren auf die erzielten Zellzahlen für jeden Wachstumsfaktor, jedes Assay und jeden Durchgang mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht.

Zeigten sich in der Varianzanalyse Unterschiede in den erzielten Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren, so wurde der Scheffé-Test angewendet. Zusätzlich wurde auf den einzelnen Konzentrationsstufen von VEGF und FGF-2 der jeweilige Effekt der Wachstumsfaktoren verglichen, dies geschah mit dem t-Test.

Die Ergebnisse jedes Assays und jedes Versuchsdurchgangs wurden in Form von Streudiagrammen mit arithmetischem Mittelwert dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse auch in tabellarischer Ansicht

abgebildet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse der Varianzanalysen erfolgte mit Fehlerbalken, die ein Konfidenzintervall von 95 % umfassen.

Insgesamt wurden umfangreiche statistische Tests verwendet um die Daten zu beschreiben und Kriterien zu erhalten um Unterschiede zu definieren. Aus diesem Grund können statistisch signifikante Differenzen auch zufällig sein und dürfen nicht verallgemeinert werden.

5.1 Identifizierung von Nervengewebe und caninen Schwannzellen

5.1.1 Identifizierung des Nervengewebes

Die Identifizierung des Nervengewebes in den gewonnenen Biopsien aus dem N. radialis und N. ischiadicus erfolgte anhand morphologischer Parameter. Dazu wurden Längs- und Querschnitte des entnommenen Gewebes angefertigt und mittels der HE-Färbung dargestellt. Von den präparierten Nervenfaserbündeln wurden Semidünnschnitte angefertigt und einer Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Färbung unterzogen.

Im HE-gefärbten Querschnitt zeigte sich der typische Aufbau eines Nervs, welcher vom Epineurium umgeben und durch das Perineurium in Nervenfaserbündel gegliedert ist, die vom Endoneurium umgebene Axone und Schwannzellen enthalten (Abb. 27 und 30).



Abb. 27:
Querschnitt durch einen caninen N. radialis, HE-Färbung, Lichtmikroskop 100 x;
1=Epineurium, 2=Perineurium, 3=Nervenfaserbündel, 4=Axon, 5=Schwannzellkern

Im Längsschnitt der Nerven ließen sich in der HE-Färbung Axone, Ranviersche Schnürringe, Fibroblasten und Schwannzellen anhand ihrer Kerne identifizieren (Abb. 28, 29 und 32).

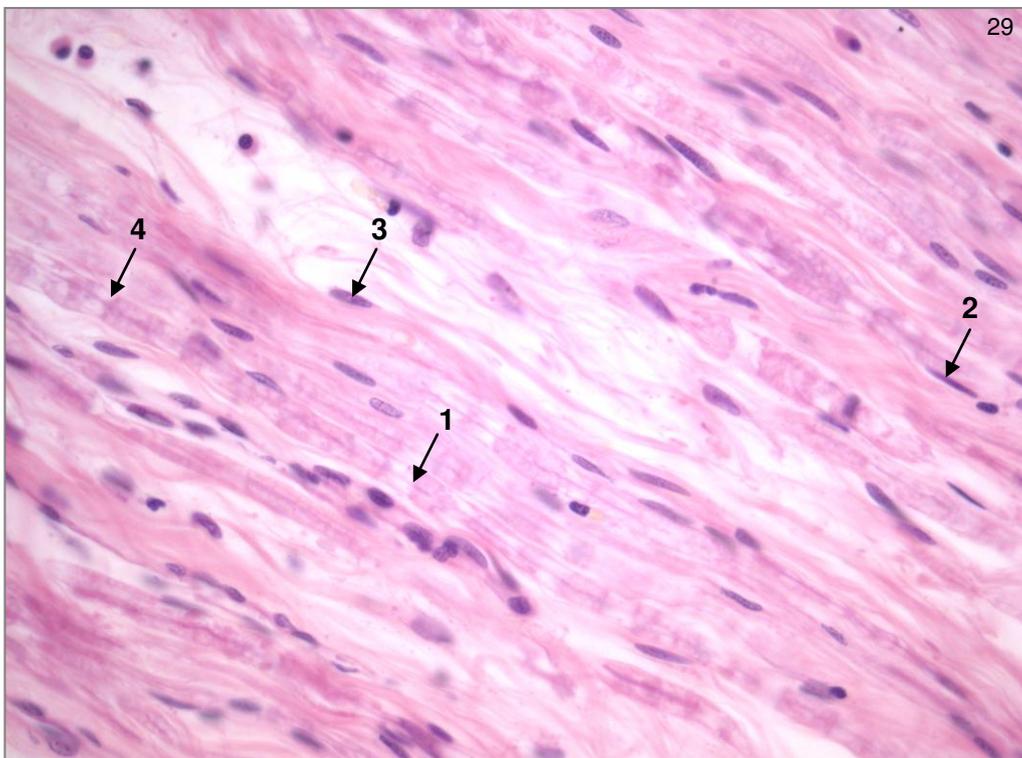
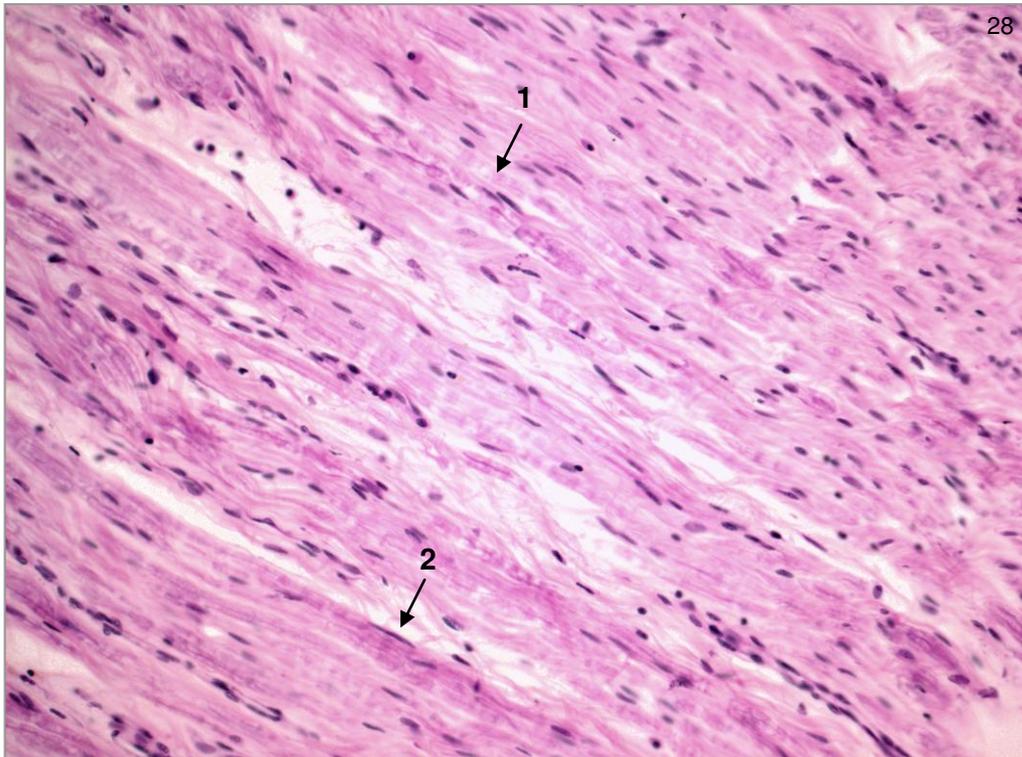


Abb. 28 und 29:
Längsschnitt durch einen caninen N. radialis, HE-Färbung, Lichtmikroskop 100 x (Abb. 28) und 200 x (Abb. 29); 1=Axon, 2=Fibroblastenkern, 3=Schwannzellkern, 4=Ranvierscher Schnürring

Im Vergleich zur HE-Färbung wurden durch die Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Färbung in den Semidünnschnitten der Nervenfaserbündel die Markscheiden sichtbar gemacht (Abb. 31 und 33).

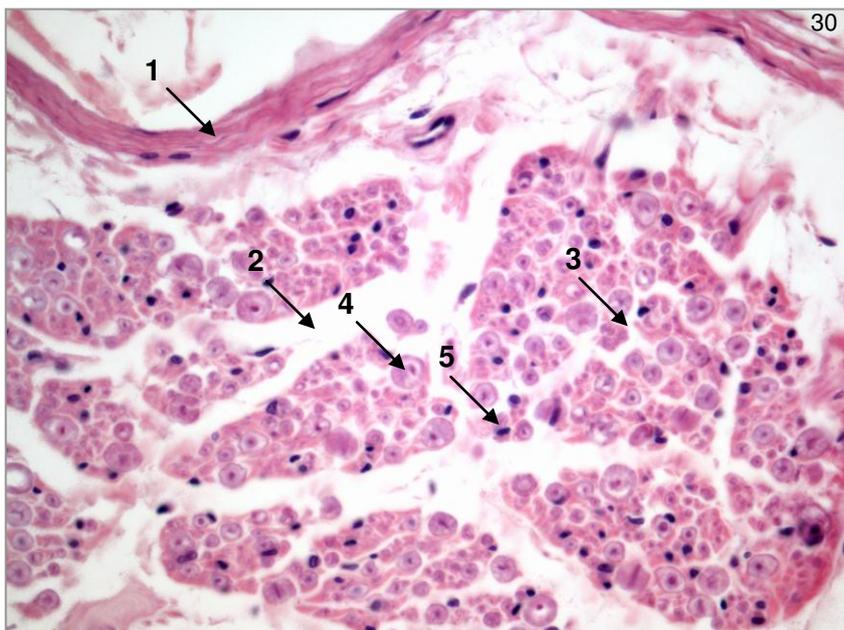


Abb. 30:
Querschnitt durch einen caninen N. radialis, HE-Färbung, Lichtmikroskop 200 x;
1=Epineurium,
2=Perineurium,
3=Endoneurium,
4=Axon mit Myelinscheide,
5=Schwannzellkern

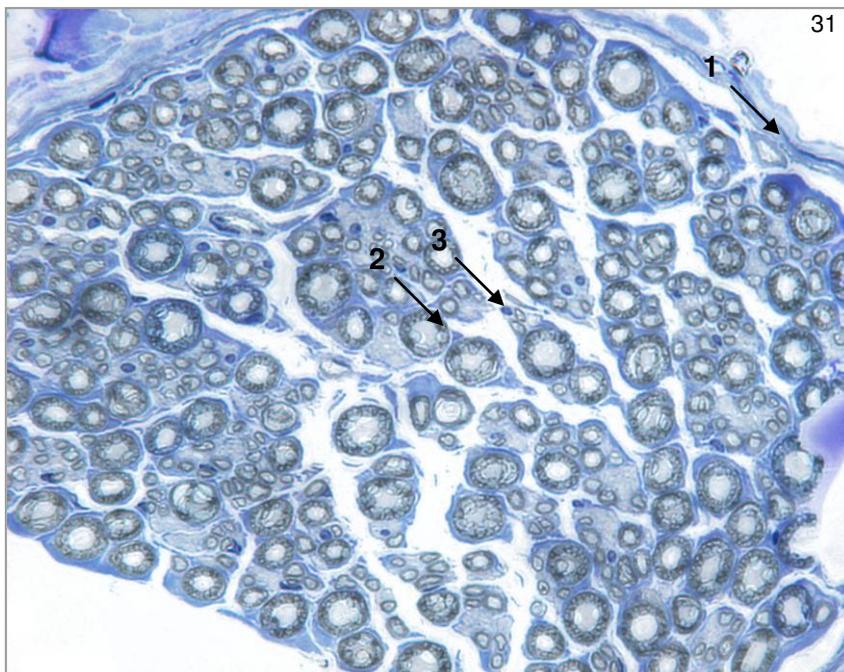


Abb. 31:
Querschnitt durch ein Nervenfaserbündel eines caninen N. radialis, Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Färbung, Lichtmikroskop 320 x;
1=Perineurium,
2=Myelinscheide,
3=Schwannzellkern

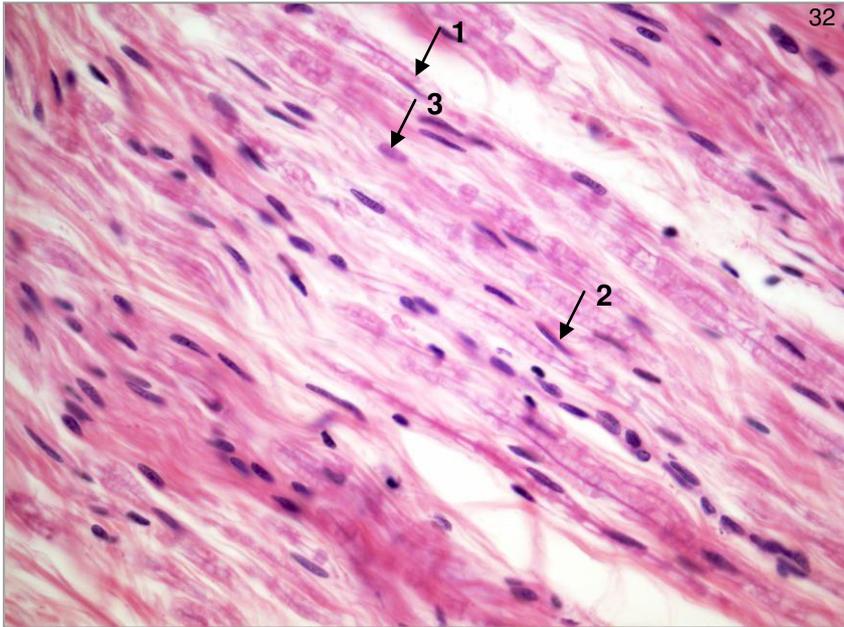


Abb.32:
Längsschnitt durch
einen caninen N.
radialis, HE-
Färbung,
Lichtmikroskop
200 x;
1=Axon,
2=Fibroblastenkern,
3=Schwannzellkern

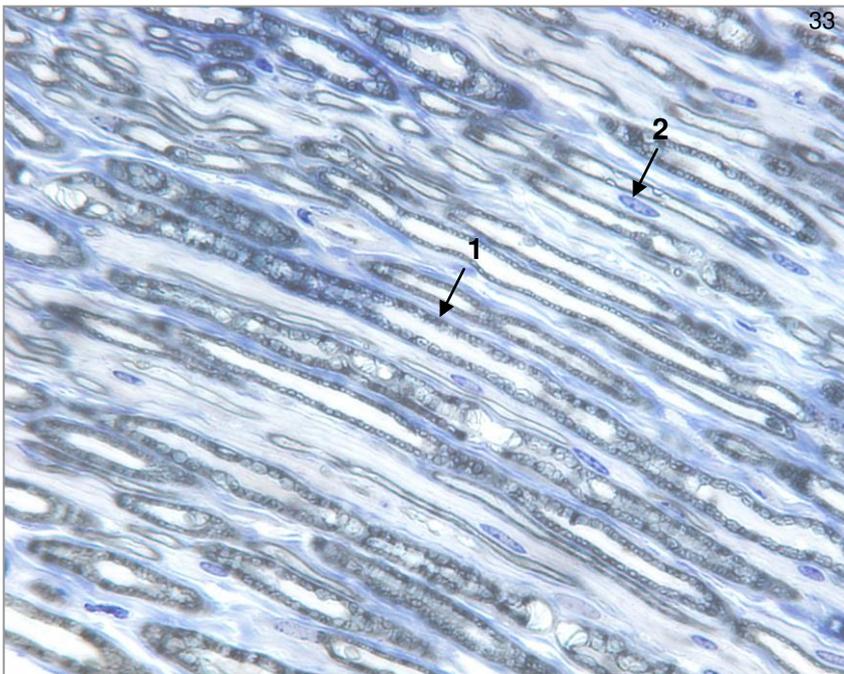


Abb. 33:
Längsschnitt durch
ein
Nervenfaserbündel
eines caninen N.
radialis,
Osmiumtetroxid-
Hämatoxylin-
Färbung,
Lichtmikroskop
320 x;
1=Myelinscheide
2=Schwannzellkern

5.1.2 Identifizierung der Schwannzellen innerhalb des Nervengewebes

Die Identifizierung der Schwannzellen innerhalb des Nervengewebes erfolgte mit Hilfe des für canine Schwannzellen etablierten monoklonalen p75-NTR-Antikörpers aus dem Kaninchen (PAULS, 2003; PAULS et al., 2004), welcher Schwannzellen, nicht aber Fibroblasten markiert.

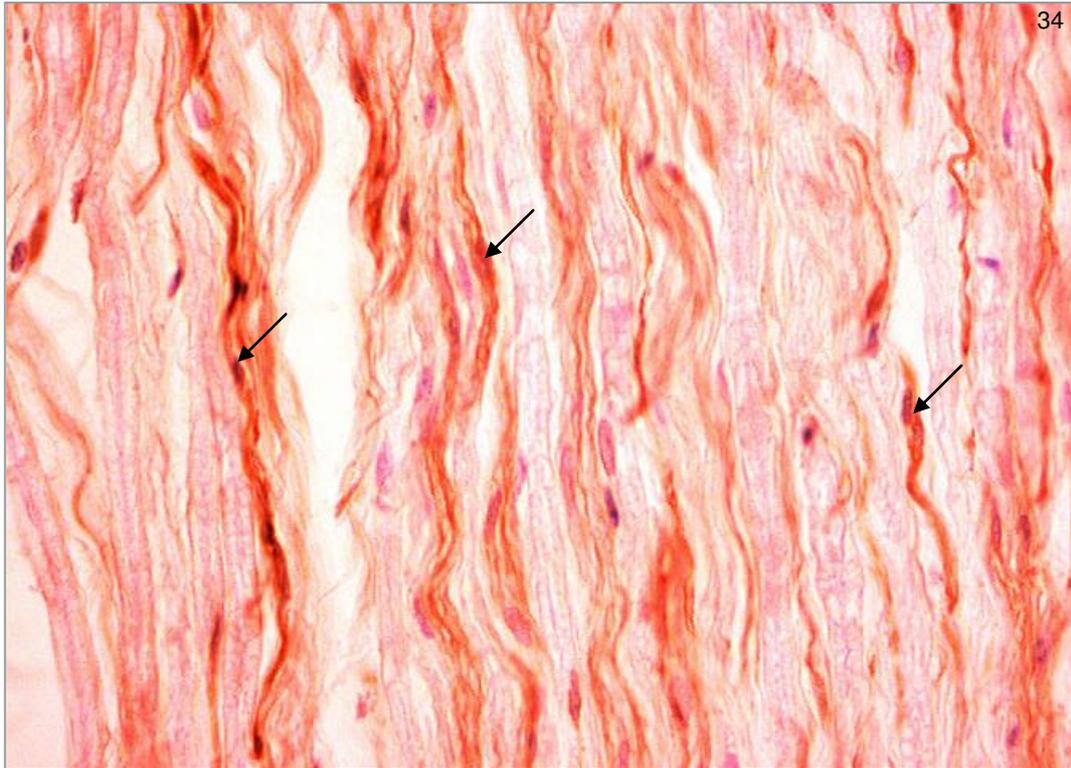


Abb. 34:
Histologischer Längsschnitt eines caninen Nerven: Immunzytochemische Markierung caniner Schwannzellen im Nervengewebe mit Hilfe des p75-NTR-AK (Pfeile), Verdünnung des Primärantikörpers 1:200, Lichtmikroskop 400 x



Abb. 35:
Semidünnschnitt einer Nervenfasers des caninen N. radialis: anti-p75-NTR markierte canine Schwannzellen (Pfeile), Verdünnung des Primärantikörpers 1:1500, Lichtmikroskop 400 x

Sowohl innerhalb des Nervengewebes als auch in den Semidünnschnitten der Nervenfaserbündel zeigte sich eine deutliche immunopositive Reaktion, die den Schwannzellen zugeordnet wurde (Abb. 34 und 35).

5.2 Gewinnung von caninen Schwannzell-Kulturen

5.2.1 Morphologische Identifizierung caniner Schwannzellen in vitro

Die gewonnenen Nervenexplantate des caninen N. radialis und N. ischiadicus wurden in DMEM+ oder MM+ kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen waren die ersten aus den Nervenexplantaten auswachsenden Zellen zu beobachten, die sich im Laufe einer Woche zu einem Zellrasen rund um die Nervenexplantate verdichteten (Abb. 36).

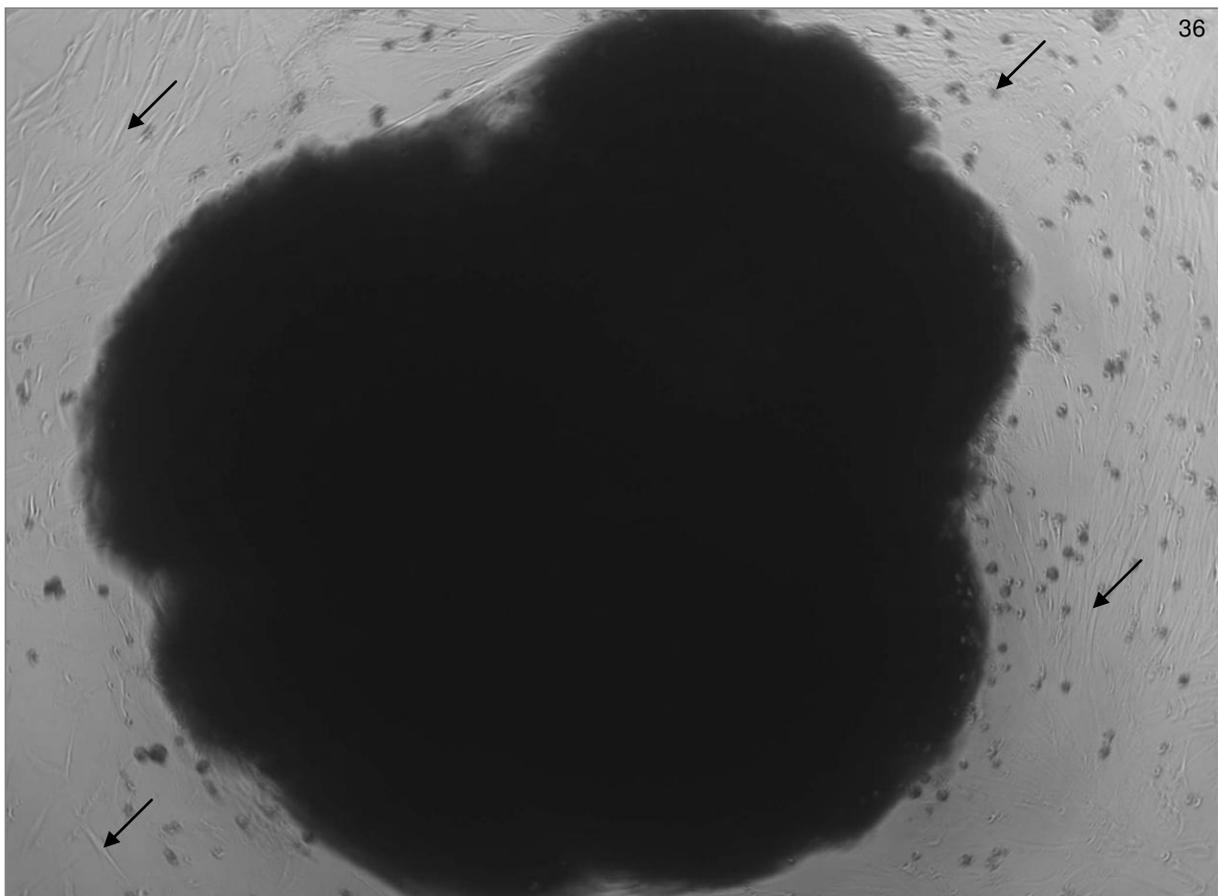


Abb. 36: Nervenexplantat des caninen N. radialis mit auswachsenden Zellen (Pfeile), 5 Tage in DMEM+ inkubiert, Phasenkontrastmikroskop 50 x

Hierbei zeigte sich ein prinzipieller Unterschied beim Emigrieren der Zellen aus Nervenexplantaten adulter und juveniler Hunde (Abb. 37 und 38). Bei Inkubation der Nervenexplantate in DMEM+ bestanden die auswandernden Zellen bei den adulten Nervenexplantaten in der ersten Woche nur vereinzelt aus Schwannzellen, während diese bei juvenilen Nervenbiopsien die überwiegende Population darstellten.

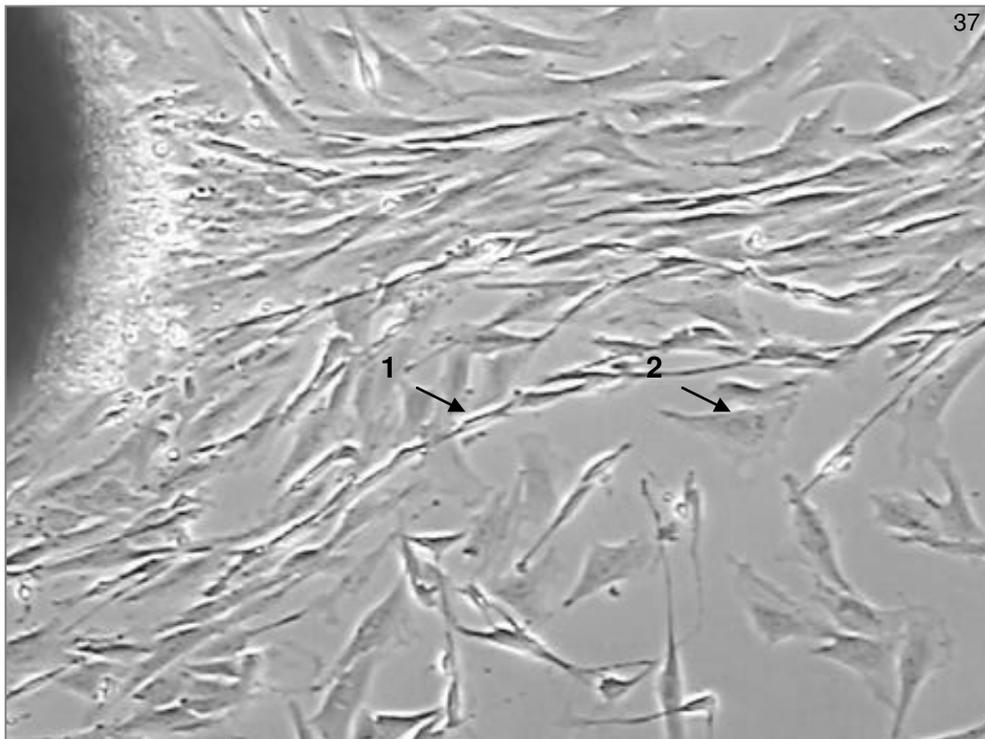


Abb.37:
Explantat des N. radialis von einem juvenilen Hund, 7 Tage in DMEM+ kultiviert, emigrierende Fibroblasten (2) und Schwannzellen (1)

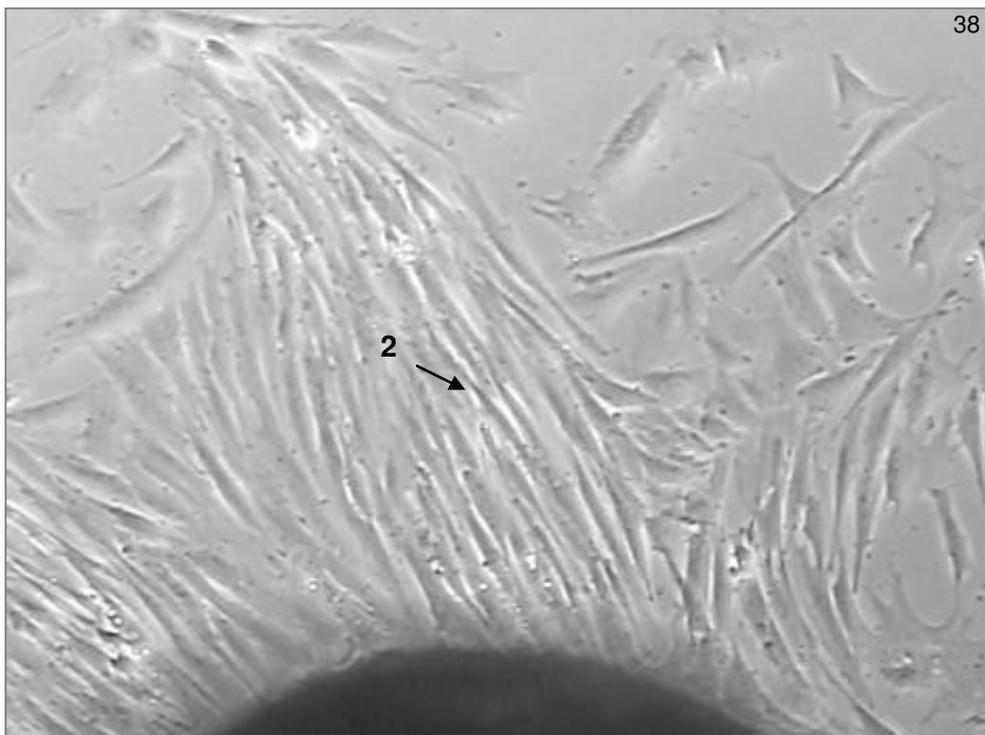


Abb. 38:
Explantat des N. radialis von einem adulten Hund, 7 Tage in DMEM+ kultiviert, emigrierende Fibroblasten (2)

Die Kultivierung der Nervenexplantate in den beiden verschiedenen Medien beeinflusste sowohl die Morphologie als auch die Konzentration der auswandernden Zellen.

5.2.1.1 Morphologische Identifizierung caniner Schwanzzellen bei Kultivierung in DMEM+

Bei Inkubation der Nervenexplantate in DMEM+ (Abb. 39 und 40) waren die auswachsenden Zellen anhand ihrer Morphologie lichtmikroskopisch zwei unterschiedlichen Zelltypen zuzuordnen, die als Schwanzzellen und Fibroblasten angesprochen wurden.

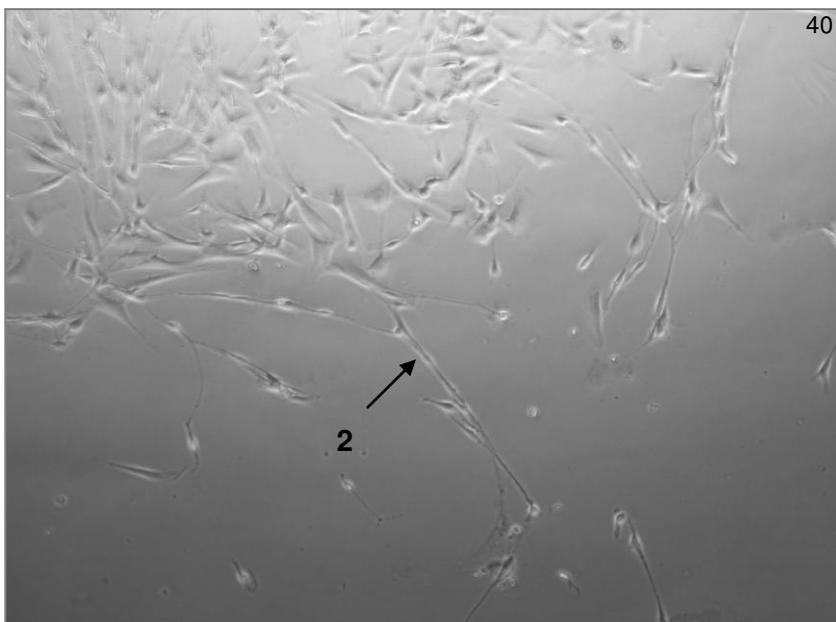
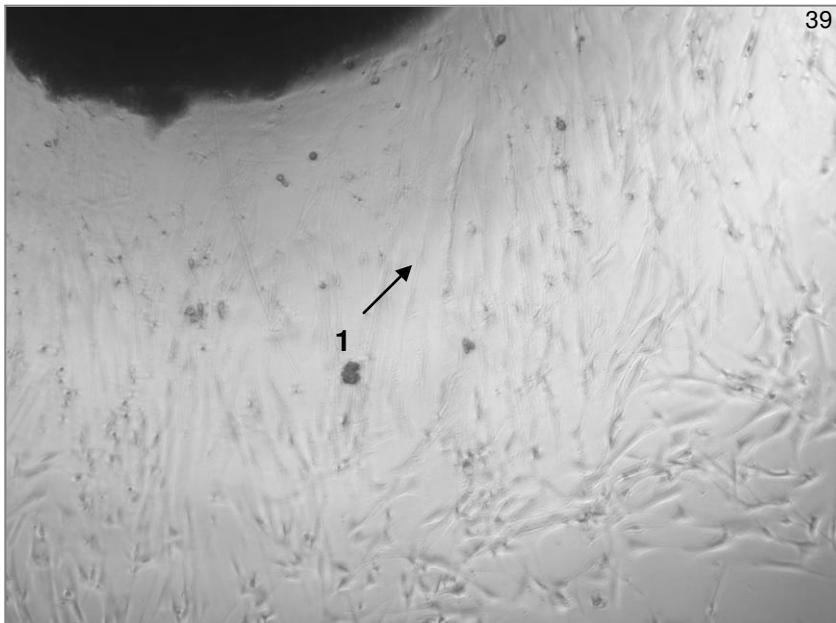


Abb. 39/40: Nervenexplantat des N. radialis mit auswachsenden Zellen, 7 Tage nach dem ersten Umsetzen, in DMEM+ kultiviert, Phasenkontrastmikroskop 100 x, zentral gelegenes Nervenexplantat, in dessen direkter Umgebung anhand der Morphologie überwiegend Fibroblasten (1) zu identifizieren sind (Abb. 39), peripherer Bereich des Zellrasens um das Explantat, überwiegend aus Schwanzzellen (2) bestehend (Abb.40)

Schwanzzellen stellen sich in vitro typischerweise schlank, spindelförmig, bipolar mit langen Zellausläufern dar und haben verhältnismäßig wenig Zytoplasma, die Morphologie der Fibroblasten dagegen ist deutlich flächenhafter, die Zellkörper sind größer, meist dreieckig und weisen verhältnismäßig wesentlich mehr Zytoplasma auf.

Bei der Kultivierung in DMEM+ waren in allen Ansätzen die ersten auswachsenden Schwanzzellen innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nach dem ersten Umsetzen der Nervenexplantate morphologisch identifizierbar. Ihre Zahl steigerte sich nach dem zweiten Umsetzen.

Nach der anschließenden enzymatischen Dissoziation behielten die Schwanzzellen ihre bipolare, spindelförmige Morphologie bei (Abb. 41).

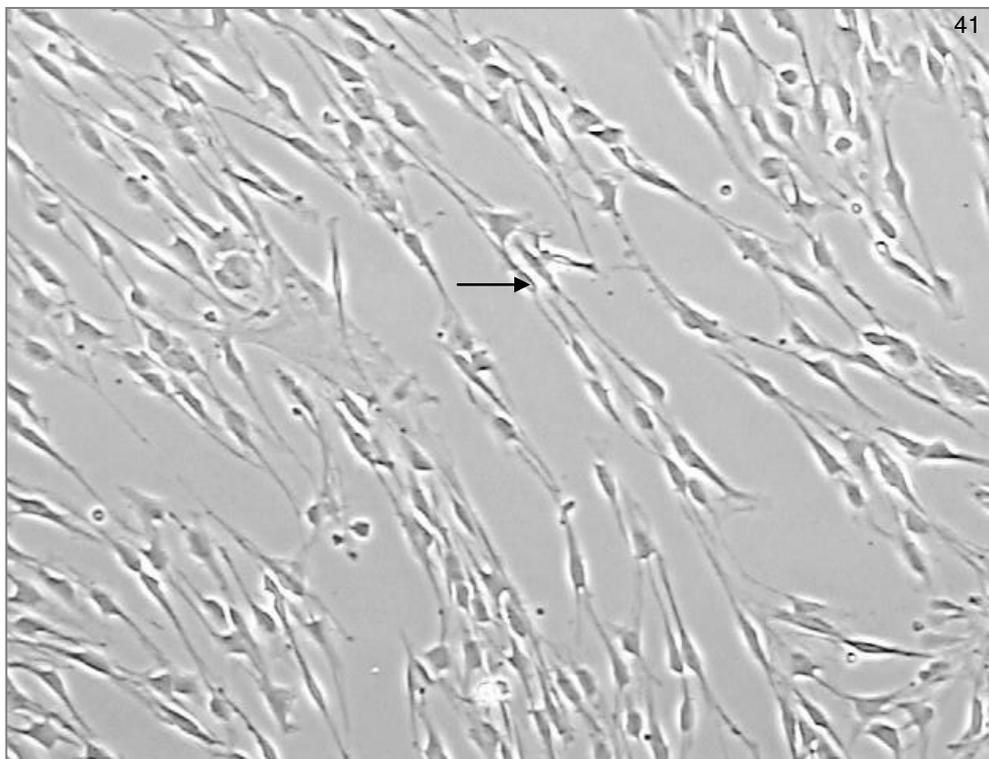


Abb. 41:

Canine Schwanzzell-Kultur aus dem N. radialis, kultiviert in DMEM+, sechs Tage nach Dissoziation der Nervenexplantate, überwiegend bipolare Morphologie caniner Schwanzzellen (Pfeile), Phasenkontrastmikroskop 200 x

5.2.1.2 Morphologische Identifizierung caniner Schwanzzellen bei Kultivierung in MM+

Wurden die Nervenexplantate in MM+ inkubiert (Abb. 42 und 43), so war im Vergleich zur Kultivierung mit DMEM+ ein deutlich dünnerer Zellrasen aus auswachsenden Zellen um die

Nervenexplantate herum lichtmikroskopisch zu erkennen, welcher jedoch von Anfang an fast ausschließlich von bipolaren Zellen gebildet wurde, die als Schwannzellen identifiziert wurden. Auffällig war hier, dass diese Zellen deutlich längere Zellausläufer aufwiesen als bei Inkubation in DMEM+.

Diese Morphologie und der hohe Anteil an Schwannzellen bei insgesamt jedoch geringerer Gesamtzellausbeute blieben auch nach dem Explantieren und der Dissoziation bestehen.

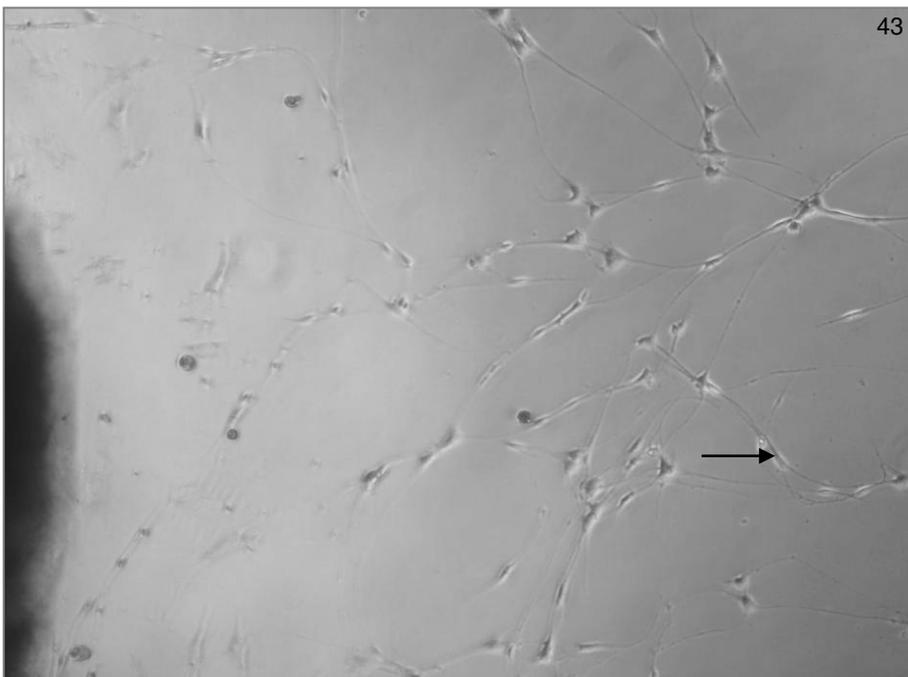


Abb. 42/43: Nervenexplantat des caninen N. radialis 7 Tage nach dem ersten Umsetzen, kultiviert in MM+, Phasenkontrastmikroskop 100 x; Bei den ausgewachsenen Zellen handelt es sich überwiegend um Schwannzellen, die eine extrem lang gestreckte Morphologie aufweisen (Pfeile).

5.2.2 Immunzytochemische Identifizierung caniner Schwannzellen in vitro

Die aus den Nervenexplantaten gewonnenen Zellkulturen bestanden zunächst aus zwei sich morphologisch deutlich unterscheidenden Zellpopulationen.

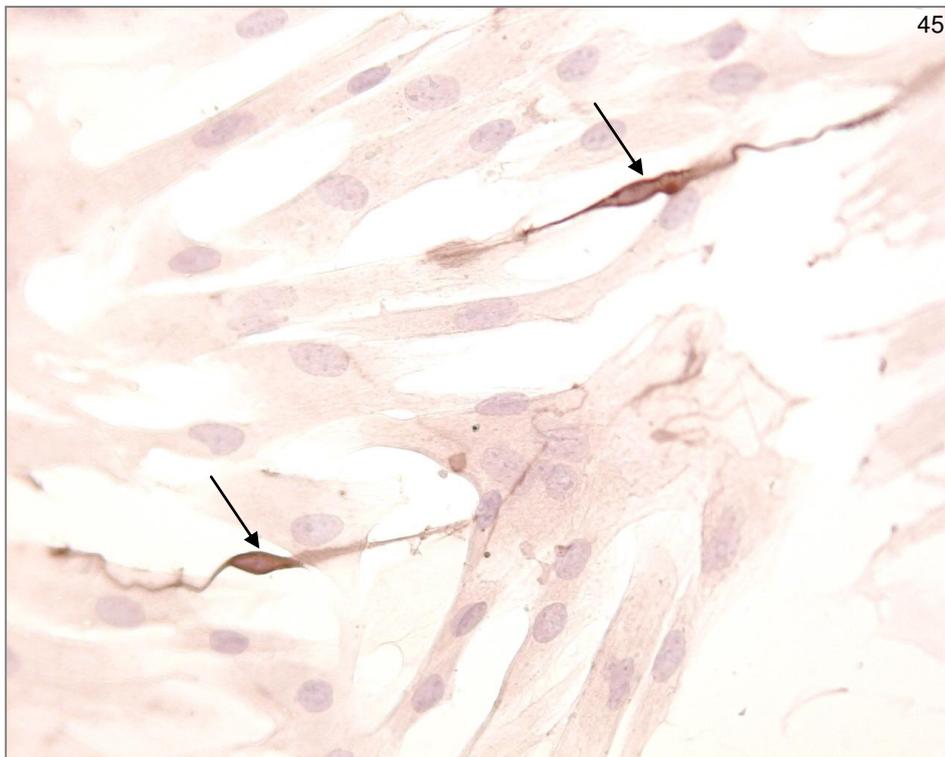
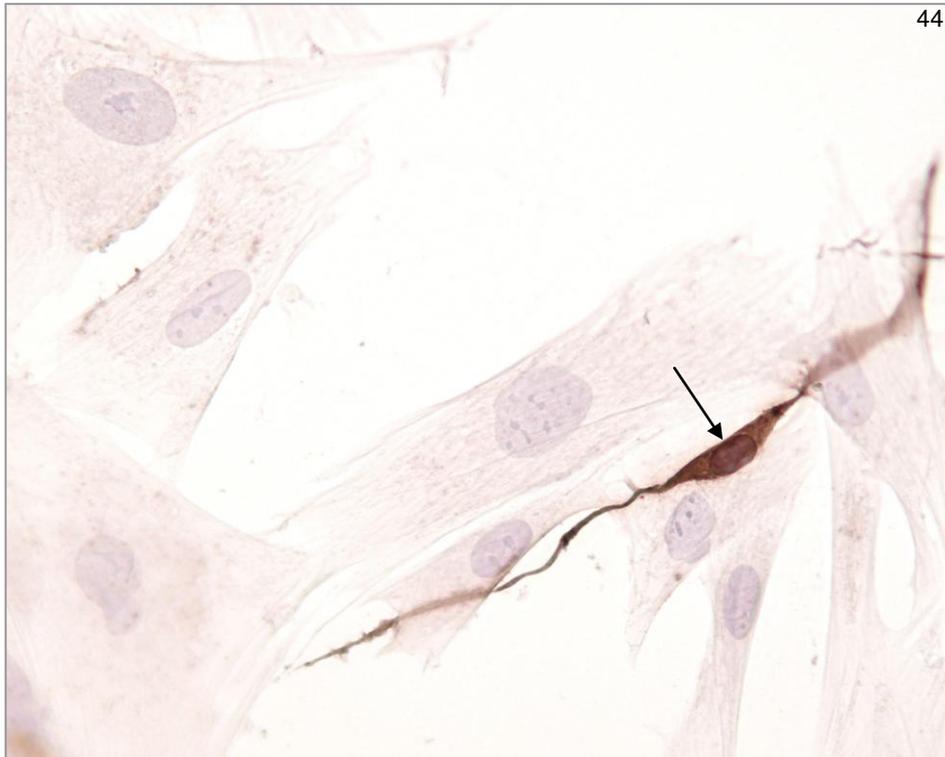


Abb. 44/45: Mischkultur aus dem caninen N. radialis, Passage 2, einzelne canine Schwannzellen (Pfeile), anti-p75-NTR markiert, Konzentration des Primärantikörpers 1: 1500, Lichtmikroskop 320 x (Abb. 45) und 240 x (Abb. 46)

Mit Hilfe des p75-NTR-Antikörpers wurden die spindelförmigen, bipolaren Zellen mit ihren langen Fortsätzen immunzytochemisch eindeutig als Schwannzellen identifiziert. Die immunopositive Reaktion umfasste stets gleichmäßig die gesamte canine Schwannzelle einschließlich ihrer langen Zellausläufer (Abb. 44 bis 49).

Die sich deutlich unterscheidenden Zellen, die morphologisch Fibroblasten ähnelten, wurden mit diesem Antikörper nicht markiert. Die Identifizierung der Schwannzellen anhand ihrer typischen Morphologie konnte durch die Immunzytochemie bestätigt werden.

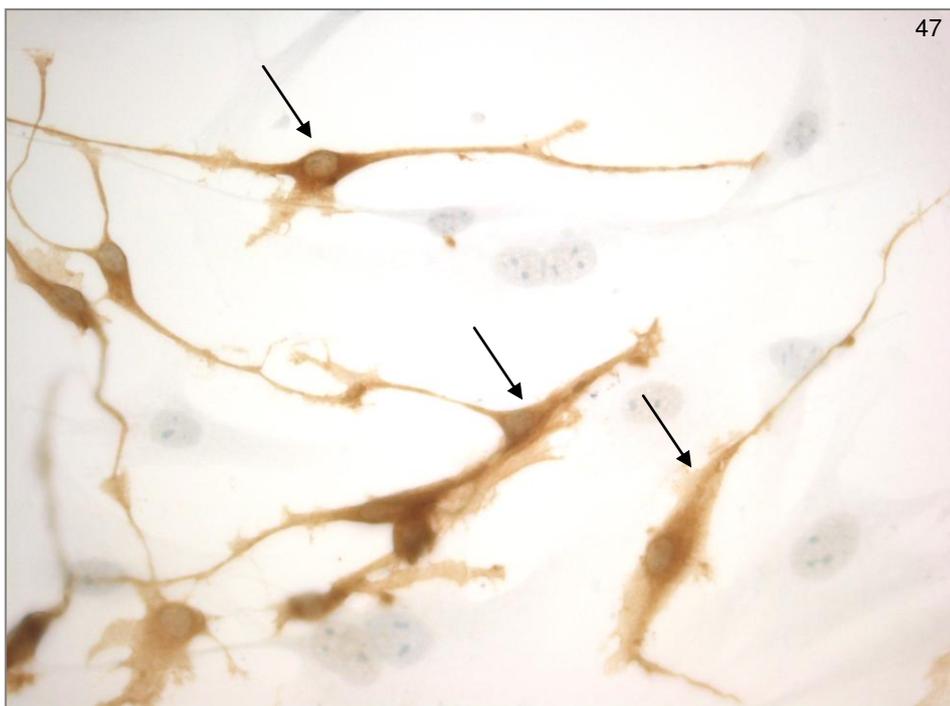
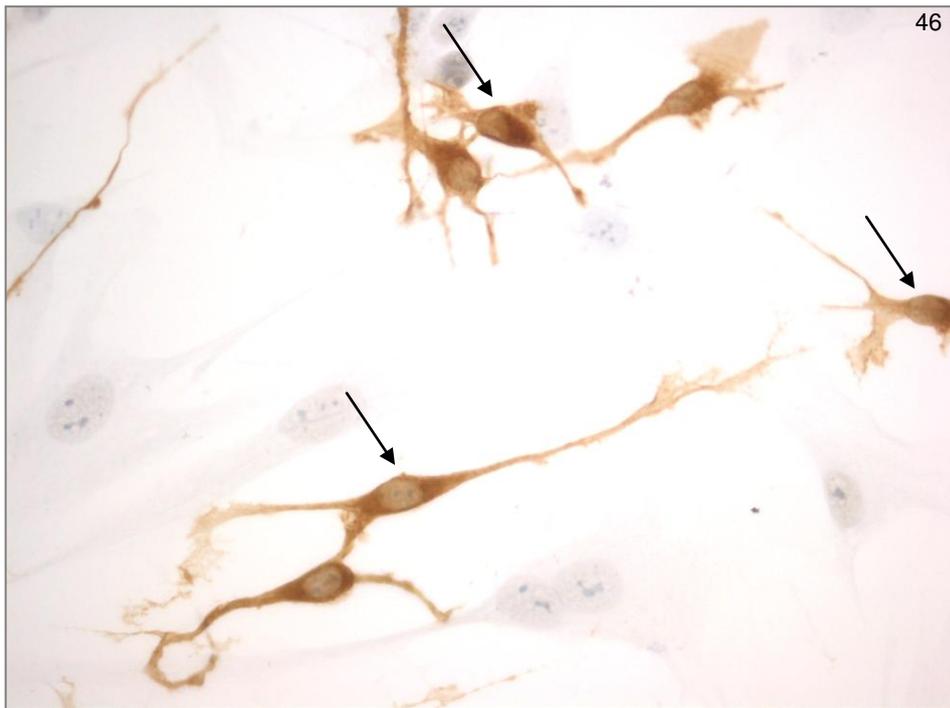


Abb. 46/47:
Mischkultur aus dem caninen N. radialis, Passage 3, canine Schwannzellen (Pfeile), anti-p75 markiert, Konzentration des Primärantikörpers 1: 1500, Lichtmikroskop 400 x

In Passage 1 nach der Dissoziation wurden nur einzelne Schwanzzellen in einer überwiegend aus nicht markierten Zellen bestehenden Mischkultur identifiziert (Abb. 44 und 45).

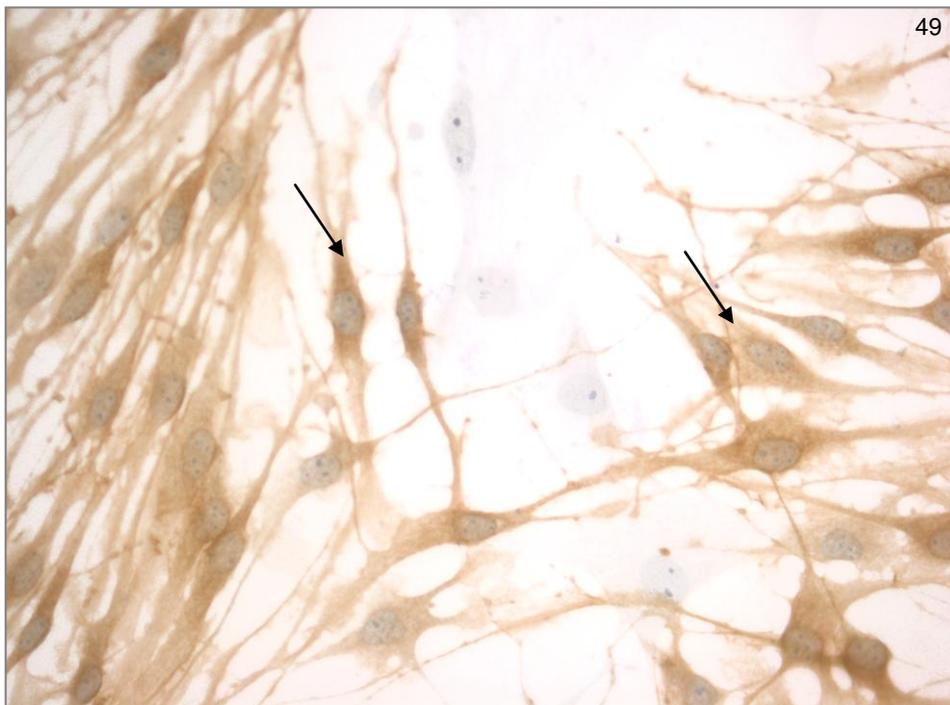
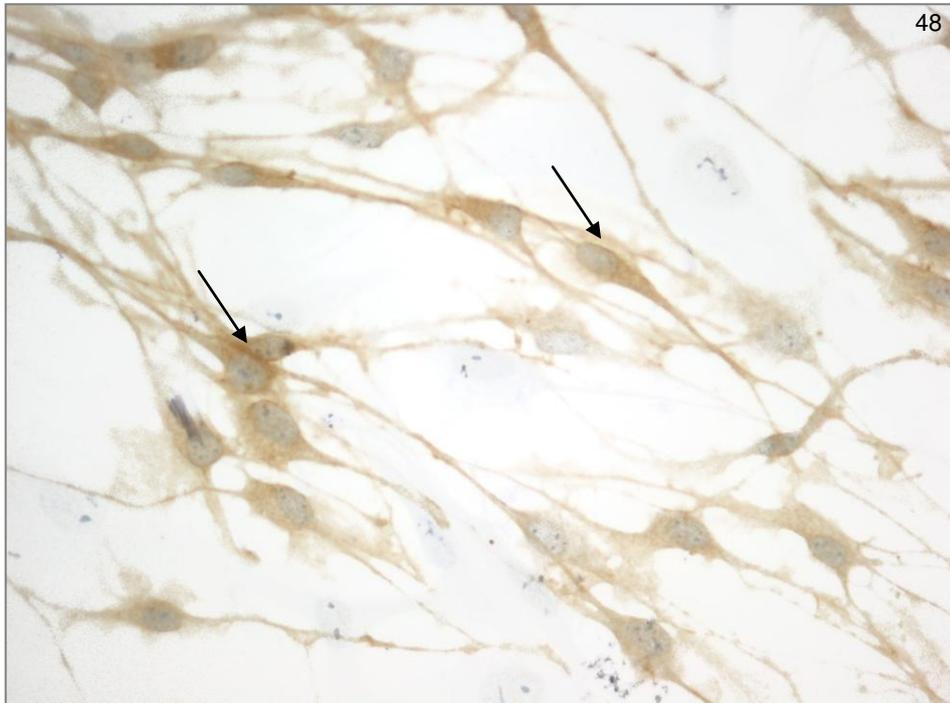


Abb. 48/49:
Mischkultur aus dem caninen N. radialis, zum überwiegenden Anteil aus anti-p75-NTR markierten Schwanzzellen bestehend (Pfeile), Passage 4, Konzentration des Primärantikörpers 1:1500, Lichtmikroskop 400 x

Die Abbildungen 46 und 47 zeigen eine Mischkultur in Passage 3. Eine überwiegend aus Schwanzzellen bestehende Mischkultur zeigen die Abbildungen 48 und 49. Hier handelt es sich um Kulturen aus dem caninen N. radialis in Passage 4.

5.2.3 Purifikation caniner Schwanzzell-Kulturen

Die durch Auswachsen von Zellen aus den Nervenexplantaten oder nach Dissoziation der Nervenexplantate gewonnenen Zellkulturen wiesen lichtmikroskopisch einen sehr unterschiedlich großen Anteil an Schwanzzellen auf. Ziel der weiteren Behandlung dieser Mischkulturen war es, die Konzentration der Schwanzzellen zu maximieren.

Die Gewinnung maximal aufgereinigter Schwanzzell-Kulturen wurde durch den Einsatz von MM+ in Kombination mit kurzzeitiger Trypsinierung verwirklicht.

5.2.3.1 Purifikation caniner Schwanzzellen durch Inkubation in MM+

Grundsätzlich ist zu beobachten, dass beim Einsatz von serumfreiem MM+ die Dichte der gesamten Zellpopulation deutlich geringer ist als unter Verwendung von serumhaltigem DMEM+.

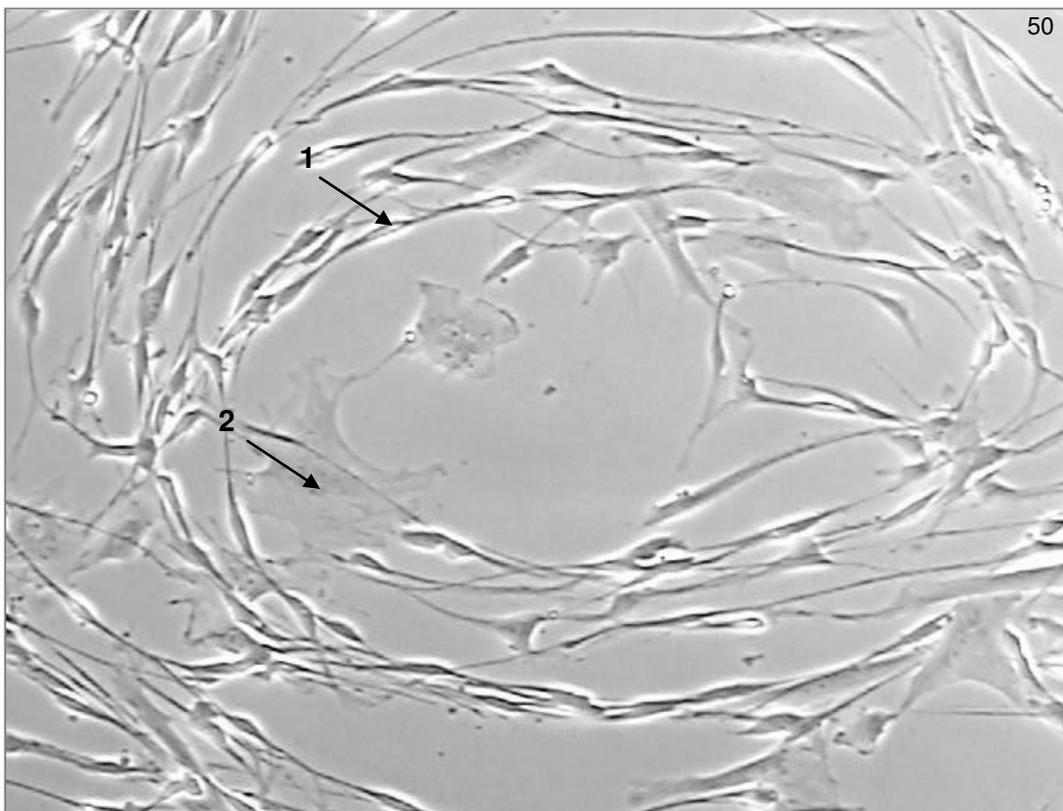


Abb. 50:

Mischkultur aus dem caninen N. radialis, bestehend aus Schwanzzellen (1) und Fibroblasten (2), deutliche Anreicherung von Schwanzzellen, Passage 3, MM+, ausgeprägte bipolare Morphologie der Schwanzzellen, Phasenkontrastmikroskop 200 x

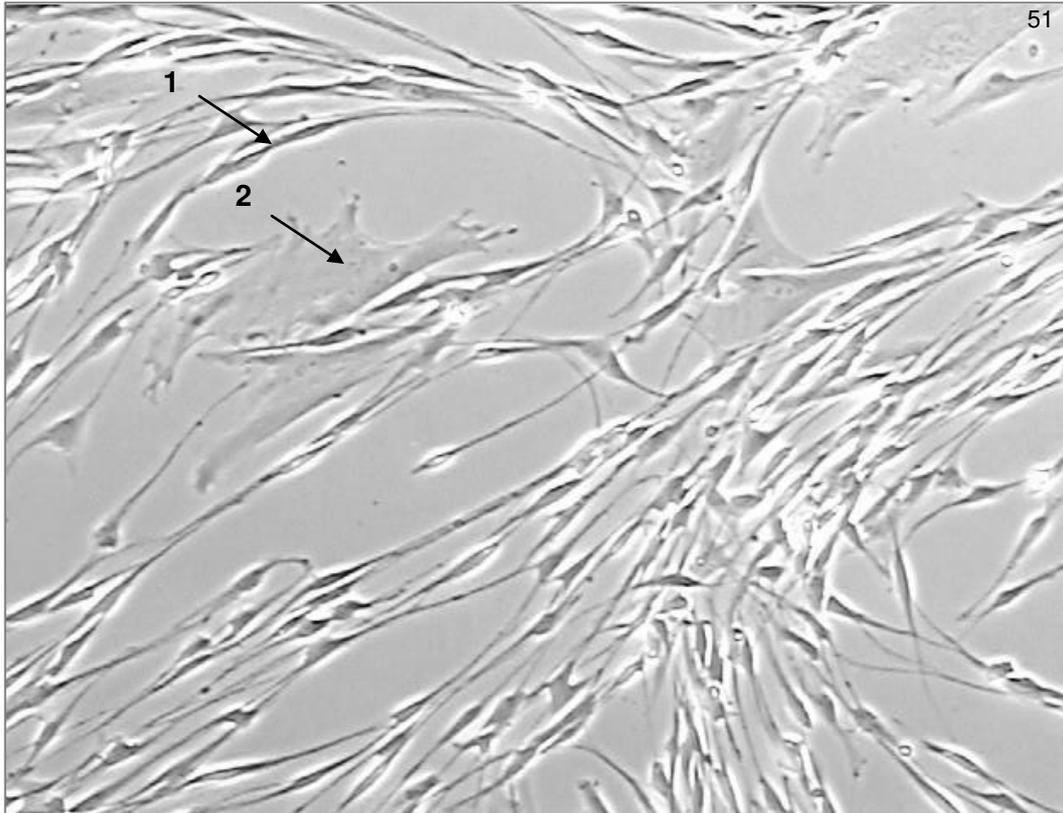


Abb. 51:

Mischkultur aus dem caninen N. radialis, bestehend aus Schwannzellen (1) und Fibroblasten (2), deutliche Anreicherung von Schwannzellen, Passage 3, MM+, ausgeprägte bipolare Morphologie der Schwannzellen, Phasenkontrastmikroskop 200 x

Jedoch hat sich gezeigt, dass die Wachstumsbedingungen im MM+ für Fibroblasten deutlich ungünstiger sind als für Schwannzellen. Daher war es möglich, den Anteil der caninen Schwannzellen an der Gesamtzellpopulation durch Inkubation im MM+ zu erhöhen (Abb. 50 und 51).

5.2.3.2 Purifikation caniner Schwannzellen durch kurzzeitige Trypsinierung

Routinemäßig werden adhärente Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Kulturschalenboden gelöst, um sie umzusetzen. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass Fibroblasten und Schwannzellen unterschiedlich stark am Zellkulturschalenboden haften. Durch eine kurze Einwirkzeit des Trypsins wurden die Schwannzellen vom Untergrund gelöst, während noch der überwiegende Teil der Fibroblasten am Kulturschalenboden haftete. Somit wurden mit Hilfe wiederholter kurzzeitiger Trypsinierung immer reinere Schwannzell-Kulturen gewonnen (Abb. 52 bis 57).

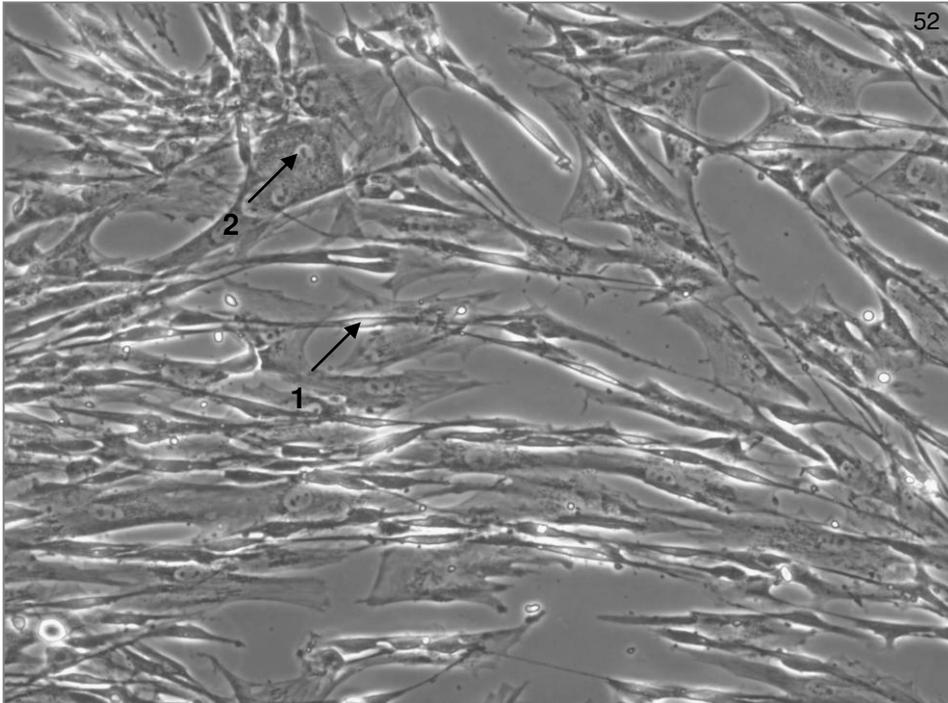


Abb. 52:
Mischkultur aus dem caninen N. ischiadicus, bestehend aus Fibroblasten (2) und Schwanzzellen (1), Passage 1, DMEM+, Phasenkontrastmikroskop 200 x; Fibroblasten dominieren

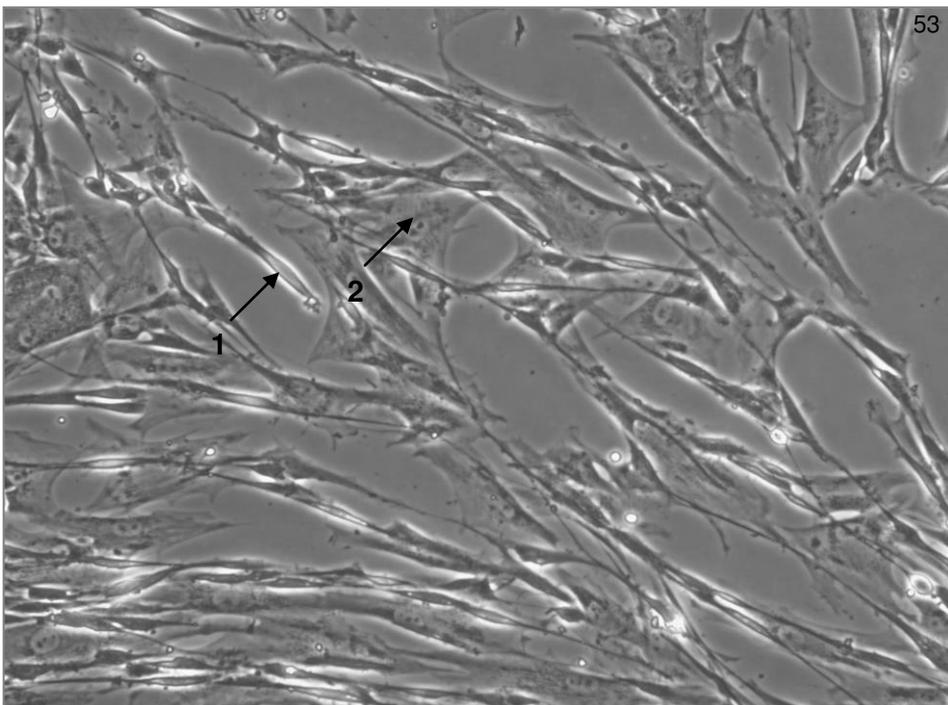
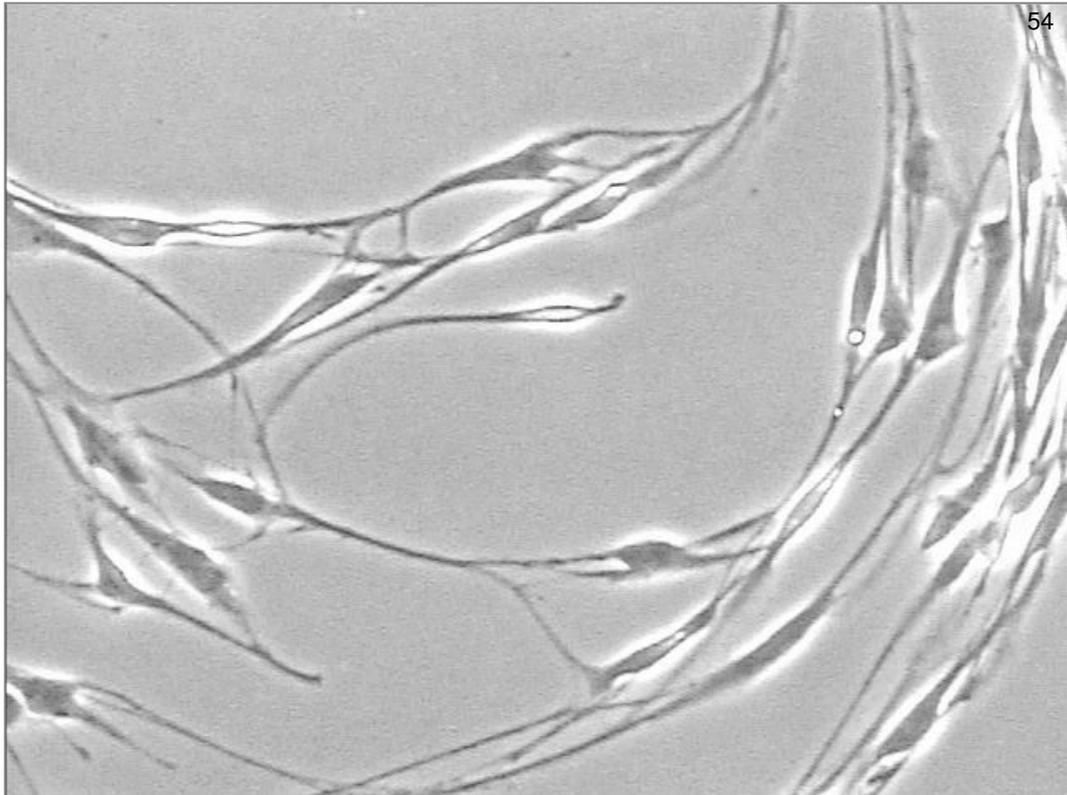
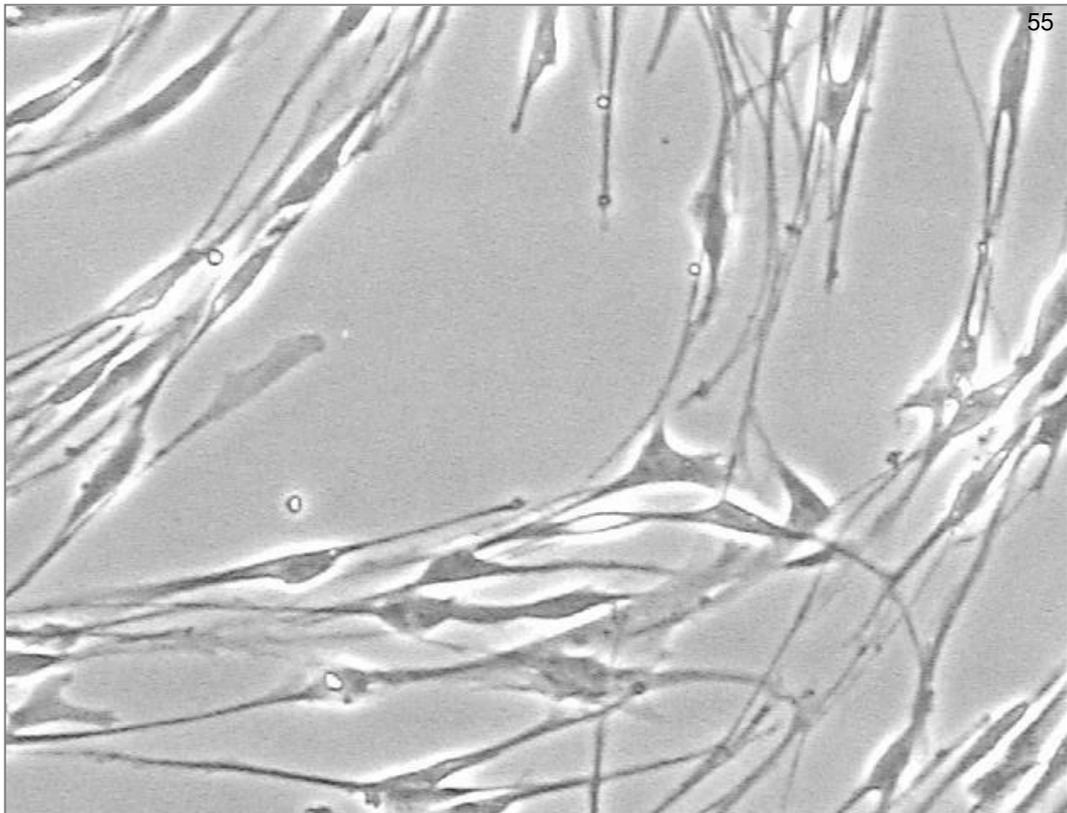


Abb. 53:
Mischkultur aus dem caninen N. ischiadicus, bestehend aus Fibroblasten (2) und Schwanzzellen (1), Passage 2, DMEM+, Phasenkontrastmikroskop 200 x; überwiegender Fibroblastenanteil

Je nach Kultivierungsmedium waren unterschiedlich viele Trypsinierungen notwendig, um reine Schwanzzell-Kulturen zu gewinnen. Unter Einsatz des MM+ waren die Fibroblasten bereits nach zwei Trypsinierungen eliminiert, während bei Kultivierung in DMEM+ die Zellen bis zu viermal umgesetzt werden mussten.



54



55

Abb. 54/55:
Schwannzell-Reinkultur aus dem caninen N. radialis, Passage 4, DMEM+,
Phasenkontrastmikroskop 320 x

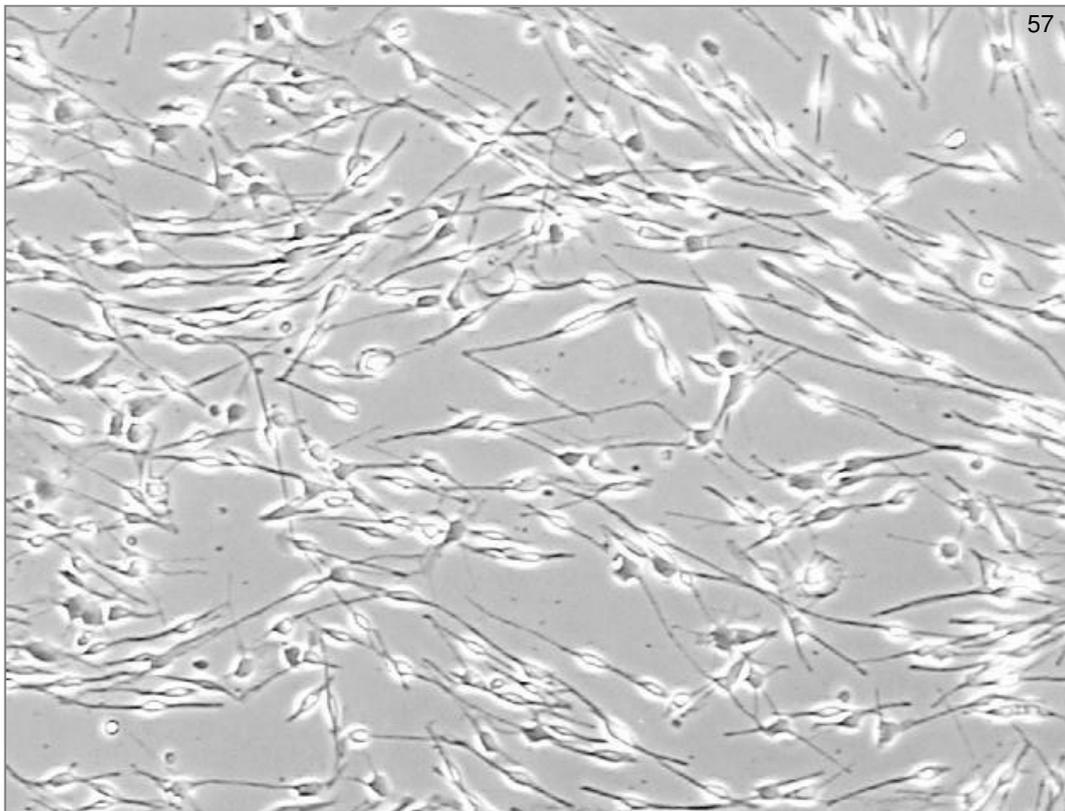
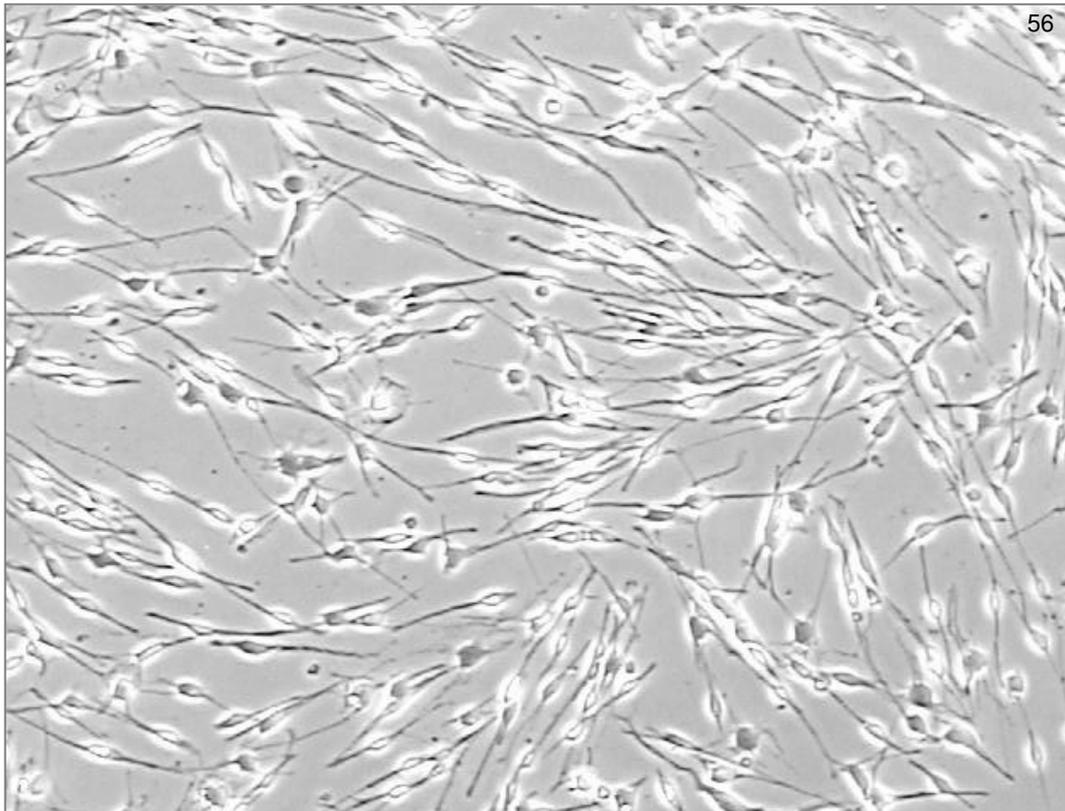
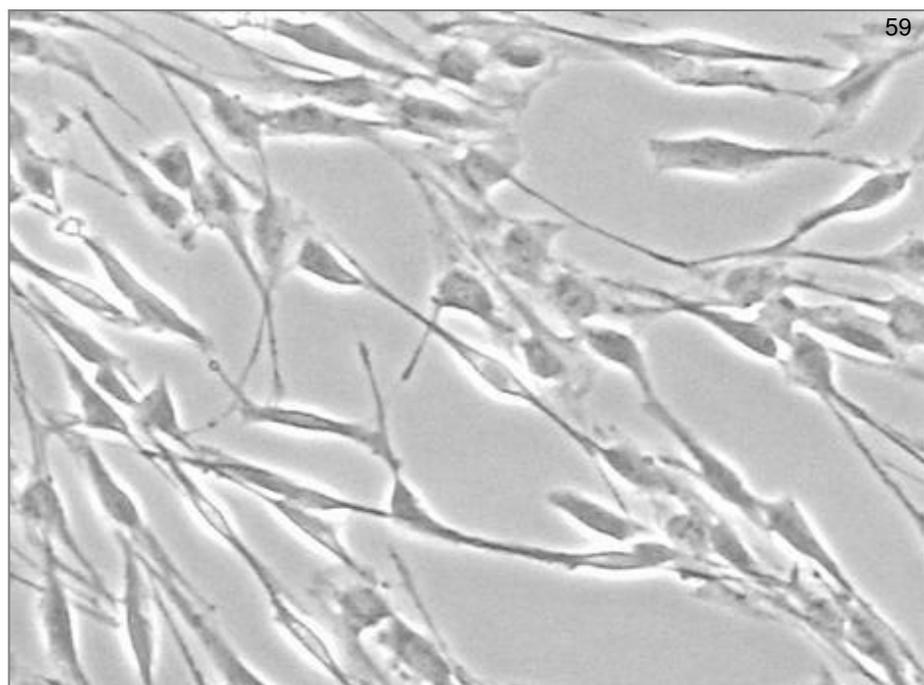
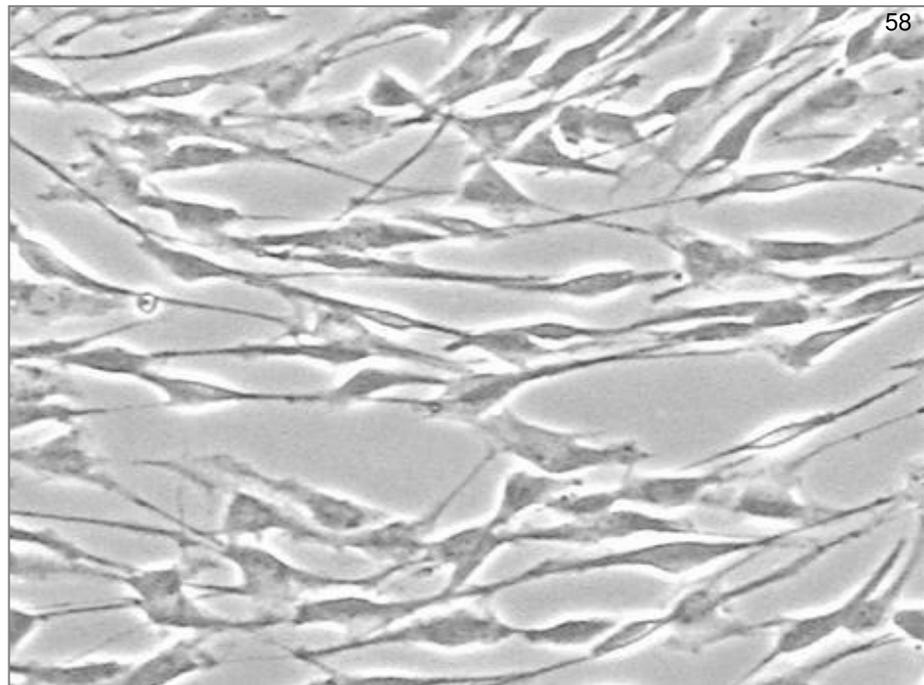


Abb. 56/57:
Schwannzell-Reinkultur aus dem caninen N. radialis, Passage 5, DMEM+,
Phasenkontrastmikroskop 100 x

5.2.4 Morphologie und Vitalität caniner Schwanzzellen vor und nach Kryokonservierung

Die aufgereinigten Schwanzzell-Kulturen wurden sowohl vor der Kryokonservierung als auch nach dem Auftauen phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich keinerlei Veränderungen der Zellmorphologie. Auch nach der Konservierung in flüssigem Stickstoff konnten die caninen Schwanzzellen weiter expandiert und passagiert werden (Abb. 58 und 59).

Abb. 58/59:
Schwanzzell-
Reinkulturen aus
dem N. ischiadicus
kultiviert in
DMEM+, vor
(Abb.58) und nach
(Abb.59)
Kryokonservierung
(Passage 5 und
6),
Phasenkontrast-
mikroskop 320 x



5.3 Morphologie und Proliferation caniner Schwanzzellen durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2

Neben der Gewinnung von Reinkulturen war die maximale Expansion der caninen Schwanzzellen in einem möglichst kurzen Zeitraum Ziel der vorliegenden Arbeit.

Als Wachstumsfaktoren wurden VEGF und FGF-2, welche auch als proangiogene Faktoren bekannt sind, gewählt, da für diese Faktoren ebenso eine besondere proliferative Wirkung auf die Zellen des Nervensystems beschrieben wurde.

5.3.1 Nachweis der Expression der Rezeptoren für die eingesetzten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2

Da für die Wirkung von Wachstumsfaktoren die Expression der entsprechenden Rezeptoren eine Voraussetzung ist, galt es, zunächst die in der Literatur für Schwanzzellen beschriebenen Rezeptoren VEGFR-2 und FGFR-3 nachzuweisen.

In den zur Untersuchung herangezogenen caninen Schwanzzell-Kulturen wurden beide Rezeptoren immunzytochemisch detektiert.

Für den VEGFR-2 war im Bereich des Zytoplasmas um den Zellkern herum die immunopositive Reaktion der caninen Schwanzzellen am deutlichsten ausgeprägt, auch die Zellfortsätze wiesen eine Markierung auf, die Zellkerne selbst blieben unmarkiert (Abb. 60).

Im Gegensatz dazu zeigten die anti-FGFR-3-markierten Zellen die intensivste immunopositive Reaktion in der Kernregion und im Bereich des Zytoplasmas um den Zellkern, wobei hier auch die Zellkerne deutlich angefärbt waren (Abb. 61).

Die immunopositive Reaktion des VEGFR-2 am Nervengewebschnitt fiel vergleichsweise schwach aus. Es konnte keine eindeutige Markierung der Zellkerne nachgewiesen werden, diese Beobachtung korreliert mit den immunzytochemischen Untersuchungen an den caninen Schwanzzellen in vitro. Markiert wurden verschiedene Strukturen innerhalb des Nervengewebes, vermutlich sowohl Zytoplasma-Anteile der Fibroblasten als auch der Schwanzzellen, damit wurde gezeigt, dass der VEGFR-2 innerhalb des Nervs exprimiert wird (Abb. 62).

Bei Anwendung des FGFR-3-Antikörpers am caninen Nervenschnitt wiesen verschiedene Strukturen eine deutlich immunopositive Reaktion auf, der FGFR-3 wird folglich innerhalb des Nervs exprimiert (Abb. 63).



Abb. 60:
Canine Schwannzellen aus dem N. ischiadicus mit anti-VEGFR-2 markiert, Primärantikörperkonzentration 1:400, Lichtmikroskop 400 x, immunopositive Reaktion der caninen Schwannzellen v.a. im Bereich des Zytoplasmas um den Zellkern und der Zellfortsätze, unmarkierte Zellkerne

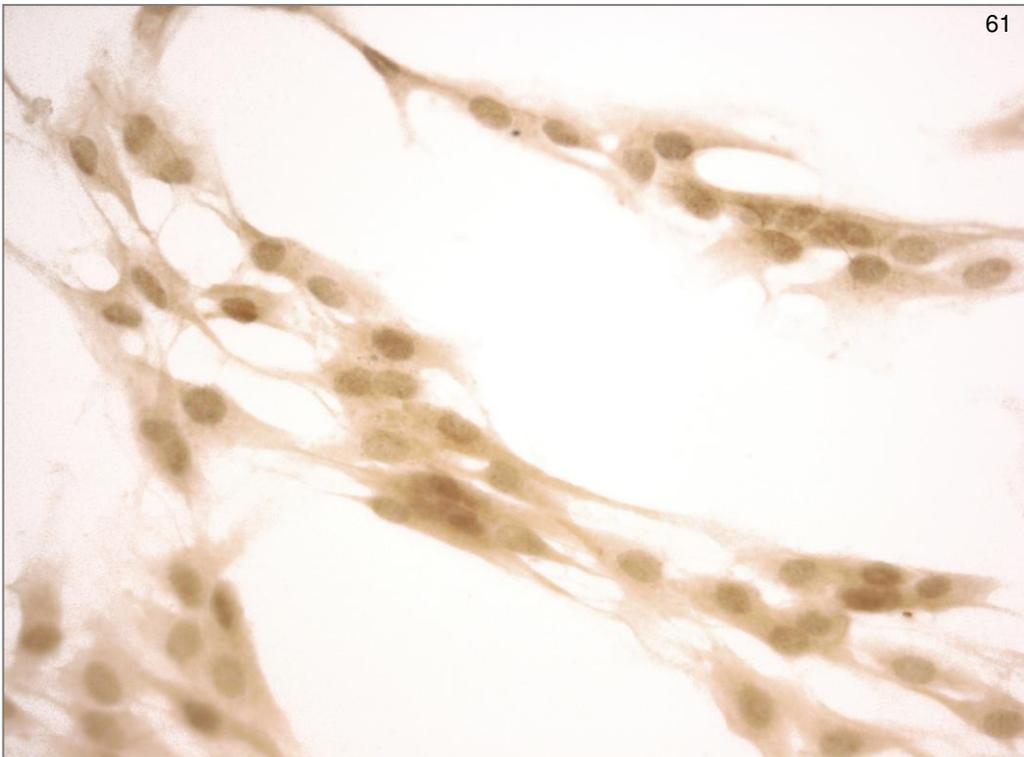


Abb. 61:
Anti-FGFR-3 markierte canine Schwannzellen, Verdünnung des Primärantikörpers 1:400, Lichtmikroskop 400 x, intensive immunopositive Reaktion der Schwannzellkerne und des Zytoplasmas einschließlich der Zellfortsätze

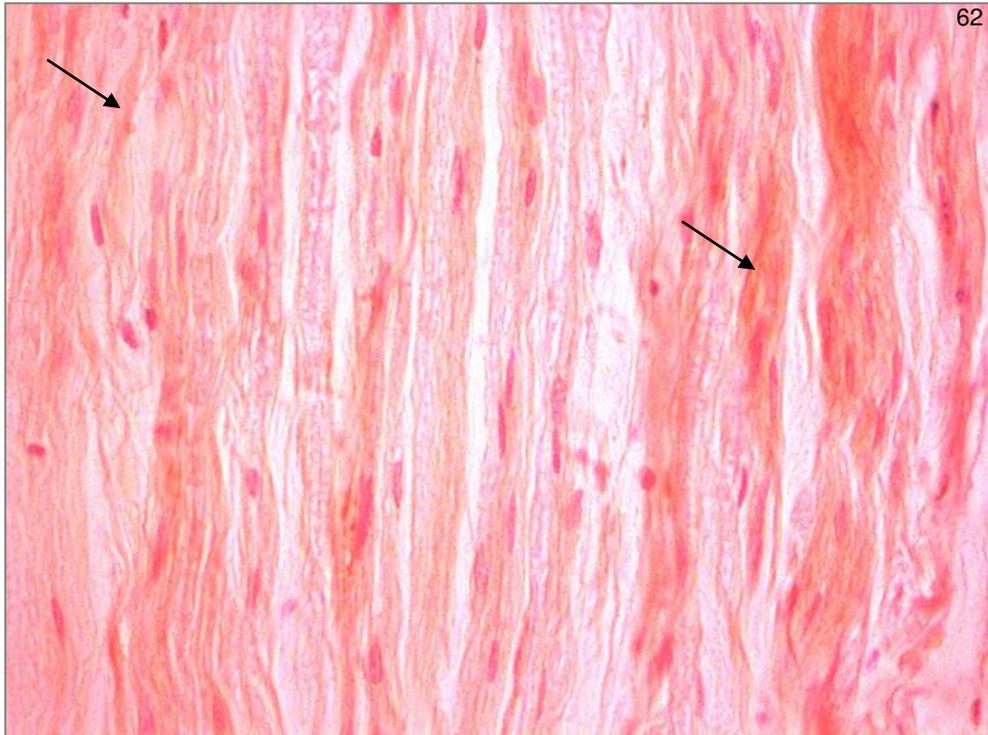


Abb. 62:

Längsschnitt durch canines Nervengewebe: immunhistochemische anti-VEGFR-2-Markierung verschiedener Strukturen, bei denen es sich vermutlich sowohl um Zytoplasma-Anteile von Schwannzellen als auch von Fibroblasten handelt (Pfeile), die Zellkerne bleiben unmarkiert, Verdünnung des Primärantikörpers 1:100, Lichtmikroskop 400 x.

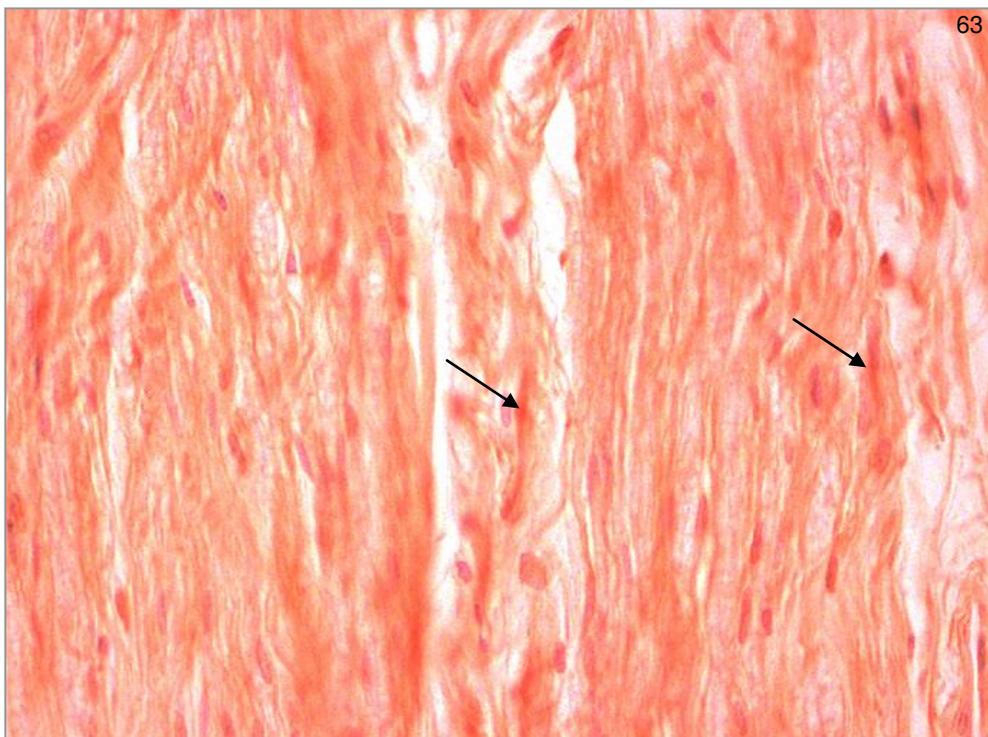


Abb. 63:

Längsschnitt durch canines Nervengewebe: anti-FGFR-3-immunhistochemische Markierung verschiedener Strukturen, bei denen es sich vermutlich sowohl um canine Schwannzellen als auch um Fibroblasten handelt (Pfeile), Verdünnung des Primärantikörpers 1:400, Lichtmikroskop 400 x.

5.3.2 Morphologie caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss der eingesetzten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2

Die caninen Schwanzzellen wurden in DMEM+ mit dem Zusatz von VEGF oder FGF-2 in den Konzentrationen 5, 10, 50 oder 100 ng/ml über einen Zeitraum von zwei Wochen inkubiert. Im Verlauf dieser Untersuchungen zeigten sich dabei keine Veränderungen in der Morphologie der Zellen.

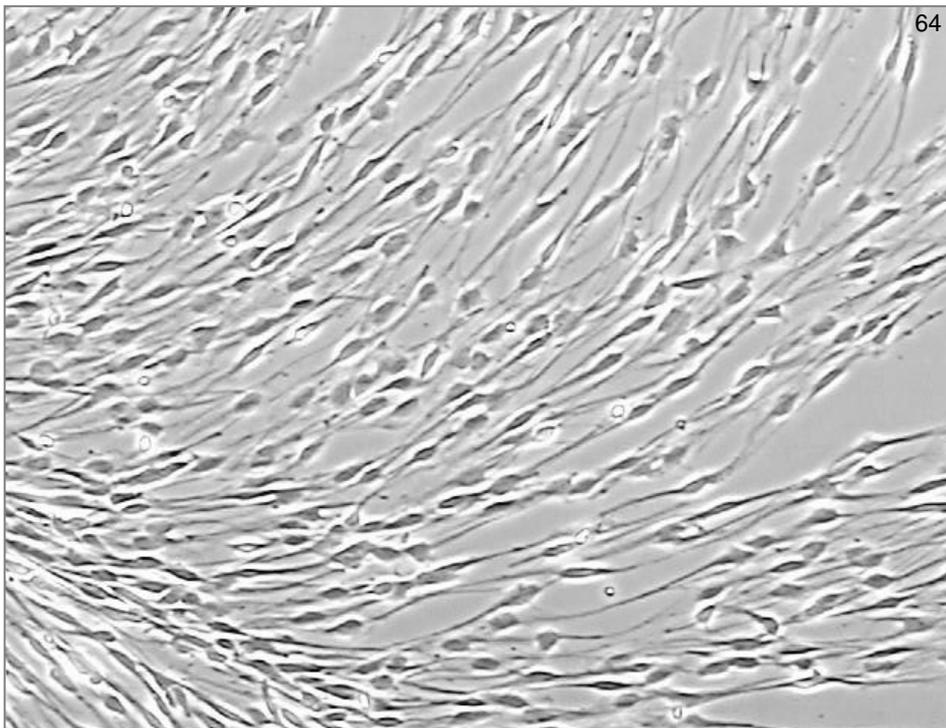


Abb. 64:
Canine Schwanzzellen kultiviert in DMEM+ mit 50 ng/ml VEGF. Typische spindelförmige bipolare Morphologie der Schwanzzellen, Phasenkontrastmikroskop 200 x

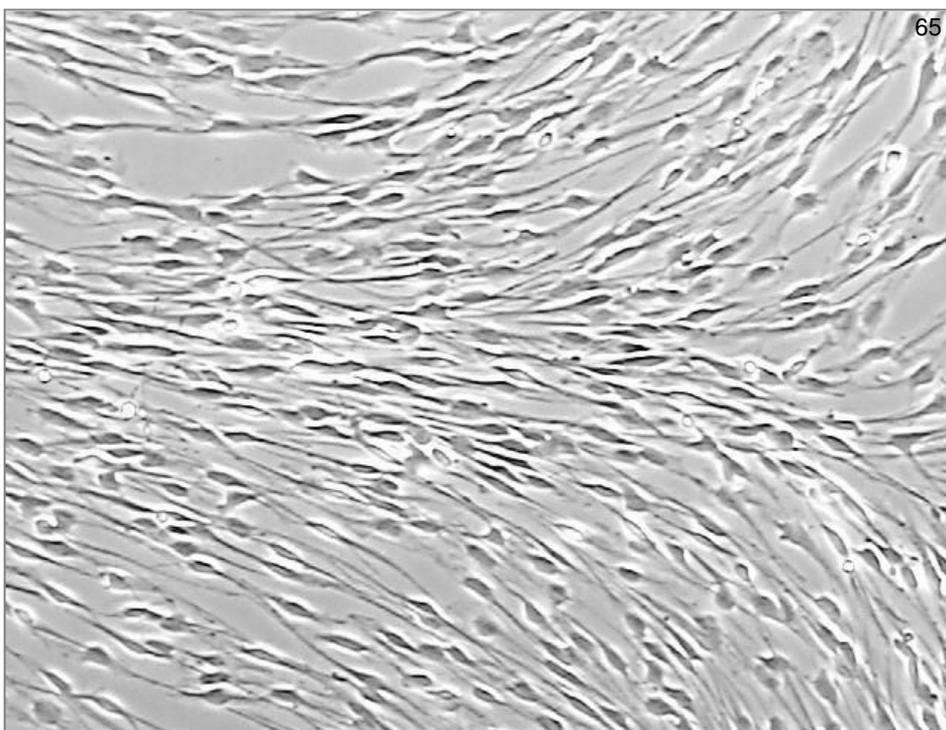


Abb. 65:
Canine Schwanzzellen kultiviert in DMEM+ mit 50 ng/ml FGF-2. Typische bipolare, spindelförmige Morphologie der Schwanzzellen, Phasenkontrastmikroskop 200 x

Diese erschienen ebenso spindelförmig und bipolar wie bei der Kultivierung in DMEM+ ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren (Abb. 64 und 65).

5.3.3 Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss der eingesetzten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2

In den ersten Untersuchungen zum proliferationsfördernden Effekt von VEGF und FGF-2 wurden diese beiden Faktoren separat in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in DMEM+ im Vergleich zu DMEM+ ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren untersucht. Anschließend erfolgte die quantitative Analyse des proliferativen Effektes aller genannten Kombinationen von VEGF und FGF-2 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml. Alle Versuche wurden sowohl mit dem BrdU-Assay als auch mit dem Resazurin-Resorufin-Assay durchgeführt und jeweils dreimal wiederholt. Die Zellen wurden hierfür in einer Konzentration von 10^3 pro Vertiefung ausgesät.

5.3.3.1 Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss von VEGF

Zur Untersuchung des proliferationsfördernden Effekts von VEGF auf canine Schwanzzellen wurde jede VEGF-Konzentration parallel sechsfach getestet und dreimal wiederholt (Diagramme 3 bis 8).

Die arithmetischen Mittel der IgZZ stiegen mit beiden verwendeten Proliferations-Assays beim Einsatz von 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml VEGF in DMEM+ mit zunehmender Konzentration von VEGF bis 50 ng/ml an. In allen Untersuchungen war das arithmetische Mittel der IgZZ bei einer VEGF-Konzentration von 50 ng/ml am höchsten. Eine weitere Steigerung der VEGF-Konzentration auf 100 ng/ml brachte keine Zunahme der IgZZ der caninen Schwanzzellen. Vielmehr lag der Mittelwert der mit 100 ng/ml erzielten IgZZ in allen Wiederholungen unter dem, der mit 50 ng/ml VEGF erreicht wurde. Die Schwanzzellen, die nur mit DMEM+ kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle und wiesen stets die geringste IgZZ auf. Schaut man sich den Mittelwert der IgZZ beim Zusatz von 50 ng/ml VEGF zu DMEM+ an, so lag dieser mit dem BrdU-Assay in der ersten Durchführung des Versuchs bei 3,6628 (Diagramm 3), in der zweiten Wiederholung bei 3,7929 (Diagramm 4) und in der dritten Wiederholung bei 3,4878 (Diagramm 5).

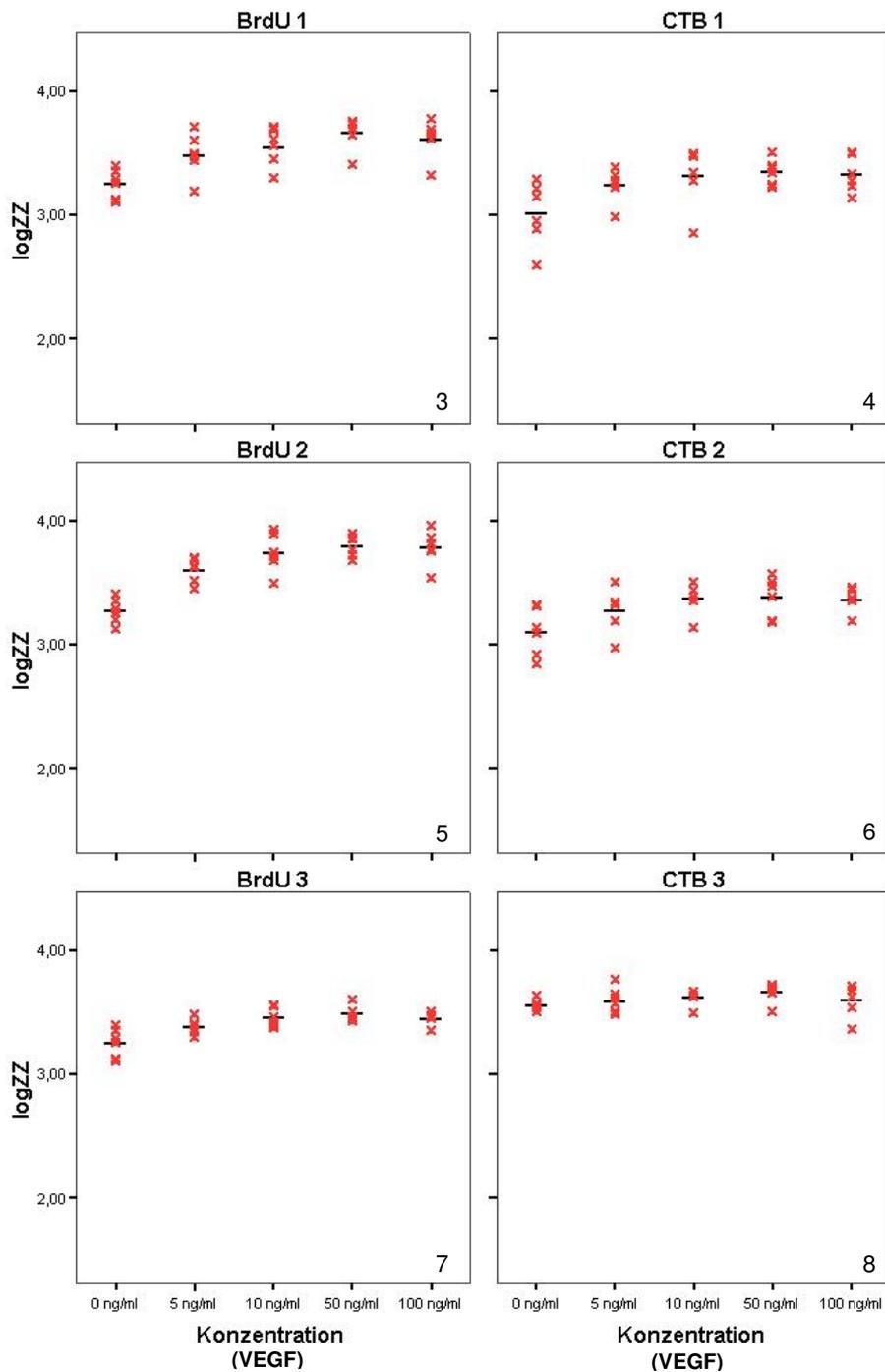


Diagramme 3-8:

Ergebnisse des proliferativen Effekts von VEGF auf canine Schwanzzellen, ermittelt mit Hilfe des BrdU- und des CTB-Assay:

VEGF wurde in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml eingesetzt. Die Streudiagramme zeigen die Ergebnisse des sechsfachen parallelen Ansatzes jeder Konzentration, außerdem ist für jede Konzentration der Mittelwert der erzielten IgZZ angegeben. Die höchste mittlere IgZZ wurde jeweils mit 50 ng/ml VEGF erzielt.

Die Diagramme 3, 4, 5 zeigen die Ergebnisse der dreimaligen Durchführung desselben Versuchs mit Hilfe des BrdU-Assay, die Diagramme 6, 7, 8 zeigen die Ergebnisse der dreimaligen Durchführung desselben Versuchs mit Hilfe des CTB-Assay.

Die logarithmischen Zellzahlen der nur in DMEM+ kultivierten Schwanzzellen waren dabei in allen Versuchsdurchgängen recht konstant mit im arithmetischen Mittel 3,2504 (Diagramm 3), 3,2692 (Diagramm 4) und 3,2515 (Diagramm 5).

Der Mittelwert der mit dem CTB-Assay in 50 ng/ml VEGF ermittelten logarithmischen Zellzahlen war in den ersten beiden Versuchsdurchgängen relativ vergleichbar mit 3,3183 (Diagramm 6) und 3,3782 (Diagramm 7). Bei der dritten Versuchsdurchführung wurde im Mittel eine höhere IgZZ von 3,6597 erzielt (Diagramm 8). Diese Tendenz lässt sich auch in den Mittelwerten der IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ ersehen. In den ersten beiden Versuchsdurchführungen lagen diese bei 3,0125 (Diagramm 6) und 3,1017 (Diagramm 7), im dritten Versuchsdurchgang dagegen bei 3,5594 (Diagramm 8). Die Ergebnisse beider Proliferations-Assays und aller Versuchsdurchgänge sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

VEGF					
Assay	Durchgang	Konzentration	Mittelwert	N	Standardabweichung
BrU	1	0 ng/ml	3.2504	6	0.11891
		5 ng/ml	3.4811	6	0.17461
		10 ng/ml	3.5502	6	0.15483
		50 ng/ml	3.6628	6	0.13044
		100 ng/ml	3.6143	6	0.15565
	2	0 ng/ml	3.2692	6	0.10140
		5 ng/ml	3.5993	6	0.09935
		10 ng/ml	3.7390	6	0.15624
		50 ng/ml	3.7929	6	0.08670
		100 ng/ml	3.7800	6	0.14106
	3	0 ng/ml	3.2515	6	0.11772
		5 ng/ml	3.3783	6	0.06182
		10 ng/ml	3.4563	6	0.07863
		50 ng/ml	3.4878	6	0.06243
		100 ng/ml	3.4465	6	0.05334
CTB	1	0 ng/ml	3.0125	6	0.25732
		5 ng/ml	3.2366	6	0.13855
		10 ng/ml	3.3461	6	0.10497
		50 ng/ml	3.3183	6	0.24668
		100 ng/ml	3.3251	6	0.14369

2	0 ng/ml	3.1017	6	0.19450
	5 ng/ml	3.2718	6	0.18001
	10 ng/ml	3.3725	6	0.12936
	50 ng/ml	3.3782	6	0.16518
	100 ng/ml	3.3583	6	0.09440
3	0 ng/ml	3.5594	6	0.04376
	5 ng/ml	3.5917	6	0.10261
	10 ng/ml	3.6169	6	0.06276
	50 ng/ml	3.6597	6	0.08153
	100 ng/ml	3.5950	6	0.12845

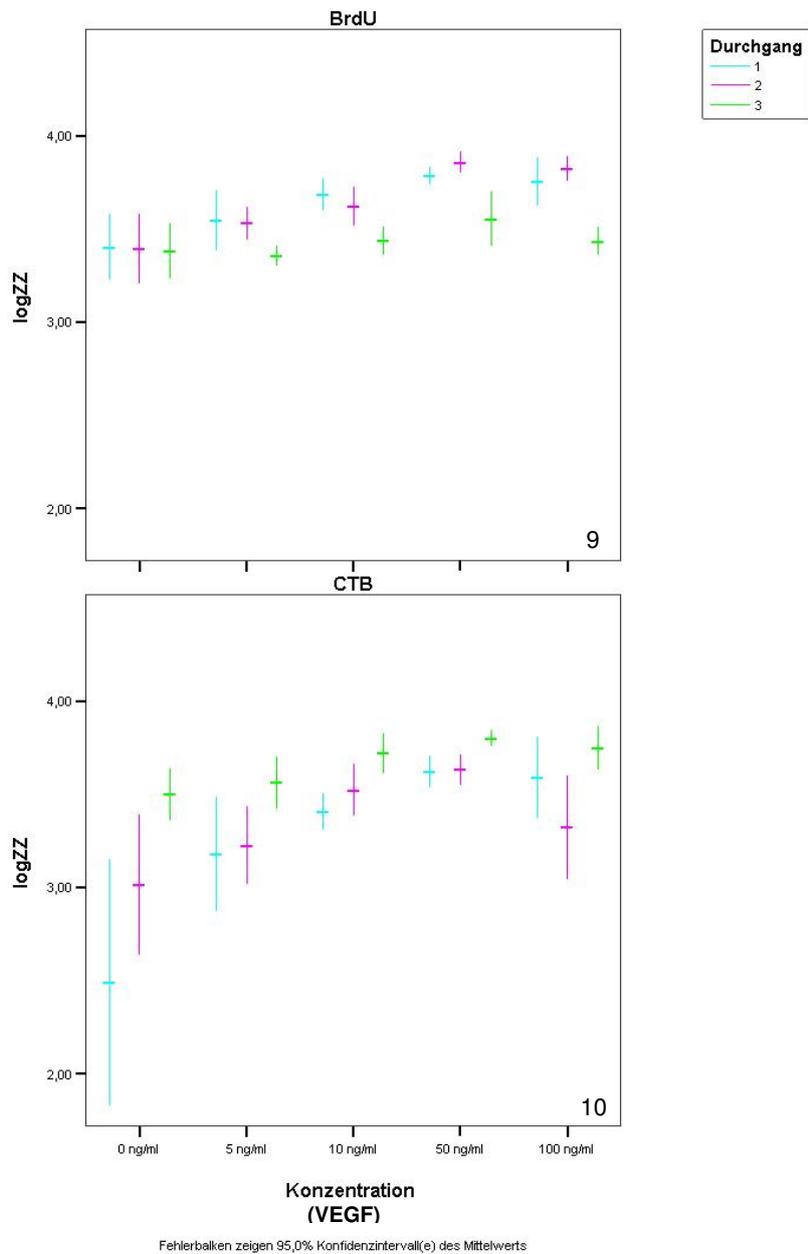
Tabelle 9:

Ergebnisse des proliferativen Effekts von VEGF auf canine Schwanzzellen: Alle Versuche wurden mit beiden Proliferations-Assays durchgeführt, sechsfach angesetzt (N=6) und dreimal wiederholt, angegeben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung der erzielten IgZZ für die jeweils eingesetzte Konzentration von VEGF.

Sowohl zwischen den Wiederholungen desselben Versuchs als auch zwischen den beiden verwendeten Proliferations-Assays zeigen die Ergebnisse insgesamt starke Schwankungen zwischen den ermittelten IgZZ.

Die mit dem CTB-Assay ermittelten IgZZ waren im Vergleich zu den mit dem BrdU-Assay ermittelten Zellzahlen in den ersten beiden Versuchsdurchführungen niedriger, aber im dritten Versuchsdurchgang höher (Diagramme 9 und 10). Zwischen den Versuchsdurchgängen zeigten sich bei Verwendung des BrdU-Assay stärkere Schwankungen als bei Nutzung des CTB-Assay. Hier waren die Ergebnisse im ersten und zweiten Durchlauf sehr konstant, im dritten Durchgang lagen die ermittelten IgZZ dagegen höher (Diagramme 9 und 10).

Mit beiden Proliferations-Assays und in allen Versuchsdurchgängen wurde jedoch die maximale mittlere IgZZ innerhalb des jeweiligen Versuchsdurchgangs mit der VEGF-Konzentration von 50 ng/ml erzielt.



**Diagramme 9 und 10:
Ergebnisse der drei Versuchsdurchgänge zur Ermittlung des proliferativen Effekts von VEGF auf canine Schwanzzellen, ermittelt mit Hilfe des BrdU- und des CTB-Assay:**

Mit dem CTB-Assay (Diagramm 10) wurden in den ersten beiden Versuchsdurchführungen niedrigere IgZZ, im dritten Versuchsdurchgang jedoch höhere IgZZ als mit dem BrdU-Assay (Diagramm 9) ermittelt.

Mit beiden Proliferations-Assays und in allen Versuchsdurchgängen wurde jedoch die maximale mittlere IgZZ innerhalb des jeweiligen Durchgangs bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in 50 ng/ml VEGF erzielt.

Aufgrund der signifikanten Wechselwirkungen in der dreifaktoriellen Varianzanalyse zwischen „Konzentration“ und „Assay“ sowie zwischen „Assay“ und „Durchgang“ wurden die Daten pro Assay bzw. pro Durchgang mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalysen ausgewertet. Da die ermittelten Zellzahlen in den unterschiedlichen Durchgängen und mit den beiden Assays so unterschiedlich waren, konnten sie nicht sinnvoll zusammengefasst werden, die Auswertung fand deshalb separat für jeden Assay und jeden Durchgang statt.

In den sich ergebenden sechs einfaktoriellen Varianzanalysen zeigten sich signifikante Unterschiede in den ermittelten Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationsstufen von VEGF. ($\alpha = 0.05$). Die signifikanten paarweisen Vergleiche nach Scheffé sind in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Vergleich	mittlere Differenzen der IgZZ, die signifikant von Null verschieden sind (Scheffé Test, $\alpha = 0.05$)					
	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3	
	BrdU	CTB	BrdU	CTB	BrdU	CTB
5 ng/ml - 0 ng/ml			0.3302			
10 ng/ml - 0 ng/ml	0.2998		0.4698		0.2049	
50 ng/ml - 0 ng/ml	0.4124		0.5237		0.2364	
100 ng/ml - 0 ng/ml	0.3640		0.5108		0.1951	
10 ng/ml - 5 ng/ml						
50 ng/ml - 5 ng/ml						
100 ng/ml - 5 ng/ml						
50 ng/ml - 10 ng/ml						
100 ng/ml - 10 ng/ml						
100 ng/ml - 50 ng/ml						

Tabelle 10:

Untersuchung der signifikanten Unterschiede in den erzielten IgZZ bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in DMEM+ gegenüber der Inkubation der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF und zwischen den unterschiedlichen VEGF-Konzentrationen

Bei Verwendung des BrdU-Assay ließen sich im ersten und dritten Durchgang jeweils statistisch signifikante Unterschiede der ermittelten IgZZ zwischen den in DMEM+ kultivierten Zellen und den Zellen, die in DMEM+ mit dem Zusatz von VEGF in den Konzentration 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert worden waren, feststellen. Im zweiten Versuchsdurchgang wurden statistisch signifikant unterschiedliche IgZZ bei Kultivierung der Zellen in DMEM+ im Vergleich zur Inkubation der Zellen in 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml VEGF ermittelt. Die erzielten IgZZ bei Kultivierung in den unterschiedlichen VEGF-Konzentrationen unterschieden sich in allen drei Versuchsdurchgängen nicht signifikant voneinander.

Die IgZZ, welche mit Hilfe des CTB-Assay bei Kultivierung caniner Schwanzzellen in DMEM+, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml VEGF ermittelt wurden, unterschieden sich in allen drei Versuchsdurchgängen nicht signifikant voneinander (Tabelle 10).

5.3.3.2 Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss von FGF-2

Zur Untersuchung des proliferationsfördernden Effekts auf canine Schwanzzellen kam auch FGF-2 in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml zum Einsatz, mit beiden Proliferations-Assays wurde jede dieser Konzentration parallel sechsfach getestet und dreimal wiederholt (Diagramme 11 bis 16). Wieder war mit beiden verwendeten Proliferations-Assays beim Einsatz von 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml FGF-2 in DMEM+, den arithmetischen Mittelwert betrachtend, mit zunehmender Konzentration des FGF-2 bis 50 ng/ml auch ein Anstieg der IgZZ messbar. In allen Untersuchungen wurde die höchste IgZZ caniner Schwanzzellen mit einer FGF-2-Konzentration von 50 ng/ml erreicht. Eine weitere Steigerung der FGF-2-Konzentration auf 100 ng/ml brachte keine weitere Zunahme der IgZZ caniner Schwanzzellen. Vielmehr lag der Mittelwert der mit 100 ng/ml erzielten IgZZ in allen Wiederholungen unter dem, der mit 50 ng/ml FGF-2 erreicht wurde. Die Schwanzzellen, die nur mit DMEM+ kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle und wiesen stets die geringste IgZZ auf (Diagramme 11 bis 16).

Schaut man sich den Mittelwert der logarithmischen Zellzahlen beim Zusatz von 50 ng/ml FGF-2 zu DMEM+ an, so wurden mit dem BrdU-Assay bei der ersten Durchführung des Versuchs eine IgZZ von 3.7877 (Diagramm 11), beim zweiten Durchgang von 3.8580 (Diagramm 12) und beim dritten Versuchsdurchgang von 3.5540 erzielt (Diagramm 13). Die IgZZ der nur in DMEM+ kultivierten Schwanzzellen waren dabei in allen drei Versuchsdurchgängen sehr konstant mit einem arithmetischen Mittelwert von 3.4036 (Diagramm 11), 3.3964 (Diagramm 12) und 3.3826 (Diagramm 13).

Wie auch in den Versuchen mit VEGF war der Mittelwert der mit dem CTB-Assay bei 50 ng/ml FGF-2 ermittelten logarithmischen Zellzahlen in den ersten beiden Versuchsdurchgängen vergleichbar mit 3.5885 (Diagramm 14) und 3.6322 (Diagramm 15). Bei der dritten Versuchsdurchführung wurde im Durchschnitt eine höhere IgZZ von 3.8023 erzielt (Diagramm 16). In den ersten beiden Versuchsdurchführungen war die IgZZ der in DMEM+ kultivierten Schwanzzellen im arithmetischen Mittel sehr gering, nämlich bei 2.4882 (Diagramm 14) und 3.0165 (Diagramm 15), im dritten Versuchsdurchgang dagegen lag sie bei 3.4996 (Diagramm 16).

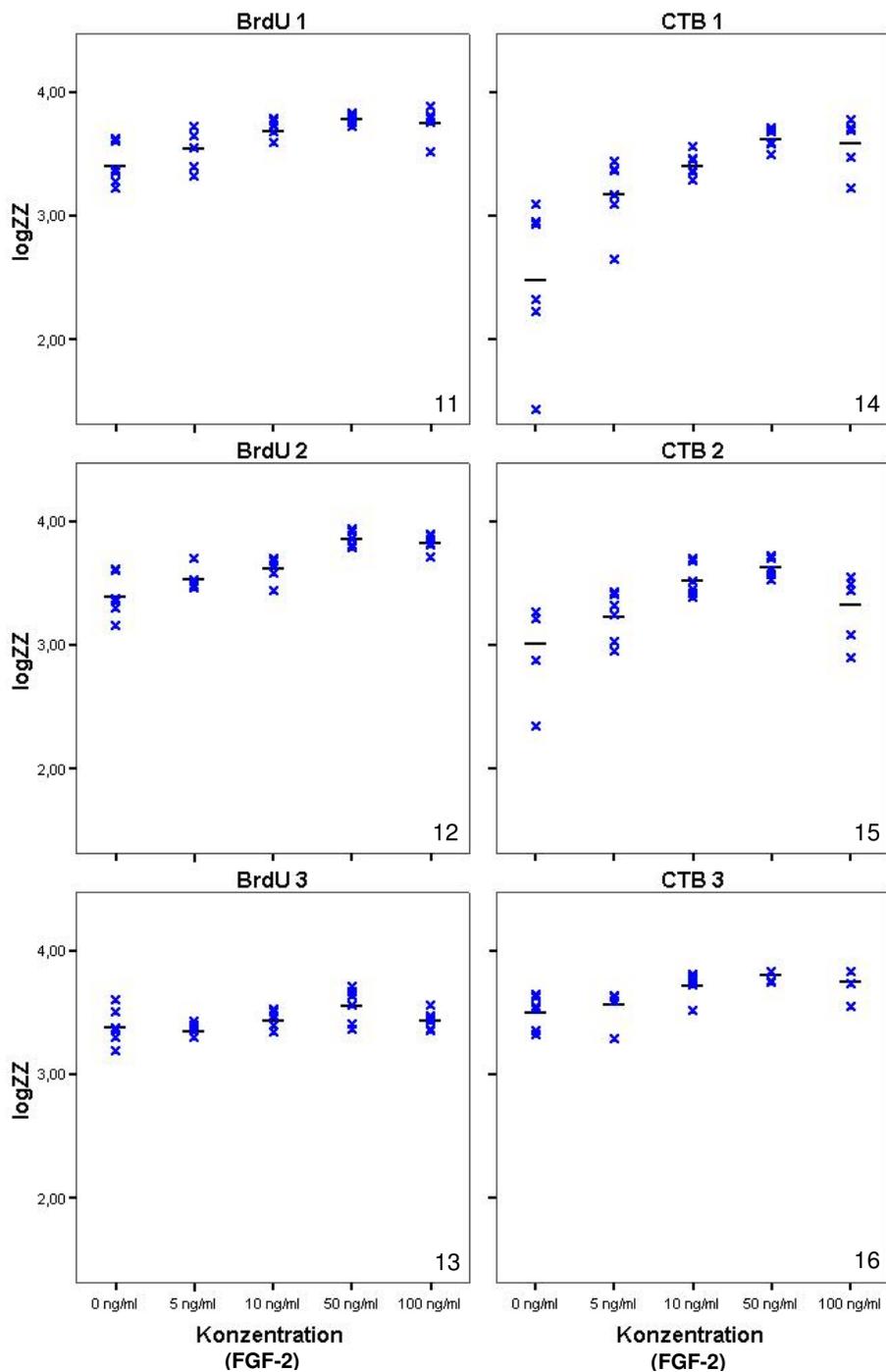


Diagramme 11-16:

Ergebnisse des proliferativen Effekts von FGF-2 auf canine Schwanzzellen, ermittelt mit Hilfe des BrdU- und des CTB-Assay:

FGF-2 wurde in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml eingesetzt. Die Streudiagramme zeigen die Ergebnisse des 6-fachen parallelen Ansatzes jeder Konzentration, außerdem ist für jede Konzentration der Mittelwert der erzielten lgZZ angegeben. Die maximale mittlere lgZZ wurde jeweils mit 50 ng/ml FGF-2 erzielt.

Die Diagramme 11, 12, 13 zeigen die Ergebnisse der dreimaligen Durchführung desselben Versuchs mit Hilfe des BrdU-Assay, die Diagramme 14, 15, 16 zeigen die Ergebnisse der dreimaligen Durchführung desselben Versuchs mit Hilfe des CTB-Assay.

FGF-2					
Assay	Durchgang	Konzentration	Mittelwert	N	Standardabweichung
BrdU	1	0 ng/ml	3.4036	6	0.16772
		5 ng/ml	3.5437	6	0.15626
		10 ng/ml	3.6857	6	0.08256
		50 ng/ml	3.7877	6	0.04448
		100 ng/ml	3.7543	6	0.12644
	2	0 ng/ml	3.3964	6	0.17790
		5 ng/ml	3.5326	6	0.08507
		10 ng/ml	3.6211	6	0.10039
		50 ng/ml	3.8580	6	0.05686
		100 ng/ml	3.8243	6	0.06455
	3	0 ng/ml	3.3826	6	0.14587
		5 ng/ml	3.3548	6	0.05383
		10 ng/ml	3.4359	6	0.07313
		50 ng/ml	3.5540	6	0.14022
		100 ng/ml	3.4351	6	0.07545
CTB	1	0 ng/ml	2.4882	6	0.63077
		5 ng/ml	3.1785	6	0.29441
		10 ng/ml	3.4089	6	0.09435
		50 ng/ml	3.5885	6	0.20886
		100 ng/ml	3.6217	6	0.08334
	2	0 ng/ml	3.0165	6	0.35870
		5 ng/ml	3.2263	6	0.19879
		10 ng/ml	3.5226	6	0.13363
		50 ng/ml	3.6322	6	0.08022
		100 ng/ml	3.3234	6	0.26597
	3	0 ng/ml	3.4996	6	0.13668
		5 ng/ml	3.5624	6	0.13640
		10 ng/ml	3.7212	6	0.10541
		50 ng/ml	3.8023	6	0.04419
		100 ng/ml	3.7479	6	0.11350

Tabelle 11:

Ergebnisse des proliferativen Effekts von FGF-2 auf canine Schwanzzellen: Alle Versuche wurden mit beiden Proliferations-Assays durchgeführt, sechsfach angesetzt (N=6) und dreimal wiederholt, angegeben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung der erzielten IgZZ für die jeweils eingesetzte Konzentration von FGF-2.

Die Ergebnisse beider Proliferations-Assays und aller Versuchsdurchgänge sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Auch diese Ergebnisse zeigen insgesamt eine starke Schwankung in den ermittelten lgZZ sowohl zwischen den Wiederholungen desselben Versuchs als auch zwischen den beiden verwendeten Proliferations-Assays. Wieder waren die mit dem CTB-Assay ermittelten lgZZ im Vergleich zu den mit dem BrdU-Assay ermittelten lgZZ in den ersten beiden Versuchsdurchführungen niedriger, aber im dritten Versuchsdurchgang höher. Innerhalb eines Assays zeigten sich zwischen den Versuchsdurchgängen bei Verwendung des BrdU-Assay stärkere Schwankungen als bei Nutzung des CTB-Assay (Diagramme 17 und 18). Mit beiden Proliferations-Assays und in allen Versuchsdurchgängen wurde die mittlere maximale lgZZ innerhalb des jeweiligen Versuchsdurchgangs mit der FGF-2-Konzentration von 50 ng/ml erzielt.

Wieder wurden die Daten aufgrund der signifikanten Wechselwirkungen in der 3- und 2-faktoriellen Varianzanalyse separat für jeden Assay und jeden Durchgang ausgewertet.

In den sich ergebenden sechs einfaktoriellen Varianzanalysen zeigten sich auch für FGF-2 signifikante Unterschiede in den ermittelten Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationsstufen von FGF-2. ($\alpha = 0.05$). Die signifikanten paarweisen Vergleiche nach Scheffé sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

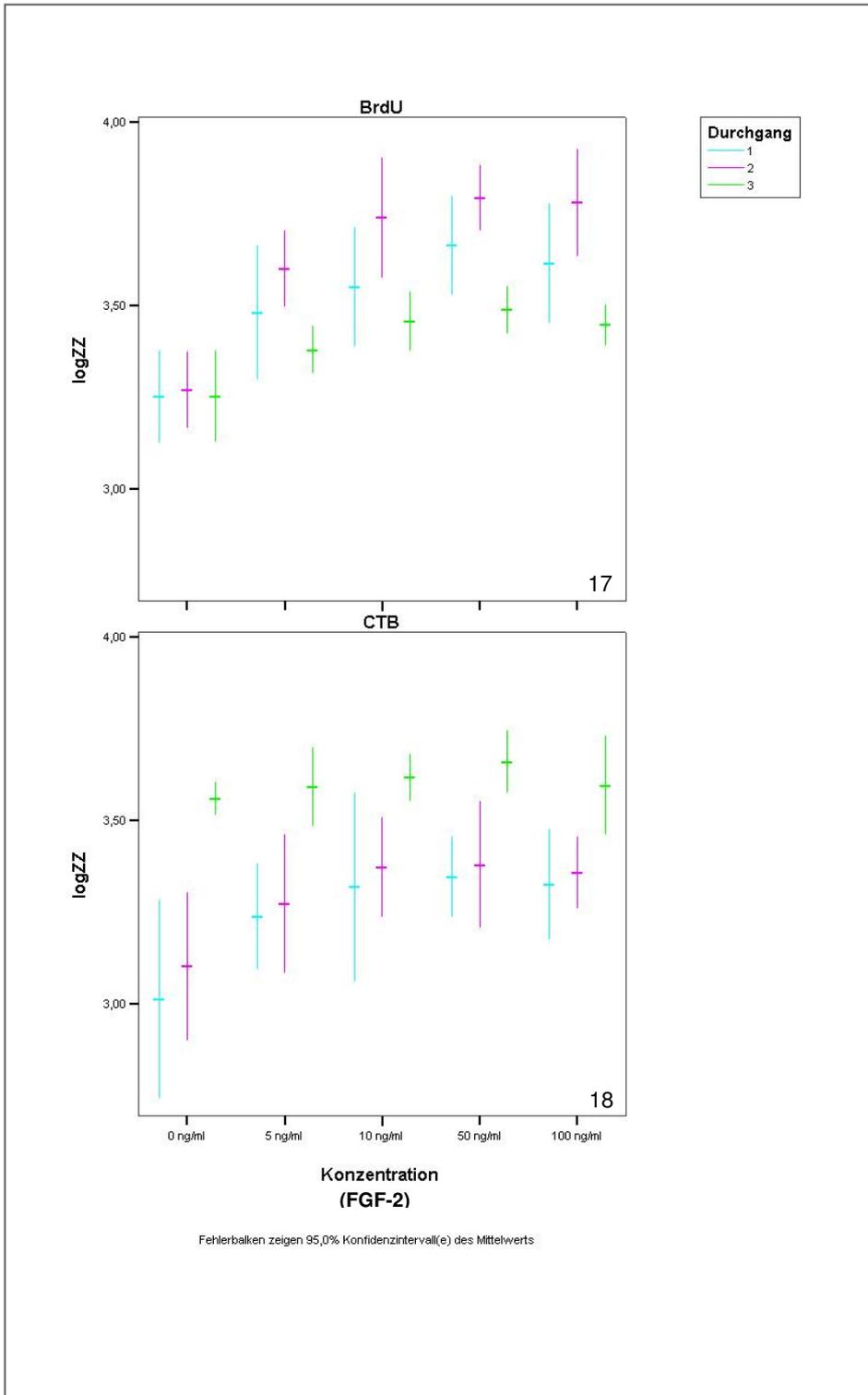


Diagramme 17 und 18:
Ergebnisse der drei Versuchsdurchgänge zur Ermittlung des proliferativen Effekts von FGF-2 auf canine Schwanzzellen, ermittelt mit Hilfe des BrdU- und des CTB-Assay:

Mit dem CTB-Assay (Diagramm 18) wurden in den ersten beiden Versuchsdurchführungen niedrigere lgZZ, im dritten Versuchsdurchgang jedoch höhere lgZZ als mit dem BrdU-Assay ermittelt.

Mit beiden Proliferations-Assays und in allen Versuchsdurchgängen wurde die maximale mittlere lgZZ innerhalb des jeweiligen Versuchsdurchgangs mit 50 ng/ml FGF-2 erzielt.

Vergleich	mittlere Differenzen der IgZZ, die signifikant von Null verschieden sind (Scheffé Test, $\alpha = 0.05$)					
	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3	
	BrdU	CTB	BrdU	CTB	BrdU	CTB
5 ng/ml - 0 ng/ml		.6902				
10 ng/ml - 0 ng/ml	0.2821	0.9207	0.2247	0.5061		0.2215
50 ng/ml - 0 ng/ml	.03840	1.1003	0.4616	0.6157		0.3026
100 ng/ml - 0 ng/ml	.03507	1.1335	0.4279			0.2483
10 ng/ml - 5 ng/ml						
50 ng/ml - 5 ng/ml	0.2440					0.2398
100 ng/ml - 5 ng/ml			0.2917			
50 ng/ml - 10 ng/ml			0.2369			
100 ng/ml - 10 ng/ml						
100 ng/ml - 50 ng/ml						

Tabelle 12:

Untersuchung der signifikanten Unterschiede in den erzielten IgZZ bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in DMEM+ gegenüber der Inkubation der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen von FGF-2 und zwischen den unterschiedlichen FGF-2-Konzentrationen

Mit dem BrdU-Assay wurden in den ersten beiden Versuchsdurchgängen statistisch signifikante Unterschiede der ermittelten IgZZ zwischen den in DMEM+ kultivierten Zellen und den Zellen, die in DMEM+ mit dem Zusatz von FGF-2 in den Konzentration 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert worden waren, festgestellt. Bei den Zellen, die in DMEM+ mit dem Zusatz von FGF-2 inkubiert wurden, zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in den erzielten IgZZ bei Inkubation der caninen Schwanzzellen in 5 ng/ml und 50 ng/ml FGF-2. Im zweiten Versuchsdurchgang zeigten sich außerdem statistisch signifikante Unterschiede bei den erzielten IgZZ zwischen den in 5 ng/ml und 100 ng/ml FGF-2 kultivierten Zellen, sowie beim Vergleich zwischen den in 10 ng/ml und 50 ng/ml FGF-2 kultivierten Zellen. Zwischen den im dritten Versuchsdurchgang ermittelten IgZZ waren keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen den IgZZ, die mit Hilfe des CTB-Assay ermittelt wurden, in allen drei Versuchsdurchgängen festgestellt. Im ersten Durchlauf unterschieden sich die IgZZ der in DMEM+ kultivierten Zellen und der Zellen, die in DMEM+ mit dem Zusatz von FGF-2 in den Konzentration 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert worden waren signifikant. Im zweiten Durchgang bestand ein signifikanter Unterschied in der IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ im Vergleich zur Kultivierung in DMEM+ mit FGF-2 in den Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml. Im dritten Durchlauf unterschieden sich die IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ signifikant von den IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ mit 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml. Zwischen den IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ mit dem Zusatz von 5 ng/ml und 50 ng/ml war ebenso ein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Tabelle 12).

5.3.3.3 Proliferation caniner Schwanzzellen: VEGF versus FGF-2

Vergleicht man die Mittelwerte der mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren erzielten IgZZ, so fällt auf, dass bei Kultivierung der Zellen in 50 ng/ml FGF-2 eine höhere IgZZ ermittelt wurde als bei Inkubation der Zellen in 50 ng/ml VEGF.

Mittels des t-Tests wurden die mit VEGF und FGF-2 in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml erzielten IgZZ untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in 50 ng/ml FGF-2 signifikant höhere IgZZ erzielt wurden, als bei Inkubation in 50 ng/ml VEGF ($\alpha = 0.05$).

5.3.3.4 Proliferation caniner Schwanzzellen unter dem Einfluss von VEGF und FGF-2

Nach der Untersuchung des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2 als alleinigem Wachstumsfaktor wurden im Folgenden VEGF und FGF-2 in Kombination hinsichtlich ihres stimulierenden Effekts auf canine Schwanzzellen untersucht. Dabei wurden die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren, mit denen die höchsten Zellzahlen erzielt worden waren (10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in DMEM+), in allen möglichen Kombinationen eingesetzt. Als Negativkontrolle kam DMEM+ ohne den Zusatz von VEGF und FGF-2 zum Einsatz. Auch hier wurde mit beiden Proliferations-Assays jede dieser Konzentration parallel sechsfach getestet und die Untersuchung dreimal wiederholt (Diagramme 19 bis 24).

Im Ergebnis führte eine geringere VEGF-Konzentration in Kombination mit höheren FGF-2-Konzentrationen zu den höchsten mittleren IgZZ. Den arithmetischen Mittelwert betrachtend wurde mit beiden Proliferations-Assays die höchste IgZZ caniner Schwanzzellen entweder mit der Kombination von 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 oder 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 erzielt.

Schaut man sich den Mittelwert der logarithmischen Zellzahlen beim Zusatz von 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 zu DMEM+ an, so lag dieser mit dem BrdU-Assay bei der ersten Durchführung des Versuchs bei 3,7642 (Diagramm 19), beim zweiten Durchgang höher bei 4,0184 (Diagramm 20) und beim dritten Versuchsdurchgang wieder mit der ersten Durchführung vergleichbar bei 3,6211 (Diagramm 21). Die mittleren IgZZ der nur in DMEM+ kultivierten Schwanzzellen zeigten die gleiche Tendenz, sie waren im ersten und dritten Versuchsdurchgang bei 3,5548 (Diagramm 19) und 3,4796 (Diagramm 21) vergleichbar, bei der zweiten Versuchsdurchführung dagegen bei 3,8993 (Diagramm 20).

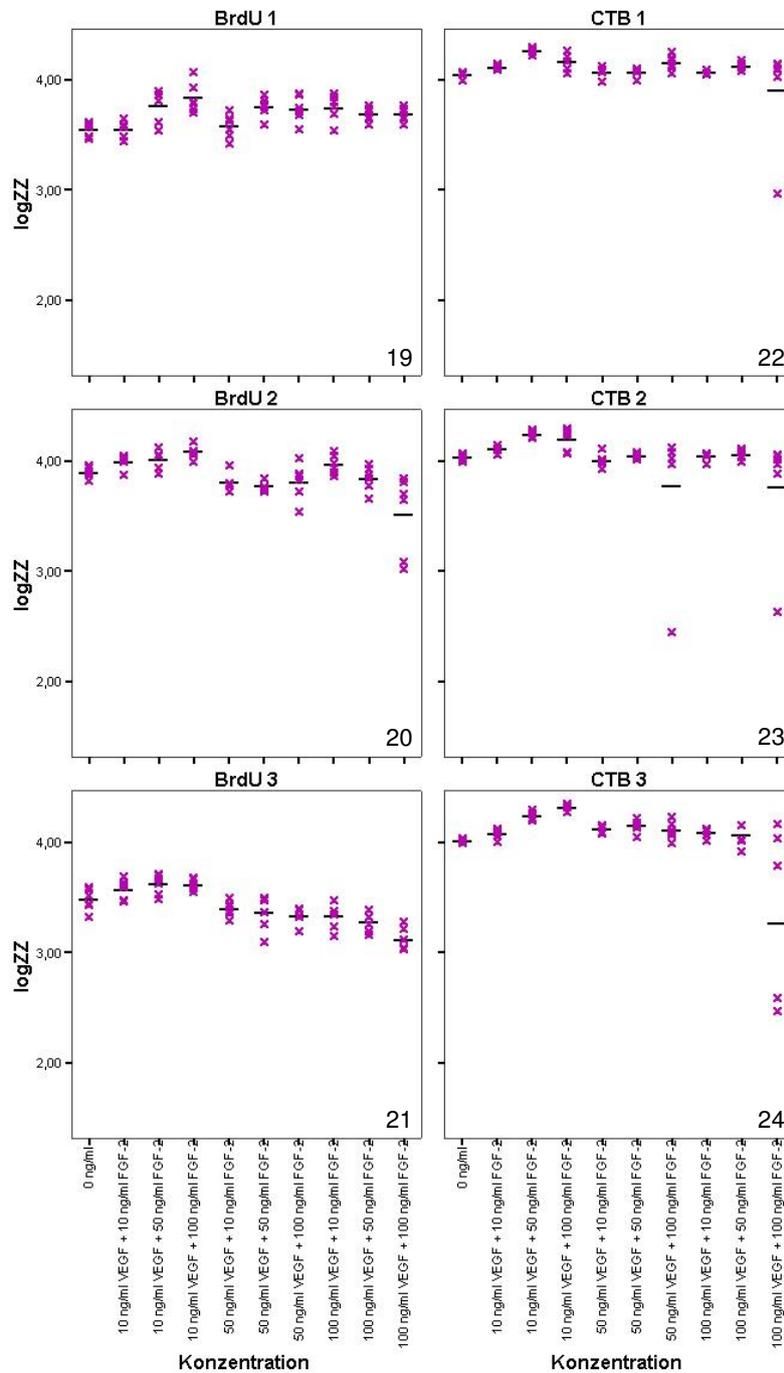


Diagramme 19-24:
Ergebnisse des proliferativen Effekts von VEGF in Kombination mit FGF-2 auf canine Schwanzzellen, ermittelt mit Hilfe des BrdU- und des CTB-Assay:

VEGF und FGF-2 wurden kombiniert in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die Streudiagramme zeigen die Ergebnisse des 6-fachen parallelen Ansatzes jeder Kombination, außerdem ist für jede Kombination der Mittelwert der erzielten IgZZ angegeben.

Die höchste mittlere IgZZ wurde jeweils mit 10 ng/ml VEGF kombiniert mit 50 ng/ml FGF-2 oder 100 ng/ml FGF-2 erzielt.

Die Diagramme 19, 20, 21 zeigen die Ergebnisse der dreimaligen Durchführung desselben Versuchs mit Hilfe des BrdU-Assay, die Diagramme 22, 23, 24 zeigen die Ergebnisse der dreimaligen Durchführung desselben Versuchs mit Hilfe des CTB-Assay.

Die erzielten IgZZ der caninen Schwanzzellen bei Kultivierung in 10 ng/ml VEGF in Kombination mit 100 ng/ml FGF-2 waren mit 3,8381 (Diagramm 19) und 3,6187 (Diagramm 21) in der ersten und dritten Versuchsdurchführung ebenfalls vergleichbar und lagen innerhalb des Versuchsdurchgangs jeweils knapp unter der IgZZ, die mit 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 erzielt wurde. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml VEGF mit 4,0963 eine noch höhere IgZZ caniner Schwanzzellen erzielt als mit 10 ng/ml VEGF in Kombination mit 50 ng/ml FGF-2 (Diagramm 20).

Die mit dem CTB-Assay ermittelten IgZZ der caninen Schwanzzellen, die in DMEM+ kultiviert wurden, waren in allen drei Versuchsdurchgängen vergleichbar und betragen 4,0506 (Diagramm 22), 4,0351 (Diagramm 23) und 4,0193 (Diagramm 24). Auch mit der Kombination aus 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 wurden mit 4,2656 (Diagramm 22), 4,2423 (Diagramm 23) und 4,2408 (Diagramm 24) sehr vergleichbare IgZZ erzielt.

Eine stärkere Abweichung zeigte sich in der IgZZ bei Kultivierung in 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2. Hier wurde im ersten Versuchsdurchlauf mit 4,1700 eine geringere IgZZ als mit der Kombination von 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 erzielt (Diagramm 22). Im zweiten und dritten Versuchsdurchgang waren die erzielten IgZZ mit 4,2018 (Diagramm 23) und 4,3211 (Diagramm 24) höher gegenüber den mit 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 erreichten Zellzahlen. Die Ergebnisse beider Proliferations-Assays und aller Versuchsdurchgänge sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

VEGF und FGF-2					
Assay	Durchgang	Konzentration	Mittelwert	N	Standardabweichung
BrdU	1	0 ng/ml	3.5548	6	0.06350
		10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.5529	6	0.07758
		10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.7642	6	0.15213
		10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.8381	6	0.13954
		50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.5795	6	0.10903
		50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.7558	6	0.09225
		50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.7386	6	0.12057
		100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.7501	6	0.12247
		100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.6888	6	0.06292
		100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.6888	6	0.06292
	2	0 ng/ml	3.8993	6	0.05135
		10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.9916	6	0.05870
		10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.0184	6	0.08815

		10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	4.0963	6	0.07200
		50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.8063	6	0.07965
		50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.7797	6	0.04917
		50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.8127	6	0.16468
		100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.9723	6	0.08662
		100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.8429	6	0.11020
		100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.5162	6	0.37038
	3	0 ng/ml	3.4796	6	0.10288
		10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.5762	6	0.09341
		10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.6211	6	0.09447
		10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.6187	6	0.04843
		50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.3964	6	0.07235
		50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.3618	6	0.16041
		50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.3284	6	0.07631
		100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	3.3278	6	0.11923
		100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	3.2836	6	0.09455
		100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.1191	6	0.10587
CTB	1	0 ng/ml	4.0506	6	0.02688
		10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.1153	6	0.01787
		10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.2656	6	0.02372
		10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	4.1700	6	0.07644
		50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.0753	6	0.04375
		50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.0715	6	0.04178
		50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	4.1546	6	0.06694
		100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.0656	6	0.02088
		100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.1292	6	0.03267
		100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.9109	6	0.46597
	2	0 ng/ml	4.0351	6	0.02851
		10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.1119	6	0.03288
		10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.2423	6	0.02996
		10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	4.2018	6	0.10051
		50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.0069	6	0.05877
		50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.0531	6	0.02284

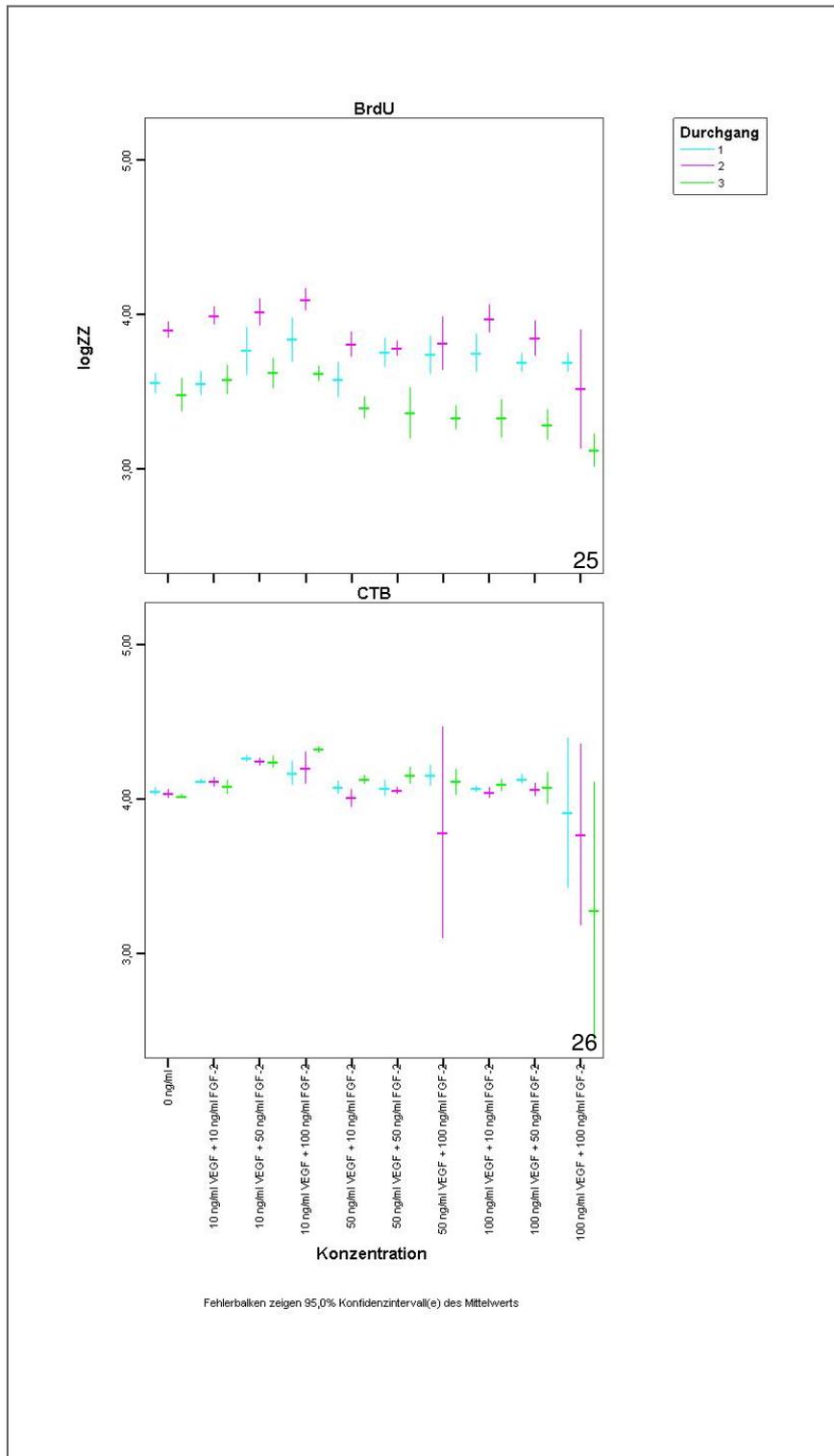
		50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.7810	6	0.65551
		100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.0435	6	0.03395
		100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.0629	6	0.04249
		100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.7693	6	0.56288
	3	0 ng/ml	4.0193	6	0.01406
		10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.0801	6	0.04525
		10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.2408	6	0.04050
		10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	4.3211	6	0.02362
		50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.1268	6	0.03090
		50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.1514	6	0.05551
		50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	4.1128	6	0.08287
		100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	4.0925	6	0.03969
		100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2	4.0722	6	0.10049
		100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2	3.2725	6	0.80274

Tabelle 13:

Ergebnisse des proliferativen Effekts von VEGF in Kombination mit FGF-2 auf canine Schwannzellen: Alle Versuche wurden mit beiden Proliferations-Assays durchgeführt, sechsfach angesetzt (N=6) und dreimal wiederholt, angegeben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung der erzielten IgZZ für die jeweils eingesetzte Konzentration von VEGF und FGF-2.

Die Ergebnisse zeigten wieder starke Schwankungen zwischen den beiden verwendeten Proliferations-Assays. Mit dem CTB-Assay wurden im Vergleich zum BrdU-Assay in allen Versuchsdurchgängen höhere IgZZ erzielt (Diagramme 25 und 26). Die Ergebnisse der 3 Versuchsdurchgänge waren sehr konstant (Diagramm 26). Bei Verwendung des BrdU-Assay variierten die Ergebnisse zwischen den Wiederholungen desselben Versuchs stärker (Diagramm 25).

Bemerkenswert bleibt aber, dass trotz aller Schwankungen mit beiden Proliferations-Assays und in allen Versuchsdurchgängen die maximale mittlere IgZZ innerhalb des jeweiligen Versuchsdurchgangs mit 10 ng/ml VEGF in Kombination mit FGF-2 in der Konzentration 50 ng/ml oder 100 ng/ml erzielt wurde.



**Diagramme 25 und 26:
Ergebnisse der drei Versuchsdurchgänge zur Ermittlung des proliferativen Effekts von VEGF in Kombination mit FGF-2 auf canine Schwanzzellen, ermittelt mit Hilfe des BrdU- und des CTB-Assay:**

Mit dem CTB-Assay wurden im Vergleich zum BrdU-Assay in allen Versuchsdurchgängen höhere IgZZ erzielt, die Ergebnisse der drei Versuchsdurchgänge waren sehr konstant (Diagramm 26).

Bei Verwendung des BrdU-Assay variierten die Ergebnisse zwischen den Wiederholungen desselben Versuchs (Diagramm 25).

Mit beiden Proliferations-Assays und in allen Versuchsdurchgängen wurde die maximale mittlere IgZZ innerhalb des jeweiligen Versuchsdurchgangs mit 10 ng/ml VEGF in Kombination mit FGF-2 in der Konzentration 50 ng/ml oder 100 ng/ml erzielt.

Wieder wurden die Daten aufgrund der signifikanten Wechselwirkungen in der drei- und zweifaktoriellen Varianzanalyse separat für jeden Assay und jeden Durchgang ausgewertet. In den sich ergebenden sechs einfaktoriellen Varianzanalysen zeigten sich signifikante Unterschiede in den ermittelten IgZZ zwischen den unterschiedlichen Kombinationen von VEGF und FGF-2 ($\alpha = 0.05$). Die signifikanten paarweisen Vergleiche nach Scheffé sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

Vergleich	mittlere Differenzen der IgZZ, die signifikant von Null verschieden sind (Scheffé Test, $\alpha = 0.05$)					
	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3	
	BrdU	CTB	BrdU	CTB	BrdU	CTB
10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml	0.2833					
50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml						
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 0 ng/ml			0.3831			0.7468
10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2	0.2852					
50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2					0.2926	
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2			0.4754		0.4570	0.8076
10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						
50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						
50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2					0.2593	
50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2					0.2927	

100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2					0.2933	
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2					0.3375	
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2			0.5022		0.5020	0.9684
50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2						
50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2					0.2569	
50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2					0.2903	
100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2					0.2909	
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2					0.3351	
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 10 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2			0.5801		0.4996	1,0486
50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2					0.2772	0.8544
50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						0.8789
100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 50 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2						0.8403
100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2 - 100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2						
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 100 ng/ml VEGF + 10 ng/ml FGF-2			0.4561			0.8201
100 ng/ml VEGF + 100 ng/ml FGF-2 - 100 ng/ml VEGF + 50 ng/ml FGF-2						0.7997

Tabelle 14:

Untersuchung der signifikanten Unterschiede in den erzielten IgZZ bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in DMEM+ gegenüber der Inkubation der Zellen in unterschiedlichen Kombinationen von VEGF und FGF-2 und zwischen den unterschiedlichen Kombinationen von VEGF und FGF-2

Mit dem BrdU-Assay zeigten sich im ersten Versuchsdurchgang statistisch signifikante Unterschiede der ermittelten IgZZ zwischen den in DMEM+ kultivierten Zellen und den Zellen, die in DMEM+ mit dem Zusatz von 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 inkubiert worden waren. Auch zwischen den IgZZ der mit der Kombination 10 ng/ml VEGF und 10 ng/ml FGF-2 sowie 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 behandelten Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede. Im zweiten Durchgang wurde die geringste IgZZ mit der Kombination 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 erzielt. Diese unterschied sich signifikant von den IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ sowie der erzielten IgZZ bei Inkubation in DMEM+ und 10 ng/ml VEGF mit 10 ng/ml FGF-2 und 10 ng/ml VEGF mit 50 ng/ml FGF-2 sowie 10 ng/ml VEGF mit 100 ng/ml FGF-2 und 100 ng/ml VEGF mit 10 ng/ml FGF-2. Mit dem Zusatz von 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 zu DMEM+ wurde auch im dritten Versuchsdurchlauf die geringste IgZZ erreicht, sie unterschied sich wieder signifikant von der erzielten IgZZ bei Kultivierung in DMEM+. Auch zwischen den durch Inkubation in unterschiedlichen Kombinationen von VEGF und FGF-2 erzielten IgZZ waren teilweise signifikante Unterschiede festzustellen. Dies war der Fall bei der Kombination von 10 ng/ml VEGF und 10 ng/ml FGF-2 im Vergleich zu 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 sowie 100 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2, ebenso bei 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 im Vergleich zu 50 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2, 50 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2, 100 ng/ml VEGF und 10 ng/ml FGF-2, 100 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 sowie 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2.

Auch zwischen der erzielten IgZZ bei Inkubation in 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 im Vergleich zu den erzielten IgZZ bei Kultivierung in 50 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2, 50 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2, 100 ng/ml VEGF und 10 ng/ml FGF-2, sowie 100 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2, als auch 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 zeigten sich signifikante Unterschiede.

Die IgZZ bei Kultivierung in 50 ng/ml VEGF und 10 ng/ml FGF-2 unterschieden sich signifikant von der bei Inkubation in 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen den IgZZ, die mit Hilfe des CTB-Assay ermittelt wurden, in den ersten beiden Versuchsdurchgängen nicht festgestellt. Im dritten Durchlauf unterschieden sich die IgZZ der in DMEM+ mit 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 inkubierten Zellen und der Zellen, die in reinem DMEM+ kultiviert wurden signifikant voneinander. Auch die Unterschiede der erzielten IgZZ zwischen den in 100 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 kultivierten Zellen und den IgZZ, die mit jeder anderen Kombination der beiden Wachstumsfaktoren erzielt wurden, waren statistisch signifikant (Tabelle 14).

5.3.3.5 Proliferation caniner Schwanzzellen: VEGF und FGF-2 versus Kombinationen von VEGF und FGF-2

Die Mittelwerte der IgZZ, die bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in der Kombination aus 10 ng/ml VEGF mit 50 ng/ml FGF-2 oder 100 ng/ml FGF-2 erzielt wurden, waren im direkten Vergleich höher als die bei Kultivierung in 50 ng/ml VEGF oder 50 ng/ml FGF-2 erzielten Zellzahlen, allerdings waren in diesen Versuchen auch die IgZZ der in reinem DMEM+ kultivierten Zellen höher; nur einmal wurde mit Hilfe des BrdU-Assay ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der erzielten IgZZ bei Kultivierung in DMEM+ und der Inkubation in 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 nachgewiesen (Tabelle 14).

Die Ergebnisse der ermittelten IgZZ bei Inkubation der caninen Schwanzzellen in unterschiedlichen Kombinationen von VEGF und FGF-2 wurden aus diesem Grund nicht direkt mit den Ergebnissen der Kultivierung caniner Schwanzzellen in VEGF oder FGF-2 verglichen.

Die vorhandenen operativen Versorgungsmöglichkeiten traumatisch bedingter Nervenläsionen, welche bei Hunden den größten Anteil peripherer Nervenerkrankungen darstellen, führen bis heute überwiegend zu unbefriedigenden funktionellen Ergebnissen.

Studien an Ratten und Mäusen haben gezeigt, dass mit autologen Schwanzzellen beladene artifizielle Nervenimplantate eine viel versprechende Behandlungsstrategie darstellen (MAY et al., 2005; HOOD et al., 2009; DE RUITER et al., 2009). Wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung solcher Implantate ist die Isolierung reiner autologer Schwanzzell-Kulturen und deren Expansion in vitro.

Da bislang noch kein entsprechendes Modell für den Hund existiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Isolierung und Purifikation caniner Schwanzzell-Kulturen entwickelt. Zusätzlich wurde geprüft, ob die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2, für welche in der Literatur eine proliferative Wirkung auf Schwanzzellen beschrieben wird (SONDELL et al., 1999a; SONDELL et al., 1999b; SCHRATZBERGER et al., 2000; DAVIS und STROOBANT, 1990; HAASTERT et al., 2007), zur Expansion der caninen Schwanzzell-Kulturen geeignet sind.

Als Resultat wurde ein Leitschema zur Isolierung und Expansion caniner Schwanzzell-Kulturen unter Einsatz von VEGF und FGF-2 entwickelt.

6.1 Von der Nervenbiopsie zur Schwanzzell-Kultur

Auf dem Weg der Entwicklung der Methode zur effektiven Kultivierung caniner Schwanzzellen galt es zuerst steriles Nervengewebe zu gewinnen. Aus diesen Nervenbiopsien wurden Zellen isoliert, bei denen es sich zunächst um Mischkulturen handelte. Der nächste wichtige Schritt bestand in der Purifikation dieser Mischkulturen zu reinen Schwanzzell-Kulturen.

In jedem Abschnitt dieses Prozesses mussten spezifische Probleme überwunden werden.

6.1.1 Gewinnung der Biopsien – Gefahr der Kontamination

Bei Primärisolierungen besteht die größte Gefahr der Kontamination des Zellmaterials bei der Entnahme der Nervenbiopsien durch die Keimflora der Tierkörper (VIERCK et al., 2000). Dieses Risiko verringerte sich nur geringgradig bei der Präparation der Nervenbiopsien,

welche unter Zuhilfenahme eines Lupenmikroskops erfolgen musste und daher nicht unter der Reinraumwerkbank durchgeführt werden konnte.

Die weitere Bearbeitung der gewonnenen Nervenexplantate erfolgte unter Zellkultur-üblichen Bedingungen. Zur Verhinderung einer bakteriellen Kontamination wurden dem Zellkulturmedium Penicillin und Streptomycin als Antibiotikum zugesetzt.

Da in den aus den ersten beiden Tieren gewonnenen Zellkulturen eine Kontamination mit Hefepilzen auftrat, wurde bei allen folgenden Isolierungen und Kultivierungen dem Kulturmedium von Anfang an prophylaktisch Partricin als Antimykotikum zugefügt, um einem erneuten Pilzbefall vorzubeugen (RIMAROLI und BRUZZESE, 2000).

6.1.2 Identifizierung der Biopsien – Nachweis des charakteristischen strukturellen Aufbaus des Nervengewebes

Im Rahmen der histologischen Untersuchung der entnommenen Biopsien wurde mittels HE-Färbung das Ausgangsmaterials eindeutig als Nervengewebe, bestehend aus Axonen, Bindegewebe und Schwannzellen, identifiziert. Zur Herstellung der Nervenexplantate wurden die entnommenen Nervenbiopsien so präpariert, dass möglichst viel Bindegewebe entfernt wurde. In anderen Studien wird diese Präparation als „Befreiung von Epi- und Perineurium“ beschrieben (PAULS, 2003; PAULS et al. 2004). Jedoch zeigte sich in den histologischen Untersuchungen, dass die gewonnenen Nervenfaserbündel noch weitestgehend vom Perineurium umhüllt waren.

Die Osmiumtetroxid-Hämatoxylin-Färbung wurde verwendet, um Myelinscheiden nachzuweisen. Das Schwermetall Osmium liegt im neutralen pH-Bereich stark positiv geladen vor und hat damit eine hohe Affinität zu negativ geladenen Elementen, wie beispielsweise den negativ geladenen Phosphaten der Phospholipidmembran der Zellen (BERG et al., 2007). Da die Myelinscheide aus Stapeln von Schwannzell-Membranen besteht, wird sie mit Hilfe dieser Färbung dargestellt. Auf diese Weise wurde an den Semidünnschnitten gezeigt, dass es sich um myelinisierte Nerven handelte.

Zur Detektion von Schwannzellen werden routinemäßig hauptsächlich zwei verschiedene Antikörper verwendet, zum einen gegen das intrazelluläre Kalzium-bindende Protein S-100 (MORRISSEY et al., 1991; ANSSELIN et al., 1995; FANSA et al., 2003), zum anderen gegen den p75-NTR (YASUDA et al., 1987; VROEMEN und WEIDNER, 2003).

Canine Schwanzzellen wurden bislang nur eindeutig über den p75-NTR identifiziert, die Markierung des S-100-Proteins verlief erfolglos (PAULS, 2003; PAULS et al., 2004).

Daher wurden sowohl in den histologischen Schnitten des gesamten Nervs als auch in den Semidünnschnitten der präparierten Nervenfaserbündel die Schwanzzellen immunhistochemisch mit anti-p75-NTR markiert und in situ identifiziert. Bei der Behandlung der Semidünnschnitte fiel neben der eindeutigen spezifischen Markierung der Schwanzzellen eine geringgradige unspezifische bräunliche Färbung des gesamten Präparats auf. Da diese unspezifischen Reaktionen jedoch sowohl bei der Reaktion als auch bei den Kontrollen deutlich wurden, konnten sie nicht durch den Primärantikörper bedingt sein, sondern können unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers zugeschrieben werden.

6.1.3 Explantation der Nervenbiopsien mit anschließender Dissoziation - Vor- und Nachteile gegenüber der sofortigen Dissoziation

Bei der Gewinnung von Schwanzzell-Kulturen aus Nervenexplantaten ist eine prinzipielle Unterscheidung zwischen zwei unterschiedlichen Methoden zu treffen. Zum einen die sofortige Dissoziation der Nervenbiopsien und zum anderen die Reexplantier-Methode, bei der zunächst die Nervenexplantate inkubiert und wiederholt umgesetzt werden. Die Dissoziation der Explantate findet bei der letztgenannten Methode erst zu einem späteren Zeitpunkt statt.

Der in der Literatur beschriebene Vorteil der Reexplantier-Methode gegenüber der sofortigen Dissoziation des Nervenmaterials liegt in der höheren Zellausbeute (ASKANAS et al., 1980; MORRISSEY et al., 1991). Durch das Umsetzen der Explantate in frische Petrischalen und das Verbleiben der ausgewanderten Fibroblasten in den alten Petrischalen verringert sich der Fibroblasten-Anteil. In den inkubierten Nervenexplantaten läuft die Wallersche Degeneration *in vitro* ab. Diese wirkt stimulierend auf die Proliferation der Schwanzzellen (MORRISSEY et al., 1991).

Der Nachteil der Reexplantier-Methode ist der lange Zeitraum, der durch das wiederholte Umsetzen der Nervenexplantate benötigt wird. Bei der Isolierung und Vermehrung humaner Schwanzzellen hat sich eine Verkürzung der Reexplantier-Phase als optimale Prozedur zur Gewinnung möglichst reiner Schwanzzell-Kulturen mit hoher Zellzahl herausgestellt. Die Nervenexplantate werden bereits nach ein bis zwei Wochen Inkubation dissoziiert, dies hat sich als ausreichend erwiesen, um die Proliferation der Schwanzzellen durch die Wallersche Degeneration zu stimulieren sowie die schnell aus den Explantaten auswandernden Fibroblasten zu eliminieren (TURNBULL, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zur Isolierung caniner Schwanzzellen aus der von PAULS (2003) für canine Schwanzzellen etablierten Reexplantier-Methode entwickelt. Jedoch wurde die Reexplantier-Phase in Anlehnung an die Methode der Isolierung humaner Schwanzzellen auf 21 Tage reduziert und auf diesen Zeitraum standardisiert. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass dieser Zeitraum genügte, um nach der Dissoziation der Nervenexplantate eine geeignete Zellpopulation zu erhalten.

Die Nervenexplantate einer jeden Nervenbiopsie wurden auf die Vertiefungen einer kollagenbeschichteten Kulturplatte verteilt. Für das Auswachsen der Zellen aus den Nervenexplantaten war es wichtig, dass die Explantate an der Kollagenbeschichtung des Kulturschalenbodens haften blieben. Wenn sich Explantate lösten und im Medium schwammen, wuchsen keine Zellen aus. Es zeigte sich, dass die Anhaftung der Explantate von ihrer Größe abhängig und bei einer Länge der Nervenexplantate von unter zwei mm gewährleistet war. Zusätzlich ließ sich die Effektivität der Anheftung erhöhen, indem die von PAULS (2003) angegebene Wartezeit von fünf Minuten zum Anheften der Explantate auf zehn Minuten verlängert wurde, bevor die Explantate vorsichtig mit dem Medium überschichtet wurden.

Außer in DMEM+ wurden die Nervenexplantate auch in MM+ inkubiert. Dieses Medium wurde bereits erfolgreich zur Kultivierung von Schwanzzellen der Ratte und des Menschen eingesetzt (MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2006b; HAASTERT et al., 2007). In den eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass bei Inkubation der Explantate in serumfreiem MM+ die Konzentration an Schwanzzellen bei den auswachsenden Zellen deutlich höher war als bei Inkubation in DMEM+. Die gesamte Zellausbeute in MM+ war allerdings so gering, dass für eine effiziente Gewinnung caniner Schwanzzell-Kulturen aus den präparierten Nervenexplantaten die Reexplantation in serumhaltigem DMEM+ empfehlenswert ist.

Bei der enzymatischen Behandlung der Nervenexplantate im Rahmen der eigenen Untersuchungen erfolgte nicht immer eine vollständige Dissoziation der Nervenstrukturen. In Einzelfällen blieben im Überstand weiße fadenartige Schlieren zurück. Möglicherweise waren in diesen Fällen größere Explantate enthalten und die Inkubationszeit im Verdauungsansatz war nicht ausreichend, um das Nervengewebe zu dissoziieren. Da bei längerer Inkubation jedoch die Gefahr bestand, die Zellen zu zerstören, wurde die Dauer nicht verlängert. In anderen Untersuchungen wurde die Dissoziation der Nervenexplantate durch eine geringere Dosierung der Verdauungsenzyme (Kollagenase 0,05%ig und Dispase 0,25%ig), aber eine längere Inkubationsdauer von 12 bis 18 Stunden, empfohlen (MORRISSEY et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 1992; CASELLA et al., 1996).

6.1.4 Purifikation der aus den Nervenexplantaten hervorgegangenen Mischkulturen - Gewinnung reiner Schwanzzell-Kulturen

Nach der Isolierung war die Purifikation der Mischkulturen zu reinen Schwanzzell-Kulturen ein wesentliches Ziel dieser Arbeit.

In Vorversuchen wurden die nach Dissoziation der Nervenexplantate gewonnenen Mischkulturen in einem für canine Schwanzzellen empfohlenen Selektivmedium kultiviert (PAULS, 2003; PAULS et al., 2004). Dieses Medium enthielt Substanzen (Forskolin, PEX, Cholera toxin und Heregulin), die selektiv proliferationsfördernd auf Schwanzzellen und gleichzeitig inhibierend auf das Fibroblastenwachstum wirken sollen. Die Kombination aus Heregulin mit cAMP-steigernden Substanzen (Cholera toxin und Forskolin) führte auch bei adulten humanen Schwanzzellen zu selektiven proliferationsfördernden Bedingungen (LEVI et al., 1995). Dieser Effekt wurde in den eigenen Untersuchungen für canine Schwanzzellen nicht bestätigt. Vielmehr kam es zu einer schnellen Überwucherung der Schwanzzellen durch die Fibroblasten, die eine nachvollziehbare Vermehrung der Schwanzzellen unmöglich machte.

Eine weitere, relativ einfache Methode, um Schwanzzell-Kulturen mit einem hohen Reinheitsgrad zu gewinnen, wird als „Cold Jet“ bezeichnet (JIRSOVA et al., 1997). Hier werden die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften von Schwanzzellen und Fibroblasten als Reaktion auf einen Kälteschock ausgenutzt. Auf diese Weise ließen sich 95-99% reine Ratten-Schwanzzell-Kulturen gewinnen. Auch auf die Purifikation von humanen adulten Schwanzzell-Kulturen konnte diese Methode erfolgreich übertragen werden (HAASTERT et al., 2007). Der Versuch der Anwendung des „Cold Jets“ bei caninen Schwanzzell-Kulturen war in den eigenen Untersuchungen nicht erfolgreich, es war keine zuverlässige Ablösung der Schwanzzellen vom Kulturschalenboden möglich.

Eine andere Herangehensweise zur Anreicherung von Schwanzzellen in einer Schwanzzell-Fibroblasten-Mischkultur stellt der Einsatz von Cytosin-Arabinosid (Ara-C) dar, einem Zytostatikum, welches das Fibroblastenwachstum hemmt. Ara-C hat aber bei häufiger Verabreichung auch einen zytotoxischen Effekt auf adulte humane Schwanzzellen gezeigt (CALDERON-MARTINEZ et al., 2002). In anderen Untersuchungen wurde durch Ara-C sowohl ein hemmender Effekt auf die Proliferation von sowohl Fibroblasten als auch Schwanzzellen festgestellt (HAASTERT et al., 2007). Im Mittelpunkt der eigenen Untersuchungen stand jedoch die Suche nach einer geeigneten Methode innerhalb der Mischkulturen Schwanzzellen anzureichern und gleichzeitig Fibroblasten zu eliminieren, die frei von zytotoxischen Effekten sein sollte.

Im Zuge der Vermehrung der aus den Nervenexplantaten isolierten caninen Schwanzzellen zeigte sich ein Phänomen, welches zur Purifikation der Schwanzzell-Kulturen herangezogen

werden konnte. Nachdem sich ein gleichmäßiger Zellrasen in den Zellkulturschalen gebildet hatte, wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Kulturschalenboden gelöst, um sie auf jeweils drei Zellkulturschalen zu verteilen. Während das Trypsin auf die Zellen einwirkte, ließ sich im Phasenkontrastmikroskop beobachten, wie die Zellen ihre Anheftung zum Boden verloren und sich abrundeten. Auffällig dabei war, dass dies bei den Schwanzzellen nach sehr kurzer Zeit (max. eine Minute) einsetzte, während der Großteil der Fibroblasten erst nach einer deutlich längeren Einwirkzeit des Trypsins (mehrere Minuten) mit der Ablösung vom Kulturschalenboden begann. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Anheftung der Zellen am Kulturschalenboden liegt in der sehr verschiedenartigen Morphologie von Fibroblasten und Schwanzzellen. Schwanzzellen sind spindelförmig und sehr lang gezogen, sie besitzen sehr wenig Zytoplasma und lange Fortsätze und nehmen damit eine relativ kleine Fläche am Boden ein. Fibroblasten stehen dagegen mit ihrem sehr viel höheren Zytoplasma-Anteil und viel weniger ausgebildeten Fortsätzen über eine sehr viel breitere Fläche mit ihrem Untergrund in Kontakt. Fibroblasten sind außerdem bekannt für ihre Kollagensynthese und gelten als Quelle für eine Vielzahl weiterer extrazellulärer Matrixproteine (CAMELLITI et al., 2005). Dies könnte zu einer stabileren Verbindung der Fibroblasten mit der Kollagenbeschichtung des Kulturschalenbodens führen als es bei Schwanzzellen der Fall ist. Diese produzieren zwar auch extrazelluläre Matrixmoleküle, jedoch nicht in den gleichen Mengen wie Fibroblasten.

Aufgrund dieses Phänomens ließen sich mittels wiederholter kurzzeitiger Trypsinierungen zuverlässig immer reinere Schwanzzell-Kulturen gewinnen.

Während der Phase der Anreicherung der caninen Schwanzzell-Kulturen durch wiederholte kurzzeitige Trypsinierungen empfahl sich die Verwendung des Melanozyten-Wachstums-Mediums (MM+), da durch die Kultivierung in diesem serumfreien Medium eine sehr viel effektivere Anreicherung der Schwanzzellen erzielt wurde, Grund hierfür war in erster Linie, das schlechte Wachstum der Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen.

Dass Schwanzzellen in einem Melanozyten-Wachstums-Medium kultivierbar sind, überrascht wenig, wenn man bedenkt, dass sowohl Schwanzzellen wie auch Melanozyten der gleichen Zellpopulation, nämlich den Zellen der Neuralleiste entstammen. In Untersuchungen zur Kultivierung von Schwanzzellen des Menschen und der Ratte wurden verschiedene serumfreie Medien vergleichend untersucht (MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2006b; HAASTERT et al., 2007). Nach diesen Studien wird ein Melanozyten-Wachstums-Medium mit Zusatz von Forskolin, FGF-2 und PEX als optimal angesehen, um Schwanzzell-Kulturen mit hohem Reinheitsgrad zu erzielen. Nach der Erfahrung dieser Autoren können nur serumfreie Medien die Überwucherung der Schwanzzellen durch Fibroblasten unterdrücken (MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2007). Andere Autoren geben zur

Kultivierung von Schwanzzellen eindeutig serumhaltigen Medien den Vorzug (KEILHOFF et al., 1999; CASELLA et al., 2000; FANSA et al., 2003).

DAVIS und STROOBANT (1990) beschrieben die Entwicklung einer ausgeprägten spindelförmigen Gestalt der Schwanzzellen bei Kultivierung in serumfreiem Medium. Diese Veränderung der Morphologie wurde bestätigt und zeigte sich bei Inkubation der Schwanzzellen in MM+ im Gegensatz zu DMEM+ dadurch, dass die Zellkörper der Schwanzzellen noch schmaler wurden, die Zellfortsätze deutlich länger waren und kaum noch Zytoplasma auszumachen war.

Die immunzytochemische Identifizierung caniner Schwanzzellen wurde auch in vitro mit Hilfe des monoklonalen p75-NTR-Antikörpers aus dem Kaninchen, der gegen humane Zellen gerichtet ist, durchgeführt. Mit diesem Antikörper wurden die spindelförmigen bipolaren Zellen ausnahmslos markiert, während Zellen anderer Morphologie nicht markiert wurden.

Ab Passage 4 war eine deutliche Anreicherung der markierten spindelförmigen bipolaren Zellen zu beobachten, welche ab Passage 6 die gesamte Zellpopulation darstellte.

Anhand der immunzytochemischen Untersuchung wurde somit bestätigt, dass Schwanzzellen in vitro anhand ihrer spindelförmigen bipolaren Morphologie identifiziert werden können und dass ab Passage 6 reine Schwanzzell-Kulturen erzielt wurden.

6.2 Einfluss von VEGF und FGF-2 auf die Morphologie und Proliferation caniner Schwanzzellen

In den letzten Jahren sind viele Parallelen zwischen dem Gefäß- und dem Nervensystem aufgedeckt worden, sodass sich das Bild der Wachstumsfaktoren, die ehemals aufgrund ihrer Wirkung auf das eine oder das andere System entdeckt wurden, durch ihre überlappenden Effekte verändert hat (ZACHARY, 2005).

Aus der großen Anzahl der in der Literatur zur Kultivierung von Schwanzzellen eingesetzten Wachstumsfaktoren wurden in dieser Arbeit die sowohl auf die Zellen des Gefäß- als auch Nervensystems wirkenden Zytokine VEGF und FGF-2 ausgewählt, um hinsichtlich ihres morphologischen sowie proliferativen Effekts auf canine Schwanzzellen untersucht zu werden.

6.2.1 Der VEGF-Rezeptor VEGFR-2 und FGF-2-Rezeptor FGFR-3 werden von caninen Schwanzzellen exprimiert

VEGF interagiert mit zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1, KDR) (BROCKINGTON et al., 2004; RAAB und PLATE 2007). Die proliferationsfördernde Wirkung von VEGF auf Neurone und Gliazellen wird hauptsächlich über VEGFR-2 vermittelt (BROCKINGTON et al., 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Untersuchung immunzytochemisch die Expression von VEGFR-2 durch canine Schwanzzellen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers aus der Maus, der gegen den humanen VEGFR-2 gerichtet ist, untersucht. Im Ergebnis konnte die Expression von VEGFR-2 durch canine Schwanzzellen in vitro und in situ eindeutig nachgewiesen werden. Dabei scheinen die Rezeptoren im Bereich des Zytoplasmas um den Zellkern am dichtesten konzentriert zu sein, die Zellkerne wurden nicht markiert.

Die Expression von FGFR-1 und FGFR-3 durch Schwanzzellen wurde bereits nachgewiesen. In der gleichen Untersuchung konnten FGFR-2 und FGFR-4 auf Schwanzzellen nicht gefunden werden (HUGHES, 1997). Andere Studien zeigen, dass nach einer peripheren Nervenverletzung die Konzentration von FGF-2 ebenso wie die Expression von FGFR-3 auf Seiten der Läsion deutlich ansteigen (GROTHER et al., 1997; GROTHER et al., 2001; SCARLATO et al., 2001). Da Schwanzzellen in vitro keinen Kontakt zu Neuronen haben und proliferieren, entsprechen sie am ehesten dem Zustand dedifferenzierter Schwanzzellen nach einer Nervenläsion. Aus diesem Grund wurde für die immunzytochemische Untersuchung der Expression eines FGF-2-Rezeptors durch canine Schwanzzellen ein AK gegen den FGFR-3 gewählt.

Der FGFR-3 scheint sehr speziesspezifisch zu sein, monoklonale AK aus der Maus, die gegen den FGFR-3 des Menschen gerichtet sind, zeigen nach Angaben der Hersteller keine Kreuzreaktivität mit Ratte, Maus und Rind. Kommerziell sind monoklonale AK gegen den caninen FGFR-3 nicht erhältlich. Aufgrund der starken speziesspezifischen Konservierung dieses Rezeptors wurde in der vorliegenden Arbeit ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen den humanen FGFR-3 verwendet.

Positivkontrollen des FGFR-3-AK wurden am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens und am Nervenschnitt durchgeführt. Zu beobachten war dabei in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Markierung der Epidermis und der epithelialen Zellen, der speziell in unbehaarten Hautbezirken vorkommenden merokrinen Drüsen (tubuläre Knäueldrüsen) der Lederhaut (LIEBICH, 2004). Es existieren verschiedene Isoformen des FGFR-3, die durch alternatives Spleißen entstehen. Speziell von epithelialen Zellen wird auch schon frühzeitig in der embryonalen Entwicklung der FGFR-3-IIIb exprimiert

(WUECHNER et al., 1996; L'HOTE und KNOWLES, 2005). Die spezielle Affinität des FGFR-3-IIIb zu epithelialen Zellen ließ sich am histologischen Schnitt des caninen Sohlenballens nachvollziehen.

6.2.2 VEGF und FGF-2 stabilisieren die charakteristische bipolare Morphologie caniner Schwanzzellen in vitro

Der Zusatz aller erprobten VEGF- und FGF-2-Konzentrationen zu DMEM+ wirkte sich auch bei Kultivierung über einen Zeitraum von 14 Tagen nicht auf die Morphologie der caninen Schwanzzellen aus. Im Phasenkontrastmikroskop erschienen sie stets bipolar, schlank und spindelförmig mit wenig Zytoplasma um den Zellkern und langen Ausläufern wie bei der Kultivierung in DMEM+ ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren.

Zu Veränderungen der Morphologie von Schwanzzellen, die in Anwesenheit von VEGF kultiviert wurden, fanden sich in der Literatur keine Angaben. Bei FGF-2 überexprimierenden Schwanzzellen konnten allerdings Veränderungen des Phänotyps beobachtet werden, je nachdem welche Isoform überexprimiert wurde. So wiesen 21 kDa und 23 kDa FGF-2 überexprimierende Schwanzzellen eine flache, verhältnismäßig zytoplasmareichere, fibroblastenähnliche Morphologie mit kurzen Fortsätzen auf. Das Erscheinungsbild der 18 kDa Isoform überexprimierenden Schwanzzellen blieb dagegen unverändert (GROTHER et al., 1998). Veränderungen in der Schwanzzell-Morphologie von der bipolaren spindelförmigen Gestalt hin zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp wurden in anderen Studien mit der Differenzierung zu myelinisierenden Schwanzzellen in Zusammenhang gebracht (JESSEN und MIRSKY, 1991).

6.2.3 VEGF und FGF-2 stimulieren die Proliferation caniner Schwanzzellen

Aufgrund seiner positiven Effekte auf Neuronen und Gliazellen wird VEGF heute nicht nur als proangiogener Faktor, sondern auch als neurotropher und neuroprotektiver Faktor gesehen (BROCKINGTON et al., 2004; NAMIECINSKA et al., 2005; ZACHARY, 2005).

Nach einer Nervenläsion wird VEGF im Verletzungsgebiet verstärkt exprimiert (SCARLATO et al., 2003). VEGF fördert die Migration von Schwanzzellen und das Überleben von Schwanzzellen in vitro (SCHRATZBERGER et al., 2000). VEGF stimuliert axonales Wachstum, erhöht die Überlebensrate und Proliferation von Schwanzzellen und aktiviert deren Invasion in azelluläre Nerventransplantate (SONDELL et al., 1999a; SONDELL et al., 1999b). Insbesondere Hypoxie führt zur verstärkten Expression von VEGF durch Gliazellen

(ZACHARY, 2005). Auch während der Embryogenese spielt VEGF eine entscheidende Rolle für die koordinierte Entwicklung des Gefäß- und Nervensystems (BROCKINGTON et al., 2004). In peripheren Nerven werden FGF-2 und die FGFR-3 überwiegend von Schwannzellen, aber auch von einwandernden Makrophagen gebildet (CLAUS et al., 2003). Außer in sensorischen Neuronen werden FGF-2 und seine Rezeptoren in den Spinalganglien auch von Satellitenzellen exprimiert. FGF-2 stimuliert die Proliferation von Schwannzellen und inhibiert die Myelinisierung der Neurone in vivo (GROTHE und NIKKHAH, 2001). Bei FGF-2-überexprimierenden Mäusen konnte eine gesteigerte Schwannzellproliferation verbunden mit einer beschleunigten Nervenregeneration im proximalen Nervenstumpf nachgewiesen werden (JUNGNICKEL et al., 2006). Auch in vitro fördert FGF-2 die Proliferation von Schwannzellen (DAVIS und STROOBANT 1990; HAASTERT et al., 2007). Da Schwannzellen einerseits FGF-2 produzieren und auf der anderen Seite FGF-2 die Proliferation von Schwannzellen fördert, wird ein auto- und parakriner Wirkungsmechanismus des FGF-2-Systems angenommen (DAVIS und STROOBANT 1990; HAASTERT et al., 2007). FGF-2 wurde in verschiedenen Studien bei der Kultivierung von Schwannzellen zur Steigerung ihrer Proliferation erfolgreich eingesetzt (DAVIS und STROOBANT, 1990; MÜLLER-OSTERMEYER et al., 2001; MAURITZ et al., 2004; HAASTERT et al., 2007).

6.2.3.1 Eingesetzte canine Schwannzell-Kulturen zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit Nervenmaterial von neun verschiedenen Hunden gewonnen. Entsprechend der Unterschiede in Größe, Gewicht und Alter der Hunde, die als Nervenspender dienten, war auch das als Ausgangsmaterial dienende Nervengewebe sehr heterogen. Um dennoch eine so weit reichende Standardisierung wie möglich zu gewährleisten, wurden nur Nervenbiopsien des N. radialis und des N. ischiadicus verwendet. Die Länge aller Biopsien betrug ca. vier cm. Der Durchmesser der unterschiedlichen Nerven korrelierte mit der Körpergröße des Spenders. Bei der Präparation zeigte sich, dass in dickeren Nerven proportional mehr Fett- und Bindegewebe im Ausgangsmaterial vorhanden war.

Für die Zusammensetzung des Nervengewebes könnte auch das Alter des jeweiligen Nervenspenders eine entscheidende Rolle spielen. Möglicherweise weisen Nerven von Neugeborenen verhältnismäßig mehr Schwannzellen sowie weniger Fett- und Bindegewebe auf, als das Nervengewebe adulter Individuen. Zellen juveniler Organismen besitzen außerdem ein höheres Proliferationspotential als Zellen adulter Organismen (SMITH et al.,

2002). In den eigenen Untersuchungen stammten die Nervenbiopsien in drei Fällen von sehr jungen Hunden. In den aus juvenilen Nerven gewonnenen Zellkulturen waren im Gegensatz zu den Zellkulturen aus adulten Nerven bereits beim ersten Auswachsen von Zellen aus den Explantaten Schwanzzellen zu identifizieren.

Der Anteil des Bindegewebes an den Nervenexplantaten wurde auch von der Präparation des Nervengewebes beeinflusst. Die Präparation erfolgte so exakt wie möglich, wie sich aber an den Semidünnschnitten zeigte, konnte das Perineurium um die Nervenfaserbündel nicht vollständig entfernt werden. Der in Abhängigkeit vom Ausgangsgewebe variierende Anteil von Fett- und Bindegewebe lässt sich durch keine noch so exakte Präparation vermeiden.

Die aus dem Ausgangsmaterial gewonnenen Zellkulturen waren entsprechend inhomogen. Diese Mischkulturen wurden durch wiederholte kurzzeitige Trypsinierungen aufgereinigt so dass aus allen Nervenbiopsien reine Schwanzzell-Kulturen gewonnen wurden.

Es waren somit Passagierungen notwendig, um die Schwanzzellen innerhalb der Kulturen anzureichern. Zur Standardisierung der Proliferationsversuche war ein ausreichender, einheitlicher Zellpool notwendig, welcher durch die Vermehrung der reinen Schwanzzell-Kulturen bis zur Passage 4 bis 6 realisiert wurde.

Auch für den Einsatz in vitro expandierter Schwanzzellen in artifiziellen Nervenimplantaten zur Überbrückung von Nervendefekten ist eine mehrfache Passagierung der Zellen notwendig, um eine ausreichende Zellzahl zu erzielen.

Jedoch birgt die wiederholte Zellvermehrung in vitro immer die Gefahr der Entdifferenzierung von Zellen bis hin zur Transformation zu Tumorzellen (FUNK et al., 2007).

Aus diesem Grund untersuchten FUNK et al. (2007) die Alterung von Ratten-Schwanzzellen in vitro. Verglichen wurden die Eigenschaften von „jungen“ Schwanzzellen (Passage 5-11) und „alten“ Schwanzzellen (Passage 25-30) hinsichtlich ihrer Proliferationsrate, ihrer Markermoleküle, ihres proliferationsfördernden Effekts auf Axone und ihres Karyotyps (Gesamtheit aller erkennbaren Chromosomeneigenschaften). Alle Schwanzzellen exprimierten die Marker- Proteine p-75 und S-100. Die in Gegenwart der „alten“ Schwanzzellen auswachsenden Axone wiesen fast die doppelte Länge auf gegenüber den Axonen, die in Ko-Kultur mit „jungen“ Schwanzzellen inkubiert wurden, außerdem war die Proliferationsrate „alter“ Schwanzzellen deutlich höher. Schwanzzellen in den Passagen 5-11 wiesen einen normalen diploiden Chromosomensatz von 42 Chromosomen auf, in den Passagen 25-30 war der Chromosomensatz meist hyperploid mit durchschnittlich 68,7 Chromosomen pro Zelle. Die Autoren dieser Studie empfehlen aufgrund dieser Veränderungen Schwanzzellen für den Einsatz in artifiziellen Nervenimplantaten nicht über Passage 11 zu vermehren.

Legt man die Klassifizierung von FUNK et al., (2007) zugrunde, so wurden in der vorliegenden Untersuchung nur „junge“ Schwanzzellen verwendet (Passage 4-6).

6.2.3.2 Eingesetzte Methoden zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2

Die Proliferation von Zellen lässt sich anhand von Zellzahlen bestimmen. Werden Zellen in einer bekannten Konzentration ausgesät, über einen definierten Zeitraum inkubiert und anschließend erneut gezählt, so lässt dies einen Rückschluss auf die Proliferation der Zellen zu.

In den eigenen Studien sollte der proliferative Effekt von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen untersucht werden. Dazu wurden die aufgereinigten Schwanzzell-Kulturen nach der Kryokonservierung in einer bekannten Konzentration ausgesät und über einen definierten Zeitraum in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen von VEGF und FGF-2 inkubiert. Es galt also sowohl die Ausgangszellzahl als auch die nach der Inkubation in den Wachstumsfaktoren erzielte Zellzahl zu bestimmen.

Eine Möglichkeit der Bestimmung von Zellzahlen ist die Zählung per Neubauer-Zählkammer. Zur Zählung der Ausgangszellzahl der caninen Schwanzzellen konnte diese Methode gut angewendet werden. Zur Bestimmung der durch die Inkubation in den Wachstumsfaktoren erzielten Zellzahl war sie jedoch nicht geeignet, da die Zellen für die Zählung in der Neubauer-Zählkammer abtrypsiniert werden müssen und nicht in den Kulturschalen gezählt werden können. Der Nachteil des Abtrypsiniens von Zellen liegt zum einen darin, dass dabei immer Verluste entstehen, d.h. niedrigere Zellzahlen bestimmt werden als die tatsächlich erzielten, zum anderen wäre diese Methode bei der Vielzahl der einzelnen Vertiefungen bei Verwendung der 96-Lochplatten nicht praktikabel gewesen.

Um Zellen ohne Trypsinierung innerhalb der Zellkulturplatten zu zählen, empfiehlt sich die Verwendung von Detektionssystemen in Form von Proliferations-Assays. In dieser Untersuchung wurden hierfür der BrdU-Assay und der Resazurin-Resorufin-Assay (CellTiter-Blue-Assay® (CTB)) eingesetzt.

Das Prinzip des BrdU-Assay basiert auf dem direkten Einbau von BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) anstelle des Nukleotids Thymidin in die DNA der Zellen. Die anschließend an die Inkubation der Zellen in den Wachstumsfaktoren nachweisbare Menge BrdU ist folglich ein direktes Maß für die Menge neu synthetisierter DNA der Zellen und gibt somit Auskunft über ihre Proliferation.

In verschiedenen Studien, die BrdU zur Untersuchung der Proliferation von Schwanzzellen verwendeten, wurden unterschiedliche Inkubationszeiten von 18 Stunden (RUTKOWSKI et al., 1992; RUTKOWSKI et al., 1995), 20 Stunden (DONG et al., 1997), 24 Stunden (MORRISSEY et al., 1991; LEVI et al., 1995; CASELLA et al., 1996; FANSA et al., 1999; CASELLA et al., 2000) und 3 Tagen (SCARPINI et al., 1988) gewählt. Nach LEVI et al. (1995) ist eine 18- bis 24-

stündige Inkubation mit BrdU ausreichend, da der Zellzyklus der meisten Säugetierzellen in vitro in diesem Rahmen liegt. Daher wurden in den eigenen Untersuchungen die Schwanzzell-Kulturen 24 Stunden mit BrdU inkubiert.

Der BrdU-Assay erfordert mehrere aufeinander folgende Arbeitsschritte, wodurch daraus resultierende Pipettier-Ungenauigkeiten kaum vermeidbar sind. Da aus diesem Grund Schwankungen in den Ergebnissen zu erwarten waren, wurden alle Untersuchungen parallel mit einem zweiten Assay, dem CTB-Assay durchgeführt.

Der CTB-Assay wird nur in wenigen Arbeitsschritten durchgeführt. Er basiert auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin. Resazurin, ein ungiftiger blauer Farbstoff, wird von lebenden Zellen aufgenommen und durch die mitochondriale Laktat-Dehydrogenase irreversibel zum rosafarbenen Resorufin reduziert. Die Menge des gemessenen Resorufins lässt auf die metabolische Aktivität der Zellen schließen.

Geht man davon aus, eine in ihrer metabolischen Aktivität einheitliche Zellpopulation zu untersuchen, so erlaubt die Menge des gemessenen Resorufins den Rückschluss auf die Zellzahl. Ein Nachteil dieses Assays ist folglich, dass nicht direkt die DNA der Zellen nachgewiesen wird. Mögliche Ungenauigkeiten können z.B. durch unterschiedlich dicht besiedelte Zellkulturschalen hervorgerufen werden. In dünn besiedelten Vertiefungen der Zellkulturplatte ist normalerweise die Stoffwechselaktivität der Zellen höher als in dicht bewachsenen Vertiefungen, da Zellen in einem nährstoffreichen Milieu eine höhere Stoffwechselaktivität besitzen.

Der Einsatz beider Proliferations-Assays diente der Relativierung ihrer Vor- und Nachteile. Die parallele Anwendung beider Assays in den gleichen Versuchen zur Untersuchung des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2 auf canine Schwanzzellen ermöglicht einen direkten Vergleich der Ergebnisse. Darüber hinaus sollte auf diesem Wege die Aussagekraft der Ergebnisse überprüft werden.

6.2.3.3 Eingesetzte Konzentrationen von VEGF und FGF-2 zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2

In der Literatur wird in zwei Studien der Einsatz von VEGF in Neuronen-Schwanzzell-Kulturen bzw. Schwanzzell-Kulturen beschrieben (SONDELL et al., 1999a; SONDELL et al., 1999b und SCHRATZBERGER et al., 2000). Die Studien von SCHRATZBERGER et al. (2000) zielten darauf ab, den Einfluss unterschiedlicher VEGF-Konzentrationen auf die Migration von Schwanzzellen zu untersuchen. Dabei konnte eine Dosisabhängigkeit, mit einem Maximum der Schwanzzell-Migration bei einer VEGF-Konzentration von 10 bis 500 ng/ml, gezeigt werden.

SONDELL et al. (1999a) untersuchten in Neuronen-Schwanzzell-Ko-Kulturen die Wirkung von VEGF in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml auf die Länge der auswachsenden Axone und die Anzahl der vorhandenen Schwanzzellen. Die höchste Anzahl an Schwanzzellen wurde dabei mit den VEGF-Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml erzielt. Für die eigenen Untersuchungen wurden deshalb diese beiden Konzentrationen aufgegriffen und um eine niedrigere (5 ng/ml) und eine höhere (100 ng/ml) VEGF-Konzentration ergänzt.

Damit erfolgten die Untersuchungen zum proliferativen Effekt von VEGF auf canine Schwanzzellen mit den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in DMEM+. Als Negativkontrolle wurden in jedem Versuchsdurchgang Schwanzzellen mit reinem DMEM+ inkubiert.

Obwohl die absoluten Zellzahlen starken Schwankungen unterlagen, war mit beiden verwendeten Proliferations-Assays in allen Versuchsdurchgängen, den arithmetischen Mittelwert betrachtend, mit zunehmender Konzentration von VEGF bis 50 ng/ml ein Anstieg der IgZZ messbar. Eine weitere Steigerung der VEGF-Konzentration auf 100 ng/ml brachte keine weitere Zunahme der Zellzahl der caninen Schwanzzellen. Vielmehr lag der Mittelwert der mit 100 ng/ml erzielten Zellzahlen in allen Wiederholungen unter dem, der mit 50 ng/ml VEGF erreicht wurde.

Die IgZZ, welche mit Hilfe des CTB-Assay bei Kultivierung caniner Schwanzzellen in reinem DMEM+, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml VEGF ermittelt wurden, wiesen in allen drei Versuchsdurchgängen keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Differenzen zwischen den mit dem BrdU-Assay ermittelten IgZZ waren dagegen innerhalb von zwei Versuchsdurchgängen zwischen den Negativkontrollen und den Zellen, die mit VEGF in den Konzentration 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert worden waren, statistisch signifikant. In einem Versuchsdurchgang waren die Unterschiede der ermittelten IgZZ sogar zwischen allen eingesetzten Wachstumsfaktorkonzentrationen signifikant.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen somit, dass die höchste VEGF-Konzentration nicht die maximale Zellausbeute zur Folge hatte. Auch in der Untersuchung von SONDELL et al., (1999a) brachte nicht die höchste VEGF-Konzentration den maximalen Effekt. Die Autoren dieser Arbeit äußern die Vermutung, dass eine zu hohe exogene VEGF-Zufuhr möglicherweise zu einer Reduktion der Expression von VEGF-Rezeptoren, insbesondere des VEGFR-2, führt. Durch zu hohe VEGF-Konzentrationen ist außerdem ein inhibierender Effekt auf die Proliferation der caninen Schwanzzellen im Sinne einer Substrathemmung denkbar.

FGF-2 wurde in verschiedenen Studien bei der Kultivierung von Schwanzzellen zur Steigerung ihrer Proliferation in der Konzentration 10 ng/ml erfolgreich eingesetzt (DAVIS und STROOBANT, 1990; MÜLLER-OSTERMEYER et al., 2001; MAURITZ et al., 2004; HAASSTERT et al., 2007). Untersuchungen unterschiedlicher FGF-2-Konzentrationen hinsichtlich ihres proliferativen Effekts auf Schwanzzellen liegen nicht vor. In Anlehnung an die für VEGF gewählten Konzentrationen wurden in den eigenen Untersuchungen zum proliferativen Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von FGF-2 auf canine Schwanzzellen die Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml gewählt.

Obwohl die absoluten Zellzahlen auch hier starken Schwankungen unterlagen, war mit beiden verwendeten Proliferations-Assays in allen Versuchsdurchgängen, den arithmetischen Mittelwert betrachtend, mit zunehmender Konzentration von FGF-2 bis 50 ng/ml ein Anstieg der IgZZ messbar. Eine weitere Steigerung der FGF-2-Konzentration auf 100 ng/ml brachte keine weitere Zunahme der Zellzahl der caninen Schwanzzellen. Vielmehr lag der Mittelwert der mit 100 ng/ml erzielten Zellzahl in allen Wiederholungen unter dem, der mit 50 ng/ml FGF-2 erreicht wurde.

Statistisch signifikante Unterschiede der mit dem BrdU-Assay ermittelten Zellzahlen ließen sich in zwei Versuchsdurchgängen zwischen den Negativkontrollen und den Zellen, die mit FGF-2 in den Konzentration 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert worden waren, feststellen. Bei den Zellen, die mit FGF-2 inkubiert wurden, zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in den erzielten Zellzahlen zwischen dem Einsatz von 5 ng/ml und 50 ng/ml FGF-2. In einem dieser beiden Versuchsdurchgänge zeigten sich außerdem statistisch signifikante Unterschiede bei den erzielten Zellzahlen zwischen den in 5 ng/ml und 100 ng/ml FGF-2 kultivierten Zellen, sowie beim Vergleich zwischen den in 10 ng/ml und 50 ng/ml FGF-2 kultivierten Zellen.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen den Zellzahlen, die mit Hilfe des CTB-Assay ermittelt wurden, in allen drei Versuchsdurchgängen ermittelt. In einem Durchlauf unterschieden sich die Zellzahlen der Negativkontrollen und der Zellen, die mit FGF-2 in den Konzentration 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert worden waren, signifikant. Im zweiten Durchgang bestand ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl der Negativkontrollen im Vergleich zur Kultivierung mit FGF-2 in den Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml. Im dritten Durchlauf unterschieden sich die Zellzahlen der Negativkontrollen signifikant von den Zellzahlen bei Kultivierung mit 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml FGF-2. Zwischen den Zellzahlen bei Kultivierung mit 5 ng/ml und 50 ng/ml FGF-2 war ebenso ein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Inkubation der Zellen in 50 ng/ml FGF-2 eine höhere Zellausbeute erzielt wurde als mit der in den anderen Studien verwendeten Konzentration von 10 ng/ml (MAURITZ et al., 2004; HAASSTERT et al., 2007). Diese Tendenz ließ sich mit

beiden Proliferations-Assays in allen Versuchsdurchgängen ermitteln. Die Differenz zwischen den ermittelten Zellzahlen bei Kultivierung der Zellen in 10 ng/ml FGF-2 und 50 ng/ml FGF-2 war allerdings nur in einem Versuchsdurchgang mit dem BrdU-Assay signifikant.

Vergleicht man die ermittelten Zellzahlen aus den drei Versuchsdurchgängen, so zeigt sich in beiden verwendeten Proliferations-Assays, dass die arithmetischen Mittelwerte der erzielten IgZZ sowohl unter Einsatz von DMEM+ als auch bei gleichen Konzentrationen von VEGF und FGF-2 in den ersten beiden Versuchsdurchgängen vergleichbar waren und bei Verwendung des CTB-Assay unter den Werten des BrdU-Assay lagen. Der dritte Versuchsdurchgang unterschied sich jedoch sowohl beim Vergleich der erzielten IgZZ zwischen den beiden Assays als auch zwischen den Versuchsdurchgängen von den beiden vorangegangenen. Hier zeigten sich bei Verwendung des BrdU-Assay nur Parallelen zwischen den Zellzahlen bei den Schwanzzell-Kulturen, die nur in DMEM+ (Negativkontrolle) inkubiert wurden, während die erzielten Zellzahlen unter dem Einfluss von beiden Wachstumsfaktoren bei allen verwendeten Konzentrationen insgesamt niedriger waren. Die mit dem CTB-Assay ermittelten Zellzahlen hingegen waren im dritten Durchlauf in allen Ansätzen durchgehend höher als in den ersten beiden Durchläufen, also auch bei den Kulturen, die als Negativkontrolle mit DMEM+ inkubiert wurden.

Da jeder Versuchsdurchlauf parallel mit beiden Proliferations-Assays am selben Tag durchgeführt wurde, ist eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch Einflüsse unterschiedlicher Tage auszuschließen, tageszeitliche Unterschiede sind als mögliche Einflussgrößen dagegen denkbar, sind aber auszuschließen, da mit dem einen Proliferations-Assay höhere IgZZ und mit dem anderen niedrigere IgZZ gemessen wurden als in den vorherigen Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse im dritten Versuchsdurchgang könnte in den verwendeten Zellkulturen liegen. Insgesamt wurden in allen Proliferations-Versuchen canine Schwanzzell-Kulturen in den Passagen 4-6 eingesetzt. Die verwendeten Zellkulturen waren in ihrer Passage und in ihrer Reinheit standardisiert, sie entstammten aber verschiedenen Hunden. Da die beiden verwendeten Assays auf der Messung zweier verschiedener Proliferationsparameter basieren, weist die Abweichung der Ergebnisse des dritten Durchlaufs auf Unterschiede in diesen Eigenschaften bei den eingesetzten Kulturen hin. Mit dem BrdU-Assay wird die während der Inkubationsphase von 24 Stunden gebildete DNA quantifiziert und damit die Replikationsrate bestimmt. Mit dem CTB-Assay hingegen wird der Umsatz von Resazurin zu Resorufin durch die mitochondriale Laktat-Dehydrogenase gemessen, welcher durch die Anzahl und Aktivität der Mitochondrien bestimmt wird und somit ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen darstellt. Während die Replikationsrate im direkten

Zusammenhang mit der Zellteilung steht, unterliegt die metabolische Aktivität auch unabhängig von der Zellteilung einer adaptionsbedingten Dynamik. Daher stellt das BrdU-Assay eine sensitivere Methode zur Bestimmung der Proliferation von Zellen dar (MAGHNI et al., 1999).

Die im dritten Durchlauf verwendete Schwanzzell-Kultur wies somit gegenüber den beiden Kulturen, die in den vorangegangenen Versuchsdurchgängen eingesetzt wurden, eine geringere Proliferationsrate auf. Dies wird insbesondere dadurch bestärkt, dass die ermittelte Zellzahl in den Negativkontrollen mit denen in den vorangegangenen Durchläufen vergleichbar war, während die Zellzahlen aller mit den Wachstumsfaktoren behandelten Ansätze niedriger waren. Jedoch zeigte diese Schwanzzell-Kultur eine per se höhere metabolische Aktivität, was vor allem dadurch deutlich wird, dass auch die Werte in den Negativkontrollen über denen lagen, welche in den ersten beiden Durchläufen gemessen wurden. Interessant ist hierbei, dass die im dritten Versuchsdurchlauf verwendete Schwanzzell-Kultur dem ältesten Hund (11 Jahre) entstammte.

Die Analyse der Ergebnisse führt somit zu der Schlussfolgerung, dass sowohl VEGF als auch FGF-2 in einer Konzentration von 50 ng/ml in DMEM+ den stärksten Effekt auf die Proliferation caniner Schwanzzellen hat.

Zusätzlich wurde auf den einzelnen Konzentrationsstufen von VEGF und FGF-2 der jeweilige Effekt der Wachstumsfaktoren mit Hilfe des t-Tests verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in 50 ng/ml FGF-2 signifikant höhere IgZZ erzielt wurden, als bei Inkubation in 50 ng/ml VEGF.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse muss zur effektiveren Kultivierung caniner Schwanzzellen dem Einsatz von 50 ng/ml FGF-2 gegenüber der Inkubation der Zellen in 50 ng/ml VEGF der Vorzug gegeben werden.

6.2.3.4 Eingesetzte Kombinationen von VEGF und FGF-2 zum Nachweis des proliferativen Effekts von VEGF und FGF-2

Untersuchungen zum kombinierten Einsatz von VEGF und FGF-2 zur Kultivierung von Schwanzzellen erfolgten erstmals im Rahmen dieser Studie.

Da beim separaten Einsatz von VEGF und FGF-2 eine Konzentration von 5 ng/ml nur in einem einzigen Fall eine signifikant höhere IgZZ im Vergleich zur Negativkontrolle aufwies, wurden für diese Untersuchungen beide Wachstumsfaktoren in den Konzentrationen 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in DMEM+ in jeder Möglichkeit mit einander kombiniert. Als Negativkontrolle wurden auch in diesen Versuchen Schwanzzellen mit reinem DMEM+ inkubiert.

Die einzelnen Versuchsdurchgänge zeigten in ihren Ergebnissen extrem starke Schwankungen. Den Mittelwert betrachtend wurde mit beiden Proliferations-Assays die höchste Anzahl caniner Schwanzzellen in drei Versuchsansätzen mit der Kombination von 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 und in anderen drei Versuchsansätzen mit 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 erzielt. Es wurde nur in einem einzigen Versuch ein signifikanter Unterschied zwischen den arithmetischen Mittelwerten der IgZZ der in 10 ng/ml VEGF in Kombination mit 100 ng/ml FGF-2 inkubierten Schwanzzellen zu den Negativkontrollen festgestellt. Jedoch führte keine Kombination der beiden Wachstumsfaktoren gegenüber der separaten Kultivierung der Schwanzzellen in 50 ng/ml VEGF oder FGF-2 zu einer signifikant höheren IgZZ.

In Untersuchungen zur Induktion von Gefäßwachstum zur Therapie ischämischer Herzerkrankungen wurde der Einfluss von VEGF und FGF-2, sowohl getrennt voneinander als auch in Kombination, auf die Angiogenese und Arteriogenese im ischämischen Kaninchenmyokard untersucht. Es zeigte sich bei VEGF und FGF-2 eine signifikante Steigerung der Kapillardichte. Die kombinierte Gabe von VEGF- und FGF-2 erwies sich in diesen Untersuchungen den Einzelfaktoren VEGF und FGF überlegen (BREDOW, 2006).

Zur effektiven Kultivierung caniner Schwanzzellen wird auf Basis der eigenen Daten der Einsatz von 50 ng/ml VEGF oder FGF-2 getrennt voneinander empfohlen und nicht eine der erprobten Kombinationen.

6.3 Leitschema zur Isolierung und Expansion caniner Schwanzzell-Kulturen unter Einsatz von VEGF und FGF-2

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur effektiven Kultivierung caniner Schwanzzellen. Aus den eigenen Untersuchungen wurde ein Leitschema zur Isolierung und Expansion caniner Schwanzzell-Kulturen unter Einsatz von VEGF und FGF-2 entwickelt.

1. Sterile Entnahme und Präparation des Nervengewebes, Erstellung von einem mm großen Nervenexplantaten
2. Inkubation der Nervenexplantate in DMEM+, wöchentliches Umsetzen der Explantate (nach dem Umsetzen der Explantate zehn Minuten warten und anschließend vorsichtig mit dem Medium überschichten)

3. Gewinnung von Mischkulturen durch enzymatische Dissoziation der Explantate nach 21 Tagen
4. Kultivierung der Mischkulturen im Melanozyten-Wachstums-Medium (MM+)
5. Gewinnung reiner Schwanzzell-Kulturen durch zweimalige kurzzeitige Trypsinierung der Kulturen nach jeweils drei Tagen Inkubation in MM+
5. Kultivierung der reinen Schwanzzell-Kulturen in DMEM+ mit Zusatz von 50 ng/ml FGF-2 und Passagierung der Zellen bis maximal zur Passage 11

6.4 Tissue-Engineering zur Herstellung artifizierlicher Nervenimplantate – Vorteile gegenüber der autologen Nerventransplantation

Ein ideales Nervenimplantat sollte eine geringe Antigenität besitzen, biodegradierbar und leicht zu vaskularisieren sein, sowie eine gute Sauerstoffdurchlässigkeit aufweisen. Des Weiteren sollten Kompressionen der Nervenenden vermieden werden (EVANS, 2001; DE RUITER et al., 2009).

Die autologe Nerventransplantation stellt zurzeit die Methode der Wahl für die chirurgische Behandlung peripherer Nervenläsionen dar, wenn die Nervenenden nicht spannungsfrei adaptiert werden können (MILLES, 2000; EVANS, 2001; BATTISTON et al., 2005; REYES et al., 2005; LOHMEYER et al., 2007). Jedoch ist sie nicht komplikationslos. Zum einen ist die Anzahl der zur Gewinnung von Autotransplantaten zur Verfügung stehenden Spendernerven begrenzt, zum anderen erfordert die Entnahme des Spendernervs eine zusätzliche Operation, die mit neurologischen Ausfällen an der Stelle der Nervenentnahme und mit Narben- und möglicherweise schmerzhafter Neuombildung einhergeht (HEATH und RUTKOWSKI, 1998; EVANS, 2000; WEBER et al., 2000; FANSA und KEILHOFF, 2003; WIBERG und TERENGI, 2003; CIARDELLI und CHIONO, 2006).

Aufgrund der genannten Risiken wird weltweit intensiv an anderen Möglichkeiten zur Behandlung von Verletzungen im peripheren Nervensystem geforscht. Beachtliche Erfolge wurden teilweise mit in Tissue-Engineering-Verfahren hergestellten, artifizierlichen Nervenimplantaten erzielt.

Tissue-Engineering ist die Konstruktion eines Gewebes aus lebenden Zellen und einem Gerüst für diese Zellen. Beim Tissue-Engineering für Nervengewebe werden in vitro kultivierte, lebende Zellen wie z.B. Schwanzzellen, in einem Gerüst verankert und dann wieder in ein in vivo-System implantiert (FANSA et al., 2002). In vitro isolierte und expandierte

Schwanzzellen sind die Voraussetzung für die Herstellung solcher artifizierlicher Nervenimplantate.

Für die Anwendbarkeit der Methode zur Gewinnung reiner Schwanzzell-Kulturen sind die benötigte Zeitdauer und die im Rahmen der Isolierung und Expansion erzielten Zellzahlen von besonderem Interesse. Bis zur Behandlung einer Nervenläsion sollte ein Zeitraum von sechs bis neun Monaten nicht überschritten werden, da ab diesem Zeitpunkt die Atrophie des Zielmuskels soweit vorangeschritten ist, dass eine Wiederherstellung der Funktion aussichtslos ist (FREY et al., 1998). Die erforderliche Zellzahl für die Beladung artifizierlicher Nervenimplantate mit Schwanzzellen wird in der Literatur in einem Bereich von 5×10^5 Schwanzzellen/ml (HADLOCK et al., 2000) bis $40 - 160 \times 10^6$ Schwanzzellen/ml (GUENARD et al., 1992) angegeben.

In den eigenen Untersuchungen wurde zunächst ein Zellpool purifizierter caniner Schwanzzell-Kulturen angelegt. Nach einer zwischenzeitlichen Kryokonservierung dieser Zellen folgte die Expansion der caninen Schwanzzell-Kulturen mit den Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2 in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen.

Die benötigte Zeitdauer von der Entnahme der Nervenbiopsie bis zur Schwanzzell-Reinkultur mit ausreichend hoher Zellzahl kann aufgrund der sinnlichen experimentellen Struktur der eigenen Untersuchungen nicht angegeben, sondern nur berechnet werden.

Die Reexplantier-Phase nahm 21 Tage in Anspruch. Die Zeitspanne der Anreicherung der Schwanzzellen mittels wiederholter kurzzeitiger Trypsinierungen und unter Verwendung von Melanozyten-Wachstums-Medium erstreckte sich maximal über 14 Tage. Die Steigerung der Proliferation caniner Schwanzzellen durch Inkubation in VEGF oder FGF-2 wurde nach drei Tagen untersucht. Alle Phasen zusammengefasst, ist es mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode möglich, innerhalb von sechs Wochen reine canine Schwanzzell-Kulturen zu züchten.

Die aus einer Nervenbiopsie erzielten Zellzahlen nach der Aufreinigung der Schwanzzell-Kulturen lagen bei ca. 8×10^5 Zellen/ml (Passage 6). Bei einer maximalen Steigerung der Zellzahlen unter Einsatz von 50 ng/ml FGF-2 von 10^4 Zellen/ml auf 20×10^4 Zellen/ml innerhalb von drei Tagen, kann von einer abschließenden Gesamtmenge von ca. 40×10^6 Zellen/ml ausgegangen werden.

Fasst man die aus einer Nervenbiopsie isolierten caninen Schwanzzell-Kulturen zusammen, so sind die erzielten Zellzahlen mit Sicht auf die Literaturangaben (GUENARD et al., 1992; HADLOCK et al., 2000) ausreichend.

Der Einsatz artifizierlicher Nervenimplantate birgt gegenüber der autologen Nerven­transplantation einige Vorteile:

- Bei der autologen Nerven­transplantation werden die transplantierten Nerven durch Wallersche Degeneration abgebaut, bevor Axone von proximal einwachsen können. Dies entfällt bei einem artifizierlichen Transplantat.
- Eine Zweitoperation mit neurologischen Defiziten an der Entnahmestelle ist nicht notwendig.
- In die artifizierliche Leitschiene können regenerationsfördernde Zellen und/oder regenerationsfördernde Faktoren eingebracht werden.
- Die Wahl von Länge und Durchmesser artifizierlicher Implantate ist beliebig.
- Weniger Nahtmaterial bedingt eine geringere Traumatisierung des Nervs.
- Durch die Verhinderung des Einwanderns narbengewebsbildender Zellen bleibt die intraneurale Narbenbildung gering, das ungerichtete Auswachsen regenerierender Neurone wird verhindert.
- Es besteht eine bessere Heilungschance durch eine weitgehende Immobilisierung der Nervenstümpfe.

Trotz der genannten Vorteile artifizierlicher Nervenimplantate und obwohl teilweise signifikante Erfolge erzielt werden konnten, sind diese bislang nicht in der Lage, das Regenerationsniveau autologer Transplantate zu übertreffen. Ein Ansatzpunkt zur Optimierung artifizierlicher Nervenimplantate ist die gentherapeutische Modifikation der Schwanzzellen mit dem Ziel, eine erhöhte Produktion neurotropher Faktoren oder extrazellulärer Matrixproteine hervorzurufen. Die Implantation von NGF-überexprimierenden Schwanzzellen konnte im Vergleich zu nicht-transfizierten Schwanzzellen in einem Rückenmarkläsionsmodell adulter Ratten das axonale Wachstum deutlich steigern (WEIDNER et al. 1999). Auch NT-3-überexprimierende Schwanzzellen führten im Rattenmodell nach einer Rückenmarksdurchtrennung zu einer deutlich verbesserten Regeneration und Remyelinisierung der Axone (ZHANG et al. 2007). Nach der Durchtrennung des N. ischiadicus zeigten Ratten, die FGF-2-transfizierte Schwanzzellen erhalten hatten, eine signifikant größere Anzahl regenerierender Nervenfasern und myelinisierter Axone. (TIMMER et al., 2003; TIMMER et al., 2004). Gleiches gilt für GDNF-überexprimierende Schwanzzellen nach einer Läsion des N. ischiadicus im Rattenmodell (LI et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine effektive Methode zur Isolierung, Purifikation und Expansion caniner Schwanzzellen entwickelt. Aus der Vielzahl der in der Literatur zur Steigerung der Proliferation von Schwanzzellen eingesetzten Wachstumsfaktoren, wurden VEGF und FGF-2 ausgesucht, hinsichtlich ihres proliferativen Effekts auf canine

Schwanzzellen untersucht und mit 50 ng/ml die Konzentration ausgemacht, die den größten Effekt brachte. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um zu erfahren, ob sich die Proliferation caniner Schwanzzellen in vitro durch andere Wachstumsfaktoren noch weiter optimieren lässt. In dieser Untersuchung wurden keine morphologischen Veränderungen der caninen Schwanzzellen durch den Einsatz von VEGF und FGF-2 beobachtet, jedoch birgt jeder Einsatz von Mitogenen die Gefahr der Transformation der behandelten Zellen. Vor einem klinischen Einsatz in vitro kultivierter caniner Schwanzzellen müssen diese unbedingt hinsichtlich Funktionalität und ihres Transformationspotentials untersucht werden.

Diese derzeit im Fokus der aktuellen Forschung stehenden Untersuchungen auf diesem Gebiet sind die wichtigste Voraussetzung dafür, dass im Tissue-Engineering Verfahren hergestellte künstliche Nervenimplantate möglicherweise die aktuellen Versorgungsmöglichkeiten peripherer Nervenverletzungen ersetzen können.

Da die verschiedenen chirurgischen Versorgungsmöglichkeiten peripherer Nervenläsionen sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin oftmals zu unbefriedigenden funktionellen Ergebnissen führen, besteht die dringende Notwendigkeit neuer Behandlungsstrategien. Eine viel versprechende Alternative stellen mit Schwannzellen beladene artifizielle Nervenimplantate dar. Voraussetzung für die Entwicklung solcher Implantate für den Hund ist die Isolierung reiner caniner Schwannzell-Kulturen und deren Expansion in vitro.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer effektiven Methode zur Isolierung, Purifikation und Expansion caniner Schwannzell-Kulturen. Als Resultat der eigenen Untersuchungen wurde ein Leitschema zur Isolierung und Expansion caniner Schwannzell-Kulturen unter Einsatz von VEGF und FGF-2 entwickelt.

Von insgesamt neun Hunden unterschiedlichen Alters wurden unmittelbar nach dem Tod Biopsien des N. radialis und des N. ischiadicus in einer Länge von ca. vier cm entnommen. Das Nervengewebe wurde unter sterilen Bedingungen präpariert und in ein bis zwei mm große Explantate zerteilt. Vergleichend wurde die Kultivierung der Explantate in serumhaltigem DMEM+ und serumfreiem MM+ erprobt, wobei sich in dieser Phase der Einsatz von DMEM+ empfahl.

Die Nervenexplantate wurden wöchentlich passagiert und nach 21 Tagen mit einem Verdauungsansatz bestehend aus Hyaluronidase, Kollagenase, DNase und Trypsin enzymatisch dissoziiert. Aus den so erhaltenen Mischkulturen wurden mit Hilfe wiederholter kurzzeitiger Trypsinierungen und Inkubation der Kulturen in MM+ effektiv reine Schwannzell-Kulturen gewonnen.

Die immunzytochemische Identifizierung der Schwannzellen sowohl in vitro als auch in situ im histologischen Schnitt caninen Nervengewebes erfolgte mit dem für canine Schwannzellen etablierten p75-NTR-Antikörper, welcher Schwannzellen, nicht aber Fibroblasten markiert.

Der proliferative Effekt von VEGF und FGF-2 wurde in den purifizierten und kryokonservierten Schwannzell-Kulturen untersucht. Alle Versuche wurden sechsfach angesetzt und dreimal wiederholt. Die quantitative Analyse der proliferativen Wirkung erfolgte stets parallel mit Hilfe des BrdU-Assay und des Resazurin-Resorufin-Assay.

Zunächst wurde der proliferationsfördernde Effekt von VEGF und FGF-2 in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml im Vergleich zu DMEM+ ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren (Negativkontrolle) separat voneinander untersucht.

Obwohl die absoluten Zellzahlen starken Schwankungen unterlagen, war bei beiden Wachstumsfaktoren mit beiden verwendeten Proliferations-Assays in allen Versuchsdurchgängen, den arithmetischen Mittelwert betrachtend, mit zunehmender Konzentration von VEGF und FGF-2 bis 50 ng/ml ein Anstieg der ermittelten logarithmischen Zellzahl (lgZZ) messbar. Eine weitere Steigerung der Wachstumsfaktor-Konzentration auf 100 ng/ml brachte keine Zunahme der Zellzahl. Sowohl VEGF als auch FGF-2 hatten in der Konzentration 50 ng/ml in DMEM+ den stärksten Effekt auf die Proliferation caniner Schwanzzellen.

Außerdem wurden bei Kultivierung der caninen Schwanzzellen in 50 ng/ml FGF-2 signifikant höhere Zellzahlen erzielt als bei Inkubation in 50 ng/ml VEGF. Deshalb muss zur effektiveren Kultivierung caniner Schwanzzellen dem Einsatz von 50 ng/ml FGF-2 gegenüber der Inkubation der Zellen in 50 ng/ml VEGF der Vorzug gegeben werden.

Da beim separaten Einsatz von VEGF und FGF-2 eine Konzentration von 5 ng/ml nur in einem einzigen Fall eine signifikant höhere lgZZ im Vergleich zur Negativkontrolle aufwies, wurden die Wachstumsfaktoren in den Konzentrationen 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml in DMEM+ in jeder Möglichkeit mit einander kombiniert. Als Negativkontrolle wurden auch in diesen Versuchen Schwanzzellen mit reinem DMEM+ inkubiert.

Mit beiden Proliferations-Assays wurde im arithmetischen Mittel die höchste Anzahl caniner Schwanzzellen in drei Versuchsansätzen mit der Kombination von 10 ng/ml VEGF und 50 ng/ml FGF-2 und in den anderen drei Versuchsansätzen mit 10 ng/ml VEGF und 100 ng/ml FGF-2 erzielt. Nur in einem einzigen Versuch wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den arithmetischen Mittelwerten der lgZZ der in 10 ng/ml VEGF in Kombination mit 100 ng/ml FGF-2 inkubierten Schwanzzellen im Vergleich zu den Negativkontrollen festgestellt.

Verglichen mit der separaten Kultivierung der Schwanzzellen in 50 ng/ml VEGF oder 50 ng/ml FGF-2 führte keine der gewählten Kombinationen aus beiden Wachstumsfaktoren zu einer signifikant höheren lgZZ.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine effektive Methode zur Isolierung, Purifikation und Expansion caniner Schwanzzellen unter Anwendung von VEGF und FGF-2 entwickelt.

Ob sich die Proliferation caniner Schwanzzellen in vitro durch andere Wachstumsfaktoren noch optimieren lässt, ist in weiteren Untersuchungen herauszufinden. Vor einem klinischen Einsatz in vitro kultivierter caniner Schwanzzellen in artifiziellen Nervenimplantaten sollten diese außerdem unbedingt hinsichtlich ihrer Funktionalität und ihres Transformationspotentials untersucht werden.

Effective cultivation of canine Schwann cells using VEGF and FGF-2 for reconstruction of peripheral nerve lesions

Current surgical techniques to restore normal peripheral nerve function remain unsatisfying in veterinary as well as in human medicine, indicating a need for new treatment strategies. Schwann cell coated tubular implants present one promising option. The development of such artificial grafts for the dog requires the isolation and in vitro expansion of pure canine Schwann cell cultures.

The study aimed to establish an effective method for isolation, purification and expansion of canine Schwann cell cultures. The research results produced a guideline for such isolation, purification and expansion with the help of VEGF and FGF-2.

Nerve biopsies from nine dogs of different ages were extracted from the N. radialis and N. ischiadicus directly after euthanasia. The biopsy length was about four cm. Nerves were prepared under sterile conditions and cut into pieces of one to two mm. Comparing serum added DMEM+ and serumfree MM+ as media for cultivation, serum added DMEM+ is recommended in this stage.

The explants were passaged weekly and dissociated after 21 days with a digestion medium containing hyaluronidase (0.1%), collagenase (0.1%), DNase (0.1%) and trypsin. Mixed cell cultures were obtained after dissociation. Pure cultures of canine Schwann cells were gained by repeated short trypsination and incubation in MM+.

Schwann cells in vitro and in situ were identified by immunolabeling with an established antibody to p75-NTR, which marks Schwann cells but not fibroblasts.

The proliferative effect of VEGF and FGF-2 was examined in the purified and cryoconserved Schwann cell cultures. All experiments were done six-fold and repeated three times. Quantitative analyses of the proliferative effect were done using two different detection systems, the BrdU assay and the Resazurin-Resorufin assay.

First the proliferative effect of VEGF and FGF-2 was tested separately in the concentrations of 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml and 100 ng/ml, and compared to DMEM+ without growth factors (the negative control).

Despite high variabilities of the absolute cell counts, an increase in arithmetic mean of the logarithmic cell count (lgCC) with increasing concentrations of VEGF and FGF-2 up to 50 ng/ml was detected in both proliferation assays and in all passages, for both growth factors.

An enhancement in growth factor concentration of up to 100 ng/ml did not lead to higher amounts of Schwann cells. Concentrations of 50 ng/ml in both VEGF and FGF-2 contained the strongest proliferative effect on canine Schwann cells.

Furthermore, incubation of canine Schwann cells in 50 ng/ml FGF-2 resulted in a significantly higher cell count compared to incubation in 50 ng/ml of VEGF. Therefore, cultivation of canine Schwann cells in 50 ng/ml FGF-2 recommends itself.

Separate Schwann cells in 50 ng/ml FGF-2 concentrations of 5 ng/ml lead to a significantly higher IgCC in only one of the cases compared to the negative control group. Due to this effect, the growth factor concentrations of 10 ng/ml, 50 ng/ml and 100 ng/ml in DMEM+ were combined in each possible iteration. The negative control group of canine Schwann cells were incubated in DMEM+ again.

The highest arithmetic mean of canine Schwann cells for both proliferation assays was reached with 10 ng/ml VEGF combined with 50 ng/ml FGF-2 in three of the cases, and with 10 ng/ml VEGF combined with 100 ng/ml FGF-2 in the three remaining cases. A significant difference in the IgCC between incubation in 10 ng/ml VEGF and 100 ng/ml FGF-2 and incubation in the negative control group was only detected in one case.

None of the combinations used led to a significantly higher IgCC compared to incubation of Schwann cells in 50 ng/ml FGF-2. The incubation in 50 ng/ml VEGF or in 50 ng/ml FGF-2 is recommended over other tested combinations for effective cultivation of canine Schwann cells.

The study developed an effective method for isolation, purification and expansion of canine Schwann cells including VEGF and FGF-2. Further examination is required to determine whether the proliferation of canine Schwann cells in vitro can be optimized by other growth factors. Before such in vitro cultivated Schwann cells can be used in artificial transplants, their functionality and transformation potential also need to be tested.

α	Alpha
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ARIA	Acetylcholine Receptor Inducing Activity
β	Beta
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BrdU	Bromodeoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C6	sechste Zervikalnervenwurzel
C7	siebte Zervikalnervenwurzel
C8	achte Zervikalnervenwurzel
ca.	circa
cm	Zentimeter
CAM	Cell Adhesion Molecule
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CO ₂	Kohlendioxid
CRD-NRG-1	Cysteine-rich Domain-Neuregulin-1
CTB	CellTiter-Blue®
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E-Cadherin	epitheliale Cadherin
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ErB	Epidermal Growth Factor Receptor-Family
FB	Fibroblast
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2

FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GAP-43	Growth-Associated-Protein-43
GGF	Glial Growth Factor
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HRG	Heregulin
HSPGs	Heparan Sulfate Proteoglycans
IBMX	Isobuthylmethylxanthine
IL	Interleukin
IGF-2	Insulin Like Growth Factor-2
kDa	Kilo Dalton
L5	fünfte Lumbalnervenwurzel
L6	sechste Lumbalnervenwurzel
L7	siebte Lumbalnervenwurzel
Ig	Logarithmus zur Basis 10
IgCC	logarithmic Cell Count
IgZZ	logarithmische Zellzahl
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LNGFR	low-affinity Nerve Growth Factor Receptor
LNTR	low-affinity Neurotrophin Receptor
M	Mol
M.	Musculus
MACS	magnetic-activated cell separation
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MBP	Myelin Basic Proteins
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
MM	Melanozyten-Wachstums-Medium
mRNA	Messenger RNA

N.	Nervus
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NgCAM	Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule
NDF	Neu Differentiation Factor
NF-K	Nuclear Factor Kappa
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NRG	Neuregulin
NRP	Neuropiline
NT	Neurotrophin
OD	optische Dichte
P0	Protein Zero
p75-NTR	p75-Neurotrophin Receptor
PBS	Phosphate Buffered Salt Solution
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEX	Pituitary Extract
PGA	Polyglycolic Acid, Polyglykolsäure
PHB	Poly-3-Hydroxybutyrat
PI.	Plexus
PLA	Polylactic Acid, Polymilchsäure
PLC	Polylactid- ϵ -Caprolacton
PLL	Poly-L-Lysin
PLPG	Polylactid-co-Polyglykolsäure
PMP-22	Peripheral Myelin Protein-22
PNS	peripheres Nervensystem
PQQ	Pyrroloquinolin-Quinon
r	Korrelationskoeffizient
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RFE	relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
S1	erste Sakralnervenwurzel
SMDF	Sensory and Motoneuron Derived Factor
SZ	Schwanzzelle
TGF	Transforming Growth Factor

Th1	erste Thorakalnervenwurzel
Th2	zweite Thorakalnervenwurzel
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Trk	Tropomyosin-Related Kinase
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethane
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
wld	Wallersche Degeneration
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

ABE, S., I. MIZUSAWA, K. KANNO, A. YABASHI, M. SUTO, M. KURAYA, T. HONDA und K. HIRAIWA (2004):

Induction of nerve growth factor mRNA in a rat dorsal root ganglion after application of a tourniquet.

Acta Neuropathol 108, 183-188.

AHMED, M.R., S.H. BASHA, D. GOPINATH, R. MUTHUSAMY und R. JAYAKUMAR (2005):
Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes.

J Peripher Nerv Syst 10, 17-30.

ALLMELING, C., A. JOKUSZIES, K. REIMERS, S. KALL und P.M. VOGT (2006):

Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit.

J Cell Mol Med 10, 770-777.

ANSSELIN, A.D., S.D. CORBEIL und D.F. DAVEY (1995):

Culture of Schwann cells from adult animals.

In Vitro Cell Dev Biol Anim 31, 253-254.

ANSSELIN, A.D., T. FINK und D.F. DAVEY (1997):

Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells.

Neuropathol Appl Neurobiol 23, 387-398.

ANTON, E.S., A.W. SANDROCK, JR. und W.D. MATTHEW (1994):

Merosin promotes neurite growth and Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration in vivo: evidence using an antibody to merosin, ARM-1.

Dev Biol 164, 133-146.

ARAKI, T., und J. MILBRANDT (1996):

Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth.

Neuron 17, 353-361.

ARCHIBALD, S.J., J. SHEFNER, C. KRARUP und R.D. MADISON (1995):
Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube.
J Neurosci 15, 4109-4123.

ASKANAS, V., W.K. ENGEL, M.C. DALAKAS, J.V. LAWRENCE und L.S. CARTER (1980):
Human Schwann cells in tissue culture: histochemical and ultrastructural studies.
Arch Neurol 37, 329-337.

ASPLIN, I.R., S.M. WU, S. MATHEW, G. BHATTACHARJEE und S.V. PIZZO (2001):
Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by alpha(2)-macroglobulin:
evidence for selective modulation of FGF-2-induced angiogenesis.
Blood 97, 3450-3457.

BAEK, S.Y., und S.U. KIM (1998):
Proliferation of human Schwann cells induced by neu differentiation factor isoforms.
Dev Neurosci 20, 512-517.

BARDE, Y.A., D. EDGAR und H. THOENEN (1982):
Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.
Embo J 1, 549-553.

BATTISTON, B., S. GEUNA, M. FERRERO und P. TOS (2005):
Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience
comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair.
Microsurgery 25, 258-267.

BATTISTON, B., P. TOS, T.R. CUSHWAY und S. GEUNA (2000a):
Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results.
Microsurgery 20, 32-36.

BATTISTON, B., P. TOS, S. GEUNA, M.G. GIACOBINI-ROBECCHI und R. GUGLIELMONE
(2000b):
Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of
regeneration.
Microsurgery 20, 37-41.

BE'ERI, H., F. REICHERT, A. SAADA und S. ROTSHENKER (1998):
The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF.
Eur J Neurosci 10, 2707-2713.

BENNETT, D., und L.C. VAUGHAN (1976):
Peroneal nerve paralysis in the cat and dog: an experimental study.
J Small Anim Pract 17, 499-506.

BENTLEY, C.A., und K.F. LEE (2000):
p75 is important for axon growth and Schwann cell migration during development.
J Neurosci 20, 7706-7715.

BERG, M.B., J.L. TYMOCZKO und L. STRYER (2007):
Stryer Biochemie. 6. Aufl.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

BERMINGHAM, J.R., S.S. SCHERER, S. O'CONNELL, E. ARROYO, K.A. KALLA, F.L.
POWELL und M.G. ROSENFELD (1996):
Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal
respiration.
Genes Dev 10, 1751-1762.

BILZER, T., M. VANDEVELDE und A. JAGGY (2005):
Neuropathologie.
in: A. Jaggy (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie. 1. Aufl.
Schlütersche, Hannover, 39-48.

BIXBY, J.L., J. LILIEN und L.F. REICHARDT (1988):
Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann
cells in vitro.
J Cell Biol 107, 353-361.

BLOCHL, A., und R. BLOCHL (2007):
A cell-biological model of p75NTR signaling.
J Neurochem 102, 289-305.

BOCK, P., A. BEINEKE, S. TECHANGAMSUWAN, W. BAUMGARTNER und K.

WEWETZER (2007):

Differential expression of HNK-1 and p75(NTR) in adult canine Schwann cells and olfactory ensheathing cells in situ but not in vitro.

J Comp Neurol 505, 572-585.

BOSSE, F., P. KURY und H.W. MULLER (2001):

Gene expression profiling and molecular aspects in peripheral nerve regeneration.

Restor Neurol Neurosci 19, 5-18.

BOYD, J.G., und T. GORDON (2001):

The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration.

J Neurobiol 49, 314-325.

BOYD, J.G., und T. GORDON (2003a):

Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo.

Exp Neurol 183, 610-619.

BOYD, J.G., und T. GORDON (2003b):

Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury.

Mol Neurobiol 27, 277-324.

BRAGA-SILVA, J. (1999):

The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm.

J Hand Surg Br 24, 703-706.

BRANDT, J., L.B. DAHLIN und G. LUNDBORG (1999):

Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects.

J Hand Surg Br 24, 284-290.

BRANDT, J., A. NILSSON, M. KANJE, G. LUNDBORG und L.B. DAHLIN (2005):

Acutely-dissociated Schwann cells used in tendon autografts for bridging nerve defects in rats: a new principle for tissue engineering in nerve reconstruction.

Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 39, 321-325.

BREDOW, A.L. (2006):

Einfluss von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorkombinationen auf Angio- und Arteriogenese am ischämischen Kaninchenmyokard.

Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität, Diss.

BREHM, D.M., C.H. VITE, H.S. STEINBERG, J. HAVILAND und T. VAN WINCKLE (1995):

A retrospective evaluation of 51 cases of peripheral nerve sheath tumors in the dog.

J Am Anim Hosp Assoc 31, 349-359.

BRITSCH, S. (2004):

Genetische Analyse entwicklungsbiologischer Funktionen der Neuregulin-1/ErbB Signalsystems.

Berlin, Medizinische Fakultät der Charite-Universitätsmedizin, Habil.

BRITSCH, S. (2007):

The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease.

Adv Anat Embryol Cell Biol 190, 1-65.

BRITSCH, S., D.E. GOERICH, D. RIETHMACHER, R.I. PEIRANO, M. ROSSNER, K.A.

NAVE, C. BIRCHMEIER und M. WEGNER (2001):

The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.

Genes Dev 15, 66-78.

BROCKINGTON, A., C. LEWIS, S. WHARTON und P.J. SHAW (2004):

Vascular endothelial growth factor and the nervous system.

Neuropathol Appl Neurobiol 30, 427-446.

BRUNELLI, G.A., B. BATTISTON, A. VIGASIO, G. BRUNELLI und D. MAROCOLO (1993):

Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits.

Microsurgery 14, 247-251.

BUNGE, M.B., P.M. WOOD, L.B. TYNAN, M.L. BATES und J.R. SANES (1989a):

Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker.

Science 243, 229-231.

BUNGE, R.P. (1993):

Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration.

Curr Opin Neurobiol 3, 805-809.

BUNGE, R.P., M.B. BUNGE und M. BATES (1989b):

Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination.

J Cell Biol 109, 273-284.

BÜNGNER, O.V. (1891):

Über die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen.

Beitr Path Anat 10, 321-393.

CALDERON-MARTINEZ, D., Z. GARAVITO, C. SPINEL und H. HURTADO (2002):

Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C).

J Neurosci Methods 114, 1-8.

CALVO, L.J., J.U. GARGALLO, M.A. VIVES, J.U. CASAUS, M.A. CANO und M.

DOMINGUEZ (1989):

Comparison de deux methodes de reinnervation musculaire (suture nerveuse et transposition musculaire) dans les cas de paralysie radiale basse chez le chien.

Revue Med Vet 140, 37-42.

CAMELLITI, P., T.K. BORG und P. KOHL (2005):

Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts.

Cardiovasc Res 65, 40-51.

CAMPANA, W.M. (2007):

Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain.

Brain Behav Immun 21, 522-527.

CANO, M.A., J.U. EZQUERRA, J.A. RAMOS und J.A. BASCUAS (1986):

Transposition musculaire afin de resoudre la paralysie basse du nerf radial chez le chien: etude experimentale.

Revue Med Vet 137, 759-764.

CAREY, D.J., C.F. ELDRIDGE, C.J. CORNBROOKS, R. TIMPL und R.P. BUNGE (1983):
Biosynthesis of type IV collagen by cultured rat Schwann cells.
J Cell Biol 97, 473-479.

CARTER, B.D., G. DECHANT, J.M. FRADE, C. KALTSCHMIDT und Y.A. BARDE (1996):
Neurotrophins and their p75 receptor.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 61, 407-415.

CASAUS, J.U., J.U. EZQUERRA, M.A. VIVES, R. GIL, A. GAZQUEZ und J.U. GARGALLO
(1991):
Deux techniques de transposition musculaire pour le traitement de la paralysie radiale
motrice chez le chien.
Revue Med Vet 124, 395-403.

CASELLA, G.T., R.P. BUNGE und P.M. WOOD (1996):
Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and
expansion in vitro.
Glia 17, 327-338.

CASELLA, G.T., R. WIESER, R.P. BUNGE, I.S. MARGITICH, J. KATZ, L. OLSON und P.M.
WOOD (2000):
Density dependent regulation of human Schwann cell proliferation.
Glia 30, 165-177.

CASPERS, C. (2004):
Versuche zur Rekonstruktion erektiler Nerven über Silikonröhrchen in Kombination mit
gezüchteten homologen Schwannschen Zellen bei der Ratte.
München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss.

CHAN, J.R. (2007):
Myelination: all about Rac 'n' roll.
J Cell Biol 177, 953-955.

CHAN, J.R., J.M. COSGAYA, Y.J. WU und E.M. SHOOTER (2001):
Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous
system.
Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14661-14668.

CHAO, M., P. CASACCIA-BONNEFIL, B. CARTER, A. CHITTKA, H. KONG und S.O. YOON (1998):

Neurotrophin receptors: mediators of life and death.

Brain Res Brain Res Rev 26, 295-301.

CHAO, M.V. (1994):

The p75 neurotrophin receptor.

J Neurobiol 25, 1373-1385.

CHEN, L.F., und W.C. GREENE (2004):

Shaping the nuclear action of NF-kappaB.

Nat Rev Mol Cell Biol 5, 392-401.

CHEN, Y.S., C.L. HSIEH, C.C. TSAI, T.H. CHEN, W.C. CHENG, C.L. HU und C.H. YAO (2000):

Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin.

Biomaterials 21, 1541-1547.

CHENG, L., F.S. ESCH, M.A. MARCHIONNI und A.W. MUDGE (1998):

Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins.

Mol Cell Neurosci 12, 141-156.

CHIANG, H.Y., H.F. CHIEN, H.H. SHEN, J.D. YANG, Y.H. CHEN, J.H. CHEN und S.T. HSIEH (2005):

Reinnervation of muscular targets by nerve regeneration through guidance conduits.

J Neuropathol Exp Neurol 64, 576-587.

CHIU, D.T., I. JANECKA, T.J. KRIZEK, M. WOLFF und R.E. LOVELACE (1982):

Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration.

Surgery 91, 226-233.

CHIU, D.T., und B. STRAUCH (1990):

A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less.

Plast Reconstr Surg 86, 928-934.

CIARDELLI, G., und V. CHIONO (2006):
Materials for peripheral nerve regeneration.
Macromol Biosci 6, 13-26.

CLAUS, P., F. DORING, S. GRINGEL, F. MULLER-OSTERMEYER, J. FUHLROTT, T. KRAFT und C. GROTHE (2003):
Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein.
J Biol Chem 278, 479-485.

COLOGNATO, H., C. FFRENCH-CONSTANT und M.L. FELTRI (2005):
Human diseases reveal novel roles for neural laminins.
Trends Neurosci 28, 480-486.

CORFAS, G., M.O. VELARDEZ, C.P. KO, N. RATNER und E. PELES (2004):
Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions.
J Neurosci 24, 9250-9260.

COSGAYA, J.M., J.R. CHAN und E.M. SHOOTER (2002):
The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination.
Science 298, 1245-1248.

CURTIS, R., H.J. STEWART, S.M. HALL, G.P. WILKIN, R. MIRSKY und K.R. JESSEN (1992):
GAP-43 is expressed by nonmyelin-forming Schwann cells of the peripheral nervous system.
J Cell Biol 116, 1455-1464.

DAHLIN, L.B., und G. LUNDBORG (2001):
Use of tubes in peripheral nerve repair.
Neurosurg Clin N Am 12, 341-352.

D'ANTONIO, M., D. MICHALOVICH, M. PATERSON, A. DROGGITI, A. WOODHOO, R. MIRSKY und K.R. JESSEN (2006):
Gene profiling and bioinformatic analysis of Schwann cell embryonic development and myelination.
Glia 53, 501-515.

DAVIS, J.B., und P. STROOBANT (1990):

Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells.

J Cell Biol 110, 1353-1360.

DAY, W.A., K. KOISHI und I.S. MCLENNAN (2003):

Transforming growth factor beta 1 may regulate the stability of mature myelin sheaths.

Exp Neurol 184, 857-864.

DE RUITER, G.C., R.J. SPINNER, M.J. YASZEMSKI, A.J. WINDEBANK und M.J. MALESSY (2009):

Nerve tubes for peripheral nerve repair.

Neurosurg Clin N Am 20, 91-105.

DELLON, A.L. (1994):

Use of a silicone tube for the reconstruction of a nerve injury.

J Hand Surg Br 19, 271-272.

DELLON, A.L., und S.E. MACKINNON (1988):

An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap.

Plast Reconstr Surg 82, 849-856.

DI BENEDETTO, G., G. ZURA, R. MAZZUCHELLI, A. SANTINELLI, M. SCARPELLI und A. BERTANI (1998):

Nerve regeneration through a combined autologous conduit (vein plus acellular muscle grafts).

Biomaterials 19, 173-181.

DOBROWSKY, R.T., G.M. JENKINS und Y.A. HANNUN (1995):

Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors.

J Biol Chem 270, 22135-22142.

DOBROWSKY, R.T., M.H. WERNER, A.M. CASTELLINO, M.V. CHAO und Y.A. HANNUN (1994):

Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor.

Science 265, 1596-1599.

DONG, Z., C. DEAN, J.E. WALTERS, R. MIRSKY und K.R. JESSEN (1997):
Response of Schwann cells to mitogens in vitro is determined by pre-exposure to serum,
time in vitro, and developmental age.
Glia 20, 219-230.

EINHEBER, S., M.J. HANNOCKS, C.N. METZ, D.B. RIFKIN und J.L. SALZER (1995):
Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions.
J Cell Biol 129, 443-458.

ESPINOZA, B., und W. WHARTON (1986):
Effects of cholera toxin and isobutylmethylxanthine on growth of human fibroblasts.
Am J Physiol 251, C238-246.

EVANS, G.R. (2000):
Challenges to nerve regeneration.
Semin Surg Oncol 19, 312-318.

EVANS, G.R. (2001):
Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs.
Anat Rec 263, 396-404.

EVANS, G.R., K. BRANDT, S. KATZ, P. CHAUVIN, L. OTTO, M. BOGLE, B. WANG, R.K.
MESZLENYI, L. LU, A.G. MIKOS und C.W. PATRICK, JR. (2002):
Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve
regeneration.
Biomaterials 23, 841-848.

FAISSLER, D., K. JURINA, L. CAUZINILLE, F. GASCHEN, F. ADAMO und A. JAGGY
(2005):
Peripheres Nervensystem und Muskulatur.
in: A. Jaggy (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie. 1. Aufl.
Schütersche, Hannover, 235-295.

FANNON, A.M., D.L. SHERMAN, G. ILYINA-GRAGEROVA, P.J. BROPHY, V.L. FRIEDRICH, JR. und D.R. COLMAN (1995):
Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions.
J Cell Biol 129, 189-202.

FANSA, H., T. DODIC, G. WOLF, W. SCHNEIDER und G. KEILHOFF (2003):
Tissue engineering of peripheral nerves: Epineurial grafts with application of cultured Schwann cells.
Microsurgery 23, 72-77.

FANSA, H., und G. KEILHOFF (2003):
Factors influencing nerve regeneration.
Handchir Mikrochir Plast Chir 35, 72-82.

FANSA, H., G. KEILHOFF, O. FRERICHS, G. WOLF und W. SCHNEIDER (1999):
Effect of pre-degeneration of peripheral nerves on plasticity of cultivated Schwann cells and their cell number in vitro.
Handchir Mikrochir Plast Chir 31, 367-372.

FANSA, H., G. KEILHOFF, G. WOLF und W. SCHNEIDER (2002):
Nerven aus dem Labor- Das Tissue Engineering peripherer Nerven zur Versorgung von Nervenverletzungen.
Magdeburger Wissenschaftsjournal 2, 25-32.

FANTON, J.W., C.E. BLAS und S.J. WITHROW (1983):
Sciatic nerve injury as a complication of intramedullary pin fixation of femoral fractures.
J Am Anim Hosp Assoc 19, 687-694.

FAWCETT, J.W., und R.J. KEYNES (1990):
Peripheral nerve regeneration.
Annu Rev Neurosci 13, 43-60.

FELTRI, M.L., und L. WRABETZ (2005):
Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies.
J Peripher Nerv Syst 10, 128-143.

FERNANDEZ-VALLE, C., R.P. BUNGE und M.B. BUNGE (1995):

Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration.

J Neurocytol 24, 667-679.

FERNANDEZ-VALLE, C., L. GWYNN, P.M. WOOD, S. CARBONETTO und M.B. BUNGE (1994):

Anti-beta 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination.

J Neurobiol 25, 1207-1226.

FERRARA, N. (2004):

Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.

Endocr Rev 25, 581-611.

FFRENCH-CONSTANT, C., H. COLOGNATO und R.J. FRANKLIN (2004):

Neuroscience. The mysteries of myelin unwrapped.

Science 304, 688-689.

FIELDS, R.D., J.M. LE BEAU, F.M. LONGO und M.H. ELLISMAN (1989):

Nerve regeneration through artificial tubular implants.

Prog Neurobiol 33, 87-134.

FIGLEWICZ, D.A., R.H. QUARLES, D. JOHNSON, G.R. BARBARASH und N.H.

STERNBERGER (1981):

Biochemical demonstration of the myelin-associated glycoprotein in the peripheral nervous system.

J Neurochem 37, 749-758.

FLORKIEWICZ, R.Z., und A. SOMMER (1989):

Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons.

Proc Natl Acad Sci U S A 86, 3978-3981.

FORTERRE, F. (2005):

Periphere Nerven.

in: A. Jaggy (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie. 1. Aufl.

Schlütersche, Hannover, 221-225.

FORTERRE, F., M. BURGER und L. BRUNNBERG (2001):

Neurotisation zur Behandlung von peripheren Nervenverletzungen beim Hund: 5 Fälle.
Kleintierpraxis 46, 571-557.

FORTERRE, F., S. KAISER, H. WAIBL und L. BRUNNBERG (2003a):

Periphere Nervenerkrankungen: Teil 2 Traumatische Nervenverletzungen der Vordergliedmaße bei Hund und Katze: retrospektive Studie über 45 Fälle.
Kleintierpraxis 48, 589-656.

FORTERRE, F., K. MATIASEK, W. SCHMAHL und L. BRUNNBERG (2003b):

Periphere Nervenerkrankungen: Teil 1 Monoparese, -plegie bei Hund und Katze: retrospektive Studie über 94 Fälle.
Kleintierpraxis 48, 125-184.

FORTERRE, F., K. MATIASEK, W. SCHMAHL, H. WAIBL und L. BRUNNBERG (2004):

Periphere Nervenerkrankungen: Teil 3 Periphere Nerventumoren bei Hund und Katze: retrospektive Studie über 17 Fälle.
Kleintierpraxis 49, 1-68.

FORTERRE, F., A. TOMEK, U. RYTZ, L. BRUNNBERG, A. JAGGY und D. SPRENG (2007):

Iatrogenic sciatic nerve injury in eighteen dogs and nine cats (1997-2006).
Vet Surg 36, 464-471.

FRADE, J.M., und Y.A. BARDE (1998):

Nerve growth factor: two receptors, multiple functions.
Bioessays 20, 137-145.

FREY, M., G. FREILINGER, J. HOLLE und H. GRUBER (1984):

Operative technic in muscle transplattation with microneurovascular anastomoses based on animal experiment studies.
Handchir Mikrochir Plast Chir 16, 211-214.

FREY, M., W. GIRSCH und P. GIOVANOLI (1998):

Rekonstruktionsmöglichkeiten bei der Plexus brachialis-Lähmung: Neurotisation.
Langenbecks Arch Chir Suppl II, 550-553.

FRIEDMAN, W.J. (2000):

Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor.

J Neurosci 20, 6340-6346.

FROSTICK, S.P., Q. YIN und G.J. KEMP (1998):

Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration.

Microsurgery 18, 397-405.

FU, S.Y., und T. GORDON (1997):

The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration.

Mol Neurobiol 14, 67-116.

FUCCILLO, M., A.L. JOYNER und G. FISHELL (2006):

Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development.

Nat Rev Neurosci 7, 772-783.

FUNK, D., C. FRICKE und B. SCHLOSSHAUER (2007):

Aging Schwann cells in vitro.

Eur J Cell Biol 86, 207-219.

GARBAY, B., A.M. HEAPE, F. SARGUEIL und C. CASSAGNE (2000):

Myelin synthesis in the peripheral nervous system.

Prog Neurobiol 61, 267-304.

GARRATT, A.N., S. BRITSCH und C. BIRCHMEIER (2000a):

Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell.

Bioessays 22, 987-996.

GARRATT, A.N., O. VOICULESCU, P. TOPILKO, P. CHARNAY und C. BIRCHMEIER (2000b):

A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the Schwann cell precursor pool.

J Cell Biol 148, 1035-1046.

GARRITY, R.W. (1955):

The use of plastic and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries.

Surg Forum 6, 517-520.

GIANNINI, C., und P.J. DYCK (1990):

The fate of Schwann cell basement membranes in permanently transected nerves.

J Neuropathol Exp Neurol 49, 550-563.

GILMORE, D.R. (1984):

Sciatic nerve injury in twenty nine dogs.

J Am Anim Hosp Assoc 20, 403-407.

GLÜCK, T. (1880):

Über Neuroplastik auf dem Weg der Transplantation.

Arch Klin Chir, 606-616.

GOETZ, J.A., L.M. SUBER, X. ZENG und D.J. ROBBINS (2002):

Sonic Hedgehog as a mediator of long-range signaling.

Bioessays 24, 157-165.

GORDON, T., O. SULAIMAN und J.G. BOYD (2003):

Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries.

J Peripher Nerv Syst 8, 236-250.

GOTZ, R., R. KOSTER, C. WINKLER, F. RAULF, F. LOTTSPREICH, M. SCHARTL und H. THOENEN (1994):

Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family.

Nature 372, 266-269.

GREENFIELD, S., S. BROSTOFF, E.H. EYLAR und P. MORELL (1973):

Protein composition of myelin of the peripheral nervous system.

J Neurochem 20, 1207-1216.

GREENFIELD, S., M.J. WEISE, G. GANTT, E.L. HOGAN und S.W. BROSTOFF (1982):

Basic proteins of rodent peripheral nerve myelin: immunochemical identification of the 21.5K, 18.5K, 17K, 14K, and P2 proteins.

J Neurochem 39, 1278-1282.

GRIFFITHS, I.R. (1974):

Avulsion of the brachial plexus -1 Neuropathology of the spinal cord and peripheral nerves.

J Small Anim Pract 15, 177-182.

GRITLI-LINDE, A., P. LEWIS, A.P. MCMAHON und A. LINDE (2001):

The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides.

Dev Biol 236, 364-386.

GROTHER, C., K. HAASSTERT und J. JUNGNICHEL (2006):

Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration--lessons from in vivo studies in mice and rats.

Brain Res Rev 51, 293-299.

GROTHER, C., C. MEISINGER und P. CLAUS (2001):

In vivo expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal ganglia.

J Comp Neurol 434, 342-357.

GROTHER, C., C. MEISINGER, A. HERTENSTEIN, H. KURZ und K. WEWETZER (1997):

Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion.

Neuroscience 76, 123-135.

GROTHER, C., C. MEISINGER, J. HOLZSCHUH, K. WEWETZER und P. CATTINI (1998):

Over-expression of the 18 kD and 21/23 kD fibroblast growth factor-2 isoforms in PC12 cells and Schwann cells results in altered cell morphology and growth.

Brain Res Mol Brain Res 57, 97-105.

GROTHER, C., und G. NIKKHAH (2001):

The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration.

Anat Embryol (Berl) 204, 171-177.

GROVE, M., N.H. KOMIYAMA, K.A. NAVE, S.G. GRANT, D.L. SHERMAN und P.J.

BROPHY (2007):

FAK is required for axonal sorting by Schwann cells.

J Cell Biol 176, 277-282.

GUENARD, V., N. KLEITMAN, T.K. MORRISSEY, R.P. BUNGE und P. AEBISCHER (1992):
Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance
channels enhance peripheral nerve regeneration.

J Neurosci 12, 3310-3320.

GUPTA, R., M. GRAY, T. CHAO, D. BEAR, E. MODAFFERI und T. MOZAFFAR (2005):
Schwann cells upregulate vascular endothelial growth factor secondary to chronic nerve
compression injury.

Muscle Nerve 31, 452-460.

GUPTA, R., L.S. RUMMLER, W. PALISPIS, L. TRUONG, T. CHAO, K. ROWSHAN, T.
MOZAFFAR und O. STEWARD (2006):

Local down-regulation of myelin-associated glycoprotein permits axonal sprouting with
chronic nerve compression injury.

Exp Neurol 200, 418-429.

GUSEVA, D., D.N. ANGELOV, A. IRINTCHEV und M. SCHACHNER (2009):

Ablation of adhesion molecule L1 in mice favours Schwann cell proliferation and functional
recovery after peripheral nerve injury.

Brain 132, 2180-2195.

HAASTERT, K., E. LIPOKATIC, M. FISCHER, M. TIMMER und C. GROTHE (2006a):

Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-
expressing different FGF-2 isoforms.

Neurobiol Dis 21, 138-153.

HAASTERT, K., C. MAURITZ, S. CHATURVEDI und C. GROTHE (2007):

Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective
non-viral transfection protocol.

Nat Protoc 2, 99-104.

HAASTERT, K., C. MAURITZ, C. MATTHIES und C. GROTHE (2006b):

Autologous adult human Schwann cells genetically modified to provide alternative cellular
transplants in peripheral nerve regeneration.

J Neurosurg 104, 778-786.

HADLOCK, T., C. SUNDBACK, D. HUNTER, M. CHENEY und J.P. VACANTI (2000):
A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve
regeneration.

Tissue Eng 6, 119-127.

HALL, S.M., H. LI und A.P. KENT (1997):

Schwann cells responding to primary demyelination in vivo express p75NTR and c-erbB
receptors: a light and electron immunohistochemical study.

J Neurocytol 26, 679-690.

HAMMERSCHMIDT, M., A. BROOK und A.P. MCMAHON (1997):

The world according to hedgehog.

Trends Genet 13, 14-21.

HE, X., R. GERRERO, D.M. SIMMONS, R.E. PARK, C.J. LIN, L.W. SWANSON und M.G.
ROSENFELD (1991):

Tst-1, a member of the POU domain gene family, binds the promoter of the gene encoding
the cell surface adhesion molecule P0.

Mol Cell Biol 11, 1739-1744.

HEATH, C.A., und G.E. RUTKOWSKI (1998):

The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration.

Trends Biotechnol 16, 163-168.

HEFTI, F. (1997):

Pharmacology of neurotrophic factors.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 37, 239-267.

HEUPEL, K. (2007):

Die Rolle von transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β) in der Entwicklung von
Synapsen.

Göttingen, Georg-August-Universität, Diss.

HIRATA, H., H. HIBASAMI, T. YOSHIDA, M. OGAWA, M. MATSUMOTO, A. MORITA und A. UCHIDA (2001):

Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves.

Glia 36, 245-258.

HIRATA, K., und M. KAWABUCHI (2002):

Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration.

Microsc Res Tech 57, 541-547.

HOBSON, M.I., C.J. GREEN und G. TERENCEHI (2000):

VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy.

J Anat 197 Pt 4, 591-605.

HOOD, B., H.B. LEVENE und A.D. LEVI (2009):

Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects.

Neurosurg Focus 26, E4.

HSU, S.H., P.S. LU, H.C. NI und C.H. SU (2007):

Fabrication and evaluation of microgrooved polymers as peripheral nerve conduits.

Biomed Microdevices 9, 665-674.

HUGHES, S.E. (1997):

Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues.

J Histochem Cytochem 45, 1005-1019.

IDE, C. (1996):

Peripheral nerve regeneration.

Neurosci Res 25, 101-121.

IGNATIADIS, I.A., C.K. YIANNAKOPOULOS, A.D. BARBITSIOTI, A.M. AVRAM, H.G. PATRALEXIS, C.K. TSOLAKIS, A.E. PAPALOIS, T.H. XENAKIS, A.E. BERIS und P.N. SOUCACOS (2007):

Diverse types of epineural conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit.

Microsurgery 27, 98-104.

INADA, Y., S. MORIMOTO, Y. TAKAKURA und T. NAKAMURA (2004):

Regeneration of peripheral nerve gaps with a polyglycolic acid-collagen tube.

Neurosurgery 55, 640-646.

JACOBSON, A., und S.C. SCHRADER (1987):

Peripheral nerve injury associated with fracture or fracture - dislocation of of the pelvis in dogs and cats: 34 cases (1978-1982).

J Am Anim Hosp Assoc 190, 569-572.

JAEGLE, M., M. GHAZVINI, W. MANDEMAKERS, M. PIIRSOO, S. DRIEGEN, F.

LEVAVASSEUR, S. RAGHOENATH, F. GROSVELD und D. MEIJER (2003):

The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development.

Genes Dev 17, 1380-1391.

JAEGLE, M., W. MANDEMAKERS, L. BROOS, R. ZWART, A. KARIS, P. VISSER, F.

GROSVELD und D. MEIJER (1996):

The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation.

Science 273, 507-510.

JESSEN, K.R. (2004):

Glial cells.

Int J Biochem Cell Biol 36, 1861-1867.

JESSEN, K.R., und R. MIRSKY (1991):

Schwann cell precursors and their development.

Glia 4, 185-194.

JESSEN, K.R., und R. MIRSKY (1997):

Embryonic Schwann cell development: the biology of Schwann cell precursors and early Schwann cells.

J Anat 191 (Pt 4), 501-505.

JESSEN, K.R., und R. MIRSKY (1999a):

Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development.

Trends Neurosci 22, 402-410.

JESSEN, K.R., und R. MIRSKY (1999b):

Why do Schwann cells survive in the absence of axons?

Ann N Y Acad Sci 883, 109-115.

JESSEN, K.R., und R. MIRSKY (2002):

Signals that determine Schwann cell identity.

J Anat 200, 367-376.

JESSEN, K.R., und R. MIRSKY (2005):

The origin and development of glial cells in peripheral nerves.

Nat Rev Neurosci 6, 671-682.

JESSEN, K.R., L. MORGAN, H.J. STEWART und R. MIRSKY (1990):

Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions.

Development 109, 91-103.

JIANG, Y., M. ZHANG, K. KOISHI und I.S. MCLENNAN (2000):

TGF-beta 2 attenuates the injury-induced death of mature motoneurons.

J Neurosci Res 62, 809-813.

JIRSOVA, K., P. SODAAR, V. MANDYS und P.R. BAR (1997):

Cold jet: a method to obtain pure Schwann cell cultures without the need for cytotoxic, apoptosis-inducing drug treatment.

J Neurosci Methods 78, 133-137.

JOHNSON, E.O., A.B. ZOUBOS und P.N. SOUCACOS (2005):

Regeneration and repair of peripheral nerves.

Injury 36 Suppl 4, S24-29.

JUNGNICKEL, J., K. GRANSALKE, M. TIMMER und C. GROTHE (2004):

Fibroblast growth factor receptor 3 signaling regulates injury-related effects in the peripheral nervous system.

Mol Cell Neurosci 25, 21-29.

JUNGNICKEL, J., K. HAASE, J. KONITZER, M. TIMMER und C. GROTHE (2006):

Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor.

J Neurobiol 66, 940-948.

KADLUBOWSKI, M., R.A. HUGHES und N.A. GREGSON (1984):

Spontaneous and experimental neuritis and the distribution of the myelin protein P2 in the nervous system.

J Neurochem 42, 123-129.

KANDEL, E.R., J.H. SCHWARTZ und T.M. JESELL (1996):

Neurowissenschaften. 1. Aufl.

Spektrum Verlag, Heidelberg.

KAUPPILA, T., E. JYVASJARVI, T. HUOPANIEMI, E. HUJANEN und P. LIESI (1993):

A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve.

Exp Neurol 123, 181-191.

KEILHOFF, G., H. FANSA, W. SCHNEIDER und G. WOLF (1999):

In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits.

J Neurosci Methods 89, 17-24.

KESKIN, M., H. AKBAS, O.A. UYSAL, S. CANAN, M. AYYLDZ, E. AGAR und S. KAPLAN (2004):

Enhancement of nerve regeneration and orientation across a gap with a nerve graft within a vein conduit graft: a functional, stereological, and electrophysiological study.

Plast Reconstr Surg 113, 1372-1379.

KIM, D.H., S.E. CONNOLLY, D.G. KLINE, R.M. VOORHIES, A. SMITH, M. POWELL, T. YOES und J.K. DANILOFF (1994):

Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair.

J Neurosurg 80, 254-260.

KIM, D.H., S.E. CONNOLLY, S. ZHAO, R.W. BEUERMAN, R.M. VOORHIES und D.G. KLINE (1993):

Comparison of macropore, semipermeable, and nonpermeable collagen conduits in nerve repair.

J Reconstr Microsurg 9, 415-420.

KIM, S.M., S.K. LEE und J.H. LEE (2007):

Peripheral nerve regeneration using a three dimensionally cultured Schwann cell conduit.

J Craniofac Surg 18, 475-488.

KINGSLEY, D.M. (1994):

The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.

Genes Dev 8, 133-146.

KOEPPEN, A.H. (2004):

Wallerian degeneration: history and clinical significance.

J Neurol Sci 220, 115-117.

KRAUS, H., und H. REISNER (1940):

Behandlungsergebnisse von Verletzungen peripherer Nerven mit besonderer Berücksichtigung der Schussverletzungen der Jahre 1919, 1927 und 1934.

Arch Klin Chir 199, 318-336.

KRIEGLSTEIN, K. (2006):

Cell death in the nervous system.

Adv Exp Med Biol 557, 1-10.

KUHLBRODT, K., B. HERBARTH, E. SOCK, J. ENDERICH, I. HERMANS-BORGMEYER und M. WEGNER (1998a):

Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells.

J Biol Chem 273, 16050-16057.

KUHLBRODT, K., B. HERBARTH, E. SOCK, I. HERMANS-BORGMEYER und M. WEGNER (1998b):

Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells.

J Neurosci 18, 237-250.

LANGE, T., N. GUTTMANN-RAVIV, L. BARUCH, M. MACHLUF und G. NEUFELD (2003):
VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells.

J Biol Chem 278, 17164-17169.

LE FORESTIER, N., M.C. LESCO und R.K. GHERARDI (1993):

Anti-NKH-1 antibody specifically stains unmyelinated fibres and non-myelinating Schwann cell columns in humans.

Neuropathol Appl Neurobiol 19, 500-506.

LEE, H., E.K. JO, S.Y. CHOI, S.B. OH, K. PARK, J.S. KIM und S.J. LEE (2006):

Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration.

Biochem Biophys Res Commun 350, 742-747.

LEE, M., A. BRENNAN, A. BLANCHARD, G. ZOIDL, Z. DONG, A. TABERNERO, C. ZOIDL, M.A. DENT, K.R. JESSEN und R. MIRSKY (1997):

P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively.

Mol Cell Neurosci 8, 336-350.

LEE, S.K., und S.W. WOLFE (2000):

Peripheral nerve injury and repair.

J Am Acad Orthop Surg 8, 243-252.

LEVI, A.D., R.P. BUNGE, J.A. LOFGREN, L. MEIMA, F. HEFTI, K. NIKOLICS und M.X. SLIWKOWSKI (1995):

The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation.

J Neurosci 15, 1329-1340.

LEVI-MONTALCINI, R. (1987):

The nerve growth factor 35 years later.

Science 237, 1154-1162.

L'HOTE, C.G., und M.A. KNOWLES (2005):

Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis.

Exp Cell Res 304, 417-431.

LI, H., C. WIGLEY und S.M. HALL (1998):

Chronically denervated rat Schwann cells respond to GGF in vitro.

Glia 24, 290-303.

LI, Q., P. PING, H. JIANG und K. LIU (2006):

Nerve conduit filled with GDNF gene-modified Schwann cells enhances regeneration of the peripheral nerve.

Microsurgery 26, 116-121.

LI, S.T., S.J. ARCHIBALD, C. KRARUP und R.D. MADISON (1992):

Peripheral nerve repair with collagen conduits.

Clin Mater 9, 195-200.

LIEBERMAN, A.R. (1971):

The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury.

Int Rev Neurobiol 14, 49-124.

LIEBICH, H.-G. (2004):

Funktionelle Histologie der Haustiere. 4. Aufl.

Schattauer, Stuttgart.

LIETZ, M., L. DREESMANN, M. HOSS, S. OBERHOFFNER und B. SCHLOSSHAUER
(2006):

Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types.

Biomaterials 27, 1425-1436.

LIU, S., H. LI, J. OU YANG, H. PENG, K. WU, Y. LIU und J. YANG (2005):
Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes filled with pyrroloquinoline
quinone.
Microsurgery 25, 329-337.

LOHMEYER, J.A., Z.L. SHEN, G.F. WALTER und A. BERGER (2007):
Bridging extended nerve defects with an artificial nerve graft containing Schwann cells pre-
seeded on polyglactin filaments.
Int J Artif Organs 30, 64-74.

LUBINSKA, L. (1977):
Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve.
Brain Res 130, 47-63.

LUNDBORG, G. (2003):
Richard P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair--a challenge to the plastic brain.
J Peripher Nerv Syst 8, 209-226.

LUNDBORG, G., L.B. DAHLIN, N. DANIELSEN, R.H. GELBERMAN, F.M. LONGO, H.C.
POWELL und S. VARON (1982a):
Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump
components.
Exp Neurol 76, 361-375.

LUNDBORG, G., L.B. DAHLIN, N. DANIELSEN, H.A. HANSSON, A. JOHANNESSEN, F.M.
LONGO und S. VARON (1982b):
Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the
possible involvement of neuronotrophic factors.
J Hand Surg Am 7, 580-587.

MACKINNON, S.E., und A.L. DELLON (1990):
Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube.
Plast Reconstr Surg 85, 419-424.

MACKINNON, S.E., und A.R. HUDSON (1992):
Clinical application of peripheral nerve transplantation.
Plast Reconstr Surg 90, 695-699.

MAGHNI, K., O.M. NICOLESCU und J.G. MARTIN (1999):
Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation:
comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA.
J Immunol Methods 223, 185-194.

MAKWANA, M., und G. RAIVICH (2005):
Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration.
Febs J 272, 2628-2638.

MALECKI, J., J. WESCHE, C.S. SKJERPEN, A. WIEDLOCHA und S. OLSNES (2004):
Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by
a common mechanism.
Mol Biol Cell 15, 801-814.

MARTINI, R., und M. SCHACHNER (1997):
Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial
cell surface molecules.
Glia 19, 298-310.

MARTINI, R., Y. XIN und M. SCHACHNER (1994):
Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and
neurites in culture.
Glia 10, 70-74.

MASSAGUE, J. (1990):
The transforming growth factor-beta family.
Annu Rev Cell Biol 6, 597-641.

MATSUMOTO, K., K. OHNISHI, T. KIYOTANI, T. SEKINE, H. UEDA, T. NAKAMURA, K.
ENDO und Y. SHIMIZU (2000):
Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-
collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological
evaluation of regenerated nerves.
Brain Res 868, 315-328.

MAURITZ, C., C. GROTHE und K. HAASSTERT (2004):

Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells.

J Neurosci Res 77, 453-461.

MAY, F., M. VROEMEN, K. MATIASEK, J. HENKE, T. BRILL, A. LEHMER, M. APPRICH, W. ERHARDT, S. SCHOELER, R. PAUL, A. BLESCH, R. HARTUNG, B. GANSBACHER und N. WEIDNER (2005):

Nerve replacement strategies for cavernous nerves.

Eur Urol 48, 372-378.

MCLENNAN, I.S., und K. KOISHI (2002):

The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells.

Int J Dev Biol 46, 559-567.

MEIER, C., E. PARMANTIER, A. BRENNAN, R. MIRSKY und K.R. JESSEN (1999):

Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB.

J Neurosci 19, 3847-3859.

MEISINGER, C., C. ZESCHNIGK und C. GROTHE (1996):

In vivo and in vitro effect of glucocorticoids on fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 expression.

J Biol Chem 271, 16520-16525.

MICHAILOV, G.V., M.W. SEREDA, B.G. BRINKMANN, T.M. FISCHER, B. HAUG, C. BIRCHMEIER, L. ROLE, C. LAI, M.H. SCHWAB und K.A. NAVE (2004):

Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness.

Science 304, 700-703.

MILEK, D.J., H.O. SARVAS, S. GREENFIELD, M.J. WEISE und S.W. BROSTOFF (1981):

An immunological characterization of the basic proteins of rodent sciatic nerve myelin.

Brain Res 208, 387-396.

MILLES, H. (2000):

Techniques for nerve grafting.

Hand Clin 16, 73-91.

MILTENYI, S., W. MULLER, W. WEICHEL und A. RADBRUCH (1990):

High gradient magnetic cell separation with MACS.

Cytometry 11, 231-238.

MOHANNA, P.N., G. TERENCEHI und M. WIBERG (2005):

Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long-term evaluation.

Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 39, 129-137.

MOHANNA, P.N., R.C. YOUNG, M. WIBERG und G. TERENCEHI (2003):

A composite poly-hydroxybutyrate-glia growth factor conduit for long nerve gap repairs.

J Anat 203, 553-565.

MOLANDER, H., O. ENKVIST, J. HAGGLUND, Y. OLSSON und E. TOREBJORK (1983):

Nerve repair using a polyglactin tube and nerve graft: an experimental study in the rabbit.

Biomaterials 4, 276-280.

MOLANDER, H., Y. OLSSON, O. ENKVIST, S. BOWALD und I. ERIKSSON (1982):

Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube.

Muscle Nerve 5, 54-57.

MONUKI, E.S., R. KUHN und G. LEMKE (1993):

Repression of the myelin P0 gene by the POU transcription factor SCIP.

Mech Dev 42, 15-32.

MONUKI, E.S., R. KUHN, G. WEINMASTER, B.D. TRAPP und G. LEMKE (1990):

Expression and activity of the POU transcription factor SCIP.

Science 249, 1300-1303.

MONUKI, E.S., G. WEINMASTER, R. KUHN und G. LEMKE (1989):

SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP.

Neuron 3, 783-793.

MORRISSEY, T.K., R.P. BUNGE und N. KLEITMAN (1995a):
Human Schwann cells in vitro. I. Failure to differentiate and support neuronal health under co-culture conditions that promote full function of rodent cells.
J Neurobiol 28, 171-189.

MORRISSEY, T.K., N. KLEITMAN und R.P. BUNGE (1991):
Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve.
J Neurosci 11, 2433-2442.

MORRISSEY, T.K., N. KLEITMAN und R.P. BUNGE (1995b):
Human Schwann cells in vitro. II. Myelination of sensory axons following extensive purification and heregulin-induced expansion.
J Neurobiol 28, 190-201.

MUIR, D. (2009):
The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair.
Exp Neurol, accepted May 2009, E-pub ahead of print.

MULLER-OSTERMEYER, F., P. CLAUS und C. GROTHE (2001):
Distinctive effects of rat fibroblast growth factor-2 isoforms on PC12 and Schwann cells.
Growth Factors 19, 175-191.

MUMENTHALER, M., M. STÖHR und H. MÜLLER-VAHL (2007):
Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome. 9. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

MYCKATYN, T.M., und S.E. MACKINNON (2004):
A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction.
Neurol Res 26, 124-138.

NAKAMURA, T., Y. INADA, S. FUKUDA, M. YOSHITANI, A. NAKADA, S. ITOI, S. KANEMARU, K. ENDO und Y. SHIMIZU (2004):
Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube.
Brain Res 1027, 18-29.

NAMIECINSKA, M., K. MARCINIAK und J.Z. NOWAK (2005):
VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor.
Postepy Hig Med Dosw (Online) 59, 573-583.

NARAYANAN, V., E. BARBOSA, R. REED und G. TENNEKOON (1988):
Characterization of a cloned cDNA encoding rabbit myelin P2 protein.
J Biol Chem 263, 8332-8337.

NAVARRO, X., F.J. RODRIGUEZ, R.O. LABRADOR, M. BUTI, D. CEBALLOS, N. GOMEZ,
J. CUADRAS und G. PEREGO (1996):
Peripheral nerve regeneration through bioresorbable and durable nerve guides.
J Peripher Nerv Syst 1, 53-64.

NAVES, F.J., J.J. HUERTA, O. GARCIA-SUAREZ, N. URDANGARAY, I. ESTEBAN, M.E.
DEL VALLE und J.A. VEGA (1996):
Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal (microtubule, microtubule-associated, and
neurofilament) proteins in adult human dorsal root ganglia.
Anat Rec 244, 246-256.

NDUBAKU, U., und M.E. DE BELLARD (2008):
Glial cells: old cells with new twists.
Acta Histochem 110, 182-195.

NEUFELD, G., T. COHEN, S. GENGRINOVITCH und Z. POLTORAK (1999):
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.
Faseb J 13, 9-22.

NICKEL, R., A. SCHUMMER und E. SEIFERLE (1992):
Peripheres Nervensystem, Systema nervosum periphericum.
in: G. Böhme (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. 4. 6. Aufl.
Parey, Berlin, 228-349.

NICKOLS, J.C., W. VALENTINE, S. KANWAL und B.D. CARTER (2003):
Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral
myelin formation.
Nat Neurosci 6, 161-167.

NILSSON, A.S., M. FAINZILBER, P. FALCK und C.F. IBANEZ (1998):
Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish.
FEBS Lett 424, 285-290.

ORNITZ, D.M., und N. ITOH (2001):
Fibroblast growth factors.
Genome Biol 2, REVIEWS3005.

PAREEK, S., U. SUTER, G.J. SNIPES, A.A. WELCHER, E.M. SHOOTER und R.A.
MURPHY (1993):
Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells.
J Biol Chem 268, 10372-10379.

PARKINSON, D.B., Z. DONG, H. BUNTING, J. WHITFIELD, C. MEIER, H. MARIE, R.
MIRSKY und K.R. JESSEN (2001):
Transforming growth factor beta (TGFbeta) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo:
examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of
TGFbeta-mediated death to Schwann cell differentiation.
J Neurosci 21, 8572-8585.

PARMANTIER, E., B. LYNN, D. LAWSON, M. TURMAINE, S.S. NAMINI, L. CHAKRABARTI,
A.P. MCMAHON, K.R. JESSEN und R. MIRSKY (1999):
Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve
sheaths.
Neuron 23, 713-724.

PAULS, J. (2003):
In vitro Kultivierung und Expansion caniner Schwannzellen.
Berlin, Freie Universität Berlin, Diss.

PAULS, J., C. NOLTE, F. FORTERRE und L. BRUNNBERG (2004):
Cultivation and expansion of canine Schwann cells using reexplantation.
Berl Munch Tierarztl Wochenschr 117, 341-352.

PAVELKA, M. und J. ROTH (2005):
Funktionelle Ultrastruktur: Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben. 1. Aufl.
Springer, Wien.

PEIRANO, R.I., D.E. GOERICH, D. RIETHMACHER und M. WEGNER (2000a):
Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10.
Mol Cell Biol 20, 3198-3209.

PERRY, V.H., M.C. BROWN und S. GORDON (1987):
The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for
macrophages in regeneration.
J Exp Med 165, 1218-1223.

PHILLIPS, J.B., S.C. BUNTING, S.M. HALL und R.A. BROWN (2005):
Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit.
Tissue Eng 11, 1611-1617.

PIETRUCHA-DUTCZAK, M., W. MARCOL, I. KORCZYNSKA, I. MATUSZEK, D. GORKA
und J. LEWIN-KOWALIK (2003):
Protein composition and structure of the myelin sheath. Part I.
Pol Merkur Lekarski 15, 268-272.

PODRATZ, J.L., E. RODRIGUEZ und A.J. WINDEBANK (2001):
Role of the extracellular matrix in myelination of peripheral nerve.
Glia 35, 35-40.

PREHN, J.H., B. PERUCHE, K. UNSICKER und J. KRIEGLSTEIN (1993):
Isoform-specific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary
neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate.
J Neurochem 60, 1665-1672.

PROBSTMEIER, R., J. NELLEN, S. GLOOR, A. WERNIG und P. PESHEVA (2001):
Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system.
J Neurosci Res 64, 70-78.

QUARLES, R.H. (2002):
Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration.
Cell Mol Life Sci 59, 1851-1871.

QUARLES, R.H. (2007):

Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond.
J Neurochem 100, 1431-1448.

QUARLES, R.H., J.L. EVERLY und R.O. BRADY (1973):

Myelin-associated glycoprotein: a developmental change.
Brain Res 58, 506-509.

RAAB, S., und K.H. PLATE (2007):

Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system.
Acta Neuropathol 113, 607-626.

RAABE, T.D., G. DEADWYLER, J.W. VARGA und G.H. DEVRIES (2004):

Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells.
Glia 45, 197-207.

RAFF, M.C., A. HORNBY-SMITH und J.P. BROCKES (1978):

Cyclic AMP as a mitogenic signal for cultured rat Schwann cells.
Nature 273, 672-673.

REICHERT, F., A. SAADA und S. ROTSHENKER (1994):

Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2.
J Neurosci 14, 3231-3245.

REYES, O., I. SOSA und D.P. KUFFLER (2005):

Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury.
P R Health Sci J 24, 215-223.

RIMAROLI, C., und T. BRUZZESE (2000):

Overview of SPA-S-843 in vitro activity against filamentous fungi.
Chemotherapy 46, 28-35.

ROCHE, P.H., D. FIGARELLA-BRANGER, L. DANIEL, N. BIANCO, W. PELLET und J.F. PELLISSIER (1997):

Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumors.

J Neurol Sci 151, 127-133.

RODRIGUEZ, F.J., E. VERDU, D. CEBALLOS und X. NAVARRO (2000):

Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration.

Exp Neurol 161, 571-584.

RODRIGUEZ-TEBAR, A., G. DECHANT und Y.A. BARDE (1991):

Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 331, 255-258.

ROSENSTEIN, J.M., und J.M. KRUM (2004):

New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels.

Exp Neurol 187, 246-253.

ROSS, M.H., L.J. ROMRELL und I.K. GORDON (1995):

Histology a Text and Atlas. 3. Aufl.

Williams and Wilkins, Baltimore.

RÜSSE, I., und F. SINOWATZ (1998):

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 2. Aufl.

Parey, Berlin.

RUTKOWSKI, J.L., C.J. KIRK, M.A. LERNER und G.I. TENNEKOON (1995):

Purification and expansion of human Schwann cells in vitro.

Nat Med 1, 80-83.

RUTKOWSKI, J.L., G.I. TENNEKOON und J.E. MCGILLICUDDY (1992):

Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves.

Ann Neurol 31, 580-586.

SALOMON, F.V., H. GEYER und U. GILLE (2005):

Anatomie für die Tiermedizin. 1. Aufl.

Enke, Stuttgart.

SCARLATO, M., J. ARA, P. BANNERMAN, S. SCHERER und D. PLEASURE (2003):
Induction of neuropilins-1 and -2 and their ligands, Sema3A, Sema3F, and VEGF, during
Wallerian degeneration in the peripheral nervous system.
Exp Neurol 183, 489-498.

SCARLATO, M., T. XU, P. BANNERMAN, J. BEESLEY, U.R. REDDY, A. ROSTAMI, S.S.
SCHERER und D. PLEASURE (2001):
Axon-Schwann cell interactions regulate the expression of fibroblast growth factor-5 (FGF-5).
J Neurosci Res 66, 16-22.

SCARPINI, E., B.Q. KREIDER, R.P. LISAK und D.E. PLEASURE (1988):
Establishment of Schwann cell cultures from adult rat peripheral nerves.
Exp Neurol 102, 167-176.

SCHERER, S.S., D.Y. WANG, R. KUHN, G. LEMKE, L. WRABETZ und J. KAMHOLZ
(1994):
Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP.
J Neurosci 14, 1930-1942.

SCHERER, S.S., Y.T. XU, P.G. BANNERMAN, D.L. SHERMAN und P.J. BROPHY (1995):
Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glia interactions and
polarized localization during development.
Development 121, 4265-4273.

SCHNORR, B., und M. KRESSIN (2006):
Embryologie der Haustiere. 5. Aufl.
Enke, Stuttgart.

SCHRATZBERGER, P., G. SCHRATZBERGER, M. SILVER, C. CURRY, M. KEARNEY, M.
MAGNER, J. ALROY, L.S. ADELMAN, D.H. WEINBERG, A.H. ROPPER und J.M. ISNER
(2000):
Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy.
Nat Med 6, 405-413.

SCHULTZE, O. (1968):

Über den frühesten Nachweis der Markscheidenfärbung im Nervengewebe.

in: B. Romeis (Hrsg.): Mikroskopische Technik. 16. Aufl.

R. Oldenbourg Verlag, München, 451-452.

SEILHEIMER, B. und M. SCHACHNER (1988):

Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture.

J Cell Biol 107, 341-351.

SENDTNER, M., B. HOLTSMANN und R.A. HUGHES (1996):

The response of motoneurons to neurotrophins.

Neurochem Res 21, 831-841.

SHAH, N.M., M.A. MARCHIONNI, I. ISAACS, P. STROOBANT und D.J. ANDERSON (1994):

Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate.

Cell 77, 349-360.

SHAMASH, S., F. REICHERT und S. ROTSHENKER (2002):

The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta.

J Neurosci 22, 3052-3060.

SHAPIRO, L., J.P. DOYLE, P. HENSLEY, D.R. COLMAN und W.A. HENDRICKSON (1996):

Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin.

Neuron 17, 435-449.

SHELLSWELL, G.B., D.J. RESTALL, V.C. DUANCE und A.J. BAILEY (1979):

Identification and differential distribution of collagen types in the central and peripheral nervous systems.

FEBS Lett 106, 305-308.

SHERMAN, D.L., und P.J. BROPHY (2005):

Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth.

Nat Rev Neurosci 6, 683-690.

SHUMAN, S., M. HARDY und D. PLEASURE (1983):

Peripheral nervous system myelin and Schwann cell glycoproteins: identification by lectin binding and partial purification of a peripheral nervous system myelin-specific 170,000 molecular weight glycoprotein.

J Neurochem 41, 1277-1285.

SJOBERG, J., und M. KANJE (1990):

The initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of the local environment for the conditioning lesion effect.

Brain Res 529, 79-84.

SMITH, D., C. TWEED, P. FERNYHOUGH und G.W. GLAZNER (2009):

Nuclear factor-kappaB activation in axons and Schwann cells in experimental sciatic nerve injury and its role in modulating axon regeneration: studies with etanercept.

J Neuropathol Exp Neurol 68, 691-700.

SMITH, G.M., E.D. RABINOVSKY, J.L. MCMANAMAN und H.D. SHINE (1993):

Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury.

Exp Neurol 121, 239-247.

SMITH, J.R., S. VENABLE, T.W. ROBERTS, E.J. METTER, R. MONTICONE und E.L. SCHNEIDER (2002):

Relationship between in vivo age and in vitro aging: assessment of 669 cell cultures derived from members of the Baltimore Longitudinal Study of Aging.

J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57, B239-246.

SOMMER, L., und U. SUTER (1998):

The glycoprotein P0 in peripheral gliogenesis.

Cell Tissue Res 292, 11-16.

SONDELL, M., und M. KANJE (2001):

Postnatal expression of VEGF and its receptor flk-1 in peripheral ganglia.

Neuroreport 12, 105-108.

SONDELL, M., G. LUNDBORG und M. KANJE (1999a):

Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system.

J Neurosci 19, 5731-5740.

SONDELL, M., G. LUNDBORG und M. KANJE (1999b):

Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts.

Brain Res 846, 219-228.

SONDELL, M., F. SUNDLER und M. KANJE (2000):

Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor.

Eur J Neurosci 12, 4243-4254.

SONG, X.Y., F.H. ZHOU, J.H. ZHONG, L.L. WU und X.F. ZHOU (2006):

Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice.

J Neurochem 96, 833-842.

STACHOWIAK, M.K., P.A. MAHER, A. JOY, E. MORDECHAI und E.K. STACHOWIAK (1996):

Nuclear localization of functional FGF receptor 1 in human astrocytes suggests a novel mechanism for growth factor action.

Brain Res Mol Brain Res 38, 161-165.

STERNBERGER, N.H., R.H. QUARLES, Y. ITOYAMA und H.D. WEBSTER (1979):

Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat.

Proc Natl Acad Sci U S A 76, 1510-1514.

STOLL, G., S. JANDER und R.R. MYERS (2002):

Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation.

J Peripher Nerv Syst 7, 13-27.

STOLL, G., und H.W. MULLER (1999):

Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights.

Brain Pathol 9, 313-325.

STRAUCH, B., D.M. RODRIGUEZ, J. DIAZ, H.L. YU, G. KAPLAN und D.E. WEINSTEIN (2001):

Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit.

J Reconstr Microsurg 17, 589-595.

SUZUKI, K., Y. SUZUKI, K. OHNISHI, K. ENDO, M. TANIHARA und Y. NISHIMURA (1999):

Regeneration of transected spinal cord in young adult rats using freeze-dried alginate gel.

Neuroreport 10, 2891-2894.

SWAIM, J.F. (1978):

A study in longevity.

J Indiana State Med Assoc 71, 771-773.

SYROID, D.E., P.R. MAYCOX, P.G. BURROLA, N. LIU, D. WEN, K.F. LEE, G. LEMKE und T.J. KILPATRICK (1996):

Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin.

Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9229-9234.

TANG, J.B. (1995):

Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects.

J Reconstr Microsurg 11, 21-26.

TANG, S., J. QIU, E. NIKULINA und M.T. FILBIN (2001):

Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration.

Mol Cell Neurosci 18, 259-269.

TANIUCHI, M., H.B. CLARK, J.B. SCHWEITZER und E.M. JOHNSON, JR. (1988):

Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties.

J Neurosci 8, 664-681.

TANIUCHI, M., J.B. SCHWEITZER und E.M. JOHNSON, JR. (1986):
Nerve growth factor receptor molecules in rat brain.
Proc Natl Acad Sci U S A 83, 1950-1954.

TAVEGGIA, C., G. ZANAZZI, A. PETRYLAK, H. YANO, J. ROSENBLUTH, S. EINHEBER, X. XU, R.M. ESPER, J.A. LOEB, P. SHRAGER, M.V. CHAO, D.L. FALLS, L. ROLE und J.L. SALZER (2005):
Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons.
Neuron 47, 681-694.

TIMMER, M., F. MULLER-OSTERMEYER, V. KLOTH, C. WINKLER, C. GROTHE und G. NIKKHAH (2004):
Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms.
Exp Neurol 187, 118-136.

TIMMER, M., S. ROBBEN, F. MULLER-OSTERMEYER, G. NIKKHAH und C. GROTHE (2003):
Axonal regeneration across long gaps in silicone chambers filled with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2.
Cell Transplant 12, 265-277.

TOMITA, K., T. KUBO, K. MATSUDA, T. FUJIWARA, K. YANO, J.M. WINOGRAD, M. TOHYAMA und K. HOSOKAWA (2007):
The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury.
Glia 55, 1199-1208.

TORIGOE, K., H.F. TANAKA, A. TAKAHASHI, A. AWAYA und K. HASHIMOTO (1996):
Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration.
Exp Neurol 137, 301-308.

TRAPP, B.D., M. DUBOIS-DALCQ und R.H. QUARLES (1984):
Ultrastructural localization of P2 protein in actively myelinating rat Schwann cells.
J Neurochem 43, 944-948.

TURNBULL, V.J. (2005):
Culturing human Schwann cells.
Methods Mol Med 107, 173-182.

UDINA, E., E. VERDU und X. NAVARRO (2004):
Effects of the immunophilin ligand FK506 on nerve regeneration in collagen guides seeded with Schwann cells in rats.
Neurosci Lett 357, 99-102.

VANLAIR, C. (1882):
De la regeneration des nerfs peripheriques par le proce de de la suture tubulaire.
Arch Biol Paris 3, 379-496.

VERDU, E., R.O. LABRADOR, F.J. RODRIGUEZ, D. CEBALLOS, J. FORES und X. NAVARRO (2002):
Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes.
Restor Neurol Neurosci 20, 169-179.

VERDU, E., F.J. RODRIGUEZ, G. GUDINO-CABRERA, M. NIETO-SAMPEDRO und X. NAVARRO (2000):
Expansion of adult Schwann cells from mouse predegenerated peripheral nerves.
J Neurosci Methods 99, 111-117.

VIATOUR, P., M.P. MERVILLE, V. BOURS und A. CHARIOT (2005):
Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation.
Trends Biochem Sci 30, 43-52.

VIERCK, J.L., K. BYRNE, P.S. MIR und M.V. DODSON (2000):
Ten commandments for preventing contamination of primary cell cultures.
Methods Cell Sci 22, 33-41.

VROEMEN, M., und N. WEIDNER (2003):
Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve.
J Neurosci Methods 124, 135-143.

WALLER, A. (1851):

Experiments on the section of the glosso-pharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structures of their primitive fibres.

Edinburgh Med Surg J 76, 369-376.

WALTON, R.L., R.E. BROWN, W.E. MATORY, JR., G.L. BORAH und J.L. DOLPH (1989):

Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study.

Plast Reconstr Surg 84, 944-949.

WANG, X., W. HU, Y. CAO, J. YAO, J. WU und X. GU (2005):

Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft.

Brain 128, 1897-1910.

WEBER, R.A., W.C. BREIDENBACH, R.E. BROWN, M.E. JABALEY und D.P. MASS (2000):

A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans.

Plast Reconstr Surg 106, 1036-1045.

WEBSTER, H.D. (1971):

The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves.

J Cell Biol 48, 348-367.

WEBSTER, W.R. und L.M. AITKIN (1971):

Evoked potential and single unit studies of neural mechanisms underlying the effects of repetitive stimulation in the auditory pathway.

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 31, 581-592.

WEIDNER, N., A. BLESCH, R.J. GRILL und M.H. TUSZYNSKI (1999):

Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1.

J Comp Neurol 413, 495-506.

WHITWORTH, I.H., R.A. BROWN, C. DORE, C.J. GREEN und G. TERENGI (1995):
Orientated mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair.
J Hand Surg Br 20, 429-436.

WIBERG, M., und G. TERENGI (2003):
Will it be possible to produce peripheral nerves?
Surg Technol Int 11, 303-310.

WITHROW, S.J., und T.C. AMIS (1977):
Sciatic nerve injury associated with intramedullary fixation of femoral fractures.
J Am Anim Hosp Assoc, 562-568.

WOODHOO, A., M.B. ALONSO, A. DROGGITI, M. TURMAINE, M. D'ANTONIO, D.B.
PARKINSON, D.K. WILTON, R. AL-SHAWI, P. SIMONS, J. SHEN, F. GUILLEMOT, F.
RADTKE, D. MEIJER, M.L. FELTRI, L. WRABETZ, R. MIRSKY und K.R. JESSEN (2009):
Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult
plasticity.
Nat Neurosci 12, 839-847.

WREDE, L. (1909):
Überbrückung eines Nervendefektes mittels Seidennaht und lebenden Venenstückes.
Dtsch Med Wochenschr 35, 1125-1160.

WU, S., Y. SUZUKI, M. TANIHARA, K. OHNISHI, K. ENDO und Y. NISHIMURA (2002):
Repair of facial nerve with alginate sponge without suturing: an experimental study in cats.
Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 36, 135-140.

WUECHNER, C., A.C. NORDQVIST, A. WINTERPACHT, B. ZABEL und M. SCHALLING
(1996):
Developmental expression of splicing variants of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)
in mouse.
Int J Dev Biol 40, 1185-1188.

YAMAUCHI, J., J.R. CHAN und E.M. SHOOTER (2003):
Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-
terminal kinase pathway.
Proc Natl Acad Sci U S A 100, 14421-14426.

YAMAUCHI, J., J.R. CHAN und E.M. SHOOTER (2004):

Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases.

Proc Natl Acad Sci U S A 101, 8774-8779.

YASUDA, T., G. SOBUE, K. MOKUNO, B. KREIDER und D. PLEASURE (1987):

Cultured rat Schwann cells express low affinity receptors for nerve growth factor.

Brain Res 436, 113-119.

YOUNG, R.C., M. WIBERG und G. TERENCEHI (2002):

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves.

Br J Plast Surg 55, 235-240.

ZACHARY, I. (2005):

Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential.

Neurosignals 14, 207-221.

ZANAZZI, G., S. EINHEBER, R. WESTREICH, M.J. HANNOCKS, D. BEDELL-HOGAN, M.A. MARCHIONNI und J.L. SALZER (2001):

Glial growth factor/neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination.

J Cell Biol 152, 1289-1299.

ZHANG, F., B. BLAIN, J. BECK, J. ZHANG, Z. CHEN, Z.W. CHEN und W.C.

LINEAWEAVER (2002):

Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects.

J Reconstr Microsurg 18, 295-300.

ZHANG, J.Y., X.G. LUO, C.J. XIAN, Z.H. LIU und X.F. ZHOU (2000):

Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents.

Eur J Neurosci 12, 4171-4180.

ZHANG, X., Y. ZENG, W. ZHANG, J. WANG, J. WU und J. LI (2007):

Co-transplantation of neural stem cells and NT-3-overexpressing Schwann cells in transected spinal cord.

J Neurotrauma 24, 1863-1877.

Mein besonderer Dank gilt meinen „Doktoreltern“ Herrn Prof. Dr. Leo Brunenberg und Frau Prof. Dr. Johanna Plendl.

Bei Herrn Prof. Brunenberg bedanke ich mich für die Überlassung dieses spannenden Themas und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Prof. Plendl danke ich für ihre liebevolle und kompetente Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ganz besonders danke ich darüber hinaus für eine tolle, lehrreiche Zeit, die mir immer in wertvoller Erinnerung bleiben wird.

In ganz besonderem Maße danke ich Mondy für ihre unermüdliche Hilfe in allen Phasen dieses Projekts. Ich danke für die Anregungen, die akribischen Rückmeldungen und ihre Freundschaft.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. Gisela Arndt für ihre engagierte und kompetente Hilfe in allen Fragen zur Erstellung und Bearbeitung der Statistik.

Für die ausführliche Einarbeitung in die Routine der Zellkultur danke ich Edith Gröninger.

Ilona Küster-Krehahn danke ich für die rege Unterstützung bei allen immunzytochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen.

Bei Monika Sachtleben bedanke ich mich insbesondere für die Zusammenarbeit bei der Erstellung der Semidünnschnitte.

Für die perfekte Unterstützung bei der Bildbearbeitung danke ich Jana Müller.

Bei Frau Christa Ebeling bedanke ich mich für die äußerst sachkundige Beratung bezüglich der Schwanzzell-Kultivierung und des Einsatzes des Melanocyte Growth Medium.

Herrn Dr. Bernd Hipler danke ich für die hilfreiche Unterstützung zu jeder Zeit und von jedem Ort, auch während seines Urlaubs, bei der Bedienung des Plattenreaders.

Für ihren spontanen und kreativen Input bedanke ich mich herzlich bei Birgit Kolkmann.

Maja Stodte danke ich für die professionelle Durchsicht der englischen Abfassung.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich von ganzem Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ich danke für ihr Interesse, ihr Verständnis und alle Denkanstöße; das stets wachsame Adlerauge meines Vaters hat wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich danke ich außerdem Mathias, Alex, Helge, Ulrike, Marie und Nina für ihre Freundschaft, Anteilnahme und Unterstützung ebenso wie für so manche Kritik.

Nicht zuletzt danke ich der Bayer-Healthcare für ihre finanzielle Unterstützung im Rahmen der „Bayer-Doktorandenförderung“.

Parotat, A.; Bahramsoltani, M.; Brunberg, L.; Plendl, J.:
Culturing Schwann cells to enhance nerve regeneration: different cellular subpopulations
and pro-angiogenic factors
101st Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, 2006
Freiburg (Poster)

Parotat, A.; Brunberg, L.; Plendl, J.:
Effektive Kultivierung caniner Schwannzellen zur Rekonstruktion peripherer
Nervenverletzungen
1. Berliner Doktorandensymposium, 2006
Berlin (Poster)

Parotat, A.; Brunberg, L.; Bahramsoltani, M.; Plendl, J.:
Kultivierung caniner Schwannzellen in proangiogenen Faktoren
2. Doktoranden-Symposium, 2007
Berlin (Vortrag)

Parotat, A.; Bahramsoltani, M.; Brunberg, L.; Plendl, J.:
Kultivierung caniner Schwannzellen in proangiogenen Faktoren
53. Jahreskongress der DGK-DVG, 2007
Berlin (Poster)

Parotat, A.; Bahramsoltani, M.; Brunberg, L.; Plendl, J.:
Kultivierung caniner Schwannzellen in proangiogenen Faktoren
13. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Innere Medizin und Klinische
Laboratoriumsdiagnostik
Gießen (Poster)
Abstr. in: Tierärztl. Praxis (G), 36, 2008, P29

Parotat, A.; Bahramsoltani, M.; Brunberg, L.; Plendl, J.: Kultivierung caniner Schwannzellen
in proangiogenen Faktoren
3. Doktorandensymposium, 2008
Berlin (Poster)

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 16.11.2009

Anna Parotat