

V. Diskussion

Aufgrund der Problematik der Physiologie der Nervenregeneration und der häufig unbefriedigenden Ergebnissen bei der Versorgung peripherer Nervenverletzungen muß auch in der Tiermedizin über neue Methoden der Behandlung nachgedacht werden. Ein Therapieansatz besteht darin, den positiven Einfluß autologer SC auf nervale Heilungsprozesse im Rahmen eines Tubulisationsverfahrens beim Hund klinisch zu nutzen. Ziel dieser Arbeit war es, die hierfür erforderliche möglichst große und reine SC-Kultur aus einer geringen Menge Nervenmaterial vom Hund zu gewinnen. Die Kultivierung caniner SC wurde hiermit erstmals untersucht.

A. Methodik

I. Wahl der Methode

In der Literatur konnten keine Arbeiten zum Umgang mit caninen SC gefunden werden. Deswegen wurden für die vorliegende Studie aus der Vielzahl der Literaturangaben zur Kultivierung von Nagetier-SC und humanen SC Methoden ausgesucht, die auch zur Kultivierung caniner SC anwendbar erschienen.

Besonders die Arbeiten von MORRISSEY et al. (1991), RUTKOWSKY et al. (1991), GUENARD et al. (1992), MORRISSEY et al. (1995) sowie CASELLA et al. (1996) waren dabei Richtschnur. MORRISSEY et al. (1991), RUTKOWSKY et al. (1991) und CASELLA et al. (1996) verglichen direkt die Reexplantier-Methode und die sofortige Dissoziation des Nervenmaterials. Folgende Vorteile des Reexplantierens stellten sie fest:

- Fibroblasten weisen eine schnellere Teilungsrate als SC auf. Sie wandern schneller aus Explantaten heraus. Sie verbleiben damit beim Transfer der Explantate auf dem Boden der Petrischale.
- Eine sofortige Verdauung bedingt einen SC-Verlust, da zu diesem frühen Zeitpunkt noch sehr enger Kontakt zwischen SC und Axon besteht.
- Bei der Reexplantiermethode kann es zu einer Wallerschen Degeneration in vitro kommen. Dabei entstehen Proliferationsreize für SC. Es kommt zum Anstieg ihrer Zellzahl.

Diese Ergebnisse begründeten, die zwar zeitaufwendigere aber ertragreichere Explantat-Methode in dieser Arbeit anzuwenden.

Sieht man einmal von den vielen Studien zu Nager- und humanen SC ab, liegt nur eine Studie zur Kultivierung von SC, gewonnen aus Spinalganglien der adulten Katze vor (WRATHALL et al., 1981). Im Vergleich beider Methoden wird darin die sofortige Dissoziation bevorzugt. Durch Zugabe von Mitogenen (Cytosinarabinosid / Fluorodeoxyuridine / Uridine / NGF) ließ sich keine zusätzliche SC-Vermehrung erzielen.

II. Grundproblematik der Methode

In der vorliegenden Schrift war es, verglichen mit Literaturangaben, in vielen Aspekten nicht möglich, die angewandte Methode zu standardisieren, weil sich mehrere Unwägbarkeiten nicht vermeiden ließen, durch die der Zellgehalt des Ausgangsmaterials beeinflusst wurde.

Klassische Versuchsprotokolle gewährleisteten die gleichzeitige Gewinnung großer und einheitlicher Mengen identischen Nervenmaterials eines einheitlichen Versuchstierkollektivs.

Die Donatoren dieser Studie waren in Hinblick auf Signalement, Körpergewicht, Kondition und gegebenenfalls Erkrankung (Tabelle 2) sehr uneinheitlich. Das Alter der Spender spielt eine wichtige Rolle für den Zellgehalt des Gewebes. Insbesondere fetales oder Nervengewebe von Neugeborenen, das in der SC-Forschung häufig zum Einsatz kommt, weist eine höhere Zelldichte und einen niedrigeren Bindegewebsanteil auf als das Gewebe ausgewachsener Tiere. Die Hunde dieser Arbeit waren ausgewachsen und meist (12/17) in einem übermäßig guten Ernährungszustand. Deswegen war in den Kulturen der Anteil an Fibroblasten schon zu Beginn relativ und auch absolut hoch.

In der Labortierforschung werden für die SC-Kultivierung häufig Spinalganglien benutzt. Die enthaltenen Neuronen sind ein zusätzlicher Stimulus für die SC-Proliferation in der Mischkultur. Diesen Vorteil boten die in dieser Arbeit genutzten peripheren Nerven nicht.

Klinisch bedingt war der Entnahmeort der peripheren Nerven uneinheitlich. Es wurden Teile von Nn. ischiadici (29%), Nn. radiales (41%) und anderer Nerven des Plexus brachialis (12%) sowie Nn. ulnares (18%) gewonnen (Tabelle 2).

Die unterschiedlichen Größendurchmesser dieser peripheren Nerven bedingten einen unterschiedlichen Fett- und Bindegewebsgehalt in den Primärkulturen. Der N. ischiadicus großer Hunde (3 Rottweiler, 2 DSH) hatte mit 0,5cm den größten Durchmesser, enthielt jedoch auch am meisten Bindegewebe.

Die Biopsielängen variierten von 1cm in zwei Fällen, bei denen die Entnahme im Rahmen einer Plexus brachialis-OP vorgenommen wurde, bis maximal 15cm. Dadurch war der Gesamtzellgehalt der Primärkulturen uneinheitlich. Kultivierungsmaßnahmen wie Mediummenge und Erneuerung des Mediums mussten der Explantatmenge entsprechend angepasst werden.

Der Anteil von SC und Fibroblasten in den Primärkulturen wurde zudem insbesondere von der Präparation des Nervengewebes beeinflusst. Obschon möglichst exakt präpariert wurde, ließen sich in den Ansätzen unterschiedlich große Fett- und Bindegewebsreste nicht vermeiden. Große Reste behinderten das Festsetzen der Explantate am Schalenboden sowie das Auswandern von Zellen aus den Explantaten. Zusätzlich bedingten unterschiedliche Bindegewebsreste eine unterschiedliche Zahl von Fibroblasten in den Kulturen.

Ein hoher Fibroblastenanteil erwies sich als maßgebender, negativ auf die SC-Proliferation wirkender Faktor.

III. Spezifische methodische Aspekte

Lagerung der Biopsien

Ob das Zeitintervall zwischen Entnahme des Nervenmaterials und Explantieren, das meist 2 bis 4 Stunden betrug, einen Einfluss hatte, blieb unklar. Drei Nerven wurden aus organisatorischen Gründen nach der Entnahme für 24 Stunden bei Kühlschranktemperaturen (4°C) aufbewahrt. Diese Verzögerung und die Temperaturschwankung schien sich jedoch nicht auf Gesamtzellzahl und SC-Ausbeute auszuwirken.

Beschichtungen

Das Verhalten von Zellen wird durch Interaktion mit Molekülen der extrazellulären Matrix beeinflusst. Zelluläre Oberflächenmoleküle nehmen über Rezeptoren Verbindung mit ihrer Umgebung auf und setzen dadurch Kaskaden in Gang, die beispielsweise zu bestimmten Genexpressionen führen. Das Substrat, auf dem Zellkulturen gehalten werden, ist daher von großer Bedeutung.

In dieser Studie wurde die Affinität caniner SC zu zwei verschiedenen Substraten untersucht. Nach dem Abtrypsinieren wurden sowohl Poly-L-Lysin (PLL)- als auch Laminin-beschichtete Deckgläschen beimpft. Die Zellen hatten sich auf Laminin nach 24 Stunden Inkubation nicht festgesetzt. Auf PLL-Deckgläschen hafteten sie nach maximal 4 Stunden.

Die Petrischalen, die die Explantate trugen, waren mit Collagen Typ I beschichtet

Schwammen Explantate ab, war dies nicht beschichtungsabhängig, sondern durch ihre übermäßige Größe ($>2\text{mm}^3$) oder das viele umgebende Fett- und Bindegewebe verursacht.

Im Hinblick auf die Beschichtungen haben CASELLA et al. (1996) umfangreiche vergleichende Untersuchungen vorgenommen. Sie kultivierten humane SC auf Collagen, Laminin, Fibronectin und PLL sowie auf unbeschichteten Flächen. Die Zellzahl war auf Laminin ($60 \times 10^3/\text{ml}$) vor Collagen ($40 \times 10^3/\text{ml}$) am höchsten. Ansonsten wanderten die Zellen nach 5 bis 7 Tagen in Haufenkonformationen ab.

In den eigenen Untersuchungen konnten die guten Ergebnisse von CASELLA et al. (1996) mit Lamininbeschichtung nicht erzielt werden.

CASELLA et al. (1996) stellten außerdem einen Morphologiewechsel humaner SC auf verschiedenen Substraten fest. Auf Laminin entwickelten die Zellen einen dreieckigen Körper mit kurzen, breiten Zellausläufern, während sie auf Collagen spindelförmig, schmal und bipolar aussahen.

Die bipolare Morphologie konnte in dieser Studie bei caninen SC auf Collagen auch festgestellt werden (Abb. 24-27).

Kontamination

Sauberkeit und Sterilität während der Arbeiten waren von großer Bedeutung.

Die Präparation des Gewebes und vor allem das Passagieren machten die wiederholte Manipulation des Zellmaterials erforderlich. Dadurch war ein erhöhtes Risiko der Verunreinigung gegeben.

In den eigenen Untersuchungen kam es während der Phase des Passagierens in zwei Fällen zum Überwuchern mit Hefepilzen. Dies entspricht 9,1% der Gruppe 1 (Tabelle 3A).

Um dies zu vermeiden oder aber schon frühzeitig intervenieren zu können, sollten die Präparate täglich per Mikroskop überwacht werden, um gegebenenfalls eine Kontamination im Anfangsstadium zu erkennen und dem Ausbreiten entgegenzuwirken. Die Kontaminationsrate durch Hefen war nach dem Abtrypsinieren besonders hoch (Tabelle 4C). In Gruppe 1 gingen insgesamt 9 Ansätze (56,25%) verloren, davon 5 durch Kontamination. Gruppe 2 wurde um 4 Ansätze (50%) reduziert, 2 davon gingen durch Kontamination ein. Von Gruppe 3 ging ein Ansatz durch Hefebesatz verloren. Als Ursachen könnten eine Membranschädigung der Zellen durch Trypsin-EDTA oder aber unsauberes Arbeiten angesehen werden.

Verdauung

Während der Verdauung der ersten Explantate entstand neben der gleichmäßigen Trübung des Verdauungsansatzes ein fadenförmiges Gebilde. Dieser Faden konnte mit 50 ml DNase nicht aufgelöst werden. Auch durch eine weitere Behandlung mit Verdauungsenzymen gelang es nicht, den Faden aufzulösen. Nach Inkubation des Fadens in Nährmedium konnten unter dem Mikroskop keine zellulären Bestandteile ausgemacht werden. Dies bedeutet, dass bei der Entstehung des Fadens während des Verdauungsprozesses keine Zellen verloren gehen. Nichtsdestotrotz wurden aus Sicherheitsüberlegungen ab der zweiten Verdauung jedem Ansatz initial 100µl DNase zugesetzt. Größere Inhomogenität wurde so vermieden.

Eine weitere Maßnahme für eine zellschonendere Dissoziation war die Verringerung der Trypsinkonzentration auf 1/3 der Initialdosis (30µl statt 90µl) sowie der Zentrifugengeschwindigkeit von 1000rpm auf 800rpm für 10 Minuten.

Die Differenzen zwischen 2. und 1. Zellzahl (Graphik 5) zeigen, daß in dieser Phase nur in Gruppen 1 und 2 Zellverluste vorkamen. Sie machten jeweils 50% aus.

Als Ursachen der durch Verdauung verursachte Zellverluste können angesehen werden:

- Die Aggressivität der Verdauungsmethode, die den sofortigen Zelltod bedingt. Dies mag durch eine Überdosierung der Enzyme induziert sein.
- Sind die Enzyme unterdosiert, bedingt dies eine unvollständige Dissoziation des Gewebes. Zellen, die nicht vollständig dissoziiert sind, gehen nicht in die Zellzählung ein.

MORRISSEY et al. (1991), RUTKOWSKY et al. (1992) und CASELLA et al. (1996) empfehlen eine schonende Dissoziation mit Collagenase (0,8 IU/ml bzw. 0,05%) und Dispase (0,8-1,25 IU/ml bzw. 0,25%) über 12 bis 18 Stunden.

Abtrypsinieren

Ziel des Abtrypsinierens war, die nach der Dissoziation einzeln auf dem Substrat festgesetzten Zellen vom Boden der Petrischale zu lösen, um sie zählen zu können. Das langsame Abrunden und Abschwimmen der Zellen innerhalb von fünf Minuten war per Lichtmikroskop gut zu beobachten (Abb. 14).

Wirkt Trypsin-EDTA länger als ca. 5min ein, werden Zellmembranen geschädigt, oder die Zellen sterben. Die stichprobenartige Überprüfung mit einer Supravitalfärbung unmittelbar nach Abtrypsinieren ergab eine Vitalität von 90%.

Eine membranschädigende Wirkung schien dennoch vorzuliegen. Die SC waren davon stärker

betroffen als die Fibroblasten, wodurch das gehäuft auftretende Überwuchern der Kulturen durch Fibroblasten nach Abtrypsinieren zu erklären ist (Gruppe 1: 3/16, Gruppe 2: 1/4).

Das Überwucherungsphänomen durch Fibroblasten ist auf ihre größere Widerstandsfähigkeit und schnellere Teilungsraten im Vergleich zu SC zurückzuführen.

Dagegen besagt die Hypothese der Kontaktinhibition (CASELLA et al., 2000), daß die SC-Proliferation bei zu hoher Zelldichte vermutlich aufgrund interzellulärer Wechselwirkungen stagniert.

Einige Ansätze mussten nach Abtrypsinieren vollständig verworfen werden, da eine Zellzählung wegen zu großer Zelldichte nicht möglich war. Statistisch gingen diese Ansätze auch als „fehlend“ ein.

MANTHORPE et al. (1980) beziffern den maximalen Verlust von Ansätzen nach Abtrypsinieren mit 30%. In der vorliegenden Arbeit betrug er insgesamt 35% (Gruppe 1: 56,25%, Gruppe 2: 50%, Gruppe 3: 25%) (Tabelle 4C).

Der kritische Faktor an dieser Stelle der Arbeiten war die Trypsinierungsdauer.

Das Ablösen aller Zellen vom Schalenboden war ohne eine Einwirkzeit des Trypsin-EDTA von ca. 5min nicht möglich. Wurde eine kürzere Einwirkzeit gewährt, musste ein Verlust an Zellen in Kauf genommen werden, die in der Petrischale verblieben. Neben Zellverlusten während der Dissoziation resultieren hieraus die im Vergleich zur 1. Zählung geringeren Zellzahlen der 2. Zählung bei jeweils 50% der Gruppen 1 und 2 (Graphik 5).

Möglich wäre es, den Zellbestand mit einem Schaber vollständig vom Boden der Petrischale zu lösen. Da dabei mechanisch Zellen zerstört werden, wurde darauf verzichtet.

Andere Methoden, die Zellen vom Boden der Petrischale zu lösen, konnten aus Mangel an Ausgangsmaterial nicht erprobt werden. Denkbar wäre der Einsatz anderer Proteasen als Trypsin, z.B. Papain oder Collagenase.

Als sanfte Methode der Separierung wird der „cold jet“ angeführt (JIRSOVA et al., 1997). Dabei wird kaltes Medium direkt auf die Zellen pipettiert („kalter Strahl“), was zum schnellen Ablösen der SC vom Schalenboden führt. Die unempfindlicheren Fibroblasten bleiben festgesetzt. Durch dieses spezifische Ablöseverhalten erreicht man gleichzeitig eine Aufreinigung der Mischkultur. Nach zweimaliger Behandlung soll eine SC-Reinheit von 98-100% zu erzielen sein.

B. Ergebnisse

I. Qualitative Ergebnisse

Nach Literaturangaben wird in über 80% der Studien zur SC-Kultivierung für die Färbung der SC der S100-AK genutzt. Insbesondere bei humanen SC wird selten auch der NGF-Antikörper verwendet, weil er spezies-spezifisch ist. Es sind auch der primaten- (LEVI et al., 1994) sowie der rattenspezifische (GUENARD et al., 1992) PNGFr bzw. 217c-Antikörper bekannt.

In Anlehnung an die Literatur wurden in dieser Arbeit die Färbungen mit einem S100-Antikörper vom Kaninchen begonnen. Dieser AK war nicht spezifisch für canine SC, d.h. er färbte SC und Fibroblasten gleichermaßen. Zudem war seine Färbung nur wenig intensiv und unpräzise. Auffallend war häufig eine stark auf die Kerne aller Zellen beschränkte Markierung, was durch die Lokalisation des S100-Proteins im Genom begründet sein könnte (Abb. 22, 23). Möglicherweise beruht dieses Phänomen aber auch auf einem Artefakt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Antikörper gegen bovines S100-Protein nicht mit caninem S100-Protein kreuzreagiert.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Differenzierung caniner SC durch Färbung mit einem p75-AK vom Kaninchen gegen humane SC durchgeführt. Bei einer hohen Verdünnung von 1:200 wurde ein sehr gutes Ergebnis erzielt. Der p75-AK war spezifisch für canine SC. Canine Fibroblasten wurden nicht markiert. Der low affinity NGF-Rezeptor ist als Membranprotein in der gesamten Zellmembran und in besonders großer Konzentration in den Membranen der Zellausläufer lokalisiert. Deswegen wurden die Zellen bis in ihre Fortsätze hinein durchgehend gefärbt, so dass die Zellmorphologie gut beurteilt werden konnte (Abb. 24 bis 28).

Durch die Zugabe von Cholera toxin zum Medium der Explantate sowohl in einfacher (0,1µg/ml) als auch in doppelter (0,2µg/ml) Dosierung wurde die spindelige, bipolare, langgestreckte Form der SC stärker ausgeprägt (Abb. 27a,b). Diese Beobachtung wurde bisher bei SC anderer Spezies nicht gemacht. GUENARD et al. (1992) stellten eine Morphologieänderung von Ratten-SC bei der Behandlung mit Forskolin fest. Die primär typisch bipolaren, spindelförmigen Zellen wandelten sich in größere, tripolare, Fibroblasten ähnelnde Zellen um. In der vorliegenden Arbeit kam es durch Zugabe von Forskolin nicht zu einer Morphologie-Änderung. Allerdings kultivierten GUENARD et al. (1992) auf einem anderen Substrat (Vitrogen) als Collagen, was ebenfalls einen Einfluß auf die Zellmorphologie gehabt haben könnte.

II. Quantitative Ergebnisse

Zeitfaktor

Die Arbeiten nahmen pro Ansatz im Durchschnitt 66 Tage in Anspruch. In einem Fall wurden über 4 Monate benötigt. Zu bedenken ist, daß im Laufe dieser Arbeiten ein großer Teil der Ansätze aus organisatorischen Gründen länger als notwendig passagiert werden musste. Die hieraus entstehenden z.T. sehr langen Gesamtzeiträume verfälschen die durchschnittliche Kultivierungsdauer.

Der Zeitrahmen, der durch die Physiologie der Nervenregeneration gegeben ist, wurde dennoch nicht überschritten. FREY et al. (1998) geben 6 bis 9 Monate als zeitlichen Rahmen von der Läsion des Nerven bis zu seiner Versorgung an. Der Atrophiegrad des Zielmuskels und der Degenerationsgrad der muskulären Endplatten dürften also zum Zeitpunkt der Implantation des Nervenimplantats eine erfolgreiche Reinnervation mit Hilfe der autologen SC zulassen. Allerdings bleibt dabei die Zeit unberücksichtigt, die für die auf die Implantation folgende Nervenregeneration in vivo noch benötigt würde.

Das Ziel weiterer Untersuchungen muß unter anderem eine deutliche Reduktion der Kultivierungsdauer sein.

Zellzahlen

Gesamtzellzahlen, SC-Prozente und absolute SC-Zahlen waren im Vergleich zu den Literaturangaben enttäuschend. Dies betraf insbesondere die Reinheit der Zellpopulationen.

Sie sollte nach Literaturangaben mit der Reexplantiermethode zwischen 90 und 99% betragen (Tabelle 1). Der maximale SC-Anteil in dieser Studie betrug in Gruppe 6 27,1%.

Die Zellzahl lag maximal bei 16×10^5 in Gruppe 6 (Tabelle 6). Dies deckt sich etwa mit Angaben in der Literatur, die bei Größenordnungen zwischen ($\times 10^4$) und ($\times 10^9$) liegen. Die Populationen der vorliegenden Arbeit bestanden jedoch zu einem großen Teil aus Fibroblasten (min. 72,9%).

In Hinblick auf einen klinischen Einsatz der Kulturen in der Neurochirurgie ist die Minimierung der Fibroblasten äußerst wichtig, da ein hoher Prozentsatz an Fibroblasten in einer SC Kultur den positiven Einfluss auf die Nervenregeneration im Nervenimplantat verringert (MC CORMACK

et al., 1991). Dies wird unter anderem durch Kontaktinhibition verursacht (CASELLA et al., 2000).

Für die Implantation von SC an Nervenverletzungen ist eine absolute SC-Zahl von mindestens 5×10^5 /ml (HADLOCK et al., 2000) erforderlich. GUENARD et al. (1992) verwendeten Suspensionen von 40 bis 160×10^6 SC/ml.

In der vorliegenden Arbeit wurden die SC-Anteile an den Kulturen in absolute SC-Zahlen umgerechnet (Tabelle 6). Es ergab sich eine maximale SC-Zahl von $4,3 \times 10^5$ /ml. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Zellzahl zwischen der 2. Zählung und der Färbung nicht mehr abgenommen hatte. In Anlehnung an HADLOCK et al. (2000) wäre der Versuch eines klinischen Einsatzes dieser maximal erreichten SC-Zahl möglich.

Bedingung wäre die Isolierung der SC von der sehr großen verunreinigenden Fibroblastenkultur. Dies könnte über **immunoselektive Purifikationsschritte** erreicht werden.

Die spezifische Immunoabsorption wird detailliert von ASSOULINE, BOSCH und LIM (1983) beschrieben. Nach Abtrypsinieren wurden die gewonnenen Zellen mit monoklonalen Maus-IgG gegen Thy1 resuspendiert und 30 Minuten inkubiert. Letztlich wurden mit Ziegen-Anti-Maus-IgG beschichtete Flächen mit der Suspension überschüttet. Ein Einwirken über 60min bei 4°C war ausreichend, um die Bindung der Thy1-positiven Fibroblasten an die mit sekundärem Antikörper beschichtete Fläche zu gewährleisten. Die gereinigte, Thy1-negative SC-Suspension wurde anschließend per Pipette abgesaugt.

Laut BROCKES et al. (1979) ist mit dieser "panning" genannten Methode eine SC-Reinheit von 80-90 % zu erreichen.

Die Purifikation mittels "magnetic beads" ist eine laut Literatur effektivere Möglichkeit (SAALBACH et al., 1997). Die magnetischen Perlen sind mit Thy1-Antikörpern ummantelt. Nach ca. 10minütiger Inkubation der Perlen mit der Zellkultur bei 4°C haben sich die Thy1-positiven Fibroblasten diesen angelagert. Die Trennung von den SC erfolgt in einem magnetischen Feld.

Weitere Antikörper gegen Fibroblasten-Antigene, die für die Immunoadhäsion genutzt wurden, sind Ran-1 (nagerspezifisch) sowie die humanspezifischen CD9, MabAS02, FibAS01 und FibAS02.

Denkbar ist, dass mit der immunoselektiven Purifikation nach Abtrypsinieren auch bei caninen SC-Kulturen der Fibroblastenanteil zu senken gewesen wäre.

Zu prüfen wäre, ob handelsübliche Thy-1 Antikörper auch zur Aufreinigung von caninen SC nutzbar sind bzw. welcher Antikörper stattdessen eingesetzt werden könnte. Im Anschluss wäre der Versuch einer weiteren Expansion der bereinigten SC-Kultur möglich.

Einfluss der Zusätze

Die Ansätze wurden 6 Gruppen zugeteilt, die mit einer steigenden Zahl von Mitogenen bzw. antiproliferativen Zusätzen versorgt wurden. Dem Medium jedes der 50 Ansätze wurden folgende zwei Mitogene zugesetzt:

Forskolin (1µl/ml) und Pituitary Extract (1µl/100µl).

Gruppe 2 erhielt zusätzlich Cholera-Toxin in einfacher Dosierung (0,1µg/ml).

Gruppe 3 erhielt zusätzlich Cholera-Toxin in doppelter Dosierung (0,2µg/ml).

Gruppe 4 erhielt zusätzlich Heregulin (10nM).

Gruppe 5 erhielt zusätzlich Heregulin (10nM) und Cholera-Toxin einfach dosiert (0,1µg/ml).

Gruppe 6 erhielt zusätzlich Heregulin (10nM) und Cholera-Toxin doppelt dosiert (0,2µg/ml).

Die Mediane sowohl der Gesamtzellzahlen als auch der SC-Prozentanteile bilden eine mit Zugabe der Zusätze kontinuierlich ansteigende Reihe (Graphik 2, 3 und 4, Tabelle 5). Für den SC-Anteil macht diese Steigerung bei den Gruppen 3, 4, 5 und 6 nur 0,7 bis 2,5 Prozentpunkte aus. Der Median der Gruppe 3 steigt im Vergleich zu dem der Gruppe 2 stark an (21,5% bzw. 8,6%). Dies ist ein Hinweis auf die Effektivität der höheren Dosierung des Cholera-Toxins. Der Fibroblastenanteil wird unterdrückt.

Auch die absoluten SC-Zahlen steigen mit Zugabe der Mitogene kontinuierlich an (Tabelle 6). Eine auffallende Steigerung ist zwischen den Maximalwerten von Gruppe 3 und Gruppe 4 (13,8 bzw. $23,8 \times 10^4$ /ml) sowie von Gruppe 5 und Gruppe 6 (28,56 bzw. $43,36 \times 10^4$ /ml) zu erkennen.

Möglicherweise liegt diesen Steigerungen die hohe Dosierung des Cholera-Toxins bzw. der synergistische Effekt von Cholera-Toxin hoch dosiert in Verbindung mit Heregulin zugrunde.

In Gruppen 3, 4, 5 und 6 zeigen alle Ansätze eine Steigerung der Zellzahl von der ersten zur zweiten Zählung, während in der 1. und 2. Gruppe 50% der Ansätze bei der zweiten Zählung eine geringere Zellzahl aufweisen (Graphik 5). Auch dies ist ein Hinweis auf den positiven Einfluss der zusätzlichen Mitogene.

Von den Gruppen, die mit Heregulin bzw. Heregulin und Choleratoxin versorgt wurden (Gruppen 4, 5 und 6), gingen keine kompletten Ansätze verloren. Von Gruppe 3 gingen zwischen 2. Zählung und Färbung $\frac{1}{4}$ der Ansätze ein (Tabelle 4C). In Gruppen 1 und 2 waren zu allen drei Zeitpunkten, vor allem aber im Zeitraum zwischen Abtrypsinieren und Färbung, massive Verluste ganzer Ansätze zu verzeichnen. In Gruppe 1 betragen diese bis zu 56,25% (Tabelle 4C). Eine **statistische Signifikanz** für Zellzahl 1 und 2 sowie den prozentualen SC-Anteil ergab sich nur im Vergleich zwischen Gruppe 1 und 6 bzw. Gruppe 2 und 6 (**Kruskal-Wallis-Test**; $p < 0,05$). In Vergleichen zwischen Gruppen 4, 5 und 6 kam es außerdem zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen von Gruppe 4 und 6. Daraus ist zu entnehmen, daß Heregulin (10nM) und Choleratoxin in ausreichend hoher Dosierung (0,2µg/ml) synergistisch wirken.

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist für die Phase nach Verdauung eine Behandlung der Zellen mit Forskolin (1µl/ml), PEX (1µl/100µl), Choleratoxin in hoher Dosierung (0,2µg/ml) und HRG (10nM) zu empfehlen.

Für die Phase des Reexplantierens sollte dem Medium Choleratoxin hoch dosiert (0,2µg/ml) zugesetzt werden.

C. Spezies-Differenzen

Es ist gut möglich, dass Spezies-Differenzen, neben der fehlenden Standardisierbarkeit des Materials, Kontamination und den spezifisch methodischen Problemen bei Verdauung und Abtrypsinieren, eine Ursache für geringe SC-Ausbeuten waren.

In Nervengewebe höherer Spezies ist der Prozentsatz epineuralen Bindegewebes und damit der Fibroblasten größer als z.B. bei Ratten oder Mäusen. Dies behindert die Vermehrung der SC in der Kultur.

EMERY et al. (1999) stellten fest, daß die Methoden, die zur Vermehrung von Ratten-SC üblicher Weise angewandt wurden, zur Anzucht humaner SC nicht ausreichten. Da SC des Menschen ein langsames Proliferationspotential als Ratten-SC haben, lag der maximale SC-Anteil in humanen Kulturen immer unter dem von Kulturen aus Rattengewebe.

Denkbar ist auch, dass höhere Spezies andere exogene Zusätze und Mitogene oder aber andere Konzentrationen der Zusätze brauchen, um zu den gleichen Proliferationsraten zu kommen wie Zellen von Labornagern. MANTHORPE et al. (1980) untersuchten die Spezies-Selektivität bei

verschiedenen Serum-Arten. Mäuse-SC reagierten mit gesteigerter Proliferation auf FCS (fetal calf serum), Ratten-SC auf HS (horse serum) und SC aus Hühnerembryonen wiederum auf FCS, nicht aber auf HS. Es ist nicht bekannt, welches Serum bei caninen SC spezifisch wirksam ist. In dieser Studie kam FCS zum Einsatz.

Auch endogene Mitogene bewirken bei SC verschiedener Spezies unterschiedlich starke Reaktionen. Beispielsweise war die durch Wallersche Degeneration induzierte Proliferation humaner SC geringer als die von Ratten-SC (GUENARD et al., 1992).

Bisher liegen keine Daten über die Kultivierung caniner SC vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen jedoch nahe, daß die Erfahrungen und Protokolle, die bei der SC-Forschung anderer Spezies bisher gewonnen wurden, nicht auf den Hund übertragen werden können. Um eine optimale Zellausbeute zu erreichen, muß das Wachstum caniner SC unter verschiedenen Bedingungen, mit verschiedenen Medien, Zusätzen und Substraten vergleichend untersucht werden. Dazu müssen größere Materialmengen eines einheitlichen, standardisierbaren Donatorenpools zur Verfügung stehen.

D. Funktionalität und Transformationspotential von mit Hilfe von Mitogenen gezüchteten Schwanzzellen

Sollten Mitogene angewandt werden, ist die Problematik der Funktionalität und des Transformationspotentials von in vitro gezüchteten SC zu bedenken. Mit Funktionalität wird die Fähigkeit der SC, Neurotrophine und extrazelluläre Matrixmoleküle zu produzieren, sich mit Neuronen zu assoziieren, Axone zu myelinisieren und die neuronale Regeneration zu unterstützen, bezeichnet. Das Transformationspotential der SC beschreibt die Neigung der Zellen, Tumoren zu bilden. Der Einfluss der Mitogene wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Unbekannt ist die Wirkung von Cholera-toxin auf die biologischen Funktionen der SC (CASELLA et al., 1996). Cholera-toxin hat einen nur langsam reversiblen oder irreversiblen Effekt auf die Aktivität der Adenylatcyclase.

HRG, Forskolin und GGF anzuwenden, wird ebenso widersprüchlich dargestellt. EMERY et al. (1999) wiesen durch in vivo-Experimente ein Malignitätspotential mitogen-stimulierter Ratten-SC nach. Nach Immortalisierung der SC durch Langzeit-Zusatz von Forskolin und HRG wurden die Zellen in autogene Nn. ischiadici von Ratten transplantiert. Sie provozierten Tumorwachstum. Die Xenotransplantation gezüchteter humaner Zellen in Nn. ischiadici

immundefizienter Mäuse induzierte dagegen keinen Tumor.

In vergleichenden *in vitro*-Studien von PORTER et al. (1986) zu Funktionalität und Transformation von mit GGF und Forskolin expandierten SC-Populationen des N. ischiadicus und fetalen Primärkulturen konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden. In beiden Gruppen wurden in den Funktionen Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle, Assoziation mit Neuronen in Co-Kulturen und Myelinisierung von Axonen identisch gute Resultate erzielt. Ein Transformationspotential wurde nicht beobachtet.

Bei *in vivo*-Experimenten kamen LANGFORD und PORTER (1988) zu anderen Ergebnissen. Eine Gruppe von Ratten erhielt ein Implantat aus innerhalb von 12 bis 15 Wochen mit GGF und Forskolin immortalisierten SC. Die andere Gruppe syngener Ratten erhielt die gleiche Anzahl nicht behandelte, primärkultivierter SC. Nach 6 bis 13 Wochen wurden die Nerven entnommen und untersucht. Bei einem Großteil der mit immortalisierten SC behandelten Nerven wurde an der Injektionsstelle perifaszikulär eine solide zelluläre Masse sich aktiv teilender, SC-ähnlicher Zellen gefunden. Alle Nerven, die mit unbehandelten SC versehen worden waren, waren unauffällig.

Menschliche SC zeigten *in vitro* nach 14tägiger Behandlung mit Forskolin und HRG nach dem Absetzen der Mitogene im weiteren keine Transformationserscheinungen. Die Zellzahl blieb stabil (CASELLA et al., 1996).

LEVI et al. (1994) prüften die Funktionalität humaner SC *in vivo* anhand der Implantierung SC-gefüllter PAN/PVC-Kanäle in periphere Nerven immundefizienter Ratten. Sie konnten eine gute Unterstützung der Nervenregeneration und deutliche Myelinbildung durch zumindest einen Teil der implantierten humanen SC feststellen. Innerhalb eines Zeitraums von 4 Wochen beobachteten sie keine Transformationsanzeichen an den implantierten Zellen, geben allerdings zu bedenken, daß Mitogene nicht benutzt wurden.

Bis heute liegen keine Daten zu Funktionalität und Transformationsgefahr *in vitro* gezüchteter caniner SC vor. Sollten Zellpopulationen klinisch eingesetzt werden, müssten diese Aspekte zuvor untersucht werden.

E. Ausblick: Zur Unterstützung der nervalen Regeneration im ZNS

Das ZNS-Milieu wirkt hemmend auf axonale Regeneration. Ursachen sind extra-axonale Moleküle wie MAG und CAM (JEFFEREY et al., 2001). Zerstörtes ZNS-Nervengewebe ist daher auf Dauer verloren. Es wird durch narbenartiges Gewebe ersetzt.

Insbesondere bei Rückenmarksläsionen ist beim Menschen der therapeutische Einsatz von SC verlassen worden. Dort hat sich die Forschung aktuell auf sogenannte Olfactory Ensheathing Cells (OEC) fokussiert. OEC sind Gliazellen, die den Riechkolben auskleiden und sich im N. olfactorius befinden. In diesen Regionen werden kontinuierlich neue Zellen gebildet, die neue Axone vom Riechepithel (außerhalb des ZNS) in den Riechkolben (innerhalb des ZNS) wachsen lassen. OEC produzieren CAM (z. B. Laminin) und Wachstumsfaktoren (PDGF, Nexin, NGF sowie evt. BDNF und NT3), und unterstützen dadurch axonales Wachstum und Regeneration. Zudem sind sie fähig zu remyelinisieren. Vorteilhaft im Vergleich zu SC ist, daß sie nicht durch das regenerationsfeindliche Umfeld im ZNS gestört werden. SC werden durch Mikroglia, Astrocyten, Oligodendrocyten und Myelinkomponenten gehemmt, die nach Verletzungen im zentralen Nervensystem die sogenannte "Glia-Narbe" bilden (LAKATOS et al., 2000; SMITH et al., 2002). XU et al. (1995) nähten SC-gefüllte Kanäle in durchtrennte Rückenmarksstränge von Ratten ein. Nach Zugabe von Neurotrophinen konnten sie einige Axone von Hirnstamm-Neuronen im Implantat nachweisen. Keines dieser Axone verließ am kaudalen Ende das Implantat und trat in ZNS-Gewebe über.

Aus den mit OEC gefüllten Kanälen wanderten die regenerierenden Axone hingegen aus dem Kanal aus und in Gewebe des ZNS hinein. Es wird vermutet, dass OEC die regenerierenden Axone umhüllen. Auf diese Weise werden die Nervenfasern vor den wachstumshemmenden Molekülen des ZNS abgeschirmt (RAMON-CUETO et al., 1998). JEFFEREY et al. (2001) propagieren den therapeutischen Einsatz autologer OEC besonders bei Hunden mit Bandscheibenproblematik sowohl für akute als auch für chronische Fälle. Die Gewinnung autogener Primärkulturen ist jedoch noch schwierig. Der Zugang zu OEC muß per Kraniotomie geschaffen werden. Es ist unklar, ob OEC auch endoskopisch über den Nasengang zu entnehmen sind.

F. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde erstmals die Kultivierung und in vitro Expandierung caniner SC zum Zwecke der Etablierung eines Nervenimplantates mit Beteiligung autologer SC beim Hund erprobt. Es musste festgestellt werden, daß die direkte Umsetzung von Protokollen aus der bisherigen Forschung über humane oder Labornager-SC auf die Spezies Hund keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte. Es sind weitere Untersuchungen über die spezifischen Eigenschaften caniner SC, die geeignetsten Substrate, Medien, exogene und endogene Mitogene sowie weitere Kultivierungsbedingungen erforderlich. Hierfür ist eine große, standardisierbare Menge an Ausgangsmaterial notwendig.

Denkbar ist, daß durch immunoselektive Purifikationsschritte und anschließende weitere Expansion Reinheit und Zellzahl der Kulturen verbessert werden können.

Bevor jedoch in vitro gezüchtete autologe canine SC klinisch eingesetzt werden können, müssen Untersuchungen über ihre Funktionalität und gegebenenfalls ein Transformationspotential angeschlossen werden.