

## VI. Zusammenfassung

Die Erfolge der chirurgischen Versorgung peripherer Nervenverletzungen beim Hund sind trotz vielfältiger Möglichkeiten häufig unbefriedigend. Erwiesenermaßen haben Schwannzellen einen regenerationsfördernden Effekt auf Nervenstümpfe. Ein neuer Therapieansatz könnte die Implantation eines mit autologen Schwannzellen gefüllten Führungskanals am Nervenabriss sein.

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Kultivierung und Vermehrung caniner SC in vitro die Grundvoraussetzung für diesen Therapieansatz zu untersuchen.

17 Nerven von Hunden unterschiedlichen Signalements wurden biopsiert. Die Biopsiegrößen variierten zwischen 1cm und 15cm Länge.

Es wurde die Reexplantiermethode mit anschließender Verdauung (Enzyme: Hyaluronidase, Collagenase, Trypsin) und weiterer Expansion der Zellsuspension durchgeführt.

Aus dem Ausgangsmaterial konnten 50 Ansätze gewonnen werden, die in sechs Gruppen aufgeteilt wurden. Das Nervenmaterial jeder der sechs Gruppen wurde mit einer unterschiedlichen Kombination von Mitogenen und Antiproliferativa versorgt, die die verunreinigenden Fibroblasten zurückdrängen und die SC zu maximaler Proliferation bringen sollten. Zum Einsatz kamen Forskolin, PEX (pituitary extract) sowie Cholera toxin und Heregulin.

Zur exakten Quantifizierung der caninen SC wurden sie mit einem spezifischen Antikörper markiert und im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Bei der Markierung der SC stellte sich heraus, daß der in der Literatur häufig angeführte S100-Antikörper für die Färbung caniner SC nicht spezifisch, also unbrauchbar war. In dieser Arbeit wurde der p75-Antikörper als spezifischer Marker für canine SC eingeführt.

Durch den Einsatz einer wachsenden Zahl von Zusätzen konnten Zellzahlen und Reinheit der Kulturen gesteigert werden. Dabei schien ein Synergismus zwischen Cholera toxin und Heregulin vorzuliegen. Es wurden maximal  $160 \times 10^4$  Zellen pro Milliliter Suspension als Gesamtzellzahl erreicht. Die größte SC-Reinheit einer Kultur betrug 27,1%. Die maximale SC-Zahl belief sich auf  $43,3 \times 10^4$  SC pro Milliliter.

Die quantitativen Ergebnisse der Arbeiten lagen damit weit hinter denen der Literaturangaben zur Kultivierung humaner oder Labornager-SC.

Ursache für geringe Gesamtzellzahlen und mangelnde Reinheit der Kulturen waren eine zu geringe Materialmenge, fehlende Standardisierungsmöglichkeiten des Ausgangsmaterials,

Speziesunterschiede sowie spezifisch methodische und organisatorische Probleme vor allem während Verdauung und Abtrypsinieren.

Der Gesamtzeitraum, den die Kultivierungen in Anspruch nahmen, war mit durchschnittlich 66 Tagen sehr lang. Diese lange Zeit wurde unter anderem dadurch bedingt, daß bei einem Teil der Ansätze die Anzahl der Passagierungen aus organisatorischen Gründen sehr hoch wurde. Die Ergebnisse könnten dadurch verfälscht worden sein.

In Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz von in vitro expandierten caninen SC im Rahmen eines Nervenimplantates ist es erforderlich, größere und reinere Kulturen in einem kürzeren Zeitraum zu gewinnen. Voraussetzung dafür sind größere Mengen eines standardisierbaren Ausgangsmaterials, die weitergehende Untersuchungen über die optimalen Kultivierungsbedingungen für canine SC erlauben.

## VII. Summary

### **In vitro cultivation and expansion of canine schwanncells**

Despite the numerous available possibilities for the surgical treatment of peripheral nerve found in dogs, the success of these treatments is often unsatisfactory. It has been proven that schwanncells (SC) have a positive influence on the regeneration of nerve stumps. Implanting a guidance channel seeded with autologous SC at the lesion site could be a new therapeutic approach.

The aim of this research was to investigate the in vitro cultivation and expansion of canine SC as the main requirement for the treatment referred to above. Biopsies were carried out on 17 nerve samples originating from dogs of different breed, age, gender and condition. The biopsy sizes ranged from 1cm to 15cm in length. The reexplantation method was employed, followed by dissociation using hyaluronidase, collagenase and trypsin. The cell suspension was then further expanded.

50 samples gained from the 17 nerves were divided into six groups. Each of these six groups was treated with a varying combination of mitogens and antimetabolic agents which were supposed to inhibit the contaminating fibroblasts growth while stimulating the proliferation of SC. The following additives were used: forskolin, PEX (pituitary extract) as well as cholera toxin and heregulin.

To obtain the correct quantities of SC, the specimens were immunostained by a specific antibody and subsequently counted with the aid of a fluorescence-microscope. The S100-antibody which is often recommended in literature pertaining to the marking of SC was not specific. In these works the p75-antibody was introduced as a specific marker for canine SC.

By employing a growing number of agents it was possible to obtain an increase in both the quantity of cells and purity of cultures. A synergy between cholera toxin and heregulin became apparent. A maximum of  $160 \times 10^4$  cells per millilitre of suspension was achieved. The largest SC purity of a single culture measured 27,1%. The maximum SC quantity achieved was  $43,3 \times 10^4$  SC per millilitre.

Thus the quantitative results were much lower than those indicated in literature relating to the cultivation of human, mouse or rat SC.

The following contributed to the relatively low cell counts and the lack of purity of the cultures: an insufficient quantity of initial nerve tissue; a lack of possibilities for standardising the cell matter; species differences; specific methodical and organisational problems, especially during phases of dissociation and detachment of cells.

The amount of time invested in cultivation was a mean of 66 days. This long time-frame was partially conditioned by organisational problems resulting in a large number of passages. Under more favourable circumstances the experiments might have taken less time.

The clinical application of in vitro expanded canine SC in the context of a nerve prosthesis necessitates the harvesting of larger and purer cultures in a shorter space of time. A prerequisite for this would be the initial availability of substantial amounts of standardised nerve tissue, which would permit profound studies on the optimal culture conditions for canine SC.