

**Diplomarbeit**

**Isolation und Kultivierung von Schwann'schen  
Zellen aus humanen peripheren Nerven  
Pilotstudie**

eingereicht von

**Kathrin Geier**

Mat.Nr.: 0311394

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Plastische, Ästhetische und  
Rekonstruktive Chirurgie**

unter der Anleitung von

**Univ. Prof. Dr. Stephan Spendel**

**Ass. Dr. Gerlinde Weigel**

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 23.03.2011*

*Unterschrift*

## **Meinen Eltern**

„Der Kopf ist rund, damit das Denken die Richtung ändern kann.“

Francis Picabia

## Danksagung

Ich danke Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Stephan Spendel für die Möglichkeit meine Diplomarbeit an der Klinischen Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie zu verfassen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Ass. Dr. Gerlinde Weigel für die geduldige und hervorragende Einführung in das Projekt und dafür, dass sie jederzeit für meine Fragen offen war .

Ein weiterer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Amyla Saxena von der Kinderchirurgie, der es ermöglichte, unsere Studien im Rahmen des EUROSTEC-Projektes durchzuführen.

Ebenso ein sehr großes Dankeschön möchte ich an Fr. Anna Kuess richten, die mir bei Zellkultur-Fragen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meinen Eltern Evelyne und Josef Geier, für ihre moralische und materielle Unterstützung und ihr Vertrauen in mich während meiner gesamten Studienzeit bedanken.

Danke möchte ich auch meinen Mädls sagen, die mich mit ihrer Freundschaft seit Jahren begleiten, mich menschlich wachsen ließen und mir großartige moralische Unterstützung leisteten, wann immer es nötig war.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Freunden, die mich durch die Studienzeit begleitet und nicht nur Prüfungen mit mir zusammen durchgestanden haben. Danke für die vielen lustigen Momente mit euch, aber auch für den Beistand, wenn mal nicht alles rund lief. Ein ganz besonderer Dank gilt dir, liebe Kristina – ohne dich hätte das Lernen nur halb so viel Spaß gemacht!

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Scharfe oder stumpfe Gewalteinwirkung im Rahmen von Unfällen jeglicher Art führt sehr häufig zu Verletzungen peripherer Nerven. Betroffen sind vor allem junge Menschen, die durch unbefriedigende Ergebnisse der zurzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden oft mit massiven motorischen und sensiblen Funktionsausfällen leben müssen. Gerade deswegen muss nach neuen vielversprechenden Alternativen geforscht werden. Eine davon stellt die Entwicklung von artifiziellen Nervenimplantaten dar, die als Nervenleitschiene für den verletzten Nerv dienen sollten. Voraussetzung dafür ist, innerhalb kürzester Zeit möglichst große und reine Schwann-Zell-Kulturen zu erhalten.

**Material und Methoden:** Die Nerven wurden von Patienten bzw. Patientinnen der Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie, die sich diversen Operationen unterzogen, bei denen Nervengewebe als Abfallprodukt hervorging, gewonnen. Unter sterilen Kautelen wurden einzelne Nervenfaszikel präpariert, in Kultur gebracht und mit Kulturmedium unter Standardbedingungen inkubiert. Sobald sich ein konfluenter Monolayer um die Faszikelstücke gebildet hatte, wurden diese passagiert. Die Identifikation der Schwann'schen Zellen erfolgte zum einen im Phasenkontrastmikroskop und zur genaueren Unterscheidung mittels S100-Färbung.

**Ergebnisse:** Erste Zellaussprossungen konnten in den Primärkulturen bereits nach 3-7 Tagen festgestellt werden, jedoch waren in diesen Kulturen Fibroblasten die dominierenden Zellen. Durch mehrmaliges Passagieren konnte der Fibroblastenanteil jedoch deutlich gesenkt werden und in Kulturen nach der 3. Passage konnte ein Reinheitsgehalt von 80-95% festgestellt werden. Die gesamte Kultivierungsdauer betrug ca. 4-6 Wochen, bis eine ausreichend große und reine Zellpopulation zur Verfügung stand.

**Schlussfolgerung:** Das ausgearbeitete Protokoll dient als Grundlage für zukünftige Arbeiten mit Schwann'schen Zellen. Weitere Modifikationen sind notwendig, um die Zellausbeute und die Reinheit der Kulturen zu verbessern, aber

allen voran die Kultivierungsdauer zu verkürzen. In weiterführenden Untersuchungen sollten die Schwann'schen Zellen auf tubuläre Polymere aufgebracht werden und bei in vivo-Studien zum Einsatz kommen.

## Abstract

**Background:** Peripheral nerve injuries are often the result of sharp or blunt trauma. The methods of treatment, which are currently in clinical practice, often lead to dissatisfying results including functional deficiency in motor function and sensibility. For this reason it's important to search for new promising alternatives. One of these is the development of an artificial nerve conduit, which should guide the sprouting axons. The prerequisite for this approach would be the successful isolation and cultivation of adult human Schwann cells.

**Material and Methods:** Tissue was obtained from patients of the Department of Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery. Under sterile conditions the neural tissue was cut into short segments, placed on culture dishes and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. When the outgrowth around the explants reached a confluent monolayer, the explants were placed in new dishes. Schwann cells were identified on the basis of cell morphology using phase contrast microscopy and by immunocytochemical labeling for S100 protein.

**Results:** First outgrowing cells were detected after 3-7 days, but fibroblasts were the predominant cell type. When the pieces of nerve had been multiply explanted and placed in new dishes, at least 80-95% of the cells showed the bi- or tripolar Schwann cell-like morphology. The total time of cultivation was about 4-6 weeks, until a sufficiently large and pure population of cells was available.

**Conclusion:** The established protocol serves as a basis for future work on Schwann cells. Further modifications are necessary to improve the cell yield and purity of cultures, but especially to shorten the time of cultivation. In further studies the Schwann cells should be applied to tubular polymers and get involved in clinical trials.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	iv
Abstract.....	vi
Inhaltsverzeichnis.....	vii
Glossar und Abkürzungen.....	x
Abbildungsverzeichnis.....	xiii
Tabellenverzeichnis.....	xiv
Graphikverzeichnis.....	xiv
1 Einleitung .....	1
1.1 Epidemiologie peripherer Nervenverletzungen .....	2
2 Grundlagen .....	4
2.1 Entwicklung des Nervensystems.....	4
2.2 Anatomische und funktionelle Grundlagen des Nervensystems .....	5
2.2.1 Zellulärer Aufbau des Nervensystems .....	5
2.2.2 Aufbau peripherer Nerven .....	9
2.2.3 Schwann'sche Zellen.....	10
2.3 Verletzungen peripherer Nerven .....	12
2.3.1 Klinische Einteilung traumatischer Nervenläsionen .....	13
2.3.2 Waller'sche Degeneration.....	15
2.3.3 Axonale Regenerationsvorgänge.....	16
2.3.4 Neurombildung .....	17
2.4 Therapiekonzepte .....	18
2.4.1 Therapieproblematik bei peripheren Nervendefekten.....	18
2.4.2 Operative Behandlungsmöglichkeiten bei Nervendefekten .....	19
2.4.3 Tissue Engineering.....	23
3 Material und Methoden.....	28

3.1	Herkunft der Materialien .....	28
3.1.1	Zusammensetzung verwendeter Medien .....	28
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	29
3.1.3	Antikörper .....	30
3.1.4	Verbrauchsmaterialien .....	30
3.1.5	Geräte.....	31
3.2	Patientenkollektiv .....	31
3.3	Isolation und Kultivierung von Schwann'schen Zellen.....	34
3.3.1	Gewinnung und Präparation der Nerven .....	34
3.3.2	Passagieren.....	36
3.3.3	Dissoziation .....	38
3.4	Identifikation der Schwannzellen .....	39
3.4.1	Phasenkontrastmikroskop .....	39
3.4.2	Färbung mittels S100.....	39
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Zellausbeute nach unterschiedlicher Behandlung des Nervengewebes .	41
4.2	Zellausbeute nach Dissoziation.....	43
4.2.1	Dissoziationsversuch nach Mauritz (2005) .....	43
4.2.2	Dissoziationsversuch nach Bozkurt et al. (2008) .....	44
5	Diskussion.....	46
5.1	Wahl der Methode.....	46
5.2	Wahl der Beschichtung .....	48
5.3	Wahl der Zusammensetzung des Mediums .....	48
5.4	Charakterisierung der Schwann-Zellen anhand spezifischer Markerproteine.....	52
5.5	Purifikation adulter SC-Kulturen .....	52
5.6	Schlussfolgerung und Zukunftsaussichten .....	55

6	Literaturverzeichnis .....	57
7	Anhang – Curriculum vitae .....	65

## Glossar und Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5'AMP	Adenosin-5'-monophosphat
a	Alter in Jahren
ALT	Alanin-Aminotransferase
Ara-C	Arabinosyl-Cytosin
AST	Aspartat-Aminotransferase
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Albumin from bovine serum
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modifies Eagles Medium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ECGF	Endothelial cell growth factor
EGF	Epidermal growth factor
EMEM	Eagle's minimal essential medium
ePTFE	Polytetrafluorethylen
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FK	Forskolin
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GPS	L-Glutamine-penicillin-streptomycin solution
h	Stunde

Hrg	Heregulin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	Insulin-like growth factor
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
m	männlich
MACS	Magnetic activated cell sorting
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Melanozytenwachstumsmedium
mm	Millimeter
mM	Millimolar
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
N-CAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
NGF	Nerve growth factor
Nn.	Nervi
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered salt solution
PDGF	Platelet-derived growth factor
PNP	Polyneuropathie
PNS	Peripheres Nervensystem
rpm	Rounds per minute
SC	Schwann'sche Zelle
TVT	Tiefe Venenthrombose
u.ä.	und ähnliches
u.a.	unter anderem
U/ml	Unit pro Milliliter
V.	Vena
v.a.	vor allem
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem
Z.n.	Zustand nach
z.B.	zum Beispiel

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 a-c: Entstehung des Neuralrohres und der Neuralleistenzellen (Junqueira & Carneiro, 2005).....	4
Abbildung 2: Aufbau einer Nervenzelle (Junqueira & Carneiro, 2005).....	6
Abbildung 3: Neuronentypen (Trepel, 2004).....	8
Abbildung 4: Histologischer Aufbau eines gemischten peripheren Nervs (Wiedenbeck & Berninger, 2007). ....	10
Abbildung 5: Schema der Schwann-Zell-Differenzierung (Mirsky et al., 2008).....	11
Abbildung 6 a-d: Schematische Darstellung der Nervenläsion (Lengerke, 2007).	13
Abbildung 7 a-e: Phasen der De- und Regeneration einer peripheren Nervenfaser (Junqueira & Carneiro, 2005).....	16
Abbildung 8: Neurom (Schroeder, 2008).....	17
Abbildung 9 a-b: Histologisches Bild einer Nervenbiopsie (Jens, 2008).....	18
Abbildung 10: Nervennähte (Dornseifer et al., 2007). ....	21
Abbildung 11: Modell eines optimalen Nervenconduits (De Ruiten et al., 2009)...	27
Abbildung 12: Nervenpräparation.....	35
Abbildung 13: Kulturplatte .....	35
Abbildung 14: Konfluenten Monolayer um ein Faszikelstück .....	36
Abbildung 15: Primärkultur .....	37
Abbildung 16: 3. Passage .....	37
Abbildung 17: Kulturmedium 1-Primärkultur.....	42
Abbildung 18: Kulturmedium 2-Primärkultur.....	42
Abbildung 19: Kulturmedium 1-Zellkultur (3. Passage) .....	43
Abbildung 20: Dissoziation nach Mauritz.....	44
Abbildung 21: Dissoziation nach Bozkurt. ....	45
Abbildung 22: Dissoziationskultur nach 18 Tagen.....	45
Abbildung 23: Mechanismus der FACS (Campbell, 2001) .....	54

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Medien .....	28
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	29
Tabelle 3: Verwendete Antikörper .....	30
Tabelle 4: Verwendete Materialien .....	30
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	31
Tabelle 6: Patienteninformationen .....	32
Tabelle 7: Serumbestandteile .....	49

## **Graphikverzeichnis**

Graphik 1: Ursachen von peripheren Nervenverletzungen.....	3
Graphik 2: Graphische Darstellung der verwendeten Nerven. ....	33

# 1 Einleitung

Traumatische Verletzungen peripherer Nerven kommen sehr häufig vor, meist im Rahmen von Verkehrs-, Arbeits-, Haushalts- oder Sportunfällen. Ca. 5% aller offenen Wunden an den Extremitäten werden durch Nervenverletzungen kompliziert (Schroeder, 2008). Dabei kann es durch stumpfe oder scharfe Gewalteinwirkung zu Quetschungen, Dehnungen bis hin zur teilweisen oder vollständigen Durchtrennung eines einzelnen Nervs aber auch ganzer Nervenplexi (z.B. Plexus brachialis) kommen. Die Folge sind Funktionsausfälle der Motorik und Sensibilität im Versorgungsgebiet des jeweiligen Nervs, die meist mit einer großen Einschränkung der Lebensqualität des betroffenen Patienten/der betroffenen Patientin einhergeht. Funktionsverluste nach Zug- oder Druckeinwirkung sind meist ohne chirurgisches Handeln reversibel, bei Nervendurchtrennungen ist jedoch immer eine chirurgische Sanierung notwendig.

Die Versorgung von peripheren Nervenläsionen stellt für den zuständigen Chirurgen/die zuständige Chirurgin aber immer noch eine große Herausforderung dar. Primär sollte versucht werden, den Nervendefekt mittels einer direkten Nervennaht zu verschließen. Ist dies nicht spannungsfrei möglich, müssen zur Überbrückung der Defektstrecke Transplantate herangezogen werden. Den Goldstandard bildet hierbei zurzeit das autologe Nerventransplantat, welches als Leitschiene für die neu aussprossenden Axone des verletzten Nerv dient und proliferations- und regenerationsfördernde Faktoren liefert (Dornseifer et al., 2007). Mit dieser Methode können – im Gegensatz zu anderen Techniken (allogene Nerventransplantate, Veneninterponate, Neurotisation, etc.) – sehr gute Erfolge in der Wiederherstellung der Nervenfunktion erzielt werden. Die Problematik liegt aber darin, dass autologe Nerven nur limitiert zur Verfügung stehen und dass bei jeder Nervenentnahme wiederum ein neuer Nervendefekt hinterlassen wird, der mit Funktionsausfällen oder schmerzhafter Neuombildung einhergehen kann (Evans, 2000).

Aus diesem Grund wird in den letzten Jahren im Rahmen des Tissue Engineerings vermehrt an der Entwicklung eines artifiziellen Nervenimplantates geforscht. Von

## 1. Einleitung

großer Bedeutung ist dafür das erfolgreiche Isolieren humaner Schwann-Zellen und deren Expansion in vitro. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der axonalen Regeneration und sollten daher als biologische Komponente in das Nerveninterponat eingebaut werden (Calderón-Martínez et al., 2002; Lundborg, 2004).

### **1.1 Epidemiologie peripherer Nervenverletzungen**

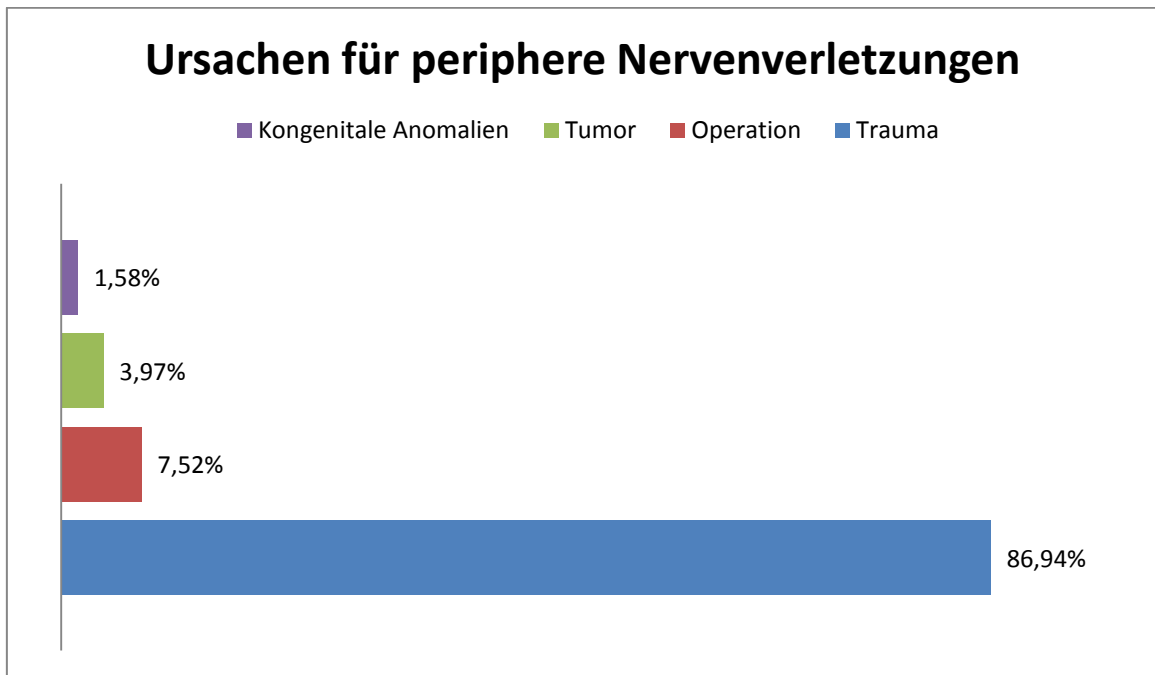
Wie bereits erwähnt, kommen periphere Nervenverletzungen sehr häufig vor und sind mit einer großen Therapieproblematik behaftet. Nicht selten müssen betroffene Patienten bzw. betroffene Patientinnen deutliche motorische und sensible Einbußen im alltäglichen und beruflichen Leben hinnehmen. Von traumatischen Nervenverletzungen ist in der Mehrzahl das männliche Geschlecht (74%) im Alter von 30-40 Jahren betroffen (Scholz et al., 2009).

Die Ursachen für periphere Nervenläsionen (Graphik 1) sind meist traumatisch bedingt (ca. 87 %), z.B. bei Knochenbrüchen im Rahmen von Sportverletzungen oder bei Polytraumen im Rahmen von Verkehrsunfällen. Sie können aber auch im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs verursacht werden (ca. 7,5%), u.a. Ischiadicusparese nach Hüftendoprothese, Interkostalnervenläsion nach Nephrektomie, Recurrensparese nach Schilddrüsenoperation oder Hypoglossuslähmung nach Karotidesobliteration. Seltener treten Nervenverletzungen als Folge von Nerventumoren (Schwannomen, Neurofibromen oder malignen peripheren Nervenscheidentumoren; ca. 4%) oder kongenitalen Anomalien bzw. geburtstraumatische Läsion (z.B. Plexus brachialis Läsion; ca. 1,5%) auf. In mehr als 80% ist dabei die obere Extremität betroffen, nur ca. 10% der Nervenverletzungen finden sich an der unteren Extremität (Scholz et al., 2009).

**Ziel dieser Arbeit ist, Methoden für die Entwicklung eines Nervenimplantates für den Menschen zu untersuchen. Dafür ist von großer Bedeutung, dass eine ausreichend große, möglichst reine Population adulter humaner**

## 1. Einleitung

Schwann-Zellen aus einer wenige Zentimeter messenden Nervenbiopsie isoliert und kultiviert werden kann.

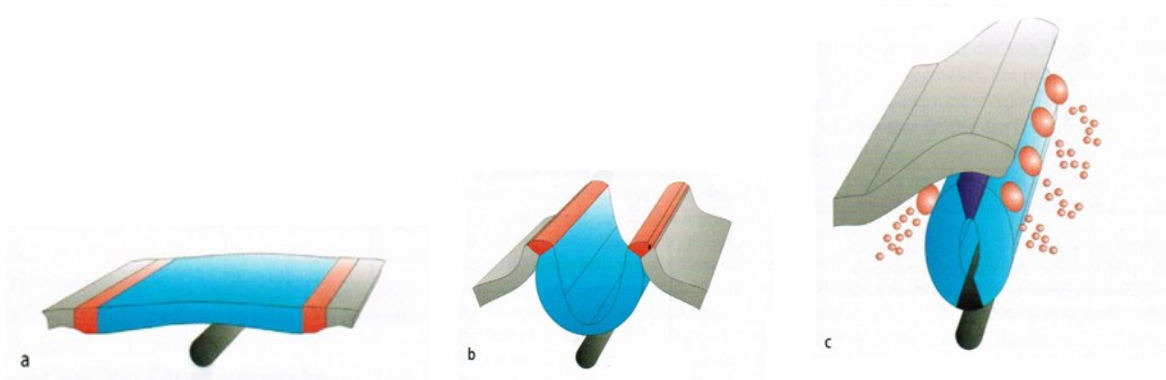


Graphik 1: Ursachen von peripheren Nervenverletzungen.

# 2 Grundlagen

## 2.1 Entwicklung des Nervensystems

In der 3. Entwicklungswoche entstehen die drei Keimblätter: Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Durch das Notochord (Chorda dorsalis = Strang des Mesoderms) wird im Ektoderm die Entstehung des Neuroektoderms induziert. Aus dem Neuroektoderm entsteht die Neuralplatte als Verdickung in der dorsalen Mittellinie (Abb. 1 a). Ab dem 18. Entwicklungstag wandert die Neuralplatte nach unten in Richtung der Chorda dorsalis, die Ränder verdicken und wulsten sich auf. Auf diese Weise entsteht die Neuralrinne (Abb. 1 b). Die beiden Ränder der Neuralrinne bewegen sich auf einander zu und nach deren Verschmelzung entsteht das Neuralrohr (Abb. 1 c). Die Verschmelzung beginnt auf Höhe der späteren Halsregion und setzt sich dann nach cranial und caudal fort. Zwischen dem 25. und 27. Entwicklungstag sollte das Neuralrohr vollständig verschlossen sein. Noch bevor es zum Schluss des Neuralrohres kommt, siedeln sich ektodermale Zellen ab und bilden beiderseits des Neuralrohres die Neuralleisten. Diese Zellen wiederum sind die Vorläuferzellen des peripheren Nervensystems und einiger anderer Strukturen, wie Melanozyten und Odontoblasten (Junqueira & Carneiro, 2005; Bucher & Wartenberg, 1997; Schmitte, 2009; Seef, 2009; Hamacher, 2002; Sadler, 2003).



**Abbildung 1 a-c: Entstehung des Neuralrohres und der Neuralleistenzellen. a: Unter dem Einfluss des Notochord (schwarz) differenziert sich das Ektoderm (grau) zum Neuroektoderm (blau). b: Auffaltung der Neuralplattenränder und Entstehung der Neuralrinne. c: Schluss des Neuralrohres und Abwanderung der Neuralleistenzellen (rot), die am Übergang zwischen Ektoderm und Neuroektoderm entstanden sind (Junqueira & Carneiro, 2005).**

### **2.2 Anatomische und funktionelle Grundlagen des Nervensystems**

Das Nervensystem lässt sich in das Zentralnervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) einteilen, wobei sich das ZNS aus Gehirn und Rückenmark zusammensetzt und das periphere Nervensystem von den Nervenfasern (Hirnnerven und Spinalnerven) und Ganglien gebildet wird.

Die Hauptaufgabe des Nervensystems liegt darin, Reize aus der Umwelt aufzunehmen, sie weiterzuleiten, zu übertragen und zu verarbeiten. Dadurch kann eine adäquate Reaktion des Körpers auf den auslösenden, äußeren Reiz folgen, die sowohl willkürlich als auch unwillkürlich sein kann (Bucher & Wartenberg, 1997; Junqueira & Carneiro, 2005; Lüllmann-Rauch, 2009; Mauritz, 2005; Schmitte, 2009; Seef, 2009; Schmidt & Baier Leach, 2003; Beck, 2005).

#### **2.2.1 Zellulärer Aufbau des Nervensystems**

Das Nervengewebe ist der Hauptbestandteil des ZNS und PNS und setzt sich aus zwei verschiedenen Zelltypen zusammen, den Neuronen (Nervenzellen) und den Gliazellen. Die Neuronen sind die Träger der spezifischen Funktion, die Gliazellen hingegen haben stützende, regulierende sowie Abwehrfunktionen (Wachtler, 2005).

##### **2.2.1.1 Die Neurone**

Das Neuron (Abb. 2) bildet die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems (Trepel, 2004). Es besitzt einen Zellkörper (Perikaryon) und einen oder mehrere Fortsätze. Das Perikaryon bildet das Stoffwechselzentrum der Nervenzelle und dient der Reizaufnahme und Proteinsynthese. Die Größe der Perikaryen kann sehr unterschiedlich sein und reicht von wenigen  $\mu\text{m}$  (z.B. Körnerzellen im Kleinhirn 4-5 $\mu\text{m}$ ) bis zu 100  $\mu\text{m}$  (z.B. Riesenpyramidenzellen in der Großhirnrinde) im Durchmesser (Wachtler, 2005; Junqueira & Carneiro, 2005).

## 2. Grundlagen

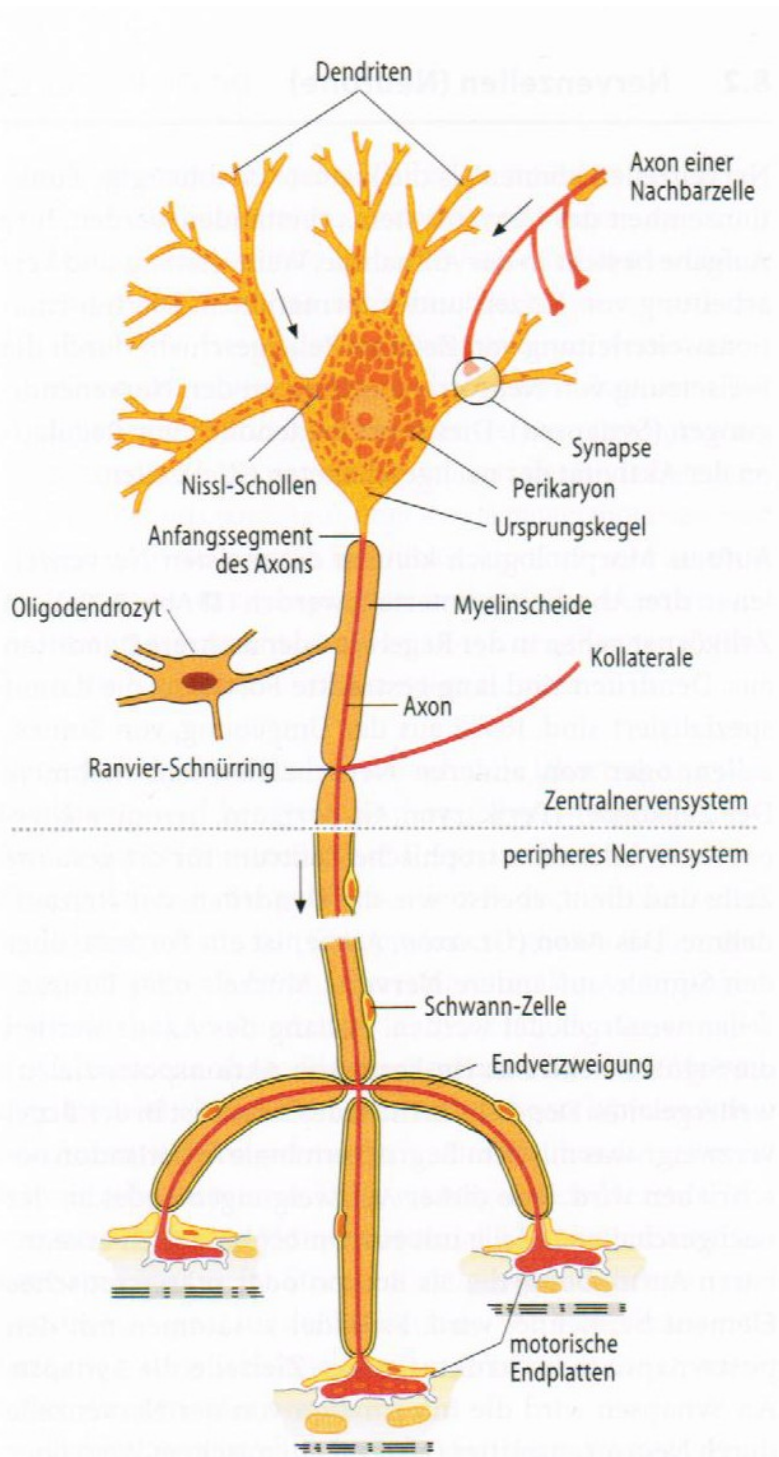


Abbildung 2: Aufbau einer motorischen Nervenzelle (Junqueira & Carneiro, 2005).

Die Fortsätze entstehen durch Ausstülpung des Zytoplasmas und werden in zwei Gruppen unterteilt:

1. Dendriten
2. Axone

## 2. Grundlagen

In der Regel hat ein Neuron nur ein Axon, besitzt in den meisten Fällen aber mehrere Dendriten besitzen (= multipolare Nervenzelle). Die Dendriten sind mit ihren Verzweigungen und Auswüchsen für die Erregungsaufnahme zuständig, das Axon hingegen leitet die Erregung vom Perikaryon weg zu anderen Nerven-, Muskel- oder Drüsenzellen. Gemeinsam mit seiner Gliahülle bzw. Myelinscheide bildet es die Nervenfasern (Trepel, 2004; Lüllmann-Rauch, 2009; Junqueira & Carneiro, 2005; Beck, 2005; Schmitte, 2009; Schmidt & Baier Leach, 2003).

Nach der Anzahl der Fortsätze können die Neuronen vier unterschiedlichen Typen zugeordnet werden (Abb.3):

1. Multipolare Neurone
2. Bipolare Neurone
3. Pseudounipolare Neurone
4. Unipolare Neurone

Multipolare Neurone (Abb 3.1) sind die am häufigsten vorkommende Form und bestehen aus einem Axon und mehreren Dendriten. Die Zahl und die Länge der Dendriten können stark variieren. Die Neurone der Sinnesbahnen (Seh-, Gehör-, Gleichgewichts-, Geschmacksbahnen) sind bipolar (Abb. 3.2) und besitzen somit ein Axon und einen Dendriten. Pseudounipolare Neurone (Abb. 3.3) finden sich praktisch nur in den sensiblen Ganglien der Spinal- und Hirnnerven. Sie scheinen nur einen Fortsatz zu besitzen, der vom Perikaryon abgeht. Dieser teilt sich jedoch in einen axonalen und einen dendritischen Teil auf. Sehr selten sind unipolare Neurone, die sich dadurch auszeichnen, dass sie nur ein Axon und keine Dendriten besitzen. Die Reizwahrnehmung findet dabei entweder direkt am (Abb. 3.4) Perikaryon oder am Axon statt. Beim Menschen gehören nur die Riechzellen zu diesem Zelltypus (Wachtler, 2005; Trepel, 2004; Junqueira & Carneiro, 2005).

## 2. Grundlagen

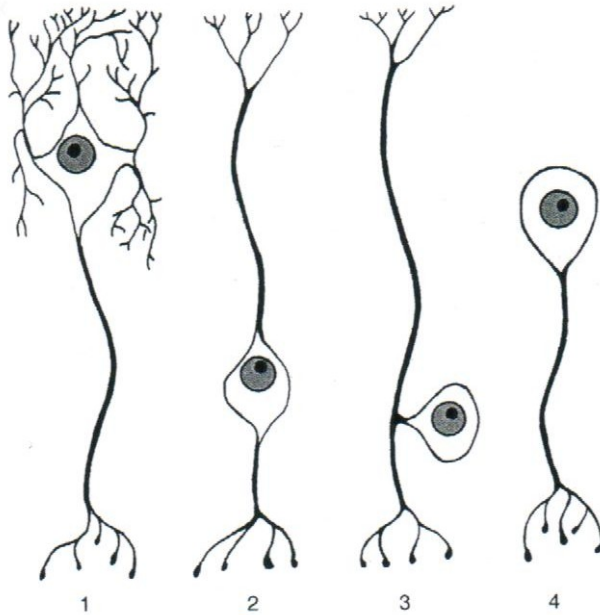


Abbildung 3: Neuronentypen. 1 Multipolares Neuron, 2 bipolares Neuron, 3 pseudounipolares Neuron, 4 unipolares Neuron (Trepel, 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung der Neurone kann aufgrund ihrer Funktion durchgeführt werden und zwar in:

1. Motorische Neurone
2. Sensorische Neurone
3. Interneurone

In den Vorderhörnern des Rückenmarks liegen die Zellkörper der motorischen Neurone, die auch als Motoneurone oder efferente Nervenzellen bezeichnet werden, und deren Axone das Rückenmark über die ventrale Wurzel verlassen. Sie leiten die Impulse des ZNS weiter zu den Effektororganen, wie z.B. den Muskelfasern, endo- oder exokrinen Drüsen.

Die Axone der pseudounipolaren sensorischen Neurone erreichen über die dorsale Wurzel die Hinterhörner der grauen Substanz des Rückenmarks. Die Zellkörper dieser sensorischen Neurone, die auch afferente Nervenzellen genannt werden, liegen in den Spinalganglien. Sie leiten die Information von den Rezeptoren der Sinnesorgane oder Organe an das ZNS weiter und dienen damit der Wahrnehmung und motorischen Koordination.

Die sensorischen und motorischen Neurone werden beide zu den Projektionsneuronen gezählt, da sie die Informationen oft über weite Strecken leiten. Im Gegensatz dazu gibt es Interneurone, die zwischen mehrere

## 2. Grundlagen

Nervenzellen geschaltet sind und so empfangene Impulse direkt an die benachbarte Nervenzelle weiterleiten (Junqueira & Carneiro, 2005).

### 2.2.1.2 Die Gliazellen

Die Gliazellen, die im Gehirn eines Säugers ca. 10 mal so häufig vorkommen als Nervenzellen, sind zwar nicht direkt für die Informationsübermittlung zuständig, jedoch würden die Neurone ohne die Unterstützung der Gliazellen ihre Funktion nicht ausüben können. Sie bilden um die Neuronen ein dreidimensionales Stützgerüst und tragen beträchtlich zum Stoffwechsel - u.a. als Energielieferanten und Energiespeicher - des Nervengewebes bei. Eine weitere Aufgabe der Gliazellen ist es, durch Bildung einer Myelinscheide die Nervenzellen elektrisch voneinander zu isolieren. Im PNS werden die myelinbildenden Gliazellen Schwann-Zellen genannt, im ZNS erfüllen Oligodendrozyten, Astrozyten, Ependymzellen und Mikrogliazellen diese Funktion (Bucher & Wartenberg, 1997; Junqueira & Carneiro, 2005; Schmitte, 2009).

### 2.2.2 Aufbau peripherer Nerven

Das periphere Nervensystem wird – wie bereits erwähnt - durch Nervenzellen und Gliazellen gebildet und stellt eine Verbindung zwischen den Sensoren (Rezeptororgane) und Effektoren der Körperperipherie und dem ZNS her (Schiebler, 2005).

Strukturell werden periphere Nerven durch Bindegewebe in mehrere Kompartimente unterteilt (Abb. 4). Die Funktion des Bindegewebes besteht in der Polsterung der Nervenfasern durch Fettzellen und in der Aufnahme von Zugkräften durch die Kollagenfibrillen. Die Nervenfaser ist in retikuläres Bindegewebe, Endoneurium genannt, eingebettet. Das Endoneurium ist aus Fibroblasten und Kollagenfibrillen aufgebaut und enthält Makrophagen, Mastzellen und ein Kapillarsystem, das zur Ernährung der Nervenzellen dient. Durch das bindegewebige Perineurium werden mehrere Nervenfasern zu Faszikeln gebündelt. Die Aufgabe des Perineuriums besteht darin, die Nervenfaser zu

## 2. Grundlagen

schützen, indem es zum einen eine polsternde Funktion hat und zum anderen eine Diffusionsbarriere für Makromoleküle bildet. Der periphere Nerv setzt sich schlussendlich aus mehreren Faszikeln, umgeben von Epineurium, zusammen. In diesem verlaufen große Gefäße zur Nervenversorgung und es verankert den peripheren Nerv im umgebenden Gewebe (Schmitte, 2009; Junqueira & Carneiro, 2005; Lüllmann-Rauch, 2009; Beck, 2005; Penkert, 1999; Schmidt & Baier Leach, 2003).

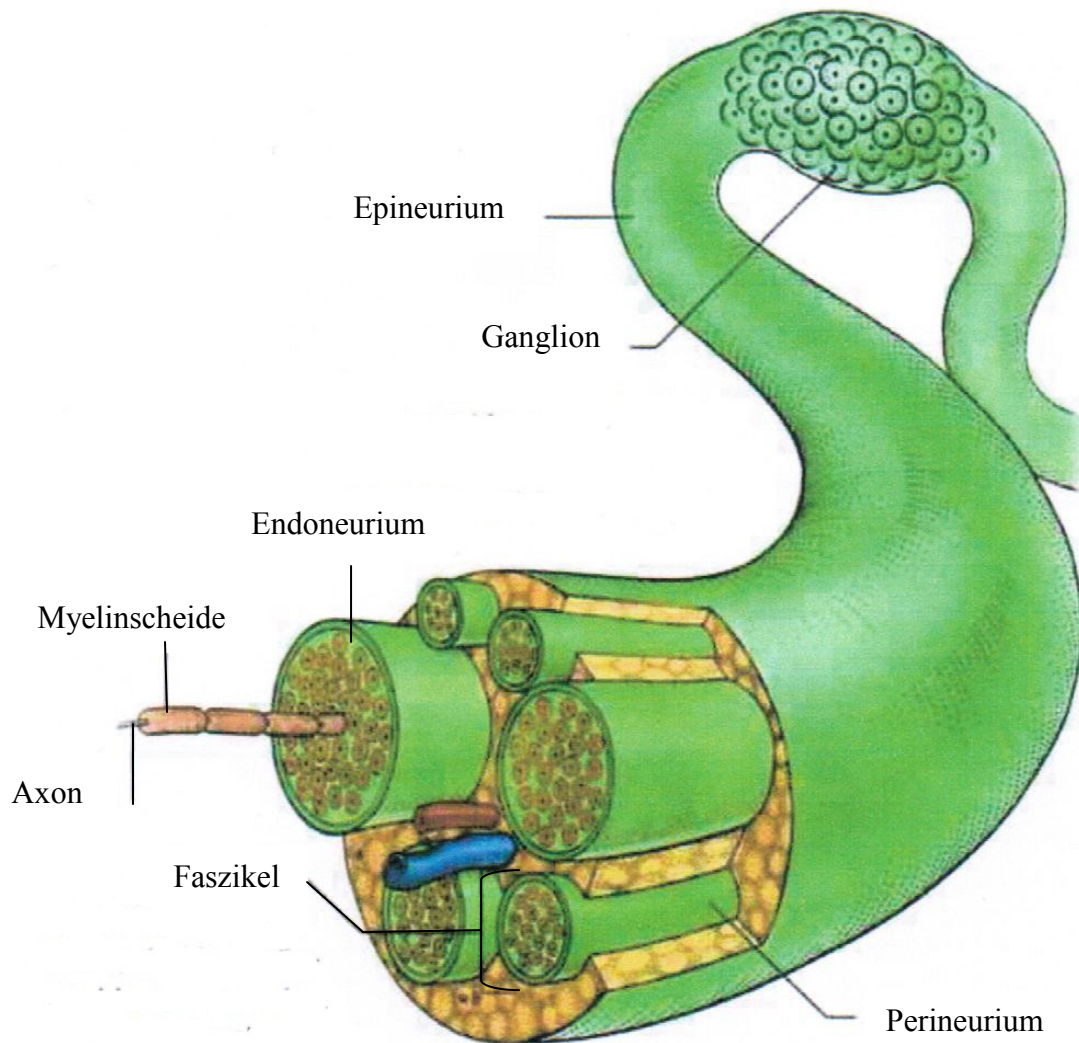


Abbildung 4: Histologischer Aufbau eines gemischten peripheren Nervs (Wiedenbeck & Berninger, 2007).

### 2.2.3 Schwann'sche Zellen

Benannt sind die Schwann'schen Zellen nach ihrem Entdecker Theodor Schwann (1810-1882). Dieser entdeckte während seinen Untersuchungen an Muskeln und

## 2. Grundlagen

peripheren Nerven eine um die Axone von Nervenzellen gelagerte Schicht und beschrieb erstmalig den Aufbau dieser Myelinscheide.

Die Schwann'schen Zellen gehen aus der Neuralleiste hervor und entwickeln sich über Vorläuferstufen in ihre ausdifferenzierte Form (Abb. 5). Während der Entwicklung des peripheren Nervensystems exprimieren sie verschiedene Wachstumshormone, die für das neuronale Überleben wie auch die Differenzierung der mesenchymalen Hüllstrukturen notwendig sind (Huber, 2002).

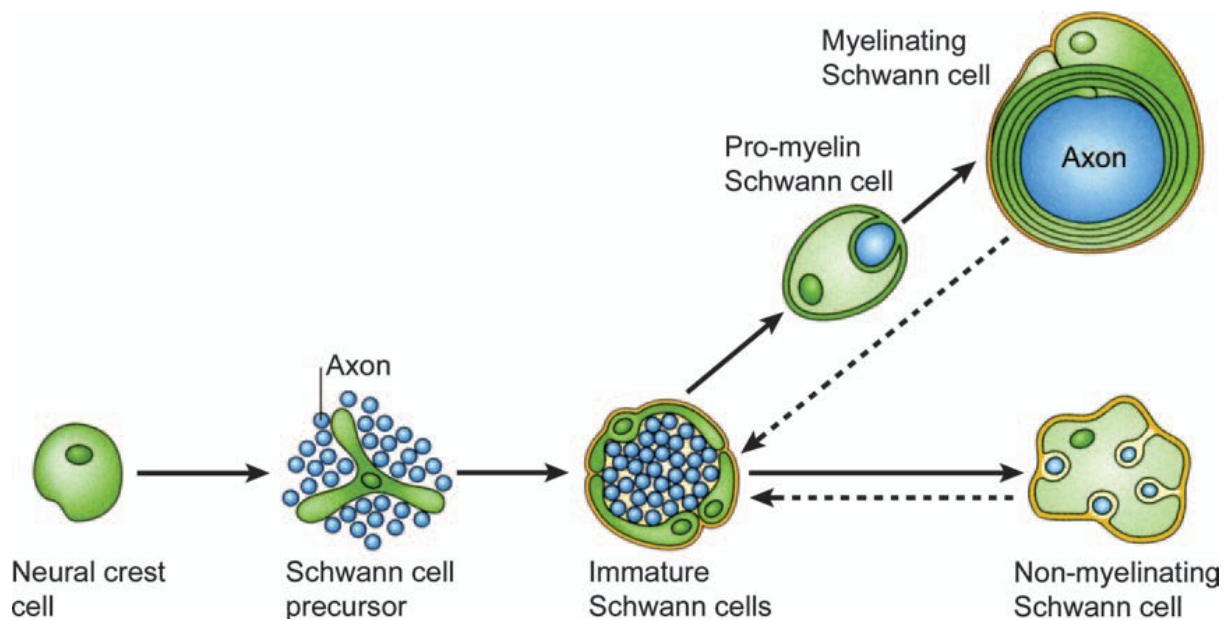


Abbildung 5: Schema der Schwann-Zell-Differenzierung (Mirsky et al., 2008).

Es lassen sich zwei Typen von Schwann-Zellen unterscheiden. Jene, die keine Myelinscheide bilden, gleichzeitig mehrere (durchschnittlich 6-12) Axone umgeben und diese vollständig in ihr Zytoplasma einlassen (=marklose Nervenfasern). Die andere Gruppe sind die myelinisierenden Schwann-Zellen, die sich mit breitflächigen Ausläufern spiralförmig um einzelne, kaliberstarke Axone legen und daraus die Myelinscheide, bestehend aus zahlreichen, konzentrischen Lipid-Protein-Lamellen, bilden (Mauritz, 2005; Bucher & Wartenberg, 1997).

Die Schwann'sche Zelle umgibt das Axon über eine bestimmte Strecke. Diesen myelinisierten Bereich bezeichnet man als Internodium. In regelmäßigen Abständen kommen kurze, myelinfreie Zonen vor, die Ranvier'sche Schnürringe genannt werden. Durch die Myelinscheide sind die Axone elektrisch isoliert,

## 2. Grundlagen

woraus folgt, dass im Bereich der Ranvier-Schnürringe keine Isolierung vorhanden ist. Dies ist die Voraussetzung für die rasche, saltatorische Erregungsausbreitung: die elektrische Erregung kann von Schnürring zu Schnürring weiterspringen. Dadurch ist begründet, warum markhaltige Nervenfasern eine schnellere Erregungsleitung als marklose Axone besitzen (Bucher & Wartenberg, 1997; Lüllmann-Rauch, 2009; Wachtler, 2005; Mauritz, 2005).

Die Schwann'schen Zellen spielen auch bei der Nervenregeneration nach vollständiger Durchtrennung eine wesentliche Rolle. Zum einen sind sie am Abbau der Myelinscheide beteiligt und zum anderen beginnen sie stark zu proliferieren und vermehren sich so bis auf das Achtfache. Erste Mitosen sind bereits 2-4 Tage nach der Nervendurchtrennung auszumachen, das Maximum wird aber zwischen dem 20. und 30. Tag nach Durchtrennung erreicht. Die Schwann-Zellen formieren sich dann zu längsorientierten Zellsäulen, die Büngner-Bänder genannt werden, und wachsen so den aussprossenden Axonen des proximalen Stumpfes entgegen. Sobald die Axonsprossen die Büngner-Bänder erreichen, fungieren diese als Leitschiene für die Regeneration. Weiters geben die Schwann-Zellen Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle an die Umgebung ab, um ein ideales neurotrophen, d.h. die Regeneration förderndes Milieu zu schaffen (Mumenthaler et al., 2007).

### **2.3 Verletzungen peripherer Nerven**

Im Gegensatz zum ZNS besitzt das PNS die Fähigkeit der Regeneration. Die Ausprägung der Schädigung ist abhängig von der Energie, sowie Art und Dauer der Einwirkung (Mumenthaler et al., 2007). Die Heilungschancen sind abhängig von der Lokalisation der Verletzung. Die Chancen auf eine vollständige Regeneration sind am besten, je weiter die Läsion vom Zellkörper entfernt und je geringer der Abstand zwischen dem proximalen und distalen Stumpf ist.

Die häufigste Ursache für die Verletzung eines peripheren Nervs ist ein mechanisches Trauma, das eine Quetschung, Zerrung oder Durchtrennung des Nervs zur Folge hat. An dieser Stelle ist zwischen stumpfer und scharfer Gewalteinwirkung zu unterscheiden. Zu den scharfen Traumen zählen Stich-, Schnitt- und Sägeverletzungen, Dehnung und Druck gehören zu stumpfen

## 2. Grundlagen

Traumen. Neben dem mechanischen Trauma können auch Tumoren, virale Infektionen oder Entzündungen zu Verletzungen der peripheren Nerven führen (Poeck & Hacke, 2006).

### 2.3.1 Klinische Einteilung traumatischer Nervenläsionen

Bei Verletzungen der Nerven wird die Leitfähigkeit der Axone unterbrochen und daraus resultiert ein Funktionsverlust des jeweiligen Nervs. Je nach Ausmaß des Traumas zeigt sich eine unterschiedliche Ausprägung der Schädigung, wobei jede einer anderen Therapie bedarf.

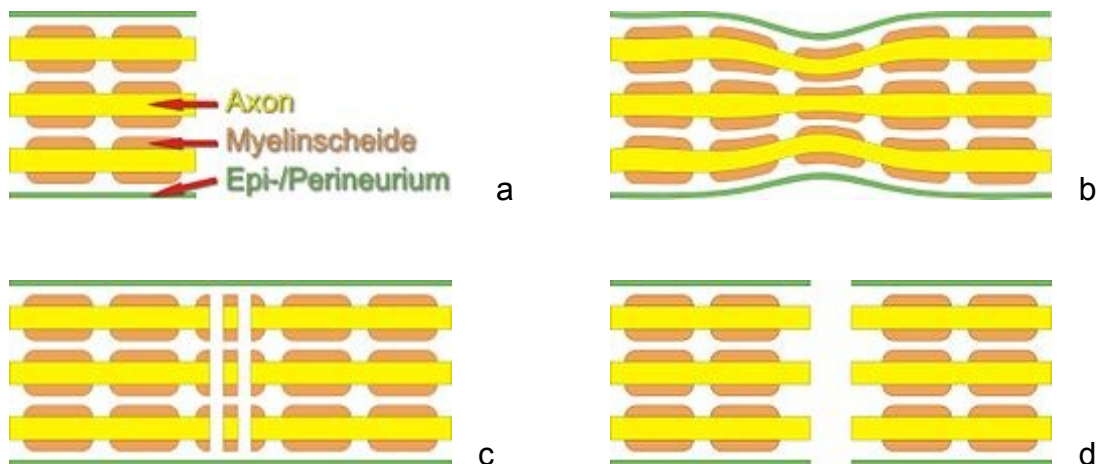


Abbildung 6 a-d: Schematische Darstellung der Nervenläsion. a: Intakter Nerv. b: Erhaltene Kontinuität des Nervs bei Zug- oder Druckeinwirkung (Neurapraxie). c: Durchtrennung des Axons, jedoch sind die Hüllstrukturen intakt (Axonotmesis). d: vollständige Durchtrennung des Axons und der Hüllstrukturen (Neurotmesis) (Lengerke, 2007).

Seddon (1943) untergliederte die Nervenläsionen aufgrund des Ausmaßes der Schädigung der verschiedenen Nervenstrukturen in drei Grade:

1. Neurapraxie (Abb. 6 b): Axon und Hüllgewebe sind intakt, jedoch kommt es durch Zug- oder Druckeinwirkungen auf den Nerven zur Störung der Leitfähigkeit im Schädigungsbereich. Dieser Zustand bildet sich spontan innerhalb von Tagen bis Wochen vollständig zurück (Restitutio ad integrum) und eine operative Therapie ist somit nicht notwendig.

## 2. Grundlagen

2. Axonotmesis (Abb. 6 c): In diesem Fall ist das Axon durchtrennt, die Hüllstruktur ist aber intakt. Da die bindegewebigen Hüllen erhalten sind, ist in den meisten Fällen kein operatives Vorgehen notwendig, da die Axone entlang der Hüllen in die richtige Richtung aussprossen und regenerieren können.
3. Neurotmesis (Abb. 6 d): ist die komplette Durchtrennung, also eine Kontinuitätsunterbrechung des Nervs und seiner Hüllstrukturen.

Sunderland (1951) erweiterte diese Einteilung um zwei Grade, wobei Grad I der Neurapraxie nach Seddon und Grad II der Axonotmesis nach Seddon entspricht. Die Neurotmesis nach Seddon unterteilte er in drei Grade, je nachdem welcher Teil der Hüllstruktur betroffen ist. Bei Grad III sind Axon und Endoneurium zerstört, Peri- und Epineurium sind aber nach wie vor intakt. Zusätzlich zu Axon und Endoneurium ist bei Grad IV auch das Perineurium in seiner Kontinuität unterbrochen und bei Grad V sind der Axon und alle seine Hüllstrukturen durchtrennt, wie es meist bei Verletzungen durch scharfe Instrumente oder stumpf durch Auseinanderreißen der Fall ist (Mumenthaler et al., 2007).

Millesi (1992) erweiterte diese Einteilung unter Berücksichtigung der posttraumatischen Reaktion des Nervengewebes und der Bindegewebsstrukturen in Form von Fibrosierung (Mumenthaler et al., 2007; Penkert, 1999):

1. Fibrose vom Typ A, wenn vorwiegend das epifaszikuläre Epineurium betroffen ist; hierbei kommt es zu einer Fibrose des umgebenden Epineuriums und durch die dadurch verursachte Schrumpfung des Gewebes wird der gesamte Nervenstamm eingeengt.
2. Fibrose vom Typ B, wenn auch das interfaszikuläre Epineurium einbezogen ist; die Fibrose findet sich zwischen Faszikeln und Faszikelgruppen und führt ebenfalls zur Kompression.
3. Fibrose vom Typ C, wenn das Endoneurium betroffen ist; das Endoneurium vernarbt, wodurch die spontane Axonaussprossung unterbunden wird und ein Neurom in Kontinuität entsteht.

Weiters erläutert Millesi unter „S“ (scar = Narbe) das Vorkommen von Bindegewebe bzw. Narbengewebe, das die einzige Verbindung zwischen den beiden Stümpfen bildet. „N“ steht für Neurom, dessen Aussprossungen vom proximalen Stumpf in Richtung des distalen Stumpfes auswachsen.

### 2.3.2 Waller'sche Degeneration

Damit es zur Regeneration peripherer Nerven kommen kann, sind optimale Wachstumsbedingungen im distalen Stumpf von großer Bedeutung. Die regenerativen Prozesse werden durch Degenerationsprozesse eingeleitet, wie durch den Abbau der Axone distal der Läsionsstelle und die Phagozytose des Myelins (Fansa & Keilhoff, 2003). Es können sowohl Veränderungen des Perikaryons als auch des distalen und proximalen Stumpfes beobachtet werden.

Die Veränderungen im Perikaryon nennt man auch Chromatolyse (Abb. 7 b). Dabei kommt es zur Auflösung der Nissl-Substanz und Abnahme der Basophilie des Zytoplasmas. Der Zellkörper schwillt an und der Zellkern wandert nach außen in exzentrische Lage (Junqueira & Carneiro, 2005).

Im distalen Stumpf kommt es zu einer anterograden Degeneration, die nach dem Physiologen Augustus Waller benannt wurde. Der Ablauf der degenerativen Veränderungen des distalen Axonabschnittes zeigt charakteristische morphologische Merkmale, deren zeitlicher Ablauf jedoch je nach Faserart, Spezies, Alter des Individuums, Temperatur und Entfernung von der Läsionsstelle variieren (Mumenthaler et al., 2007). Zuerst kommt es zum Zerfall der Axone, gefolgt vom Zerfall und der Auflösung der Myelinscheide. Die anwesenden Schwann-Zellen stellen sich, sobald sie den axonalen Kontakt verlieren, von der Aufgabe zu myelinisieren auf Regenerationsförderung um und beginnen die Myelinscheide zu fragmentieren und den anfallenden Zelldebris zu phagozytieren. Diese Aufgabe wird von hämatogenen Makrophagen, die einwandern und Zytokine, Chemokine und neuroaktive Faktoren produzieren, unterstützt. In Folge vermehren sich die Schwann-Zellen und fügen sich zu den Büngner-Bändern zusammen (Abb. 7 c). Das anfangs ödematös geschwollene Endoneurium beginnt nach Abbau der Axon- und Markscheidenzerfallsprodukte wieder zu schrumpfen (Mumenthaler et al., 2007). Auch die Zellverbände im Perineurium beginnen sich zu lockern.

Gleichzeitig zur Wallerdegeneration im distalen Stumpf, verläuft in den Axonen proximal der Läsionsstelle eine Degeneration, die retrograd gerichtet ist. Diese fällt allerdings geringfügiger aus und schreitet meist nur bis zum nächsten Ranvier'schen Schnürring fort. Auch hierbei kommt es zum Abbau von Axonen,

## 2. Grundlagen

der Myelinscheide und zur Vermehrung von Schwann-Zellen, die aber nach distal auswachsen.

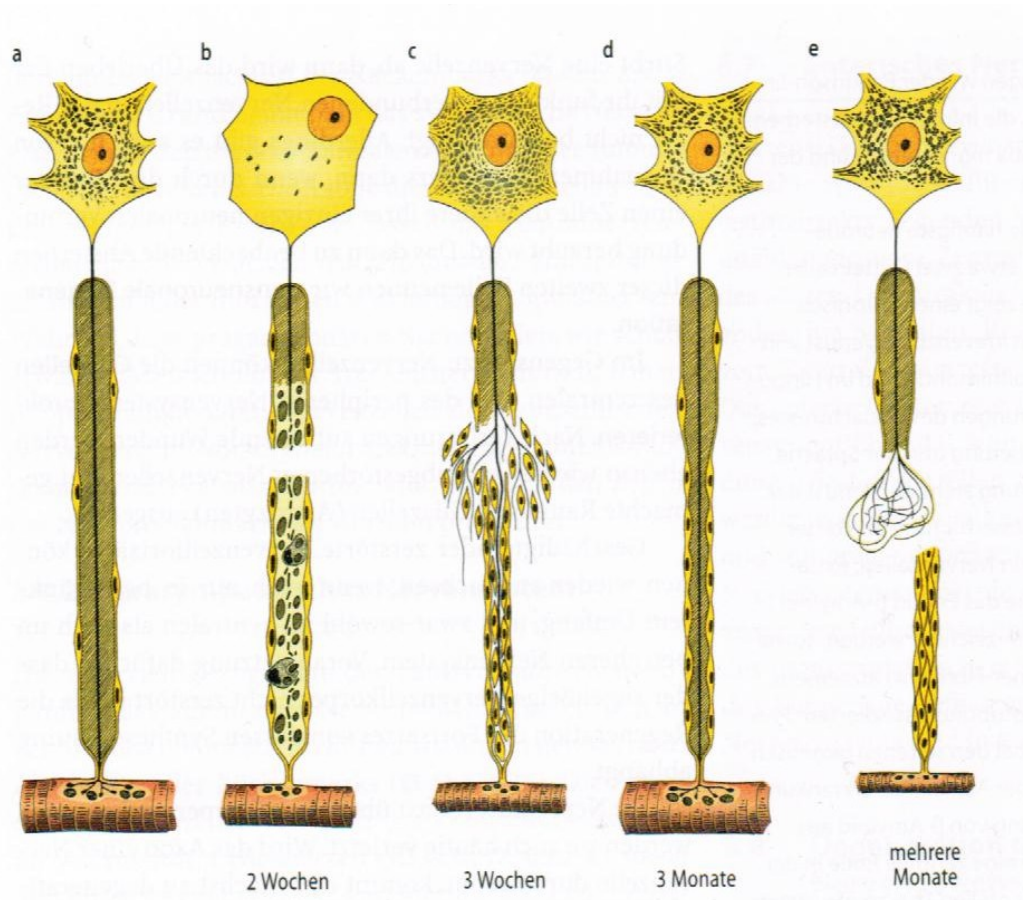


Abbildung 7 a-e: Phasen der De- und Regeneration einer peripheren Nervenfasers. a: Normale Nervenfasers mit Perikaryon und Zielzelle. b: Veränderung des Perikaryons und Degeneration des distalen stumpfes nach Nervendurchtrennung. c: Aussprossung des Axons vom proximalen Stumpf und SC-Proliferation. d: Zustand nach erfolgreicher Regeneration des Nerven. e: Erfolgreicher Regenerationsversuch mit Neuroombildung (Junqueira & Carneiro, 2005).

### 2.3.3 Axonale Regenerationsvorgänge

Die Regeneration der Nervenfasern geht immer vom proximalen Stumpf aus, der noch im Kontakt mit dem Perikaryon steht. Nachdem der Degenerationsbereich des proximalen Stumpfes durch Makrophagen gesäubert wurde, beginnen die Axonenden meist im Bereich eines ehemaligen Ranvier'schen Schnürrings anzuschwellen und bilden den Wachstumskolben. Bereits wenige Stunden später beginnt das Axon vom Wachstumskolben ausgehend wieder auszuspriessen. Wenn diese Axonaussprossungen die Büngner-Bänder des distalen Stumpfes

## 2. Grundlagen

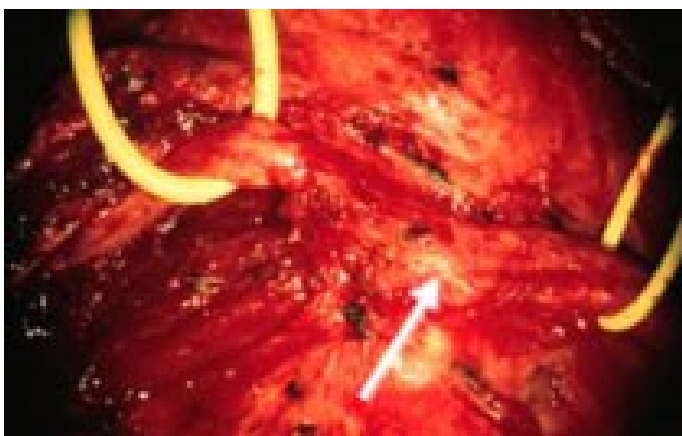
erreichen können, ist die Aussicht auf eine erfolgreiche Regeneration und Wiederherstellung der Nervenfunktion positiv.

In proximalen Nervenabschnitten verläuft die Regeneration meist schneller als in distaler gelegenen Bereichen, jedoch nimmt die Geschwindigkeit mit zunehmender Distanz vom neuronalen Zellkörper progressiv ab. So darf für die am schnellsten regenerierenden Axone eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 1-2 mm pro Tag angenommen werden (Mumenthaler et al., 2007). Weitere Konditionen, die auf die Regenerationsgeschwindigkeit Einfluss nehmen, sind Größe und Typ der Nervenfasern, Nervenstamm und Alter des Individuums.

Ein Regenerationserfolg ist klinisch gegeben, wenn der Nerv seine Funktion wieder vollständig ausführen kann. In manchen Fällen kommt es aber zu Fehlinnervationen, die dadurch entstehen, dass die Nervenfasern zwar regenerieren, aber ein falsches Endorgan erreichen. Bei rein motorischen oder sensiblen Nerven ist das nur selten zu beobachten. Häufiger tritt eine Fehlinnervation bei gemischten Nerven auf und zwar dann, wenn z.B. regenerierende Axone sensibler Nerven zu motorischen Endplatten weitergeleitet werden (Junqueira & Carneiro, 2005). Tritt dieser Fall ein, kann die Funktion des Muskels nicht wieder hergestellt werden.

### 2.3.4 Neurombildung

Ist die Distanz zwischen den beiden Nervenstümpfen zu groß, gelangen die



**Abbildung 8: Der Nerv (angeschlungen mit gelben Zügeln) endet in einem derben Nervenknötchen (Neurom, weißer Pfeil) (Schroeder, 2008).**

Axonaussprossungen nicht bis zu den Büngner-Bändern vor, die normalerweise die Aussprossungen in die richtige Richtung leiten. Fehlt den Aussprossungen eine Leitstruktur, verlieren sie ihre proximodistale Ausrichtung und verirren sich im Narbengewebe. Sie wachsen knäulenartig

## 2. Grundlagen

durcheinander und zum Teil auch retrograd um den proximalen Stumpf (Mumenthaler et al., 2007). Zusammen mit Narbengewebe entsteht dadurch ein kleiner derber Tumor (Abb. 8).

Das Neurom besteht aus vielen Minifaszikeln, die in unterschiedliche Richtungen wachsen, und nur wenigen Nervenfasern (Abb. 9 b). Diese sind meist marklos und ins Perineurium eingehüllt. Neurome können eine erhöhte Berührungsempfindlichkeit bis hin zu Kausalgien oder Phantomschmerzen bei Amputationen verursachen.

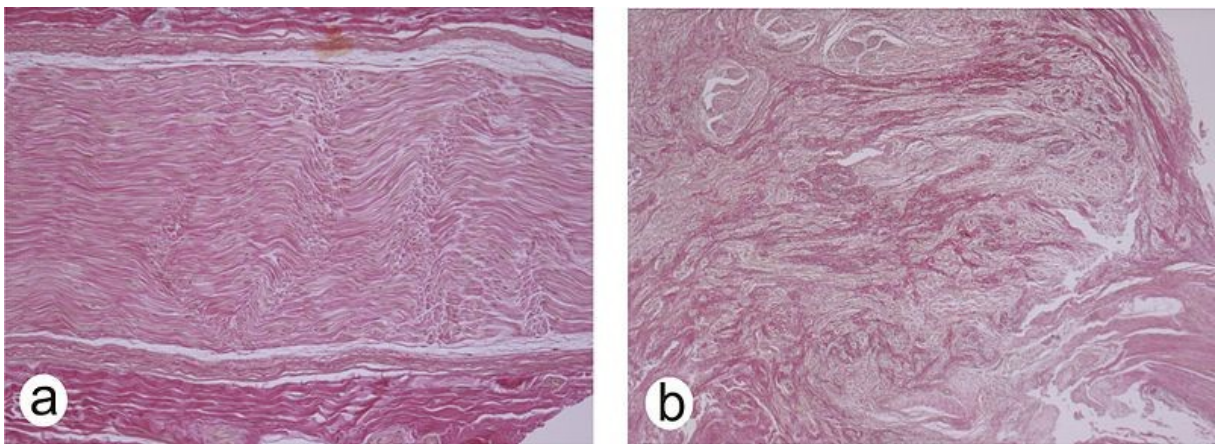


Abbildung 9 a-b: Histologisches Bild einer Nervenbiopsie. a: Normaler Nerv im longitudinalen Schnitt. b: Neurom mit ungeordneten Minifaszikeln (Jens, 2008).

Auch im distalen Stumpf kann es zur Ausbildung eines kleinen Knötchens kommen, das sich aus auswachsenden Schwann-Zellen, Kapillarendothelien, Fibroblasten und Perineuralzellen zusammensetzt. In der Regel verursachen diese keine Beschwerden.

### 2.4 Therapiekonzepte

#### 2.4.1 Therapieproblematik bei peripheren Nervendefekten

Trotz großer Fortschritte in der Mikrochirurgie ist die Versorgung einer Nervenläsion immer noch problematisch. Die einfachste Variante ist die Nervennaht, die jedoch nur möglich ist, wenn es zu keinem oder nur geringem Substanzverlust gekommen ist und eine spannungsfreie Koaptation der Stümpfe

## 2. Grundlagen

möglich ist. Sobald aufgrund einer zu großen Distanz zwischen den beiden Nervenstümpfen eine direkte Koaptation nicht mehr möglich ist, kann autologes (körpereigenes) Nervenmaterial zur Defektüberbrückung herangezogen werden. Hierbei bestehen die Probleme darin, dass es Qualitätsunterschiede zwischen dem Spender- und Empfängernerv (motorisch/sensibel) geben und es in Folge zum Funktionsausfall des Spendernervs kommen kann. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Spendernerven kann diese Methode bei großen Substanzdefekten oder bei Verletzung mehrerer Nerven nicht durchgeführt werden. Die Verwendung von Alлотransplantaten, d.h. von körperfremden Nerven, ist kritisch zu betrachten, da die Patienten sich einer immunsuppressiven Behandlung unterziehen müssen, die mit starken Nebenwirkungen einhergehen kann. Die Neurotisation, wobei „verzichtbare“ Nerven umgeleitet werden, ist ebenfalls nur als Therapie zweiter Wahl anzusehen, da die funktionelle Wiederherstellung des Nervs nicht oder nur sehr geringgradig gegeben ist. Eine alternative Therapiemöglichkeit ist das Überbrücken des Substanzdefektes mittels resorbierbaren Nervenleitschienen. Auf diese wird gezüchtetes, nervales Gewebe aufgebracht, das für die Defektheilung erforderlich ist. Doch trotz der Fortschritte im Bereich des Tissue Engineerings sind bislang die Erfolge in Hinsicht auf Regenerationspotenz über große Defektstrecken dem der autologen Nerven transplantate unterlegen (Evans, 2000).

### 2.4.2 Operative Behandlungsmöglichkeiten bei Nervendefekten

Die mikrochirurgische Versorgung von durchtrennten Nerven und deren postoperative Ergebnisse hängen nicht zuletzt vom Ausmaß der Verletzung selbst ab (Sinis et al., 2009). Prinzipiell muss eine Differenzierung in eine „einfache Durchtrennung“ des Nervs und in einen „Segmentverlust“ vorgenommen werden, da davon das operative Vorgehen abhängig ist.

Für die Behandlung einer Nervenläsion wird in der Regel die direkte Nerven naht als erste Option gewählt (ca. 78%). Sollte dies nicht möglich sein, werden andere Alternativen herangezogen: in 15% kommen autologe Nerven transplantate und in 4,5% andere Methoden wie der Einbau eines artifiziellen Nervenkonduits zum

## 2. Grundlagen

Einsatz. Der Fall, das aufgrund widriger Umstände keine chirurgische Versorgung möglich ist, tritt nur in ca. 2,5% ein (Scholz et al., 2009).

### 2.4.2.1 *Nervennaht*

Bei einer glatten Durchtrennung ohne Substanzverlust, kann eine direkte Koaptation der Nervenstümpfe angestrebt werden. Diese muss allerdings spannungsfrei erfolgen, da es ansonsten zu vermehrter Narbenbildung, Kompression der regenerierenden Axone und mangelnder Durchblutung des Läsionsgebietes kommen kann (Ijkema-Paasen et al., 2004). Die Naht kann epineural, epiperineural oder perineural ausgeführt werden.

Die Epineuralnaht (Abb. 10) wird vor allem bei monofaszikulären Nerven angewandt. Dabei werden zuerst die beiden Nervenstümpfe mobilisiert, um Spannung zu vermeiden, und dann richtig koaptiert. Danach wird das Endoneurium des proximalen Stumpfes mit dem des distalen Stumpfes mittels zwei bis vier 10\_0 Nähten locker verknüpft, wobei darauf geachtet werden muss, dass kein endoneurales Gewebe miterfasst wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das intraneurale Gewebe unberührt bleibt und es dadurch kaum zur Fibrosierung kommt (Ijkema-Paasen et al., 2004). Jedoch haben die einzelnen Faszikel keine Orientierung und können in eine falsche Richtung auswachsen.

Die epiperineurale Naht (Abb. 10) findet ihre Anwendung hauptsächlich bei oligofaszikulären Nerven. Dabei wird mit dem Epineurium zugleich auch das randständige Perineurium des Faszikels erfasst.

Bei der perineuralen Naht (Abb. 10), die vor allem für die Wiederherstellung der Kontinuität polyfaszikulärer Nerven verwendet wird, werden vom Epineurium einige Millimeter reseziert und dann das Perineurium der Faszikelgruppen mit ein bis drei perineuralen Nähten locker mit dem Perineurium der korrespondierenden Faszikelgruppe des gegenüberliegenden Stumpfes vernäht (Tscherne et al., 2003). Dadurch kann ein ungerichtetes Wachsen der Faszikel verhindert werden, jedoch ist diese Methode sehr häufig mit Vernarbungen verbunden. Außerdem ist das exakte Zusammenfügen der Faszikelgruppen der beiden Nervenstümpfe mit vielen Schwierigkeiten und Komplikationen behaftet.

## 2. Grundlagen

Die Nervennaht wird prinzipiell meist mittels monofilen Fäden der Stärke 9\_0-11\_0 durchgeführt, bevorzugt aber mit 10\_0 Näden. Die spannungsfreie Koaptation ist der Literatur zufolge bestmöglich, wenn sie mit 10\_0 Fäden und bei Neutralstellung der Gelenke durchgeführt wird. Damit es zu keiner Ausbildung von Nahtgranulomen kommt, sollte das Nahtmaterial möglichst sparsam verwendet werden (Tscherne et al., 2003).

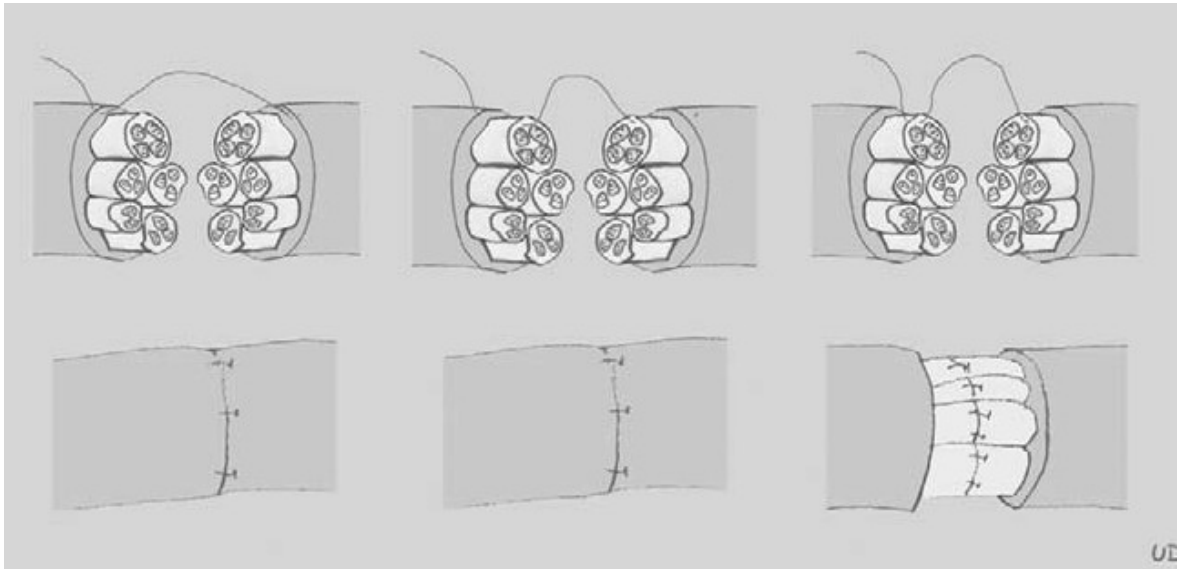


Abbildung 10: Epineurale (links), epiperineurale (Mitte) und perineurale Naht (rechts) (Dornseifer et al., 2007).

Bei Nervendurchtrennungen, die im stammnahen Bereich liegen, kann die Koaptation der Nervenstümpfe auch mittels Fibrinkleber versucht werden. Dabei werden die Nervenenden exakt aneinandergelegt, der Fibrinkleber aufgebracht und mit Pinzetten bis zum Aushärten des Fibrinklebers aneinandergedrückt (Berger & Hierner, 2003). Die Verschweißung der Nervenenden mittels CO<sub>2</sub>-Laser befindet sich noch im Teststadium.

### 2.4.2.2 Nervale Neurotisation

Bei der nervalen Neurotisation wird ein peripherer Nerv in ein neues Zielgebiet verlagert oder an den distalen Stumpf eines proximal irreversibel geschädigten Nervs adaptiert. Dieses Verfahren wird vor allem bei posttraumatischen Armplexusläsionen angewandt, wenn keine proximalen Stümpfe des Plexus

## 2. Grundlagen

brachialis selbst für die Transplantation zur Verfügung stehen. Die Neurotisation gilt als Therapie zweiter Wahl, da bei einer erfolgreichen Reinnervation eine Verknüpfung von nicht synergistischen Nervenbahnen entsteht und die Patienten mit den neurotisierten Nerven neue Funktionen übernehmen müssen, was viel Training bedarf (Nikkhah et al., 1997).

### 2.4.2.3 Autologe Nerventransplantation

Die Therapie der Wahl bei Nervenläsionen mit Substanzdefekten ist das Einbringen von autologen Transplantaten, um die Distanz zwischen dem proximalen und dem distalen Stumpf zu überbrücken und die axonale Aussprossung in Richtung des distalen Stumpfes zu leiten. Am häufigsten werden als Spendernerven solche mit sensibler Qualität verwendet, zu denen der N. suralis, der N. cutaneus brachii medialis, der N. saphenus oder der N. radialis R. superficialis zählen (Penkert, 1999). Auch bei der Transplantation von autologen Nerven muss auf einen spannungsfreien Zusammenschluss Wert gelegt werden. Um nach dem Abheilen der äußeren Wunden ein Reißen der Transplantate zu vermeiden, das z.B. durch Druck von außen akzidentell vorkommen kann, wird von einigen Autoren propagiert, die Transplantate bis zu 30% über die Defektstrecke hinweg länger zu planen und einzusetzen (Sinis et al., 2009). Die Vorteile der autologen Transplantate sind die Immunkompatibilität und das Vorhandensein vitaler Schwann-Zellen, die ein ideales Milieu für das axonale Wachstum bilden und in Form der Büngner-Bänder als Leitschiene der aussprossenden Axone dienen. Die Limitation dieser Methode ergibt sich einerseits daraus, dass verwendbares Material nur beschränkt zur Verfügung steht, andererseits muss der Nutzen in Relation zur Morbidität (Narbenbildung, Sensibilitätsstörungen beim Donor, Hyperalgesien, Neurombildung), vor allem bei Verletzungen kleinerer, rein sensibler Nerven wie den Nn. digitales proprii, stehen (Lohmeyer et al., 2007). Weiters muss mit einer verlängerten Operationszeit gerechnet werden, da es zwei Operationsgebiete gleichzeitig gibt. Problematisch ist auch, dass die regenerierenden Axone zwei Nahtlinien überwachsen müssen, was immer mit Verlust von Nervenfasern einhergeht, und durch die starre Hülle

## 2. Grundlagen

des autologen Nerventransplantates der Axon in seinem Wachstum blockiert wird (Dornseifer et al., 2007).

### *2.4.2.4 Allogene Nerventransplantate*

Bei einer Allotransplantation werden Transplantate eines genetisch differenten Spenders derselben Spezies verpflanzt. Um Abwehrreaktionen des Körpers gegen das Transplantat zu unterdrücken, muss der Empfänger Immunsuppressiva zu sich nehmen, durch deren Nebenwirkungen die Transplantationsergebnisse negativ beeinflusst werden können. Alles in allem können die Resultate mit allogenen Transplantaten nicht an die mit autogenen Transplantaten heranreichen und aufgrund der Immunsuppression sollte aus onkologischer Sicht die Verwendung allogener Transplantate vermieden werden (Evans, 2001).

### *2.4.2.5 Autologe Veneninterponate*

Autologe Veneninterponate werden v.a. in Notfallsituationen wie bei Replantation zur Überbrückung kleiner Defektstrecken mit einer maximalen Länge von 2-3 cm, effektiver aber bei Defektstrecken kleiner 30 mm, verwendet (Berger et al., 1999). Venen können prinzipiell aus jeder Körperregion entnommen werden, ohne eine beeinträchtigende Funktionsstörung zu hinterlassen. Der beinahe grenzenlosen Verfügbarkeit ist aber die Problematik gegenüberzustellen, dass Venen aufgrund der dünnen Wandstärke und des fehlenden Drucks von innen häufig kollabieren oder durch umgebendes Narbengewebe das Lumen abgeschnürt werden kann, wodurch keine adäquate Nervenregeneration stattfinden kann (Dornseifer et al., 2007).

### **2.4.3 Tissue Engineering**

Seit vielen Jahren wird bereits an der Entwicklung alternativer Materialien auf dem Gebiet des Tissue Engineerings als Ersatz für das autologe Nerventransplantat

## 2. Grundlagen

geforscht (Sinis et al., 2006). Das Ziel ist es, ein artifizielles biohybrides Nerven­transplantat zu erstellen, mit dessen Hilfe ein Nervendefekt überbrückt und in Folge eine Regeneration erzielt werden kann (Abb. 11). Um dem Aufbau eines natürlichen Nerven­transplantates möglichst ähnlich zu sein, sollte das artifizielle Transplantat (Konduit) mindestens vier wichtige Komponenten beinhalten:

1. Ein röhren- bzw. schlauchförmiges Gerüst, das als Leitschiene für das axonale Wachstum dient.
2. Stützzellen wie Schwann-Zellen
3. Wachstumsfaktoren
4. Extrazelluläre Matrix

Außerdem sind spezielle Eigenschaften des Konduits von Bedeutung, wie z.B. die biologische Abbaubarkeit, einfache Verfügbarkeit und Implantierbarkeit und niedrige Antigenität. Weiters sollte das Konduit leicht zu durchbluten und durchlässig für Sauerstoff und Nährstoffe sein, keine langfristigen Kompressionen verursachen und leicht formbar sein, einen gewünschten Durchmesser und eine passende Wandstärke inbegriffen (Evans, 2001; Chalfoun et al., 2006 Mauritz, 2005; Schmitte, 2009).

### 2.4.3.1 Gerüst

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Materialien unternommen, wobei man grundsätzlich natürliche biologische von synthetischen Materialien unterscheiden muss. Als natürliche Implantate werden Sehnen, Venen, Muskulatur aber auch Kollagen, Laminin und Fibronectin verwendet. Der Vorteil dieser Stoffe liegt darin, dass sie eine erhöhte Biokompatibilität aufweisen, zu keinen toxischen Effekten beim Abbau und vermehrter Einwanderung von Schwann-Zellen führen. Jedoch – abhängig vom Patient und der Herkunft des Materials – kann es zu einer unerwünschten Immunantwort kommen, die durch eine immunsuppressive Therapie unterdrückt werden muss. Bei der Verwendung von Venen besteht wie bei autologen Veneninterponaten die Gefahr, dass diese kollabieren. Bei Muskelgewebe als Defektüberbrückung kommt es gehäuft zu ungerichteten axonalen Wachstum mit Neuombildung (Ijkema-Paasen et al., 2004; Evans,

## 2. Grundlagen

2001; Chalfoun et al., 2006; Dornseifer et al., 2007; Mauritz, 2005; Schmitte, 2009; Evans, 2000; Schmidt & Baier Leach, 2003).

Synthetische Materialien haben den Vorteil, dass man Eigenschaften wie Form, Größe, Aufbau, Permeabilität, Biokompatibilität und Degradation, die die axonale Regeneration beeinflussen, jederzeit neu gestalten oder abändern kann. So kann durch Veränderung physikalischer Attribute z.B. die Diffusion von Nährstoffen erhöht, das axonale Wachstum beschleunigt und das Einwachsen von Fibroblasten verhindert werden.

Man unterscheidet nicht-resorbierbare und resorbierbare Stoffe. Zu den nicht-resorbierbaren Materialien zählen u.a. Silikone und Polytetrafluorethylen (ePTFE). Sie haben keinen Einfluss auf den Regenerationsprozess und sind stabiler als resorbierbare Substanzen. Die Ausdehnungsmöglichkeit des Nervs beschränkt sich aber auf den Durchmesser des Konduits und ist daher häufig der Grund für Kompressionen. Weitere nachteilige Aspekte sind das erhöhte Infektrisiko und Auftreten von chronischen Entzündungen und Fibrosierung (Ijkema-Paasen et al., 2004; Dornseifer et al., 2007; Schmitte, 2009; Chalfoun et al., 2006). Eine wesentlich größere Bedeutung haben aber resorbierbaren Materialien wie Polylactidsäure, Polyglycolsäure und Poly (D, L)-Lactid- $\epsilon$ -Caprolacton, die nach erfolgreicher Nervenregeneration degradieren und vom umgebenden Gewebe resorbiert werden (Sinis et al., 2006; De Ruiter et al., 2009; Schmidt & Baier Leach, 2003).

### 2.4.3.2 Stützzellen

Die am häufigsten verwendeten supportiven Zellen sind die Schwann'schen Zellen. Durch die Abgabe von bioaktiven Faktoren schaffen sie ein ideales Milieu für die Nervenregeneration. Sie spielen auch eine mechanische Rolle bei der Überbrückung des Defekts, indem sie proliferieren und die Büngner-Bänder ausbilden, die als Leitschiene für die Axonsprossen dienen. Schwann-Zellen produzieren Moleküle der extrazellulären Matrix wie Laminin und Kollagen. Weiters exprimieren sie eine Vielzahl von Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptoren, zu denen L1, N-Cadherin,  $\gamma_1$ -Integrine und N-CAM zählen. Auch neurotope und neurotrophe Substanzen wie NGF, BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

## 2. Grundlagen

und CNTF (ciliary neurotrophic factor) werden von den Schwann'schen Zellen synthetisiert und abgegeben (Evans, 2001; Chalfoun et al., 2006; De Ruiter et al., 2009; Dornseifer et al., 2007).

Chalfoun et al. versuchten genetisch hergestellte dermale Fibroblasten, die wie Schwann-Zellen agieren und NGF abgeben, als Schwann-Zellersatz für Konduits zu verwenden. Dies scheiterte aber an der massiven Narbenbildung verursacht durch die Fibroblasten. Neuere Untersuchungen werden mit pluripotenten Stammzellen durchgeführt. Diese besitzen die Fähigkeit sich in verschiedene Richtungen zu differenzieren und können dadurch eine günstige Umgebung für die axonale Regeneration schaffen (Chalfoun et al., 2006).

### 2.4.3.3 Wachstumsfaktoren

Zu den Faktoren, die positiven Einfluss auf das Nervenwachstum und die Nervenregeneration haben, zählen NGF, BDNF, GDNF (glial-derived neurotrophic factor), insulin-like growth factor (IGF-1, IGF-2), platelet-derived growth factor, FGF (fibroblast growth factor), Neurotrophin-3 und CNTF. Die Wachstumsfaktoren treiben zum einen das axonale Wachstum voran und sichern andererseits das neuronale Überleben. Die beste Wirkung auf das Nervenwachstum wird NGF zugeschrieben. Durch mehrere Autoren konnte gezeigt werden, dass durch exogene Gabe von NGF das Absterben eines sensorischen Neurons nach Axondurchtrennung verhindert werden kann (Fine et al., 2002; Chalfoun et al., 2006). Da der Effekt der Wachstumsfaktoren meist dosisabhängig und das Vorhandensein dieser über einen längeren Zeitraum notwendig ist, sollte die Abgabe über Abgabesysteme geregelt erfolgen (Chalfoun et al., 2006; Evans, 2001; De Ruiter et al., 2009).

### 2.4.3.4 Extrazelluläre Matrix

Durch den Einbau von unlöslichen Extrazelluläre Matrix-Molekülen, wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen in Konduits können bessere Ergebnisse bei der Axonregeneration erzielt werden. Auch Chitosan, das antitumoröse und

## 2. Grundlagen

antibakterielle Eigenschaften besitzt, zeigt eine positive Wirkung auf die Nervenregeneration. Es fördert das Einwandern und die Proliferation von Schwann-Zellen, die für die Regenerationsvorgänge notwendig sind (Chalfoun et al., 2006).

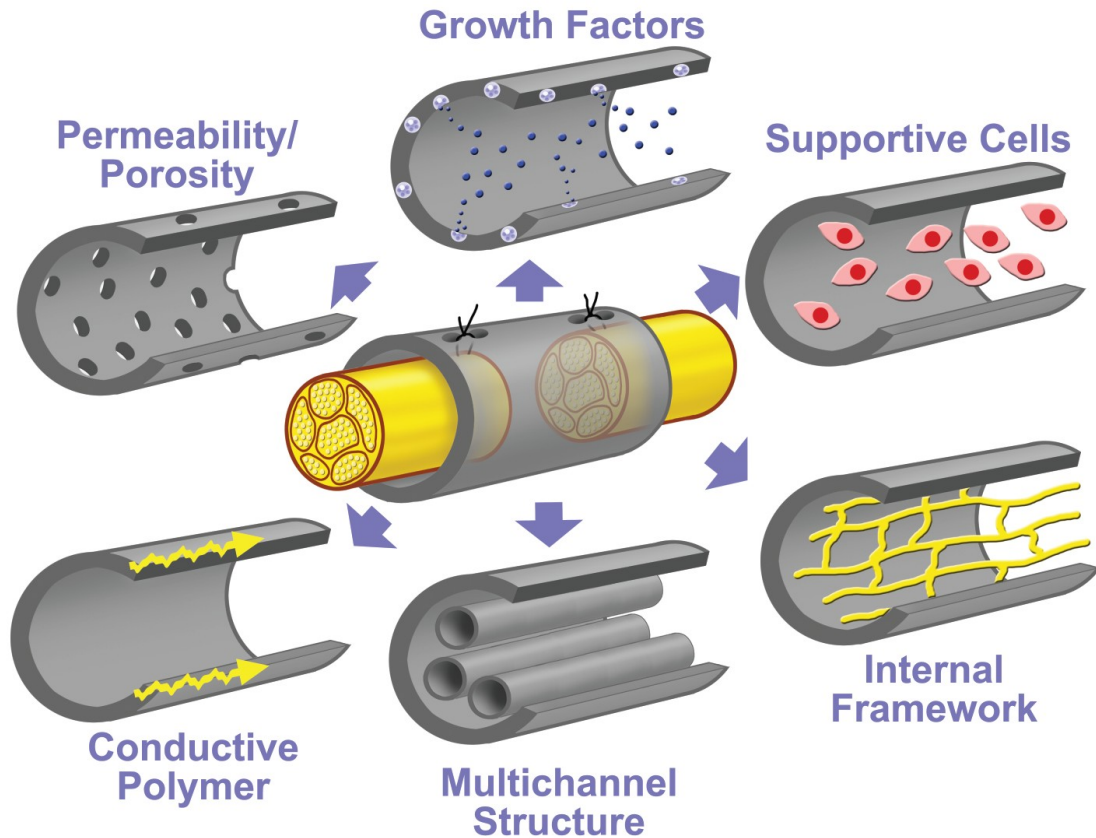


Abbildung 11: Modell eines optimalen Nervenconduits (De Ruiter et al., 2009).

## 3 Material und Methoden

Die Arbeit mit humanem Nervengewebe wurde unter der EK-Nummer 23-127 ex 10/11 und dem Titel „Isolation und Kultivierung von Schwann’schen Zellen aus humanen peripheren Nerven – Pilotstudie“ von der Ethik-Kommission der Medizinischen Universität Graz am 20.01.2011 genehmigt.

### 3.1 Herkunft der Materialien

#### 3.1.1 Zusammensetzung verwendeter Medien

Tabelle 1: Verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium 1 (SC-2)	DMEM + 10% FBS + 1% GPS + 2 $\mu$ M Forskolin + 2,5 $\mu$ g/ml Amphotericin B
Kulturmedium 2 (SC-4)	DMEM + 10% FBS + 500 U/ml GPS + 0,5 mM IBMX + 2,5 $\mu$ g/ml Amphotericin B + 10 nM $\beta$ -Heregulin + 0,5 $\mu$ M Forskolin + 2,5 $\mu$ g/ml Insulin
Aufbewahrungsmedium	DMEM + 1% GPS
Dissoziationsmedium 1	DMEM + 10% FBS + 1% GPS + 0,125% Kollagenase

### 3. Material und Methoden

---

Dissoziationsmedium 2	+ 1,25 U/ml Dispase Kollagenasepuffer + 10 mg Kollagenase + 40 mg BSA
Kollagenasepuffer	100 mM Hepes solution 120 mM NaCl 50 mM KCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM Glucose

---

#### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

---

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Amphotericin B	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Collagen	Roche Diagnostics GmbH, Wien
D-(+)-Glucose solution	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Dispase	BD Biosciences Austria, Schwechat
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Fetales bovines Serum (FBS)	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Forskolin	Sigma Aldrich GmbH, Wien
HEPES solution	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Heregulin- $\beta$	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Insulin solution from bovine pancreas	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Kaliumchlorid	Merck GesmbH, Wien
Kalziumchlorid	Merck GesmbH, Wien
Kollagenase I	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Laminin	Sigma Aldrich GmbH, Wien

---

### 3. Material und Methoden

---

L-Glutamine–penicillin–streptomycin solution (GPS)	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Natriumchlorid	Merck GesmbH, Wien
Phosphate Buffered Salt Solution (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Poly-L-ornithine solution	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich GmbH, Wien
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma Aldrich GmbH, Wien

---

#### 3.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

---

Antikörper	Bezugsquelle
S 100 beta antibody	Abcam, Cambridge
Biotinylated goat Anti-Polyvalent	Thermo Scientific Inc., Waltham

---

#### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Jegliche Materialien, die zur Anwendung kamen

---

Materialien	Bezugsquellen
6-Wellplatte	IWAKI Europe GmbH, Willich
Lab-Tek Kammerobjektträger	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Petrischalen	BD Biosciences Austria, Schwechat
Pipettenspitzen	Eppendorf Austria GmbH, Wien
Zellsieb gelb (100µm)	VWR International , Wien
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD Biosciences Austria, Schwechat

---

#### 3.1.5 Geräte

Tabelle 5: Geräte, die zur Anwendung kamen

Geräte	Bezugsquelle
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Inkubator	Eppendorf Austria GmbH, Wien
Inversmikroskop	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Mikro Pinzette	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikro-Federschere	Aesculap AG, Tuttlingen
Pipette blau (100-1000µl)	Eppendorf Austria GmbH, Wien
Pipette gelb (10-100µl)	Eppendorf Austria GmbH, Wien
Pipette grau (0,5-10µl)	Eppendorf Austria GmbH, Wien
Schüttelwasserbad	JP SELECTA S.A., Abrera (Spanien)
Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortex Schüttler	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Chirurgische Schere	Aesculap AG, Tuttlingen
Anatomische Pinzette	Aesculap AG, Tuttlingen

#### 3.2 *Patientenkollektiv*

Das Nervengewebe, das für die Studie verwendet wurde, wurde von Patienten und Patientinnen der Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie gewonnen. Diese unterzogen sich diversen Operationen, bei denen das Nervengewebe als Abfallprodukt hervorging.

Insgesamt standen uns für die Studie zehn Nerven von acht Patienten/Patientinnen zur Verfügung. Von diesen Patienten/Patientinnen waren fünf männlich, die anderen drei weiblich. Der jüngste Patient war 43 Jahre alt, der älteste 76 Jahre alt, was ein Durchschnittsalter von 58,125 Jahren ergibt. In Tabelle 6 sind die Spenderdaten und entnommene Nerven aufgeschlüsselt:

### 3. Material und Methoden

Tabelle 6: Patienteninformationen

Nr	Sex	Alter	Operation	Diagnose	Nerv
01	W	71a	Pirogoff- Amputation links	Charcot- Arthropathie	N. ischiadicus N. tibialis posterior
02	M	69a	Unterschenkel- amputation rechts	Fasciitis necroticans	N. tibialis posterior
03	M	76a	Amputation des rechten Daumens im Inter- phalangealgelenk	Malignes Melanom am Daumenend- glied	N. digitalis palmaris proprius
04	W	61a	Neurom-Excision	Neurom	N. cutaneus brachii lateralis
05	M	52a	Neurom-Excision	Neurom	N. peroneus superficialis
06	M	43a	Gestielte myokutane Lappenplastik	Weichteildefekt am Unter- schenkel	N. cutaneus brachii lateralis
07	M	44a	Triple- Neurektomie	Leisten- schmerzen	N. genitofemoralis N. iliohypogastricus
08	W	49a	Neurom-Excision	Morton'sches Neurom	N. plantaris communis

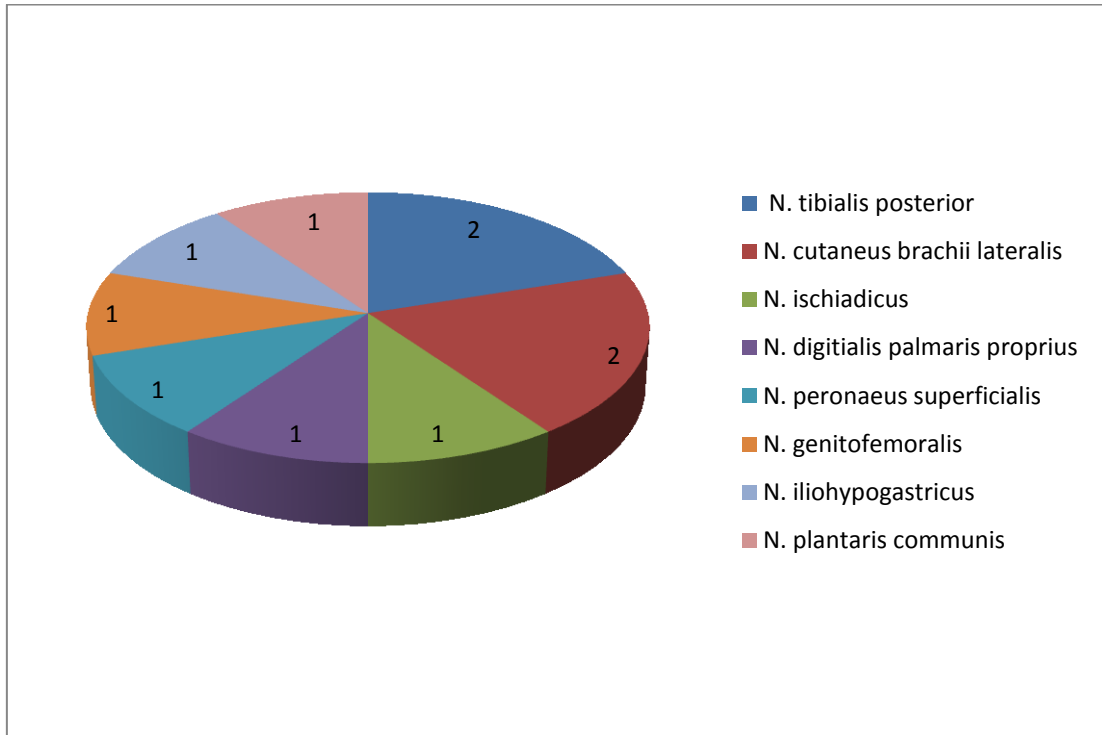
Die Palette der Vorerkrankungen der Patienten/der Patientinnen ist breit gefächert und führt von Diabetes mellitus Typ II, KHK, TVT, PNP, pAVK, Hypertonus, Osteoporose, Depressionen bis hin zu Leukopenie bei Immunsuppression bei Z.n. Nierentransplantation.

Bei den zehn Nerven, die in unserer Studie verwendet wurden, handelt es sich um folgende (Graphik 2):

- N. tibialis posterior (n=2)
- N. cutaneus brachii lateralis (n=2)
- N. ischiadicus (n=1)
- N. digitalis palmaris proprius (n=1)

### 3. Material und Methoden

- N. peroneus superficialis (n=1)
- N. genitofemoralis (n=1)
- N. iliohypogastricus (n=1)
- N. plantaris communis (n=1)



Graphik 2: Graphische Darstellung der verwendeten Nerven.

Die Standardisierung dieser Methode mit adultem humanem Gewebe gestaltete sich schwierig, da kein einheitliches Spendergewebe zur Verfügung stand. Die Donatoren unterschieden sich in Alter, Geschlecht, Erkrankungen, Allgemeinzustand und Ernährungszustand. Außerdem war der Entnahmeort der Nerven aus klinischen Gründen uneinheitlich (Graphik 2), verbunden mit unterschiedlichen Nervenqualitäten (motorisch, sensibel, gemischt).

## **3.3 Isolation und Kultivierung von Schwann'schen Zellen**

### **3.3.1 Gewinnung und Präparation der Nerven**

Die Nerven wurden noch im Operationssaal unter sterilen Bedingungen entnommen, bis zur Verarbeitung in ein Aufbewahrungsmedium gegeben und im Kühlschrank (4°C) gelagert. Der Zeitraum zwischen Entnahme und Präparation betrug zwischen einer halben Stunde und zwei Tagen.

Die 6-Wellplatten für die Zellkultur wurden zum Teil mit 1:50 verdünntem Kollagen in Kulturmedium vorbeschichtet und zum Einwirken für mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Einige 6-Wellplatten blieben zum Vergleich unbeschichtet. Währenddessen wurde das Nervenstück unter sterilen Kautelen aus dem Aufbewahrungsmedium genommen, auf eine Petrischale gelegt und mit DMEM gewaschen. Danach wurde versucht die einzelnen Faszikel mit einer feinen, sterilen Pinzette aus dem Nervenstück herauszuzupfen und so vom umgebenden Bindegewebe zu trennen (Abb. 12). Die einzelnen Faszikel wurden anschließend so gut wie möglich vom restlichen Epineurium befreit und mit einer sterilen mikrochirurgischen Schere in ca. 1-2 mm große Stücke geschnitten. Jeweils vier bis fünf Faszikelstücke wurden pro Well auf die unbeschichteten bzw. beschichteten Platten - ohne die Kollagenbeschichtung vorher abzusaugen – aufgeklebt (Abb. 13). Um ein Anhaften der Faszikelstücke am Schalenboden zu gewährleisten, wurden die beklebten 6-Wellplatten für ungefähr eine halbe Stunde in den Inkubator gestellt. Nach dem Verstreichen der halben Stunde wurden die 6-Wellplatten wieder aus dem Inkubator herausgeholt, jedem Well 1ml Kulturmedium hinzugefügt und anschließend zurück in den Inkubator gestellt. Es wurden das Kulturmedium 1 (Mauritz, 2005) mit dem Kulturmedium 2 (Diebold, 2007) verglichen.

### 3. Material und Methoden

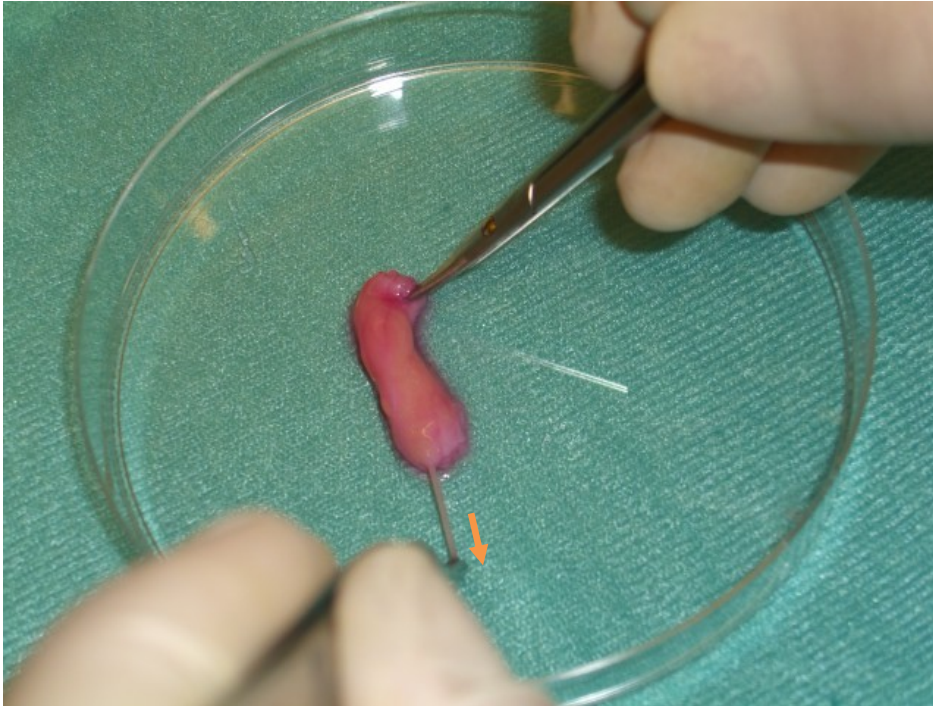


Abbildung 12: Ein einzelner Faszikel wird vorsichtig aus dem Nervenexplantat herausgezupft.

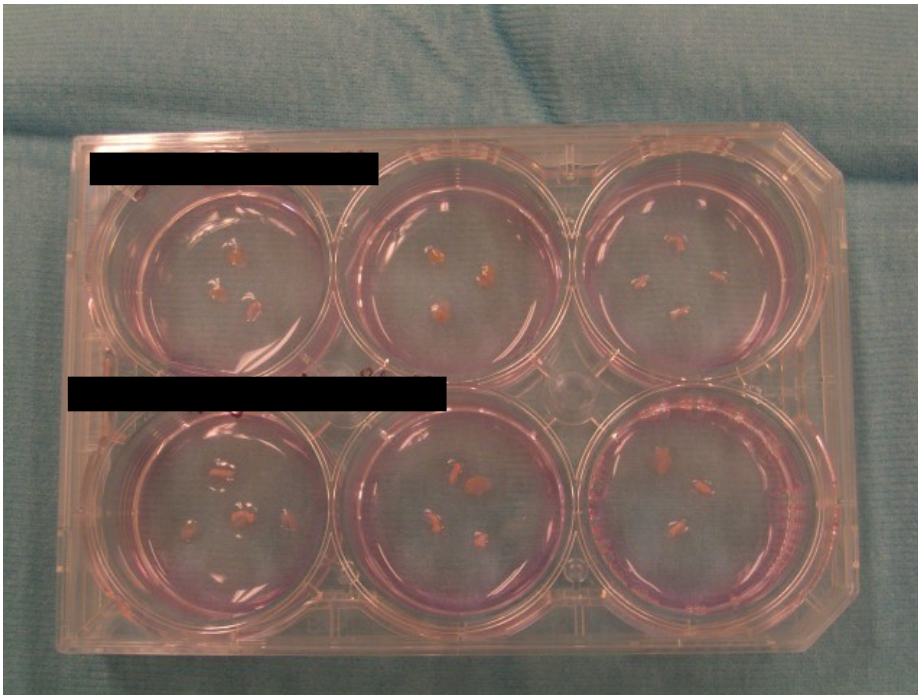


Abbildung 13: Vorbeschichtete Kulturplatte mit aufgeklebten Faszikelstücken.

Die Inkubation fand unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit statt. Zweimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Beim Absaugen des alten Mediums wurde darauf Acht gegeben, dass die Faszikelstücke geschont wurden. Bevor das neue Medium hinzugefügt wurde, wurde die 6-Wellplatte erneut für eine halbe Stunde in den Inkubator gestellt, um

### 3. Material und Methoden

die Faszikelstücke antrocknen zu lassen und so ein Aufschwimmen der Stücke zu verhindern.

#### 3.3.2 Passagieren

Sobald sich um die Faszikelstücke durch Aussprossen von Zellen ein konfluenter Monolayer gebildet hatte (Abb. 14), wurden die Explantate aus den 6-Wellplatten gezupft und auf neue Platten aufgebracht (Morrissey et al., 1991). Diese waren wiederum zum Teil mit Kollagen, zum anderen Teil mit Laminin/Ornithin vorbeschichtet. Außerdem wurden einige Faszikelstücke auf unbeschichtete oder mit Laminin/Ornithin vorbeschichtete Kammerobjektträger aufgebracht, die anschließend gefärbt werden sollten. Die 6-Wellplatten und Kammerobjektträger wurden dann weiter in Kulturmedium inkubiert bis erneut Zellaussprossungen vorhanden waren und eine weitere Passage erfolgen konnte.

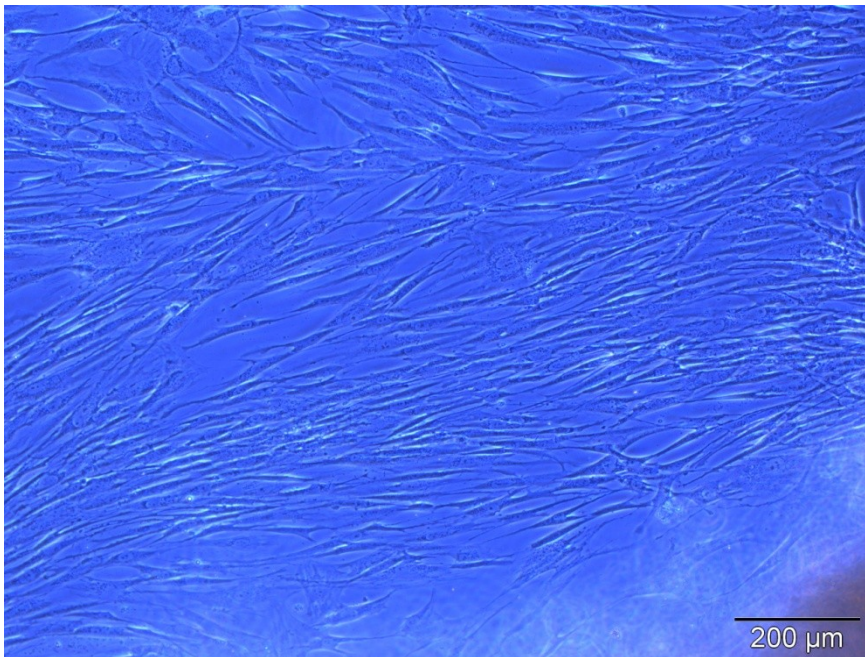


Abbildung 14: Ein aus aussprossenden Zellen gebildeter konfluenter Monolayer um ein Faszikelstück (im rechten unteren Eck).

Durch die schnellere Teilungsrates und damit verbundene schnellere Aussprossung der Fibroblasten, waren in den ersten Passagen überwiegend Fibroblasten und nur vereinzelt Schwann-Zellen aufzufinden (Abb. 15). Jedoch wurde die Anzahl der Schwann-Zellen, je öfter passagiert wurde, immer größer und die Fibroblastenzahl nahm ab (Abb. 16).

### 3. Material und Methoden

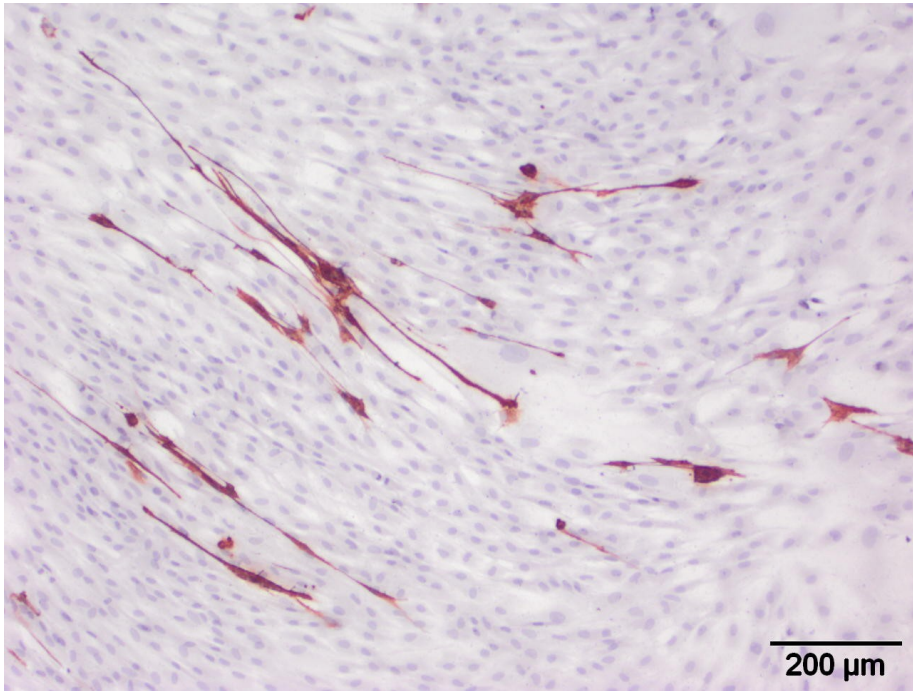


Abbildung 15: Primärkultur. Viele Fibroblasten (blau) vorhanden, nur vereinzelt sind SC eingestreut (S100 positiv, rot).



Abbildung 16: Nach der 3. Passage. Viele SC vorhanden (S100 positiv, rot). Nur noch vereinzelt Fibroblasten (blau).

### 3.3.3 Dissoziation

Nach der 3.-5. Passage wurden die Faszikelstücke der Dissoziation unterzogen, um die Zellen, die nach wie vor in den Explantaten zurückgeblieben waren, herauszulösen. Die Dissoziation erfolgte auf zwei verschiedene Arten:

1) Dissoziation nach Mauritz 2005:

Die Faszikelstücke wurden mit einer Pinzette aus der 6-Wellplatte herausgezupft und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, welches mit einer Enzymlösung (Dissoziationslösung 1) gefüllt war. Diese Dissoziationslösung bestand aus: DMEM mit 10% FBS, 1% GPS, 0,125% Kollagenase und 1,25 U/ml Dispase. Das Zentrifugenröhrchen wurde dann bei 37°C ins Schüttelwasserbad gestellt, um eine gleichmäßige Verdauung des Gewebes zu gewährleisten. Die von Mauritz angegebene Inkubationszeit wurde von 20 Stunden auf eine Stunde verkürzt, um die Anzahl vitaler Zellen zu erhöhen. Da die Gewebestruktur nach einer Stunde Dissoziation noch nicht vollständig aufgelöst war, wurden die halbverdauten Faszikelstücke durch ein Zellsieb gestrichen. Anschließend wurde mit PBS nachgespült und die Zellsuspension für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde 1 ml PBS hinzugefügt. Es wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurde das Zellpellet mit 1 ml Kulturmedium vermischt und auf einer mit Poly-L-Ornithin/Laminin-vorbeschichteten 6-Wellplatte ausgesät.

2) Dissoziation nach Bozkurt et al. 2008:

Die Faszikelstücke wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit Kollagenasepuffer, Kollagenase und BSA transferiert (Dissoziationslösung 2). Der Kollagenasepuffer setzte sich aus 100 mM Hepes solution, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 5 mM Glucose zusammen. Das Zentrifugenröhrchen mit der Dissoziationslösung und den Nervenfaszikeln wurde für eine halbe Stunde ins Wasserbad (37°C) gestellt. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde abgesaugt und zum Zellpellet wurden 5 ml DPBS (ohne Kalzium und Magnesium) hinzugefügt und gevortext. Danach wurde für weitere 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Waschvorgang mit DPBS erfolgte zweimal.

### 3. Material und Methoden

Anschließend wurde 1 ml Trypsin EDTA zur Zellsuspension hinzugefügt, kurz aufgeschüttelt und für weitere 10 Minuten bei 37°C ins Wasserbad gestellt. Zum Beenden der enzymatischen Verdauung wurden gleich nach dem Entfernen aus dem Wasserbad 500µl FBS hinzugefügt. Die Suspension wurde aufgeschüttelt und zentrifugiert (10 min, 1000 rpm). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 1 ml Kulturmedium aufgefüllt und auf eine mit Poly-L-Ornithin/Laminin-vorbeschichtete 6-Wellplatte ausgesät.

#### **3.4 Identifikation der Schwannzellen**

##### **3.4.1 Phasenkontrastmikroskop**

Schwann'sche Zellen zeigen sich im Mikroskop normalerweise schlank und spindelförmig. Die Form ist meist bi-, seltener tripolar, und sie haben lange Ausläufer. Schwann'sche Zellen besitzen verhältnismäßig wenig Zytoplasma, in dem die ovalen Zellkerne stiftförmig angeordnete sind (Vroemen & Weidner, 2003; Casella et al., 1996; Calderón-Martínez et al., 2002).

Fibroblasten stellen sich hingegen eher flächenhaft und polymorph mit großen Zellkörpern dar. Der Zellkern ist groß und rund (Parotat, 2009; Honkanen et al., 2007; Hedayatpour et al., 2007).

##### **3.4.2 Färbung mittels S100**

Um die Reinheit der Schwann-Zellkulturen zu ermitteln bzw. die Schwann-Zellen zu identifizieren, wurde nach jeder Passage eine immunzytochemische Markierung durchgeführt. Dazu wurde ein Primärantikörper verwendet, der sich gegen das intrazelluläre kalziumbindende Protein S100β richtete. Durch die S100-Färbung zeigte sich das Zytoplasma der Schwann'schen Zellen in ausgeprägter roter Farbgebung.

### 3. Material und Methoden

Die für die Immunzytochemie vorgesehenen Kammerobjektträger wurden abgesaugt, mit PBS gewaschen und für mindestens 24 Stunden zum Trocknen stehen gelassen. Die Färbung erfolgte in folgenden Schritten:

- Fixierung mit Aceton
- Trocknen bei Raumtemperatur
- Rehydrierung der Kulturen mit PBS
- Betropfen mit Ultra V Block
- Aufbringen des mit Antibody Diluent auf 5 µg/ml verdünnten Primärantikörpers S100β für eine Stunde
- Waschen mit PBS
- Aufbringen des Sekundärantikörpers Biotinylated goat Anti-Polyvalent
- Waschen mit PBS
- Auftropfen von Streptavidin
- Waschen mit PBS
- Aufbringen des roten Farbstoffs AEC+
- Mit Aqua dest. AEC+-Reaktion gestoppt
- Gegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung
- Mit Leitungswasser fließend wässern bis die Farbe vollständig ausgewaschen ist
- Kurz eintauchen in Ammoniakwasser
- Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

# 4 Ergebnisse

## **4.1 Zellausbeute nach unterschiedlicher Behandlung des Nervengewebes**

Für den klinischen Einsatz von in vitro vermehrten Schwannzellen zur Versorgung von Nervenläsionen ist es notwendig, dass diese innerhalb kürzester Zeit in einem ausreichenden Maße zur Verfügung gestellt werden können. Denn je länger das Endorgan ohne nervale Innervation ist, desto geringer wird die Chance auf vollständige Regeneration. Daher ist die Dauer, die für die Kultivierung der Schwannzellen notwendig ist, von großer Bedeutung.

Eine erste Aussprossung der Zellen konnte in den meisten Fällen innerhalb von 3-7 Tagen beobachtet werden, spätestens nach zwei Wochen waren aber immer auswachsende Zellen zu finden. Dies war einerseits abhängig vom Medium, das den Kulturen gefüttert wurde, und andererseits von der Vorbehandlung der 6-Wellplatten. Auf mit Kollagen und Laminin/Ornithin vorbeschichteten 6-Wellplatten konnte im Durchschnitt fünf Tage früher Zellaussprossungen verzeichnet werden als auf unbeschichteten Platten. An dieser Stelle ist zu bemerken, dass auf den unbeschichteten 6-Wellplatten die beste Anhaftung der Explantate am Schalenboden zu registrieren war. Die Faszikelstücke in den beschichteten 6-Wellplatten schwammen immer wieder, trotz erneutem antrocknen lassen vor der Zugabe des neuen Mediums, auf. Doch meist ist die Adhäsionsfähigkeit der Faszikelstücke auch abhängig vom Fett- und Bindegewebeanteil der Explantate. Im Vergleich der Beschichtungen Kollagen und Laminin/Ornithin war letztere zu bevorzugen, da auf dieser eine deutlich höhere Proliferationsrate der SC zu beobachten war.

Bei der Primärkultivierung der Explantate im Kulturmedium 1 konnten bereits nach 3 Tagen aussprossende Zellen beobachtet werden. Diese waren jedoch in den meisten Fällen als Fibroblasten zu identifizieren. Ein erstes Auswachsen von Zellen in den Kulturen, die mit Kulturmedium 2 gefüttert wurden, konnte erst nach 7 Tagen beobachtet werden. Im Übrigen zeigte sich in den Medium 1-Primärkulturen (Abb. 17) eine deutliche höhere Zellzahl als in den Medium 2-

#### 4. Ergebnisse

Kulturen. Bei späterer S 100-Färbung stellte sich jedoch heraus, dass in den Kulturen, die mit Kulturmedium 1 ernährt wurden, ein großer Teil der Zellen S 100 negativ und somit als Fibroblasten zu identifizieren waren. In den Medium 2-Primärkulturen (Abb. 18) waren, trotz geringerer Zellausbeute, 85% der Zellen S100 positiv und somit als Schwanzzellen zu identifizieren. Der Fibroblastenanteil in diesen Kulturen war verhältnismäßig gering.

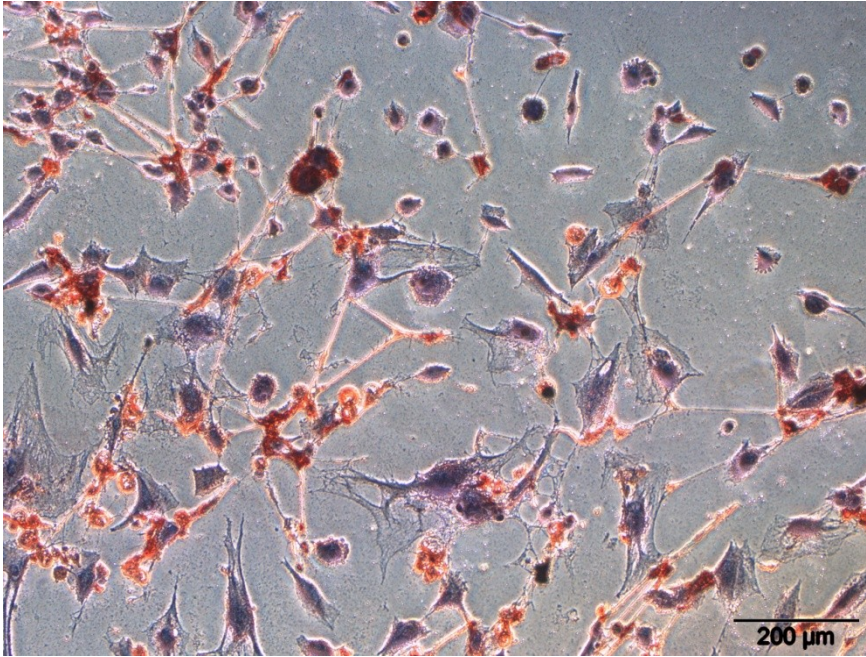


Abbildung 17: Kulturmedium 1-Primärkultur. Gefärbt mit S100.

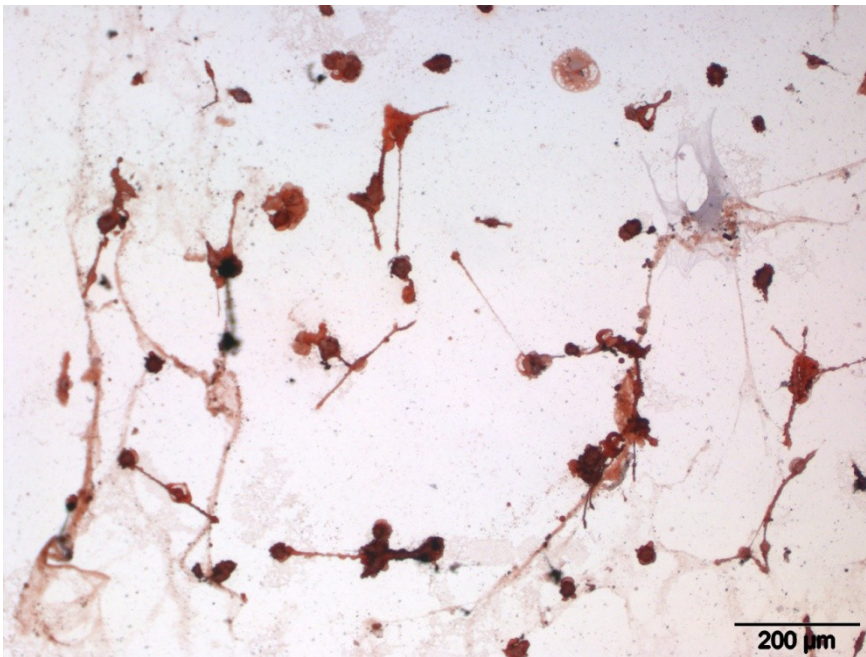


Abbildung 18: Kulturmedium 2-Primärkultur. Gefärbt mit S100.

## 4. Ergebnisse

Nach mehrmaliger Passage kam es auch in den Medium 1-Kulturen zu einer Vermehrung des SC-Anteiles und einer Abnahme der Fibroblastenanzahl. Ab der 3. Passage konnte in diesen ein Reinheitsgrad von 80-95% ermittelt werden (Abb.19).

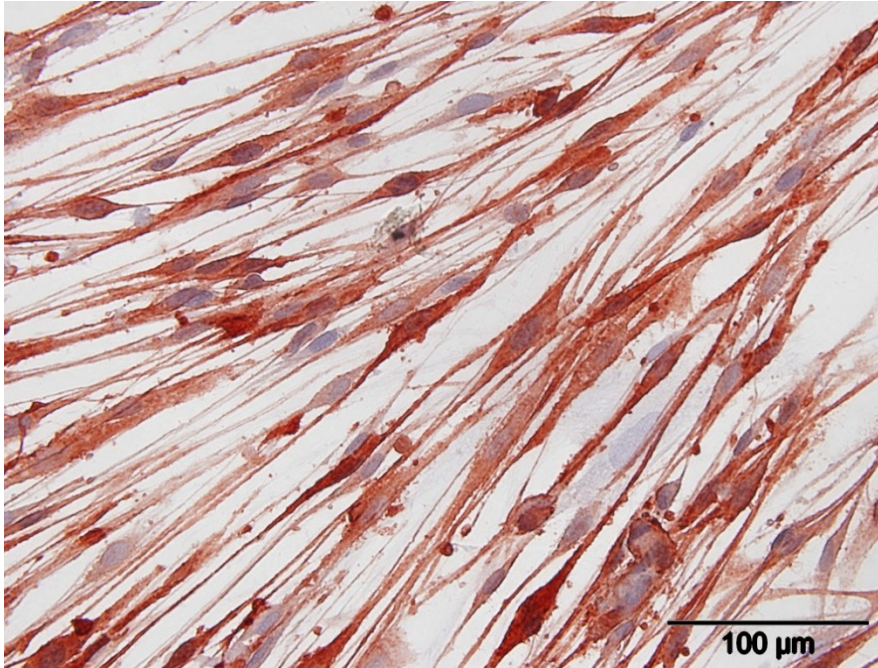


Abbildung 19: Kulturmedium 1-Zellkultur (3. Passage) zeigt einen hohen SC-Gehalt. Gefärbt mit S100.

### 4.2 Zellausbeute nach Dissoziation

#### 4.2.1 Dissoziationsversuch nach Mauritz (2005)

Nach dem Vorgehen, wie im Protokoll von Mauritz (2005) angegeben (20h Dissoziation bei 37°C), konnten kaum vitale Zellen gefunden werden (Abb. 20). Die Zellen blieben meist abgerundet und setzten sich nicht am Schalenboden nieder. Auch nach mehrfacher Modifikation des Protokolls - angefangen bei Verkürzung der Dissoziationszeit bis Senkung der Dissoziationstemperatur - konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Nur vereinzelt konnten vitale Zellen beobachtet werden.

## 4. Ergebnisse

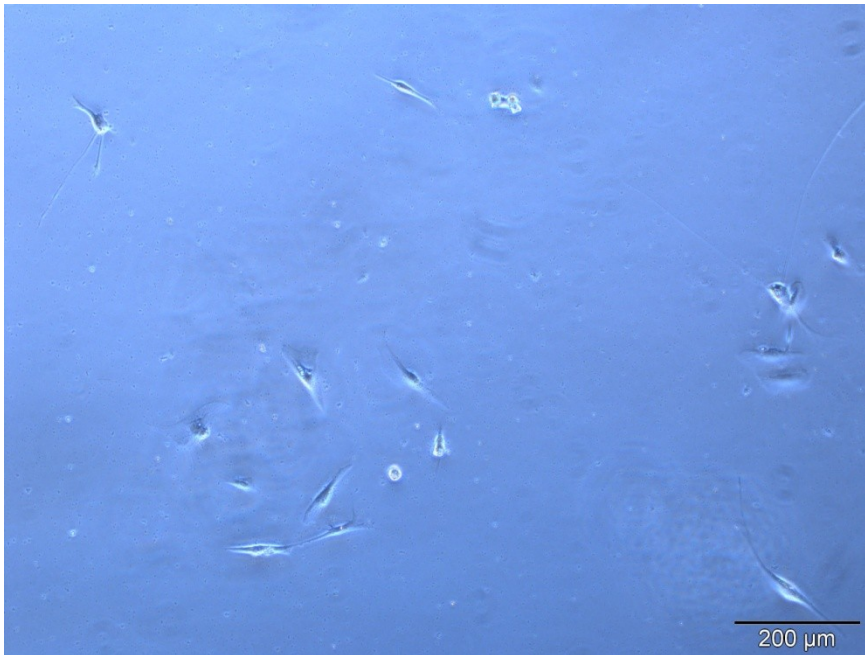


Abbildung 20: Drei Tage nach Dissoziation sind nur wenige vitale Zellen mit typischer SC-Morphologie zu finden.

### 4.2.2 Dissoziationsversuch nach Bozkurt et al. (2008)

Auch dieses Protokoll musste modifiziert werden um vitale Zellen gewinnen zu können. Die Gesamtinkubationszeit von drei Stunden, die von Bozkurt et. al 2008 angegeben wurde, musste auf eine maximale Inkubationszeit von 40 Minuten verkürzt werden, um eine zufriedenstellende Anzahl an vitalen Zellen zu erhalten (Abb. 21).

Die Problematik, die sich uns in diesem Fall darstellte, war, dass die auf diese Weise dissoziierten Zellen jegliches Potential zur Proliferation verloren hatten. In den folgenden Tagen nach der Dissoziation kam es, trotz regelmäßigem Mediumwechsel und Inkubation bei idealen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), zu keiner weiteren Zellvermehrung. Aus diesem Grund konnten die Zellen maximal für 15 Tage in Kultur gehalten werden. Danach verloren sie ihr spindelförmiges Aussehen und rundeten sich ab. Nach 18 Tagen in Kultur waren nur noch vereinzelt vitale Zellen sichtbar (Abb. 22).

## 4. Ergebnisse

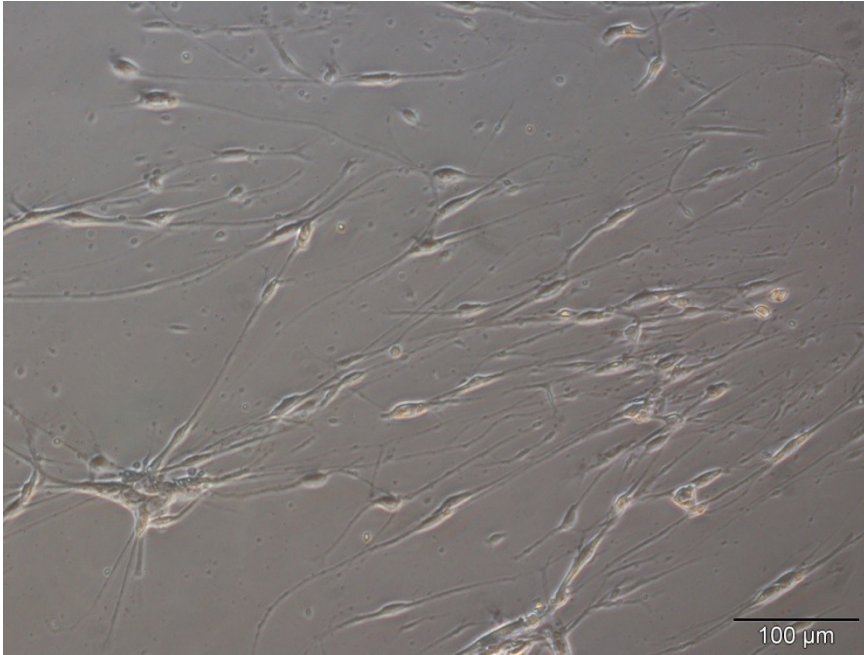


Abbildung 21: Drei Tage nach Dissoziation sind viele vitale Zellen mit typischer SC-Morphologie sichtbar.

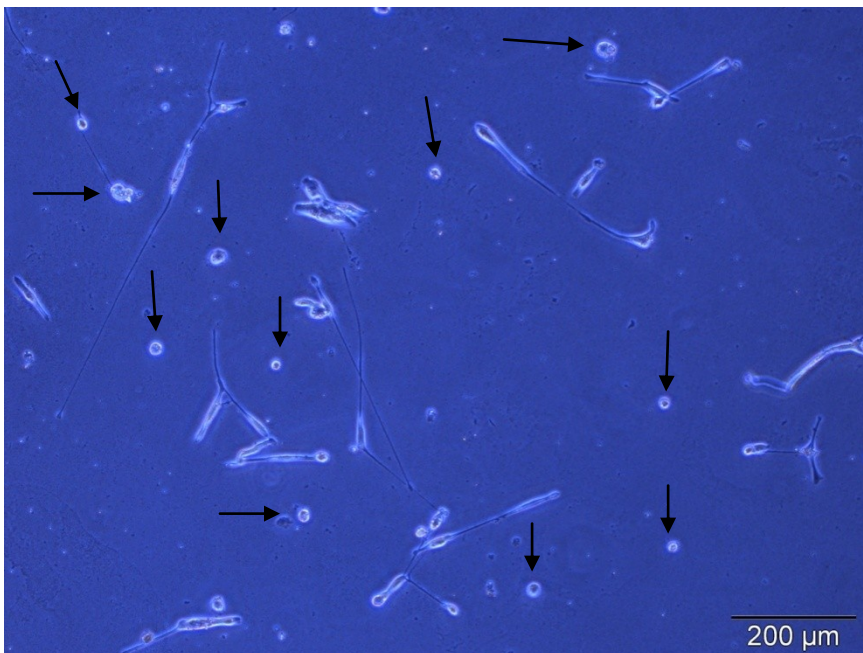


Abbildung 22: Nach 18 Tagen in Kultur hat sich die Zellzahl deutlich verringert und die Zellen zeigen teilweise eine abgerundete Form (Pfeil).

### 5 Diskussion

Da die Behandlung von Nervenläsionen mit Defektstrecke klinisch immer noch eine große Problematik darstellt, wird derzeit im Rahmen des Tissue Engineering intensiv an der Schaffung geeigneter Nervenconduits zur Überbrückung der Defektstrecke geforscht. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist das erfolgreiche Isolieren und Kultivieren von Schwann'schen Zellen. Es gibt bereits einige Protokolle, die die Isolierung von Schwann'schen Zellen aus nervalem Gewebe von Ratten (u.a. Bozkurt et al., 2009; Hedayapour et al., 2007; Morrissey et al., 1991; Anselin et al., 1998; Niapour et al., 2010) und auch aus humanem Nervengewebe beschreiben (u.a. Fansa et al., 2000; Lopez & De Vries, 1999; Calderón-Martínez et al., 2002; Levi, 1996; Rutkowski et al., 1995). Ziel dieser Arbeit war es, aus adultem, humanem Gewebe eines Nervenbiopsates eine genügend große Anzahl an SC zu züchten bzw. reine SC-Kulturen herzustellen, die für das Tissue Engineering erforderlich sind. Um eine geeignete Methode zu finden, wurden sowohl Protokolle zur Isolierung und Kultivierung von SC von Nagetieren und Hunden als auch von Menschen übernommen, Methoden kombiniert und optimiert.

#### 5.1 Wahl der Methode

In der Literatur sind drei verschiedene Methoden zur Isolierung und Kultivierung von SC beschrieben:

1. Methode der direkten Dissoziation (u.a. Morrissey et al., 1991)
2. Methode der Prädegeneration in vivo oder in vitro und anschließende Dissoziation (u.a. Mauritz, 2005; Bozkurt et al., 2009)
3. Reexplantiermethode (u.a. Morrissey et al., 1991; Paul, 2003)

Unsere Wahl fiel aus mehreren Gründen auf die Reexplantiermethode (Morrissey et al., 1991). Die Vorteile dieser Methode liegen zum einen in der höheren Zellausbeute gegenüber der direkten Dissoziation, da durch eine sofortige Dissoziation aufgrund des noch engen Kontakts zwischen SC und Axon mit einem

## 5. Diskussion

SC-Verlust gerechnet werden muss. Zum anderen zeigen Fibroblasten eine deutlich höhere Teilungsrate als SC. Dies hat zur Folge, dass sie bereits vor den SC aussprossen und dass durch Umsetzen der Nervenfaszikel in eine neue 6-Wellplatte die bereits ausgewanderten Fibroblasten in der alten Platte zurückbleiben. So kann ohne Zugabe von Antimitotika der Fibroblastenanteil in jeder weiteren Passage gesenkt werden. Außerdem ist zu beobachten, dass es bei der Inkubation der Nervenfaszikel in-vitro zur Waller'schen Degeneration kommt. Diese wirkt stimulierend auf die SC und damit ist eine Erhöhung der Zellzahl in-vitro begründet (Morrissey et al., 1991; Paul, 2003).

Die Nachteile dieser Methode liegen darin, dass bis zum Erhalt einer reinen SC-Kultur eine relativ lange Zeitspanne vergeht. Diese ergibt sich aus dem Warten bis sich ein konfluenter Monolayer aus Zellen gebildet hat und dem nachfolgenden Umsetzen der Nervenfaszikel in eine neue Platte. Im Durchschnitt ergab sich bei unseren Untersuchungen eine Kultivierungsdauer von 4-6 Wochen bis eine reine SC-Kultur vorhanden war. Durch die Methode der Prädegeneration für eine Woche und anschließende Dissoziation könnte die Zeitspanne verkürzt werden (Mauritz, 2005; Seef, 2009), jedoch fielen unsere Ergebnisse der Dissoziation im Verhältnis zum Umsetzen der Faszikelstücke und Auswachsen lassen in einer neuen Platte zahlenmäßig schlechter aus und deswegen wurde der zeitliche Aspekt erstmals hintenangestellt.

Fetales Nervengewebe (Lopez & De Vries, 1999), das in der SC-Forschung häufig verwendet wird, zeigt eine deutlich höhere Zellzahl und Proliferationsfähigkeit als adultes Gewebe. Außerdem besitzt es einen geringeren Anteil an Bindegewebe. Boyer et al. (1994) fanden heraus, dass der anfängliche Zellgehalt in Gewebe von Kindern ca. 2-3 mal größer ist als der in adultem Gewebe und dieses zeigte außerdem eine höhere Mitoserate und längere Lebensdauer in Kultur. Die Patienten und Patientinnen unserer Studie waren alle älter als 40 Jahre und z.T. multimorbid (siehe Kap. 3.2). Deswegen war der Bindegewebeanteil und damit verbunden der Anteil der Fibroblasten schon von Beginn an sehr hoch. Trotz exakter Präparation ließen sich die Nervenfaszikel nicht vollkommen von Fett- und Bindegewebsanteilen befreien, was sich negativ auf das Anheften der Faszikelstücke am Plattenboden, das Aussprossen der Zellen aus den Stücken und die SC-Proliferation auswirkte.

### **5.2 Wahl der Beschichtung**

Eine nicht unerhebliche Rolle bei der Kultivierung von SC spielt die Beschichtung der Kulturplatten. In der Literatur wurden u.a. Kollagen (Calderón-Martínez et al., 2002; Haastert et al., 2009), Laminin (Komiyama et al., 2003; Fansa et al., 2000) und Poly-L-Lysin (Hedayatpour et al., 2007; Levi, 1996) zur Beschichtung der Kulturplatten verwendet.

Die Beschichtung sollte gute adhäsive Eigenschaften haben und sich im besten Fall auch noch stimulierend auf die Proliferation der SC auswirken (Vleggeert-Lankamp et al., 2003). Wir entschieden uns für die Doppelbeschichtung der Kulturplatten mit Laminin und Poly-L-Ornithin (Mauritz, 2005). Laminin ist eine natürliche Komponente der Basallamina und nimmt eine wichtige Stellung bei der Aufrechterhaltung der normalen Schwann-Zell-Funktion im peripheren Nerven ein (Mirsky & Jessen, 1999). Es kommt in den regenerationsfähigen Anteilen des Nervensystems, wie dem proximalen Nervenstumpf und den spinalen Motoneuronen vor und spielt somit eine Rolle bei der axonalen Regeneration im PNS (Fansa & Keilhoff, 2003). Die Beschichtung der Kulturplatten mit Laminin fördert die Adhäsion der SC am Plattenboden und stimuliert die Proliferation der SC (Vleggeert-Lankamp et al., 2003). Poly-L-Ornithin ist eine künstlich hergestellte Polyaminosäure, die sich im Rattenmodell als geeignetes Kultivierungssubstrat gezeigt hat (Mauritz, 2005).

Auch Kollagen ist ein Adhäsionsmolekül der Extrazellulären Matrix, jedoch konnte in Studien keine proliferationsstimulierende Wirkung nachgewiesen werden (Vleggeert-Lankamp et al., 2003).

### **5.3 Wahl der Zusammensetzung des Mediums**

Die Wahl des richtigen Mediums spielt bei der Kultivierung von Zellen unterschiedlichster Herkunft eine große Rolle. Wir verglichen in unserer Studie zwei unterschiedliche Kulturmedien, die jedoch beide auf DMEM als Grundmedium beruhten. DMEM kam bereits in vielen Arbeiten über humane Schwann-Zellkulturen, aber auch bei der Kultivierung von Schwann-Zellen von

## 5. Diskussion

Nagetieren zum Einsatz (Hedayatpour et al., 2007; Morrissey et al., 1991; Bozkurt et al., 2009; Niapour et al., 2010; Keilhoff et al., 1999; Komiyama et al., 2003; Fansa et al., 2000). Es ist ein standardisiertes Nährmedium, welches sich vom Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ableitet, jedoch mehr Nährstoffe enthält. Für unsere Studien wurde DMEM mit einem hohen Anteil an Glucose verwendet.

Auch die Verwendung von serumfreien Melanozytenwachstumsmedium (MM) zur Kultivierung von SC wird in einigen Arbeiten in Betracht gezogen (Mauritz, 2005; Seef, 2009). Bei Inkubation der Faszikelstücke in MM konnte eine deutlich höhere Konzentration an SC bei den aussprossenden Zellen festgestellt werden als bei Inkubation in DMEM, jedoch war die Gesamtzellzahl in den meisten Fällen deutlich geringer als bei Inkubation in DMEM (Parotat, 2009).

Sowohl in Kulturmedium 1 als auch in Kulturmedium 2 verwendeten wir FBS. Der Einsatz von fetalem Serum wird aus ethischer und wissenschaftlicher Sicht kontrovers diskutiert. In Zell- und Gewebekulturen wird FBS gerne verwendet, da es Faktoren liefert, die die Zellhaftung, Wachstum und Proliferation fördern. Jedoch muss tierisches Serum als eine komplexe Mischung vieler unterschiedlicher Bestandteile (Tab. 7) angesehen werden, deren genaue Zusammensetzung und Konzentration undefinierbar ist. U.a. befinden sich darin Hormone und Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum und die Proliferation der Zellen stimulieren. Auch Transportproteine, die Hormone, Mineralien, Lipide und Spurenelemente befördern, sowie Faktoren, die für das physiologische Gleichgewicht (pH-Wert, osmotischer Druck,...) der Zelle notwendig sind, sind inkludiert (Brunner et al., 2010).

**Tabelle 7: Bestandteile, die in Seren vorkommen (Brunner et al., 2010)**

---

### **Bestandteile in Seren:**

Serumproteine	Albumin
	Globuline (z.B. Immunglobuline)
	$\alpha_1$ -Antitrypsin
	$\alpha_2$ -Makroglobulin
Transportproteine	Transferrin
	Transcortin

---

## 5. Diskussion

---

	$\alpha_1$ -Lipoprotein
	$\beta_1$ -Lipoprotein
Adhäsionsfaktoren	Fibronektin
	Laminin
Enzyme	Laktat-Dehydrogenase
	Alkalische Phosphatase
	ALT, AST
Hormone	Insulin
	Glukagon
	Kortikosteroide
	Vasopressin
	Schilddrüsenhormone
	Nebenschilddrüsenhormone
	Wachstumsfaktoren
	Hypophysenfaktor
	Prostaglandine
Wachstumsfaktoren und Zytokine	EGF, FGF, NGF, ECGF, PDGF, IGF
	Interleukine, Interferone
Fettsäuren und Lipide	Freie und gebundene Fettsäuren
	Triglyzeride
	Phospholipide
	Cholesterol
	Ethanolamine
Vitamine und Spurenelemente	Vitamine A, B, C, E
	Selen, Eisen, Zink,...
Kohlehydrate	Glukose
	Galaktose
	Fruktose
	Mannose
	Ribose
Stickstoffe	Harnstoff
	Purin/Pyrimidin
	Polyamine

---

---

Kreatinin

Aminosäuren

---

Die Entscheidung für geeignete Mitogene erfolgte nach ergiebiger Literaturrecherche. Über eine Erhöhung des cAMP-Levels kann eine proliferationsfördernde Wirkung auf SC erreicht werden (Rahmatullah et al., 1998). Im Gegensatz dazu hat eine erhöhte cAMP-Konzentration eine inhibierende Wirkung auf humane Fibroblasten, wodurch eine Überwucherung der SC-Kulturen mit Fibroblasten auch über längere Zeit verhindert werden kann (Mauritz, 2005). Zu einem intrazellulärem Anstieg der cAMP führt einerseits Forskolin, das die Adenylatzyklase stimuliert und auch IBMX, welches die Phosphodiesterase blockiert und damit den Umbau von cAMP zu 5'AMP verhindert. Auch Insulin soll eine proliferationsfördernde Wirkung auf SC haben. In Kombination mit cAMP-steigernden Substanzen konnte der stimulierende Effekt auf Proliferation und Differenzierung von Ratten-SC bereits nachgewiesen werden (Hanemann et al., 1998). Eine sehr starke mitogene Wirkung auf humane SC wird auch den Neuregulinen nachgesagt. Dazu zählt auch das Polypeptid Heregulin. Neureguline, die im peripheren Nervensystem vorkommen, nehmen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und dem Überleben der SC ein (Mauritz, 2005). Nach Rahmatullah et al. (1998) haben Heregulin und cAMP-steigernde Substanzen einen synergistischen Effekt, wodurch die Teilungsaktivität der SC potenziert werden kann. In unseren eigenen Versuchen kamen wir zu dem Erkenntnis, dass in Kulturen, in deren Nährmedium sowohl Forskolin und IBMX als auch Heregulin zugesetzt waren (Kulturmedium 2), der Anteil an SC zwar relativ hoch war, jedoch lag die Gesamtzellzahl unter den erhofften Ergebnissen, die für eine effiziente Kultivierung von SC notwendig wären.

Der Einsatz von Mitogenen ist jedoch umstritten. In Studien wurde festgestellt, dass die Langzeitgabe von Forskolin und Heregulin zu einer Immortalisierung von Ratten-SC führt. Die Transplantation dieser Zellen in Nerven von Ratten führte zu Tumorwachstum. Jedoch konnte bei der Xenotransplantation von humanen mitogenstimulierten SC in immunsupprimierte Ratten und Mäuse kein erhöhtes Malignitätspotential registriert werden (Emery et al., 1999).

### **5.4 Charakterisierung der Schwann-Zellen anhand spezifischer Markerproteine**

Bereits durch die Morphologie der Zellen im Mikroskop ließen sich SC und Fibroblasten voneinander unterscheiden und eine grobe Abschätzung der Reinheit der Kulturen konnte abgegeben werden. Humane SC zeigen ein spindelförmiges, bi- oder tripolares Erscheinungsbild, Fibroblasten hingegen erscheinen eher flächenhaft und polymorph (Vroemen & Weidner, 2003; Honkanen et al., 2007).

In der Literatur wird der immunhistochemische Nachweis von SC meist mittels Antikörper gegen S100 (Morrissey et al., 1991; Rutkowski et al., 1995; Calderón-Martínez et al., 2002) und p75 (Vroemen & Weidner, 2003) beschrieben. Das kalziumbindende S100-Protein, das sowohl von myelinisierenden als auch von nicht-myelinisierenden SC exprimiert wird (Gonzalez-Martinez et al., 2003), ist ein intrazellulärer SC-Marker (Haastert et al., 2006). P75 hingegen ist ein Rezeptor für NGF, der an der Zelloberfläche sitzt (Haastert et al., 2006), und von SC während der Entwicklung und von reifen nicht-myelinisierenden SC exprimiert wird. Bei Verletzungen peripherer Nerven kommt es jedoch zu einer Hochregulierung von p75 (Gmerek, 2004). Mauritz (2005) stellte bei Doppelmarkierung der SC-Kulturen mit S100 und p75 fest, dass ca. 4% der S100 positiven Zellen nicht p75 positiv waren. Sie führte die Diskrepanz darauf zurück, dass p75 in Kulturen erst nach vorangegangenen Redifferenzierungsprozessen exprimiert wird. Li et al. (1998) konnten hingegen keine Unterschiede bei der Doppelmarkierung mit S100 und p75 feststellen.

Aufgrund der besseren Etablierung von S100 auf humane SC, entschieden wir uns für diese Methode und konnten damit gute Ergebnisse erzielen. Ab der 3. Passage konnte mit S100 eine 80-95%ige Reinheit der Kulturen nachgewiesen werden.

### **5.5 Purifikation adulter SC-Kulturen**

Für die Entwicklung von Nervenconduits ist eine möglichst reine SC-Kultur nötig, da ein großer Anteil an Fibroblasten den Regenerationsprozess durch

## 5. Diskussion

Narbenbildung u.ä. verhindern würde (Calderón-Martínez et al., 2002). Bei der von uns gewählten Methode konnten nach der 3.-4. Passage Kulturen mit einem hohen Reinheitsgehalt gewonnen werden. Diese Ergebnisse waren für uns akzeptabel, da wir mehr Wert auf die Reinheit der Kulturen legten als auf den zeitlichen Aspekt. In weiterführenden Untersuchungen sollte aber auch die Kultivierungsdauer verkürzt werden, wofür – um eine annehmbare Reinheit der Kulturen zu erhalten – Purifikationsschritte notwendig sein werden. In der Literatur werden zahlreiche Strategien zur Aufreinigung der Kulturen beschrieben:

1. Antimitotika, die das Fibroblastenwachstum hemmen (Calderón-Martínez et al., 2002)
2. Immunopanning (Dong et al., 1997)
3. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) (Spiegel & Peles, 2009)
4. Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) (Manent et al., 2003)
5. Cold Jet (Jirsová et al., 1997)

Zu den am häufigsten verwendeten Antimitotika zählen Arabinosyl-Cytosin (Ara-C) und 5-Fluoruracil. Sie hemmen die Zellteilung und eliminieren daher v.a. schnell proliferierende Zellen wie Fibroblasten. Durch häufige Anwendung von Ara-C konnte jedoch auch ein zytotoxischer Effekt auf adulte humane SC nachgewiesen werden (Calderón-Martínez et al., 2002).

Sowohl Immunopanning als auch FACS und MACS funktionieren über einen Mechanismus, bei dem die Zielzellpopulation, in unserem Fall Schwann'sche Zellen, an einen Oberflächenmarker binden. Beim Immunopanning muss eine Kulturplatte mit einem Sekundär- und anschließend mit einem Primärantikörper vorbeschichtet werden. Danach werden die kultivierten und zu trennenden Zellen auf die Kulturplatte aufgebracht und abgewartet, bis sich die Zielzellpopulation an die Antikörper anhaftet. Die unerwünschten Zellen können danach einfach abgespült werden. Dong et. al (1997) konnten mit dieser Methode bei juvenilen und adulten SC Reinheitsgrade von 96-99% erreichen.

Die FACS ist eine Art der Durchflusszytometrie (Abb. 22). Dabei werden die Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert und durch einen Lichtstrahl geschickt, damit sie zur Fluoreszenz angeregt werden. Ein Computer wertet das reflektierte Licht aus. Zellen mit bzw. ohne Fluoreszenz und Zellen, die dem Lichtstrahl entgangen sind, werden dann mit unterschiedlichen Ladungen bzw.

## 5. Diskussion

keiner Ladung belegt. Durch ein magnetisches Feld werden die Zellen dann in drei unterschiedliche Behälter sortiert (positive Ladung, negative Ladung und keine Ladung).

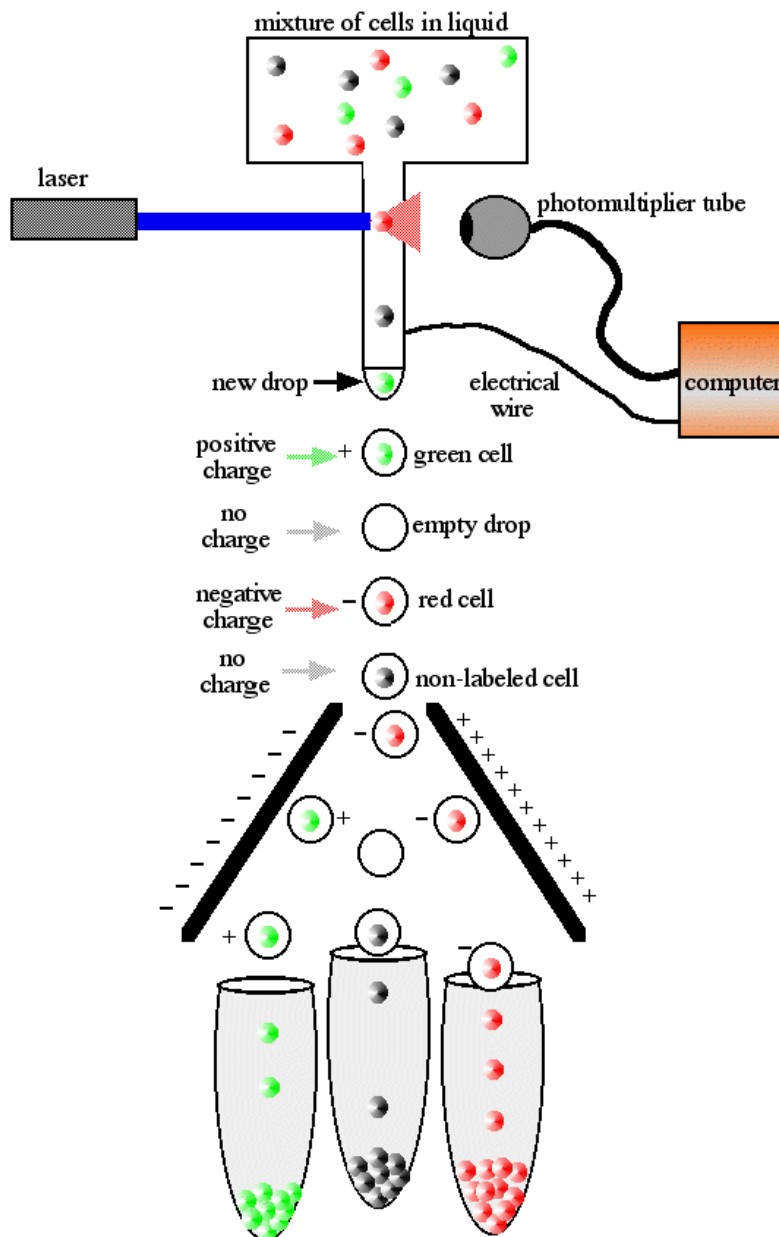


Abbildung 23: Mechanismus der FACS (Campbell, 2001).

Bei der MACS werden die Zellen mit „magnetic beads“ beladen, die an die Zielzellpopulation binden. Die Zellsuspension wird anschließend durch eine magnetische Trennsäule geschickt. Die gewünschten Zellen bleiben daran haften (positive selection), unerwünschte Zellen können ausgespült werden. Um die volle Effizienz dieser Methode auszuschöpfen, müssen aber meist mehrere Aufreinigungszyklen durchgeführt werden. Manent et. al (2003) konnten im ersten

## 5. Diskussion

Aufreinigungszyklus bereits einen Reinheitsgrad von 96,5% erreichen, im 2.Zyklus konnte die Reinheit auf 99,1% erhöht werden.

Die drei letztgenannten Methoden sind relativ zeitaufwendig und bei der FACS und MACS sind auch noch entsprechende Apparaturen notwendig. Eine deutliche einfachere Vorgehensweise stellt das Cold jet-Verfahren dar. Die Methode basiert auf der unterschiedlichen Reaktion von SC und Fibroblasten auf einen Kälteschock (Jirsová et al., 1997). Die Kulturplatten werden mit kaltem PBS oder Medium (4°C) gespült. Daraufhin lösen sich die SC von der Kulturplatte ab, wohingegen der Großteil der Fibroblasten haften bleibt. Jirsová et al. (1997) konnten damit höchst zufriedenstellende Ergebnisse erzielen. Nach einmaliger Durchführung des Cold jet-Verfahrens konnte ein Reinheitsgehalt von 95% erzielt werden, nach einem weiteren Zyklus erhöhte sich der Reinheitsgehalt auf 98-100%.

### **5.6 Schlussfolgerung und Zukunftsaussichten**

Abschließend lassen sich für alle im Rahmen dieser Diplomarbeit untersuchten Aspekte Teilerfolge feststellen. Es ist uns gelungen auch aus sehr kleinen Nervenbiopsien eine ausreichend große SC-Kultur mit hohem Reinheitsgrad zu erhalten. Der Reinheitsgehalt nahm bei jeder Passage zu, ohne das Purifikationsverfahren zur Anwendung kamen. Die Kultivierungsdauer könnte aber durch vorangehende Reinigungsschritte deutlich verkürzt und die Zellzahl erhöht werden. Weiters sollte in nachfolgenden Untersuchungen an der Modifikation des Dissoziationsprotokolls gearbeitet werden, um eine größere Ausbeute an vitalen SC zu erhalten. Dies würde sich auch positiv auf die Kultivierungsdauer auswirken.

Erfolge im Bereich der Forschung an SC-Kultivierung sind notwendig, um die Herstellung von artifiziellen Nerventransplantaten im Rahmen des Tissue Engineering voranzutreiben. Aspekte wie Zellzahl, benötigte Kultivierungsdauer und Reinheit der SC-Kulturen spielen dabei eine große Rolle. In der Literatur werden für das Beladen von artifiziellen Nerventransplantaten benötigte Zellmengen um ca.  $5 \times 10^5$  Schwannzellen/ml angegeben (Hadlock et al., 2000). Auf die Reinheit von SC-Kulturen ist deswegen ein großer Wert zu legen, da eine

## 5. Diskussion

Verunreinigung mit Fibroblasten den regenerativen Effekt der SC vermindern würde (Calderón-Martínez et al., 2002). Der zeitliche Aspekt ist insofern von Bedeutung, dass die Wiederherstellung der Funktion eines denervierten Muskels nur dann möglich ist, wenn Atrophie und Degeneration des Muskels noch nicht zu weit fortgeschritten sind. Die maximal tolerierbare Zeitspanne vom Zeitpunkt der Nervenverletzung bis zur Wiederherstellung der Funktion wird beim Menschen mit 18 Monaten angegeben (Seef, 2009).

Derzeit ist die Methode der Wahl zur chirurgischen Sanierung von Nervenläsionen, bei denen die Stümpfe nicht direkt spannungsfrei koaptiert werden können, die autologe Nerven transplantation (Evans, 2001; Lohmeyer et al., 2007). Diese ist aber auch mit Komplikationen verbunden. Einerseits stehen autologe Spendernerven nur in begrenztem Ausmaß zur Verfügung und andererseits ist mit neurologischen Ausfällen wie Sensibilitätsstörungen bishin zur Neuombildung am Entnahmeort zu rechnen (Evans, 2000; Fansa & Keilhoff, 2003). Diese Komplikationen könnten durch in vivo-Implantation eines künstlichen Nervenkonstruktes, bestehend aus einem Gerüst und darin verankerten Zellen, verhindert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Anselin, A.D., Corbeil, S.D. & Davey, D.F., 1998. Successfully culturing Schwann cells from adult peripheral nerve. *Acta Chirurgica Austriaca*, pp.15-19.

Beck, C., 2005. Untersuchungen zur neurogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen gewonnen aus dem Knochenmark und aus trabekulären Knochenfragmenten. [Inaugural-Dissertation] Würzburg, Deutschland.

Berger, A. & Hierner, R., 2003. *Plastische Chirurgie - Grundlagen, Prinzipien, Techniken*. 1st ed. Berlin, Deutschland: Springer-Verlag.

Berger, A., Hierner, R., Rohde, U. & Shen, Z.-L., 1999. Diagnostik und Therapie peripherer Nervenverletzungen - Das "intergrative Therapiekonzept". *Unfallchirurg*, pp.59-68.

Boyer, P. et al., 1994. Sources of human Schwann cells and the influence of donor age. *Experimental Neurology*, pp.53-55.

Bozkurt, A. et al., 2009. In vitro cell alignment obtained with a schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels. *Biomaterials*, pp.169-79.

Brunner, D. et al., 2010. Serum-free cell cultures: The serum-free media interactive online database. *Altex*, pp.53-62.

Bucher, O. & Wartenberg, H., 1997. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12th ed. Bern, Schweiz: Hans Huber Verlag.

Calderón-Martínez, D., Garavito, Z., Spinel, C. & Hurtado, H., 2002. Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *Journal of Neuroscience Methods*, pp.1-8.

Campbell, M., 2001. Department of Biology, Davidson College. [Online] Available at: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/FACS.html> [Accessed Dezember 2010].

Casella, G., Bunge, R. & Wood, P., 1996. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia*, pp.327-38.

Chalfoun, C.T., Wirth, G.A. & Evans, G.R.D., 2006. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *J. Cell. Mol. Med.*, pp.309-17.

De Ruiter, G. et al., 2009. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus*, pp.1-9.

Diebold, R., 2007. Untersuchungen zur Haploinsuffizienz im Neurofibromatose Typ 2 Gen. [Dissertation] Ulm, Deutschland.

Dong, Z. et al., 1997. Response of Schwann Cells to Mitogens In Vitro Is Determined by Pre-exposure to Serum, Time In Vitro, and Developmental Age. *Glia*, pp.219-30.

Dornseifer, U. et al., 2007. Surgical therapy of peripheral nerve lesions: current status and new perspectives. *Zentralblatt Neurochirurgie* , pp.101-10.

Emery, E. et al., 1999. Assessment of the malignant potential of mitogen stimulated human Schwann cells. *Journal of peripheral nervous system*, pp.107-16.

Evans, G.R.D., 2000. Challenges to nerve regeneration. *Seminars in Surgical Oncology* , pp.312-18.

Evans, G.R.D., 2001. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *The Anatomical Record* , pp.396-404.

Fansa, H. & Keilhoff, G., 2003. Faktoren, die die Regeneration peripherer Nerven beeinflussen. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie* , pp.72-82.

Fansa, H., Keilhoff, G., Wolf, G. & Schneider, W., 2000. Die Kultivierung humaner Schwannscher Zellen für das Tissue Engineering peripherer Nerven. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie*, pp.181-86.

Fine, E. et al., 2002. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *European Journal of Neuroscience*, pp.589-601.

Gmerek, A., 2004. Etablierung eines durch Verletzung induzierbaren Promotors. [Dissertation] Bochum, Deutschland.

Gonzalez-Martinez, T., Perez-Piñera, P., Díaz-Esnal, B. & Vega, J.A., 2003. S-100 protein in the human peripheral nervous system. *Microscopy Research and Technique*, pp.633-38.

Haastert, K., Mauritz, C., Matthies, C. & Grothe, C., 2006. Autologous adult human Schwann cells genetically modified to provide alternative cellular transplants in peripheral nerve regeneration. *Journal of Neurosurgery*, pp.778-86.

Haastert, K. et al., 2009. A new cell culture protocol for enrichment and genetic modification of adult canine Schwann cells suitable for peripheral nerve tissue engineering. *Research in Veterinary Science*, pp.140-42.

Hadlock, T. et al., 2000. A Polymer Foam Conduit Seeded with Schwann Cells Promotes Guided Peripheral Nerve Regeneration. *Tissue Engineering*, pp.119-27.

Hamacher, M., 2002. Molekularbiologische Untersuchungen am Tetraspan Molekül Plasmolipin. [Inaugural-Dissertation] Düsseldorf, Deutschland.

Hanemann, O. et al., 1998. Improved Culture Methods to Expand Schwann Cells With Altered Growth Behaviour From CMT1A Patients. *Glia*, pp.89-98.

Hedayatpour, A. et al., 2007. A methode for isolation and cultivation of adult Schwann cells for nerve conduit. *Archives of Iranian Medicine*, pp.474-80.

Honkanen, H. et al., 2007. Isolation, purification and expansion of myelination-competent, neonatal mouse Schwann cells. *European Journal of Neuroscience*, pp.953-64.

Huber, A., 2002. *Gentherapeutischer Ansatz bei der peripheren Nervenregeneration*. [Inaugural-Dissertation] München, Deutschland.

Ijkema-Paasen, J., Jansen, K., Gramsbergen, A. & Meek, M.F., 2004. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*, pp.1583-92.

Imbschweiler, I., 2009. *In vitro und in situ Charakterisierung einer Schwann-Zell-ähnlichen Makroglia population im Gehirn des Hundes*. [Inaugural-Dissertation] Hannover, Deutschland.

Jens, F., 2008. Wikipedia. [Online] Available at: [http://de.wikibooks.org/wiki/Datei:EvG\\_nerve\\_and\\_neuroma.jpg](http://de.wikibooks.org/wiki/Datei:EvG_nerve_and_neuroma.jpg) [Accessed November 2010].

Jirsová, K., Soodaar, P., Mandys, V. & Bär, P.R., 1997. Cold jet: a method to obtain pure Schwann cell cultures without the need for cytotoxic, apoptosis-inducing drug treatment. *Journal of neuroscience methods*, pp.133-37.

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J., 2005. *Histologie*. 6th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Keilhoff, G., Fansa, H., Schneider, W. & Wolf, G., 1999. In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduit. *Journal of Neuroscience Methods*, pp.17-24.

Keilhoff, G. et al., 2006. Peripheral nerve tissue engineering: autologous schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, pp.1451-65.

Keilhoff, G., Prätisch, F., Wolf, G. & Hisham, F., 2005. Bridging extra large defects of peripheral nerves: possibilities and limitations of alternative biological grafts from acellular muscle and schwann cells. *Tissue Engineering*, pp.1004-14.

Komiyama, T. et al., 2003. A novel technique to isolate adult Schwann cells for an artificial nerve conduit. *Journal of Neuroscience Methods*, pp.195-200.

Lengerke, J., 2007. Wikipedia. [Online] Available at:  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Neurapraxie> [Accessed November 2010].

Levi, A., 1996. Characterization of the technique involved in isolating Schwann cells from adult human peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*, pp.21-26.

Lohmeyer, J. et al., 2007. Überbrückung peripherer Nervendefekte durch den Einsatz von Nervenröhrchen. *Der Chirurg*, pp.142-47.

Lopez, T.J. & De Vries, G.H., 1999. Isolation and serum-free culture of primary Schwann cells from human fetal peripheral nerve. *Experimental Neurology*, pp.1-8.

Lüllmann-Rauch, R., 2009. *Histologie*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Lundborg, N., 2004. Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie*, pp.1-7.

Mailänder, P. & Zimmermann, S., 2005. Die operative Therapie von Läsionen peripherer Nerven. *Zentralblatt Chirurgie*, pp.W2-W8.

Manent, J. et al., 2003. Magnetic cell sorting for enriched Schwann cells from adult mouse peripheral nerves. *Journal of neuroscience methods*, pp.167-73.

Mauritz, C., 2005. Etablierung der Isolierung, selektiven Anreicherung und Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen. [Inaugural-Dissertation] Hannover, Deutschland.

Mirsky, R. & Jessen, K., 1999. The Neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathology*, pp.293-311.

Mirsky, R. et al., 2008. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, pp.122-35.

Morrissey, T., Kleitman, N. & Bunge, R., 1991. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *The Journal of Neuroscience*, August. pp.2433-42.

Mumenthaler, M., Stöhr, M. & Müller-Vahl, H., 2007. *Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome*. 9th ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag.

Niapour, A. et al., 2010. Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells. *Biotechnology Letters*, pp.781-86.

Nikkhah, G., Carvalho, G.A. & Samii, M., 1997. Nerventransfer (Neurotisation) zur funktionellen Wiederherstellung von Armfunktionen bei zervikalen Wurzelaustrissen. *Der Orthopäde*, pp.606-11.

Parotat, A., 2009. Effektive Kultivierung caniner Schwannzellen unter Einsatz von VEGF und FGF-2 zur Rekonstruktion peripherer Nervenverletzungen. [Inaugural-Dissertation] Berlin, Deutschland.

Pausl, J., 2003. In-vitro Kultivierung und Expansion caniner Schwann-Zellen. [Inaugural-Dissertation] Berlin, Deutschland.

Penkert, G., 1999. *Chirurgie der Nervenverletzungen Teil I*. *Der Chirurg*, pp.959-67.

Poeck, K. & Hacke, W., 2006. *Neurologie*. 12th ed. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag.

Rahmatullah, M. et al., 1998. Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin. *Molecular and Cellular Biology*, pp.6245-52.

Rutkowski, L., Kirk, C., Lerner, M. & Tennekoon, G., 1995. Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nature Medicine*, pp.80-83.

Sadler, T.W., 2003. Medizinische Embryologie - Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 10th ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag.

Schiebler, T.H., 2005. Anatomie. 9th ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

Schmidt, C. & Baier Leach, J., 2003. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed Eng.*, pp.293-347.

Schmitte, R., 2009. In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen therapeutischer Konzepte zur Förderung der anatomischen und funktionellen Regeneration über große Defektstrecken im Nervus ischiadicus der adulten Ratte. [Inaugural-Dissertation] Hannover, Deutschland.

Scholz, T. et al., 2009. Peripheral nerve injuries: An international survey of current treatments and future perspectives. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, pp.339-44.

Schroeder, H., 2008. Universitätsklinikum Greifswald. [Online] Available at: [http://www.medizin.uni-greifswald.de/neuro\\_ch/index.php?id=442](http://www.medizin.uni-greifswald.de/neuro_ch/index.php?id=442) [Accessed November 2010].

Seef, P., 2009. Genetische Modifikation von Schwann-Zellen der Ratte und des Hundes - in-vitro-Charakterisierung und funktionelle und histologische Untersuchung nach Transplantation im Regenerationsmodell des Nervus ischiadicus der adulten Ratte. [Inaugural-Dissertation] Hannover, Deutschland.

Sinis, N. et al., 2009. Nervenrekonstruktion und Nervenersatzoperation. *Der Chirurg*, pp.875-82.

Sinis, N. et al., 2006. Tissue Engineering peripherer Nerven. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie*, pp.378-89.

Spiegel, I. & Peles, E., 2009. A Novel Method for Isolating Schwann Cells Using the Extracellular Domain of Necl1. *Journal of neuroscience research*, p.3288–3296.

Trepel, M., 2004. Neuroanatomie - Struktur und Funktion. München: Urban & Fischer Verlag. pp.1-19.

Tscherne, H., Nerlich, M. & Berger, A., 2003. Unfallchirurgie - Weichteilverletzungen und -infektionen. 1st ed. Berlin, Deutschland: Springer-Verlag.

Vleggeert-Lankamp, C.L. et al., 2003. Adhesion and proliferation of human Schwann cells on adhesive coatings. Biomaterials, pp.2741-51.

Vroemen, M. & Weidner, N., 2003. Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. Journal of neuroscience methods, pp.135-43.

Wachtler, F., 2005. Histologie. 7th ed. Wien, Österreich: Facultas Universitätsverlag.

Wiedenbeck, D. & Berninger, J., 2007. Periphere Nervenläsion. [Seminarbericht] Aschersleben, Deutschland.

## 7 Anhang – Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

---

Name	Kathrin Geier
Anschrift	Steyrergasse 45 A – 8010 Graz
Geboren am	10. Juni 1985
Geburtsort	Rottenmann
Nationalität	Österreich
E-Mail	<a href="mailto:kathrin.geier@stud.medunigraz.at">kathrin.geier@stud.medunigraz.at</a>

### Schulbildung

---

1995 – 2003	Stiftsgymnasium Admont, Abschluss: Matura mit Ausgezeichnetem Erfolg
1991 – 1995	Volksschule I Admont

### Studium

---

2003-2011	Diplomstudium Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz
Studienkennzahl	O202
Februar 2005	Abschluss des ersten Studienabschnittes Humanmedizin
Mai 2010	Abschluss des zweiten Studienabschnittes Humanmedizin mit erfolgreich abgeschlossener OSKE-Prüfung
Mai 2010-März 2011	Klinisches Praxisjahr: Allgemeinmedizin (Dr. Friedrich M. Pötsch/Dobl), Unfallchirurgie (Universitätsklinik für Unfallchirurgie Graz), Innere Medizin (Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Graz Marschallgasse), Gynäkologie (Klinikum Passau/Deutschland)

### Vertiefte Ausbildung

---

WS 2005	Klinisch topographische Anatomie der Extremitäten
WS 2006	Individualmedizin und Gesundheitsplanung

SS 2007	Wissenschaftlich fundierte Krankheitsprävention
WS 2007	Case-based Learning in Klinik und Praxis
WS 2007	Gesundheitsökonomie und Kinder- und Jugendgesundheit

### **Famulaturen**

---

September 2009	Famulatur an der Universitätsklinik für Orthopädie Graz
August 2009	Famulatur an der Unfallchirurgischen Abteilung des UKH Kalwang
September 2008	Famulatur an der Internistischen Abteilung des LKH Rottenmann
Juli 2007	Famulatur an der Universitätsklinik für Neurologie Graz
Jänner 2007	Famulatur an der Gynäkologischen Abteilung des LKH Rottenmann
Juli 2006	Famulatur an der Chirurgischen Abteilung des LKH Rottenmann

### **Besondere Kenntnisse**

---

Sprachen	Englisch (fließend in Wort und Schrift) Italienisch (Grundlagen) Französisch (Grundlagen)
PC-Kenntnisse	MS – Office
Sonstiges	Büro- und Laborkenntnisse