

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Busse -
Abteilung für experimentelle Ophthalmologie
- Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos -**

**Die Revaskularisierung peripherer Nerven-
transplantate
am *Nervus opticus***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Höhl, Leonie

aus Herdecke (Ruhr)

2006

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichtstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos

2. Berichtstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. L. Figgner

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Busse -
Abteilung für experimentelle Ophthalmologie
- Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos -
- Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos -
- Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. L. Figgenger -

ZUSAMMENFASSUNG

Die Revaskularisierung peripherer Nerventransplantate am *Nervus opticus*

Höhl, Leonie

Die Fähigkeit eines peripheren Nerventransplantats die Regeneration durchtrennter Axone des zentralen Nervensystems zu ermöglichen, ist abhängig von der Vitalität der Schwann-Zellen. Die Revaskularisierung des Transplantats ist aufgrund der nutritiven Funktion für die Schwann-Zellen ein kritischer Parameter für eine mögliche Regeneration, weil diese Zellen nach einer Axotomie nur wenige Tage über den Mechanismus der Diffusion ernährt werden können.

In der vorliegenden Studie wurden folgende Aspekte untersucht: 1) Die Revaskularisierung peripherer Ischiadicustransplantate am *Nervus opticus*. 2) Der Zusammenhang zwischen der Revaskularisierung und der Regeneration der Axone retinaler Ganglienzellen. 3) Die nach einer Transplantation auftretende Reaktion der Schwann-Zellen und der Makrophagen. Alle Experimente wurden am Sehnerv der Ratte durchgeführt.

Zur Bearbeitung der Frage wurden an den *Nervus opticus* transplantierte, autologe Ischiadicussegmente zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen dem ersten und 84. Tag nach der Transplantation) wieder entnommen und die angefertigten Kryostatschnitte mithilfe der indirekten Immunhistochemie mit spezifischen Antikörpern angefärbt.

Die Ergebnisse zeigen: 1) Eine beginnende Revaskularisierung ab dem dritten Tag nach der Transplantation. Die Gefäßdichte entspricht nach etwa sieben Tagen der eines normalen Nervs. 2) Eine zeitlich verzögerte Regeneration zentraler Axone, die ab dem siebten Tag zwar detektierbar, jedoch erst ab dem 15. Tag eindeutig sichtbar ist. 3) Eine relative Stabilität der Schwann-Zellen sowie eine Makrophagenreaktion, die zwischen dem dritten und siebten Tag beginnt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die der Regeneration vorausgehende Revaskularisierung der Transplantate Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration ist. Die Vitalität der Schwann-Zellen und die Debrisentfernung durch die Makrophagen sind weitere wichtige Parameter, welche die Regeneration beeinflussen. Nur durch das komplexe Zusammenwirken aller Faktoren wird die Möglichkeit einer Regeneration eröffnet.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2006

Tierversuchsgenehmigung: Bezirksregierung Münster, 26.5.2000, Aktenzeichen 23.0835.1.0 (G73/99)

Für meine Eltern und Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | GRUNDLAGEN DER REGENERATION IM ZENTRALEN UND PERIPHEREN NERVENSYSTEM UND DIE ANWENDUNG PERIPHERER NERVENTRANSPLANTATE | 1 |
| 1.2 | ZIELE DER ARBEIT | 6 |
| 1.3 | GEFÄßVERSORGUNG PERIPHERER NERVEN | 7 |
| 2 | Material und Methoden | 8 |
| 2.1 | OPERATIONSMETHODEN | 8 |
| 2.1.1 | Erste Operation | 9 |
| 2.1.2 | Gewebsentnahme | 10 |
| 2.1.3 | Weiterer Ablauf | 11 |
| 2.1.4 | Intrakardiale Tintenperfusion | 11 |
| 2.2 | PARAFFINEINBETTUNG | 12 |
| 2.3 | HE-FÄRBUNG | 13 |
| 2.3.1 | Verwendete Lösungen | 14 |
| 2.4 | IMMUNHISTOCHEMIE | 15 |
| 2.4.1 | Verfahren | 15 |
| 2.4.2 | Materialien für die Immunhistochemie | 16 |
| 2.4.3 | Verwendete Antikörper | 18 |
| 3 | Ergebnisse | 19 |
| 3.1 | REVASKULARISIERUNG DER TRANSPLANTATE | 19 |
| 3.1.1 | Von Willebrand Faktor (vWF) | 19 |
| 3.1.2 | Endothelin | 23 |
| 3.1.3 | Tintenperfusion und HE-Färbung | 26 |
| 3.2 | REGENERIERENDE AXONE | 30 |
| 3.2.1 | <i>Growth-associated protein-43</i> (GAP- 43) | 30 |
| 3.3 | SCHWANN-ZELLEN | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1 Galactocerebrosid | 33 |
| 3.3.2 S-100..... | 36 |
| 3.4 MAKROPHAGEN..... | 39 |
| 3.4.1 ED-1 | 39 |
| 4 DISKUSSION..... | 42 |
| 4.1 REVASKULARISIERUNG VON TRANSPLANTATEN | 44 |
| 4.2 REGENERATION DER AXONE..... | 49 |
| 4.3 SCHWANN-ZELLEN | 50 |
| 4.4 MAKROPHAGEN..... | 51 |
| 4.5 ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG | 53 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 56 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS | 58 |
| 7 DANKSAGUNG..... | 66 |
| 8 LEBENS LAUF | 67 |
| 9 ANHANG | I |
| 9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | I |
| 9.2 GENEHMIGUNGSBESCHEID ZUR DURCHFÜHRUNG VON TIERVERSUCHEN..... | II |

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen der Regeneration im zentralen und peripheren Nervensystem und die Anwendung peripherer Nerventransplantate

Die Fähigkeit zur spontanen Nervenregeneration nach einer Verletzung ist bei Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) von adulten Säugetieren sowie bei Vögeln limitiert. Es besteht keine Möglichkeit für eine Regeneration mit vollständiger funktioneller Reparatur (Ramon y Cajal, 1928, Bray *et al.*, 1987). Demzufolge ist eine Nervenverletzung bzw. Nervendurchtrennung im ZNS dauerhaft und irreversibel. Für den Sehnerv (*Nervus opticus*) als Teil des ZNS ist dies von herausragender Bedeutung, da mit der Verletzung bzw. Durchtrennung der retinalen Ganglienzellaxone und deren darauffolgender retrograder Degeneration die irreversible Erblindung eintritt. Besondere Risiken für eine Verletzung wie die Durchtrennung von Axonen oder deren Quetschung bestehen insbesondere bei Traumata im Kopfbereich, bei Tumoren, bei bakteriellen und viralen Infektionen sowie bei Glaukomen (Heiduschka & Thanos, 2000).

Im Gegensatz zum ZNS behalten die Neurone des peripheren Nervensystems (PNS) auch nach Wachstumsabschluss die Fähigkeit zur spontanen Regeneration nach einer Verletzung bei (Politis & Spencer, 1986). Diese Tatsache gab den Anlass für die Verwendung peripherer Nerventransplantate im Bereich durchtrennter Nerven des ZNS. Diverse, meist an Ratten durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass sowohl die Axone retinaler Ganglienzellen (RGZ) als auch die Axone anderer Teile des ZNS wie z.B. des Rückenmarks mithilfe peripherer Nerventransplantate regenerieren können (David & Aguayo, 1981; Richardson *et al.*, 1980; Politis & Spencer, 1986).

Dies zeigt, dass die von Cajal bereits 1928 aufgestellte Hypothese, das Misslingen der Nervenregeneration im ZNS sei nicht auf die intrinsische

Unfähigkeit der Neurone zur Regeneration, sondern auf hemmende Umgebungseinflüsse zurückzuführen (Ramon y Cajal, 1928), zumindest teilweise richtig ist. Die Tatsache, dass die Verwendung eines peripheren Nerven-Transplantats die Regeneration retinaler Ganglienzellaxone ermöglicht, zeigt, welchen entscheidenden Einfluss eine regenerationspermissive Umgebung auf die Axone des ZNS hat.

Als inhibitorische Faktoren der Regeneration nach einer Axotomie wurden unter anderem Oligodendrozyten und das Myelin des ZNS als Produkt jener Oligodendrozyten identifiziert (Caroni *et al.*, 1988; Weibel *et al.*, 1994). Der hemmende Einfluss wird hierbei vor allem durch membrangebundene Proteine des Myelins vermittelt (Caroni *et al.*, 1988). Zwei weitere Proteine, *myelin-associated glycoprotein* (MAG) und Nogo-A, ein mit dem endoplasmatischen Reticulum assoziiertes Protein, konnten ebenfalls als myelin-assoziierte, inhibitorische Komponenten des ZNS identifiziert werden (McKerracher *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; GrandPré *et al.*, 2000).

Die Möglichkeit der partiellen Neutralisierung dieser regenerationshemmenden Einflüsse z.B. durch den monoklonalen Antikörper IN-1, der gegen inhibitorische, oligodendrozyten- und myelin-assoziierte Proteine gerichtet ist, sowie durch neurotrophe Faktoren wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und *fibroblast growth factor* (FGF) konnte experimentell nachgewiesen werden (Weibel *et al.*, 1994).

Ein weiterer Faktor im ZNS, der die Regeneration negativ beeinflusst, ist die verminderte Aktivität der Makrophagen. Diese Zellen phagozytieren den zellulären Debris während der nach einer Verletzung stattfindenden Aktivierung der Immunabwehr. Zudem sind sie für das „Lipidrecycling“ verantwortlich und sezernieren außerdem ein weites Spektrum von Zytokinen, welche trophische, mitogene und chemotaktische Fähigkeiten besitzen (Lotan & Schwartz, 1994).

Makrophagen spielen mithin eine entscheidende Rolle während der Heilungsprozesse nach Nervenverletzungen. Durch die mangelnde Aktivität dieser Zellen im ZNS wird der Myelindebris nur verlangsamt abgebaut (Lazarov-Spiegler *et al.*, 1998).

Lazarov-Spiegler *et al.* (1996) zeigten, dass bei der Verwendung von Makrophagen, die zuvor durch periphere Nerven stimuliert wurden, der Myelinabbau verstärkt und damit eine Regeneration erleichtert wird.

Notwendige Voraussetzung für eine potentielle Regeneration ist jedoch primär das Überleben der RGZ nach einer Axotomie. Die Anzahl der überlebenden retinalen Ganglienzellen hängt dabei von mehreren Faktoren ab:

Ein entscheidender Faktor ist die Lokalisation der Verletzung. Eine intraorbitale Durchtrennung der Axone hat ein schnelleres und prozentual höheres Absterben der Axone zur Folge als eine intrakranielle Axotomie. In beiden Fällen tritt das Absterben jedoch verzögert zur Axotomie auf. Der Großteil der RGZ stirbt zwischen dem siebten und 14. Tag nach einer Axotomie ab (Berkelaar *et al.*, 1994).

Dies bestätigten Villegas-Perez *et al.* (1993), die zwei Phasen des Absterbens der RGZ unterscheiden:

Während der ersten Phase bis zu zwei Wochen nach der Axotomie stirbt bereits ein großer Teil der RGZ ab. In der darauffolgenden zweiten Phase verläuft das Absterben der übriggebliebenen RGZ verlangsamt; nur wenige Axone (< 5% der Gesamtpopulation) überleben bis zu 20 Monate nach einer Axotomie.

Während also bei einer intraorbitalen Durchtrennung ohne Anschluss eines peripheren Nervenimplantats (PNT) etwa 90% der Axone innerhalb eines Monats nach einer Axotomie absterben, ist die Zahl der den Zeitraum von ein bis drei Monaten überlebenden RGZ bei Verwendung eines peripheren Nervenimplantats um das Zwei- bis Vierfache erhöht. Es wächst jedoch nur etwa ein Fünftel dieser überlebenden Axone in das Implantat ein. Weiterhin

konnte beobachtet werden, dass trotz sinkender Anzahl der überlebenden Axone während der ersten drei Monate nach einer Axotomie die Zahl der in das Transplantat einwachsenden Axone relativ stabil bleibt (Villegas-Perez *et al.*, 1988).

Robinson und Madison (2000) entdeckten, dass auch die Art der Verbindung des Transplantats zum zentralen Nerv von Bedeutung ist. Sie zeigten, dass durch die Verwendung von Fibrinkleber an der Verbindungsstelle des durchtrennten Nervs zum Transplantat die Anzahl der in das Transplantat einwachsenden Axone zusätzlich gesteigert werden kann.

Die Verwendung peripherer Nerven-Transplantate ist ein entscheidender Faktor für das Überleben der Axone, denn das Transplantat stimuliert nicht nur die axonale Regeneration, sondern erhöht auch die Anzahl der überlebenden RGZ nach einer Axotomie (Villegas-Perez *et al.*, 1988).

Die Tatsache, dass es den Axonen retinaler Ganglienzellen möglich ist mithilfe eines peripheren Nerven-Transplantats zu regenerieren, weist darauf hin, dass das PNT Faktoren beinhalten muss, die eine Regeneration von Axonen erleichtern bzw. überhaupt erst ermöglichen.

Ein PNT bietet den Axonen retinaler Ganglienzellen eine regenerationspermissive Umgebung, denn es gibt keinen inhibitorischen Einfluss in Form von im ZNS vorkommenden Myelin (Mey & Thanos, 1996). Zusätzlich erweist es sich als „Leitschiene“ für die regenerierenden Axone.

Eine besondere Bedeutung haben außerdem die im PNT vorkommenden Schwann-Zellen, deren Vitalität als essentiell für eine erfolgreiche Regeneration betrachtet wird. Sie sezernieren unter anderem neurotrophe Faktoren wie z.B. *nerve growth factor* (NGF), was ein gesteigertes Überleben der RGZ ermöglicht (Maffei *et al.*, 1990). Überdies sind sie für die Myelinisierung der einwachsenden Axone zuständig. Die Transplantation weiterer Schwann-Zellen sowie die Konzentrationserhöhung anderer neurotropher Faktoren wie BDNF oder Neurotrophin-4 ermöglichten in Experimenten eine zusätzliche

Steigerung der Anzahl überlebender RGZ (Peinado-Ramon *et al.*, 1996; Negishi *et al.*, 2001).

Für die angestrebte funktionelle Regeneration ist jedoch nicht nur ein kurzfristiges, sondern das dauerhafte Überleben der Axone sowie deren Wachstum inklusive Erreichen des Zielgebietes entscheidend. Thanos und Vanselow (1989) zeigten, dass retinale Ganglienzellen zumindest über mehrere Wochen nach einer Axotomie die Fähigkeit zur Regeneration in periphere Nerventransplantate beibehalten. Die Fähigkeit zur Regeneration ist jedoch während der ersten Woche nach einer Axotomie am größten.

In experimentellen Untersuchungen fand man heraus, dass Axonen das Erreichen des *Colliculus superior* inklusive der Ausformung von Synapsen durch die Verwendung peripherer Nerventransplantate ermöglicht werden kann (Bray *et al.*, 1991). Eine zumindest partielle funktionelle Restauration konnte bei Ratten durch die Ableitung visuell evozierter Potentiale (VEP) nachgewiesen werden (Thanos *et al.*, 1997).

Das langfristige Überleben der RGZ kann nur gesichert werden, wenn die Axone ihre Zielgebiete erreichen, durch welche sie mit „Überlebensfaktoren“ in Form trophischer Substanzen versorgt werden. Um dies zu ermöglichen, muss das verwendete periphere Transplantat mit dem cerebralen Zielgebiet verbunden sein. Das Überleben blind endender Transplantate, bei denen keine Verbindung zu einem Zielgebiet besteht, ist von Anfang an limitiert (Mey & Thanos, 1995).

Die dargestellten Erläuterungen sollen einen kurzen Einblick in die Problematik der Nervenregeneration im ZNS, die naturgegeben kaum existent ist, geben. Die geschilderten Aspekte und Forschungsansätze sollten hierbei nicht isoliert, sondern im Zusammenhang betrachtet werden.

Jedes der angesprochenen Probleme, das Überleben der RGZ, die Regeneration der Axone, das Erreichen der Zielgebiete ebenso wie die Verwendung peripherer Nerventransplantate, hat seine besondere Relevanz.

Ein weiterer Ansatz, der die Regeneration retinaler Ganglienzellaxone mithilfe peripherer Nerven-Transplantate thematisiert und sich insbesondere mit der Revaskularisierung der Transplantate beschäftigt, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.2 Ziele der Arbeit

Die nutritive Versorgung und die ausreichende Sauerstoffzufuhr der Zellen sind zwei wichtige limitierende Parameter einer Regeneration. Beides kann nur durch ein funktionierendes Gefäßsystem gewährleistet werden. Die Ernährung der Schwann-Zellen, deren Vitalität essentiell für das Überleben eines Transplantats ist, kann etwa sechs bis sieben Tage über den Mechanismus der Diffusion gesichert werden (Weiss & Taylor, 1946, zit. in Best & Mackinnon, 1994). Kommt es innerhalb dieses Zeitraumes nicht zu einer Revaskularisierung des Gewebes, ist dessen Ernährung und damit das Überleben der Zellen nicht mehr gewährleistet. Die Vitalität der Schwann-Zellen und die zeitige Revaskularisierung des Transplantats sind kritische Parameter und unerlässliche Vorbedingungen für eine erfolgreiche Regeneration (Penkert *et al.*, 1988).

Ziele dieser Arbeit waren deshalb:

- 1) Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Revaskularisierung von peripheren Ischiadicustransplantaten am *Nervus opticus* (*N. opticus*)
- 2) Untersuchung der zeitlichen Korrelation zwischen der Regeneration retinaler Ganglienzellaxone und der Revaskularisierung der Transplantate
- 3) Beobachtung der Reaktion der Schwann-Zellen während der Regeneration
- 4) Beobachtung der Makrophagenreaktion innerhalb der Transplantate

Hierzu wurden in den angewandten immunhistochemischen Verfahren sowohl für das Gefäßsystem und die Regeneration als auch für verschiedene Zellpopulationen wie z.B. Makrophagen spezifische Antikörper verwendet. Dies geschah unter der Zielsetzung, nicht die Revaskularisierung der Gefäße isoliert, sondern im Zusammenhang mit der Regeneration der Axone und weiteren begleitenden Faktoren zu untersuchen.

Tabelle 1 liefert eine kurze Übersicht der verwendeten Antikörper:

| | |
|----------------------|---|
| Gefäße | Anti-von Willebrand Faktor (vWF) Anti-Endothelin |
| Makrophagen | ED-1 |
| Schwann-Zellen | Anti-Galactocerebrosid Anti-S-100 |
| regenerierende Axone | Anti- <i>growth-associated protein-43</i> (GAP-43) |

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper

1.3 Gefäßversorgung peripherer Nerven

Die Gefäßversorgung peripherer Nerven erfolgt über zwei verschiedene Systeme, das extrinsische und das intrinsische.

Die extrinsischen Gefäße sind Verzweigungen von umgebenden Gefäßen aus Interstitium, Muskulatur und Periost. Sie sind für die nutritive Versorgung verantwortlich, indem sie den Zufluss zum intrinsischen System gewährleisten; sie befinden sich im *Meso-* und *Epineurium*.

Das intrinsische System fungiert als Austauschsystem, welches den Metabolismus auf zellulärer Ebene erleichtert. Die Gefäße dieses Systems werden auch als endoneurale Mikrogefäße bezeichnet. Sie ähneln Kapillaren, unterscheiden sich von diesen jedoch strukturell, da sie von einer Schicht endothelialer Zellen umgeben werden (Best & Mackinnon, 1994).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Operationsmethoden

Die Versuche wurden mit männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (*Rattus norvegicus*) durchgeführt, deren Gewicht zwischen 180 und 220 g lag. Sie wurden entweder von der Firma Charles River (Sulzfeld, Germany) bezogen oder in der zentralen Tiereinrichtung des Universitätsklinikums Münster selbst gezüchtet. Die Haltung der Ratten erfolgte paarweise oder zu dritt bei Raumtemperatur (18-20°C) in Zuchtkäfigen (Makrolonkäfig Typ III) unter natürlichem Hell-Dunkel-Rhythmus. Als Nahrung diente eine *ad libitum*-Diät aus Standard-Alleinfutter und Leitungswasser.

Alle genehmigungspflichtigen Versuche wurden mit der Zulassung des Regierungspräsidenten (Versuchsnummern A48/99; G73/99) durchgeführt. Der Ablauf der Operationen wurde gemäß §9a (1) des Tierschutzgesetzes protokolliert.

Bei jedem der insgesamt 16 Versuchstiere wurde in einer ersten Operation die Transplantation durchgeführt. Als Transplantat wurde jeweils ein zwischen 10 und 12 mm langes Segment des *Nervus ischiadicus* (*N. ischiadicus*) verwendet. Dieser ist nicht nur chirurgisch leicht zugänglich, er weist außerdem einen ausreichenden Durchmesser auf.

Innerhalb eines Zeitraumes von 84 Tagen nach der Transplantation wurden die Nervensegmente wie folgt wieder entnommen:

Jeweils zwei nach einem, zwei, drei und sieben Tag(en), eins nach 15 Tagen, drei nach 21 Tagen und zwei nach 84 Tagen. Zusätzlich wurde bei zwei Versuchstieren der kontralaterale *N. ischiadicus* entnommen, um ihn als Negativkontrolle zu verwenden. Bei zwei weiteren Versuchstieren wurde das Transplantat erst nach intrakardialer Perfusion mit Schwarztinte entnommen. Die Perfusionen sowie die darauffolgenden Transplantatentnahmen erfolgten vier bzw. 17 Tage nach der Transplantation.

Es wurden immer autologe Transplantate verwendet, um eventuelle immunologische Abstoßungsreaktionen zu vermeiden.

Die für die operativen Eingriffe erforderlichen Instrumente (feine und chirurgische Pinzetten, Präparationsscheren sowie Faden- und Skalpellhalter) stammten von den Firmen Aesculap, Martin und Storz (Tuttlingen). Zusätzlich standen ein Handstaubsauger und ein handelsüblicher Rasierapparat zur Operationsvorbereitung der Ratten zur Verfügung.

Alle Operationen wurden an einem Operationsmikroskop (OPMI 19-FC, Zeiss, Jena, Germany) bei Vier- bis 16-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.1.1 Erste Operation

Als Anästhetikum wurde den Versuchstieren eine intraperitoneale Injektion bestehend aus 12,5 mg Ketaminhydrochlorid (10%, Sanofi-Synthelabo, Paris, France) und 2 mg Xylazin (2%, Sanofi-Synthelabo, Paris, France) pro 100 g Körpergewicht verabreicht. Das Erreichen eines ausreichenden Narkosestadiums wurde durch das Erlöschen des kornealen Lidschlussreflexes überprüft. Nachfolgend wurden die betroffenen Stellen der Kopf- und der rechten Oberschenkelregion rasiert. Schließlich wurden die Tiere am Operationstisch mit Maulklemmen und Klebestreifen fixiert.

Zu Beginn der Operation wurde der rechte *N. ischiadicus* des jeweiligen Versuchstieres entnommen und während der Vorbereitung des Transplantatbettes vorläufig in phosphatgepufferter physiologischer Salzlösung (PBS) gelagert. Die Entnahmestelle wurde nachfolgend zweischichtig und mittels einer fortlaufenden Naht mit 4-0 Seide (Ethicon) verschlossen.

Der zweite Teil der Operation bestand in der Verknüpfung des vorher entnommenen Ischiadicustransplantats mit dem axotomierten kontralateralen *N. opticus* desselben Tieres. Um dies zu ermöglichen, wurde zuerst ein Transplantatbett für den *N. ischiadicus* vorbereitet, indem mithilfe eines Rosenbohrers parasagittal eine Rinne in die Schädelkalotte gefräst wurde. Um eine schonende Präparation des *N. opticus* zu ermöglichen, wurden die

Glandula lacrimalis und ein Teil der Augenmuskeln entfernt. Die *Dura mater* wurde in longitudinaler Richtung durchtrennt, um die darin verlaufende *Arteria centralis retinae* zu schonen. Anschließend wurden die Axotomie des *N. opticus* sowie die nachfolgende Verknüpfung mit dem Transplantat durchgeführt. Diese Verknüpfung erfolgte über zwei bis drei Adaptionsnähte, d.h. spannungsfrei, mit 10-0 Ethilon (Ethicon). Proximal wurde das Transplantat mit der *Dura mater* des *N. opticus* vernäht, um eine Traumatisierung der Axone des Sehnervs zu vermeiden. Distal endete das Transplantat blind, d.h. ohne Verbindung zum *Colliculus superior*. Zur Stabilisierung, Auffüllung des Gewebedefektes und als lokal hämostyptische Maßnahme wurde im Operationsgebiet ein Gelfoam aus Gelatine eingelegt. Der Verschluss erfolgte wiederum mit einer fortlaufenden Naht aus 4-0 Seide (Ethicon). Zur Entzündungsprophylaxe wurde Gentamycinsalbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) auf das Auge der betroffenen Seite sowie auf die Nahtstellen aufgetragen.

Die postoperative Kontrolle der Tiere erfolgte jeweils nach einigen Stunden und in den darauffolgenden Tagen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sie keine auf Schmerzen hindeuteten Verhaltensauffälligkeiten zeigten und dass die Operationsnähte entzündungsfrei waren.

2.1.2 Gewebsentnahme

Vor der Entnahme von Gewebe wurden die Versuchstiere schmerzlos durch die Inhalation einer CO₂-Überdosis getötet. Nachfolgend wurde das jeweilige Transplantat wieder entnommen. Die Entfernung gestaltete sich hierbei umso schwieriger, je länger das Transplantat vorher *in situ* gewesen war. Einige Nervensegmente waren bereits bindegewebig eingeeilt.

Die durchschnittliche Länge der entnommenen Transplantate betrug zwischen 10 und 12 mm.

2.1.3 Weiterer Ablauf

Nach der Transplantatentnahme wurden diese vorerst kurzzeitig in PBS gelagert; einige wurden für ein bis zwei Stunden in Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Die Transplantate wurden präpariert und unter Verwendung von flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von $-195,8^{\circ}\text{C}$ in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) eingefroren. Mit einem Kryostaten (Reichert-Jung, Germany) wurden Kryostatschnitte von ca. $10\ \mu\text{m}$ Dicke für die immunhistochemischen Untersuchungsmethoden angefertigt. Diese wurden danach bis zum Anfärben bei -20°C gelagert.

Es wurden sowohl Längs- als auch Querschnitte der entnommenen Transplantate hergestellt.

2.1.4 Intrakardiale Tintenperfusion

Die vorangegangenen immunhistochemischen Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Revaskularisierung nach etwa drei bis vier Tagen beginnt. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde eines der Versuchstiere vier Tage nach der Transplantation intrakardial mit Schwarztinte im Sinne einer Angiographie perfundiert, um die einwachsenden Gefäße im peripheren Nerventransplantat zu untersuchen. Ein weiteres Versuchstier wurde 17 Tage nach der Transplantation ebenfalls mit Schwarztinte perfundiert. Nach der Transplantatentnahme wurde dieses Nervensegment fotografiert, um auch die makroskopische Ebene der angefärbten Gefäße darzustellen.

Bei der durchgeführten Operation wurde nach der Injektion einer Überdosis von Ketaminhydrochlorid in Kombination mit Xylazin zuerst der Brustkorb von kaudal unterhalb des *Processus xiphoideus* eröffnet. Nachfolgend wurden die deszendierenden Gefäße abgeklemmt und das rechte *Atrium* wurde eröffnet, um zuerst ein Abfließen des Blutes und später das der Schwarztinte zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Schwarztinte (Pelikan, Germany) mit einer

Kanüle direkt in den linken Ventrikel injiziert bis eine leicht bläuliche Färbung der unbehaarten Haut an Schnauze und Pfoten erkennbar war. Im Anschluss wurde das Nerventransplantat entnommen und in 4%igem PFA für 24 Stunden fixiert, um es dann in Paraffin einbetten zu können.

2.2 Paraffineinbettung

Die Einbettung des Transplantats erfolgte mithilfe eines Einbettautomaten (Histomaster, Fa. Bavimed 2052) automatisch nach folgendem Schema:

1. Fixierung
in 5% Formol für 2 Stunden
2. Entwässerung:
in 70%igem Ethanol für 1 Stunde
in 70%igem Ethanol für 1 Stunde
in 96%igem Ethanol für 1 Stunde
in 96%igem Ethanol für 1 Stunde
in 100%igem Ethanol für 1 Stunde
in 100%igem Ethanol für 1 Stunde
in 100%igem Ethanol für 1 Stunde
3. Chloroform (Benzol) für zweimal 1 Stunde
4. Paraplast bei 60°C für je 2 bzw. 3 Stunden

Nach der Einbettung wurden mit einem Schneideautomaten (Jung, Germany) ca. 5 µm dicke Längs- und Querschnitte des entnommenen Transplantats angefertigt.

Da durch die Tintenperfusion keine ausreichend starke Färbung der zu untersuchenden Gefäße erzielt werden konnte, wurden die Schnitte nachfolgend zusätzlich einer HE-Färbung unterzogen. Diese Färbung sollte das Ergebnis optimieren und die Gefäße bzw. die darin enthaltenen, verbliebenen Erythrozyten noch besser darstellen.

2.3 HE-Färbung

Die HE-Färbung der Paraffinschnitte erfolgte nach folgendem Schema:

1. Erwärmung der Schnitte für 10-15 Minuten im Brutschrank bei 70°C
2. Entparaffinieren:
 - Rotihistol zweimal 10 Minuten
 - 99%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 99%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 96%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 96%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 70%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 70%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - Aqua dest.*
3. Hämalun 3-5 Minuten
4. kurz mit Leitungswasser spülen
5. mit HCl-Alkohol differenzieren für 5 Sekunden
6. in Leitungswasser fließend wässern für 5 Minuten
7. Eosin für 2 Minuten
8. 70%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 96%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 96%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 99%iger Alkohol 1-3 Minuten
 - 99%iger Alkohol 1-3 Minuten
9. Rotihistol für 5 Minuten
10. Rotihistol für 10 Minuten
11. Einbetten mit Rotihistokitt

2.3.1 Verwendete Lösungen

| | |
|------------------------|--|
| HCl-Alkohol: | 1 Liter 70%iger Alkohol und 12 ml 25% HCl |
| Eosin-Stammlösung: | 10 g (Roth 70891) 200 ml <i>Aqua dest.</i> 800 ml 95% Ethanol |
| Eosin-Gebrauchslösung: | 50 ml Stammlösung 150 ml 70%iger Alkohol 1 ml Eisessig |
| Hämalaun nach Mayer: | Merck Best.Nr. 1.09249 |

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Verfahren

Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren der indirekten Immunhistochemie beruht auf dem Prinzip, dass ein unmarkierter Primärantikörper eine spezifische Bindung mit einem bestimmten Protein im Gewebe, einem sogenannten Antigen, eingeht. Durch eine weitere spezifische Bindung des Primärantikörpers an einen konjugierten Sekundärantikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, kann das Antigen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sichtbar gemacht werden.

Die Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Fixierung der Schnitte in -20°C kalten Methanol für 10 min.
2. dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min. in PBS
3. Blockierung mit FCS (10%) für 30 min. bei Raumtemperatur
4. Pipettieren der Primärantikörperlösung auf die Schnitte und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
5. dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min. in PBS
6. Pipettieren der Sekundärantikörperlösung auf die Schnitte und Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und Dunkelheit für eine Stunde
7. dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min. in PBS
8. Eindeckeln der Schnitte in DAPI-Mowiol

Bei den Negativkontrollen wurde bei sonst gleicher Methode anstatt des Primärantikörpers FCS aufgetragen.

Die Lagerung der Schnitte erfolgte in Dunkelheit bei 4°C .

2.4.2 Materialien für die Immunhistochemie

PBS

Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (Phosphate Buffered Saline/PBS):

Bestandteile: 2,5 Liter *Aqua dest.*
22,5 g NaCl
0,675 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O
3,55 g KH₂PH₄

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt.

Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt, Germany)

12 g Mowiol wurden in 30 g fluoreszenzfreien Glycerin unter intensivem, mindestens zweistündigem Rühren gelöst. Danach wurden 30 ml *Aqua dest.* zugegeben und es wurde weitere fünf Minuten gerührt. Die entstandene Suspension wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 60 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer (2,42 g Tris (Tris hydroxymethylaminomethan) auf 100 ml *Aqua dest.*, pH 8,5 mit 0,1 N HCl eingestellt) hinzugegeben wurden. Unter ständigem Rühren wurde die Lösung für 10 min. bei 56°C erwärmt und im Anschluss für 15 min. bei 5000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

DAPI-Mowiol (Hoechst 33258)

Die Endkonzentration des zur Kerndarstellung verwendeten DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat) lag bei 10µg/ml.

Blockierlösung

10%iges fötales Kälberserum (FCS, Carlsbad, CA,USA)

Paraformaldehyd

4%iges Paraformaldehyd (Merck) in PBS

Beschichtung der Objektträger

Die Objektträger wurden mit absolutem Alkohol (Merck) gereinigt und in eine frisch filtrierte Beschichtungslösung aus 0,5 % Gelatine und 0,05 % $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) getaucht. Anschließend wurden sie zum Trocknen für ca. zwei Stunden in eine staubfreie Umgebung gestellt.

Hilfsmittel für die Auswertung

aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Germany)

Kamera (Axiocam HRc, Zeiss, Germany)

Computerprogramm Axiovision 3.0

Alle Aufnahmen der angefertigten Schnitte erfolgten bei 20- bis 40-facher Vergrößerung.

2.4.3 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

1. Anti-Galactocerebroside (Sigma, St. Louis, MO, USA, product no. G-9152)
Verdünnung 1:200
2. Anti-Galactocerebroside (Boehringer, Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany, Cat no. 1351 621) Verdünnung 1:100
3. ED1 (Serotec, Oxford, UK, MCA341) Verdünnung 1:250
4. Anti-von Willebrand Factor (Dako, Glostrup, Denmark, code no. M616)
Verdünnung 1:500
5. Anti-GAP-43 (Sigma, product no. G9264) Verdünnung 1:500
6. Anti-Endothelin (Sigma, product no. E-1645) Verdünnung 1:1000
7. Anti-S-100 (Sigma, product no. S2644) Verdünnung 1:200

Sekundärantikörper

1. Cy2-conjugated Anti-mouse (Jackson Immuno Research, Westgrove, PA, USA) code no. 115-226-062) Verdünnung 1:200
2. Cy2-conjugated Anti-rabbit (Jackson Immuno Research, code no. 111-225-045) Verdünnung 1:200

Der Cy2-Anti-mouse-Antikörper wurde für die oben genannten Primärantikörper 1. bis 5. verwendet, der Cy2-Anti-rabbit-Antikörper für die oben genannten Primärantikörper 6. und 7.

Die angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf eine Verdünnung mit 10%igem FCS.

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente werden im Folgenden für jeden der untersuchten Bereiche sowie für alle sechs verwendeten Antikörper separat dargestellt.

Die in den nachfolgenden Diagrammen dargestellten Ergebnisse wurden nach der relativen Fluoreszenzintensität eingeteilt. Stufe null bedeutete hierbei keinerlei unter dem Mikroskop erkennbare Fluoreszenz. Die weitere Einteilung erfolgte in den Stufen eins bis drei (schwach bis mäßige, ausgeprägte und sehr ausgeprägte Fluoreszenzintensität).

3.1 Revaskularisierung der Transplantate

3.1.1 Von Willebrand Faktor (vWF)

Einer der beiden verwendeten Antikörper zur Untersuchung der Gefäße bzw. der Revaskularisierung der Transplantate ist gegen den von Willebrand Faktor (vWF) gerichtet. Der vWF spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutstillung nach Gefäßverletzungen. Zum einen bildet er einen Komplex mit dem plasmatischen Gerinnungsfaktor VIII, zum anderen vermittelt er die Adhäsion der Thrombozyten an subendothelialen Strukturen. Der vWF wird als Glykoprotein in vaskulären Endothelzellen synthetisiert und dann ins Plasma sezerniert (Manucci, 1998). Die Verwendung des gegen den vWF gerichteten Antikörpers ermöglichte die Darstellung der Endothelzellen von Blutgefäßen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigten bei den einen bzw. zwei Tag(e) nach der Transplantation entnommenen Nervensegmenten keinerlei erkennbare Fluoreszenz (Abb.1A und B). Nach drei Tagen konnten bereits erste eingewachsene Gefäße durch die Anfärbung der Endothelzellen dargestellt werden (Abb.1C). Ab dem siebten Tag nach der Transplantation konnte die Revaskularisierung der Ischiadicustransplantate sowohl im Längs-

als auch im Querschnittspräparat eindeutig als positiv bewertet werden (Abb.1D und Abb.2B). Die Präparate der nach 15, 21 und 84 Tagen entnommenen Transplantate wiesen ebenfalls eine deutliche Anfärbung der zumeist längs angeschnittenen Gefäße auf, wobei die Fluoreszenzintensität nach 21 Tagen das Maximum erreichte (Abb.1E-G).

Die Kontrolle zeigte ein ähnliches Bild der Gefäße wie die Schnitte der zwischen dem siebten und 84. Tag entnommenen Transplantate sowohl was die Struktur als auch was die Dichte, d.h. die Anzahl der vorkommenden Gefäße, betraf (Abb. 1H).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Revaskularisierung der Transplantate etwa ab dem dritten Tag nach der Transplantation beginnt und die Gefäßdichte in den folgenden Tagen stetig zunimmt. Nach 84 Tagen scheint sich diese auf dem Niveau der Kontrolle stabilisiert zu haben (Abb.3).

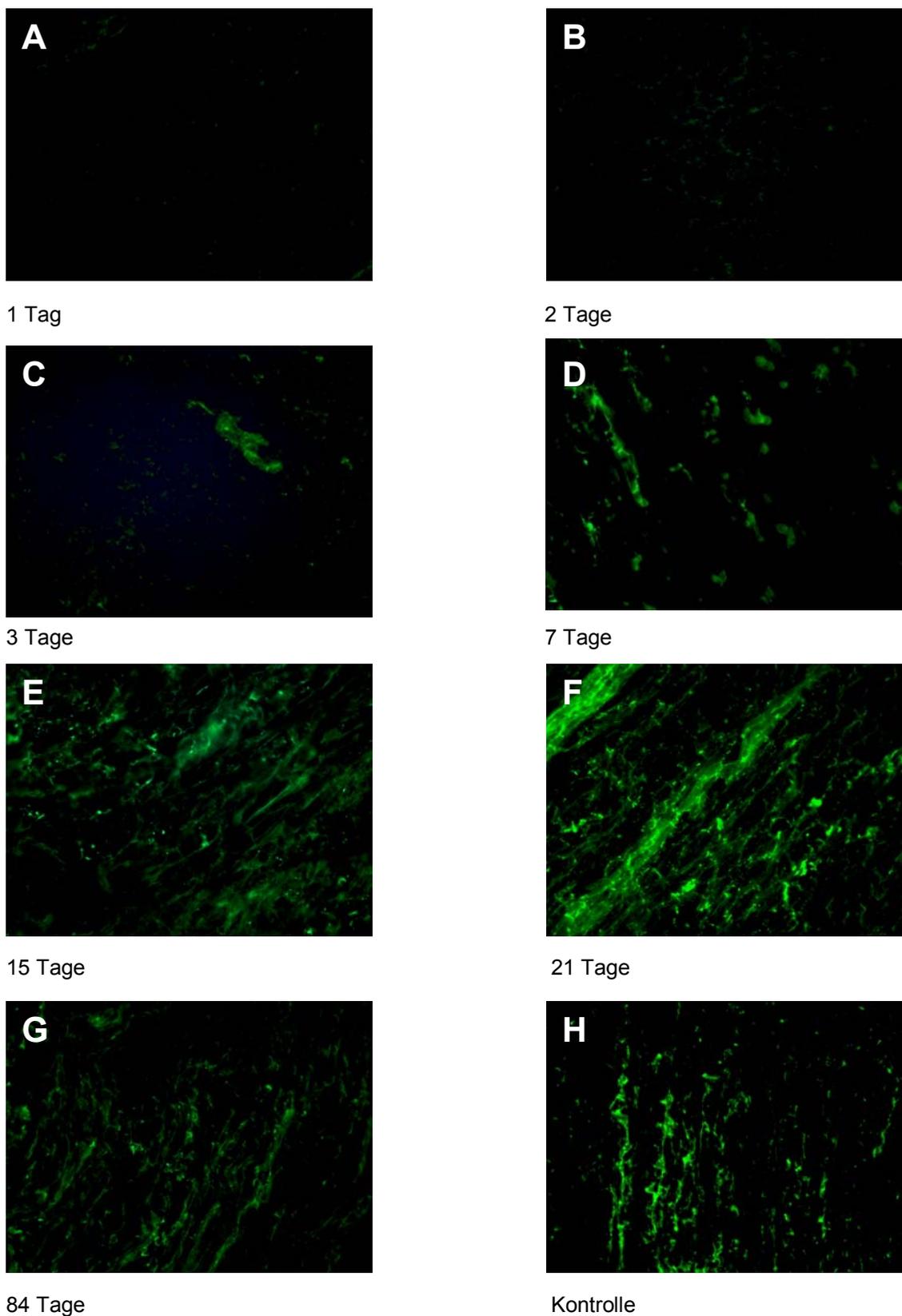
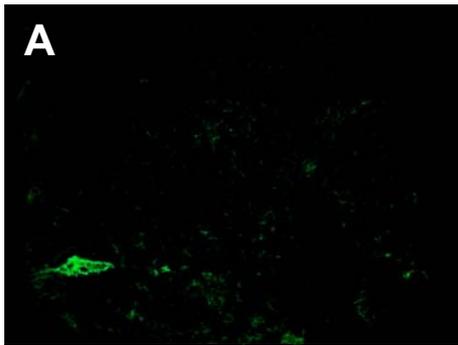
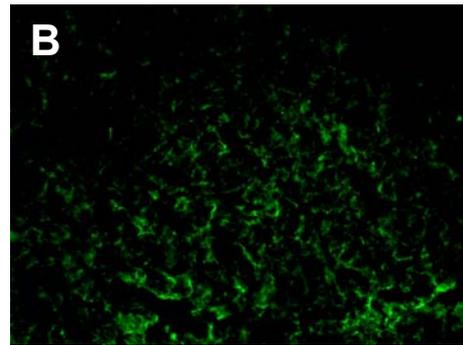


Abbildung 1 (A-H): Verlauf der vWF-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Beginn der Revaskularisierung am dritten Tag (C); nach sieben Tagen (D) Gefäßdichte eines normalen Nervs (H); maximale Gefäßdichte nach 21 Tagen (F).



2 Tage



7 Tage

Abbildung 2 (A-B): Verlauf der vWF-Fluoreszenzintensität an Querschnitten. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität vom zweiten (A) bis zum siebten (B) Tag ist erkennbar.

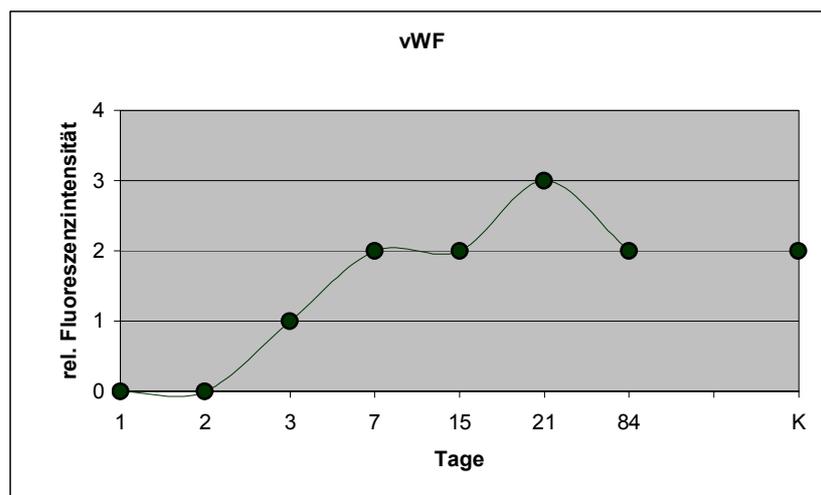


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Anfärbarkeit von Transplantatschnitten mit einem gegen den vWF gerichteten Antikörper. Es zeigt sich eine ab dem dritten Tag beginnende und dann stetig zunehmende Fluoreszenzintensität, die sich nach 84 Tagen auf dem Niveau der Kontrolle (K) stabilisiert. (K: Kontrolle; rel. Fluoreszenzintensität: relative Fluoreszenzintensität)

3.1.2 Endothelin

Der Zweite zur Gefäßdarstellung verwendete Antikörper ist gegen Endothelin gerichtet. Endothelin ist ein vasokonstriktorisches wirksames Polypeptid, welches in vaskulären Endothelzellen synthetisiert und exprimiert wird.

Die Ergebnisse der Kryostatschnitte des einen Tag nach der Transplantation entnommenen Nervensegments zeigten eine sehr schwache, residuale Fluoreszenzmarkierung (Abb.4A). Diese Markierung war am zweiten Tag vollständig verschwunden (Abb.4B). Nach drei Tagen war wiederum eine Anfärbung der vereinzelt vorzufindenden Gefäße erkennbar (Abb.4C und Abb.5B). Eine ausgeprägte Darstellung der sowohl längs als auch quer angeschnittenen, eingewachsenen Gefäße zeigte sich nach sieben Tagen (Abb.4D). Die Fluoreszenzintensität entsprach zu diesem Zeitpunkt etwa der Ausprägung des Kontrollnervs. Bei den Schnitten der nach 15 Tagen entnommenen Segmente war die Gefäßdarstellung nicht stärker ausgeprägt als nach sieben Tagen (Abb.4E). Die nach 21 und 84 Tagen entnommenen Nerventransplantate (Abb.4F und 4G) wiesen eine deutlich intensivere Anfärbung der Gefäße als das nach 15 Tagen entnommene Transplantat und der Kontrollnerv auf. Dies kann als Zeichen einer überschießenden Endothelinexpression gewertet werden.

Die Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen des gegen den vWF gerichteten Antikörpers (Abb.3), dass die Revaskularisierung etwa ab dem dritten Tag nach der Transplantation beginnt und die Gefäßdichte in den folgenden Tagen stetig zunimmt (Abb.6).

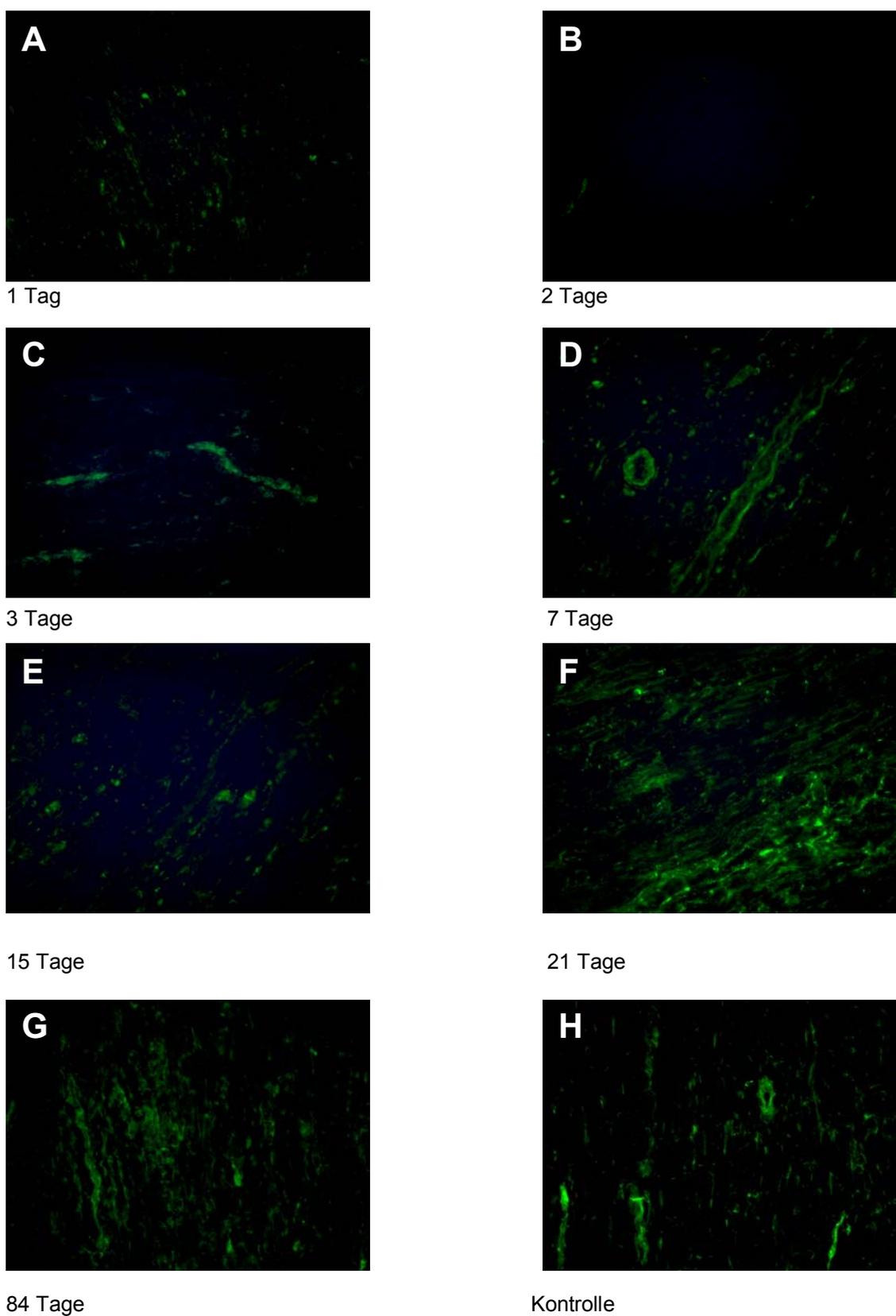


Abbildung 4 (A-H): Verlauf der Endothelin-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Beginn der Revaskularisierung am dritten Tag (C), maximale Gefäßdichte nach 21 (F) bzw. 84 (G) Tagen.

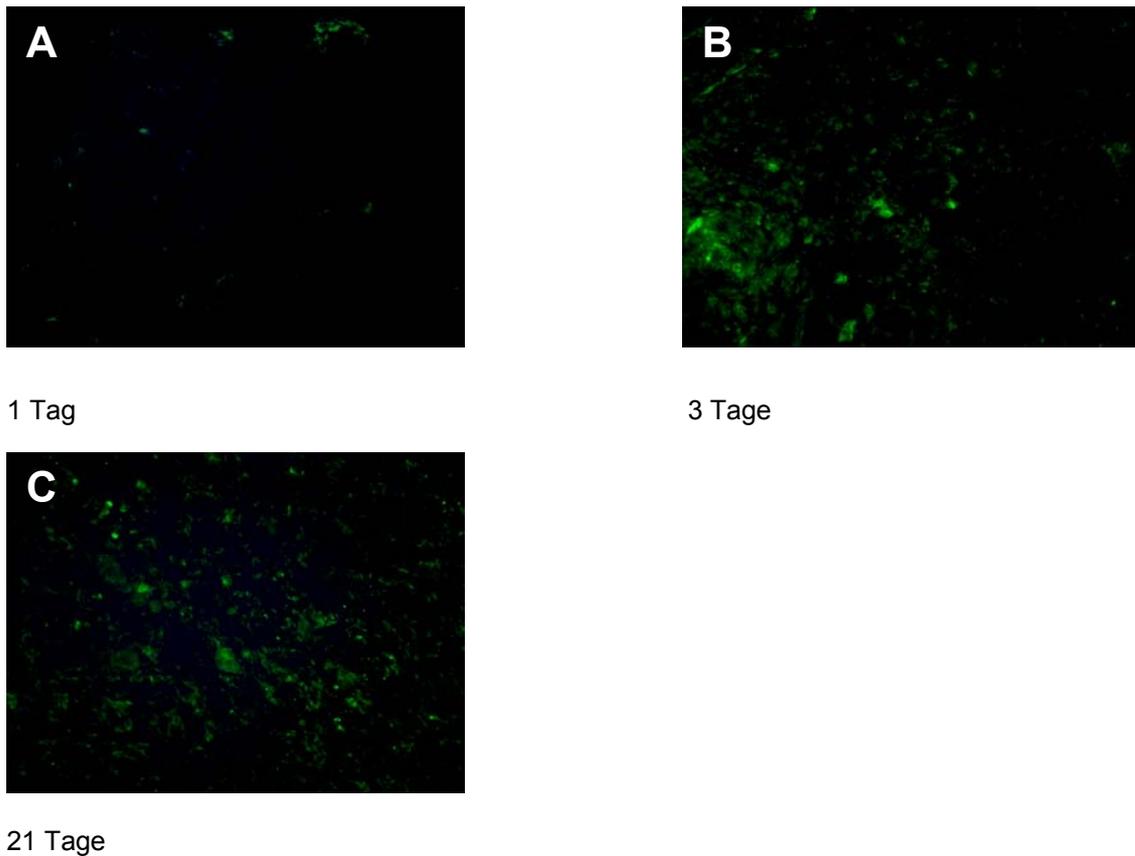


Abbildung 5 (A-C): Verlauf der Endothelin-Fluoreszenzintensität an Querschnitten. Zunahme der Fluoreszenzintensität vom ersten (A) bis zum 21. (C) Tag.

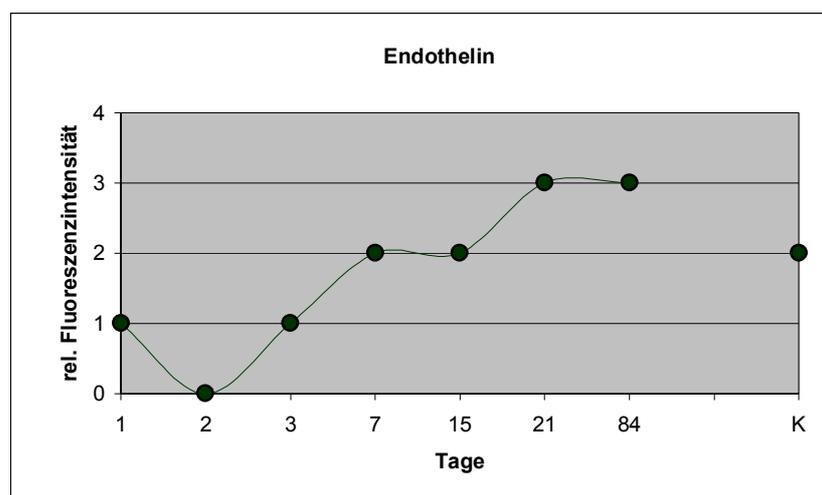


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Anfärbarkeit von Transplantatschnitten mit einem gegen Endothelin gerichteten Antikörper. Stetige Zunahme der Fluoreszenzintensität ab dem dritten Tag nach der Transplantation. (K: Kontrolle; rel. Fluoreszenzintensität: relative Fluoreszenzintensität)

3.1.3 Tintenperfusion und HE-Färbung

Bei zwei Versuchstieren wurde eine intrakardiale Perfusion mit Schwarztinte durchgeführt. Die Schnitte des vier Tage nach der Operation entnommenen Transplantats wurden zusätzlich einer HE-Färbung unterzogen, um eine optimale Gefäßdarstellung zu erreichen. Das 17 Tage nach der Operation entnommene und mit Tinte perfundierte Transplantat wurde fotografisch als ganzes Präparat dokumentiert. Beide Methoden sollten zusätzlich zur immunhistochemischen Untersuchung eine alternative respektive makroskopische Darstellung der Gefäße ermöglichen.

Die Fotos des 17 Tage nach der ersten Operation entnommenen Transplantats zeigten eine deutlich sichtbare Anfärbung der durch die Schwarztinte markierten Gefäße (Abb.7). Das Übersichtsbild (Abb.7A) zeigte eine von außen erkennbare Revaskularisierung des Transplantats insbesondere im proximalen und distalen Bereich (Abb.7A). Im mittleren Anteil hingegen war zumindest die von außen sichtbare Anzahl der Gefäße geringer. Dieser Anteil des peripheren Nervensegments war demzufolge 17 Tage nach der Transplantation weniger reich revaskularisiert als der proximale und distale Anteil. Die Nahtstelle, an welcher der *N. ischiadicus* zuvor mit dem axotomierten *N. opticus* verbunden worden war (Abb.7A und C), war reich vaskularisiert.

Die Resultate der makroskopischen Aufnahmen machen deutlich, dass die Revaskularisierung zumindest teilweise longitudinal erfolgt.

Da die makroskopischen Aufnahmen jedoch kaum eine Beurteilung der endoneuralen Gefäße erlauben, sind sie in dieser Hinsicht nur bedingt aussagekräftig. Aus diesem Grund wurden zusätzlich histologische Schnitte angefertigt, die eine bessere Darstellung der endoneuralen Gefäße ermöglichen.

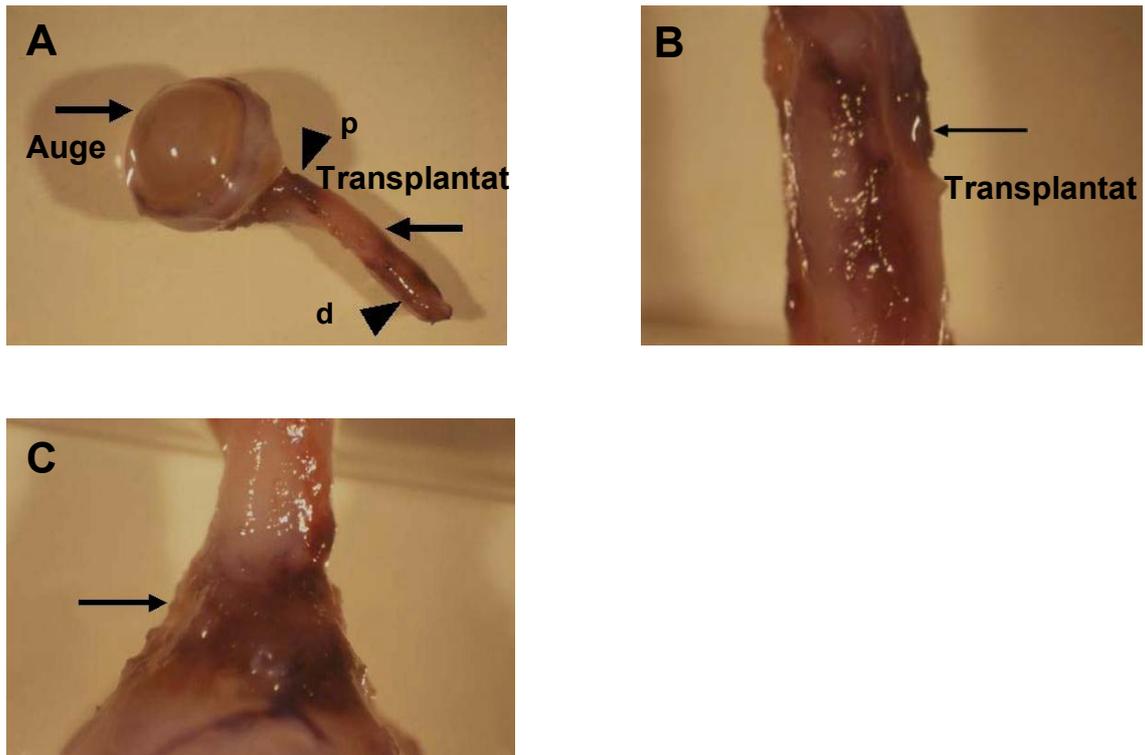


Abbildung 7 (A-C): Fotos des nach 17 Tagen entnommenen Transplantats. A: Ganzpräparat mit Auge. Proximaler (p) und distaler (d) Transplantatteil sind gekennzeichnet. B: Vergrößerter Ausschnitt des Transplantats aus A mit schwarz angefärbten Gefäßen. C: Verbindungsstelle von *N. opticus* und dem peripherem Nerv (Pfeil) mit schwarz angefärbten Gefäßen.

Bei den HE-gefärbten Präparaten konnte man sowohl im Längs- als auch im Querschnitt die aufgrund der angefärbten Erythrozyten gut dargestellten, eingewachsenen Gefäße erkennen. Vier Tage nach der Transplantation kamen diese allerdings nur vereinzelt vor (Abb.8, Abb.9). Die größeren perineuralen und die kleineren endoneuralen Gefäßen waren im Querschnittspräparat gut zu unterscheiden (Abb.9D).

Die Ergebnisse der tintenperfundierten sowie HE-gefärbten Präparate bestätigen die Resultate der mit den gefäßendothelspezifischen Antikörpern durchgeführten Versuche, dass eine beginnende Revaskularisierung etwa ab dem dritten Tag nach der Transplantation beginnt.

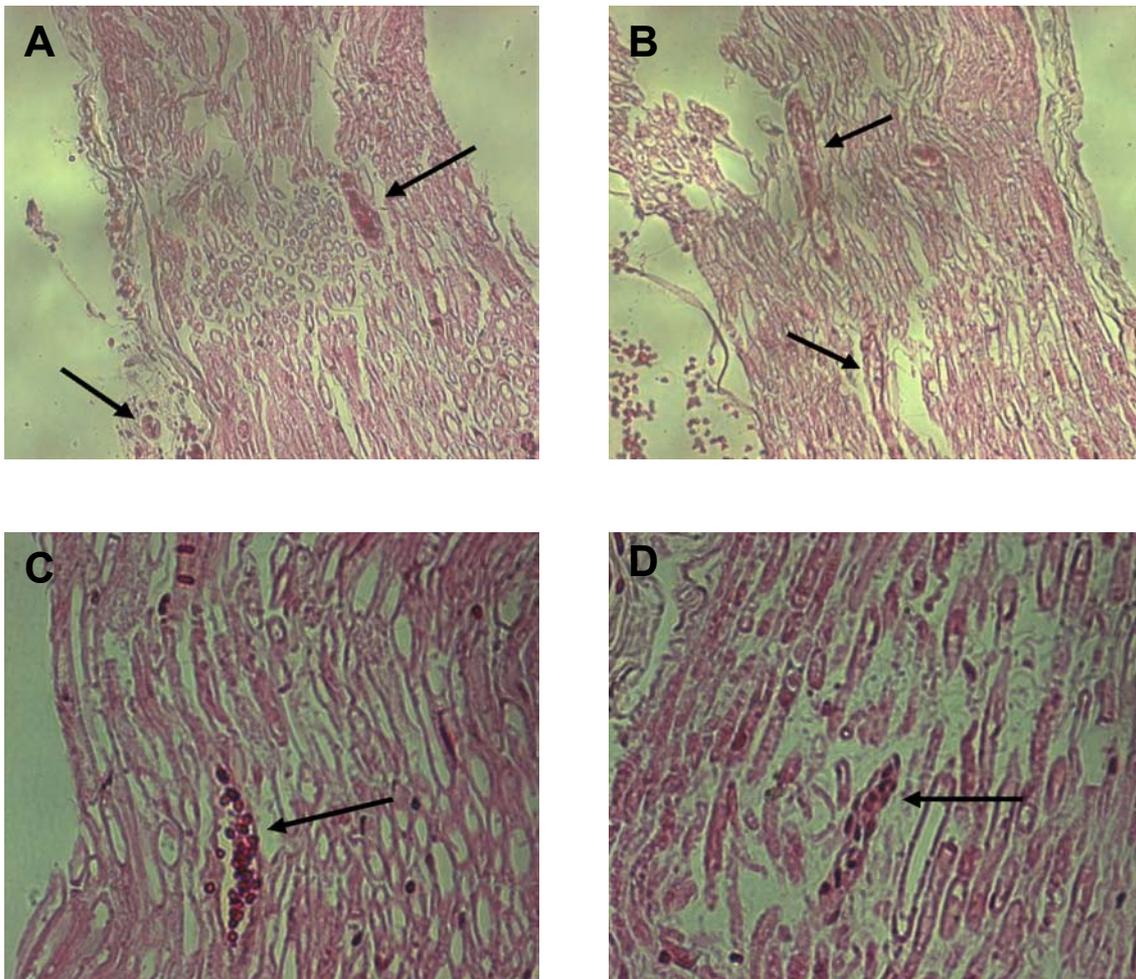


Abbildung 8 (A-D): Längsschnitte des nach vier Tagen entnommenen, mit Tinte perfundierten und HE-gefärbten Transplantats. Erste einwachsende Gefäße mit enthaltenen Erythrozyten sind erkennbar (Pfeile).

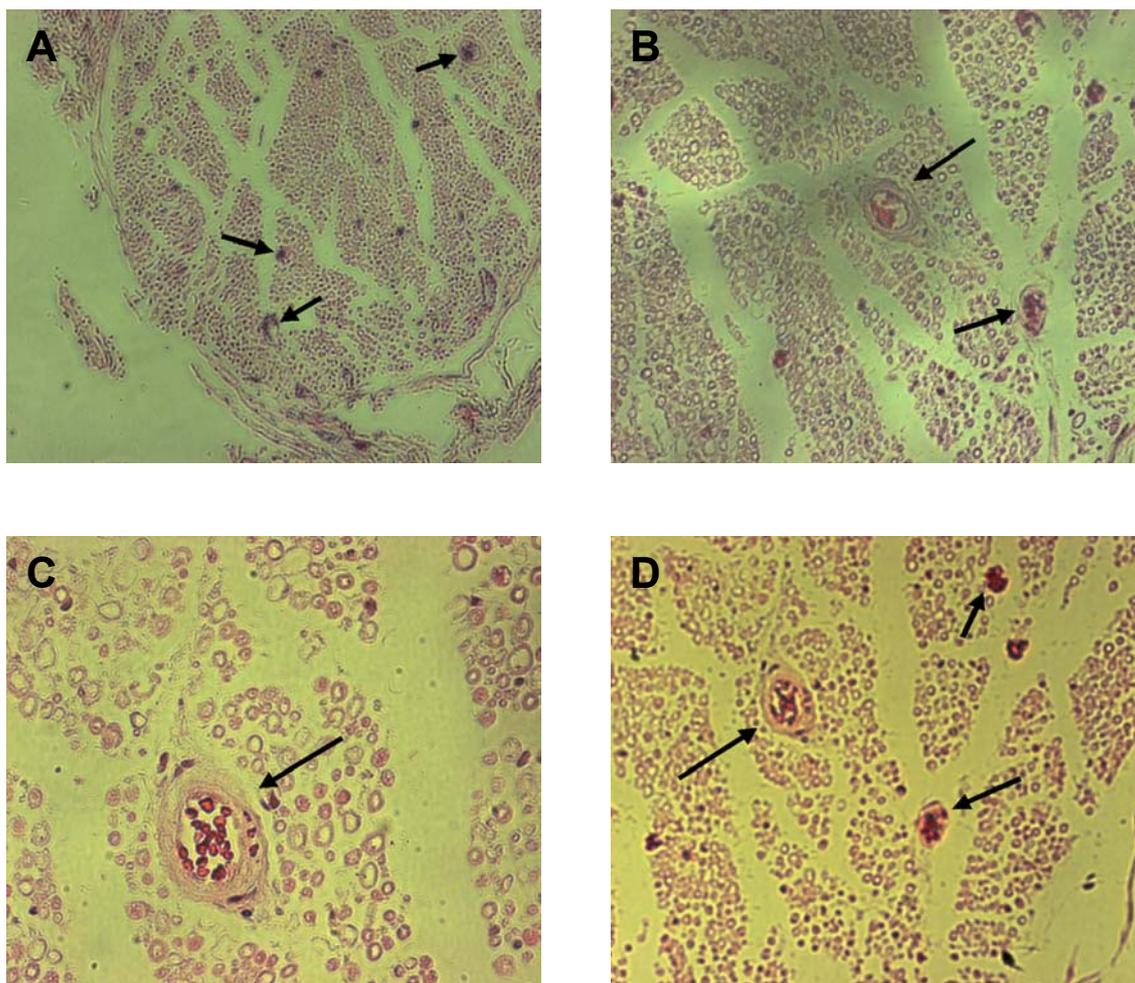


Abbildung 9 (A-D): Querschnitte des nach vier Tagen entnommenen, mit Tinte perfundierten und HE-gefärbten Transplantats. Erste einwachsende GefäÙe mit enthaltenen, verbliebenen Erythrozyten sind erkennbar (Pfeile).

3.2 Regenerierende Axone

3.2.1 *Growth-associated protein-43 (GAP- 43)*

Ein gegen GAP-43 gerichteter Antikörper wurde als Marker für das Vorkommen bzw. das Einwachsen regenerierender Axone verwendet. Bei GAP-43 handelt es sich um ein intrazelluläres Phosphoprotein mit neuralspezifischer Expression im peripheren und zentralen Nervensystem. Es gilt als Hauptprotein axonaler Wachstumskegel und spielt eine wichtige Rolle bei der Axonregeneration (Benowitz & Routtenberg, 1997), bei der eine vermehrte Expression von GAP-43 stattfindet (Ng *et al.*, 1995). Schaden *et al.* (1994) fanden heraus, dass regenerationskompetente retinale Ganglienzellen GAP-43 vermehrt exprimieren, und dass die Fähigkeit zur Regeneration und die erhöhte GAP-43-Expression in kausalem Zusammenhang stehen.

Die histologischen Schnitte der einen Tag nach der Transplantation entnommenen Nervensegmente wiesen eine lediglich minimale Fluoreszenzintensität auf (Abb.10A). Nach zwei und auch nach drei Tagen konnte keinerlei Aktivität nachgewiesen werden (Abb.10B und 10C). Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität, die jedoch weiterhin sehr schwach blieb, war sieben Tage nach der Transplantation nachweisbar (Abb.10D). Erst nach 15 Tagen (Abb.10E) war in einigen Bereichen eine deutliche Anfärbung der länglich dargestellten Axone immunhistochemisch sichtbar. Die maximale Fluoreszenzintensität konnte nach 21 Tagen beobachtet werden (Abb.10F). Nach 84 Tagen wiederum war die Fluoreszenzmarkierung der regenerierenden Axone durch den gegen GAP-43 gerichteten Antikörper verringert (Abb.10G).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Regeneration der axotomierten zentralen Axone zeitlich verzögert zur bereits am dritten Tag nach der Transplantation beginnenden Revaskularisierung stattfindet (Vergleich Abb.3 und Abb.11).

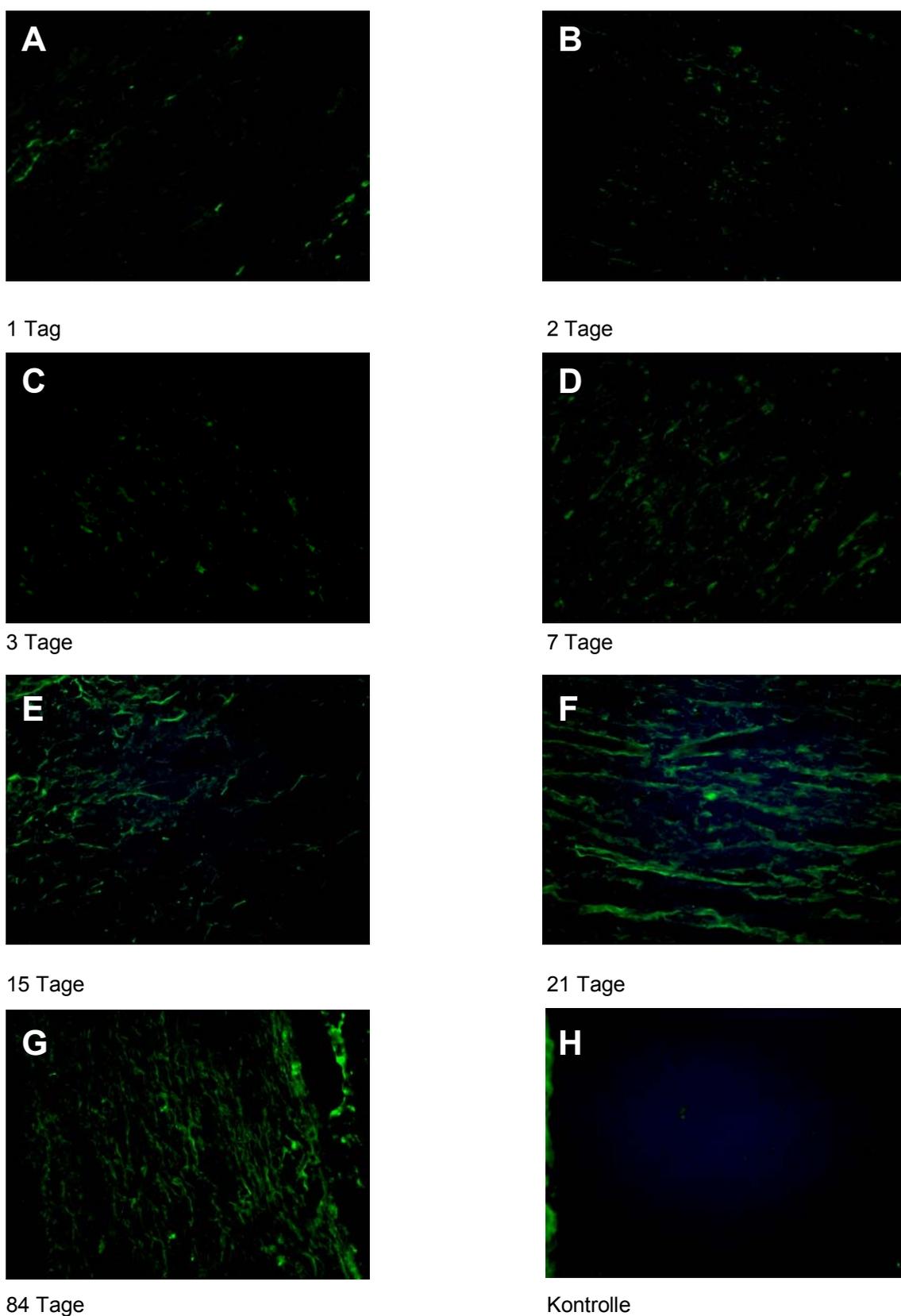


Abbildung 10 (A-H): Verlauf der GAP-43-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Nur langsamer Anstieg der Intensität; Beginn nach sieben Tagen (D); Maximum nach 21 Tagen (F).

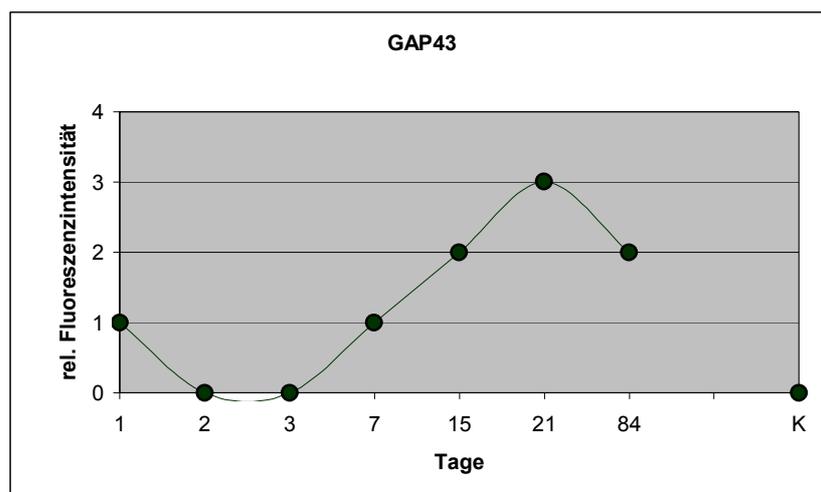


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Anfärbarkeit von Transplantatschnitten mit einem gegen GAP-43 gerichteten Antikörper. Nur langsamer, erst am siebten Tag beginnender Anstieg der Intensität, die nach 21 Tagen das Maximum erreicht. (K: Kontrolle; rel. Fluoreszenzintensität: relative Fluoreszenzintensität)

3.3 Schwann-Zellen

3.3.1 Galactocerebrosid

Einer der beiden zur Darstellung vitaler Schwann-Zellen verwendeten Antikörper ist gegen Galactocerebrosid gerichtet. Hierbei handelt es sich um ein Galactosphingolipid, welches auf der Oberfläche von Oligodendrozyten im zentralen und Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem lokalisiert ist und überdies eine wichtige Rolle bei Myelinisierungsprozessen spielt (Stoffel & Bosio, 1997).

Die Untersuchungen für Galactocerebrosid zeigten bei den Präparaten nach einem, zwei, drei und sieben Tag(en) eine etwa gleich bleibende Fluoreszenzmarkierung (Abb.12A-D). Die angefärbten, relativ kleinen Schwann-Zellen stellten sich schmal und länglich dar. Ihre Anzahl war während der ersten drei Tage nach der Transplantation im Vergleich zu späteren Untersuchungszeitpunkten erhöht. Dies kann als Zeichen der Proliferation dieser Zellen gewertet werden.

Bei den 15 bzw. 21 Tage nach der Transplantation entnommenen Nervensegmenten konnte man eine Zunahme der Dicke bzw. des Volumens der markierten Schwann-Zellen beobachten. Zwischen den angefärbten Strukturen befanden sich nun größere, nicht fluoreszenzmarkierte Areale (Abb.12E und 12F). Die Fluoreszenzintensität selbst blieb relativ konstant (Abb.14).

Nach 84 Tagen stellten sich die Zellen wiederum etwas verändert dar. Sie erschienen in ihrer Struktur nicht mehr so dick und voluminös, sondern eher dünn und faserig (Abb.12G).

Die Ergebnisse zeigen eine relative Stabilität der Schwann-Zellen. Ungeachtet dessen deuten die strukturellen Veränderungen nach 84 Tagen auf eine bindegewebige Umwandlung der blind endenden Transplantate hin.

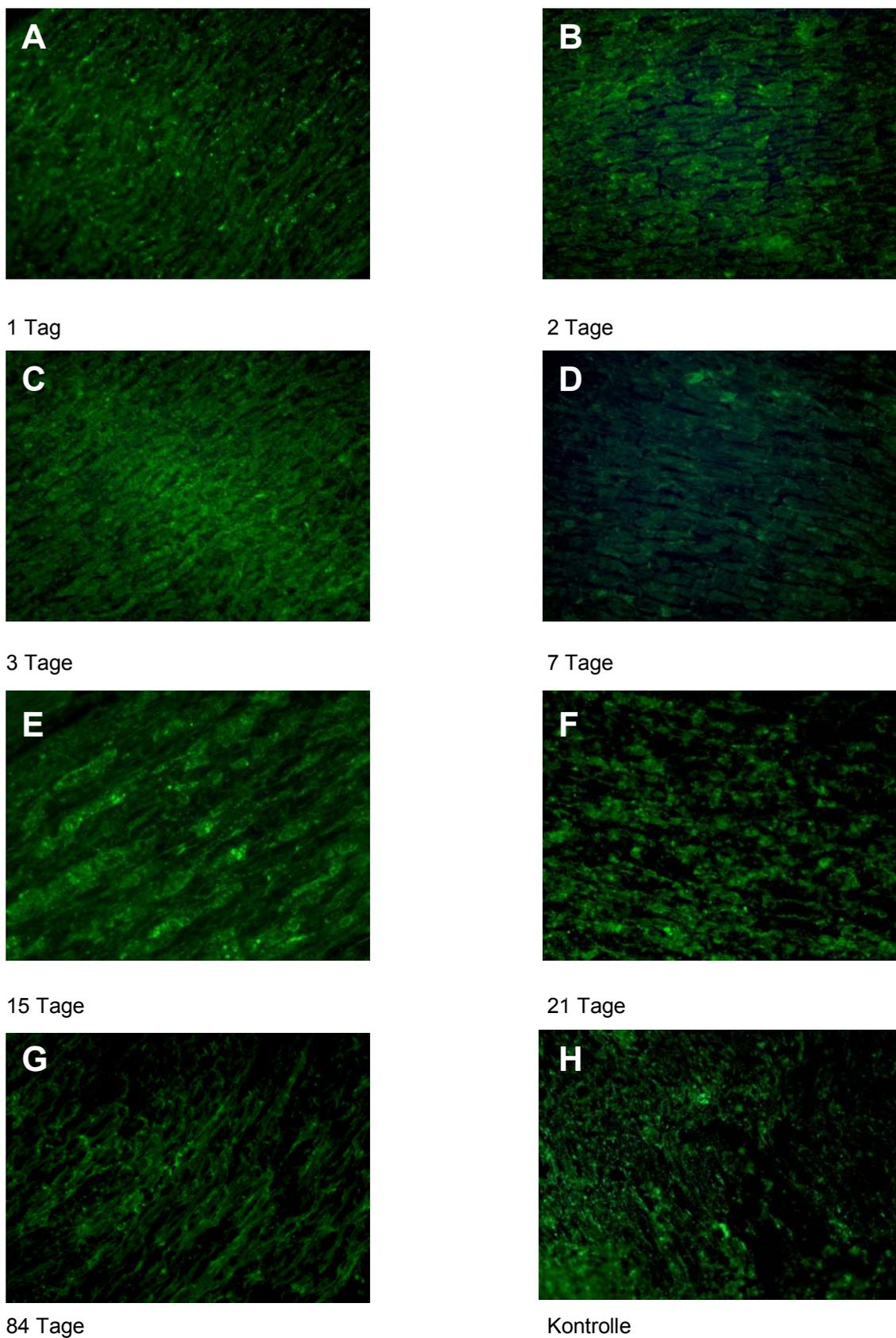
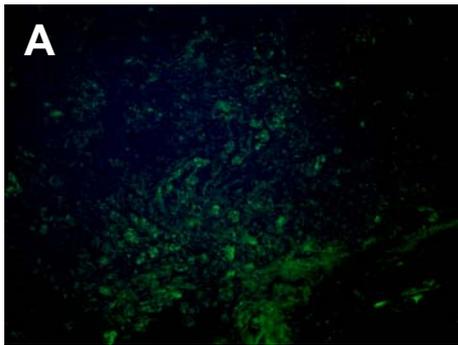
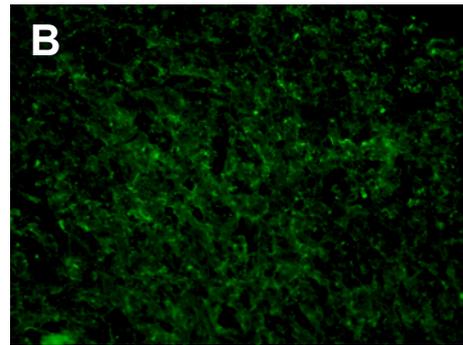


Abbildung 12 (A-H): Verlauf der Galactocerebroside-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Vergleichbare Intensität bei den Schnitten aller untersuchten Zeitpunkte.



3 Tage



21 Tage

Abbildung 13 (A-B): Verlauf der Galactocerebroside-Fluoreszenzintensität an Querschnitten.

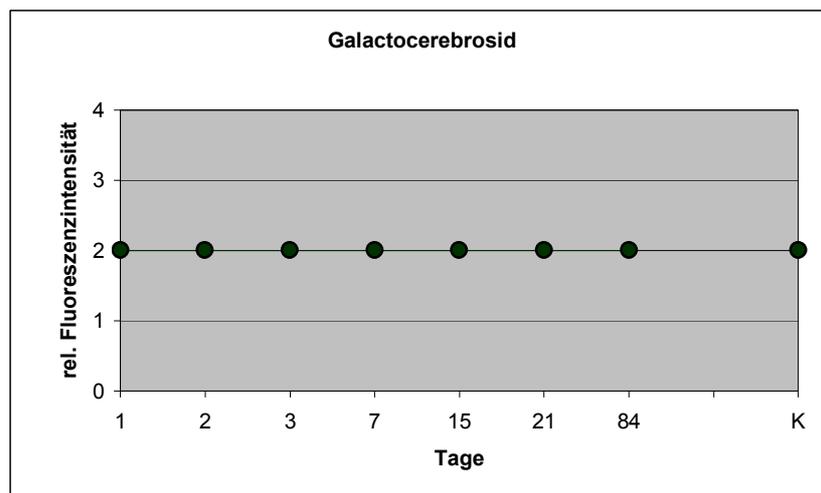


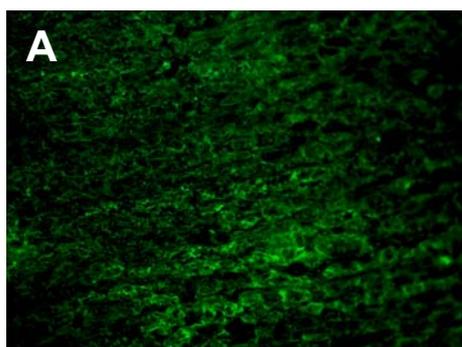
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Anfärbarkeit von Transplantatschnitten mit einem gegen Galactocerebroside gerichteten Antikörper. Vergleichbare Intensität bei den Schnitten aller untersuchten Zeitpunkte. (K: Kontrolle; rel. Fluoreszenzintensität: relative Fluoreszenzintensität)

3.3.2 S-100

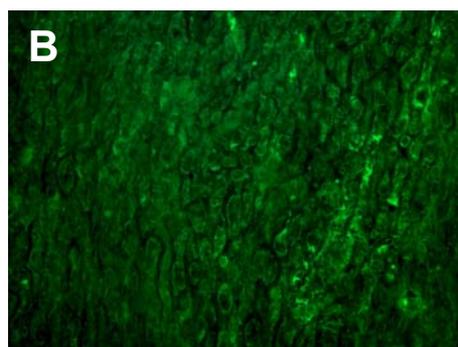
Der Zweite zur Darstellung der Schwann-Zellen verwendete Antikörper ist gegen S-100 gerichtet. Hierbei handelt es sich um ein unter anderem in Schwann-Zellen vorkommendes Protein.

Die Untersuchungen für S-100 ergaben eine relativ konstante Fluoreszenzintensität für den gesamten Beobachtungszeitraum vom ersten bis zum 84. Tag nach der Transplantation. Die maximale Anzahl der Schwann-Zellen konnte während der ersten drei Tage (Abb.15A, 15B und 15C) beobachtet werden, wobei die durchschnittliche Größe der Zellen in diesem Zeitraum eher gering war. Nach 15 und 21 Tagen (Abb.15E und 15F) war ebenso wie bei dem gegen Galactocerebrosid gerichteten Antikörper eine Größenzunahme der Zellen zu verzeichnen und es waren Areale ohne Fluoreszenzmarkierung erkennbar.

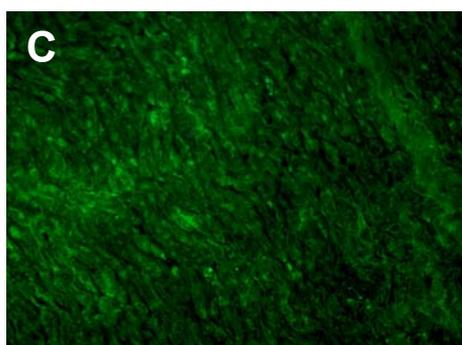
Auch bei der Markierung durch diesen Antikörper erschien die Struktur der Zellen 84 Tage nach der Transplantation faserig verändert (Abb.15G), was auf eine bindegewebige Umwandlung der blind endenden Transplantate hinweist.



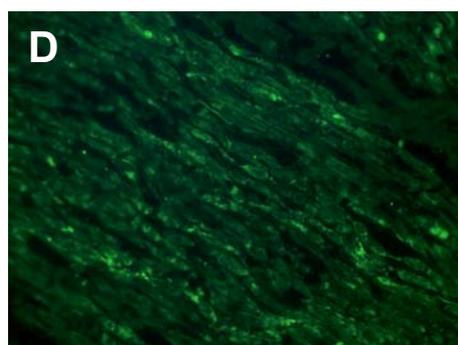
1 Tag



2 Tage



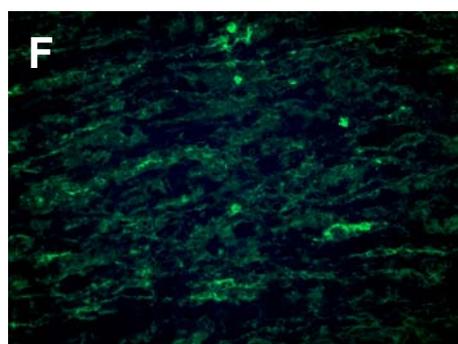
3 Tage



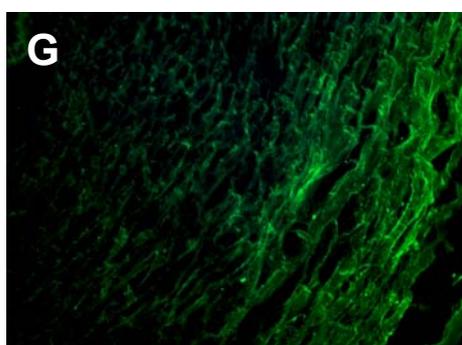
7 Tage



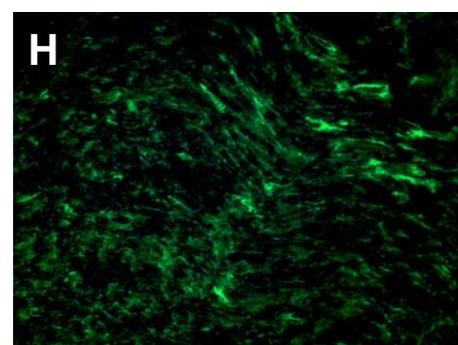
15 Tage



21 Tage

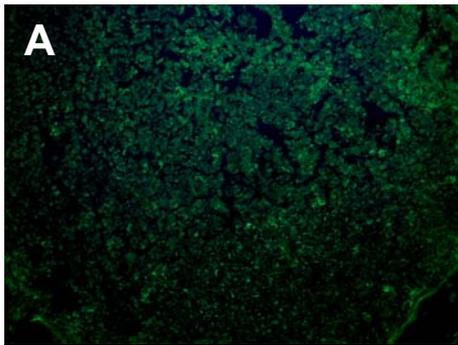


84 Tage

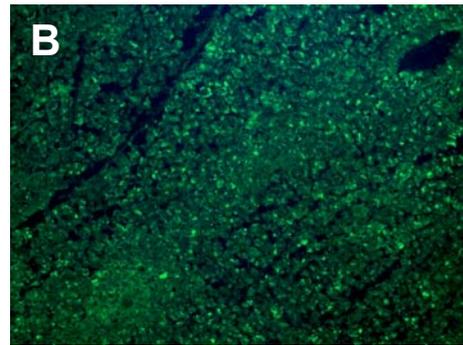


Kontrolle

Abbildung 15 (A-H): Verlauf der S-100-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Vergleichbare Intensität bei den Schnitten aller untersuchten Zeitpunkte.



3 Tage



7 Tage

Abbildung 16 (A-B): Verlauf der S-100-Fluoreszenzintensität an Querschnitten. Vergleichbare Intensität am dritten (A) und siebten (B) Tag.

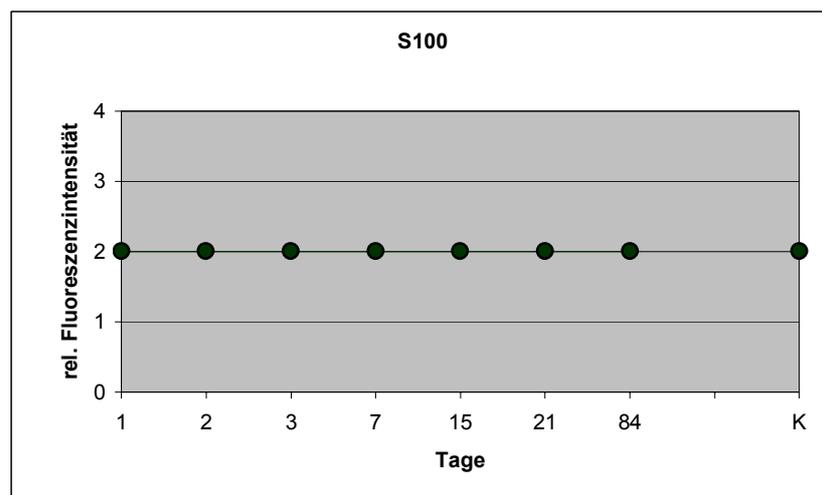


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Anfärbarkeit von Transplantatschnitten mit einem gegen S-100 gerichteten Antikörper. Konstante Fluoreszenzintensität bei den Schnitten aller untersuchten Zeitpunkte. (K: Kontrolle; rel. Fluoreszenzintensität: relative Fluoreszenzintensität)

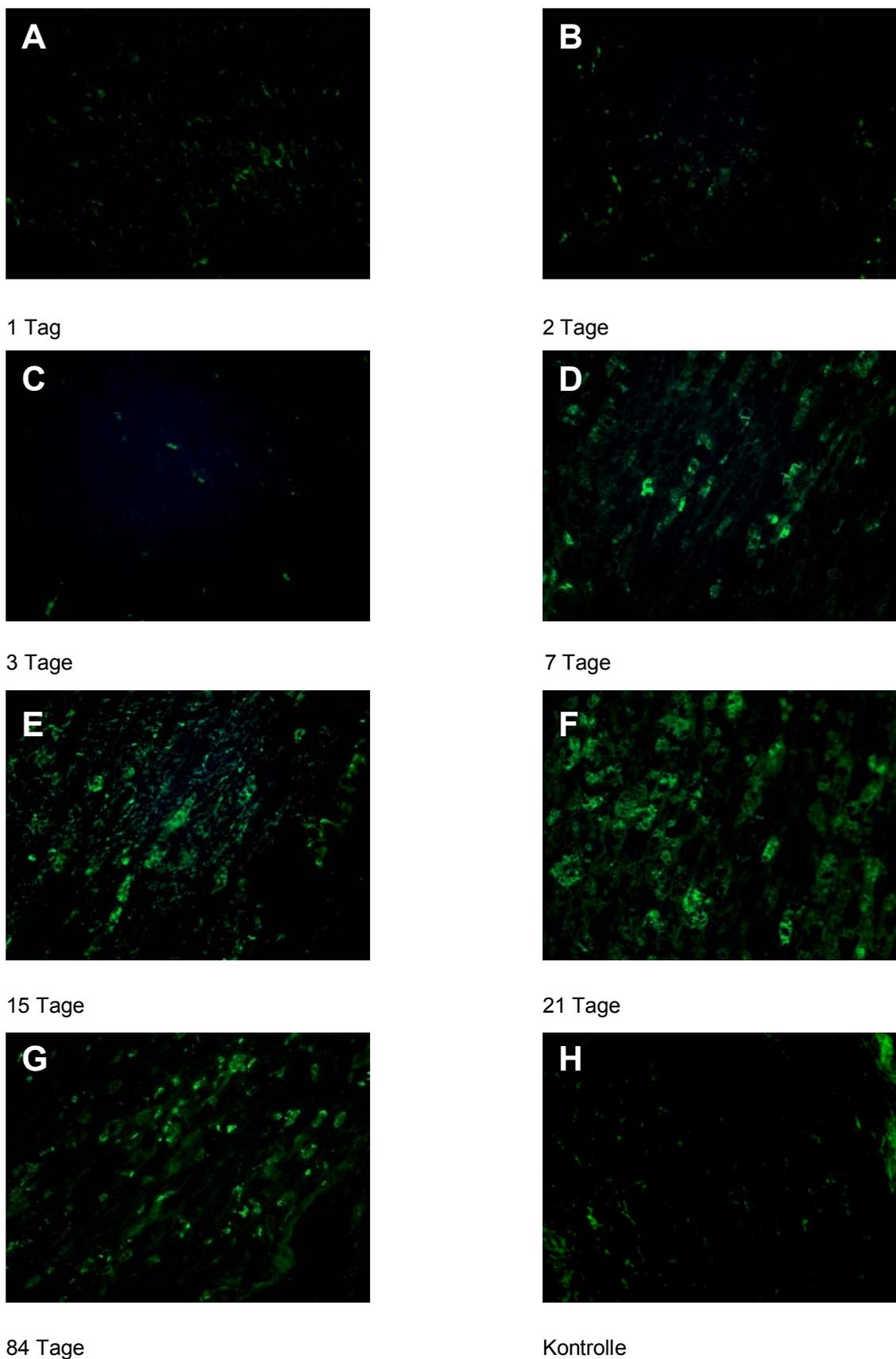
3.4 Makrophagen

3.4.1 ED-1

Zur Untersuchung der Invasion phagozytärer Zellen bzw. aktiver Makrophagen wurde der Antikörper ED-1 verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der gegen ein Glykoprotein bzw. Antigen von etwa 90 bis 100 KD gerichtet ist. Dieses Antigen wird insbesondere auf lysosomalen Membranen, aber auch auf der Zelloberfläche von Gewebsmakrophagen exprimiert. Das Ausmaß der Antigenexpression korreliert hierbei mit der phagozytotischen Aktivität der Zellen (Damoiseaux *et al.*, 1994).

Die Nervensegmente, die zwischen dem ersten und dritten Tag nach der Transplantation entnommen wurden, wiesen ebenso wie die Kontrolle nur eine minimale Fluoreszenzmarkierung durch den Antikörper auf (Abb.18A, 18B, 18C und 18H). Nach sieben bzw. 15 Tagen zeigte sich eine deutliche fluoreszenzmikroskopische Darstellung der durch den verwendeten Antikörper markierten Makrophagen (Abb.18D und 18E). Die größte Anzahl aktiver Makrophagen konnte nach 21 (Abb.18F) und 84 (Abb.18G) Tagen beobachtet werden. Nach 21 Tagen fiel zusätzlich eine enorme Größenzunahme der Zellen auf, die als Zeichen der gesteigerten phagozytotischen Aktivität und der Debrisaufnahme zu werten ist.

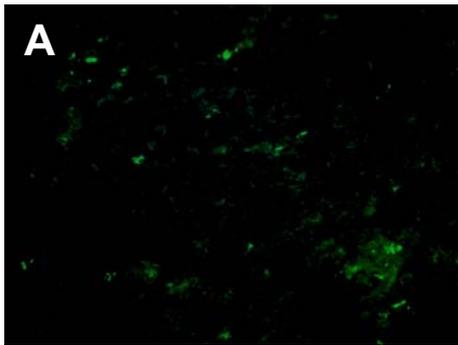
Die Makrophagenaktivierung beginnt diesen Ergebnissen zufolge zwischen dem dritten und siebten Tag nach der Transplantation (Abb.20).



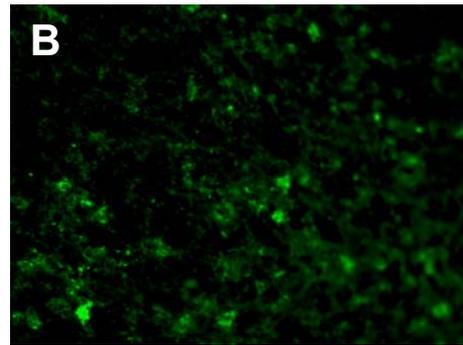
84 Tage

Kontrolle

Abbildung 18 (A-H): Verlauf der ED-1-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Beginn der Makrophagenaktivierung zwischen dem dritten (C) und siebten (D) Tag.



3 Tage



21 Tage

Abbildung 19 (A-B): Verlauf der ED-1-Fluoreszenzintensität an Längsschnitten. Geringe Fluoreszenzintensität am dritten (A) und maximale Fluoreszenzintensität am 21. (B) Tag.

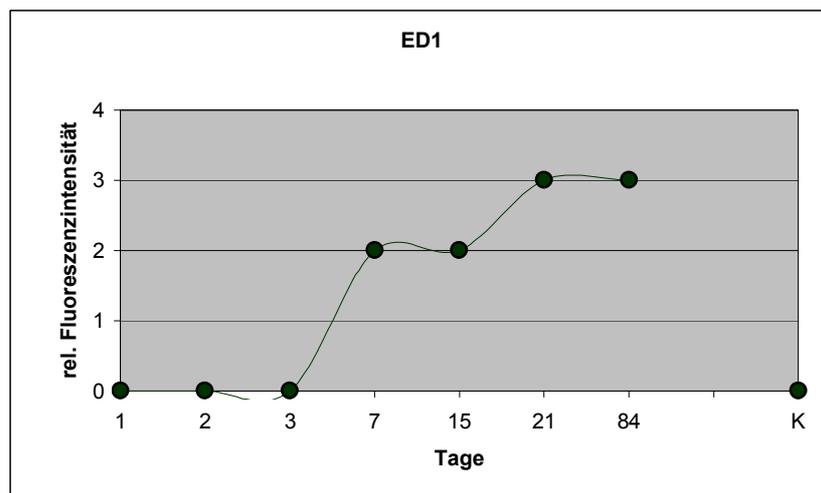


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Anfärbarkeit von Transplantatschnitten mit dem Antikörper ED-1 zur Markierung von Makrophagen. Beginn der Aktivierung zwischen dem dritten und siebten Tag nach der Transplantation, danach weiterer Anstieg der Anzahl phagozytärer Zellen. (K: Kontrolle; rel. Fluoreszenzintensität: relative Fluoreszenzintensität)

4 DISKUSSION

In dieser Studie wurde die Revaskularisierung von Segmenten des *N. ischiadicus*, die an den axotomierten *N. opticus* transplantiert wurden, im Zusammenhang mit der Regeneration der zentralen Axone untersucht. Ferner wurde die Reaktion der Schwann-Zellen beobachtet, die vor allem wegen der von ihnen synthetisierten funktionellen Substanzen eine essentielle Rolle bei der Regeneration spielen. Ihr Überleben ist abhängig von einer zeitigen Revaskularisierung der Transplantate. Bestandteil der Untersuchung war außerdem der zeitliche Ablauf der Makrophagenreaktion.

Bevor die Ergebnisse diskutiert werden, sollen sie an dieser Stelle noch einmal kurz zusammengefasst werden:

1) Revaskularisierung der Transplantate:

Die Untersuchung der endoneuralen Revaskularisierung der peripheren Ischiadicustransplantate mithilfe der gegen vWF und Endothelin gerichteten Antikörper ergab, dass eine Revaskularisierung ab dem dritten Tag nach der Transplantation immunhistochemisch erkennbar ist. In den folgenden Tagen nimmt die Gefäßdichte weiter zu.

Die Untersuchungen des mit Schwarztinte perfundierten Präparats, dessen Schnitte zusätzlich einer HE-Färbung unterzogen wurden, bestätigten das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchungen insofern, dass zum Beobachtungszeitpunkt vier Tage nach der Transplantation einige Gefäße sowohl im Längs- als auch im Querschnittspräparat sichtbar waren. Die Fotos des 17 Tage nach der Transplantation entnommenen, tintenperfundierten Ischiadicussegments weisen jedoch darauf hin, dass es möglicherweise auch zu diesem Zeitpunkt noch Regionen mit einer weiterhin geringen Gefäßdichte gibt. Diese scheinen sich vornehmlich im zentralen Anteil des Transplantats zu befinden. Da die Fotos jedoch nur eine externe makroskopische Ansicht erlauben und die immunhistochemischen Präparate zur Gefäßdarstellung nach 21 Tagen die stärkste Fluoreszenzintensität zeigten, ist davon auszugehen,

dass nach 21 Tagen eine ausreichende, wenn auch nicht in allen Regionen vollständige Revaskularisierung erfolgt ist.

2) Korrelation zwischen Revaskularisierung und Regeneration:

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Revaskularisierung der Transplantate, welche ab dem dritten Tag nach der Transplantation beobachtet werden konnte (s.o.), der Regeneration der GAP-43-positiven Axone, die erst ab dem siebten Tag nach der Transplantation sichtbar war, vorausgeht.

3) Schwann-Zellen:

Die Untersuchungen ergaben für den Beobachtungszeitraum von 84 Tagen eine weitgehend konstante Fluoreszenzmarkierung bei beiden verwendeten Antikörpern, wobei Veränderungen in Form und Größe der Zellen beobachtet werden konnten. Die zu Beginn kleinen, proliferierenden Zellen waren nach 21 Tagen vergrößert, jedoch in ihrer Gesamtzahl reduziert. Nach 84 Tagen war eine Veränderung der Strukturen erkennbar, die auf eine bindegewebige Umwandlung des blind endenden Transplantats hindeutet.

4) Makrophagenreaktion:

Eine deutliche Makrophagenaktivität konnte ab dem siebten Tag nach der Transplantation beobachtet werden. Innerhalb der ersten drei Tage traten Makrophagen hingegen nur vereinzelt auf. Die Makrophagenaktivierung findet folglich zwischen dem dritten und siebten Tag statt.

4.1 Revaskularisierung von Transplantaten

Die Verwendung peripherer Nerventransplantate am durchtrennten *N. opticus* ist eine etablierte Methode, den Axonen retinaler Ganglienzellen eine zumindest partielle Regeneration zu ermöglichen. Trotz weitläufiger Untersuchungen zu diesem Thema wurde der Aspekt der Revaskularisierung der Transplantate bis jetzt jedoch weitgehend vernachlässigt. Aus diesem Grund ist lediglich ein Vergleich mit der in der Literatur besser beschriebenen Revaskularisierung peripherer Nerventransplantate im peripheren Nervensystem möglich.

Die Ergebnisse verschiedener Autoren zu diesem Thema sind jedoch kontrovers, insbesondere bezüglich des Zeitpunktes und der Art der Revaskularisierung. Dies ist wahrscheinlich sowohl auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden als auch auf die Verwendung unterschiedlicher Versuchstiere zurückzuführen. Ferner spielen vermutlich auch Differenzen in der Transplantatlänge, dem Transplantatdurchmesser und in der Beschaffenheit des Transplantatbettes eine Rolle.

Die experimentellen Untersuchungsmethoden betreffend kommen zur Untersuchung der Gefäße in peripheren Nerventransplantaten neben der in dieser Studie hauptsächlich angewandten Methodik der Immunhistochemie mit fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung auch mikroangiographische und weitere histologische Techniken zur Anwendung (Best & Mackinnon, *for review*, 1994).

Die Anwendung verschiedener Methoden sollte abhängig gemacht werden vom Ziel der jeweiligen experimentellen Untersuchung. Best und Mackinnon (1991) unterscheiden bei der Untersuchung der Gefäße peripherer Nerven grundsätzlich drei Kategorien von Studien, wobei jeweils unterschiedliche Untersuchungsziele bestehen; sie differenzieren zwischen anatomischen, physiologischen und immunologischen Studien.

Die anatomischen Methoden eignen sich beispielsweise zur dreidimensionalen Darstellung eines Gefäßsystems, die physiologischen eher zur Bestimmung der Durchblutung bzw. Blutflussrate, während die immunologischen Verfahren sich

zum Nachweis von Gefäßen an sich eignen und deshalb in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

Die Verwendung unterschiedlicher Versuchstiere hat zur Folge, dass ein direkter Vergleich der Experimente nur beschränkt möglich ist. Dies resultiert im Besonderen aus der Tatsache, dass der Durchmesser der verwendeten Nerventransplantate bei Ratten, Kaninchen, Hunden und Affen naturgemäß verschieden ist. Best und Mackinnon (1999a) befassten sich mit diesem Problem und untersuchten die Revaskularisierung von Transplantaten mit kleinem und großem Durchmesser im Vergleich. Ihren Ergebnissen zufolge findet bei Transplantaten mit kleinem Durchmesser (in ihrer Versuchsreihe der *N. ischiadicus* bei Ratten und der *Nervus peroneus* bei Affen) eine spontane Revaskularisierung statt, während bei Transplantaten mit großem Durchmesser (*Nervus suralis* bei Affen) keine ausreichende Revaskularisierung erfolgt und somit eine erfolgreiche Regeneration nicht stattfinden kann.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse von Studien mit unterschiedlichen Versuchstieren ist daher nur bedingt möglich. Er soll jedoch trotzdem gezogen werden, um eine möglichst breite Vielfalt von Ergebnissen verschiedener Autoren zu zeigen.

Die zentralen Themen bei den Untersuchungen zur Revaskularisierung peripherer Nerventransplantate im peripheren Nervensystem sind jedoch der Zeitpunkt und die Art der Revaskularisierung.

Bereits 1945 führten Tarlov und Epstein Versuche mit peripheren Ischiadicustransplantaten mit einer Länge von 3 cm bei Hunden durch und fanden durch mikroangiographische Untersuchungen heraus, dass eine Revaskularisierung in longitudinaler Richtung ab dem dritten Tag nach der Transplantation beginnt. Die von der Umgebung, d.h. dem Gewebebett, in dem sich das Transplantat befindet, ausgehende Revaskularisierung findet allerdings erst ab dem sechsten Tag statt. Ein Abschluss der

Revaskularisierung erfolgt ihren Ergebnissen zufolge erst nach drei Wochen (Tarlov & Epstein, 1945, zit. in Best & Mackinnon, 1994).

Weiss und Taylor kamen 1946 zu dem Ergebnis, dass eine Revaskularisierung von Ischiadicustransplantaten bei Ratten zwischen dem zweiten und vierten Tag nach der Transplantation beginnt (Weiss & Taylor, 1946, zit. in Best & Mackinnon, 1994).

Die Ergebnisse von Almgren (1974), der tibiale Transplantate bei Kaninchen mit stereomikroangiographischen Methoden untersuchte, besagen, dass eine Revaskularisierung ab dem dritten Tag nach der Transplantation beginnt.

McCullough *et al.* (1984) untersuchten Ischiadicustransplantate bei Ratten ebenfalls mittels Mikroangiographie und Histologie. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Revaskularisierung ab dem dritten Tag beginnt und etwa am neunten Tag abgeschlossen ist. Zusätzlich führten sie Versuche mit polyethylenummüllten Transplantaten durch, bei denen ein laterales Einwachsen der Gefäße verhindert wurde, so dass eine Revaskularisierung lediglich in longitudinaler Richtung möglich war. Diese Transplantate waren nach 15 Tagen im mittleren Segment noch avaskulär; eine vollständige Revaskularisierung konnte erst nach 24 Tagen beobachtet werden.

Die Ergebnisse von Penkert *et al.* (1988), die Ischiadicustransplantate bei Kaninchen mikroangiographisch untersuchten, besagen, dass der früheste Zeitpunkt der Revaskularisierung autologer Transplantate der dritte Tag nach der Transplantation ist. Zusätzlich untersuchten sie den Mechanismus der Revaskularisierung, indem bei einer Versuchsgruppe die Enden der Transplantate durch die Verwendung einer Membran isoliert wurden. Dadurch wurde das Einwachsen der Gefäße in longitudinaler Richtung verhindert. Bei einer weiteren Versuchsgruppe wurde eine laterale Umhüllung durchgeführt, so dass eine Isolierung der Transplantate vom Transplantatbett stattfand. Bei der proximalen/distalen Isolierung der Transplantate waren die ersten Gefäße am

vierten postoperativen Tag sichtbar, während bei der lateralen Isolierung die Revaskularisierung stärker behindert zu sein schien und auch nach sechs Tagen nur geringfügig erkennbar war.

Zusammenfassend kamen Penkert *et al.* zu dem Ergebnis, dass die longitudinale Revaskularisierung im Vergleich zu der vom Transplantatbett ausgehenden eine untergeordnete Rolle spielt. Ihren Ergebnissen zufolge sind die entscheidenden Kriterien bei der Revaskularisierung insbesondere der Transplantatdurchmesser und die Beschaffenheit des Transplantatbettes. Die Länge des Nervensegments spielt eine eher untergeordnete Rolle, solange ein Einwachsen der Gefäße vom Gewebbett aus möglich ist.

Auch Prpa *et al.* (2002) kamen nach Versuchen mit lateral umhüllten Transplantaten zu dem Ergebnis, dass die Neovaskularisation ausgehend vom Gewebbett der dominierende Mechanismus bei Transplantaten ist.

Diesen Ergebnissen steht das von Best und Mackinnon (1999b) gegenüber, die der longitudinalen eine der von außen stattfindenden Revaskularisierung übergeordnete Rolle zuschreiben. Sie untersuchten Ischiadicustransplantate mit einer Länge von 2 cm bei Ratten und kamen auch bezüglich des Zeitpunktes der Revaskularisierung zu einem anderen Ergebnis andere Autoren. Ihren Ergebnissen zufolge ist die epineurale Revaskularisierung bereits 48 Stunden und die endoneurale Revaskularisierung 72 Stunden nach der Transplantation vollständig abgeschlossen.

Lux *et al.* (1988) hingegen kamen nach histologischer Untersuchung von Saphenustransplantaten bei Hunden zu dem Ergebnis, dass die ersten Gefäße bei nicht vaskularisierten Transplantaten nach dem dritten Tag erkennbar sind, und dass im Verlauf der ersten Woche eine weitere Revaskularisierung stattfindet.

Die den Zeitpunkt der Revaskularisierung betreffenden Ergebnisse dieser Arbeit besagen, dass eine Revaskularisierung etwa am dritten Tag nach der

Transplantation beginnt und dann ein weiterer Anstieg zu verzeichnen ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen eines Großteils der in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zum Thema Revaskularisierung peripherer Nerven-
transplantate im peripheren Nervensystem überein.

Die Revaskularisierung nach einer Transplantation scheint im peripheren und zentralen Nervensystem zumindest vom zeitlichen Ablauf her vergleichbar zu sein. Das Problem der ischämischen Phase nach der Operation besteht in beiden Fällen. Hierbei gilt sowohl für das periphere als auch für das zentrale Nervensystem, dass diese Phase möglichst innerhalb weniger Tage überwunden werden muss, um ein Überleben der Zellen gewährleisten zu können.

Die Verwendung vaskularisierter Transplantate soll eine zeitliche Verkürzung der ischämischen Phase ermöglichen. Bei vaskularisierten Transplantaten des *Nervus saphenus* von Hunden konnten schon am ersten postoperativen Tag Gefäße nachgewiesen werden (Lux *et al.*, 1988), so dass die ischämische Periode auf ein Minimum reduziert war. Fraglich blieb zunächst jedoch, ob die Verkürzung der ischämischen Periode einen entscheidenden Vorteil bietet bzw. ob die Dauer dieser Phase von etwa drei bis vier Tagen bei nicht vaskularisierten Transplantaten einen entscheidenden Nachteil birgt.

Später fanden Tark und Roh (2001) durch Versuche mit vaskularisierten Ischiadicustransplantaten bei Kaninchen heraus, dass der Durchmesser regenerierender Axone bei vaskularisierten Transplantaten vergrößert ist. Überdies ist die Anzahl der Schwann-Zellen im Gegensatz zu nicht vaskularisierten Transplantaten erhöht (Tark & Roh, 2001). Durch die Verwendung vaskularisierter Transplantate scheinen die Bedingungen für eine optimale Regeneration verbessert zu sein.

Bezogen auf den Mechanismus der Revaskularisierung kamen einige Autoren, wie bereits erwähnt, zu unterschiedlichen Ergebnissen. Den Studien zufolge scheint zumindest gesichert, dass die Revaskularisierung sowohl longitudinal als auch vom Transplantatbett aus erfolgt. Letztendlich geht es um die Frage,

welcher der beiden Mechanismen überwiegt. Diesbezüglich sind die Meinungen jedoch kontrovers.

Die diese Thematik betreffenden Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass die Revaskularisierung sowohl longitudinal als auch vom Transplantatbett aus erfolgt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der endoneuralen Gefäße zeigen eine relativ gleichmäßige Gefäßdichte im Verlauf der Transplantate. Die Fotos des mit Schwarztinte perfundierten Transplantats weisen jedoch tendenziell eher auf eine longitudinale Revaskularisierung hin. Da in dieser Arbeit allerdings keine speziellen Methoden zur Untersuchung des Revaskularisierungsmechanismus zur Anwendung kamen, können die Ergebnisse lediglich die bereits bestehende These, die besagt, dass es zwei verschiedene Mechanismen gibt, tendenziell bestätigen. Sie geben jedoch keinen Aufschluss darüber, welcher dieser beiden Mechanismen dominiert.

4.2 Regeneration der Axone

Neben dem zeitlichen Verlauf der Gefäßentwicklung sollte in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der Revaskularisierung und der Regeneration der Axone retinaler Ganglienzellen in periphere Nerventransplantate untersucht werden. Mit dieser Thematik beschäftigten sich bisher nur wenige Studien, die ausschließlich den Zusammenhang der Gefäßentwicklung mit der Nervenregeneration im peripheren Nervensystem thematisieren.

Hobson *et al.* (1997) fanden durch Untersuchungen an einem Fibronectin-Modell heraus, dass die Revaskularisierung der Regeneration von Axonen peripherer Neurone vorausgeht. Dies bestätigt die These, dass die Revaskularisierung der durch sie erst ermöglichten Regeneration vorausgeht und vorausgehen muss, denn nur durch die nutritive Versorgung der Zellen, die über die Blutgefäße gesichert wird, wird deren Überleben und damit auch das Überleben der potentiell einwachsenden Axone ermöglicht.

McCullough *et al.* (1984) zeigten jedoch, dass auch in mittleren, nicht vaskularisierten Anteilen polyethylenhüllter peripherer Nerven-Transplantate zum Teil regenerierende Axone zu finden sind. Möglicherweise wird durch die proximal vorhandenen Gefäße eine zumindest temporär ausreichende Versorgung der Zellen gewährleistet, die eine weitere Regeneration der Axone begünstigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, mit dem Vorgenannten teilweise übereinstimmend, dass eine Regeneration erst nach dem Beginn der Revaskularisierung, also zeitlich verschoben, stattfindet.

Die ersten einwachsenden Axone, markiert mithilfe von GAP-43, konnten erst sieben Tage nach der Transplantation beobachtet werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Thanos und Vanselow (1989) überein, die herausfanden, dass bei einer Durchtrennung des *N. opticus* und nachfolgender Transplantation eines peripheren Nerven-segments sechs Tage nach der Operation ein erstes Einwachsen der Axone in den peripheren Nerv zu beobachten ist.

4.3 Schwann-Zellen

Die Schwann-Zellen eines peripheren Nerven-Transplantats spielen bei den Regenerationsvorgängen eine besondere Rolle. Ihre Vitalität wird aufgrund der von ihnen produzierten funktionellen Substanzen, die sowohl das Überleben der RGZ als auch die Regeneration der Axone fördern, als essentiell für eine potentielle Regeneration angesehen. Die Regeneration retinaler Ganglienzellaxone in periphere Nerven-Transplantate respektive auch die Nervenregeneration im Allgemeinen erfolgt nur in Anwesenheit vitaler Schwann-Zellen (Berry *et al.*, 1988; Terenghi, 1995).

Dessen ungeachtet ist die besondere Bedeutung der Schwann-Zellen während der Regeneration auch auf die von ihnen synthetisierten Zelladhäsionsmoleküle

zurückzuführen. Diese stellen den Kontakt zwischen Schwann-Zellen und regenerierenden Axonen her und ermöglichen somit eine direkte und dynamische Kommunikation zwischen beiden (Dezawa & Adachi-Usami, 2000). Dieser Kontakt ist unerlässlich für eine Regeneration. Bei der Regeneration retinaler Ganglienzellen in periphere Nerven-Transplantate konnten verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie L1 und NCAM sowie Zell-Zell-Kontaktproteine, welche die Bildung von *tight-* und *gap-junctions* ermöglichen, nachgewiesen werden (Dezawa & Nagano, 1996).

Ein weiterer Aspekt ist die Proliferation der Schwann-Zellen, die als Reaktion auf die nach einer Nervendurchtrennung stattfindende Waller-Degeneration erfolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine erhöhte Anzahl der Schwann-Zellen insbesondere während der ersten drei Tage nach der Transplantation und bestätigen die Resultate von Stoll und Müller (1999), die das Maximum der Zellteilung nach drei Tagen vermuten.

4.4 Makrophagen

Die Makrophagenaktivierung nach einer Nervenverletzung als Teil der inflammatorischen Immunantwort spielt insofern eine entscheidende Rolle bei der Regeneration, als dass diese Zellen eine potentielle Nervenregeneration erleichtern. Sie unterstützen den Heilungsprozess nach einer Verletzung durch phagozytotische sowie sekretorische Mechanismen.

Nach einer Verletzung erfolgt die Makrophagenaktivierung im PNS relativ schnell, während sie im ZNS unterdrückt ist.

Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die phagozytotische Aktivität der Makrophagen durch Kontakt mit dem ZNS inhibiert wird, und dass sich die umgebungsbedingte verminderte inflammatorische Reaktion nach einer Nervenverletzung im ZNS negativ auf eine mögliche Nervenregeneration auswirkt (Zeev-Brann *et al.*, 1998; Avellino *et al.*, 1995). Somit scheint die

unzureichende inflammatorische Reaktion nach einer Verletzung zumindest teilweise verantwortlich für die mangelhafte Regeneration im ZNS zu sein.

Die Relevanz der Makrophagenaktivierung nach einer Verletzung beweist auch die Studie von Dahlin (1995). Er fand heraus, dass bei Behinderung der Makrophageninvasion eine Beeinträchtigung der axonalen Regeneration im peripheren Nervensystem zu beobachten ist.

Andere Studien zeigen, dass durch die Stimulierung der phagozytotischen Aktivität von Makrophagen durch Preinkubation mit peripheren Nerven-segmenten und durch die nachfolgende Transplantation ins zentrale Nervensystem (verletzter *N. opticus*) eine axonale Regeneration ermöglicht wird (Lazarov-Spiegler, 1996). Eine retinale Makrophageninfiltration kann durch eine Linsenverletzung oder sogar durch eine zusätzliche intravitreale Zymosaninjektion zu einer erhöhten Anzahl überlebender, regenerierender Axone retinaler Ganglienzellen im verletzten *N. opticus* führen (Yin *et al.*, 2003; Leon *et al.*, 2000). Dies bestätigt die Relevanz der Makrophagen im Regenerationsprozess nach einer Nervenverletzung.

In dieser Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der nach einer Nervenverletzung auftretenden Makrophagenrekrutierung im transplantierten, peripheren Nerven-transplantat untersucht.

Die Ergebnisse zeigen eine Makrophageninvasion, die ab dem dritten Tag nach der Transplantation langsam beginnt (vorher sind nur vereinzelt Makrophagen zu beobachten) und am siebten Tag bereits deutlich ausgeprägt ist. Die Aktivierung findet demzufolge vornehmlich im Zeitraum zwischen dem dritten und siebten Tag nach der Transplantation statt.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Perry *et al.* (1987) überein, die die Makrophagenantwort nach einer Verletzung im PNS und im ZNS untersuchten. Sie fanden heraus, dass die Makrophageninvasion im peripheren Nervensystem etwa drei bis fünf Tage nach einer Verletzung stattfindet. Stoll

und Müller (1986) kamen bei ihren Untersuchungen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass nach drei Tagen die Einwanderung von Apolipoprotein E exprimierenden Makrophagen beginnt und 14 Tage nach der Verletzung des peripheren Nervs ein Maximum erreicht. Avellino *et al.* (1995) hingegen beobachteten schon einen Tag nach der Verletzung das Auftreten von Makrophagen.

Mueller *et al.* (2001) untersuchten die Unterschiede zwischen endoneuralen, also ortsansässigen und hämatogenen Makrophagen. Sie fanden heraus, dass die ortsansässigen Zellen, die in geringer Anzahl auch im intakten Nerv vorzufinden sind, etwa zwei Tage nach einer Verletzung beginnen, dass ED1-Antigen als Zeichen ihrer Aktivierung zu exprimieren. Die ED1-positiven, hämatogenen Makrophagen hingegen sind erst ab dem dritten bis vierten Tag nach einer Verletzung nachweisbar.

Die Aktivierung der endoneuralen Zellen könnte das vereinzelte Auftreten von aktiven Makrophagen in den ersten drei Tagen erklären, einem Zeitraum, in dem noch keine Einwanderung hämatogener Makrophagen erfolgt sein kann, da die Revaskularisierung erst in diesem Zeitraum beginnt.

4.5 Abschließende Bewertung

Abschließend soll noch einmal verdeutlicht werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren (Revaskularisierung, Schwann-Zellen und Makrophagen) nur durch ihr gegenseitiges Zusammenwirken eine Regeneration zentraler Axone ermöglichen können.

Nur eine zeitige Revaskularisierung kann das Überleben der für eine potenzielle Regeneration essentiellen Schwann-Zellen, das nur wenige Tage mittels Diffusion gesichert werden kann, garantieren. Der notwendige phagozytische Abbau des bei der Waller-Degeneration anfallenden Myelindebris kann nur durch eine adäquate Reaktion der Makrophagen ermöglicht werden.

In der Literatur beschäftigten sich nur wenige Autoren mit mehr als einem der relevanten Faktoren gleichzeitig.

Fansa *et al.* (2001) jedoch beobachteten die Revaskularisierung von autologen peripheren Nerventransplantaten unter anderem im Vergleich mit azellulären Transplantaten, denen Schwann-Zellen zugesetzt wurden. In diesem Zusammenhang untersuchten sie ferner die Einwanderung von Makrophagen. Sie kamen, übereinstimmend mit den Resultaten dieser Arbeit, zu dem Ergebnis, dass bei autologen Transplantaten eine Revaskularisierung nach drei Tagen beginnt, und dass ab diesem Zeitpunkt auch eine Makrophageninvasion zu beobachten ist. Die Vitalität der Schwann-Zellen wird auch hier als ein kritischer Parameter für eine mögliche Regeneration angesehen.

Obwohl die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Regeneration bei den in dieser Arbeit untersuchten Transplantaten gegeben zu sein schienen, weisen die strukturellen Veränderungen der Schwann-Zellen nach 84 Tagen sowie die zu diesem Zeitpunkt immer noch erhöhte Anzahl von Makrophagen auf einen bindegewebigen Umbau der Transplantate hin. Dies ist durch die fehlende Verbindung zum Zielgebiet des *Colliculus superior* zu erklären. Weil die Transplantate bei den durchgeführten Versuchen blind endeten, konnte eine funktionelle Restauration nicht stattfinden.

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit aber auf die Revaskularisierung gerichtet war, war dies nicht von entscheidender Relevanz.

Bei den untersuchten, relativ graziilen Nerven der Ratte scheint die Revaskularisierung rechtzeitig und relativ unproblematisch erfolgen zu können. Somit wird zumindest ein für eine potentielle Regeneration als kritisch einzustufender Parameter erfüllt.

Nichtsdestotrotz scheint die von Lux *et al.* (1988) sowie von Tark und Roh (2001) im peripheren Nervensystem beschriebene Anwendung vaskularisierter Transplantate ein vielversprechender Ansatz zu sein. Durch ihre Verwendung

kann einerseits die posttraumatische ischämische Phase verkürzt und andererseits die Anzahl der Schwann-Zellen erhöht, sowie der Durchmesser der regenerierenden Axone vergrößert werden. Dies könnte insbesondere bei Transplantaten mit größerem Durchmesser von Bedeutung sein, bei denen eine erfolgreiche Regeneration nachgewiesenermaßen problematischer ist (Best & Mackinnon, 1999a).

Als Ausblick lässt sich vorhersagen, dass die Verwendung peripherer Transplantate auch Zugang zur klinischen Forschung und möglicherweise zur Therapie finden könnte. Autologes Material hätte dann den Vorteil der fehlenden Abstoßung und zusätzlich der raschen Revaskularisierung, die als kritischer Parameter für eine erfolgreiche axonale Regeneration einzustufen ist. Angesichts fehlender Alternativen scheint dies ein plausibler Weg und erfolgsversprechender Ansatz zu sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Fähigkeit eines peripheren Nerventransplantats die Regeneration durchtrennter Axone des zentralen Nervensystems zu ermöglichen, ist abhängig vom Überleben der Schwann-Zellen. Die Revaskularisierung des Transplantats ist aufgrund der nutritiven Funktion für die Schwann-Zellen ein kritischer Parameter für eine mögliche Regeneration, weil diese Zellen nur wenige Tage über den Mechanismus der Diffusion ernährt werden können.

In dieser Studie wurden folgende Aspekte untersucht: 1) Der zeitliche Verlauf der endoneuralen Revaskularisierung von Ischiadicustransplantaten am *N. opticus*. 2) Der Zusammenhang zwischen der Revaskularisierung und der Regeneration der Axone retinaler Ganglienzellen. 3) Die nach einer Transplantation auftretende Reaktion der Schwann-Zellen und der Makrophagen.

Alle Experimente wurden am Sehnerv der Ratte durchgeführt.

Nach der Transplantation von autologen, peripheren Ischiadicusegmenten an den durchtrennten *N. opticus* wurden die peripheren Nervensegmente zu verschiedenen Zeitpunkten (am ersten, zweiten, dritten, siebten, 15., 21. und 84. Tag nach der Transplantation) wieder entnommen. Die daraufhin von den peripheren Nervensegmenten angefertigten Kryostatschnitte wurden mithilfe der indirekten Immunhistochemie mit spezifischen Antikörpern angefärbt.

Die mikroskopische Untersuchung für die gefäßendothelspezifischen Antikörper gegen den vWF und gegen Endothelin ergab, dass die Revaskularisierung der Transplantate am dritten Tag nach der Transplantation beginnt und die Gefäßdichte am siebten Tag etwa der eines normalen Nervs entspricht. Einwachsende Axone, markiert durch einen gegen GAP-43 gerichteten Antikörper, waren ab dem siebten Tag detektierbar, klar sichtbar jedoch erst nach 15 Tagen.

Die Invasion von Makrophagen, dargestellt mithilfe des Antikörpers ED-1, war erst nach sieben Tagen deutlich zu erkennen. Vereinzelt auftretende Makrophagen konnten aber bereits nach drei Tagen beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Makrophageninvasion zwischen dem dritten und siebten Tag nach der Transplantation stattfindet.

Die Schwann-Zellen wurden durch die Antikörper gegen S-100 und gegen Galactocerebroside, ein Sphingolipid des Myelins der Schwann-Zellen, markiert. Hierbei zeigte sich eine relativ konstant bleibende Fluoreszenzintensität für beide Antikörper. Die maximale Anzahl der Zellen konnte in den ersten drei Tagen nach der Transplantation beobachtet werden.

Nach 84 Tagen deutete sich eine Veränderung in der Struktur der Schwann-Zellen an, die auf eine bindegewebige Umwandlung der Transplantate hinweist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Revaskularisierung eines Transplantats der Regeneration vorausgeht, wahrscheinlich sogar Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration ist.

Unerlässlich für eine erfolgreiche Regeneration sind jedoch auch die Vitalität der Schwann-Zellen sowie die Entfernung des bei der Waller-Degeneration anfallenden Myelindebris durch Makrophagen.

Nur durch das komplexe Zusammenwirken aller Faktoren wird die Möglichkeit der Regeneration eröffnet. Die Tatsache jedoch, dass die Transplantate bei den Versuchen dieser Studie blind endeten, machte eine Fibrosierung wahrscheinlich und eine funktionelle Reparatur unmöglich.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Almgren, K. G. (1974): Revascularization of free peripheral nerve grafts: an experimental study in the rabbit. *Acta Ortho. Scand. Suppl.* 154;1-104
- 2) Avellino, A. M., Hart, D., Dailey, A. T., Mackinnon, M., Ellgala, D. and Kliot, M. (1995): Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. *Exp. Neurology* 136;183-198
- 3) Benowitz, L. I. and Routtenberg, A. (1997): GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 20;84-91
- 4) Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y.-C., Bray, G. M. and Aguayo, A. J. (1994): Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 14(7);4368-4374
- 5) Berry, M., Rees, L., Hall, S., Yiu, P. and Sievers, J. (1988): Optic axons regenerate into sciatic nerve isografts only in the presence of schwann cells. *Brain Res. Bull.* 20;223-231
- 6) Best, T. J. and Mackinnon, S. E. (1994): Peripheral nerve revascularization: a current literature review. *J. Reconstr. Microsurg.* 10;193-203
- 7) Best, T. J. and Mackinnon, S. E. (1991): Intraneural vascular investigative techniques. *J. Reconstr. Microsurg.* 7 ;245-248

- 8) Best, T. J. and Mackinnon, S. E. (1999a): Peripheral nerve revascularization: histomorphometric study of small- and large-caliber grafts. *J. Reconstr. Microsurg.* 15 ;183-190
- 9) Best, T. J. and Mackinnon, S. E. (1999b): Revascularization of peripheral nerve autografts and allografts. *Plast. Reconstr. Surg.* 104;152-160
- 10) Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M. and Aguayo, A. J. (1987): The use of peripheral nerve grafts to enhance neuronal survival, promote growth and permit terminal reconnections in the central nervous system of adult rats. *J. Exp. Biol.* 132, 5-19
- 11) Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Carter, D.A. and Aguayo, A. J. (1991): Neuronal and nonneuronal influences on retinal ganglion cell survival, axonal regrowth and connectivity after axotomy. *Ann. N Y Acad. Sci.* 633:214-228
- 12) Cajal, R. y (1928): Degeneration and regeneration of the nervous system (ed. May, R.M., trans.). *Oxford University press*, London
- 13) Caroni, P., Savio, T. and Schwab, M. E. (1988): Central nervous system regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Progress in Brain Research* 78; 363-370
- 14) Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F and Schwab, M. E. (2000): Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403;434-438
- 15) Dahlin, L. B. (1995): Prevention of macrophage response invasion impairs regeneration in nerve grafts. *Brain research* 679;274-280

- 16) David, S. and Aguayo, A. J. (1981): Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214; 931-933
- 17) Damoiseaux, J. G. M. C. , Döpp, E. A. Calame, W., Chao, D., MacPherson, G. G. and Dijkstra, C. D. (1994): Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED-1. *Immunology* 83; 140-147
- 18) Dezawa, M. and Adachi-Usami, E. (2000): Role of schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 19(2);171-204
- 19) Dezawa, M. and Nagano, T. (1996): Immunohistochemical localization of cell adhesion molecules and cell-cell contact proteins during regeneration of the optic nerve induced by sciatic nerve autotransplantation. *The Anatomical record* 246;114-126
- 20) Fansa, H., Schneider, W. and Keilhoff, G. (2001): Revascularization of tissue-engineered nerve grafts and invasion of macrophages. *Tissue Engineering* 7(5);519-524
- 21) GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T. and Strittmatter, S. M. (2000) : Identification of the nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* 403;439-443
- 22) Heiduschka, P. and Thanos, S. (2000): Restoration of the retinofugal pathway. *Progr. Ret. Eye Res.* 19 ; 577-606
- 23) Hobson, M. I., Brown, R., Green, C. J. and Terenghi, G. (1997): Interrelationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. *Brit. J. Plast. Surg.* 50; 125-131

- 24) Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A. S., Zeev-Braun, A. B., Hirschberg, D. L., Lavie, V. and Schwartz, M. (1996): Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J.* 10, 1296-1302
- 25) Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A. S., and Schwartz, M. (1998): Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve. *Glia* 24, 329-337
- 26) Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N. and Benowitz, L. I. (2000): Lens injury stimulates axon regeneration in the mature optic nerve. *J. Neurosci.* 20(12);4615-4626
- 27) Lotan, M. and Schwartz, M. (1994): Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J.* 8; 1026-1033
- 28) Lux, P., Breidenbach, W. and Firrell, J. (1988): Determination of temporal changes in blood flow in vascularized and nonvascularized nerve grafts in the dog. *Plast. Reconstr. Surg.* 82;133-144
- 29) Maffei, L., Carmignoto, G., Perry, H., Candeo, P. and Ferrari, G. (1990): Schwann cells promote the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve section. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 1855-1859
- 30) Manucci, P. M. (1998): Von willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler. Thromb. Biol.* 18(9);1359-1362
- 31) McCullough, C. J., Gagey, O., Higginson, D. W. et al. (1984): Axon regeneration and vascularization of nerve grafts: an experimental study. *J. Hand Surg.* 9B;323-327

- 32) McKerracher, L., David, S., Jackson, D. L., Kottis, V., Dunn, R. J. and Braun, P. E. (1994): Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite outgrowth. *Neuron* 13;805-811
- 33) Mey, J. and Thanos, S. (1996): Functional and biochemical analysis of CNS-relevant neurotrophic activity in the lesioned sciatic nerve of adult rats. *J. Hirnforsch.* 37, 25-50
- 34) Mueller, M., Wacker, K., Ringelstein, E. B., Hickey, W. F., Imai, Y. and Kiefer, R. (2001): Rapid response of identified resident endoneural macrophages to nerve injury. *Am. J. Pathol.* 159;2187-2196
- 35) Negishi, H., Dezawa, M., Oshitari, T. and Adachi-Usami, E. (2001): Optic nerve regeneration within artificial schwann cell graft in the adult rat. *Brain Res. Bull.* 55(3);409-419
- 36) Ng, T. F., So, K. F. and Chung, S. K. (1995): Influence of peripheral nerve grafts on the expression of GAP-43 in regenerating retinal ganglion cells in adult hamsters. *J. Neurocytol.* 24, 487-496
- 37) Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M. P. and Vidal-Sanz, M. (1996): Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3 and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37;489-500
- 38) Penkert, G., Bini, W. and Samii, M. (1988): Revascularization of nerve grafts: an experimental study. *J. Reconstr. Microsurg.* 4;319-325
- 39) Perry, V. H., Brown, M. C. and Gordon, S. (1987): The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *J. Exp. Med.* 165;1218-1223

- 40) Politis, M. J. and Spencer, P. S. (1986) Regeneration of rat optic axons into peripheral nerve grafts. *Exp. Neurol.* 91, 52-59
- 41) Prpa, B., Huddleston, P. M., An, K.-N. and Wood, M. B. (2002): Revascularization of nerve grafts: a qualitative and quantitative study of the soft-tissue bed contributions to blood flow in canine nerve grafts. *J. Hand Surg.* 27A;1041-1047
- 42) Richardson, P. M., McGuinness, U. M. and Aguayo, A. J. (1980): Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284; 264-265
- 43) Robinson, G. A., and Madison, R. D. (2000): Survival of adult rat retinal ganglion cells with regrown axons in peripheral nerve graft: a comparison of graft attachment with suture of fibrin glue. *J. Neurosurg.* 93(2):275-278
- 44) Schaden, H., Stuermer, C. A. and Bähr, M. (1994): GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J. Neurobiol.* 25, 1570-1578
- 45) Stoffel, W. and Bosio, A. (1997): Myelin glycolipids and their functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7(5);654-661
- 46) Stoll, G. and Müller, H. W. (1999): Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology* 9;313-325
- 47) Stoll, G. and Müller, H. W. (1986): Macrophages in the peripheral nervous system and astroglia in the central nervous system of rat commonly express apolipoprotein E during development but differ in their response to injury. *Neuroscience Letters* 72;233-238

- 48) Tark, K. C. and Roh, T. S. (2001): Morphometric study of regeneration through vascularized nerve graft in a rabbit sciatic nerve model. *J. Reconstr. Microsurg.* 17;109-114
- 49) Tarlov, I. M. and Epstein, J. A. (1945): Nerve grafts: the importance of an adequate blood supply. *J. Neurosurg.* 2;49
- 50) Terenghi, G. (1995): Peripheral nerve injury and regeneration. *Histol. Histopathol.* 10;709-718
- 51) Thanos, S. and Mey, J. (1995): Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J. Neurosci.* 15, 1057-1079
- 52) Thanos, S., Naskar, R. and Heiduschka, P. (1997): Regenerating ganglion cell axons of the adult rat establish the retinofugal topography and restore visual function. *Exp. Brain Res.* 114, 483-491
- 53) Thanos, S. and Vanselow, J. (1989) : Adult retinal ganglion cells retain the ability to regenerate their axons up to several weeks after axotomy. *J. Neurosci. Res.* 22; 144-149
- 54) Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Bray, G. M. and Aguayo, A.J. (1988): Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 8(1);265-280
- 55) Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M. and Aguayo, A. J. (1993): Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24, 23-26

- 56) Weibel, D., Cadelli, D. and Schwab, M. E. (1994): Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 642; 259-266
- 57) Weiss, P. and Taylor, C. (1946): The viability of isolated nerve fragments and its modification by methylene blue. *J. Cell Comp. Physiol.* 27; 87
- 58) Yin, Y., Cui, Q., Li, Y., Irwin, N., Fischer, D., Harvey, A. R. and Benowitz, L. I. (2003): Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J. Neurosci.* 23(6); 2284
- 59) Zeev-Brann, A. B., Lazarov-Spiegler, O., Brenner, T. and Schwartz, M. (1998): Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia* 23, 181- 190

7 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos, Leiter der Abteilung für experimentelle Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik Münster, für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Rita Naskar für die Durchsicht der Arbeit sowie für ihre immerwährende geduldige Hilfe bei jeglichen Problemen oder Fragen, Dr. Erik Schütz für die Durchführung der Operationen und Mechthild Wissing für die Einführung in die Technik der Immunhistochemie und alle weiteren Methoden. Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken.

8 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Leonie Höhl
Geburtsdatum: 28. April 1979
Geburtsort: Herdecke (Ruhr)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1985-1989 Grundschule Aplerbeck in Dortmund
1989-1998 Gymnasium an der Schweizer Allee in Dortmund
Mai 1998 Abitur

Studium:

Sept. 1998 Studium der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-
bis Dez. 2003 Universität Münster
August 1999 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April 2001 Zahnärztliche Vorprüfung
Dez. 2003 Staatsexamen/ Zahnärztliche Approbation

Berufliche Tätigkeit:

Januar 2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Assistenz Zahnärztin in der
bis August 2005 Poliklinik für Prothetik der Zahnklinik des
Universitätsklinikums Münster
seit September Assistenz Zahnärztin in zahnärztlicher Praxis
2005

Dortmund, den

9 ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| bzw. | beziehungsweise |
| BDNF | brain-derived neurotrophic factor |
| ca. | circa |
| DAPI | 4, 6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat |
| d.h. | das heißt |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FGF | fibroblast growth factor |
| GAP-43 | growth-associated protein-43 |
| MAG | myelin-associated glycoprotein |
| N. ischiadicus | Nervus ischiadicus |
| N. opticus | Nervus opticus |
| NGF | nerve growth factor |
| PBS | Phosphate buffered Saline |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| PNT | peripheres Nervenplantat |
| rel. | relativ(e) |
| RGZ | retinale Ganglienzelle |
| s.o. | siehe oben |
| VEP | visuell evoziertes Potential |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

9.2 Genehmigungsbescheid zur Durchführung von Tierversuchen



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Prof. Dr. Dr. Solon Thanos
Klinik und Poliklinik
für Augenheilkunde
Experimentelle Ophthalmologie der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Domagkstr. 15

48149 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 73/99)

26 . Mai 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag (Neufassung) vom 17.01.2000, hier eingegan-
gen am 26.01.2000, **und** Ergänzungen / Nachbesserungen
vom 28.03. und 08.05.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Thanos,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Be-
kanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die
Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens
erteilt:

**Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung verlet-
zungsinduzierter Genprodukte bei de- und regenerierenden Nerven.**

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreterin sind:

Herr
Prof. Dr. Dr. Solon Thanos
Klinik und Poliklinik
für Augenheilkunde
Experimentelle Ophthalmologie
Domagkstr. 15

48149 Münster

Frau
Dr. Christiane Köbbert
Klinik und Poliklinik
für Augenheilkunde
Experimentelle Ophthalmologie
Domagkstr. 15

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum **30. 06. 2003.**

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

810 Ratten und
210 Mäuse.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Die Mitarbeiter Lars Indorf, Dietmar Fischer, Mitrofanis Pavlidis, Markus Sauerborn und Arja Moghadam dürfen solange nicht am Versuchsvorhaben beteiligt werden, bis der Nachweis der Teilnahme am Versuchstierkunde-Kursus dem Veterinäramt der Stadt Münster vorliegt.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.


Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Piontkowski