

NERVEN AUS DEM LABOR – DAS *TISSUE ENGINEERING* PERIPHERER NERVEN ZUR VERSORGUNG VON NERVENVERLETZUNGEN

Hisham Fansa, Gerburg Keilhoff, Gerald Wolf, Wolfgang Schneider

Verletzungen peripherer Nerven sind häufiger als gemeinhin angenommen und werden in Deutschland noch nicht optimal behandelt. Die besten Voraussetzungen für eine gute Rekonstruktion bietet die primäre mikrochirurgische Nervennaht. Bei Defekten wird ein körpereigenes Transplantat benötigt. Dessen Entnahme führt allerdings zu Funktionsausfällen. Unsere interdisziplinäre Forschungsgruppe aus Plastischen Chirurgen und Neurobiologen beschäftigt sich mit der labortechnischen Herstellung von Nervenersatzgewebe aus einer biogenen Trägermatrix und den nerveneigenen Hüllzellen (sog. Schwannsche Zellen), die die Regeneration der Nerven verbessern.

Verletzungen (sog. Läsionen) peripherer Nerven werden in Deutschland noch immer stiefmütterlich behandelt. Die Versorgung ist aufwendig und wird selten adäquat durchgeführt. Dies liegt zum Teil daran, daß Indikationen und Techniken nur an wenigen Universitäten adäquat vermittelt werden, und damit die Studenten und späteren Ärzte insuffizient ausgebildet werden. Viele Kollegen, die Patienten mit solchen Läsionen dann außerhalb der Klinik betreuen, wissen entweder nicht von den Möglichkeiten der Versorgung oder ziehen fehlerhafte Schlüsse aus inadäquat versorgten Patienten /1/. Die Physiologie der Regeneration der Nervs erschwert zudem die sofortige Kontrolle des Operationsergebnisses, denn vom Läsionsort nach körperfern muß der Nerv erst einmal die alten Nerven- und Hüllstrukturen abbauen (Degeneration) und dann vom Läsionsort bis zum Endorgan, also beispielsweise dem Muskel, regenerieren. Dies geschieht mit einer Geschwindigkeit von maximal 1 mm am Tag und bedeutet, daß bei einer Läsion eines Handnervs auf Schulterhöhe, die Regeneration durchaus bis zu zwei Jahren dauern kann. Anders als bei einem reparierten Elektrokabel, mit dem der Nerv immer gern verglichen wird, benötigt der Nerv lange Zeit, ehe er seine Funktion wieder aufnehmen kann. Die komplexen Vorgänge sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

Läsionen peripherer Nerven finden sich vor allem bei Verletzungen der oberen Extremität, insbesondere bei Verletzungen der Hand. Während an Hals und Schulter (Plexus brachialis) die stumpfen Läsionen (also Schlag- und Traktionsschäden) im Vordergrund stehen, sind es an Arm und Hand häufiger offene Verletzungen, die eine Durchtrennung der Nerven bewirken. Unfallbedingte Nervenverletzungen an der unteren Extremität sind deutlich seltener, dafür finden sich hier aber vermehrt iatrogene, also

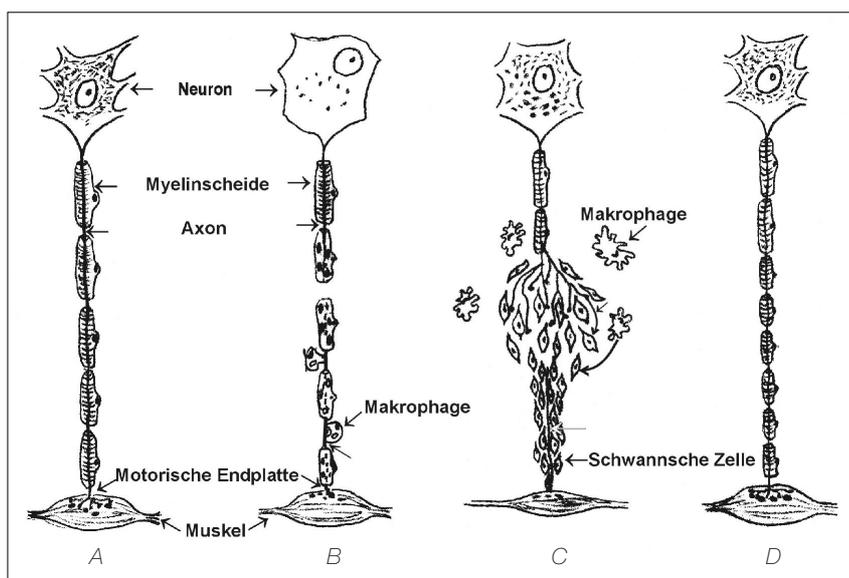


Abb. 1

Degeneration und Regeneration

Im peripheren Nerv können zwei Strukturen Schaden nehmen – die Faser selbst (Axon) und die Schwannsche Zelle mit der von ihr produzierten Hülle, der Myelinscheide. Diese ist wichtig für die Ernährung der Nervenfasern und für die Weiterleitung der elektrischen Impulse. Schematische Darstellung der wichtigsten Veränderungen nach Durchtrennung eines Axons.

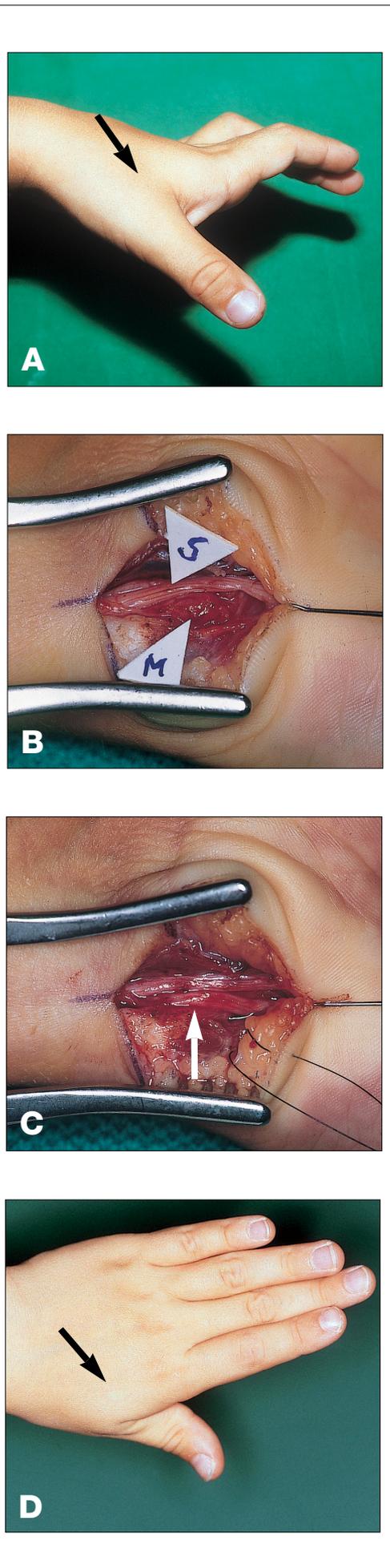
A: Normale Nervenfasern mit Neuron und Verbindung zum Skelettmuskel. Myelinisierung und Wachstumsfaktoren befinden sich im Gleichgewicht.

B: Nach Durchtrennung verlagert sich der Nucleus in die Peripherie des Neurons. Im läsionsfernen Abschnitt kommt es zur Wallerschen Degeneration (nach Augustus Waller benannt). Die myelinisierenden Komponenten werden heruntergeregelt, die Produktion der Wachstumsfaktoren gesteigert. Der Abbau der alten Myelinscheiden erfolgt zunächst durch Schwannsche Zellen, später durch hämatogene Fresszellen (Makrophagen).

C: Die proliferierenden Schwannschen Zellen bilden im körperfernen Abschnitt eine Zellsäule, das sogenannte Büngnersche Band, das dem auswachsenden Axon als Leitschiene dient. Ein kompliziertes Zusammenspiel aus Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen und der extrazellulären Matrix regelt die axonale Regeneration. Der Muskel zeigt eine Atrophie.

D: Nach erfolgreicher Regeneration kommt es zu einer Reinnervation des Muskels. Die Myelinisierung wird wieder hochreguliert.

Abb. 2
Rekonstruktion des motorischen N. ulnaris Astes der Hand
 Bei diesem siebenjährigen Jungen war der die handbinnenmuskulaturversorgende, motorische Ast des N. ulnaris durch eine Schnittverletzung durchtrennt worden. Die Läsion wurde zunächst übersehen, erst als die Parese (A: -> atrophe, eingefallene Handbinnenmuskulatur) manifest wurde, erfolgte eine Vorstellung bei uns. Der Abgang wurde dargestellt (B: S: sensibler; M: motorischer Ast des N. ulnaris) und mit einem 2,5 cm langen N. suralis-Transplantat (->) mikrochirurgisch rekonstruiert (C). Nach sechs Monaten zeigt sich eine sehr gute Funktion der Handbinnenmuskulatur, mit wieder voll ausgeprägtem Muskelbauch des M. interosseus dorsalis I (D, ->). Für eine solche Rekonstruktion ist das körpereigene Material ausreichend, die Entnahme des N. suralis führt jedoch zu einem Sensibilitätsausfall an der fibularen Fußkante.



durch den Arzt bedingte Läsionen. Auch die radikale Resektion von Tumoren kann zu Kontinuitätsunterbrechungen von Nerven führen. Häufig tritt die Verletzung des Nerven nicht isoliert auf, sondern ist mit Verletzungen von anderen Strukturen kombiniert, wie beispielsweise Sehnen-, Muskel- oder Knochenverletzungen. Daher erfolgt die Versorgung solcher Nervenläsionen meist durch den Plastischen und Handchirurgen, seltener durch den Neurochirurgen. Voraussetzung ist die Anwendung mikrochirurgischer Operationstechniken und die Logistik für die primäre und sekundäre Versorgung schwer verletzter Patienten.

Nach einer Nervendurchtrennung weist die primäre mikrochirurgische Nervennaht unter Berücksichtigung der intraneuralen Topographie die besten Regenerationsergebnisse auf. Das heißt, der Chirurg muß wissen, wo in dem Nerv die sensiblen und wo die motorischen Fasern verlaufen. Diese Nervenbündel, Faszikel genannt, müssen mikroskopisch einander zugeordnet und dann miteinander vernäht werden. Das Nahtmaterial ist hierbei dünner als ein Haar, um das Trauma am Nerv so gering wie möglich zu halten und damit die Regeneration nicht zu beeinträchtigen. Ein besonderes Problem entsteht, wenn bei sekundären Rekonstruktionen oder bei Verlust von Nervengewebe nach Trauma oder Tumoren eine Defektstrecke resultiert. Für deren Überbrückung ist derzeit das autologe Nerventransplantat, also die Verwendung eines „überflüssigen“ körpereigenen Nerven die Therapie der Wahl (Abb. 2). Hierbei wird meist ein sensibler Nerv aus dem Bein genutzt, dessen Entnahme „vertretbare“ Defizite hinterläßt. Narben, Fehlausprossungen regenerierender Fasern und schlechte Anbindung der Transplantate an den Blutkreislauf können das Ergebnis beeinträchtigen. Zudem ist die Anzahl der zur Verfügung stehenden Spendernerven begrenzt, und ihre Entnahme führt zu neurologischen Ausfällen. Gleichzeitig ist die Qualität der Spendernerven oftmals nicht ausreichend, um eine gute Regeneration zu gewährleisten.

Die intensive Suche nach alternativen Nerventransplantaten führte nahezu zwangsläufig zur Verwendung allogenen Materials, also körperfremden Transplantaten. Derartige Transplantate wurden experimentell und auch klinisch eingesetzt. Allogene Nerven bleiben jedoch immunogen, da die Nerven-Hüllzellen, die sogenannten Schwannschen Zellen (nach dem Erstbeschreiber, dem Neusser Physiologen Theodor Schwann; 1810-1882), aus dem Spendernerv nicht komplett durch körpereigene ersetzt werden. Sie unterliegen damit einer Abstoßungsreaktion, die nur durch eine kontinuierliche immunsuppressive Therapie unterdrückt werden kann, ähnlich wie bei einer Herz- oder Nierentransplantation. Eine derartige Therapie weist allerdings zahlreiche, zum Teil lebensbedrohliche Nebenwirkungen auf, die einen Einsatz für die Nerventransplantation derzeit nicht rechtfertigen. Weiterhin herrscht noch Unklarheit über das funktionelle

Ergebnis nach dem Einsatz allogener Transplantate, so daß sie nur in besonderen Fällen eingesetzt werden.

Vorwiegend am Modell der Ratte wurden daher verschiedene dauerhafte wie auch resorbierbare, sogenannte biodegradierbare, synthetisch hergestellte Leitschienen als Nervenersatz erprobt. Meist in der Form von Röhren wurden Laktatpolymere, Polyglactingitter, Polyethylen, Papier, Glas und Silikonpolymere eingesetzt. Auch biogene Materialien, wie autologe Kollagene, Arterien, Venen, azelluläre Nerven und azelluläre Muskeln, wurden transplantiert. Keines dieser „artifizialen“ Transplantate konnte ein so gutes Regenerationsergebnis aufweisen wie das autologe Transplantat. Allerdings waren die biogenen Materialien immer besser geeignet als die synthetischen Substanzen. Zudem stehen Venen und Muskeln als Spenderorgane im Körper in ausreichendem Maß zur Verfügung, und ihre Entnahme verursacht keine zusätzlichen Defekte.

Klinisch wurden Venen zur Überbrückung von Fingernervendefekten eingesetzt, konnten sich aber aufgrund der schlechten Regenerationsqualität beim Menschen nicht durchsetzen. Gleiches gilt für den klinischen Einsatz azellulären Muskels als Transplantat, bei dem die zellulären Elemente durch flüssigen Stickstoff (-196 °C) destruiert sind, und die Regeneration entlang der intakten Membranschleife des Muskels stattfindet.

All diese Transplantate, seien sie nun künstlich hergestellt oder biogen, enthalten keine Schwannschen Zellen. Diese aber sind notwendig zur Ernährung des Nervs, auch helfen sie dem auswachsenden Nerv, seinen richtigen Weg zu finden, und sie sind für die Isolierung des Nervs und damit für Reizleitung unerlässlich. Schwannsche Zellen müssen in diese Transplantate erst aus dem proximalen (körpernah) und distalen (körperfern gelegen) Stumpf einwachsen /2/. Bei längeren Strecken versagen also diese zellosen Transplantate. Da aber gerade die längeren Strecken beim Menschen problematisch sind, haben die lediglich als Leitschienen konzipierten Transplantate nur bedingte Indikationen in der Klinik gefunden.

Das ideale „artifiziale“ Transplantat ist also dasjenige, das eine dem autologen Transplantat ähnliche Regeneration ermöglicht und dessen Herstellung keine neurologischen Defizite hervorruft.

In einer tierexperimentellen Untersuchung hat unsere interdisziplinäre Forschungsgruppe aus Plastischen Chirurgen und Neurobiologen geprüft, ob und inwieweit es möglich ist, diesem Ideal des autologen Nervs durch Entwicklung eines Transplantates näherzukommen, indem eine als Leitschiene fungierende Matrix mit vitalen Schwannschen Zellen ausgestattet wird, um die Regeneration zu begünstigen. Dazu wurden als Trägermatrix verschiedene biogene Gewebe erprobt, da sie sich den derzeit erhältlichen synthetisch hergestellten Materialien als überlegen erwiesen haben: azelluläre Muskeln, Venen, Epineurium und azelluläre Nerven. Schwannsche

Lebenswissenschaften inkl.
Zell-, Molekular-, Entwicklungsbiologie,
molekulare Genetik, Biochemie, Immunologie

TISSUE ENGINEERING

Klinische Disziplinen,
medizinische Grundlagenfächer,
experimentelle Chirurgie

Zellkulturtechnik,
Materialwissenschaften,
Bioverfahrenstechnik

Tissue Engineering (TE) ist die Konstruktion eines Gewebes, also eines Organs, aus lebenden Zellen und einem Gerüst für diese Zellen. Dies geschieht außerhalb des Körpers in speziellen Laboren (also *in vitro*). Die Kultivierung von Zellen für die therapeutische, diagnostische und wissenschaftliche Verwendung ist bereits in vielen medizinischen Bereichen etabliert. Eingesetzt werden hierbei einzelne Zellen, Zellsuspensionen oder kultivierte Zellverbände in Kombination mit biogenen oder synthetischen Materialien. Das TE hat gleichsam die Schaffung eines „Ersatzteillagers“ für den Menschen zum Ziel und stellt damit die Labor-Alternative zur allogenen, also körperfremden, Transplantation dar.

Der Begriff TE wird meist mit der *Ex-vivo*-Herstellung von Organen wie Leber, Herz oder Niere assoziiert. Hierbei wird versucht, in Bioreaktoren oder spezialisierten Kultursystemen mit Gerüsten aus abbaubaren Polymeren und Zellen einen Zellverband, ein Organ, herzustellen. Das Hauptproblem dieser Technik besteht derzeit in der Herstellung der Durchblutung solcher Organe. Kann eine Blutversorgung nicht mitgezüchtet werden, ist das fertige Organ beim *In-vivo*-Einsatz auf ein Überleben durch Diffusion (also auf die Nährstoffe von außen) angewiesen. Das begrenzt die Einsatzmöglichkeit und Komplexität solcher künstlich hergestellter Organe. Ein anderer Weg des TE ist die gezielte Generation oder Regeneration *in vivo*. Hier werden quasi die entwicklungsbiologischen Abläufe rekapituliert.

Beim TE von Nervengewebe, wird gleichsam ein Mittelweg gewählt. Lebende Zellen, *ex vivo* kultiviert und in einem Gerüst verankert, werden in ein *In-vivo*-System implantiert. Dieses Organ ist allerdings noch nicht funktionsfähig, sondern lediglich ein vitales Gerüst, mit dessen Hilfe die Regeneration erst durch körpereigene Reorganisationsvorgänge erfolgen muß. Dabei werden Abläufe genutzt, die denen der Embryogenese ähnlich sind. Die Ernährung erfolgt dann wie beim normalen Nerventransplantat zunächst durch Diffusion und nach Anschluß an das Blutssystem über die Gefäße.

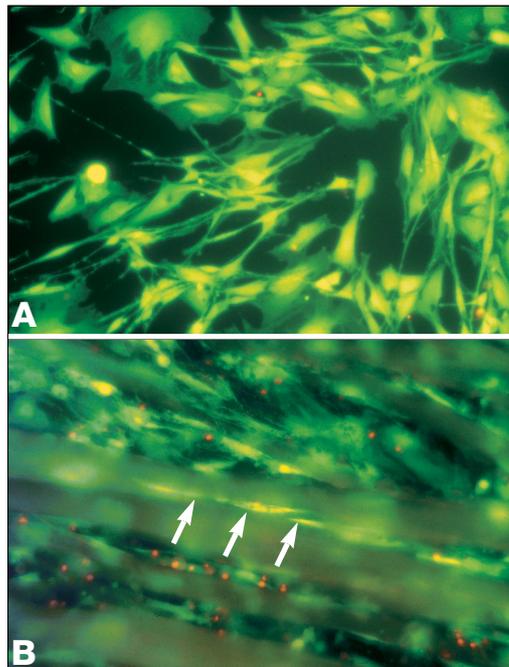
Zellen wurden aus genetisch gleichen Tieren kultiviert und in die jeweilige Matrix eingebracht. Dieses „vitale“ Transplantat wurde in vivo zur Überbrückung eines 2 cm langen Defekts des Nervus (N.) ischiadicus (dem sog. Ischiasnerv) eingesetzt. Als Kontrolle diente das entsprechende Transplantat ohne Schwannsche Zellen sowie der derzeitige Standard, das autologe Nerventransplantat. Die Regeneration wurde nach sechs Wochen beurteilt. Nach Einschätzung der klinischen Regenerationsparameter erfolgte die Auswertung in erster Linie histologisch und morphometrisch.

Nachfolgend wird das erfolgversprechendste Konzept – Leitschienen aus azellulären Muskeln mit gezüchteten Schwannschen Zellen – vorgestellt /3/.

VERSUCHSAUFBAU

Drei Versuchsgruppen mit je acht Tieren wurden gebildet, in allen erfolgte die Rekonstruktion eines zwei cm langen Defektes am Ischiasnerv der Ratte. Die Ratten wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien narkotisiert und waren sowohl während des Eingriffs als auch in der postoperativen Phase schmerzfrei.

Abb. 3
Das obere Bild (A) zeigt eine Kultur Schwannscher Zellen nach einer Woche in Kultur. Fluoreszein-Fluoreszenz-Färbung zur Bestimmung der Vitalität (x 250). B zeigt die Ausrichtung der Schwannschen Zellen im azellulären Muskel *in vitro*. Die Schwannschen Zellen (grüne Fluoreszenz) richten sich auf der Membran des Muskels (rot) aus und bilden eine Zellsäule (->), den Büngrnerschen Bändern des regenerierenden Nervs entsprechend (Vibratonschnitt, Fluoreszein-Propidiumjodid-Fluoreszenz, x 250).



Gruppe 1: Die autologe Nerventransplantation stellt in der Klinik die Therapie der Wahl zur Überbrückung von Nervendefekten dar. Daher verwendeten wir als Kontrollgruppe das Modell der Transplantation des N. ischiadicus. Hierbei wurde der Nerv dargestellt, ein 2 cm langes Segment herausgetrennt und an Ort und Stelle mit Hilfe eines Operationsmikroskopes mit monofilamentem Nylon in epi-perineuraler Technik vernäht (koaptiert).

Gruppe 2: Für diese Versuchsgruppe wurde der N. ischiadicus entnommen. Anschließend wurde ein Muskel aus dem Adduktorenbererich (M. gracilis) über eine Länge von 4 cm dargestellt und komplett entfernt. Um die zellulären Elemente des Muskels zu zerstören, wurde dieser in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Nachdem der Muskel durchgefroren war, wurde er sofort in warmes, destilliertes Wasser gelegt. Dieser Vorgang erfolgte insgesamt dreimal. Durch das wiederholte Frieren und Auftauen schrumpfte der Muskel auf die Hälfte seiner ursprünglichen Länge. Der Muskel ließ sich dann mikrochirurgisch entlang seines Faserverlaufs in den Nervendefekt einpassen /siehe 4, 5/.

Gruppe 3: Für diese Gruppen wurde der gleiche Aufbau wie für Gruppe 2 verwendet. Der azelluläre Muskel wurde zusätzlich mit Schwannschen Zellen entlang der Faserverlaufsrichtung beimpft. Die so eingebrachten Zellen waren im roten Muskelgewebe als weißliche Punkte sichtbar. Die Zellen waren zuvor aus adulten Tieren des gleichen Genpools kultiviert worden (Abb. 3). Vor der Implantation erfolgte mit einer speziellen Fluoreszenztechnik die Kontrolle der Vitalität der Zellen. Die Implantation erfolgte in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/100µl/Tier /siehe 6/.

Nach einer Regenerationszeit von sechs Wochen erfolgte die Auswertung des Materials. Dazu wurde die Funktion der Extremität überprüft und der transplantierte Nerv bzw. das

Ersatzmaterial histologisch aufgearbeitet, elektronenmikroskopisch untersucht und computergestützt vermessen.

ERGEBNIS

Klinik: Die Operationen verliefen planmäßig und wurden gut vertragen. Alle Wunden heilten primär. In keiner Gruppe fand sich eine Fehlstellung der operierten Pfote. Das Streckdefizit überschritt in keiner der Gruppen einen Winkel von 30°. Die Zehenspreizung der Versuchsgruppen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 1) keinen Unterschied. Nur einzelne Tiere konnten bereits nach dieser Zeit die Zehen spreizen, aber auch hier fand sich keine eindeutige Häufung in einer Gruppe.

Alle Transplantate waren in ihrer Kontinuität erhalten. Äußerlich waren in den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine stärkeren oder gruppenspezifischen Vernarbungen festzustellen. Insbesondere an den Nahtstellen zeigte sich keine vermehrte Vernarbung. Entzündliche Veränderungen fanden sich in keiner Gruppe. Makroskopisch zeigten sich alle Transplantate, gleich welcher Herkunft, gut revaskularisiert (Abb. 4).

Histologie: In allen Gruppen war eine Regeneration durch das jeweilige Transplantat ersichtlich. Die Qualitätsunterschiede, sichtbar am Semidünnschnitt (1 µm dick) und in der Elektronenmikroskopie, waren zum Teil erheblich. Wie erwartet, fand sich die beste Regeneration in der autologen Kontrollgruppe (Gruppe 1): gut remyelinisierte (d. h. mit einer isolierenden Myelinschicht versehene) Axone, in hoher Anzahl und guter Form, faszikulärer Anordnung und ohne Zeichen zellulärer Infil-

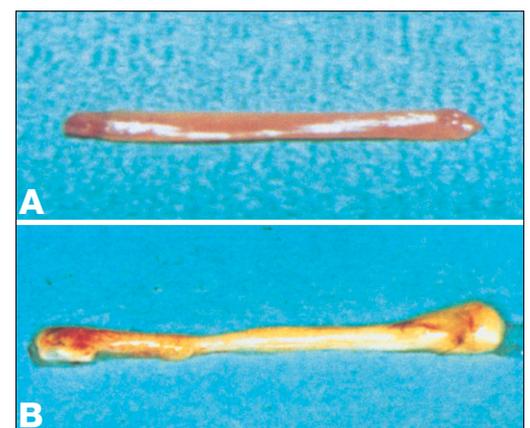


Abb. 4
Azellulärer Muskel als Transplantat
Das obere Bild (A) zeigt den entnommenen M. gracilis eines Versuchstiers vor der Stickstoffbehandlung. Der Muskel kann über eine Länge von etwa 4 cm entnommen werden. Durch das wiederholte Frieren und Auftauen schrumpft der Muskel auf die Hälfte seiner ursprünglichen Länge. Nach sechswöchiger Regeneration durch den azellulären Muskel mit Schwannschen Zellen (B) ähnelt das Transplantat makroskopisch dem autologen Transplantat.

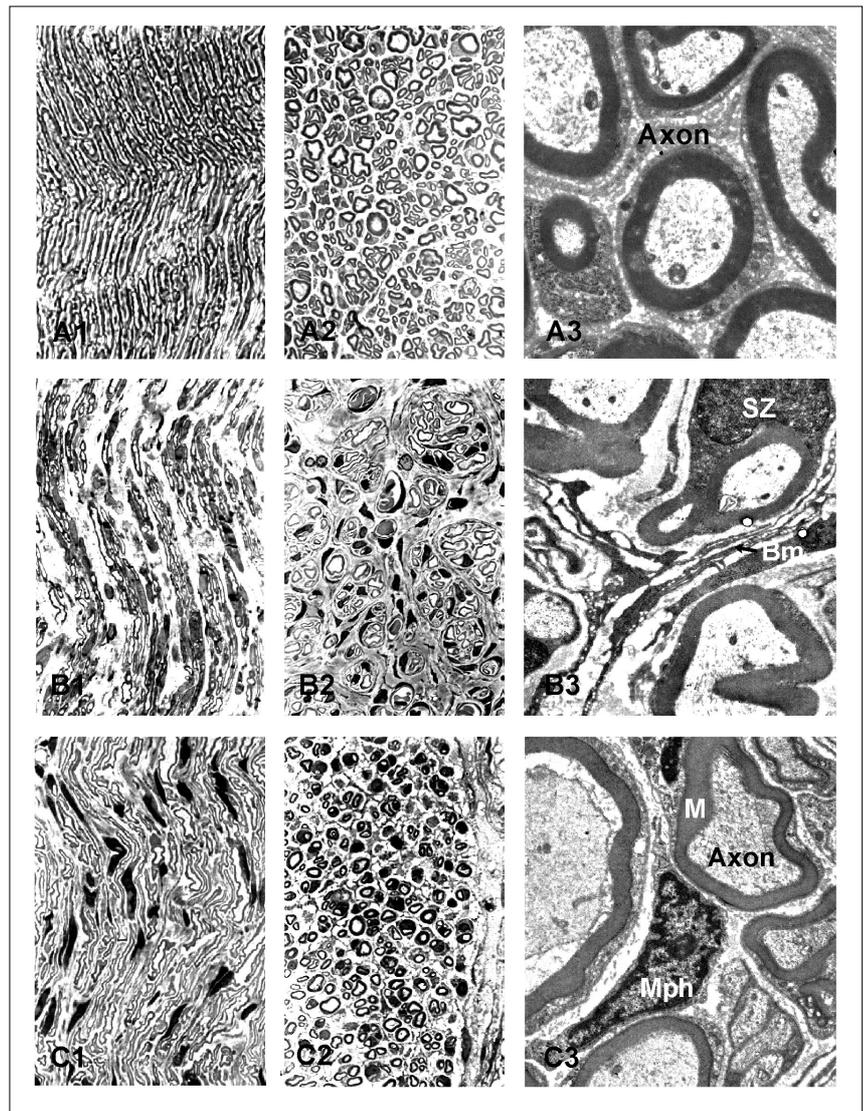
tration. Fibrose oder Bindegewebe fanden sich kaum. Die Organisation der Fasern sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt entsprach einem gesunden Nerv.

Bei den Versuchsgruppen zeigte Gruppe 3 (azellulärer Muskel mit Schwannschen Zellen) die bessere und der Kontrollgruppe ähnliche Regeneration. Hier fand sich bei einer guten Myelinisierung, guter Axonform und angemessenem Axondurchmesser die geringste Fibrosierung. Auch die Orientierung der Fasern im Längsschnitt war der der Gruppe 2 überlegen. Diese wies im Vergleich eine geringere Axonzahl, mehr Fibrose, eine irreguläre Axonform und Minifaszikelformation auf. Somit führte die Implantation der Schwannschen Zellen zu einer besseren Regeneration (Abb. 5).

Die Auszählung der Axone bestätigte den bereits durch die Histologie gewonnenen Eindruck: Der Muskel ohne Schwannsche Zellen (Gruppe 2) zeigte statistisch signifikant geringere Axonzahlen als die Kontrollgruppe mit autologem Nerv (Gruppe 1). Betrachtet man zusätzlich das Verhältnis aus Axondurchmesser zu Faserdurchmesser, als „Reife“-Parameter (g-Ratio) des regenerierten Nervs, wiesen beide Muskelgruppen eine der Kontrollgruppe vergleichbare Relation auf. Allerdings zeigte sich nur der Muskel mit Schwannschen Zellen in beiden Parametern, Axonzahlen und g-Ratio, der Kontrollgruppe entsprechend; damit war diese die einzige der *Tissue-engineering*-Gruppen, die sowohl eine angemessene Axonzahl, als auch eine gute Myelinisierung aufweisen konnte.

Revaskularisierung: Das Nervenstransplantat ist darauf angewiesen, daß es schnell Anschluß an das Blutsystem findet, die sog. Revaskularisierung. Bis zum Anschluß wird es durch Diffusion ernährt.

Insgesamt revaskularisierte das autologe Nervenstransplantat schneller, auch die Makrophagenwanderung (Freßzellen) war deutlich schneller als bei den engineernten Transplantaten, deren Revaskularisation erst am siebten Tag nachweisbar war. Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) wies bereits nach drei Tagen deutliche Zeichen einer Revaskularisierung auf. Zum gleichen Zeitpunkt fand sich eine Infiltration von Makrophagen in das autologe Nervenstransplantat. Dies entsprach zeitlich der bei der Wallerschen Degeneration beschriebenen hämatogenen Einwanderung der Makrophagen. Hingegen war in den Muskelgruppen zu diesem Zeitpunkt keine Revaskularisation festzustellen. Makrophagen konnten ebenfalls nicht dargestellt werden. Nach fünf Tagen war in der Kontrollgruppe die Revaskularisierung vorangeschritten, in den Muskeltransplantaten befanden sich jedoch keine nachweisbaren Gefäße. Makrophagen ließen sich nun in allen Transplantaten nachweisen. Mit dem siebten Tag zeigte sich eine Revaskularisierung auch in den Muskeltransplantaten. Die mit dem siebten Tag beobachtete Revaskularisation in den Muskelgruppen nahm am zehnten Tag deutlich zu.



Hinsichtlich der Revaskularisation ergaben sich über den gesamten Zeitraum keine Unterschiede zwischen der Muskelgruppe mit oder ohne Schwannsche Zellen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Der Begriff *Tissue engineering* wird meist mit der Ex-vivo-Herstellung von Organen wie Leber, Herz oder Niere assoziiert. Hierbei wird versucht, in Bioreaktoren oder spezialisierten Kultursystemen mit Gerüsten aus biodegradierbaren Polymeren und Zellen einen Zellverband, ein Organ, herzustellen. Das Hauptproblem dieser Technik besteht derzeit in der Herstellung der Durchblutung solcher Organe. Kann eine Blutversorgung nicht mitgezüchtet werden, ist das fertige Organ beim In-vivo-Einsatz auf ein Überleben durch Diffusion angewiesen. Das begrenzt die Einsatzmöglichkeit und Komplexität solcher künstlich hergestellter Organe. Ein anderer Weg des *Tissue engineering* ist die gezielte Generation oder Regeneration in vivo. Hier werden quasi die entwicklungsbiologischen Abläufe rekapituliert. Mit der vorliegenden Studie, dem *Tissue engineering* von Nervengewebe, wurde gleichsam ein Mittelweg gewählt. Lebende Zellen, ex vivo kultiviert und in einem Gerüst verankert, werden in ein In-vivo-

Abb. 5

A: Kontrollgruppe (Gruppe 1) mit guter Regeneration, kaum Fibrose, gute Remyelinisierung.
B: Azellulärer Muskel ohne Schwannsche Zellen (Gruppe 2), schlechtere Orientierung und Myelinisierung als die Kontrollgruppe, mehr Fibrose.
C: Azellulärer Muskel mit Schwannschen Zellen (Gruppe 3), bessere Regeneration als ohne, weniger Fibrose und bessere Axonform [links (1): Semidünn-Längsschnitt; Mitte (2): Semidünn-Querschnitt, beides Toluidinblaufärbung, x 400; rechts (3): Elektronenmikroskopie, x 7000; M: Myelinscheide, SZ: Schwannsche Zellen, Bm: Basalmembran, Mph: Makrophage].

System implantiert. Dieses Organ ist allerdings noch nicht funktionsfähig, sondern lediglich ein vitales Gerüst, mit dessen Hilfe die Regeneration erst durch körpereigene Reorganisationsvorgänge erfolgen muß. Dabei werden Abläufe genutzt, die denen der Embryogenese ähnlich sind. Die nutritive Versorgung erfolgt dann wie beim normalen Nerven-Transplantat zunächst durch Diffusion und nach Anschluß an das Blutssystem hämatogen.

Für längere Defekte haben sich weder synthetische, biodegradierbare noch azelluläre Muskeltransplantate oder Venen durchgesetzt. Der Grund besteht im Fehlen der Schwannschen Zellen, die für eine erfolgreiche axonale Regeneration essentiell sind. Vor allen Dingen in der frühen Regenerationsphase produzieren und akkumulieren sie diverse ernährende Faktoren, die wichtig für Axon und Neuron sind. Die Wallersche Degeneration aktiviert die Schwannschen Zellen und diese unterhalten ein ideales ernährendes Milieu für die axonale Regeneration. Hinzu kommt ihre vermittelnde Funktion beim Kontakt zwischen Nerv, Schwannscher Zelle und Basalmembran. Die Basalmembran ist der Anteil der extrazellulären Matrix, an den sich die regenerierenden Axone heften. Diese Basalmembran in Form des sogenannten Endoneuralrohrs bietet dem auswachsenden Axon ausreichend Platz und Adhäsionsmoleküle. Solche Basalmembranrohre finden sich in autologen Nerven-Transplantaten, aber auch in einem azellulären Muskel. Beides stellt für auswachsende Axone ein gutes Gerüst dar /7/.

Hinzu kommt, daß die Schwannschen Zellen in der Regenerationsphase eine Zellsäule bilden, das Büngnersche Band. Diese Zellsäule dient dem auswachsenden Axon gleichzeitig als Gerüst und Pfad zu seinem Zielorgan.

In Vorstudien konnte unsere interdisziplinäre Forschungsgruppe in In-vitro-Experimenten zeigen, daß sich die Schwannschen Zellen, wenn man sie in einen azellulären Muskel implantiert und in vitro inkubiert, in diesem Muskel anheften und proliferieren. Dabei ordnen sie sich innerhalb dieser Basalmembranrohre an, die in ihrer Funktionalität ähnlich den Endoneuralrohren sind, und bilden eine Zellsäule, die den Büngnerschen Bändern im regenerierenden Nerv gleicht. Diese beobachtete Schwann-Zell-Säule mag einer der Gründe sein, warum wir in den Muskeltransplantaten mit Schwannschen Zellen eine organisiertere Regeneration auffinden als in der Gruppe ohne Zellen.

Der Erfolg oder Mißerfolg der Regeneration peripherer Nerven hängt von der Anzahl der Axone ab, die durch das Transplantat in den distalen Stumpf einwachsen, das richtige Zielorgan erreichen und es innervieren. Ein Transplantat, das eine solche Regeneration unterstützt, muß daher folgende Eigenschaften aufweisen:

- (1) Es muß revaskularisiert werden.
- (2) Es muß dem einwachsenden Axon erlauben, mit einem Minimum an „Unordnung“ und Fibrose durch das Transplantat hindurch zu wachsen.

(3) Es muß Bedingungen für eine gute Myelinisierung des durchwachsenden Axons aufweisen.

(4) Es muß aus Materialien bestehen, die immunologisch mit dem Empfänger kompatibel sind, und

(5) es muß chirurgisch implantierbar sein.

Die Muskel-Schwanzzell-Transplantate erfüllen diese Kriterien, wie die eigenen Untersuchungen ergeben haben. Sie sind zwischen dem fünften und siebten Tag revaskularisiert und weisen eine systematische und organisierte Regeneration auf, histologisch gekennzeichnet durch wenig Bindegewebe und eine gute Orientierung der regenerierenden Fasern /8/. Die Transplantate aus azellulärem Muskel und körpereigenen Schwannschen Zellen sind immunologisch kompatibel und benötigen keine Immunsuppression. Aufgrund der biogenen Herkunft ist keine Fremdkörperreaktion oder Fibrose um diese Transplantate aufgetreten. Die implantierten Schwannschen Zellen verbleiben im Transplantat.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß das Fehlen endoneuralrohrähnlicher Strukturen zu einer schlechteren Regeneration führt. Dies unterstreicht die Bedeutung der Basalmembran als Gerüst in der axonalen Regeneration. Die längsgerichtete Anordnung im azellulären Muskel bietet in Kombination mit den Schwannschen Zellen beste Voraussetzungen für eine geordnete Regeneration.

CHIRURGISCHE ANWENDBARKEIT UND AUSBLICK

Transplantate aus azellulärem Muskel können, je nach Bedarf, in jeder Form und Länge hergestellt werden. Muskelanteile sind leicht zu entnehmen, beispielsweise bei der chirurgischen Präparation der eigentlichen Verletzung. Im Gegensatz zur Entnahme eines Nervs führt die Entnahme eines Muskelstreifens nicht zu einer Funktionsbeeinträchtigung. Die Verfügbarkeit ist nahezu unbegrenzt und in flüssigem Stickstoff kann der Muskel über sehr lange Zeiträume gelagert werden. Diese Form des Transplantates würde eine faszikuläre Nervenrekonstruktion erlauben, die notwendig ist, um die intraneurale Topographie wiederherzustellen /9/.

Die Kombination von Schwannschen Zellen mit einem geeigneten, gerichteten Trägermaterial stellt, unseres Erachtens, die Lösung für die Überbrückung ausgedehnter Nervendefekte dar. Trotz der hier vorgestellten ermutigenden Ergebnisse bleibt die Suche nach geeigneteren als den hier vorgestellten Trägermaterialien notwendig. Beispielsweise sind bereits gerichtete Kollagenstrukturen herstellbar. Ihr Einsatz ist aufgrund der mangelnden Festigkeit und ihrer schnellen Auflösung allerdings noch problematisch.

Humane Schwannsche Zellen können heute auch in ausreichender Zeit und Qualität gezüchtet werden. Unsere interdisziplinäre Forschungsgruppe konnte zeigen, daß sich humane Schwannsche Zellen aus dem verletzten Nerv selbst auch vom adulten Spender gut kultivieren

lassen /10/. Mit der Verwendung dieser Schwannschen Zellen vermeidet man eine Entnahme von Spendernerven für die Kultivierung der Schwannschen Zellen und damit auch den neurologischen Defekt.

Einige Arbeiten beschreiben bei der Implantation von kultivierten allo- und xenogenen (nicht menschlichen) Schwannschen Zellen in das ZNS ein Ausbleiben der Immunantwort. Ob das auch im peripheren Nervensystem gilt, ist derzeit noch ungeklärt; hier besteht dringender Klärungsbedarf. Sollten die kultivierten Schwannschen Zellen wirklich immunologisch unauffällig sein, wäre der Einsatz einer Zellbank oder -linie denkbar. Damit würde die Entnahme von körpereigenen Zellen entfallen /9, 10/. Zusammen mit einer immunologisch unauffälligen Trägermatrix kann es die Nervenrekonstruktion für Patienten und Chirurgen erleichtern.

Neben der Untersuchung der Trägermatrix und der Herkunft der Schwannschen Zellen sollte die pharmakologische und biochemische Beeinflussbarkeit der Regeneration diskutiert werden /12/. Hierbei scheint uns der Einsatz eines

einzelnen Wachstumsfaktors nicht sinnvoll /12/. Vielmehr sollte eine systemische pharmakologische Stimulation angestrebt werden /13/. Auch eine genetische Modifikation der eingebrachten Zellen oder der Zellen in der Trägermatrix wäre denkbar.

Zusammenfassend zeigen unsere interdisziplinär durchgeführten Studien, daß sich der azelluläre Muskel als Trägermaterial für kultivierte Schwannsche Zellen bewährt hat. Obgleich klinisch derzeit noch das konventionelle, autologe Nerven-Transplantat als Standard zur Überbrückung von Nervendefekten anzusehen ist, stellt die Kombination aus kultivierten Schwannschen Zellen mit ihren neurotrophen und neurotrophen Substanzen und der Basalmembran der azellulären Muskeln aber eine vielversprechende Ausgangsposition für das *Tissue engineering* eines biogenen Transplantates dar.

Derzeit wird versucht, die Transplantate in neuen Versuchen zu optimieren und die Regeneration durch den Einsatz neuer Wachstumsfaktoren und stimulierender Substanzen weiter zu verbessern.

Literatur

- /1/ Schneider W, Fansa H, Feistner H: Die operative Therapie traumatischer Läsionen des Plexus brachialis. *Ärztblatt Sachsen-Anhalt* 1998; 2: 40-46
- /2/ Bunge RP: Expanding roles for the Schwann cell: Ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 805-809
- /3/ Fawcett JF, Keynes RJ : Muscle basal lamina : A new graft material for peripheral nerve repair. *J Neurosurg* 1986; 65: 354-363
- /4/ Fansa H, Keilhoff G, Plogmeier K, Frerichs O, Wolf G, Schneider W: Successful Implantation of Schwann Cells in Acellular Muscles. *J Reconstr Microsurg* 1999; 15: 61-65 (IF: 0,494)
- /5/ Fansa H, Keilhoff G, Förster G, Seidel B, Wolf G, Schneider W: Acellular Muscle with Schwann cell implantation. An Alternative Nerve Conduit. *J Reconstr Microsurg* 1999; 15: 531-537
- /6/ Keilhoff G, Fansa H, Schneider W, Wolf G: In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits. *J Neurosci Methods* 1999; 89: 17-24
- /7/ Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W: Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of veins and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 485-494
- /8/ Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W: Revascularization of tissue engineered nerve grafts and invasion of macrophages. *Tissue Eng* 2001; 7: 519-524
- /9/ Fansa H, Schneider W, Wolf G, Keilhoff G: Host responses after acellular muscle basal lamina allografting used as matrix for tissue engineered nerve grafts. *Transplantation* 2002; 74: 381-386
- /10/ Keilhoff G, Fansa H, Schneider W, Wolf G: Neuroma: a donor age independent source of human Schwann cells for tissue engineered nerve grafts. *Neuroreport* 2000; 11: 3805-3809
- /11/ Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Schneider W: The Effect of the Immunosuppressant FK 506 on Regeneration of Peripheral Nerve Grafts. *J Hand Surg* 1999; 24B: 38-42
- /12/ Fansa H, Schneider W, Wolf G, Keilhoff G: Influence of Insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue engineered nerve grafts. *Muscle Nerve* 2002; 26: 87-93
- /13/ Frerichs O, Fansa H, Ziemer P, Schneider W, Keilhoff G: Regeneration of peripheral nerves after clenbuterol treatment in a rat model. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1687-1691



Priv.-Doz. Dr. Hisham Fansa,

geb. 1969 in Hannover, 1988 bis 1994 Studium der Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover und der University of Western Ontario in London, Ontario, Kanada. Promotion 1995 in Hannover (Prof. Dr. A. Berger). Seit 1994 in der Klinik für Plastische, Wiederherstellungs- und Handchirurgie der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg (Prof. Dr. W. Schneider). 2000 Facharzt für Plastische Chirurgie und Oberarzt. 2001 Habilitation. Schwerpunkte: periphere Nerven, rekonstruktive Mikrochirurgie, Brustchirurgie.



Priv.-Doz. Dr. Gerburg Keilhoff,

geb. 1956 in Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz), 1974 bis 1979 Biologie-Studium an der Lenin-Universität Kischinow/UdSSR (heute Moldawien) mit Abschluß Diplom-Biologe, seit 1979 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologie (jetzt Institut für Medizinische Neurobiologie) der Otto-von-Guericke-Universität (ehem. Medizinischen Akademie) Magdeburg, 2002 Habilitation, Arbeits- und Interessengebiete: Neurode- und -regeneration, Nerven transplantation, Zellkulturtechniken, Stickoxid, Elektronenmikroskopie, Histochemie, Immunhistochemie.



Prof. Dr. rer. nat. Gerald Wolf,

1943 geboren, studierte von 1962 bis 1967 Biologie an der Leipziger Universität und parallel dazu absolvierte er ein Medizinteilstudium. Unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. G. Sterba wurde Gerald Wolf 1970 an der Leipziger Universität promoviert. Dort erfolgte 1979 auch die Habilitation. Im gleichen Jahr wurde er zum Dozenten für das Fachgebiet „Biologie für Mediziner“ an der Medizinischen Akademie Magdeburg berufen. 1981 erfolgte die Berufung zum ordentlichen Professor und 1985 die Ernennung zum Direktor des Institutes für Biologie der selben Einrichtung. 1992 wurde er Professor neuen Rechts. Mit der Gründung der Otto-von-Guericke-Universität erhielt die von ihm geleitete Einrichtung die Bezeichnung Institut für Medizinische Neurobiologie. Professor Wolf ist Autor, Herausgeber und Mitherausgeber von 14 Büchern, Autor von etwa 195 Originalpublikationen in internationalen Fachzeitschriften und Monographien. Forschungsschwerpunkte sind die glutamaterge Transmission und die durch Glutamat, Stickoxid und andere Radikale vermittelten Schäden im zentralen Nervensystem. Weitere Interessengebiete: Hirn und Verhalten, philosophische Aspekte der Biologie und Psychologie



Prof. Dr. med. Wolfgang J. W. Schneider,

geboren 1944 in Zobten/Breslau; Studium der Physik an der TU Berlin, der Humanmedizin an der Universität Köln und der FU Berlin. 1975/76 Verleihung des Bundesleistungsstipendiums zur Erlangung der Doktorwürde, 1975 Staatsexamen. Es folgten Tätigkeiten als Assistenzarzt für Unfallchirurgie sowie Allgemein-, Thorax und Gefäßchirurgie in Krankenhäusern und Kliniken in Bielefeld, Berlin und Hannover. 1986 Berufung als Oberarzt für Plastische-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und 1988 als leitender Oberarzt an die Medizinische Hochschule Hannover, dort 1989 Habilitation und Erlangung der Venia Legendi im Fach Plastische Chirurgie. Seit 1993 Professor für Plastische-, Wiederherstellungs- und Handchirurgie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Mitglied in zahlreichen nationalen und internationalen medizinischen Gesellschaften und Gremien für Plastische, Wiederherstellungs- und Handchirurgie. Seit 2000 Mitglied des Chair committees der International Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Foundation, Chairman: Board for Codification of Diagnosis and Techniques in Plastic Surgery. Die Lehrtätigkeit umfaßt das Gebiet der Intensivmedizin schwerbrandverletzter Patienten sowie den plastisch chirurgisch rekonstruktiven Bereich. Forschungs- und Interessenschwerpunkte: Engineering peripherer Nerven; Tissue Engineering von Knochengewebe, klinische Studien zu peripheren Nervendefekten sowie zu verschiedenen Lappenplastiken. Herausgeber der Fachzeitschrift „Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie“.