

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine Untersuchung über den Regenerationserfolg kryokonservierter peripherer Nerven unter Berücksichtigung der Vitalität der Schwannschen Zellen. Insgesamt 40 Wistar-Ratten wurde ein 25 mm langes Segment des *N. ischiadicus* entnommen, dieses wurde in der unkontrolliert kryokonservierten Gruppe (n=8) ohne schrittweises Abkühlen sofort in flüssigen Stickstoff überführt. In der DMEM-Gruppe (n=8) wurde das Transplantat, in DMEM lagernd, kontrolliert schrittweise kryokonserviert, um die thermodynamischen Belastungen für die Zellen so gering wie möglich zu halten. In der DMSO-Gruppe (n=8) wurde wie in der DMEM-Gruppe unter Zusatz von 10 % DMSO verfahren, die Nervensegmente der prädegenerierten Gruppe (n=8) schließlich wurden vor der eigentlichen, ebenfalls kontrollierten Kryokonservierung, einer 32 Stunden langen Prädegeneration bei 4 °C ausgesetzt. Bei der Kontrollgruppe (n=8) wurde eine orthotope, autologe Transplantation ohne Kryokonservierung vorgenommen. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Nervensegmente in epi-perineuraler Nahttechnik mikrochirurgisch orthotop reimplantiert. Nach sechswöchiger Regeneration wurden die transplantierten Nervensegmente klinisch, neurophysiologisch, histologisch sowie morphometrisch anhand von Semidünnschnitten und ergänzend an Ultradünnschnitten untersucht. Die Morphometrie konzentrierte sich auf die Bestimmung von Fläche und Durchmesser der Axone und Markscheiden, sowie der Anzahl der Axone pro 10.000 μm^2 .

Nach der Konservierung konnten weder Ödeme, Schrumpfungen oder Elastitätsverluste beobachtet werden. Die Versuchsgruppen unterschieden sich nicht in der klinischen Evaluation. Neurophysiologisch konnte bei allen Versuchstieren eine positive Reizantwort beobachtet werden, wobei die kontrolliert kryokonservierten Gruppen eine signifikant langsamere Reizleitungsgeschwindigkeit erkennen ließen. Morphometrisch konnte bei allen transplantierten Nervensegmenten eine Regeneration dokumentiert werden, wobei die kontrolliert kryokonservierten Gruppen die höchsten Axonzahlen pro Flächeneinheit aufwiesen. Der Gefrierschutzfaktor DMSO hatte keinen protektiven Einfluss auf das Überleben der Schwannschen Zellen, die durch die Prädegeneration induzierte Proliferation und Aktivierung der Schwannschen Zellen hatte ebenfalls keine positive Auswirkung auf die

Regenerationsqualität. Die unkontrolliert kryokonservierten Nervensegmente ließen eine statistisch signifikant schlechtere Regeneration erkennen und wiesen hiermit auf eine verminderte Überlebensrate der Schwannschen Zellen hin. Die Regenerationsqualität der nicht konservierten Kontrollgruppe wurde von keiner Gruppe erreicht.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse, scheinen die Effekte der Kryokonservierung in einer zeitlich verzögerten Wallerschen Degeneration, einer verlangsamten Revaskularisation der Endothelien und möglicherweise in einer verminderten Überlebensrate der ortsständigen Schwannschen Zellen und damit zu einem Fehlen der unterstützenden neurotrophischen und neurotropischen Faktoren, als auch der Adhäsionsmoleküle in der frühen Phase der Regeneration zu resultieren. Weitere wissenschaftliche Studien, die sich mit dem Ausmaß des Einflusses der genannten Faktoren auf die nervale Regeneration beschäftigen, scheinen sinnvoll, zumal die vorliegende Untersuchung grundsätzlich für die Kryokonservierung peripherer Nerven spricht.

Kook, Peter

Studies on the regeneration of cryopreserved peripheral nerves with special regard to the Schwann cells.

8 Summary

In the present study 40 rat sciatic nerve segments were harvested and stored in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) either with or without cryoprotectant and subjected to controlled and uncontrolled freezing. In the uncontrolled cryopreserved group (n=8), the segments, stored in DMEM, were frozen uncontrolled and plunged into liquid nitrogen (-196°C) without being gradually cooled. The segments of the DMEM-group (n=8), also stored in DMEM, were frozen in a stepwise manner, to minimize the thermodynamic demands on the cells. The transplants of the DMSO-group (n=8) were treated the same way as in the DMEM-group, but 10 % DMSO was added. The nerve segments of the predegenerated-group (n=8) finally went through a 32-h long predegeneration at 4 °C, before cryopreservation took place. The control group (n=8) received only the operation without extracorporeal treatment. Immediately after thawing the segments were replanted orthotopically in an epi-perineural technique. Regeneration was allowed to take place for 6 weeks. Evaluation included clinical appearance of the extremity, electrophysiological examination, and histological and computer-based morphometric evaluation using semi-thin and ultra-thin sections. Evaluation criteria were the number of axons per 10.000 µm² and the ratios involving the myelin/axon areas.

After storage no edema, shrinkage, or loss of elasticity were apparent. There were no distinctions between the clinical appearances of the 5 groups. In all cases positive responses to electric stimulation were recorded; the controlled cryopreserved groups showed significantly impaired results, the uncontrolled cryopreserved group did not differ from the control group. Thus, some degree of nerve regeneration was demonstrated clinically and electrophysiologically in all animals. Histologically, freezing did not affect the structural elements such as basal-membrane tubes and

perineural tissue, except in the uncontrolled cryopreserved group, where an impaired regeneration became obvious through a higher percentage of connective tissue and more myelin debris. Morphometrically, there was also regeneration evident in all specimens, although all cryopreserved grafts had significantly less axon counts and less myelination compared with the control group. Cryoprotected nerves showed no different regeneration. Controlled freezing was superior to uncontrolled freezing. The cryoprotectant DMSO had no positive impact on the survival of the Schwann cells and the predegeneration phase also failed to contribute to an improved quality of regeneration.

Impaired regeneration must be attributed to delayed Wallerian degeneration and slower revascularization. The decreased survival of resident Schwann cells in the graft may lead to inferior regeneration itself due to the lack of neurotrophic and attachment factors in early regeneration. For elective reconstructive surgery, unlimited supply of nerve tissue, tissue typing and nerve banking is necessarily required. Controlled preserved grafts support axonal regeneration to a certain extent, however further studies are required to assess various cooling patterns, cryoprotectants and graft revascularization.