

Aus der Plastischen Chirurgie im Interdisziplinären Brustzentrum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Zur Morphologie der peripheren Nervenregeneration und  
zur Beeinflussung des axonalen Regenerationsverhaltens  
durch elektrische Nervenstimulation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Fojuth

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Infanger

2. Prof. Dr. med. H. Fansa

3. Prof. Dr. med. C.-E. Heyde

Datum der Promotion: 08.04.2011

Meinem Vater Dr. med. Christian Fojuth

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Periphere Nervenverletzung	2
1.1.1	Anatomischer Aufbau des peripheren Nervs	2
1.1.2	Traumatische Nervenschädigung	6
1.2	Degeneration	8
1.2.1	Distaler Stumpf (Waller-Degeneration)	8
1.2.2	Proximaler Stumpf	11
1.3	Regeneration	12
1.3.1	Historie – RAMON Y CAYAL	12
1.3.2	Neuere Erkenntnisse und Techniken	12
1.3.3	Antwort des Axons	13
1.3.4	Geschwindigkeit der axonalen Regeneration	13
1.3.5	Morphologie regenerierender Axone	14
1.3.6	Neurotrophe Faktoren	15
1.3.7	Spezifität der Regeneration	16
1.4	Chirurgische Therapie	18
1.5	Elektrostimulation	20
1.5.1	Geschichtliche Entwicklung	20
1.5.2	Aktuelle Verfahren	22
1.5.3	Elektrische Nervenstimulation und die axonale Regeneration	25
1.6	Problemstellung und Zielsetzung	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
2.1	Mausmodell	28
2.2	Operation	29
2.2.1	Anästhesie	29
2.2.2	Allgemeine Operationstechnik	29
2.2.3	Empfängergruppen und Spendergruppe	30
2.2.4	Gruppe mit elektrischer Nervenstimulation	31
2.3	Gewebepräparation und histologische Untersuchung	32
2.3.1	Entnahme und Fixierung	32
2.3.2	Einbettung	32
2.3.3	Anfertigung der Vibratomschnitte und Färbung	32
2.4	Bilddarstellung und -analyse	33
2.4.1	Längsschnitte	33
2.4.2	Querschnitte	35
2.5	Retrograde Fluoro-Gold-Markierung	36
2.6	Auswertung der Ergebnisse	36

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
3.1	Kreuzen der Reparaturstelle .....	39
3.2	Treffen des distalen Stumpfs .....	43
3.3	Regeneration im distalen Stumpf.....	46
3.4	Elektrostimulation.....	49
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
4.1	Funktionelle Wiederherstellung.....	60
4.2	Gestaffelte Regeneration .....	62
4.2.1	Regenerationsgeschwindigkeit unter dem Aspekt der Staffelung.....	65
4.3	Axonmorphologie .....	66
4.4	Bildung und Stutzen von Kollateralen .....	69
4.4.1	Preferential Motor Reinnervation .....	70
4.5	Elektrostimulation.....	72
4.5.1	Elektrostimulation und axonale Regeneration.....	73
4.5.2	Elektrostimulation und axonale Wachstumsgeschwindigkeit.....	77
4.5.3	Elektrostimulation und molekulare Faktoren .....	78
4.5.4	Klinische Bedeutung .....	79
4.6	Zentrale Plastizität .....	81
4.7	Schlussfolgerungen .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>85</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>99</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>103</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>104</b>
	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>106</b>

# 1 Einleitung

Trotz zunehmend wachsender neurowissenschaftlicher Erkenntnisse während der letzten Jahrzehnte gehören periphere Nervenverletzungen weiterhin zu den anspruchsvollsten und schwierigsten Problemen in der chirurgischen Rekonstruktion. Das periphere Nervensystem ist im Gegensatz zum zentralen Nervensystem prinzipiell zu einer Regeneration imstande. Doch das funktionelle Ergebnis nach einer peripheren Nervenverletzung bleibt auch mit zahlreichen Verbesserungen in der intraoperativen Nervendarstellung, etablierten mikrochirurgischen Techniken und weit reichenden Rehabilitationsmaßnahmen dürftig. Die komplette Wiederherstellung der Funktion ist weiterhin nur in einem geringen Maß möglich und meist mit einem hohen Anteil bleibender Funktionsverluste verbunden. So erlangen nur zehn Prozent der Erwachsenen nach Durchtrennung und Naht eines peripheren Hauptstammnervs wieder eine normale Funktion (BRUSHART, 1998b).

In letzter Zeit wächst das Verständnis dafür, mit einem komplexen biologischen Problem konfrontiert zu sein, da vorwiegend mechanisch ausgerichtete Bemühungen an ihre Grenzen stoßen. Die klinische Herangehensweise an eine periphere Nervenverletzung hat sich allerdings bis heute nur wenig geändert.

Ein potentieller Erklärungsansatz für das erreichte Limit der chirurgischen Verfahren könnte in der Morphologie der Nervenregeneration begründet sein. Zur Klärung dieser Hypothese haben wir ein Mausmodell entwickelt, mit dem die Morphologie der Nervenregeneration auf Ebene der Einzelstrukturen untersucht werden kann. Zusätzlich können an diesem Modell auch Verfahren zur Beeinflussung der Regeneration geprüft werden.

Zum genaueren Verständnis werden einführend die grundlegenden Mechanismen der Regeneration nach peripherer Nervenverletzung erörtert.

## 1.1 Periphere Nervenverletzung

### 1.1.1 Anatomischer Aufbau des peripheren Nervs

Periphere Nerven enthalten neurale und nicht-neurale Anteile, die in drei Komponenten eingeteilt werden können: das impulsleitende Axon, die isolierenden Schwann-Zellen und das umgebende Bindegewebe.

#### a) Axon

Eine Nervenzelle besteht zum einen aus einem Zellkörper, auch Soma oder Perikaryon genannt, und zum anderen aus Nervenzellfortsätzen. Dabei unterscheidet man zwischen Dendriten und Axonen. Dendriten leiten die elektrische Erregung in afferenter Richtung, d.h. sie dienen dem Erregungsempfang. Axone hingegen sind für die Impulsweiterleitung in efferenter Richtung verantwortlich und damit für die Erregungsweitergabe zuständig. Im peripheren Nervensystem bilden diese Nervenzellfortsätze gebündelt den peripheren Nerven. Ihre Nervenzellkörper befinden sich überwiegend im Rückenmark. In der Mehrheit der Literatur ebenso wie in dieser Arbeit werden alle Nervenzellfortsätze vereinfachend als Axone bezeichnet, unabhängig, ob die Impulsweiterleitung in afferenter oder efferenter Richtung erfolgt. Das Zytoplasma des Axons wird als Axoplasma, die Zellmembran als Axolemm bezeichnet.

#### b) Schwann-Zellen

Im peripheren Nervensystem wird zwischen markhaltigen und marklosen Nervenfasern unterschieden. Für diese Differenzierung sind die Schwann<sup>1</sup>-Zellen verantwortlich. Schwann-Zellen sind Gliazellen des peripheren Nervensystems, die der Neuralleiste entstammen. Man unterteilt zwei Hauptphänotypen: die myelinisierenden und die nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen.

---

<sup>1</sup> THEODOR SCHWANN (\*1810 in Neuss – †1882 in Köln) gilt als Erstbeschreiber der nach ihm benannten Schwann-Zellen. Allerdings sind sie seiner Auffassung nach Bestandteile des peripheren Nervs, der die weiße Substanz sezerniert (KOSINSKI, 2004). Erst über 100 Jahre später entdeckte GEREN den Vorgang der Myelinisierung (GEREN und SCHMITT, 1954).

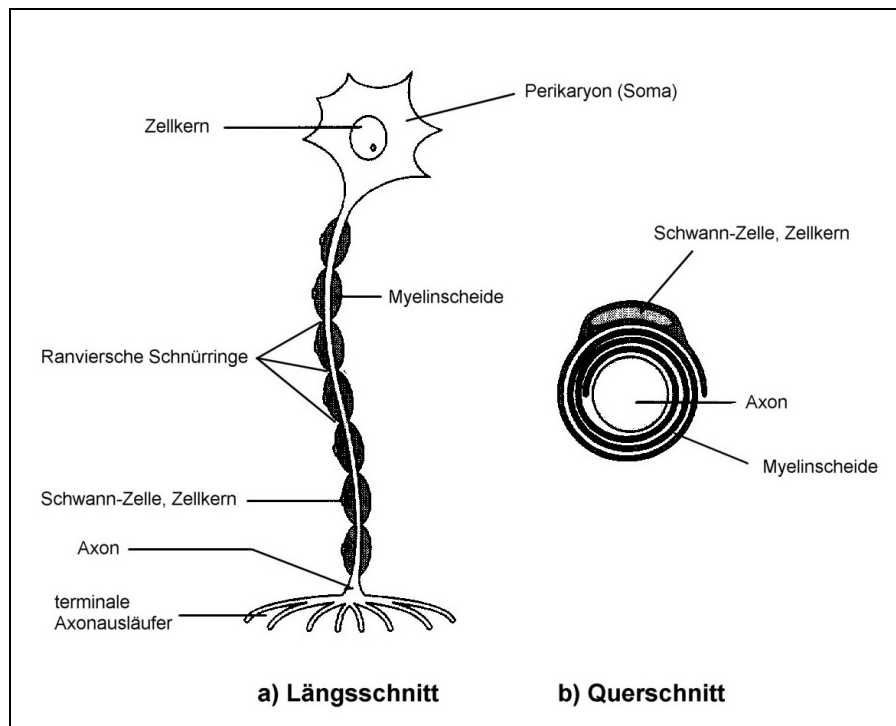
Die myelinisierenden Schwann-Zellen bilden eine lipidreiche Membran, die als Isolierungsschicht für die Axone dient. Bei der Myelinisierung legt sich die Schwann-Zelle einem einzigen Axon an, umhüllt es und umwächst es spiralförmig, so dass am Ende eine lamellenartige Struktur entsteht, die Markscheide. Diese Markscheide charakterisiert Axone von **markhaltigen** Nervenfasern (Abb. 1). Im Längsschnitt betrachtet ist diese Markscheide segmental in Internodien unterteilt. Ein Internodium stellt die Länge des Myelins dar, das von einer einzelnen Schwann-Zelle gebildet wird. Die Internodien sind durch unmyelinisierte Abschnitte, den sogenannten Ranvierschen Schnürringen, voneinander getrennt.

Die Markscheidenbildung dient der elektrischen Isolierung. Eine Depolarisation der Zellmembran kann deshalb nur an den unmyelinisierten Ranvierschen-Schnürringen erfolgen. Daraus resultiert eine saltatorische Erregungsweiterleitung, die eine wesentlich schnellere Fortleitung des Aktionspotentials ermöglicht.

Bei den **marklosen** Nervenfasern werden meist mehrere Axone von einer Schwann-Zelle umhüllt, es erfolgt keine Markscheidenbildung. Im Querschnitt fehlt daher die Lamellenstruktur der Markscheide. Ein Aktionspotential wird in den marklosen Nervenfasern nur kontinuierlich weitergeleitet, die Geschwindigkeit ist daher langsamer als in den markhaltigen Nervenfasern (CAMPANA, 2007; GRANT et al., 1999; MUMENTHALER et al., 2007; SCHERER und ARROYO, 2002).

Neben ihrer isolierenden Funktion bei der Erregungsweiterleitung spielen Schwann-Zellen auch bei der Regeneration peripherer Nerven eine wichtige Rolle.





**Abb. 1 Schematische Darstellung einer markhaltigen Nervenfasers am Beispiel eines peripheren Motoneurons. a) Längsschnitt: Nervenzellkörper, Axon, Myelinscheide, terminale Axonausläufer b) Querschnitt: Myelinscheide aus Schwann-Zellen, um das Axon gewickelt (modifiziert nach Heath und Rutkowski, 1998).**

### c) Bindegewebe

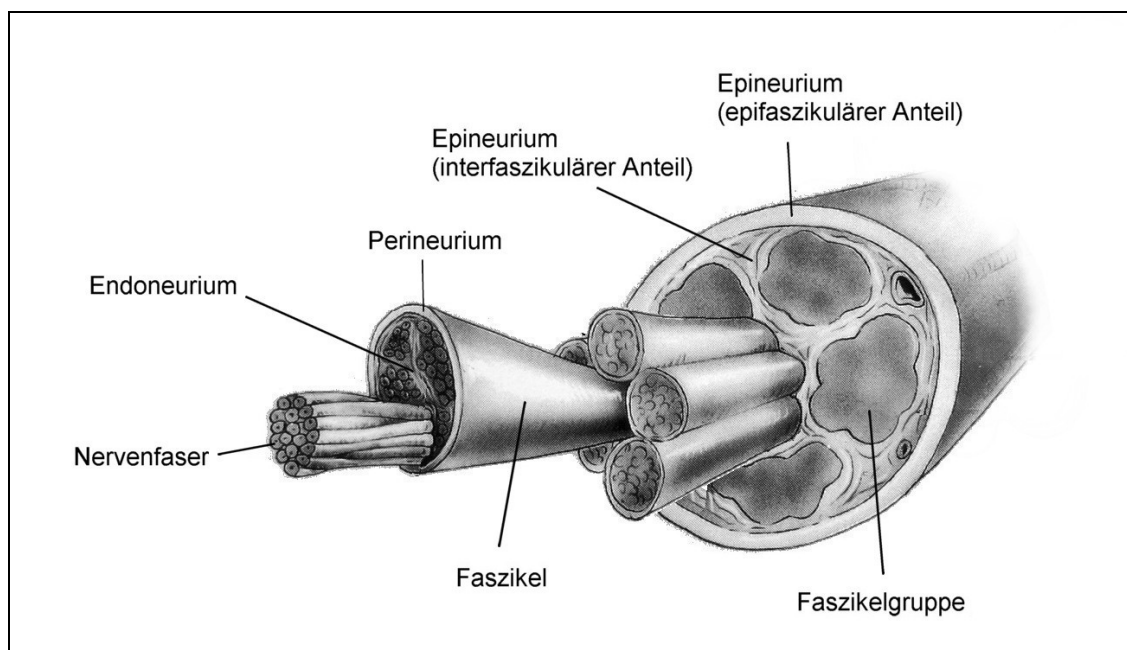
Der periphere Nerv besteht aus einer Anordnung unterschiedlich vieler Nervenfasern, die zu Faszikeln und Faszikelgruppen geordnet den makroskopisch erkennbaren Nerven bilden (Abb. 2). Als Nervenfasers bezeichnet man den Komplex von Axon, Axolemm, Schwann-Zellen mit und ohne Markscheiden und Basallamina der Schwann-Zellen (MILLES, 1992; MERLE, 1997; MUMENTHALER et al., 2007).

Jede Nervenfasers ist von einer bindegewebigen Hülle umgeben, dem **Endoneurium**. Sie bildet die stützende Wand des sogenannten Endoneuralrohres, welches von Axon, Schwann-Zellen und Myelin ausgefüllt wird (SUNDERLAND, 1965).

Mehrere vom Endoneurium umhüllte Nervenfasern sind zu Faszikeln gebündelt. Diese wiederum werden von dem dreischichtigen kollagenen **Perineurium** umschieden und sind makroskopisch erkennbar. Das Perineurium dient als Diffusionsbarriere zwischen dem intrafasikulären Milieu als Ausstülpung des subarachnoidalen Raums und der extrafasikulären Umgebung. Zusätzlich ist es

zum großen Teil für die Zugfestigkeit und Elastizität eines Nervenstammes verantwortlich (MILLES, 1992; MERLE, 1997; MUMENTHALER et al., 2007).

Mehrere Faszikel lagern sich zu Faszikelgruppen zusammen. Sie sind in einem lockeren Bindegewebe eingebettet, dem **Epineurium** (SUNDERLAND, 1965). Dieses besteht aus zwei Anteilen: den inneren interfaszikulären Fasern, die den Raum zwischen den Faszikelgruppen locker ausfüllen und Blutgefäße, Lymphgefäße und Fettgewebe enthalten können, und den äußeren, epifaszikulären Fasern, die den gesamten Nervenstrang umschließen (MILLES, 1992; MERLE, 1997; MUMENTHALER et al., 2007). Diese verdichteten Fasern an der Nervenoberfläche trennen den Nerven vom umgebenden Nervenbett, in dem es locker befestigt ist (SUNDERLAND, 1965).



**Abb. 2** Schematische Darstellung des Aufbaus eines peripheren Nervs.

Die intraneurale Topographie der peripheren Nerven, gebildet durch die unterschiedlichen Faszikelgruppierungen im lockeren epineuralen Bindegewebe, verändert sich entlang der gesamten Länge des Nervs. Die Faszikel ordnen sich hierbei mittels Teilung und Fusion plexiform an (SUNDERLAND et al., 1959). Dies führt zu schnellen und wiederholten Veränderungen in Anzahl, Größe und Anordnung der Faszikel. Aus diesem Grund haben Transversalschnitte eines Nervs einige Millimeter voneinander entfernt nicht mehr genau dieselbe Faszikelstruktur (SUNDERLAND, 1965).

### 1.1.2 Traumatische Nervenschädigung

SEDDON klassifizierte 1943 die traumatischen Nervenschädigungen in drei Kategorien, die er mit den von COHEN vorgeschlagenen Begriffen „Neurapraxie“, „Axonotmesis“ und „Neurotmesis“ benannte (SEDDON, 1943b).

Mit **Neurapraxie** bezeichnete er die mildeste Form der Nervenverletzung, die keinen axonalen Kontinuitätsverlust aufweist und nur einen vorübergehenden Funktionsausfall verursacht. Ein morphologisches Substrat des Defektes ist meist nicht nachweisbar, feine Schäden der Myelinscheide ohne Kontinuitätsverlust des Achsenzylinders wurden beobachtet. Es finden keine degenerativen Vorgänge entsprechend der Waller-Degeneration (s. Abs. 1.2.1) statt. Die Innervation des Erfolgsorgans durch die Nervenfasern bleibt bestehen. Die Verminderung oder der Verlust der Nervenleitfähigkeit ist vom Ausmaß der Marksverletzung abhängig und vollständig reversibel. Die funktionelle Wiederherstellung erfolgt spontan (SEDDON, 1943b; BURNETT und ZAGER, 2004).

Bei einer **Axonotmesis** liegt im Gegensatz dazu eine komplette Kontinuitätsunterbrechung des Axons vor. Die bindegewebigen Strukturen des Nerven wie Endoneurium, Perineurium und Epineurium sind allerdings erhalten. Distal der Verletzung erfolgt eine Waller-Degeneration. Klinisch liegt ein vollständiger Funktionsverlust des Nerven vor. Die Aussicht auf funktionelle Erholung ist allerdings ausgezeichnet, da die erhaltenen mesenchymalen Strukturen als Leitschienen für die aussprossenden Axone zu ihren Zielorganen fungieren. Das Auftreten einer spontanen Wiederherstellung mit sehr gutem Endergebnis ist hierbei möglich (SEDDON, 1943b; BURNETT und ZAGER, 2004).

**Neurotmesis** geht mit einer vollständigen Trennung des Nerven einher. Alle essentiellen Anteile des Nerven - Axon, Endo-, Peri- und Epineurium - sind zerstört. Es folgt regelmäßig eine periphere Waller-Degeneration und eine Narbenbildung. Klinisch unterscheidet sich dieser Zustand direkt posttraumatisch nicht von der Axonotmesis. Allerdings tritt eine spontane Wiederherstellung ohne chirurgische Intervention gewöhnlich nicht auf und ist niemals von guter Qualität (SEDDON, 1943b; BURNETT und ZAGER, 2004).

SUNDERLAND verfeinerte diese Einteilung der Nervenschädigung und unterteilte in fünf Schweregrade (Tab.1). Eine Verletzung ersten Grades entspricht hierbei der Neurapraxie SEDDONS. Die Axonotmesis umfasst die Schweregrade zwei bis vier. Eine Verletzung zweiten Grades entspricht der ursprünglichen Bedeutung der Axonotmesis SEDDONS mit axonalem Kontinuitätsverlust bei erhaltenen Hüllstrukturen. Bei der Grad-drei-Verletzung ist neben dem Axon und der Myelinscheide auch das Endoneurium und bei der Grad-vier-Verletzung auch das Perineurium durchtrennt. Die Verletzung fünften Grades entspricht der Neurotmesis mit vollständiger Durchtrennung des Nervenstrangs einschließlich des Epineuriums (SUNDERLAND, 1951).

SEDDON	SUNDERLAND	Myelin	Axon	Endoneurium	Perineurium	Epineurium
Neurapraxie	I	x				
Axonotmesis	II	x	x			
	III	x	x	x		
	IV	x	x	x	x	
Neurotmesis	V	x	x	x	x	x

Tab. 1 **Synapse der Klassifikation traumatischer Nervenschäden nach SEDDON und SUNDERLAND.** x = geschädigte Struktur

Diese erweiterte Klassifikation von SUNDERLAND ist von klinischer Relevanz, da sie hilft, nicht nur das Verletzungsausmaß zu beschreiben, sondern auch die Prognose besser beurteilen und einen geeigneten Therapieplan entwerfen zu können (SUNDERLAND, 1951; NIX, 1991).

## 1.2 Degeneration

Notwendige Voraussetzung für die periphere Nervenregeneration sind optimale Wachstumsbedingungen im distalen Nervenstumpf. Bevor Nervenfasern regenerieren können, muss eine bestimmte Abfolge von degenerativen Prozessen stattfinden. Diese schaffen eine Umgebung, die ein erfolgreiches Einwachsen der Nervenfasern in den distalen Stumpf ermöglicht (BURNETT und ZAGER, 2004; STOLL und MÜLLER, 1999; FAWCETT und KEYNES, 1990; FANSA und KEILHOFF, 2003). Durch eine Axonunterbrechung entstehen zwei ungleiche Teile der Nervenzelle: das Perikaryon mit Zellkern und proximalem Axonstumpf und das abgetrennte kernlose distale Axonsegment. In diesem distalen Abschnitt erfolgt eine anterograde Degeneration von proximal nach distal. Der Ablauf dieser degenerativen Veränderungen zeigt charakteristische morphologische Merkmale und ist als „Waller-Degeneration“ bekannt. Zeitgleich spielen sich proximal der Läsionsstelle ebenfalls degenerative Vorgänge ab, die als retrograde Degeneration bezeichnet werden (MUMENTHALER et al., 2007). Reaktive, degenerative und regenerative Veränderungen greifen dabei eng ineinander und sind oft schwer voneinander abzugrenzen (KRÜCKE, 1974).

### 1.2.1 Distaler Stumpf (Waller-Degeneration)

#### 1.2.1.1 Historische Entwicklung

Die Kenntnisse der histopathologischen Veränderungen im proximalen und distalen Abschnitt des peripheren Nervs nach Unterbrechung des Axons gehen auf experimentelle Untersuchungen aus dem 18. und hauptsächlich 19. Jahrhundert zurück (KRÜCKE, 1974). AUGUSTUS WALLER<sup>2</sup> stellte 1850 den Nervenzerfall nach

---

<sup>2</sup> AUGUSTUS VOLNEY WALLER (\*1816 in Faversham, Kent – †1870 in Genf) beschrieb in seiner Veröffentlichung in den Philosophical Transactions of the Royal Society of London von 1850 erstmals seine Beobachtungen von den Veränderungen durchschnittener Nerven an Froschzungen (WALLER, 1850). Die nach Nervendurchtrennung ablaufende Degeneration des distalen Nervenstumpfs ist seitdem als „Waller-Degeneration“ bekannt und sein Name in der Neurophysiologie fest verankert. WALLER steuerte mit seinen weit gefächerten Untersuchungen grundlegend zum Verständnis der Struktur des Nervensystems bei. Seine Arbeit stellt den Beginn der Neuronentheorie (→ s. Fußnote RAMON Y CAJAL) dar und lieferte eine Technik zur Erforschung neuronaler Wegfindungen und Verknüpfungen (JAY, 2002).

Axonotomie am Beispiel vom N. glossopharyngeus und N. hypoglossus des Frosches dar (WALLER, 1850). In seinem bekannten Beitrag der Royal Society of London beschrieb er seine mikroskopischen Beobachtungen über die ablaufenden Veränderungen der Nervenstruktur, nachdem die Verbindung zum zentralen Nervensystem unterbrochen worden war (WALLER, 1850). Diese Beschreibungen stimmen mit dem heutigen Verständnis der distalen Nervendegeneration größtenteils überein.

Ein halbes Jahrhundert nach WALLER bestätigte RAMON Y CAJAL<sup>3</sup> WALLERS Beobachtungen und lieferte eine sehr detaillierte histologische Beschreibung der axonalen Degeneration (RAMON Y CAJAL, 1928; STOLL et al., 2002).

### 1.2.1.2 Neuere Erkenntnisse

Was WALLER am N. hypoglossus und N. glossopharyngeus des Frosches beschrieb und mit handgefertigten Zeichnungen illustrierte, trifft nach heutigem Verständnis auf alle Nervenläsionen zu, die die Integrität des Axoplasmas unterbrechen. Basierend auf WALLERS und CAJALS Beobachtungen und neueren ultrastrukturellen und molekularen Untersuchungen bezeichnet der Ausdruck „Waller-Degeneration“ heutzutage folgenden Ablauf der Ereignisse im distalen Stumpf eines axotomierten Nervs (STOLL et al., 2002):

Sie beginnt mit einer Strukturauflösung des Axoplasmas und des Axolemm (STOLL et al., 1989b), die Ultrastruktur der Axone wird durcheinander gebracht, die axonale Kontur infolge variköser Schwellung unregelmäßig (BURNETT und ZAGER, 2004). Mit

---

<sup>3</sup> SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL (\*1852 in Petilla de Aragón – †1934 in Madrid) ist als einer der Begründer der modernen Neurowissenschaften bekannt. Zu seinen Veröffentlichungen gehören grundlegende Werke im Verständnis des Nervensystems. In der damaligen Zeit war die Auffassung von einem retikulären Nervensystem vorherrschend, einem Netzwerk von kontinuierlich zusammenhängenden Nervenfasern. CAJAL revolutionierte dieses Konzept: Zur histologischen Darstellung modifizierte er eine von GOLGI (1873) entwickelte Silberimprägnierung, bei der die einzelnen Nervenzellen sich schwarz gegen das transparente umgebende Gewebe abgrenzen (LOEWY, 1971). Er folgerte aus seinen Beobachtungen, dass einzelne Nervenzellen die Grundlage des Nervensystems bilden. Die Axone und Dendriten als Teil dieser Neurone stellen die Nervenfasern dar und enden mittels freier Verzweigungen, die sich direkt an die Zielzellen anlegen. Die Reizübertragung erfolgt nach seiner Theorie über Synapsen der benachbarten Strukturen (HAMBURGER, 1980; LOEWY, 1971). Er erhielt 1906 zusammen mit GOLGI den Nobelpreis („in Anerkennung ihrer Arbeit über die Struktur des Nervensystems“) (KIRSCHKE, 1984). Seine herausragende wissenschaftliche Arbeit und seine zahlreichen Lehrbücher zur Morphologie des Nervensystems führten zur Errichtung der so genannten „Spanischen Schule“ der Neurohistologie (HAMBURGER, 1980; ANDRES-BARQUIN, 2001).

der Auflösung der Axone zerfällt auch die Markscheide zunächst in ellipsenförmige Fragmente, den Myelinoiden (STOLL et al., 1989b). Der weitere Abbau der Markscheide erfolgt durch Schwann-Zellen und später durch Makrophagen.

Die Schwann-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Waller-Degeneration. Im Rahmen der Degeneration stellen sie ihre Funktion von Myelinisierung auf Regenerationsförderung und Proliferation um. Als Reaktion auf den Axonverlust hypertrophieren ihre Zellkerne und das Zytoplasma (LIU et al., 1995) und ihre Myelinproteinsynthese wird innerhalb von wenigen Tagen minimiert (LEBLANC und PODUSLO, 1990). Sie phagozytieren Myelinellipsoide und sondern kleinere Myelinfragmente ab (STOLL et al., 1989b). Myelinabfälle von Schwann-Zellen wirken chemotaktisch auf einwandernde Makrophagen (LIU et al., 1995), die die myelinen Abfallprodukte weiter zu Neutralfetten abbauen. Von Makrophagen gebildete Zytokine stimulieren die Proliferation der Schwann-Zellen und die Produktion neurotropher Faktoren (LIU et al., 1995). Sie unterstützen so die Bildung eines für die axonale Regeneration günstigen lokalen Milieus (BAICHWAL et al., 1988; HEUMANN et al., 1987). Die proliferierenden Schwann-Zellen produzieren ihrerseits Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Moleküle der extrazellulären Matrix (LIU et al., 1995). Schließlich lagern sich die durch Proliferation neu gebildeten Schwann-Zellen innerhalb der verbliebenen Basallamina säulenförmig an. Sie bilden die sogenannten „Büngner<sup>4</sup>-Bänder“, welche als Leitschienen für regenerierende Nervenfasern dienen (STOLL et al., 1989b). Sobald die Schwann-Zellen wieder mit dem auswachsenden Axon Kontakt erhalten haben, erfolgt die erneute Umstellung des molekularen Programms auf Remyelinisierung (STOLL und MÜLLER, 1999). Die Expression der neurotrophen Moleküle wird reduziert und die Schwann-Zellen beginnen mit der erneuten Synthese von myelinen Proteinen, Fetten und spezifischen Enzymen (LIU et al., 1995).

---

<sup>4</sup> OTTO VON BÜNGNER (\*1858 in Riga - †1905 in St. Blasien) habilitierte „Ueber die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen“. Er erkannte, dass eine zeitliche oder räumliche Trennung von Degeneration und Regeneration nicht möglich ist. Er beschreibt die Vermehrung der Kerne der Schwann-Scheide nach Nervendurchtrennung, ihre Gruppierung gemäß des Faserverlaufs und die fibrilläre Struktur des Protoplasmas (VON BÜNGNER, 1890).

### 1.2.2 Proximaler Stumpf

Nach einer axonalen Durchtrennung unterliegen die Zellkörper einer Vielzahl von anatomischen Veränderungen sowie Modifikationen der Genexpression und des zellulären Stoffwechsels (FAWCETT und KEYNES, 1990). Das Ausmaß der Veränderungen des Nervenzellkörpers und des proximalen Nervenstumpfes hängen vom Verletzungsgrad und der Nähe des verletzten Segments zum Zellkörper ab. Schwann-Zellen gehen in der Umgebung der Verletzung zugrunde. Axone und Markscheiden werden in ihrem Durchmesser sichtbar reduziert. Die Nervenleitgeschwindigkeit ist aus diesem Grund vermindert (BURNETT und ZAGER, 2004).

Die proximalen degenerativen Veränderungen können vom Ausmaß sehr unterschiedlich sein. Sie können nur bis zum ersten Ranvierschen Schnürring proximal der Verletzung reichen oder aber auch die gesamte Strecke bis zum Nervenzellkörper einnehmen (BURNETT und ZAGER, 2004). Nicht selten resultiert aus einer schweren Verletzung ein apoptoseähnlicher Tod der Nervenzelle (LUNDBORG, 2000). Der reaktive Ablauf im Nervenzellkörper selbst verläuft verhältnismäßig vorhersehbar. Innerhalb von sechs Stunden wandert der Zellkern an den Rand der Zelle. Die Nisslschollen (Ansammlungen von rauem Endoplasmatisches Retikulum) brechen auf und lösen sich im Rahmen dieser „Chromatolyse“ auf (FAWCETT und KEYNES, 1990; BURNETT und ZAGER, 2004). Zeitgleich reagieren die umgebenden Glia-Zellen mit Proliferation (BURNETT und ZAGER, 2004). Der Beginn der Regeneration ist verknüpft mit vermehrter Genexpression und Proteinbiosynthese. Prinzipiell werden solche Proteine während der Regeneration produziert, die auch mit der axonalen Entwicklung in der Embryonalzeit assoziiert sind. Der Nervenzellkern ist aufgrund der gesteigerten Proteinbiosynthese vergrößert (FAWCETT und KEYNES, 1990).



## 1.3 Regeneration

### 1.3.1 Historie – RAMON Y CAJAL

Ende des 19. Jahrhunderts existierten zwei gegensätzliche Hypothesen über den Vorgang der Regeneration: Die Verfechter der Kontinuitätstheorie beschrieben die Regeneration als Verlängerung des proximalen Endes, die Anhänger der Diskontinuitätstheorie oder „catenary theory“ nahmen an, dass die Regeneration von der mesodermalen Schwann-Scheide ausgehe (RAMON Y CAJAL, 1928). Erst RAMON Y CAJAL konnte 1905 durch verbesserte Darstellung der Axone mithilfe der Silberfärbung den Nachweis erbringen, dass die Axonregeneration allein durch Aussprossen aus dem proximalen Stumpf erfolgt. Er unterschied dabei zwei Formen der Faserneubildung: einerseits geknospete Terminalfasern der verlängerten alten Axonspitze und andererseits Kollateralen, die im rechten oder spitzen Winkel zum alten Axon aussprossen. Beide Triebe besitzen noch keine Markscheiden und enden frei mit einer terminalen Knospe oder Keule (RAMON Y CAJAL, 1928).

### 1.3.2 Neuere Erkenntnisse und Techniken

Auf den Grundlagen der Erkenntnisse von RAMON Y CAJAL haben technische Neuerungen, wie die Entwicklung des Elektronenmikroskops durch ERNST RUSKA und MAX KNOLL 1931 (KRUGER et al., 2000), die Markierungen mit Radiotracern (FORMAN und BERENBERG, 1978; DANIELSEN et al., 1986) oder retrograde Markierungen (BRUSHART, 1993; AL-MAJED et al., 2000b) zur Erweiterung des Verständnisses der peripheren Axonregeneration beigetragen.

Dabei macht man sich bei den Markierungsmethoden physiologische Vorgänge der Nervenzellen zunutze: Intrazellulär existieren unterschiedliche Transportmechanismen: zum einen ein langsamer axonaler Transport, der nur in anterograder Richtung verläuft, d.h. vom Perikaryon nach distal, und der v.a. für den Transport von Strukturproteinen wie Mikrofilamenten verantwortlich ist. Zum anderen ein schneller axonaler Transport, der in beide Richtungen verlaufen kann und z.B. Neurotransmitter anterograd und lysosomale Vesikel retrograd transportieren kann

(STENOIEN und BRADY, 1999; VON BARTHELD, 2004). Diese Transportmechanismen können verwendet werden, um Axone und deren Perikaryen zu markieren.

### **1.3.3 Antwort des Axons**

Axone beginnen innerhalb weniger Stunden nach ihrer Durchtrennung zu regenerieren. Die ersten Aussprossungen in myelinisierten Axonen werden generell aus dem letzten Ranvierschen Knoten beobachtet (FRIEDE und BISCHHAUSEN, 1980; McQUARRIE, 1985; MORRIS et al., 1972a; MORRIS et al., 1972b). Die Veränderungen am proximalen Stumpf zeigen wenige Tage nach der Axonunterbrechung keulen- oder kolbenförmige Auftreibungen, die als Wachstumskolben bezeichnet werden. Diese Auftreibungen enthalten Ansammlungen zytoplasmatischer Strukturen, die sich als Anstauung des anterograden Transports verstehen lassen. Die Enzymaktivität des Axons ist gesteigert. Dies bezeichnete RANVIER als präterminale Hypertrophie durch nutritive Hyperaktivität (RAMON Y CAJAL, 1928). Die Markscheide um die Axonschwellung ist abgestriffen (KRÜCKE, 1974).

Wie zuvor dargestellt, proliferieren bei der axonalen Regeneration eines peripheren Nervs Schwann-Zellen im distalen Teil und bilden die Büngner-Bänder nach der Waller-Degeneration aus. Sie können zudem die Verlängerung der regenerierenden Axone über lange Distanzen stimulieren.

### **1.3.4 Geschwindigkeit der axonalen Regeneration**

Die Geschwindigkeit, mit der die Axone aus dem proximalen Stumpf wachsen, hängt von den Veränderungen im Nervenzellkörper, der Aktivität der Wachstumskolben an der Spitze jedes einzelnen Axonssprosses und von dem Widerstand des verletzten Gewebes zwischen Zellkörper und Endorgan ab (BURNETT und ZAGER, 2004).

1942 verglich GUTMANN im Kaninchenmodell die Regeneration von Nerven nach Nervenquetschung mit Nerven, die durchtrennt und genäht worden waren (GUTMANN et al., 1942). Die ermittelten Wachstumsgeschwindigkeiten lagen bei 3,5 mm / Tag nach Nervendurchtrennung und 4,4 mm / Tag nach Nervenquetschung (GUTMANN et al., 1942). Zahlreiche andere Arbeitsgruppen folgten und untersuchten mit verschiedenen Methoden die Geschwindigkeit der Regeneration peripherer Nerven

(SEDDON et al., 1943a; FORMAN et al., 1979; DANIELSEN et al., 1986; FUGLEHOLM et al., 1994). Dabei stimmen ihre Ergebnisse insoweit überein, dass es in der ersten Zeit nach der Verletzung zu einer Verzögerung der Regeneration kommt, bevor eine konstante Geschwindigkeit erreicht werden kann (GUTMANN et al., 1942; FORMAN et al., 1979; DANIELSEN et al., 1986; FUGLEHOLM et al., 1994).

### **1.3.5 Morphologie regenerierender Axone**

Die ersten genaueren Untersuchungen zur Morphologie der regenerierenden Axone wurden von RAMON Y CAJAL Anfang des 20. Jahrhunderts unternommen. Er verwendete zur Darstellung der Axone eine neue Färbetechnik mit reduzierten Silbernitrat und veröffentlichte die Ergebnisse in seinem bekannten Werk „Degeneration and Regeneration of the nervous system“ von 1928. Er beschreibt darin Axone, die die Schnittfläche des distalen Stumpfs seitlich durchqueren und in Schwann-Zellhüllen eintreten, die weit vom ursprünglichen Axon entfernt sind (RAMON Y CAJAL, 1928). Seine Untersuchungsmethoden und Ergebnisse sind auch heute noch, über 80 Jahre nach ihrer Veröffentlichung, von großer Aktualität und Wichtigkeit. Dennoch sind die gelieferten Informationen hauptsächlich von qualitativer Art. Ebenso wurden die Wechselbeziehungen der axonalen Form mit ihrer Funktion eher in der Gruppe als auf individuellem Niveau untersucht. In den folgenden Jahrzehnten wurden deshalb technische Neuerungen zur weiteren Erforschung der Regeneration angewendet, allerdings mit unterschiedlichem Erfolg. So konnten nach der Entwicklung des Elektronenmikroskops durch ERNST RUSKA und MAX KNOLL 1931 zahlreiche ultrastrukturelle Erkenntnisse des proximalen und distalen Stumpfs während der Degeneration und Regeneration gewonnen werden (MORRIS et al., 1972a; KRUGER et al., 2000). Diese Methode ist allerdings zur Beobachtung des einzelnen Axons in seiner Gesamtheit ungeeignet (FRIEDE und BISCHHAUSEN, 1980). Daneben führen Techniken wie die anterograde Markierung und immunhistochemische Nachweismethoden von wachstumsassoziierten Proteinen zu einer Markierung von zahlreichen Axonen über lange Distanzen. Dies macht eine Unterscheidung der Axone untereinander im Gewirr der Reparaturstelle fast unmöglich. Die Interaktion individueller Axone mit dem distalen Nervenstumpf ist damit nicht ausreichend zu bewerten. Gerade dieser Prozess allerdings ist vermutlich

für das funktionelle Ergebnis der Nervenwiederherstellung verantwortlich. Daher sind auch weiterhin Untersuchungen der axonalen Regeneration aus morphologischem Blickwinkel notwendig.

Die Entwicklung transgener Mäuse, die fluoreszierende Proteine in einem Teil ihrer Axone exprimieren, hat hierbei neue Möglichkeiten eröffnet (FENG et al., 2000; CHALFIE et al., 1994; CHALFIE, 1995; NGUYEN et al., 2002). Somit kann die individuelle Regeneration einzelner Axone entlang einer Nervenreparatur und mehrere Millimeter in den distalen Stumpf hinein verfolgt werden. Ihr morphologisches Verhalten, wie z.B. die seitliche Bewegung, kann präzise auch auf quantitativer Ebene untersucht werden. Damit ist es nun fast ein Jahrhundert nach RAMON Y CAJALS Beschreibungen möglich, das Regenerationsverhalten einzelner Axone zu beobachten. CAJALS Überlegungen zu Form und Funktion können nun auf der Ebene des individuellen Axons angewendet werden. Dies könnte unser Verständnis über die axonale Auswahl der Leitschienen im Prozess der Regeneration verbessern.

Mit der vorliegenden Arbeit soll CAJALS Versuchsaufbau zur Morphologie der Axone während der Regeneration im peripheren Nerven aufgegriffen werden. Am N. ischiadicus transgener Mäuse soll das Verhalten einzelner regenerierender Axone auf individueller Ebene mithilfe der Fluoreszenzmethode untersucht und quantifiziert werden.

### **1.3.6 Neurotrophe Faktoren**

In ihrer embryonalen Entwicklung sind periphere Neurone entscheidend auch von bestimmten neurotrophen Faktoren abhängig. Nach Verletzung antwortet das periphere Nervensystem der Säugetiere mit erneuter Bereitstellung dieser Faktoren. Im Rahmen der Waller-Degeneration wird durch zahlreiche molekulare Änderungen im distalen Stumpf eine Mikroumgebung gebildet, die die axonale Regeneration unterstützt (STOLL und MÜLLER, 1999). Bei diesen neurotrophen Faktoren können mehrere Gruppen mit zahlreichen Vertretern unterschieden werden. Dazu gehören die Neurotrophine mit NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5, die GDNF-Familie, neuropoetische Zytokine und Faktoren aus der Insulinfamilie (IGF-I/II). Die einzelnen Wirkstoffe und deren Rezeptoren müssen in einem exakt ausbalancierten Verhältnis zueinander stehen, um eine erfolgreiche axonale Regeneration und eine funktionelle

Wiederherstellung erreichen zu können. Die Erforschung der genauen Regulationsmechanismen stellt ein weites Feld in der aktuellen Forschung der Nervenregeneration dar (BOYD und GORDON, 2003; FANSA und KEILHOFF, 2003; ENGLISH, 2003; AL-MAJED et al., 2000b; SAARMA und SARIOLA, 1999; STOLL und MÜLLER, 1999). In der vorliegenden Arbeit richten wir unseren Fokus auf Untersuchungen der Morphologie der axonalen Regeneration. Von einer ausführlichen Erörterung der einzelnen Faktoren wird hier deshalb abgesehen.

### **1.3.7 Spezifität der Regeneration**

Die Ergebnisse peripherer Nervenreparatur hängen von mehreren Faktoren ab: Genügend Axone müssen die Peripherie vor Atrophie der Endorgane erreichen. Zusätzlich müssen Axone spezifisch mit passenden Endorganen zusammengefügt werden, um die motorische Funktion wiederherzustellen oder sinnvolle sensible Information zum ZNS zu liefern (BRUSHART, 1991; NIX, 1991).

Das therapeutische Versagen nach Nervenverletzung resultiert hauptsächlich aus der Regeneration von Axonen gemischter Nerven in unpassende Leitungsbahnen (AL-MAJED et al., 2000a) und somit Fehlleitung zu funktionell ungeeigneten Endorganen (BRUSHART, 1991). Nach Durchtrennung und Reparatur des N. ischiadicus beispielsweise innervieren korrekt nur 14 % der originalen Motoneurone den M. soleus (BODINE-FOWLER et al., 1997). Die regenerierenden Motoaxone werden zu sensiblen Endorganen geführt und sensible Axone zu motorischen Endplatten (LANGLEY und HASHIMOTO, 1917; BRUSHART, 1988; BRUSHART, 1991). Diese Axone scheitern nicht nur daran, funktionellen Kontakt herzustellen, sie blockieren gleichzeitig die von ihnen besetzten Leitungsbahnen für passende Axone (BRUSHART, 1991).

Bei vermindertem Trauma, wie z.B. Nervenquetschung im Gegensatz zum Nervenschnitt, verfolgen die Axone ihre früheren Leitschienen und kehren zu ihren Zielorganen mit großer Präzision zurück (NGUYEN et al., 2002). Für diese Spezifität werden die Hüllzellen verantwortlich gemacht, bei deren Unterbrechung die Präzision verschwindet und eine Vielfalt von geeigneten und ungeeigneten Zielen reinnerviert wird (NGUYEN et al., 2002; BRUSHART und MESULAM, 1980).

Embryonale Nerven besitzen die Fähigkeit, über weite Distanzen auch ohne Leitschiene das Erfolgsorgan zu erreichen. Diese Fähigkeit nimmt mit der weiteren Entwicklung ab und ist im erwachsenen Organismus nicht mehr vorhanden. Anatomische Strukturen müssen als Leitungsschienen verwendet werden wie z.B. die Büngner-Bänder nach Nerven-Transsektion. Bei vollständiger Kontinuitätsunterbrechung des Nerven samt seiner Hüllstrukturen führt die zufällige Wahl der Leitungsschienen zu Fehlregeneraten, die z.B. Synkinesien der Gesichtsmuskulatur nach Fazialisläsion erklären können (Nix, 1991).

Die Spezifität der Axonregeneration kann in zwei Formen unterteilt werden: Die „topographische Spezifität“ resultiert in der Reinnervation des korrekten Muskels im motorischen System bzw. des korrekten Hautareals im sensiblen System, die „Endorganspezifität“ beschreibt Reinnervation des korrekten Typus des sensiblen Endorgans im sensiblen System bzw. des korrekten Fasertyps im motorischen System (BRUSHART, 1991).

Mehrere Mechanismen werden für das Erreichen von Spezifität verantwortlich gemacht. Ihre potentielle Rolle in der Regeneration peripherer Nerven wird aber zum Teil widersprüchlich diskutiert.

**a) Mechanisch**

Das regenerierende Axon wird zu einer passenden distalen Schwann-Zellhülle durch operative Ausrichtung von proximalen und distalen Stumpf geführt (BRUSHART, 1991).

**b) Kontaktwiedererkennung**

Das regenerierende Axon testet den molekularen Fingerabdruck der distalen Schwann-Zellhüllen, erkennt und reinnerviert selektiv die passende Leitschiene. Hierbei werden sowohl anziehende als auch abweisende Mechanismen unterschieden (TESSIER-LAVIGNE und GOODMAN, 1996; BRUSHART, 1991).

### c) **Neurotropismus**

Das regenerierende Axon wird direkt durch einen ansteigenden Gradienten einer diffusiblen Substanz vom distalen Stumpf zu einer passenden Schwann-Zellhülle geführt. Auch hier sind sowohl chemoattraktive als auch chemorepulsive Faktoren bekannt (TESSIER-LAVIGNE und GOODMAN, 1996).

### d) **Neurotrophismus**

Der distale Stumpf wird zunächst zufällig durch vielfach verzweigte Axonaussprossungen reinnerviert. Axone, die in passende Schwann-Zellhüllen eintreten, erhalten trophische Unterstützung, während Axone in unpassenden Leitungsbahnen diese Unterstützung nicht erhalten und resorbiert werden (BRUSHART, 1991).

## 1.4 **Chirurgische Therapie**

Die Entwicklung der epineuralen Naht Ende des 19. Jahrhunderts ermöglichte das Zusammenfügen der durchtrennten Stümpfe ohne das faszikuläre Gewebe direkt zu berühren. Diese Verfahren, bei der das hauptsächliche Ziel ist, die Kontinuität des Nerven in der dazugehörigen Drehrichtung spannungsfrei wiederherzustellen (ROWSHAN et al., 2004), war mehr als über 100 Jahre lang die Methode der Wahl bei der chirurgischen Wiederherstellung durchtrennter Nerven (MILLES, 1985). Die Ausrichtung der Nervenenden orientiert sich dabei an äußeren Kennzeichen wie epineuralen Blutgefäßen. Die inneren Strukturen des Nervs bleiben ungestört (JABALEY, 1991).

Die Entwicklung eines ersten einfachen Operationsmikroskops 1921 durch NYLÉN (NYLEN, 1972) und weitere Entwicklungen führten 1953 zur Einführung des Operationsmikroskops OPMI 1 von Carl Zeiss ([WWW.ZEISS.DE/CHIRURGIE](http://WWW.ZEISS.DE/CHIRURGIE), 2003). Dies leitete die Ära der Mikrochirurgie ein. Das Interesse an faszikulärer Nerven-naht stieg erst daraufhin (JABALEY, 1991), obwohl die perineurale Naht von Langley und Hashimoto schon 1917 beschrieben worden war (LANGLEY und HASHIMOTO, 1917).

In den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die interfaszikuläre Nerven-Transplantation bekannt und die korrekte faszikuläre Identifizierung erlangte

mehr praktische Bedeutung (JABALEY, 1991). Im Gegensatz zur epineuralen Naht, bei der der erste Knoten die Ausrichtung des gesamten Nervs festlegt, erlaubt die faszikuläre Auftrennung die Identifizierung und erneute Koaptation jedes einzelnen Faszikels oder Faszikelgruppe innerhalb eines Nervensegments. Aufgrund dieser inneren Auftrennung liegen mehr Auswahlmöglichkeiten und somit auch mehr potentielle Fehlerquellen vor (JABALEY, 1991). Der potentielle Nutzen gegenüber der epineuralen Naht, das passende Zusammenfügen motorischer und sensibler Faszikel, muss gegenüber der möglicherweise gesteigerten Fibrosierung im Zusammenhang mit größerer Auftrennung und vermehrtem intraneuralem Nahtmaterial abgewogen werden (ROWSHAN et al., 2004). Es existieren keine Daten oder Hinweise, die zeigen, dass sich eine Technik grundsätzlich besser eignet als andere (MILLES, 1985; ROWSHAN et al., 2004).

Die in den sechziger und siebziger Jahren erzeugte Hoffnung, die Verfeinerungen in der mikrochirurgischen Technik würden durch genaues Ausrichten der neuronalen Komponenten das klinische Ergebnis nach Wiederherstellung peripherer Nerven bedeutsam verändern, wurde zwar im Vergleich zu den makroskopisch erlangten Resultaten erreicht. Dennoch sind die heute gewonnenen Ergebnisse bei Erwachsenen in bis zu 90 % der Fälle permanente funktionelle Kompromisslösungen (BRUSHART, 1998b). Die Entwicklung zusätzlicher Verfahren ist notwendig, um durch kombiniertes Herangehen das funktionelle Ergebnis zu verbessern. Hierbei lieferten Untersuchungen der letzten Jahre eindeutige Hinweise einer positiven und potentiell klinisch nutzbaren Wirkung niederfrequenter elektrischer Nervenstimulation.



## 1.5 Elektrostimulation

In der Medizin sind drei Verwendungsbereiche der elektrischen Stimulation bekannt: als diagnostisches Hilfsmittel, als therapeutisches Verfahren und als Ersatz verloren gegangener physiologischer Funktionen.

### 1.5.1 Geschichtliche Entwicklung

Eine in der Wissenschaft lang verbreitete Annahme war die schon von GALEN (\*um 130 - † um 200) postulierte These, dass ein „tierischer Geist“ vom Gehirn durch die Nerven zu den Muskeln ströme, um dort die Aktivität des Körpers zu steuern. Vor dem Hintergrund weit reichender Forschungen und Entdeckungen auf dem Gebiet der Elektrizität, stellten die Wissenschaftler des 18. Jahrhunderts die Vermutung auf, dass dieser „tierische Geist“ elektrischer Natur sei (GEDDES und HOFF, 1971). Als einer der Begründer der experimentellen Physiologie führte ALBRECHT VON HALLER (1708-1777) systematische tierexperimentelle Untersuchungen zur „Irritabilität“ (Reizbarkeit) und „Sensibilität“ durch. LUIGI GALVANI (1737-1798) verursachte mit ersten Darstellungen der „Bioelektrizität“ im späten 18. Jahrhundert eine heftige Debatte unter den damaligen Wissenschaftlern, aus der eine Reihe wesentlicher Entdeckungen und Entwicklungen hervorgingen (GEDDES und HOFF, 1971; ASHLEY-ROSS und GILLIS, 2002).

Wegen mangelnder Sensitivität der damals gebräuchlichen Messinstrumente, war es den Forschern jener Zeit nicht möglich, die kleinen Ströme des bioelektrischen Potentials zu messen. Erst der Berliner Physiologe DU BOIS-REYMOND<sup>5</sup> (1818-1896) konnte mithilfe eines speziellen „Galvanometers“ nicht nur zeigen, dass sowohl Nerven als auch Muskeln elektrische Ströme in Form kurzer Impulse generieren und

---

<sup>5</sup> EMIL HEINRICH DU BOIS-REYMOND (\*1818 in Berlin – †1896 in Berlin) Der Berliner Physiologe gilt als wissenschaftlicher Begründer der Elektrophysiologie. Zu den wichtigsten seiner Erkenntnisse in der Elektrophysiologie gehört der Nachweis der elektrischen Aktivität in Nerven und Muskeln. Er löste damit die Vorstellung von einem „Nervensaft“ komplett ab. Zusätzlich entdeckte er die „negative Schwankung“ als Funktionsgrundlage der Nerven. Dies führte später zur Aufklärung des Nervenimpulses, oder heute Aktionspotential genannt. Weitere Verdienste schuf er durch die Entwicklung und Einführung verbesserter Reiz- und Messinstrumente in die Laborpraxis, die oftmals die Grundlage der noch heute verwendeten Instrumente bilden (ROTHSCHUH, 1964; BENEKE, 1999).

leiten (BASMAJIAN und DE LUCA, 1985; SABBATINI, 1998), sondern diese Ströme auch präzise messen (ASHLEY-ROSS und GILLIS, 2002). Die gemessenen Impulse wurden später als Aktionspotentiale bekannt. DU BOIS-REYMONDS „Untersuchungen über die thierische Elektrizität“ (DU BOIS-REYMOND, 1849) begründeten den Wissenschaftszweig der Elektrophysiologie.

HERMANN VON HELMHOLTZ gelangen 1850 erste Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit (VON HELMHOLTZ, 1850). LUDIMAR HERMANN formulierte die „Strömchentheorie“ der Erregungsleitung, bei der Lokalströme von erregten Abschnitten in benachbarte fließen und selber erregend wirken. Auf dieser Grundlage beruht die heute aktuelle Ionentheorie der Erregung, die von BERNSTEIN begründet (BERNSTEIN, 1902) und von HODGKIN und HUXLEY weiterentwickelt wurde (HODGKIN und HUXLEY, 1952). Dabei wird das Ruhepotential der Zellmembranen, gebildet von ihrer unterschiedlichen Permeabilität für verschiedene Ionen, durch einen lokalen Reiz entladen und in ein Aktionspotential umgewandelt. Die so entstandene Potentialdifferenz zwischen benachbarten Nervenabschnitten wird durch Ionenströme ausgeglichen, die ihrerseits zu einer Depolarisation des angrenzenden Segments führen.

Als therapeutisches Mittel wurde elektrische Stimulation Mitte des 19. Jahrhunderts zur populären Behandlung bei Beschwerden des Nervensystems eingesetzt. Schon in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts hatte die Elektrotherapie, im Unterschied zur Elektrodiagnostik, eine Trendwelle erlebt und war aufgrund ausgeprägter Scharlatanerie als Behandlungsart in Verruf geraten (CAMPBELL, 1973). Die Entdeckung des Elektromagnetismus durch OERSTEDT 1820 und der Induktionselektrizität von MICHAEL FARADAY 1831 sowie die Entwicklung der Induktionsspule brachten der Elektrotherapie einen neuen Aufschwung (DUCHENNE DE BOULOGNE, 1860). Die Versuche, den elektrischen Strom zu physiologischen und therapeutischen Zwecken auf einzelne Körperteile zu beschränken, scheiterten allerdings an dem Unvermögen, das kranke Organ zu erreichen ohne zugleich gesunde Organe oder das gesamte Nervensystem zu erregen. Erst der französische

Neurologe DUCHENNE DE BOULOGNE<sup>6</sup> begründete eine Methode der örtlichen Anwendung der Elektrizität. Dieses Verfahren ermöglichte die gezielte und beschränkte elektrische Stimulation einzelner Muskeln, Nerven oder innerer Organe (DUCHENNE DE BOULOGNE, 1855; DUCHENNE DE BOULOGNE, 1860). Für sein Verfahren verwendete er Induktionsstrom und bezeichnete es als „örtliche Faradisation“ (DUCHENNE DE BOULOGNE, 1860).

Der Berliner Neurologe ROBERT REMAK (1815-1865) war hingegen der Meinung, dass der konstante Gleichstrom der galvanischen Elektrizität dem Induktionsstrom DUCHENNES in seinen therapeutischen Leistungen überlegen sei (REMAK, 1858). Aufgrund entscheidender Modifikationen des Verfahrens gelang es ihm, die therapeutische Anwendung des galvanischen Stromes auf eine wissenschaftliche Basis zu stellen. Mit der Entwicklung eines neuen Galvanoskops an der Charité Berlin und zahlreichen Veröffentlichungen führte er die Galvanisation erneut in die Medizin ein (GERNET, 2000). Die Indikationen seiner Galvanotherapie zeigen große Übereinstimmungen mit den noch heute aktuellen Anwendungsbereichen der Gleichstromtherapie.

### 1.5.2 Aktuelle Verfahren

In der klinischen Anwendung existieren unzählige Verfahren, denen die Verwendung elektrischer Stimulation gemein ist, die sich aber in Funktion, Indikation und Anwendung grundlegend unterscheiden. Generell lassen sich therapeutische von diagnostischen Verfahren abgrenzen. Unter den therapeutischen wiederum gibt es Methoden zur Schmerztherapie, zum funktionellen Ersatz neurologischer Funktionen und zum Beispiel zur Förderung von Knochenwachstum, Wundheilung oder auch Nervenregeneration. Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung liegt in der zugrunde liegenden Elektrizität. So können Iontophorese und Stangerbad als Gleichstromverfahren (und auf REMAKS Galvanotherapie begründet) von Verfahren mittels Wechselstrom auf der Grundlage der DUCHENNE'schen örtlichen Faradisation

---

<sup>6</sup> GUILLAUME BENJAMIN AMAND DUCHENNE DE BOULOGNE (\*1806 in Boulogne - †1875 in Paris) begründete die moderne Elektrodiagnostik und Elektrotherapie. Mit der von ihm entwickelten Methode der isolierten elektrischen Erregung einzelner Skelettmuskeln erlangte er zudem große Verdienste in der Muskelphysiologie und später in der Muskelpathologie.

abgegrenzt werden, wie dies bei der transkutanen und neuromuskulären Nervenstimulation der Fall ist. Als weiteres Einteilungsprinzip ist auch die Gliederung nach Frequenz- bzw. Wellenlängenbereich verbreitet: Nieder- (0 – 1000 Hz), Mittel- (1000 Hz – 300 kHz) und Hochfrequenztherapien (> 300 kHz). Eine Sonderform im Niederfrequenzbereich bildet die Elektrotherapie mit konstantem Gleichstrom (Frequenz Null) als Galvanisation. Im Gegensatz zur Reiz- oder Impulsstromtherapie kommt es bei ihr zu keinen Erregungen bzw. Depolarisationen von Nerv oder Muskel.

Die weitere Erwähnung und Beschreibung der verschiedenen Verfahren der Elektrotherapie erfolgt im Hinblick ihrer Verwendung bei Störungen des peripheren Nervensystems. Eine detaillierte Beschreibung aller vorhandenen Methoden kann im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend erarbeitet werden.

#### **a) Gleichstromverfahren: Galvanisation**

Aufgrund der Zusammensetzung seiner Gewebsflüssigkeit aus Elektrolyten kann der menschliche Körper elektrischen Strom leiten. Die diagnostische und therapeutische Verwendung dieses Effekts durch Einleiten von Gleichstrom wird zu Ehren GALVANIS als „Galvanisation“ bezeichnet. Unter „galvanischem Strom“ versteht man einen Strom konstanter Spannung und gleich bleibender Fließrichtung, bei denen es zu keiner Depolarisation von Nerv oder Muskel kommt. Zur Therapie werden galvanische Elemente verwendet, bestehend aus zwei Elektroden verschiedener Metalle, die in eine oder zwei elektrisch leitende Flüssigkeiten getaucht werden. Damit lässt sich eine zeitlich konstante elektrische Spannung (d.h. Gleichspannung) erzeugen. Für die Bildung der Elektrizität ist hierbei die Umwandlung von chemischer in elektrische Energie zuständig (GERNET, 2000). Die häufigste Applikationsart der galvanischen Ströme sind hydroelektrische Bäder als Voll- oder Teilbäder, z.B. „Stangerbad“ oder Vierzellenbad (GERNET, 2000). Zu den Anwendungsgebieten gehören Schmerztherapie, Durchblutungsförderung und Iontophorese, bei der mithilfe des konstanten galvanischen Stroms Medikamente durch die unverletzte Haut in tiefere Bereiche des Gewebes eingebracht werden (EDEL, 1991).

**b) Wechselstromverfahren: Reizstromtherapie**

Dieses Verfahren beruht auf der Entdeckung des Induktionsstroms durch FARADAY. Der erzeugte Wechselstrom zeichnet sich dadurch aus, dass er mehrmals pro Sekunde das Vorzeichen seiner Spannung und damit seine Fließrichtung ändert. Aufgrund der sehr kurzen Dauer der einzelnen Stromimpulse zeigen faradische Ströme keine chemischen und elektrolytischen Wirkungen. Durch den von außen applizierten elektrischen Reiz wird das Ruhepotential der Nervenfaser- oder Muskelfasermembran unter einen kritischen Wert abgesenkt. Die dadurch schlagartig zustande kommende Depolarisation löst ein Aktionspotential und damit die Weiterleitung der Erregung aus (GERNET, 2000; EDEL, 1991). Dies macht man sich bei den Verfahren zur neuromuskulären Reizung zunutze.

Bei der Reizung im Niederfrequenz- und Mittelfrequenzbereich können Muskeln entweder indirekt über die motorischen Nervenfasern oder direkt gereizt werden. Zu den **indirekten Verfahren** gehört die neuromuskuläre Elektrostimulation (NMES) normal innervierter Skelettmuskulatur: Durch Einzelimpulse oder durch sogenannte tetanisierende Impulsfolgen können normal innervierte Muskeln über ihren peripheren motorischen Nerven zur Kontraktion gebracht werden. Im therapeutischen Bereich wird dieses Verfahren zur Therapie der Inaktivitätsatrophie bei Immobilisation angewendet. In der Sportmedizin ist dieses Verfahren auch zum Muskelaufbau gesunder Sportler bekannt.

Ein Verfahren der **direkten Muskelstimulation** wird bei total denervierter Skelettmuskulatur eingesetzt: Folge nach Verletzung motorischer Nerven ist im Normalfall eine progressive Muskelatrophie. Diese atrophischen Muskelveränderungen sind auf eine Kombination von Nichtgebrauch und Denervation zurückzuführen. Ihr Schweregrad hängt direkt von der Distanz ab, die der regenerierende Nerv von der Verletzungsstelle bis zum Muskel wachsen muss (WILLIAMS, 1996a). Eine gute funktionelle Wiederherstellung nach Nervenverletzung kann allerdings nur erreicht werden, wenn nach erfolgter Nervenregeneration auch noch ausreichend Muskelsubstanz zur Verfügung steht. Zur Überbrückung des Zeitraumes zwischen Denervation und vollendeter Reinnervation wird der betroffene Muskel elektrisch stimuliert. Hierbei müssen die Muskelfasern direkt gereizt werden.

Das Voranschreiten des atrophischen Prozesses kann damit gestoppt oder zumindest vermindert werden.

Als dritte Form der klinischen Nervenstimulation steht neben der diagnostischen und therapeutischen Nervenstimulation die **funktionelle elektrische Nervenstimulation** (FES) zu Verfügung. Ihr Ziel ist es, durch künstlich erzeugte Nervenaktivität verloren gegangene Bewegungen oder Funktionen zu unterstützen oder zu ersetzen. Sie steuert die gewünschte Muskelaktivität und verbessert deren Willkürkontrolle. Klinische Beispiele sind hierfür die elektronische Peronealorthese bei Hemiplegikern mit Fallfuß, die elektrophrenische Respiration zur Langzeitbeatmung oder die sakrale Nervenstimulation bei Stuhlinkontinenz (RUSHTON, 1997).

Ein weiteres großes Feld bilden die Nervenstimulationsverfahren zur Schmerzbekämpfung, der **Elektroanalgesie**. Die transkutane Elektrostimulation (TENS) wird zur Behandlung akuter oder chronischer Schmerzzustände zahlreicher Indikationsgebiete angewendet. Die verwendeten Oberflächenelektroden werden auf bestimmten Hautarealen befestigt und können direkt über dem Schmerzgebiet, über dem peripheren Nerven, der das Schmerzareal versorgt oder über Triggerpunkten positioniert werden. Aufgrund der fehlenden Invasivität, des breiten Indikationsspektrums und der Entwicklung von batteriebetriebenen handlichen Geräten zur Heimanwendung, hat dieses Verfahren eine weit verbreitete Anwendung in der Schmerztherapie gefunden. Bei der peripheren Nervenstimulation (PNS) bzw. subkutanen Nervenstimulation (SNS) erfolgt die Stimulation peripherer Nerven zur Schmerztherapie mittels Elektroden, die operativ epineural befestigt worden sind (PNS) oder mittels Elektroden, die perkutan eingebracht worden sind und subkutan in der Umgebung des Nervs liegen (SNS). Ein weiteres Elektroanalgesieverfahren ist die Rückenmarksstimulation (SCS), bei dem im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Methoden die Stimulation nicht im peripheren sondern im zentralen Nervensystem erfolgt. Die Elektroden werden hierbei entweder perkutan oder operativ eingebracht und liegen im Epiduralraum.

### **1.5.3 Elektrische Nervenstimulation und die axonale Regeneration**

Zahlreiche Studien der letzten zwanzig bis dreißig Jahre deuten positive Effekte der elektrischen Nervenstimulation auf die axonale Regeneration nach peripherer

Nervenverletzung an (NIX und HOPF, 1983; POCKETT und GAVIN, 1985; MANIVANNAN und TERAKAWA, 1994; SEBILLE und BONDOUX-JAHAN, 1980). In letzter Zeit erwies sich vor allem die kurzzeitige niederfrequente Elektrostimulation zum Zeitpunkt der Nervenreparatur als vielversprechende Option, die Regeneration motorischer und sensibler Axone zu fördern (AL-MAJED et al., 2000a; GEREMIA et al., 2002; BRUSHART et al., 2005).

Der zugrunde liegende Mechanismus ist hierbei allerdings noch umstritten: So konnte in den unterschiedlichen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden, ob durch die Elektrostimulation die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone direkt gesteigert wird (ENGLISH et al., 2005; ENGLISH et al., 2007) oder ob vielmehr die beschleunigte Regeneration durch einen erleichterten Beginn der axonalen Regeneration zu erklären ist (BRUSHART et al., 2002). Zur erneuten Untersuchung dieser Fragestellung wird die vorliegende Arbeit am Ischiadikus-Modell der Maus mittels Versorgung durch Nervennaht durchgeführt.

## 1.6 Problemstellung und Zielsetzung

In letzter Zeit hat sich die Herangehensweise an eine periphere Nervenverletzung allmählich gewandelt, da vorwiegend mechanisch ausgerichtete Bemühungen an ihre Grenzen stoßen. Dagegen wächst das Verständnis, mit einem komplexen biologischen Problem konfrontiert zu sein.

Eine mögliche Erklärung für das Versagen der funktionellen Regeneration bei voller Ausnutzung der aktuellen chirurgischen Möglichkeiten ist in der Morphologie der axonalen Regeneration zu suchen. Erste Überlegungen dazu stellte schon der spanische Histologe RAMON Y CAJAL zu Beginn des letzten Jahrhunderts an. Viele seiner Beobachtungen zur Regeneration peripherer Nerven sind bis heute noch aktuell. Die Entwicklungen der Molekulargenetik ermöglichen uns allerdings verbesserte Darstellungsmethoden. So sind wir in der Lage, anhand eines transgenen Mausmodells den Verlauf der regenerierenden Axone als individuelle Einzelstrukturen verfolgen zu können. Die Versuche von CAJAL aufgreifend soll in der vorliegenden Arbeit mithilfe der individuellen Darstellung der Axone die Morphologie der axonalen Regeneration peripherer Nerven weiter untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es, potentielle Erklärungsansätze für das erreichte Limit der chirurgischen Verfahren zu erhalten und Möglichkeiten der Beeinflussung der axonalen Regeneration zu erläutern.

Auf der Suche nach potentiell klinisch nutzbaren Verfahren, die die periphere Nervenregeneration zu fördern vermögen, erlangt die elektrische Nervenstimulation wachsende Bedeutung. Zahlreiche Studien der letzten Jahrzehnte deuten eine potentielle Beeinflussung der axonalen Regeneration durch elektrische Stimulation an. Mithilfe transgener Mäuse, die fluoreszierende Proteine in einem Teil ihrer Axone exprimieren und somit die Beobachtung des Regenerationsverhaltens individueller Axone ermöglichen, soll zuerst die Morphologie der axonalen Regeneration untersucht und in einem weiteren Schritt die Beeinflussung auf das axonale Regenerationsverhalten durch elektrische Stimulation geprüft werden.



## 2 Material und Methoden

Mit der vorliegenden Arbeit sollen weitere Erkenntnisse sowohl zur Morphologie der peripheren Nervenregeneration als auch zur Beeinflussung des axonalen Regenerationsverhaltens durch elektrische Stimulation gewonnen werden.

Vor dem Hintergrund einer breiten Studienlage, die bis ins 19. Jahrhundert zurückreicht, steht diese Arbeit unter dem besonderen Aspekt der Beobachtung der Axone in ihrer Individualität. Aufgrund der Entwicklung eines speziellen Mausmodells war es uns möglich, die einzelnen Axone und ihre Morphologie im Verlauf des Regenerationsprozesses zu verfolgen.

Der Versuch ist in zwei Teilbereiche gegliedert. Der erste Abschnitt befasst sich mit der Morphologie der Axone auf ihrer Weg- und Zielsuche nach peripherer Nervendurchtrennung. In einem zweiten Abschnitt soll der Einfluss elektrischer Stimulation auf das Regenerationsverhalten der Axone untersucht werden.

### 2.1 Mausmodell

Zur individuellen Darstellung der regenerierenden Axone wurden die Versuche an transgenen Mäusen der Linie thy1-YFP-H durchgeführt: transgene Mäuse, deren genetische Grundlagen auf Kreuzungen der Linien C57BL/6J und CBA mit Rückkreuzung auf C57BL/6J basieren (FENG et al., 2000). Sie waren durchschnittlich 12 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 25 – 30g.

Diese Tiere exprimieren in einem Teil ihrer Axone das gelb fluoreszierende Protein YFP (yellow fluorescent protein) unter der Kontrolle des thy1-Promotors<sup>7</sup> (FENG et al., 2000). YFP ist die gelbe Variante der vier spektralen Formen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) der Qualle, welche als vitale Färbung für Neuronen genutzt wird (CHALFIE et al., 1994)<sup>8</sup>. Die Axone, die YFP exprimieren, können mithilfe

---

<sup>7</sup> Thy1 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird sowohl von Neuronen in vielen Teilen des Nervensystems als auch von anderen Zellen exprimiert, einschließlich der Thymozyten (GORDON et al., 1987).

<sup>8</sup> MARTIN CHALFIE erhielt 2008 für die Entdeckung und Weiterentwicklung des GFPs zusammen mit SHIMOMURA und TSIEN den Nobelpreis für Chemie.

eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden. Dadurch ist es möglich, einzelne Axone über zentimeterlange Entfernungen zu verfolgen.

Bei der Untersuchung des Regenerationsprozesses nach peripherer Nervendurchtrennung und -reparatur ergibt sich allerdings das Problem fehlender Differenzierbarkeit der von proximal aussprossenden regenerierenden Axone von degenerierenden Anteilen im distalen Stumpf. Die ursprüngliche Fluoreszenz ist auch nach zehn Tagen Waller-Degeneration im distalen Stumpf noch anteilig erhalten. Bei Unmöglichkeit der Diskriminierung von degenerierenden und regenerierenden Anteilen entwickelten wir ein Versuchsmodell, bei dem YFP-positive Mäuse N. ischiadicus-Transplantate YFP-negativer Wurfgeschwister erhielten. Die nach Nerven-naht im Reparaturspalt sowie im distalen Stumpf zu beobachtenden fluoreszierenden Axone waren somit sicher proximaler Herkunft und spiegelten das axonale regenerierende Einwachsen nach distal wieder.

Dieses Modell erlaubt uns, nicht nur einzelne Axone zu beobachten. Vielmehr können definitiv die regenerierenden Axone verfolgt werden. Untersuchungen anhand unterschiedlichster Fragestellungen, zum Beispiel ihrer morphologischen Eigenschaften, sind damit auch nach Nervenreparatur individuell möglich.

Die Maßnahmen sind vom „Landesamt für Gesundheit und Soziales – Berlin“ genehmigt (Tierversuchsnummer: G 0013/04, 11.02.2004) und im Institut für Zellbiologie und Neurobiologie des Zentrums für Anatomie der Charité Berlin durchgeführt worden.

## **2.2 Operation**

### **2.2.1 Anästhesie**

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 0,1 ml / 10 g KG einer Lösung von Xylazin (16 mg / kg) und Ketamin (100 mg / kg) anästhesiert.

### **2.2.2 Allgemeine Operationstechnik**

Die Mäuse wurden auf dem Bauch liegend mit Pflasterstreifen auf einem Korkbrett fixiert. Beide dorsalen Hinterlaufregionen wurden enthaart und mit 70 % Alkohol

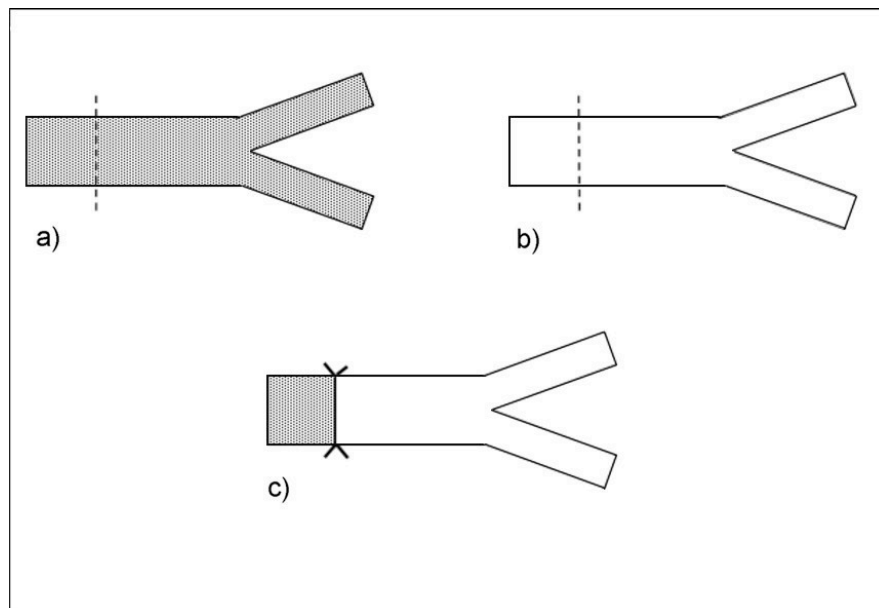
desinfiziert. Anschließend wurden die Tiere unter der Lichtquelle und dem Operationsmikroskop positioniert.

Auf beiden Seiten erfolgten die Hautinzision in Längsrichtung, stumpfes Präparieren des subkutanen Fettgewebes, Öffnen der Faszie und Aufsuchen des N. ischiadicus unter der ischiocruralen Muskulatur. Beide Ischiadikusnerven wurden proximal der Faszikelauftrennung in N. peroneus communis und N. tibialis scharf durchtrennt. Das weitere Verfahren war von der Zugehörigkeit der zu operierenden Maus zu der jeweiligen Versuchsgruppe bestimmt. Abschließend erfolgte der Wundverschluss durch Einzelknopfnähten der Haut mit Prolene 5.0.

### **2.2.3 Empfängergruppen und Spendergruppe**

Zeitgleich zur Operation einer YFP-positiven Maus erfolgte die Operation einer Wildtyp-Maus. Nach proximaler Durchtrennung des N. ischiadicus wurden in den YFP-positiven Mäusen einzentimeterlange Segmente des Nerven exzidiert und mit entsprechenden Segmenten aus Wildtyp-Mäusen ersetzt. Die Verbindung von Empfängernerv und Transplantat erfolgte mit einem Silikonröhrchen (Dow Corning; 0.020 inch ID). Dabei wurde streng auf die Seitengleichheit und die Beibehaltung der proximal-distalen Ausrichtung der Transplantate geachtet.

Die aneinander gefügten Enden des durchtrennten Empfängernervs und des Transplantats wurden sorgfältig zum Mittelteil der Schiene ausgerichtet und mit 11.0 Ethilon-Nähten, proximal und distal der Nervenverbindung gesetzt, verankert. Auf diese Weise wurde eine Berührung mit den Nervenenden vermieden und dennoch ein Auseinanderweichen verhindert. Anschließend erfolgte der Wundverschluss wie zuvor beschrieben.



**Abb. 3 Schematische Darstellung der N. ischiadicus-Transplantation. a)** N. ischiadicus einer YFP-positiven Maus mit Schnittebene proximal der Aufteilung in N. tibialis und N. peroneus communis. **b)** N. ischiadicus einer YFP-negativen Maus mit Schnittebene proximal der Aufteilung in N. tibialis und N. peroneus communis. **c)** Verbindung und Ausrichtung der beiden Nervenstümpfe mithilfe eines Silikonröhrchens und 11-0er Einzelknopfnähten epineural.

#### 2.2.4 Gruppe mit elektrischer Nervenstimulation

Bei den Versuchen mit elektrischer Nervenstimulation wurde den Tieren intraoperativ für eine Stunde eine elektrische Nervenstimulation auf einer Extremitätenseite zugeführt. Dazu wurde vor der Übertragung des Transplantats der proximale Stumpf des N. ischiadicus mit Elektroden verbunden und niedrigfrequent mit 20 Hz über die Dauer von einer Stunde elektrisch stimuliert. Ein Grass SD-9-Stimulator lieferte Gleichstrom von 20 Hz (100  $\mu$ s, 3 - 5 V bis gerade eine Muskelzuckung sichtbar war) über feine Silberdrähte, die an der Ober- und Unterseite des proximalen Stumpfs anlagen: direkt an der Schnittstelle die Anode und etwas proximal die Kathode.

Danach erfolgten Schienung, Naht und Wundverschluss wie zuvor beschrieben. Die kontralaterale Extremitätenseite dieser Versuchstiergruppe diente als Kontrollgruppe.

## **2.3 Gewebepräparation und histologische Untersuchung**

### **2.3.1 Entnahme und Fixierung**

Nach Überlebenszeiten von fünf, sieben und anfangs zehn Tagen wurden die Mäuse erneut nach beschriebenem Verfahren anästhesiert. Es war uns allerdings nicht möglich, eine Überlebenszeit kürzer als fünf oder länger als sieben Tage für die Auswertung zu verwenden. Im Alter von drei bis vier Tagen ist die Nervenreparatur noch nicht fest genug für die weitere Bearbeitung. Nach mehr als sieben Tagen hat ein Teil der regenerierenden Axone das Ende des Transplantats bereits erreicht und die Reparaturstelle ist nicht mehr präzise abgrenzbar. Die Auswertungen und weitere Versuche erfolgten daher nur mit Überlebenszeiten von fünf und sieben Tagen.

Die transplantierten Ischiadikus-Nerven wurden einschließlich der Reparaturstelle entnommen. Die entnommenen Nerven wurden auf kleinen, einseitig flachen Holzschiffchen befestigt, um eine Wellenbildung bei der Fixation zu vermeiden, und in 4 % Paraformaldehyd für 24 h fixiert. Danach wurde die Paraformaldehydlösung durch einen Saccharosepuffer ausgetauscht, worin die Nerven bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung verbleiben konnten.

### **2.3.2 Einbettung**

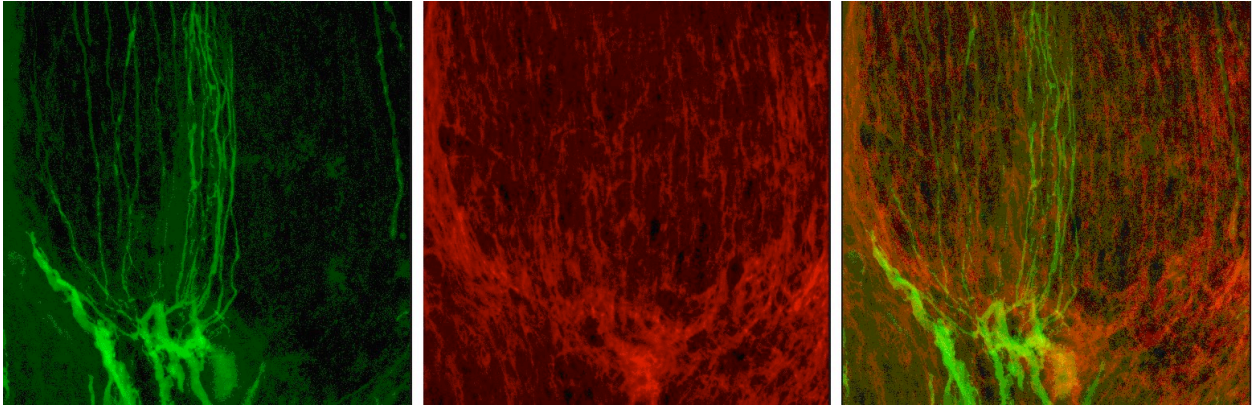
Es erfolgte weiter die Einbettung der fixierten Nerven in einem Gemisch aus 10 % Gelatine und 10 % Saccharose in 0.1 M Phosphatpuffer.

### **2.3.3 Anfertigung der Vibratomschnitte und Färbung**

Die Präparate der transplantierten Nerven wurden mit dem Vibratom in einer Dicke von 100 µm längs geschnitten. Außerdem wurden von sechs unoperierten Nerven Querschnitte angefertigt. Wir verwendeten eine Dicke von 100 µm mit dem Ziel, fast alle durchquerenden Axone verfolgen zu können und die Anzahl der Fasern, die zwischen den einzelnen Schnitten kreuzen, zu minimieren.

Zur Darstellung der Schwann-Zellen im Fluoreszenzmikroskop wurden die Gewebeschnitte gegengefärbt. 1:250 verdünnte Lamininantikörper (Sigma) wurden

als primäre Antikörper verwendet und mit Alexa Fluor 568 (1:300) markiert, um die Basalmembran der Schwann-Zellen im Fluoreszenzmikroskop abgrenzen zu können. So entstand eine rote Färbung der Schwann-Zellarchitektur.



**Abb. 4** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Verzweigung eines regenerierenden Axons bei Eintritt in den distalen Stumpf. Die YFP-exprimierenden Axone stellen sich grün-gelblich dar, die Schwann-Zellarchitektur durch Gegenfärbung mit Lamininantikörpern rot (20 x Vergrößerung).

## 2.4 Bilddarstellung und -analyse

Die histologisch aufgearbeiteten Gewebeschnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50) analysiert. Fotografien wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica SL 7) aufgenommen. Die so erzeugten Bilder wurden zur Abstimmung von Farbwerten, zur Entfernung von Artefakten und zur Bildschärfensteigerung digital nachbearbeitet (Adobe Photoshop).

### 2.4.1 Längsschnitte

Die Längsschnitte der transplantierten Nerven einschließlich der Reparaturstelle wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

**a) Proximal der Reparaturebene**

Um das Zählen von axonalen Trieben, die von der Reparaturstelle umgekehrt sind und in retrograder Richtung wachsen, zu minimieren, wurden die zur Regeneration verfügbaren YFP-exprimierenden Axone jedes Nervs 1 mm proximal zu Reparaturstelle gezählt.

**b) Bei der Durchquerung des Reparaturspalts**

Anschließend wurden die Axone, die durch die Reparaturstelle verfolgt werden konnten, gezählt. Diese Anzahl wurde in ein Verhältnis mit der Anzahl der proximal gezählten Axone gesetzt („crossing index“). Zudem wurden alle Axone nach ihrem Verzweigungsverhalten eingestuft: Ein Einzel-Axon durchquert den Reparaturspalt unverzweigt, kann aber Tochtertriebe bei Eintritt in den distalen Stumpf abgeben. Ein verzweigtes Axon hingegen bildet Verzweigungen schon bei seiner Annäherung an den distalen Stumpf.

**c) Im distalen Stumpf**

Im distalen Stumpf wurde die Anzahl der fluoreszierenden Axone in 1 mm-Intervallen distal der Reparaturebene gezählt, um den Fortschritt der Regeneration zu beurteilen. Außerdem wurden alle Verzweigungsaktionen im Verlauf des distalen Stumpfs gezählt.

Die Präparate der Versuchstiere, die intraoperativ eine einstündige elektrische Nervenstimulation einer Extremitätenseite erhalten hatten, wurden auf die gleiche Weise ausgewertet. Um den Einfluss der elektrischen Nervenstimulation auf die Regenerationsgeschwindigkeit der Axone und ihr Verzweigungsverhalten zu untersuchen, wurden die gewonnenen Ergebnisse mit denen der nichtstimulierten Extremitätenseite verglichen.

### 2.4.2 Querschnitte

Zur Untersuchung, wie sich das Abweichen der Axone quer zur Fläche des distalen Nervenstumpfs auswirkt, wurde die durchschnittliche Zahl der Schwann-Scheiden bestimmt, die sich in einer Serie von größer werdenden Arealen auf dem Querschnitt des distalen Stumpfs befanden.

Es wurden von sechs unoperierten Nerven Querschnitte angefertigt. Die Höhe der Schnittstelle entsprach der Verbindung zwischen Transplantat und Empfängernerv in den operierten Tieren. Einzelne konfokale Bilder dieser Schnitte wurden in Quadranten eingeteilt. Jeder Quadrant wurde wahllos mit einer Folge von Schablonen überlagert, die Musterkreisen von 10 – 90  $\mu\text{m}$  entsprachen. Die in den Kreisen enthaltenen Schwann-Scheiden wurden gezählt (n = 24 Zählungen / Kreisdurchmesser).

Anfängliche Versuche, diese Zählungen an voroperierten Nerven durchzuführen, scheiterten an der schwachen Auflösung der Basallamina in der Nähe der Operationsebene. Die Beschaffung der Messungen von nicht operierten Nerven war daher nötig. Dies war nur bei sich entsprechenden Außendurchmessern möglich. Die Silikonröhren halfen hierbei, die Nervenschwellung an der Reparaturstelle zu minimieren. Vergleiche der Außendurchmesser von den Kontrollnerven und den operierten Nerven ergaben ähnliche Werte (Kontrollnerven n = 6, Mittelwert 450  $\mu\text{m}$ , Standardabweichung 46  $\mu\text{m}$ ; operierte Nerven n = 9, Mittelwert 412  $\mu\text{m}$ , Standardabweichung 43  $\mu\text{m}$ ). Somit waren die Messungen an den nicht operierten Nerven ein geeigneter und akzeptabler Kompromiss.



## 2.5 Retrograde Fluoro-Gold-Markierung

Wie bereits erwähnt, exprimieren bei den Mäusen der YFP-H-Linie nur ein Teil der Axone das für die gelb fluoreszierende Eigenschaft verantwortliche Protein. Somit war auch nur eine Teilmenge der myelinisierten Axone unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Zur Identifizierung dieser Axone als sensibel oder motorisch wurde in Voruntersuchungen durch die kooperierende Arbeitsgruppe in Baltimore eine retrograde Markierung mit Fluoro-Gold durchgeführt (BRUSHART et al., 2002; WITZEL et al., 2005). Fluoro-Gold ist ein axonaler Marker, der sehr effektiv endozytiert und retrograd transportiert wird (SCHMUED und FALLON, 1986). Der nichtoperierte N. ischiadicus von Tieren dieser Gruppe wurde für zwei Stunden einer dreiprozentigen Fluoro-Gold-Lösung ausgesetzt. Die Injektion des Markers erfolgte über eine Mikroinjektion. Für den retrograden Transport des Markers nach proximal wurden 48 Stunden angesetzt (siehe auch BRUSHART, 1990). Anschließend erfolgte die Präparation und Entnahme des lumbosakralen Rückenmarks und der korrespondierenden Spinalganglien. Aufgrund der retrograden Markierung waren Neurone, die fluoreszierende Axone in den N. Ischiadicus projizieren, sowohl mit YFP als auch mit Fluoro-Gold markiert (BRUSHART et al., 2002; WITZEL et al., 2005).

## 2.6 Auswertung der Ergebnisse

Alle Auswertungen erfolgten mit der Statistik-Software SPSS (Version 15).

Bei den Untersuchungen zur Morphologie der axonalen Regeneration verwendeten wir zur statistischen Auswertung Überlebenskurven, logistische Regressionsanalysen, Punkteschar- und Poisson Regressions-Analysen.

Zum Vergleich des Regenerationsverhaltens durch elektrische Stimulation wurden die Ergebnisse bei Vorliegen einer nichtparametrischen Verteilung und zweier unverbundener Stichproben mit dem U-Test nach Mann und Whitney ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

Die Morphologie axonaler Regeneration im peripheren Nervensystem sollte anhand des N. ischiadicus transgener Mäuse näher beleuchtet werden. Des Weiteren wurde am selben Modell ein möglicher Einfluss elektrischer Nervenstimulation auf das axonale Regenerationsverhalten untersucht.

Die Untersuchungen fanden am Nervus ischiadicus transgener Mäuse statt, die das fluoreszierende Protein YFP in einem Anteil ihrer Axone exprimieren. Zur Bestimmung dieser fluoreszierenden Untergruppe wurden in Voruntersuchungen retrograde Markierungen des N. ischiadicus angefertigt (BRUSHART et al., 2002; WITZEL et al., 2005). Dabei erfolgte die Markierung mit Fluoro-Gold an zuvor nicht operierten Nerven. Im Durchschnitt waren 109 (Spannbreite von 95 - 120) Neurone im lumbosakralen Rückenmark der Maus mit YFP und Fluoro-Gold doppelt markiert. Die doppelt markierten Neurone entsprechen den Nervenzellen, die YFP-exprimierende Axone in den N. Ischiadicus entsenden. 72 % (Spannbreite 71 - 73 %) dieser Neurone wurden aufgrund ihrer Lage im Rückenmark als sensible Nervenzellen identifiziert. Die restlichen 27 – 29 % waren motorischen Ursprungs (WITZEL et al., 2005).

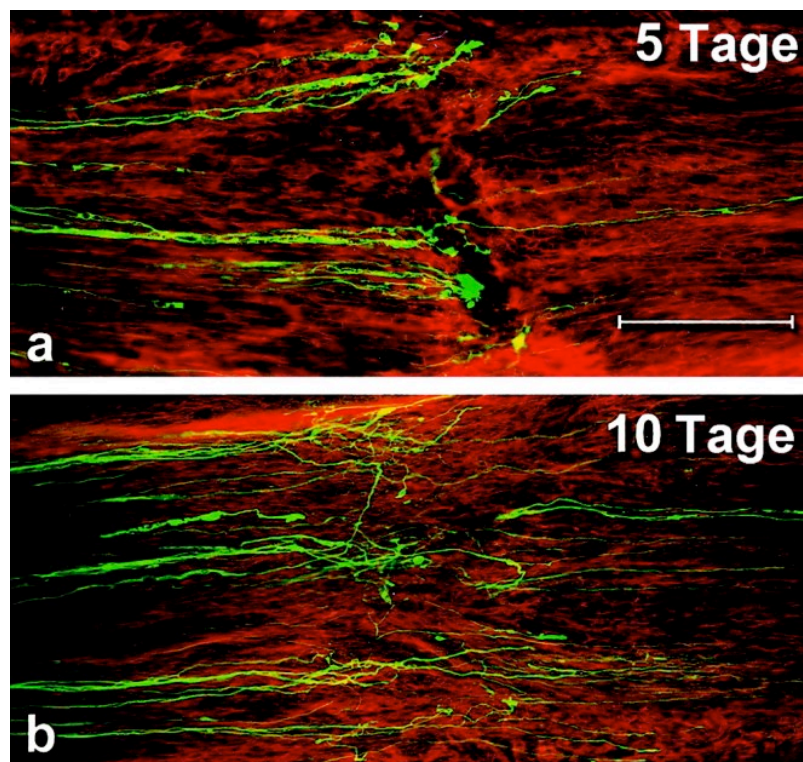
Den YFP-positiven Mäusen wurden einzentimeterlange Segmente des N. ischiadicus entfernt und mit entsprechenden Segmenten aus Wildtyp-Mäusen ersetzt. Die Verwendung von YFP-negativen Transplantaten stellte sicher, dass die zu beobachtende Fluoreszenz im distalen Nervenstumpf nur durch regenerierendes axonales Einwachsen von proximal erfolgt sein kann.

Die Ischiadicusnerven wurden für den ersten Versuchsabschnitt fünf (n = 10), sieben (n = 9) oder zehn Tage (n = 9) nach der Operation entnommen. Für die Auswertung mussten wir uns aus zuvor genannten Gründen auf die zwei Überlebenszeiträume von fünf und sieben Tagen beschränken. Für die Versuche mit intraoperativer elektrischer Nervenstimulation wurden die Nerven ebenfalls fünf (n = 15) und sieben Tage (n = 18) nach Operation und elektrischer Stimulation entnommen.

Nach Nervenentnahme erfolgten die Anfertigung von 100 µm dicken Längsschnitten und die Gegenfärbung von Laminin zur Darstellung der Basalmembran der Schwann-Zellen. Wir verwendeten eine Dicke von 100 µm mit dem Ziel, fast alle

durchquerenden Axone verfolgen zu können und die Anzahl der zwischen den einzelnen Schnitten kreuzenden Fasern zu reduzieren.

Die fertigen histologischen Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Alle fluoreszierenden Axone wurden hierbei sowohl 1 mm proximal der Reparaturstelle, bei der Durchquerung des Reparaturspalts und in 1 mm-Intervallen entlang des distalen Nervenstumpfs (bzw. im YFP-negativen Nervenransplantat) gezählt. Zusätzlich erfolgten die Unterscheidung von unverzweigten und verzweigten Axonen im Reparaturspalt, die Zählung jeglicher Verzweigungsaktivität innerhalb des Nervenransplantats und Messungen unter morphologischem Gesichtspunkt, wie die laterale Auslenkung der regenerierenden Axone.



**Abb. 5** 100 µm dicker Längsschnitt einer Nervenreparatur fünf und zehn Tage nach Operation (x 10, Messbalken = 0,25 mm). Links erkennt man den proximalen Stumpf, die Reparaturstelle befindet sich in vertikaler Ausrichtung etwa mittig und das Nervenransplantat auf der rechten Seite. Die sensiblen und motorischen Axone, die das fluoreszierende Protein YFP exprimieren, stellen sich grün-gelb dar, die Schwann-Zellarchitektur erscheint rot durch die Gegenfärbung mit Lamininantikörper, die mit Alexa Fluor markiert sind. **a)** Fünf Tage nach der Nervenreparatur sind proximaler und distaler Nerv durch einen deutlichen Spalt getrennt, der das Voranschreiten zahlreicher Axone zu blockieren scheint. Sobald ein Axon den distalen Stumpf erreicht hat, durchdringt es zügig das Transplantat. **b)** Nach zehn Tagen ist der Spalt verschwunden, die präzise Abgrenzung ist nur ungenügend möglich, obwohl an der Reparaturstelle eine axonale Unordnung deutlich erkennbar ist. Viele Axone haben den distalen Stumpf penetriert, häufig nach Zurücklegen weiter Umwege.

### 3.1 Kreuzen der Reparaturstelle

Es wurden alle fluoreszierenden Axone, die den Spalt zwischen proximalem Stumpf und distalem Nerventransplantat durchqueren, gezählt und nach ihrem Verzweigungsverhalten als unverzweigt oder verzweigt eingeordnet. Als unverzweigte Axone definierten wir Axone, die auf ihrem Weg durch den Reparaturspalt keine Kollateralen bilden, bei Eintritt in den distalen Stumpf aber Tochtertriebe abgeben können. Verzweigte Axone verzweigen sich hingegen schon auf dem Weg durch den Reparaturspalt und beschreiten bei Eintritt in den distalen Stumpf gleichzeitig mehrere Wege nach distal.

Die Anzahl der gezählten und klassifizierten Axone wurde in ein Verhältnis mit den proximal zur Verfügung stehenden fluoreszierenden Axonen gesetzt. Fünf Tage nach Transplantation konnten 17 % der im proximalen Stumpf gezählten Axone im Reparaturspalt verfolgt werden. 12 % als einzelne Axone und 5 % als verzweigte.

Nach sieben Tagen haben 25 % der Axone den Spalt durchquert, 21 % unverzweigt und 4 % verzweigt.

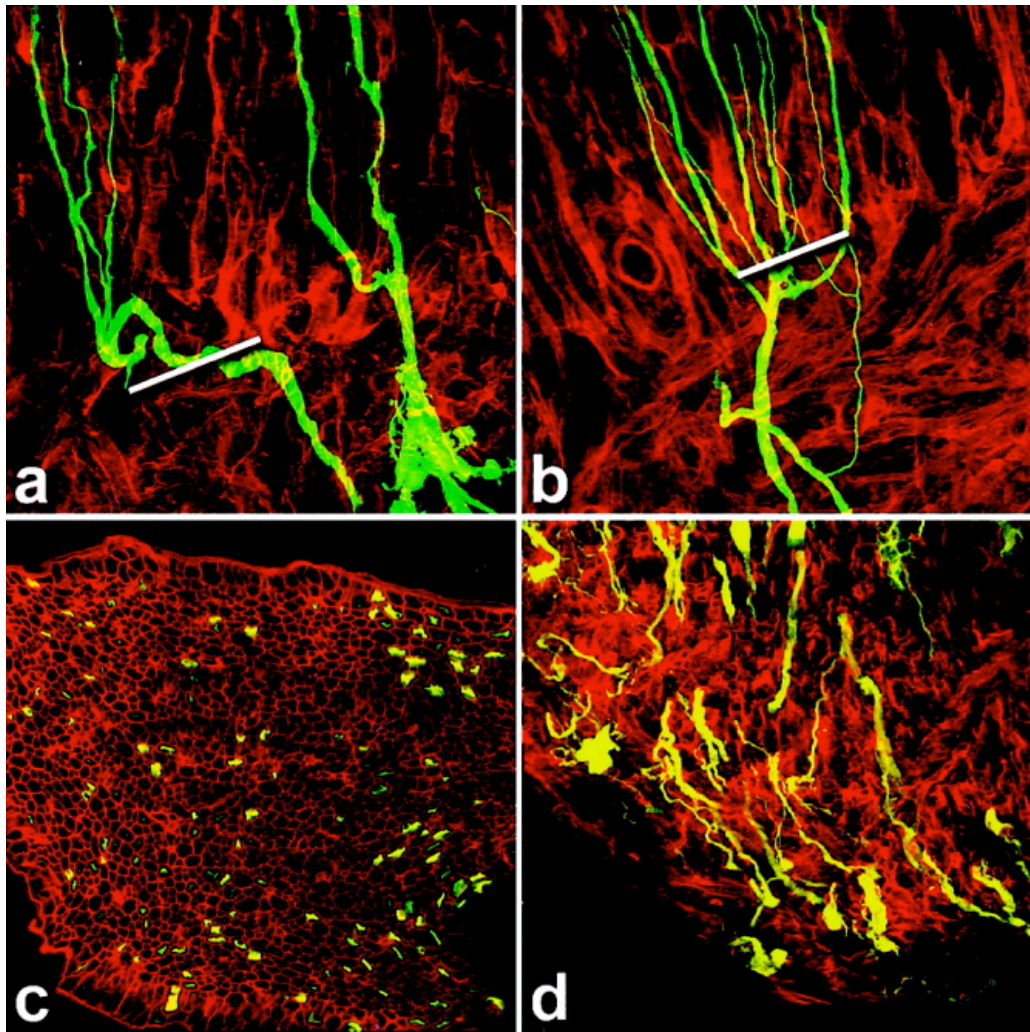
Bei der Gruppe der Tiere, denen zehn Tage nach Operation die Nerven entnommen worden waren, konnten keine Zählungen vorgenommen werden, da die Reparaturebene nicht mehr präzise abgrenzbar war.

Die Beobachtung, dass sieben Tage nach Nervendurchtrennung und –reparatur erst ein Viertel aller zur Verfügung stehenden Axone den Spalt zwischen proximalem und distalem Stumpf durchquert hat, zeigt die Reinnervation des distalen Stumpfes als stufenartigen Prozess: eine kleine Gruppe von Axonen drängt sich nach vorne und penetriert rasch den distalen Stumpf. Während hingegen die Mehrzahl der Axone für mindestens sieben Tage an der Reparaturstelle verweilt.

Bei Vorliegen eines nicht-linearen Zusammenhangs und binären Variablen (verzweigt / unverzweigt) führten wir eine logistische Regressionsanalyse durch. Es zeigte sich, dass der Anteil von proximalen Axonen, die den Reparaturspalt als einzelne Axontriebe durchquerten, signifikant vom 5. zum 7. Tag angestiegen ist ( $p < 0,001$ ). Der Anteil der Axone, die verzweigt den Spalt durchkreuzten, blieb hingegen gleich.

Bei der Untersuchung der einzelnen Längsschnitte war ein Phänomen der axonalen Regeneration deutlich erkennbar, welches schon RAMON Y CAJAL mit seinen Silberimprägnierungen dargestellt hatte: Zahlreiche Axone wanderten auf ihrem Weg von proximal nach distal seitlich entlang der Schnittebene des distalen Stumpfs, um Schwann-Zellhüllen weit entfernt von dem Ursprungaxon zu betreten (Abb. 6 a, b, d).

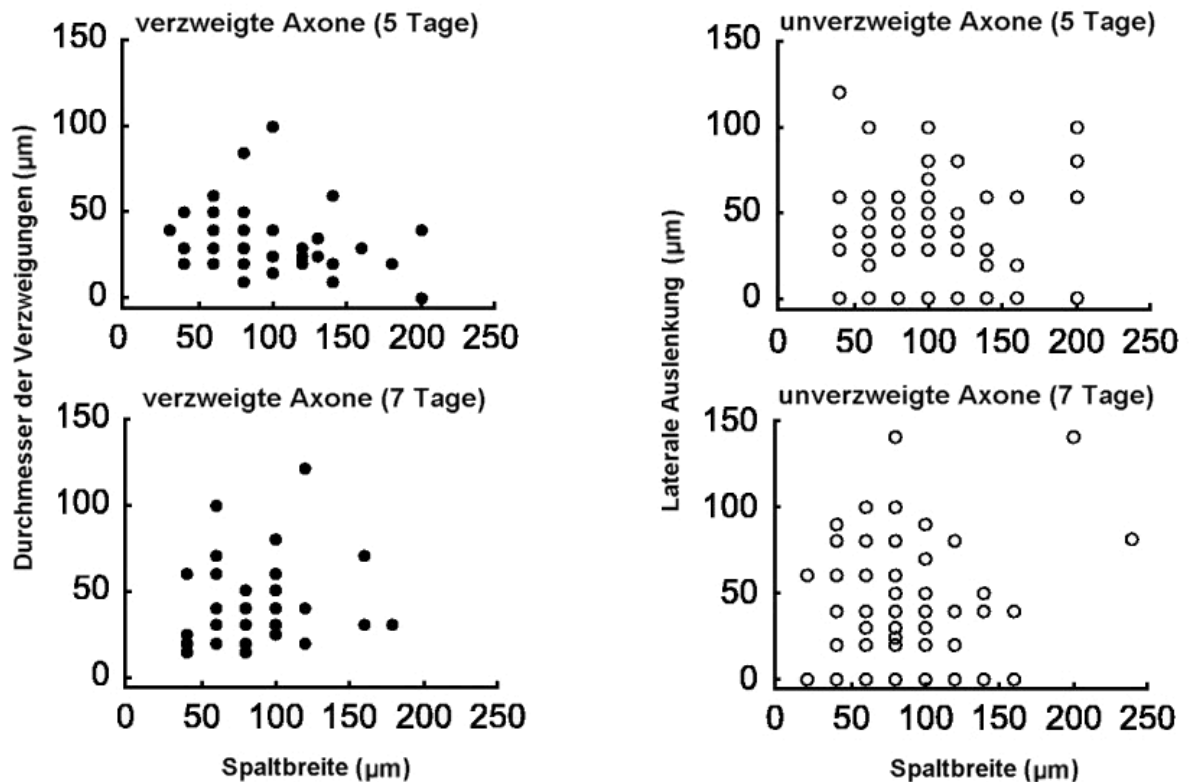
Sowohl fünf als auch sieben Tage nach der Transplantation sind die Schwann-Zellhüllen des proximalen und distalen Nervenstumpfs von einem Spalt getrennt. Dieser Spalt war in allen Präparateschnitten zu einem gewissen Ausmaß vorhanden, selbst wenn die Aneinanderfügung der beiden Nervenenden zum Zeitpunkt der Operation unter leichtem Druck erfolgt war. Um den Einfluss dieses Spalts auf die Abweichung der axonalen Wuchsrichtung abzuschätzen, wurde die Größe des Spalts mit den lateralen Auslenkungen der durchquerenden Axone in ein Verhältnis gesetzt. Bei unverzweigten Axonen, die fast regelmäßig einer seitlichen Auslenkung zu ihrer Längsachse unterliegen, ist die laterale Abweichung als Distanz zwischen der Longitudinalen und dem Kontaktpunkt mit dem distalen Stumpf messbar. Bei verzweigt durch den Spalt kreuzenden Axonen erfolgte diese Charakterisierung mittels der Weite ihrer axonalen Verzweigungen beim Eintreffen im distalen Stumpf (Abb. 6 a, b).



**Abb. 6** Darstellung des unterschiedlichen Durchquerungsverhaltens regenerierender Axone durch den **Reparaturspalt** (x 40; Messbalken = 74  $\mu\text{m}$  in a; 44  $\mu\text{m}$  in b). **a, b:** Längsschnitte: Der proximale Stumpf befindet sich im unteren Teil der Bilder, mittig in etwa horizontaler Richtung erkennt man den **Reparaturspalt**, darüber beginnt das Nervenransplantat. **a) unverzweigte Axone.** Das Axon im linken Teil der Aufnahme wandert 74 $\mu\text{m}$  nach lateral an der Schnittebene des distalen Stumpfs entlang bevor es eine Schwann-Zellhülle betritt. Das Axon im rechten Teil des Bildes betritt den distalen Stumpf auf direktem Weg. Die Menge an fluoreszierendem Material an seiner Basis lässt die Degeneration zusätzlicher Kollateralen vermuten. **b) verzweigtes Axon.** Das dickere der beiden durchquerenden Axone verzweigt sich ausgiebig. Die Verzweigungen beginnen im **Reparaturspalt** und setzen sich im distalen Stumpf fort. **c, d:** Querschnitte des Ischiadicusnervs. **c) proximaler Stumpf.** Proximal der Nervenreparatur liegen die YFP-exprimierenden Axone über die gesamte Fläche des Nervs verteilt. **d) Reparaturstelle.** Dieser Querschnitt auf Höhe der Reparaturstelle zeigt die laterale Auslenkung vieler Axone auf ihrem Weg vom proximalen zum distalen Stumpf.

Die so ermittelten Messdaten trugen wir gegeneinander als graphische Darstellung in Form einer Punkteschar auf (Abb. 7). Bei unverzweigten Axonen wurden die Spaltbreiten, die jedes einzelne Axon zu durchqueren hatte, den lateralen Auslenkungen gegenübergestellt. Bei verzweigten Axonen wurde der Durchmesser

der Verzweigungen über die jeweilige Spaltbreite aufgetragen. Ein Zusammenhang zwischen Spaltlänge und seitlicher Auslenkung bzw. Verzweigungsdurchmesser konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht dem visuellen Eindruck, nach dem die Axone einen recht geraden Weg durch den Spalt vollführen und dann vor dem distalen Stumpf entweder seitlich ausscheren oder sich verzweigen.



**Abb. 7** Auswirkung der Breite des Spalts zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf auf das Regenerationsverhalten der Axone. Der Umfang der durch die regenerierenden Axone durch seitliche Auslenkung oder breit gefächerte Verzweigungen erreichbaren distalen Schwann-Zellhüllen ist unabhängig von der Breite des Reparaturspalts.

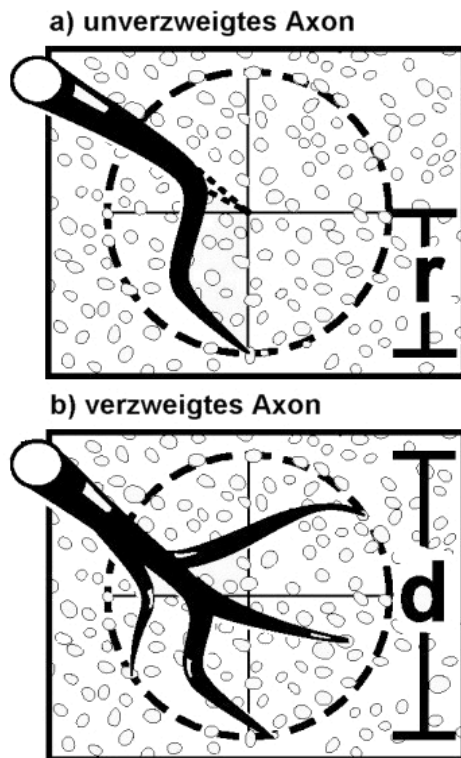
### 3.2 Treffen des distalen Stumpfs

Beim Eintritt der regenerierenden Axone in den distalen Nervenstumpf unterscheiden sich unverzweigte und verzweigte Axone grundlegend. Die unverzweigten Axone, die ohne Kollateralen zu bilden den Reparaturspalt durchquert haben, treten häufig erst nach der im vorigen Abschnitt dargestellten seitlichen Abweichung in den distalen Stumpf ein. Bei Eintritt können sie gelegentlich Tochtertriebe abgeben. Dagegen beschreiten die verzweigten Axone beim Eintritt in den distalen Stumpf gleichzeitig zahlreiche oft weit voneinander entfernte Wege. Beiden Formen gemein ist die dadurch entstehende Vervielfachung der erreichbaren distalen Leitungsschienen:

Die laterale Abweichung des unverzweigten Axons, messbar als Distanz zwischen der Longitudinalen und dem Kontaktpunkt mit dem distalen Stumpf, kann als Radius eines Kreises aufgefasst werden, den das Axon potentiell für seinen Weg in den distalen Stumpf hätte beschreiten können (Abb. 8 a). Mit der Auslenkung zeigt das Axon seine Fähigkeit, eine Strecke von der Länge des Radius zu wandern. Daher ist es vermutlich auch in der Lage, mindestens genauso weit in jede andere Richtung zu wandern. Der Kreis, der durch diesen Radius definiert wird, ist eine Abschätzung des Gebiets, welches das Axon erkunden kann. Jede in der Kreisfläche enthaltene Schwann-Zellhülle hätte daher möglicherweise durch das Axon reinnerviert werden können. Der Kreis kann somit als Bereich aufgefasst werden, den das Axon auf seinem Weg in den distalen Stumpf abtastet („sampling circle“ bzw. „Abtastkreis“).

Die Äste der verzweigten Axone tasten auf ihrer Wegsuche ebenfalls ein Areal in Form eines Kreises ab. Anders als bei den unverzweigten Axonen wird hierbei allerdings kein Radius sondern der Kreisdurchmesser von der „Baumkrone“ der axonalen Verzweigungen gebildet (Abb. 8 b). Innerhalb der Kreisfläche hat das Axon schon einen Teil der Schwann-Zellhüllen reinnerviert, aber die Reinnervierung von allen anderen wäre ebenso denkbar.



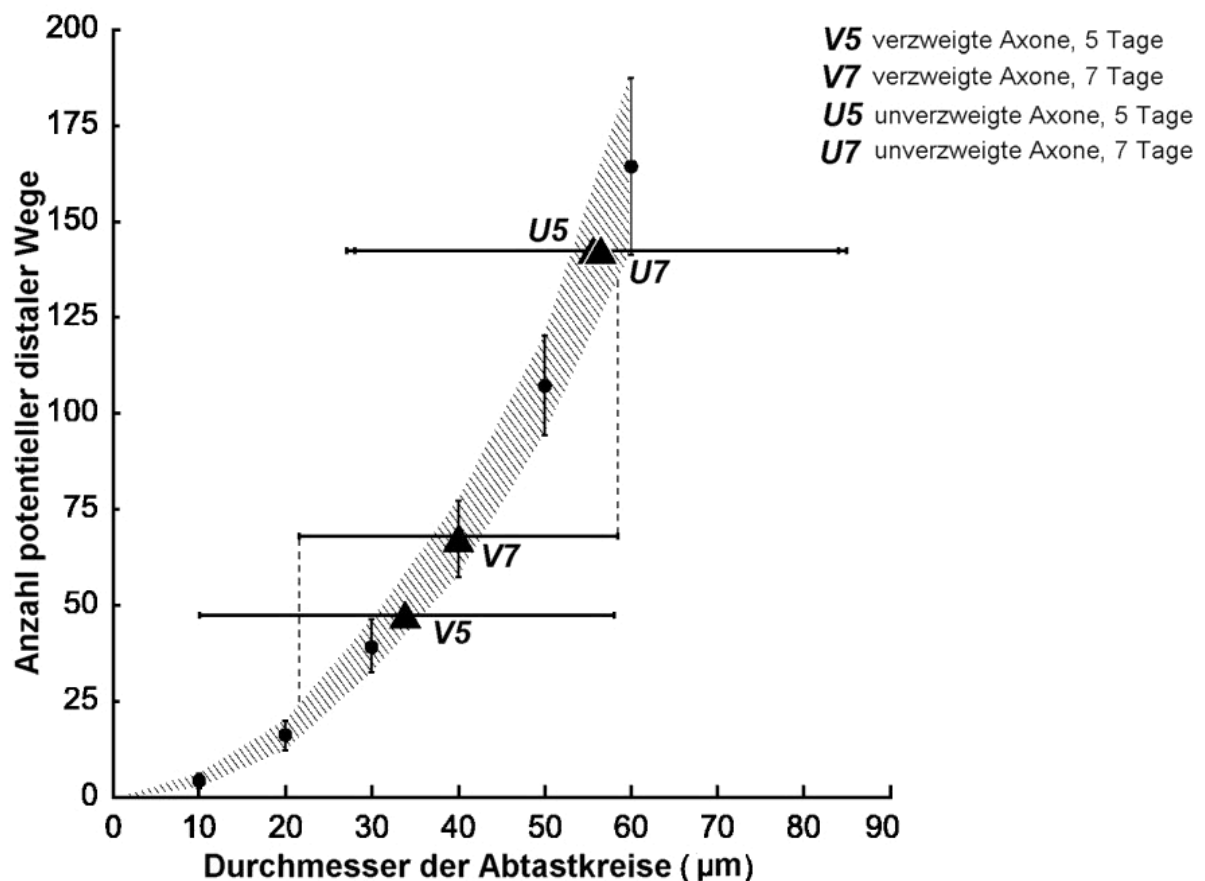


**Abb. 8 Schematische Darstellung der Abtastkreise eines unverzweigten Axons und eines verzweigten Axons („sampling circle“).**

**a)** Die seitliche Auslenkung zwischen der Längsachse eines regenerierenden, unverzweigten Axons und dem Kontaktpunkt mit dem distalen Stumpf definiert den Radius ( $r$ ) eines Kreises.

**b)** Die Kontaktpunkte der axonalen Verzweigungen eines verzweigten Axons mit dem distalen Stumpf definieren den Durchmesser ( $d$ ) eines Kreises.

Anhand von Kreisschablonen mit ansteigenden, definierten Durchmessern untersuchten wir die Auswirkung der Größe dieser Abtastkreise auf die Anzahl der möglichen distalen Leitungsbahnen. Die Kreisschablonen wurden über Querschnitte nicht operierter Kontrollnerven (YFP+) gelagert und die vom Kreis umgrenzten Schwann-Zellhüllen gezählt. Die Ergebnisse wurden in Form einer Kurve graphisch dargestellt (Abb. 9, schraffierte Kurve). Eine Poisson-Regressionsanalyse bestätigte den Verdacht, dass die Anzahl von umgrenzten Schwann-Zellhüllen proportional zur gemessenen Kreisfläche ist. Im zweiten Schritt wurden dann die im Experiment ermittelten Durchmesser der Abtastungskreise (Radius des Abtastungskreises unverzweigter Axone mal zwei bzw. Durchmesser des Abtastungskreises verzweigter Axone) auf diese Kurve aufgebracht. Es lässt sich nun die Anzahl der Schwann-Zellhüllen und somit distalen Wege ablesen, die potentiell vom entsprechenden Axon betreten werden können.



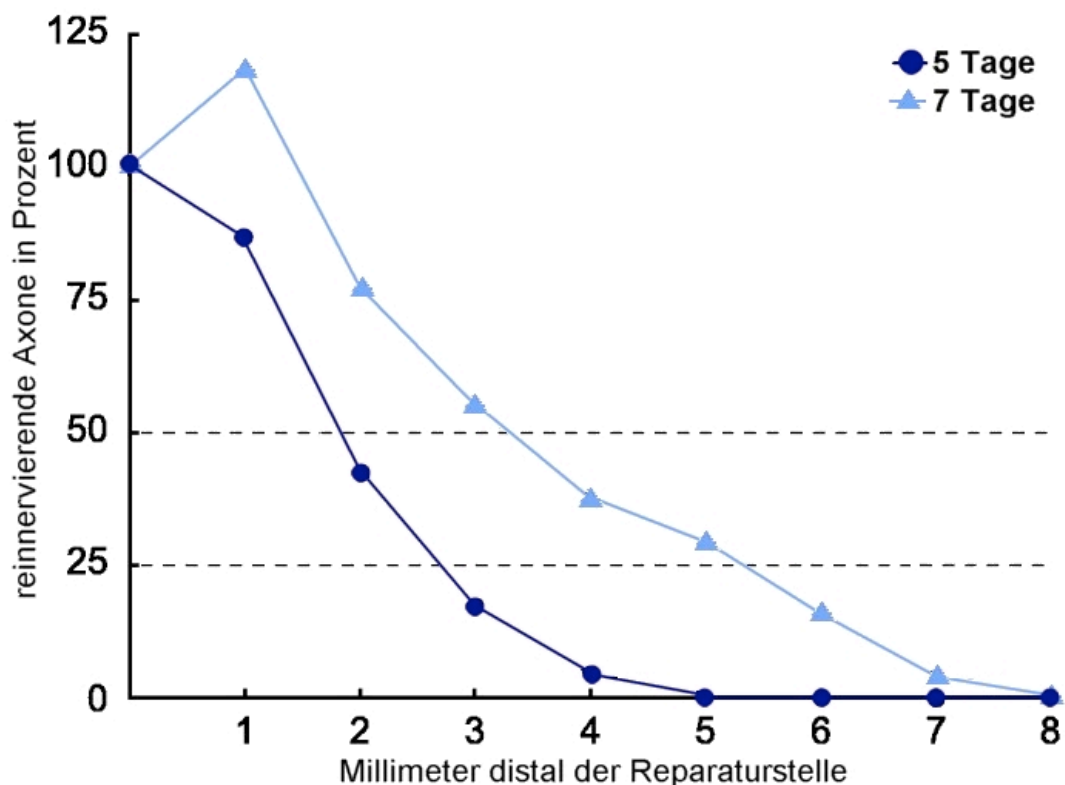
**Abb. 9 Auswirkung der Größe der Abtastkreise auf die Anzahl potentieller distaler Regenerationswege.** Die Anzahl von Schwann-Zellhüllen, die von den Kreisschablonen mit steigendem Durchmesser in einer Versuchsreihe mit Kontrollnerven umgeben sind, stellt die schraffierte Kurve dar (Mittelwert  $\pm$  1 SD). Der Mittelwert der Durchmesser experimentell ermittelter Abtastkreise kann auf diese Kurve aufgetragen werden, um die entsprechende Anzahl an umschlossenen Schwann-Zellhüllen und somit an potentiellen distalen Wegen abzuschätzen. Zum Beispiel haben verzweigte Axone nach 7 Tagen (V7) eine durchschnittliche Spannweite von 40µm. Dies entspricht auf der vertikalen Achse einem Mittelwert von 68 Schwann-Zellhüllen. Allerdings sind die Standardabweichungen vom Mittelwert relativ groß (dargestellt in Form der Fehlerbalken für V7) aufgrund großer individueller Unterschiede in der Größe der Abtastkreise.

Verzweigte Axone waren in der Lage, nach fünf Tagen durchschnittlich 47 und nach sieben Tagen 68 distale Schwann-Zellhüllen zu erreichen. Unverzweigte Axone könnten potentiell 142 separate Schwann-Zellhüllen im distalen Stumpf sowohl nach fünf als auch sieben Tagen abtasten. Obwohl schon überraschend groß, sind diese Zahlen möglicherweise noch unterschätzt. Die seitliche Auslenkung der Axone, die parallel zur histologischen Schnittfläche wandern, wird korrekt gemessen worden sein. Während hingegen das Ausmaß der Auslenkung quer zur Schnittfläche eventuell unterschätzt und der Radius dieser Abtastungskreise bei einigen Axonen künstlich verkleinert worden ist.

### 3.3 Regeneration im distalen Stumpf

Zur Auswertung des weiteren Regenerationsverlaufs wurden die fluoreszierenden Axone in 1 mm-Intervallen distal zur Reperaturstelle gezählt.

Aufgrund erheblicher individueller Unterschiede zwischen den Proben stellten wir diese Daten mithilfe einer Überlebenszeitanalyse dar, basierend auf der Anzahl der Axone, die anfänglich den distalen Stumpf in der individuellen Probe erreicht hatten (Abb. 10). Jedes Segment zeichnete sich durch das Verhältnis der reinnervierenden Axone aus, die das Transplantat weit genug durchdrangen, um das Segment zu erreichen.

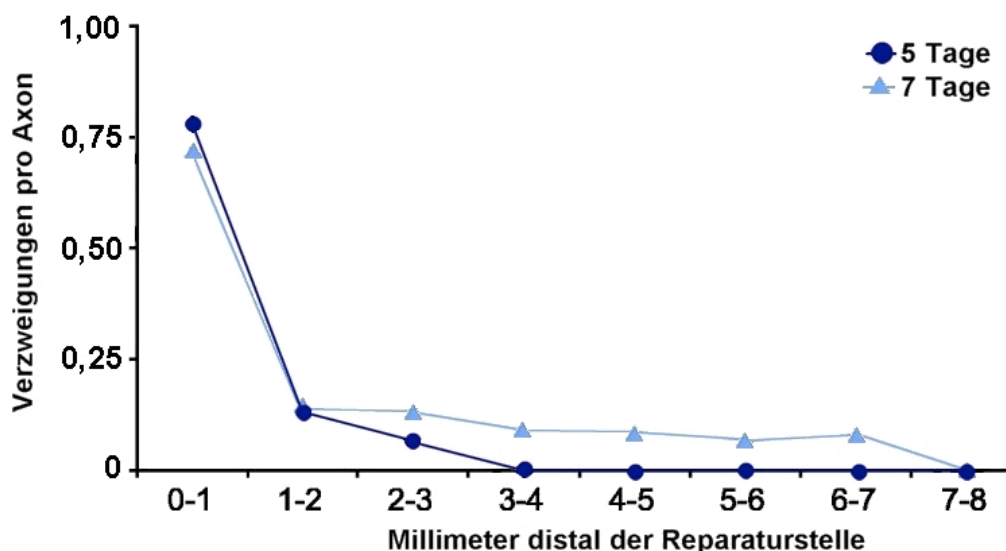


**Abb. 10 Überlebenskurve des axonalen Auswachsens durch das Transplantat.** Alle regenerierenden Axone wurden an der Reperaturstelle und in 1 mm-Intervallen nach distal gezählt. Diese Ergebnisse wurden als Überlebensanalyse dargestellt, basierend auf der Anzahl der Axone, die initial in den distalen Stumpf bzw. das Transplantat eingedrungen sind.

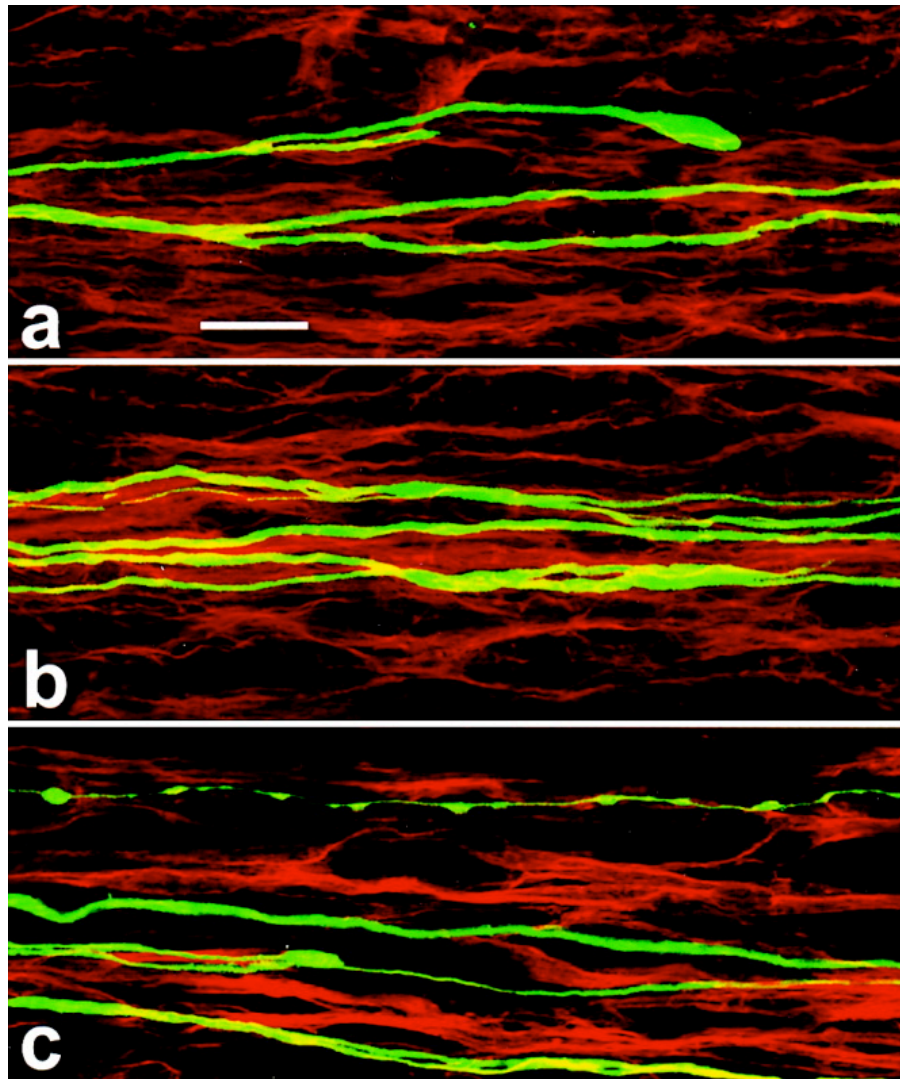
Eine Poisson-Regressionsanalyse zeigte, dass sich die Überlebenskurven der beiden Zeitintervalle (fünf und sieben Tage) signifikant unterscheiden ( $p < 0,001$ ). Die Ausbreitung der regenerierenden Axone innerhalb des distalen Stumpfs wird

demzufolge nicht nur durch den gestaffelten Charakter der initialen Reinnervation sondern auch durch unterschiedliche Prozesse innerhalb des distalen Stumpfs selbst beeinflusst. Diese könnten das komplexe Zusammenspiel zahlreicher Faktoren darstellen, zum Beispiel Reifung der Leitungsbahnen, Stutzen der kollateralen Triebe und Konkurrenz unter den Axonen.

Aus der Analyse der im distalen Stumpf gewonnenen Daten ergab sich eine weitere überraschende Beobachtung: In der Gruppe nach sieben Tagen stieg die Anzahl der Axone in dem ersten 1 mm-Segment an (siehe Abb. 10). Um diese Ergebnisse weiter auszubauen, wurden in jedem 1 mm-Segment jedes Nerven die Verzweigungspunkte gezählt. Das ausgeprägte Verzweigungsverhalten im Reparaturspalt setzte sich in den proximalen Segmenten des Transplantats fort. Dies könnte durch die Erweiterung der Verletzungszone auf den Nerv begründet sein. Unsere Zählungen zeigten allerdings auch, dass manche Verzweigungen erst weit distal erfolgen und sporadische Aussprossungen in jedem Intervall des distalen Stumpfs stattfinden können. Obwohl die Mehrzahl der Axone in ihren ursprünglichen Schwann-Zellhüllen bleibt, gibt es keine absolute Beschränkung auf eine einzige Leitungsbahn, vor allem zu Beginn ihrer Passage (Abb. 11, 12).



**Abb. 11 Fortsetzung der axonalen Verzweigungen in den distalen Stumpf hinein.** Die 1 mm-Segmente der Nerventransplantate wurden auf kollaterale Aussprossungen untersucht. Die meisten Verzweigungen wurden in den proximalen Abschnitten des Transplantats gezählt. Sporadische Verzweigungen konnten allerdings in jedem Intervall über die gesamte Länge des Transplantats nachgewiesen werden.



**Abb. 12 Axonale Regeneration 4 - 6 mm distal der Reparaturstelle** (x 40; Messbalken = 20  $\mu\text{m}$ ).  
**a)** Aussprossen von Kollateralen ist auch im distalen Stumpf möglich. Das Ende des obersten Axons vermittelt den Eindruck eines Retraktionskolbens. **b)** Die Abkömmlinge eines einzelnen Axons verlaufen auf ihrem distalen Weg eng beieinander. **c)** Das perlschnurartige Aussehen des obersten Axons deutet einen stattfindenden Abbauvorgang an. Diese Beobachtungen verdeutlichen simultanes Aussprossen und Stutzen von Kollateralen weit distal der Reparaturstelle.

### 3.4 Elektrostimulation

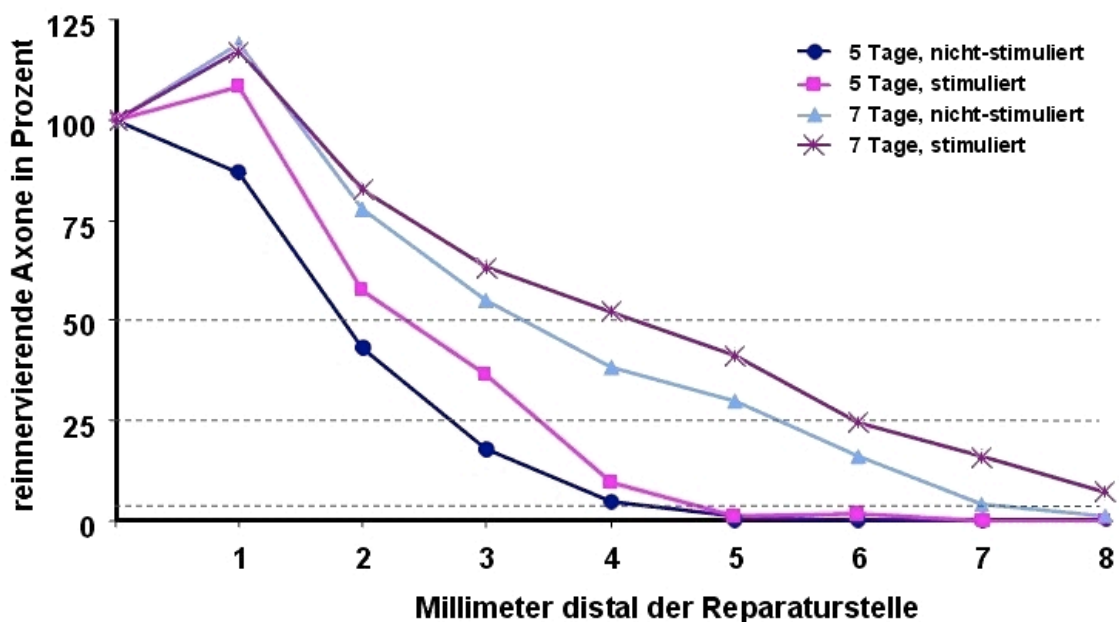
Zahlreiche Belege aus in vitro- und in vivo-Studien deuten an, dass elektrische Nervenstimulation zum Zeitpunkt der Reparatur die axonale Regeneration fördern kann. Der genaue Mechanismus ist dabei jedoch umstritten. Die individuelle Beobachtung regenerierender Axone ist im Rahmen unseres Versuchsmodells durch die Regeneration fluoreszierender Axone in das nichtfluoreszierende Nerventransplantat möglich. Nach der eben beschriebenen Untersuchung des Regenerationsverhaltens unter morphologischem Gesichtspunkt soll im zweiten Teil dieser Arbeit das Verhalten regenerierender Axone auf elektrische Stimulation untersucht werden.

Dazu wurde nach Durchtrennung der N. ischiadicus YFP-positiver Mäuse unilateral über Silberdrähte mit einem niedrigfrequenten Gleichstrom über eine Stunde elektrisch stimuliert. Der Nerv der kontralateralen Seite wurde identisch durchtrennt ohne intraoperativ eine elektrische Stimulation zu erhalten und diente als Kontrollgruppe. Anschließend wurde auf beiden Seiten ein Nervenstück von 1 cm Länge durch ein Nerventransplantat einer Wildtyp-Maus ersetzt und wie oben beschrieben mit einer Schiene verbunden.

Nach Überlebenszeiten von fünf ( $n = 15$ ) oder sieben Tagen ( $n = 18$ ) nach Transplantation erfolgte die Entnahme der Nerven einschließlich der Reparaturstelle. Die Präparate wurden mit einer Dicke von 100  $\mu\text{m}$  längs geschnitten und mit fluoreszierenden Lamininantikörpern gegengefärbt, um die Schwann-Zellarchitektur darzustellen. Die fertigen histologischen Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Wie schon im ersten Teil der Studie wurden die fluoreszierenden Axone sowohl 1 mm proximal der Reparaturstelle, beim Durchqueren der Reparaturstelle und in 1 mm-Intervallen entlang des Transplantats gezählt. Die so ermittelten Ergebnisse der elektrisch stimulierten Nerven wurden mittels U-Test von Mann und Whitney mit den Ergebnissen der nicht stimulierten Kontrollgruppe verglichen.

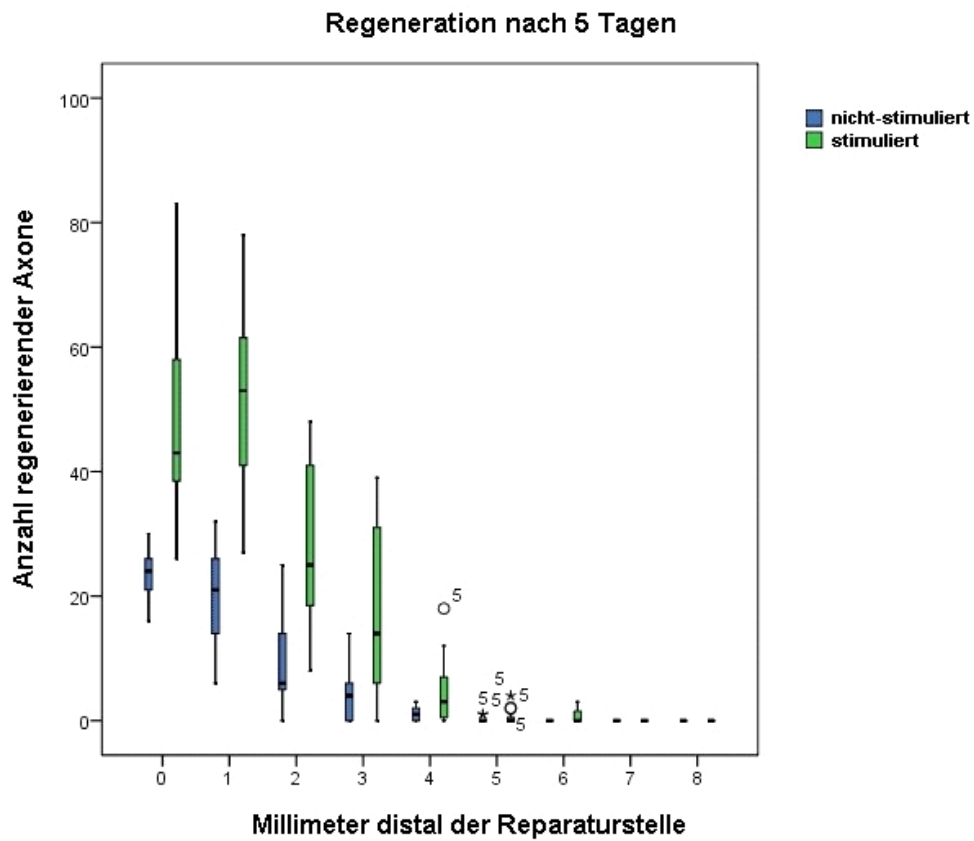
Um den Verlauf der Regeneration innerhalb des distalen Stumpfs – bzw. in unserem Fall innerhalb des Nerventransplantats – darzustellen, zählten wir die Anzahl der

Axone in 1 mm-Intervallen distal der Reparaturstelle. Diese Daten stellten wir sowohl als Überlebensanalyse (Abb. 13) als auch als nicht-parametrischer Test (Abb. 14 und 15) dar. Fünf Tage nach elektrischer Stimulation und Transplantation haben die Axone maximal 6 mm durchquert. 50 % der Axone erreichten 2,4 mm. Die Axone der Kontrollgruppe erreichten nach fünf Tagen maximal 4 mm, 50 % dieser Axone 1,9 mm. Nach sieben Tagen erstreckten sich die längsten Axone nach Stimulation über 9 mm, 50 % erreichten 4,1 mm. Im Vergleich durchquerten die Axone ohne Stimulation nach sieben Tagen maximal 7 mm, 50 % davon 3,4 mm.



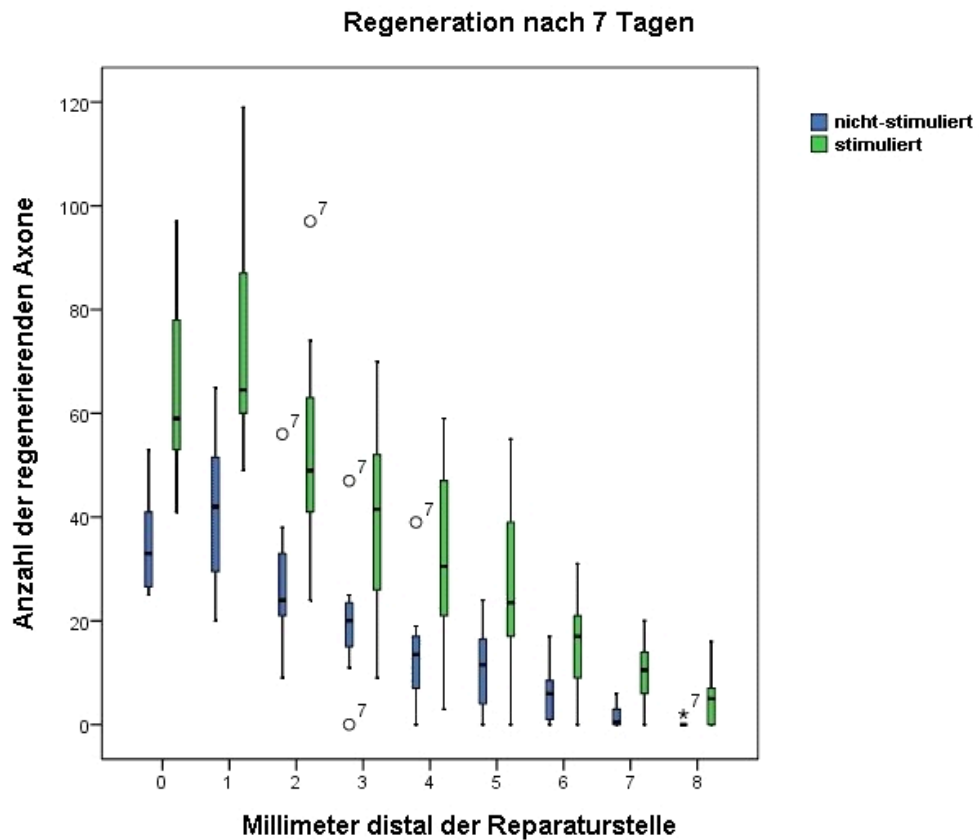
**Abb. 13** Überlebenskurve des Auswachsens regenerierender Axone durch das Transplantat nach elektrischer Nervenstimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle regenerierenden Axone wurden an der Reparaturstelle und in 1 mm-Intervallen nach distal gezählt. Diese Ergebnisse wurden als Überlebensanalyse dargestellt, basierend auf der Anzahl der Axone, die initial in den distalen Stumpf bzw. das Transplantat eingedrungen sind.

Die statistischen Auswertungen mittels U-Test zeigten in der Gruppe nach fünf Tagen bis zum 4 mm-Intervall einen signifikanten Anstieg der Axonanzahl nach elektrischer Stimulation. Nach dem 4 mm-Intervall war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dagegen war nach sieben Tagen in jedem 1 mm-Intervall ein signifikanter Anstieg der Anzahl an regenerierenden Axonen in der elektrisch stimulierten Gruppe nachweisbar.

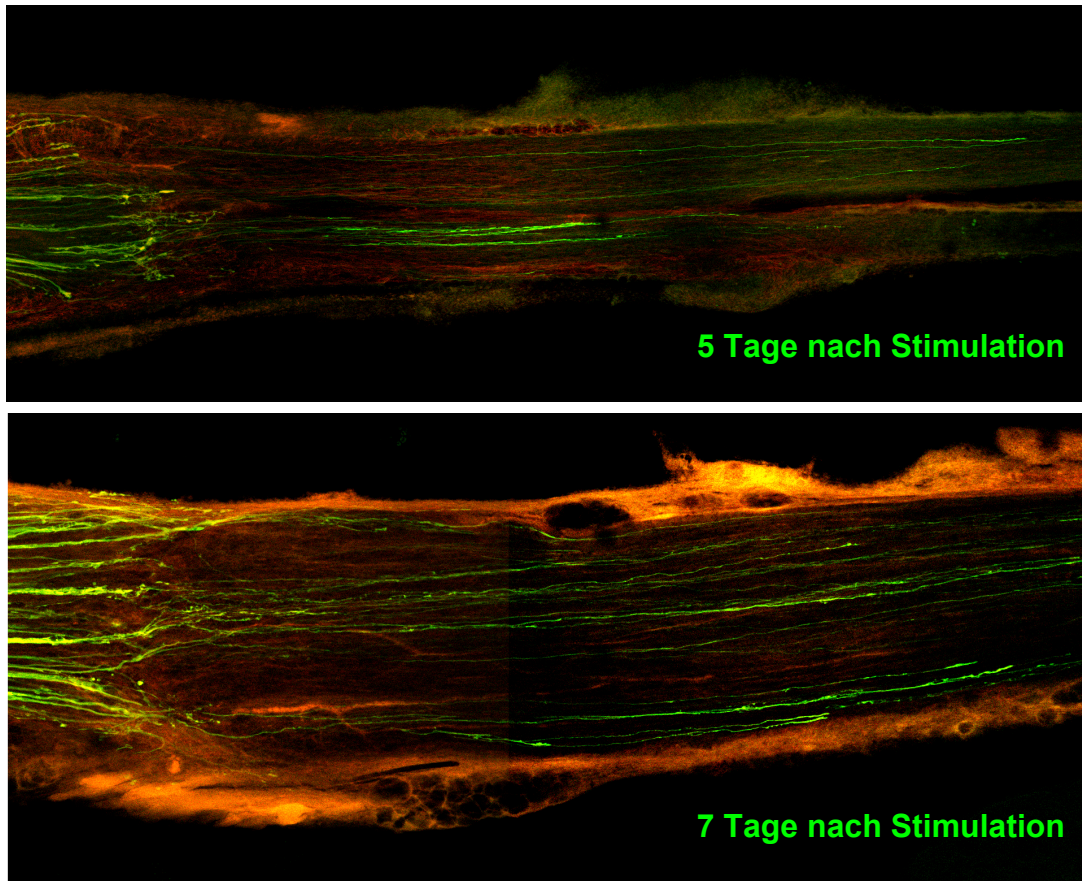


**Abb. 14 Nicht-parametrischer Test der Anzahl regenerierender Axone in das Nerven­transplantat nach fünf Tagen.** Nach initialer elektrischer Stimulation haben signifikant mehr Axone das Transplantat in jedem Abschnitt bis zum 4 mm-Intervall durchquert.





**Abb. 15 Nicht-parametrischer Test der Anzahl regenerierender Axone in das Transplantat nach sieben Tagen.** Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen sich signifikant gestiegene Axonzahlen nach Stimulation innerhalb des gesamten Transplantats.

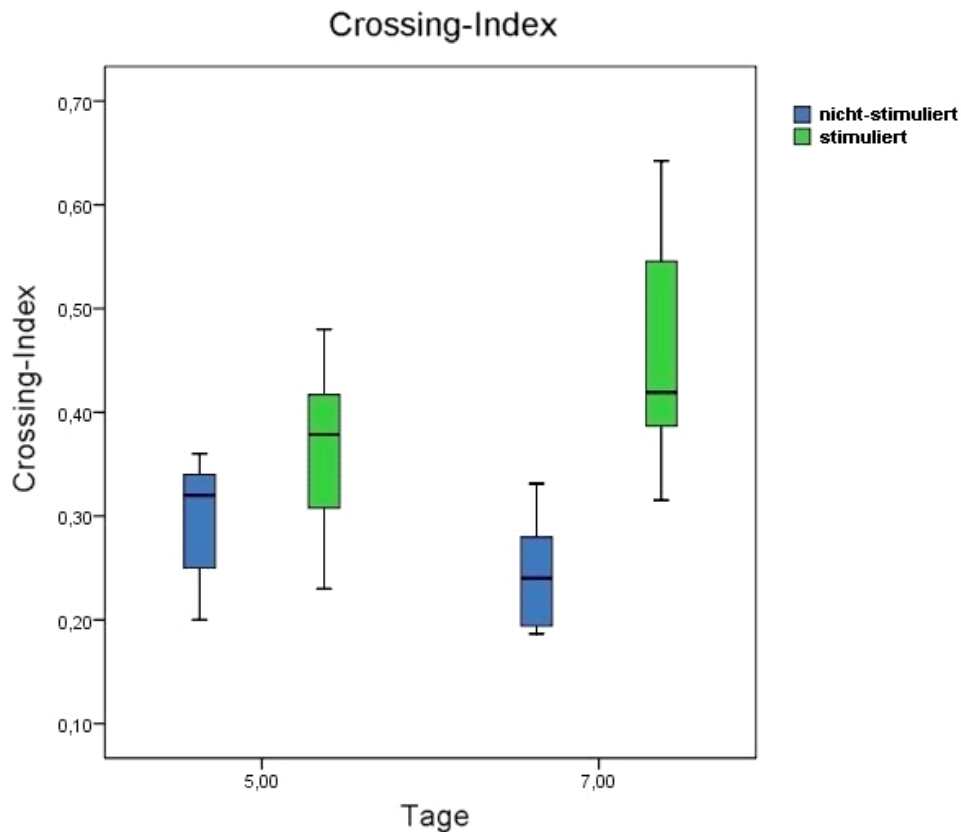


**Abb. 16** Longitudinale Schnittbilder des N. ischiadicus fünf bzw. sieben Tage nach elektrischer Nervenstimulation. Wesentlich mehr Axone konnten die Reparaturstelle durchqueren und in den distalen Stumpf bzw. das Transplantat eindringen.

Der eben erläuterte Anstieg der Anzahl regenerierender Axone im distalen Nervenstumpf nach initialer elektrischer Stimulation kann zum einen durch ein vermehrtes Kreuzen von Axonen über den Reparaturspalt bedingt sein oder aber auch allein ein häufigeres Verzweigen der regenerierenden Axone widerspiegeln.

Zur Klärung der ersten Hypothese wurde die Anzahl der Axone, die die Reparaturstelle kreuzen, in ein Verhältnis mit der Anzahl der Axone gesetzt, die vom proximalen Stumpf nach distal regenerieren. Dieser „Crossing-Index“ diente zum Vergleich der elektrisch stimulierten Gruppe mit der Kontrollgruppe. Innerhalb der Stimulationsgruppe konnte fünf Tage nach Transplantation fast die doppelte Anzahl der Axone beim Durchqueren der Reparaturstelle verfolgt werden (stim<sub>5</sub> 33,8 % versus non-stim<sub>5</sub> 17 %). Nach sieben Tagen hatten 46 % der Axone nach initialer Stimulation die Reparaturstelle gekreuzt, im Gegensatz zu 25 % in der nichtstimulierten Gruppe. Statistisch steigt die Anzahl der kreuzenden Axone

signifikant nach initialer elektrischer Stimulation im Gegensatz zur nichtstimulierten Kontrollgruppe in beiden Zeitperioden an (5 Tage:  $p < 0,001$ ; 7 Tage  $p < 0,001$ ).



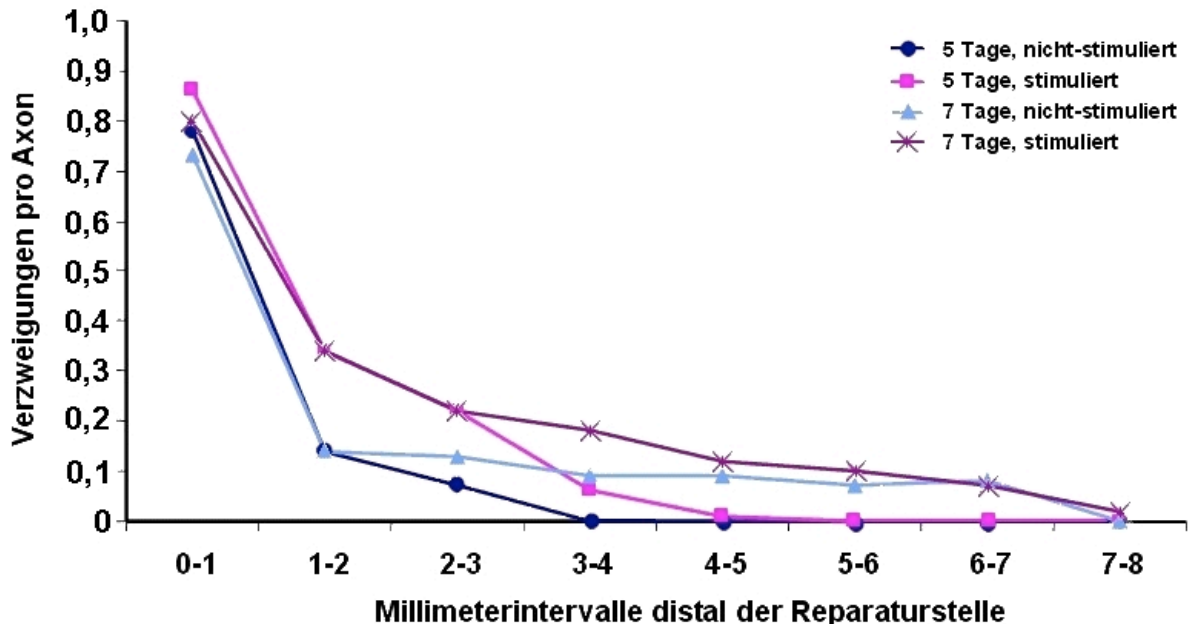
**Abb. 17 Crossing-Index.** Der Crossing-Index beschreibt den Anteil der Axone, die den Reparaturspalt kreuzen, an den im proximalen Stumpf gezählten Axonen. Nach elektrischer Stimulation erreichen im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrollgruppe signifikant mehr Axone den distalen Stumpf ( $p < 0,001$ ).

Demzufolge wird die Reinnervation des distalen Nervenstumpfs kurze Zeit nach Nerventransplantation durch die initiale elektrische Stimulation gesteigert. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Daten von Markierungsstudien mit elektrischer Stimulation überein (BRUSHART et al., 2002): Elektrische Stimulation verändert die Antwort auf Nervendurchtrennung und Reparatur durch vermehrte Rekrutierung von Axonen, die Nahtlinie zu überqueren und früher in den distalen Stumpf als ohne Stimulation einzudringen.

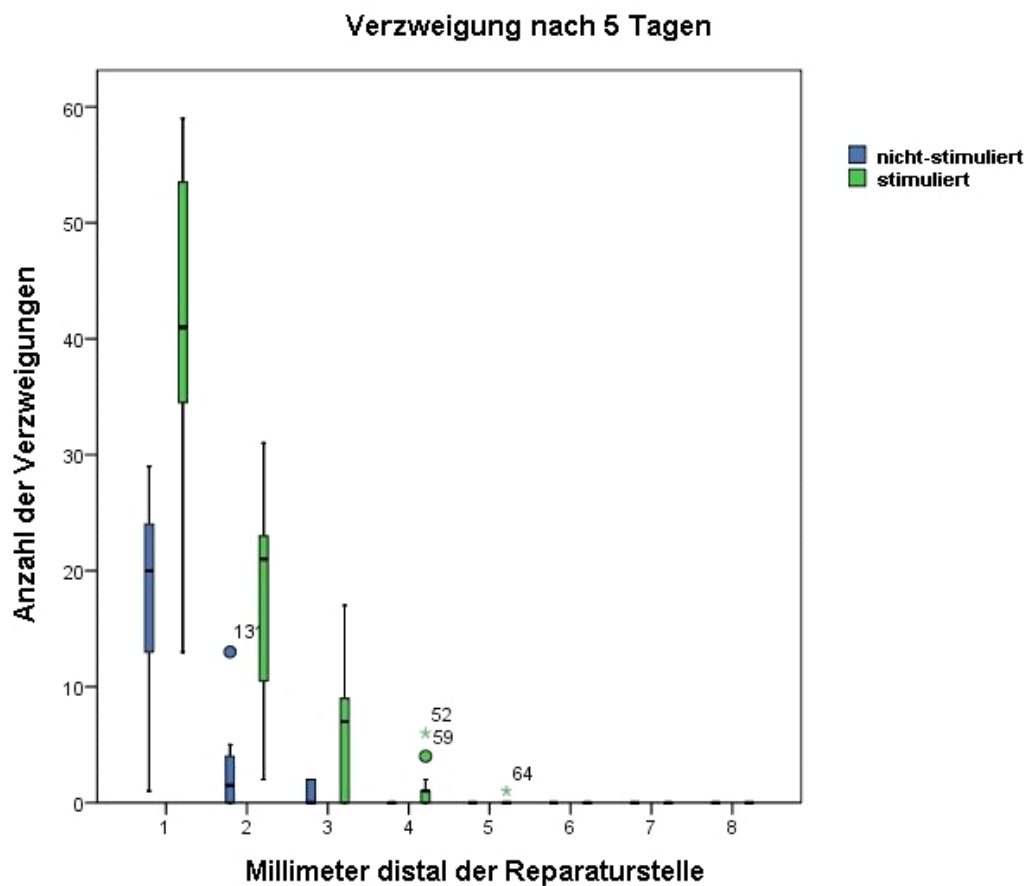
Die gesteigerte Anzahl reinnervierender Axone im distalen Stumpf nach elektrischer Nervenstimulation kann neben der soeben dargestellten gesteigerten Zahl

durchquerender Axone auch durch ein gesteigertes Verzweigungsverhalten der Axone bedingt sein. Wir verglichen als weiteres Merkmal der axonalen Regeneration das Verzweigungsverhalten nach elektrischer Stimulation mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe. Hierfür zählten wir im Rahmen der Zählungen entlang der Regenerationsstrecke neben den unverzweigten Axonen auch jede Verzweigungsaktivität, jedes seitliche Aussprossen. Nach der Datenerhebung erfolgte die statistische Auswertung erneut mit dem U-Test nach Mann und Whitney.

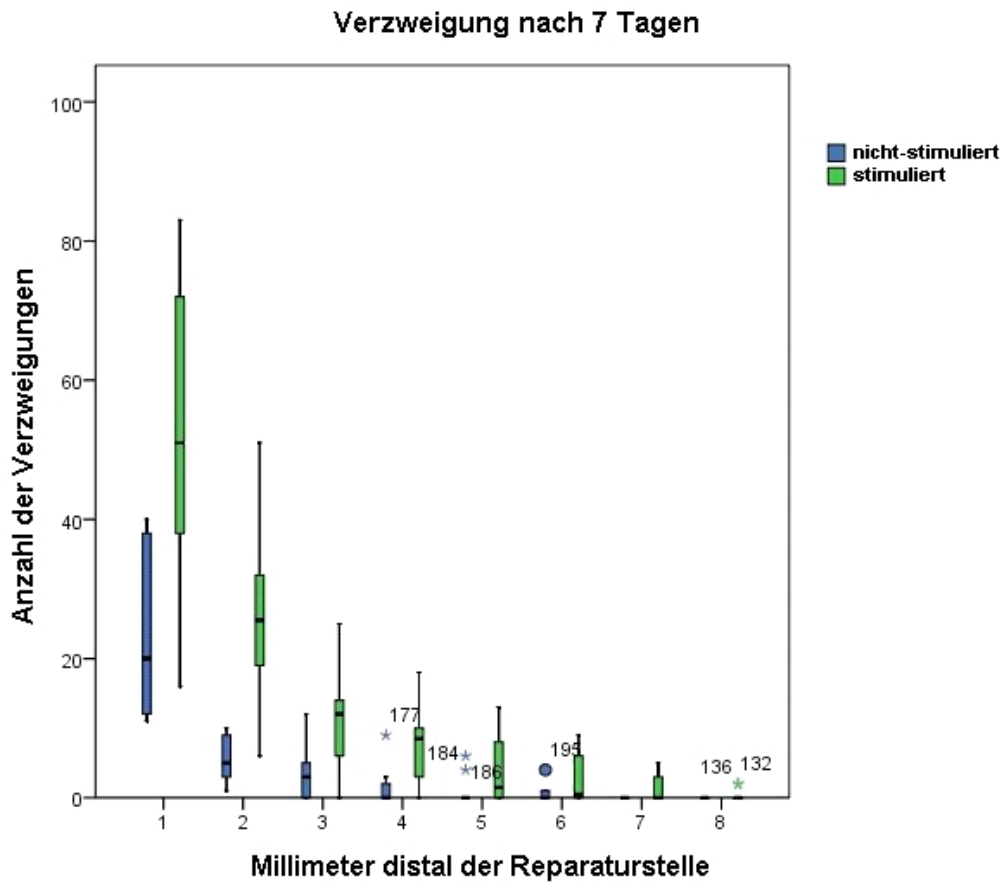
Bei der elektrisch stimulierten Gruppe zeigte sich ein Anstieg der Verzweigungsaktivität im Nerventransplantat bis weit distal der Reparaturstelle. Dieser Anstieg war sowohl nach fünf als auch nach sieben Tagen bis 4 mm distal der Reparaturstelle signifikant ( $p < 0,001$ ). Ab dem Intervall zwischen 4 und 5 mm konnte kein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen den positiven Effekt der elektrischen Nervenstimulation auf das Verzweigungsverhalten. Sie sind ebenfalls eine Erklärung für die gesteigerte Anzahl regenerierender Axone im distalen Stumpf nach initialer elektrischer Stimulation.



**Abb. 18 Fortführung des axonalen Verzweigens innerhalb des distalen Stumpfs nach elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe.** Die beschriebenen 1 mm-Intervalle wurden sorgfältig nach kollateralem Aussprossen untersucht. Bis 4 mm distal der Reparaturstelle findet sich zu jedem Zeitintervall eine signifikante Steigerung des axonalen Verzweigungsverhaltens durch elektrische Stimulation ( $p < 0,001$ ).

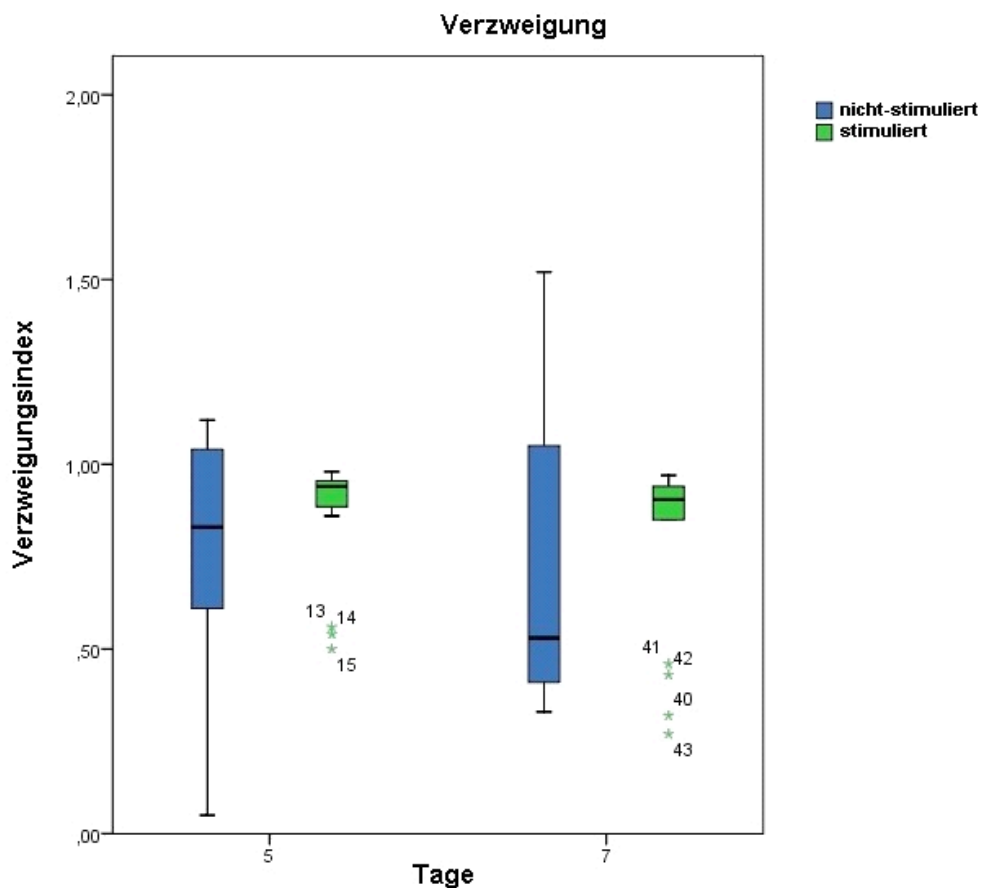


**Abb. 19 Nicht-parametrischer Test der Anzahl der Verzweigungen innerhalb des Nervenimplantats nach fünf Tagen.** Bis 4 mm distal der Reparaturstelle ist die Verzweigungsaktivität nach elektrischer Stimulation signifikant angestiegen ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 20 Nicht-parametrischer Test der Anzahl der Verzweigungen innerhalb des Nerventransplantats nach sieben Tagen.** Ebenfalls ist die Verzweigungsaktivität nach elektrischer Stimulation bis 4 mm distal der Reparaturstelle signifikant angestiegen ( $p < 0,001$ ).

Zur Klärung der Hypothese, ob elektrische Stimulation die Anzahl der Äste pro Verzweigung steigert, errechneten wir den Verzweigungsindex. Dieser Index beschreibt das Verzweigungsverhalten jedes verzweigten Axons. Er entspricht dem Verhältnis von Ästen pro verzweigtes Axon. Die statistische Auswertung erfolgte erneut mit dem U-Test nach Mann und Whitney. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der elektrisch stimulierten Gruppe und der Kontrollgruppe (Abb. 21). Demzufolge erhöhen die verzweigten Axone nicht die Anzahl ihrer Äste durch elektrische Stimulation.



**Abb. 21 Verzweigungsindex.** Der Verzweigungsindex beschreibt das Verhalten jedes verzweigten Axons. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Tieren nachgewiesen werden.

Eine umstrittene Frage der Förderung der axonalen Regeneration durch elektrische Nervenstimulation ist die Beeinflussung der axonalen Wachstumsgeschwindigkeit durch die Stimulation. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Daten geben hierzu detailliert Auskunft.

Die schnellsten 5 % der regenerierenden Axone nach elektrischer Stimulation kommen mehr als 3,5 mm im Zeitintervall zwischen fünf und sieben Tagen voran (Abb. 13). Dies entspricht einer Wachstumsgeschwindigkeit von mehr als 1,7 mm / Tag. Im Vergleich dazu beträgt die Geschwindigkeit der schnellsten 5 % in der Kontrollgruppe 1,5 mm / Tag. Die schnellsten 25 % nach Stimulation benötigen 2 Tage, um von 3,5 mm auf 6 mm voranzukommen, einer Geschwindigkeit von 1,25 mm / Tag entsprechend. Ohne elektrische Stimulation legen die schnellsten 25 % der Axone 1,02 mm / Tag zurück. Ebenfalls zwei Tage benötigen die

schnellsten 50 % der Axone in der Stimulationsgruppe, um mit einer Geschwindigkeit von 0,9 mm / Tag von 2,4 mm auf 4,1 mm fortzuschreiten. Die schnellsten 50 % der Kontrollgruppe haben eine Geschwindigkeit von 0,84 mm / Tag. Diese Daten zeigen keinen signifikanten Anstieg der Regenerationsgeschwindigkeit. Bei den schnellsten 5 % der regenerierenden Axone scheint ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten zu sein, nicht für die schnellsten 25 % und 50 %. Die Gesamtsumme der schnellsten 5 % der regenerierenden Axone ist allerdings so gering, dass statistisch der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen keine Signifikanz zeigt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen früherer Untersuchungen überein: Eine größere Zahl an Axonen hat den Reparaturspalt überwunden, die Geschwindigkeit ihrer Regeneration ist dabei allerdings nicht verändert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse nach elektrischer Stimulation eine gesteigerte Anzahl regenerierender Axone sowohl fünf als auch sieben Tag nach Nervenreparatur. Dieser Anstieg der Axonzahlen spiegelt sowohl einen Anstieg der den Reparaturspalt durchquerenden Axone wider als auch eine gesteigerte Anzahl an Axonen, die sich verzweigen, allerdings ohne Steigerung der Anzahl der Verzweigungsäste pro verzweigtes Axon und ohne Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit.



## **4 Diskussion**

### **4.1 Funktionelle Wiederherstellung**

Während der letzten Jahrzehnte hat sich unser Verständnis über die biologischen Mechanismen, die die Regeneration nach peripherer Nervenverletzung betreffen, vervielfacht. Bedauerlicherweise schlug sich diese Entwicklung nicht in einer entsprechenden Verbesserung der klinischen Resultate nieder. Das funktionelle Endergebnis unterscheidet sich nicht viel von dem vor über 25 Jahren (LUNDBORG, 2000). Trotz einer technisch perfekten operativen Versorgung und einer individuell angepassten Rehabilitation, ist der Ausgang nach einer peripheren Nervenverletzung unvorhersehbar und oftmals enttäuschend. Als häufige Symptome zeigen sich verminderte oder abnorme Sensibilität, unzureichende motorische Funktion, Kälteintoleranz und Schmerz (LUNDBORG, 2000; ROSBERG et al., 2005). Abhängig von der anatomischen Lage der Nervenverletzung und dem betroffenen Körperteil führen diese zu einer Verminderung der Lebensqualität mit Problemen im Berufsleben, der Freizeit oder dem sozialen Umfeld. Daneben verursachen die oft langwierige Arbeitsunfähigkeit im Rahmen der Rehabilitation und die sich oft anschließende verminderte Erwerbsfähigkeit beträchtliche volkswirtschaftliche Kosten. Eine schwedische Untersuchung zur Kostenanalyse nach Nervus medianus- oder Nervus ulnarisverletzungen ergab Gesamtkosten von durchschnittlich 51.000 € nach Medianusverletzung, wobei knapp 90 % des Betrages auf den Arbeitsausfall zurückzuführen waren (ROSBERG et al., 2005).

Die Funktionsdefizite nach Nervenverletzungen können durch drei physiologische Mechanismen zum Teil kompensiert werden. Die Reinnervation denervierter Strukturen kann erstens durch die regenerierenden Axone des verletzten Nervs erfolgen oder zweitens durch kollaterale Verzweigungen benachbarter unverletzter Axone. Als dritte Möglichkeit gilt ein „Remodelling“ der zentralen Verschaltungen, die die verlorene Funktion betreffen. Dennoch zeigen klinische und experimentelle Studien, dass zumindest nach schweren Verletzungen durch diese Mechanismen in der Regel keine zufriedenstellende funktionelle Wiederherstellung erreicht wird (BRUSHART, 1998b; LUNDBORG, 2000).

Für ein optimales funktionelles Ergebnis nach einer peripheren Nervenregeneration ist die korrekte Verbindung der Axone mit ihren ursprünglichen Zielorganen von entscheidender Wichtigkeit (FAWCETT und KEYNES, 1990). Dabei zeigen Quetschungsverletzungen einen wesentlich höheren Grad an präziser Reinnervation im Vergleich zu Verletzungen, bei denen die Kontinuität der Hüllstrukturen unterbrochen wurde (NGUYEN et al., 2002; BRUSHART und MESULAM, 1980). Die Schwann-Scheiden samt endoneuraler Strukturen bilden Leitschienen, in denen die Axone direkt zu ihren Zielorganen geführt werden. Sind diese unterbrochen, können die aussprossenden axonalen Triebe „unpassende“ Hüllstrukturen reinnervieren. Als Folge nehmen die Spezifität und damit das funktionelle Ergebnis der Reinnervation ab. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, sind zahlreiche Reparaturverfahren entwickelt worden. Trotzdem ist die passende Reinnervation von jedem Endorgantyp durch sein ursprüngliches Axon noch lange nicht perfekt. Auch heutzutage gibt es kein Verfahren, welches die Wiederherstellung der normalen sensomotorischen Funktion eines erwachsenen Patienten nach einer schweren peripheren Nervenverletzung gewährleisten kann. Es wird angenommen, dass hinsichtlich der Verfeinerungen der chirurgischen Techniken eine Grenze erreicht ist (LUNDBORG, 2000). Aus diesem Grund werden neue Verfahren benötigt, die in der Lage sind, das Überleben von Neuronen nach Axotomie zu verbessern, die axonale Regeneration zu verstärken, die gezielte Reinnervation von Zielstrukturen zu fördern, die zentrale Reorganisation zu modulieren und die Entstehung von neuropathischem Schmerz zu reduzieren.

Faktoren, die das funktionelle Ergebnis beeinflussen können, sind Alter, Zeitpunkt der Intervention, Art des Nervs, Lage der Verletzung, Verletzungsart- und individuelle spezifische kognitive Fähigkeiten (LUNDBORG und ROSEN, 2007). Wie eine elektrophysiologische Studie an Affen zeigen konnte, ist die Zeit bis zur Reinnervation des Muskels der beste Indikator für das funktionelle Endergebnis der Nervenregeneration. Dies legt nahe, dass der Grad der Wiedererlangung von motorischer und sensibler Funktion, der nach Monaten oder Jahren erreicht wird, durch das frühe Auswachsen der Axone bestimmt oder zumindest stark beeinflusst wird (KRARUP et al., 2002). Verfahren, die das Wachstum der Axone von der Läsion in den distalen Stumpf hinein beschleunigen können, könnten demnach helfen, ein besseres funktionelles Ergebnis wiederzuerlangen. Die Methoden, denen eine

gesteigerte Geschwindigkeit von Regeneration und Reinnervation nachgewiesen werden konnten, zeigten ebenfalls eine Verminderung fehlgeleiteter Reinnervationen (Vivó et al., 2008). Dies könnte auch die Steigerung der axonalen Regeneration bei Verwendung von vordegenerierten Nervenplantaten (BRUSHART et al., 1998a) erklären sowie den potentiellen klinischen Wert elektrischer Nervenstimulation.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die axonale Regeneration kein Synonym für die Wiedererlangung der Funktion ist. Ein Reifungsprozess muss sich anschließen, der Dickenwachstum der Axone, Remyelinisierung und Festigung der synaptischen Verbindung mit dem Endorgan einschließt (BURNETT und ZAGER, 2004).

## 4.2 Gestaffelte Regeneration

Die Regeneration der Axone im peripheren Nervensystem läuft als ein asynchroner Prozess ab. Das Versagen regenerierender Axone, die Naht als eine einzige Front zu durchqueren, wurde schon von RAMON Y CAJAL beschrieben (RAMON Y CAJAL, 1928). Spätere Hinweise von Studien mit Radiotracern (FORMAN und BERENBERG, 1978; DANIELSEN et al., 1986) und retrograder Markierung (BRUSHART, 1993) stützten diese Hypothese, bei der die Axone gestaffelt in den distalen Nervenstumpf hinein regenerieren. In letzter Zeit konnte diese Staffelung durch Markierung der Axone mit retrograden Tracern präzise quantifiziert werden (BRUSHART et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen und bestärken diese Beobachtungen. Die Betrachtung regenerierender Axone von Mäusen, die fluoreszierende Proteine in einem Teil ihrer Axone exprimieren, ermöglichte die individuelle Verfolgung der einzelnen Axone durch den Reparaturspalt und machte den gestaffelten Prozess der Regeneration sichtbar:

Fünf Tage nach Nervendurchtrennung konnten erst 17 % der proximal zur Verfügung stehenden Axone im Reparaturspalt beobachtet werden. Eine Woche nach Nervendurchtrennung und -naht hatte nur ein Viertel der proximalen Axone überhaupt die Nahtlinie übertreten. Von diesen Axonen waren allerdings 50 % schon über 3 mm in den distalen Stumpf hinein vorgerückt. Eine kleine Anzahl an Axonen bildet gewissermaßen eine Vorhut bei der Penetration des distalen Stumpfs,

während der Großteil der Axone für mindestens sieben Tage an der Reparaturstelle verweilt.

Das Wachstum der Axone wird durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren bestimmt. Sowohl die Bestandteile des umgebenden Milieus als auch die Eigenschaften des Neurons selbst beeinflussen das Ausmaß und die Kapazität der axonalen Regeneration. Die Regenerationsfähigkeit des peripheren Nervensystems beruht so zum Großteil auf der Existenz von Schwann-Zellen, die eine Umgebung schaffen, in denen Axone auch jenseits der Embryonalphase gut wachsen können. Dagegen verhindern die Glia-Zellen des zentralen Nervensystems das Wachstum der meisten Axone im ZNS. Neben diesem wichtigen Einfluss des Umgebungsmilieus kommt aber auch intrinsischen Eigenschaften der Neurone eine bedeutende Rolle auf das Ausmaß der axonalen Regeneration zu. So nimmt generell die Fähigkeit zur Regeneration mit dem Alter der Neurone ab. Allerdings können sich auch gleichaltrige Neurone auf demselben Entwicklungsstand stark in ihrer Regenerationsleistung unterscheiden (FAWCETT, 1992).

Die beobachtete Form der axonalen Regeneration als gestaffelten Prozess lässt vor diesem Hintergrund verschiedene Interpretationen ihrer Ursache, Funktion und Auswirkungen zu. So deutet das gleichzeitige Vorkommen von ruhenden und wachsenden Axonen im selben Umgebungsmilieu auf die individuellen Unterschiede der Neurone als Ursache für die Staffelung hin. Zudem ist die molekulare Zusammensetzung des Extrazellulärraumes nach Nervenverletzung ständigen Veränderungen unterworfen: Der Spalt zwischen proximalem und distalem Stumpf, in den die schnell reagierenden Neurone ihre Axone schicken, enthält z.B. anfänglich kein Laminin, einem wichtigen Förderer des axonalen Wachstums (MANTHORPE et al., 1983), und weist wahrscheinlich verschiedene hemmende Substanzen auf (KREKOSKI et al., 2001). Nach erfolgreicher Durchquerung erreichen die Axone einen distalen Nervenstumpf, der sich in einer Übergangsphase befindet: Durch die ablaufende Waller-Degeneration werden Bestandteile des Axoplasmas abgebaut. Der Phänotyp der Schwann-Zellen verändert sich vom myelinisierenden hin zum proliferierenden (FU und GORDON, 1997; DEZAWA, 2000). Wachstumsfördernde neurotrophe Faktoren werden hochreguliert (BOYD und GORDON, 2003). Durch den gestaffelten Charakter der Regeneration folgt, dass die regenerierenden Axone abhängig von ihrer

Geschwindigkeit, mit der sie die Reparatur durchqueren, eine unterschiedliche distale Umgebung vorfinden. Neben den erwähnten individuellen Unterschieden in der neuronalen Regenerationsfähigkeit beeinflusst dies erneut den Erfolg und das Ausmaß des axonalen Wachstums. Ebenso werden die Entscheidungen, die die Suche nach dem richtigen Zielorgan betreffen, von dieser Zusammensetzung gelenkt. Möglicherweise verursachen allerdings gerade diese Unterschiede der Extrazellulärzusammensetzung den gestaffelten Verlauf der Regeneration: Die unterschiedliche Zusammensetzung erlaubt es zuerst nur wenigen, dann mehreren Neuronen, ihre Axone nach distal sprossen zu lassen.

Um zu erreichen, dass mehr Axone in kürzerer Zeit den distalen Stumpf erreichen, wären zwei verschiedene Manipulationsmöglichkeiten denkbar: Durch Steigerung der Regenerationskapazität der Neurone (AL-MAJED et al., 2000a; QIU et al., 2002) oder durch Veränderung der hemmenden Substanzen in der Umgebung (ZUO et al., 2002; MEARS et al., 2003). So konnte das Einwachsen regenerierender Axone in den distalen Stumpf nach Nervendurchtrennung und Adaptation um ein mehrfaches gesteigert werden, indem durch Einspritzen von Chondroitinase wachstumshemmende Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane denaturiert wurden (ZUO et al., 2002). Mit Antikörpern gegen das hemmende MAG (Myelin-assoziiertes-Glykoprotein) konnte sogar die Spezifität der Reinnervation verbessert werden (MEARS et al., 2003). Mit einem auf den Regenerationszeitpunkt genau abgestimmten Menü von Signalstoffen könnte so vielleicht die Fähigkeit der Axone gesteigert werden, den korrekten Zielweg einzuschlagen (BRUSHART, 1998b; BRUSHART et al., 2002).

Eine verbesserte Regenerationskapazität der Neurone kann beispielsweise durch ein angehobenes cAMP-Level erreicht werden (QIU et al., 2002). Dieser Weg spielt vermutlich auch bei der gesteigerten Regeneration durch elektrische Stimulation eine Rolle. Auf die Möglichkeit, mithilfe elektrischer Nervenstimulation den gestaffelten Prozess zu komprimieren und damit die Regeneration zu steigern, wird im Laufe der Diskussion noch eingegangen.

#### 4.2.1 Regenerationsgeschwindigkeit unter dem Aspekt der Staffelung

Der gestaffelte Charakter der axonalen Regeneration muss bei den Versuchen, die axonale Regenerationsgeschwindigkeit nach Nervennaht zu bestimmen, berücksichtigt werden.

Die zahlreichen Bemühungen, die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration nach einer Reihe unterschiedlichster Verletzungen zu bestimmen, haben sich erheblich darauf gestützt, das am schnellsten regenerierende Axon zu identifizieren (GUTMANN et al., 1942; FORMAN et al., 1979; DANIELSEN et al., 1986; FUGLEHOLM et al., 1994; PESTRONK et al., 1980). Aus technischen Gründen wurden diese Messungen meist schon wenige Tage nach der Läsionssetzung unternommen. Die vorliegenden Ergebnisse anhand individueller morphologischer Messungen zeigen jedoch deutlich, dass in den frühen Phasen der Regeneration nach einer Nervenreparatur die Mehrzahl der Axone den distalen Stumpf noch nicht erreicht hat. Und die Axone, die schon in den distalen Stumpf eingedrungen sind, schreiten nicht mit derselben Geschwindigkeit voran (WITZEL et al., 2005). In unseren Ergebnissen zeigten sich Wachstumsgeschwindigkeiten von 1,5 mm / Tag von den schnellsten 5 % und 0,84 mm / Tag von den schnellsten 50 % der regenerierenden Axone.

AL-MAJED zeigte im Rattenmodell, dass manche Motoaxone des durchtrennten und genähten Femoralnervs eine Distanz von 25 mm nicht vor 8 - 10 Wochen oder später erreichten, obwohl Axone bei der von Gutmann (GUTMANN et al., 1942) geschätzten Regenerationsgeschwindigkeit von 3 mm / Tag eine Distanz von 25 mm innerhalb von 2 - 3 Wochen überwinden sollten (AL-MAJED et al., 2000a).

Die Bestimmung der Regenerationsgeschwindigkeit nur anhand des schnellsten Axons reicht demnach nicht dazu aus, das Verhalten der meisten Axone adäquat zu beschreiben. Zudem sind selbst die schnellsten Schätzungen der morphologisch im Mausmodell bestimmten Regenerationsgeschwindigkeit signifikant langsamer als die physiologisch erhaltenen Messungen in der Ratte (FORMAN und BERENBERG, 1978; BLACK und LASEK, 1979; PESTRONK et al., 1980).

### 4.3 Axonmorphologie

Eine mögliche Ursache für die mangelhafte funktionelle Wiederherstellung nach peripherer Nervenverletzung und für die aufgezeigten Grenzen der chirurgischen Verfahren könnte in der Morphologie der Regeneration begründet sein.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben die morphologischen Reaktionen der regenerierenden Axone nach Nervenverletzung detailliert beschrieben (FRIEDE und BISCHHAUSEN, 1980; MCQUARRIE, 1985; MORRIS et al., 1972a; MORRIS et al., 1972b).

Für die genaue Verfolgung des einzelnen Axons auf seinem Weg von diesem proximalen Ausgangspunkt bis in den distalen Stumpf hinein sind die elektronenmikroskopischen Darstellungen allerdings wenig geeignet. Eine weitaus handlichere Methode bietet hierbei die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der YFP-positiven Axone in unserem Mausmodell. Nach Durchtrennung des N. ischiadicus der Maus wird der distale Nervenstumpf durch ein Nerventransplantat einer Wildtyp-Maus ersetzt. Die später zu beobachtende Fluoreszenz im distalen Stumpf entspricht somit ausdrücklich den regenerierenden Axonen aus dem proximalen Stumpf. Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, dass die YFP-positiven Mäuse nur in einer kleinen Untergruppe ihrer Axone das fluoreszierende Protein exprimieren. Die Axone können damit deutlich von der Umgebung abgegrenzt werden, die Verfolgung der Axone auf ihrem Weg nach distal und die Beschreibung ihrer Morphologie sind individuell möglich.

In unseren Beobachtungen zeigte sich, dass die regenerierenden Axone auf zwei vollkommen verschiedenen Arten mit dem distalen Stumpf interagieren. Wir unterscheiden unverzweigte Einzel-Axone von verzweigten Axonen. Die Einzel-Axone folgen überwiegend einem geraden Verlauf durch den Spalt vom proximalen zum distalen Stumpf, vollführen dann eine Auslenkung nach lateral und schreiten quer die Oberfläche des distalen Stumpfs in variabler Distanz ab, bevor sie letztendlich in eine der Schwann-Zellhüllen eindringen. An diesem Punkt können sie zusätzliche Sprosse bilden, die als Kollateralen in angrenzende Schwann-Scheiden eintreten. Sowohl fünf als auch sieben Tage nach der Nerventransplantation zeigten

Einzel-Axone das Potenzial auf diese Art mit bis zu 142 separaten Schwann-Scheiden des distalen Stumpfs zu interagieren.

Andere Axone bilden im Gegensatz dazu schon Verzweigungen, während sie sich dem distalen Stumpf annähern, und schicken kollaterale Aussprossungen in fünf bis zehn separate Schwann-Zellhüllen. Sie werden daher als „verzweigte Axone“ bezeichnet. Dieses Verhalten erlaubt dem ursprünglichen Axon aus durchschnittlich 68 unterschiedlichen distalen Wegen zu wählen. Allerdings gab es auch fließende Übergänge zwischen der Morphologie unverzweigter und verzweigter Axone. Beispielsweise bei Axonen, die sich erst bei Eintritt in den distalen Stumpf verzweigen. Hier zeigt sich die Schwäche der Betrachtung eines dynamischen Prozesses mithilfe zeitlich festgelegter, statischer Bilder (WITZEL et al., 2005).

Dennoch zeigen unsere Versuche, dass Axone unterschiedlicher Morphologie Zugang zu einer Vielzahl an Schwann-Zellhüllen im distalen Stumpf haben. Zahlreiche Endorgane können somit gegebenenfalls erreicht werden. Die Folgen dieses weit reichenden Zugangs hängen wiederum von der Anordnung der Axone auf Höhe der Verletzung ab (STEWART, 2003). In einem distal gelegenen Faszikel, in dem alle Axone für das gleiche Zielorgan bestimmt sind, wird sich eine Unordnung des axonalen Systems nur gering auswirken. Auf proximaler Ebene dagegen, wo funktionell unterschiedliche Axone miteinander vermischt sind, steigt die Chance, dass regenerierte Axone antagonistische Muskeln oder funktionell verschiedene Gewebe reinnervieren. Des Weiteren sind die Faszikel im distalen Bereich kabelförmig angeordnet und zeigen einen hohen Grad an somatotopischer Ordnung. Die Faszikel auf proximaler Höhe weisen hingegen eine eher plexiforme Organisation auf. Trotz der häufigen Veränderungen in der Faszikelanordnung wird jedoch auch dort die somatotopische Gruppierung weitgehend bewahrt (STEWART, 2003).

Um diesen komplexen axonalen Anordnungen gerecht zu werden, wurden zahlreiche Bemühungen unternommen, die chirurgische Adaptierung von durchtrennten Nervenstümpfen anhand der individuellen Faszikelstruktur präzise auszurichten. Neben den Techniken der direkten End-zu-End-Verfahren mit Epineural-Naht, Faszikelgruppen-Naht oder gar Faszikelnah existieren Nerven-transplantationsverfahren, die größere Distanzen zwischen den beiden



Nervenstümpfen überbrücken sollen. Ihnen gemein ist der Versuch, die beiden Enden möglichst exakt passend aneinanderzufügen. Als intraoperative Hilfsmittel wurden hierfür faszikuläre Nervenstimulationen (KLINE et al., 1969; WILLIAMS und TERZIS, 1976), enzymatische Faszikelfärbungen (RILEY und LANG, 1984) oder komplexe optische Techniken (BOPPART et al., 1998) entwickelt. Der Nachweis, dass die Nervennaht oder -transplantation der individuellen Faszikel das funktionelle Ergebnis deutlich verbessert, blieb allerdings gemessen an dem zu erwartenden Erfolg größtenteils aus (STEWART, 2003; DE MEDINACELI und SEABER, 1989). Eine mögliche Erklärung könnten unsere Beobachtungen liefern: Die seitliche Auslenkung der regenerierenden Axone, wie sie hier dargestellt wurde, zeigt, warum die chirurgische Reparatur durchtrennter Nerven limitiert ist. Auch bei optimaler Ausrichtung der entsprechenden Faszikel sind die Axone in der Lage, aus zahlreichen Zielpfaden zu wählen und eventuell einen unpassenden Weg einzuschlagen.

Entsprechend RAMON Y CAJALS Überlegungen von Form zur Funktion (RAMON Y CAJAL, 1928) lassen sich für das morphologisch betrachtete Verhalten der Einzel-Axone mehrere mögliche Erklärungen finden. Die Wachstumskolben der Axone können durch verschiedene Faktoren auf ihrem Weg gelenkt werden. Dazu gehört sowohl der Neurotropismus als auch die Kontaktwiedererkennung mit ihren jeweiligen anziehenden und abweisenden Faktoren (TESSIER-LAVIGNE und GOODMAN, 1996). Der Begriff „Neurotropismus“ wurde schon von CAJAL als Erklärung für die spezifische Reinnervation passender Leitschienen verwendet (RAMON Y CAJAL, 1928). Axone, die die Oberfläche des distalen Stumpfs überqueren, könnten demnach einem Gradienten eines diffusionsfähigen Faktors folgen, der von einer bestimmten Schwann-Scheide ausströmt. Oder aber von einer chemorepulsiven Substanz aus einer unpassenden Leitschiene ausweichen. Nach der Theorie der Kontaktwiedererkennung ist auch denkbar, dass sie die Oberfläche solange erkunden, bis sie einen besonderen molekularen „Fingerabdruck“ treffen, diesen als Zielweg erkennen und selektiv reinnervieren. Keine der beiden Mechanismen ist bis jetzt im Zusammenhang mit der spezifischen Interaktion einzelner Schwann-Scheiden untersucht worden. Es kann allerdings vermutet werden, dass beide Mechanismen keine deutliche Rolle in der peripheren Nervenregeneration des Erwachsenen spielen. Ansonsten wäre es nicht erklärbar, wie die beträchtliche

Unordnung in den Verbindungen zustande käme, die nach peripherer Nervenreparatur nachgewiesen werden konnte (BRUSHART und MESULAM, 1980; KOERBER et al., 1989; WITZEL et al., 2005).

Alternativ könnte die Bedeutung des seitlichen Wachstums nicht in der zurückgelegten Distanz sondern in der dafür benötigten Zeit liegen: Erfolgreiches axonales Wachstum erfordert die richtige Balance von wachstumsfördernden und –hemmenden Substanzen (JONES et al., 2003; TESSIER-LAVIGNE und GOODMAN, 1996). Beim Vorherrschen von positiven Signalen können die Axone trotz vorhandener inhibitorischer Signale ihr Wachstum fortsetzen. Das Verhalten der Wachstumskegel entspricht dabei einer fein abgestimmten Antwort auf die Umgebung (TESSIER-LAVIGNE und GOODMAN, 1996). Das Verhältnis der Substanzen kann so die Richtung der Wachstumskolben lenken bzw. das Weiterwachsen fördern oder blockieren. Die ablaufende Waller-Degeneration verändert im zeitlichen Verlauf diese Balance in jeder einzelnen Schwann-Scheide. Nur wenn ein Wachstumskegel einer Schwann-Scheide begegnet, in der die fördernden Substanzen den hemmenden überwiegen, wird das Axon abbiegen und diese betreten. Das seitliche Auslenken der Axone entlang der Schnittebene des distalen Stumpfs scheint demnach vielmehr einem Abtasten des regenerierenden Axons auf der Suche nach einer zeitlich reifen Schwann-Scheide darzustellen (WITZEL et al., 2005).

#### **4.4 Bildung und Stutzen von Kollateralen**

In der Regeneration peripherer Nerven ist die Bildung kollateraler Triebe von regenerierenden Axonen ein bekannter Mechanismus. Die verletzten Axone senden zahlreiche Sprosse als „Regenerationseinheit“ nach distal (MORRIS et al., 1972a). Wie viele Studien zeigen konnten, ist als Folge die Anzahl der Axone im distalen Stumpf um ein Mehrfaches im Vergleich zum unverletzten Nerven für mehrere Monate nach Nervendurchtrennung und –reparatur erhöht (SHAWE, 1955; EVANS und MURRAY, 1956; MACKINNON et al., 1991). Erst nach 24 Monaten werden wieder normale Werte erreicht (MACKINNON et al., 1991). Anhand der gestiegenen Anzahl distaler Axone und dem Verhalten der beobachteten axonalen Populationen kann zwar auf die Bildung von Kollateralen geschlossen werden. Das proportionale Verhältnis von verzweigten und unverzweigten Axonen oder das Ausmaß der

Verzweigungen kann mit diesen Studien allerdings nicht ermittelt werden. So haben innerhalb des distalen Nervenstumpfs vier Kollateralen eines einzelnen Ursprungsaxons dasselbe Erscheinungsbild, wie ein Trieb von je vier Axonen. Selbst Markierungsstudien (BRUSHART, 1993) können nur begrenzt Auskunft über das genaue Verzweigungsverhalten geben: Kollateralen eines Neurons müssen separate Nervenäste reinnervieren, um mit dieser Methode überhaupt identifiziert zu werden. Und selbst dann kann damit nicht mehr als die Existenz dieser beiden markierten Kollateralen dargestellt werden. Aus den genannten Gründen bietet unser Versuchsmodell zuvor unerreichbare Möglichkeiten in der systematischen Untersuchung des Verzweigungsverhaltens individueller Axone.

#### **4.4.1 Preferential Motor Reinnervation**

Im Gegensatz zu unverzweigten Axonen haben verzweigte Axone die Möglichkeit, gleichzeitig mit mehreren Zielwegen in Kontakt zu treten, um den am besten passenden zu wählen: Diese Vorstellung wird von Ergebnissen retrograder Doppelmarkierungen eines gemischten Nervs im Rattenmodell gestützt. Dabei wurden die Axone, die in den motorischen oder kutanen Zweig des Femoralnervs nach Durchtrennung und Reparatur regenerierten, mit zwei verschiedenen Tracern markiert. Somit konnten die neuen Axonaussprossungen zurückverfolgt und ihre Ursprungsneurone bestimmt werden. Es zeigte sich, dass nach Durchtrennung des gemischten Nervs regenerierende Motoaxone bei gleichem Zugang zu motorischen und kutanen Leitbahnen bevorzugt den Muskel (BRUSHART, 1988) oder den Muskelnerv (BRUSHART, 1993) reinnervieren. Viele Neurone enthielten allerdings anfänglich beide Tracer. Diese haben demzufolge ihre Kollateralen sowohl zu sensiblen als auch motorischen Zweigen projiziert. Im weiteren Verlauf stieg die Zahl der Motoneurone, die korrekt in den motorischen Zweig projizierten, dramatisch an. Die Zahl der doppelt-markierten Neurone fiel zur gleichen Zeit signifikant ab, während die Population der Motoneurone, die allein in den sensiblen Zweig projizierten, nur geringfügig abnahm. Kollateralen von Motoaxonen in den sensiblen Zweig wurden demnach gestutzt, so dass die Zahl der korrekten Projektionen auf Kosten der doppelt-markierten Neurone anstieg. Die Motoaxone, die ausschließlich zum sensiblen Zweig projizierten, waren unfähig, ihren Irrtum zu korrigieren, ihre

Anzahl blieb konstant (BRUSHART, 1990). Die Tendenz motorischer Axone, selektiv die motorischen Zweige in einem gemischten Nerv zu reinnervieren, wird als „preferential motor reinnervation“ (PMR) bezeichnet (BRUSHART, 1988). Dieser Vorgang schreitet im Rahmen des gestaffelten Prozesses der Regeneration voran (BRUSHART, 1993; AL-MAJED et al., 2000a).

In dem eben dargestellten Versuch wuchsen zu Beginn der Reinnervation etwa ebenso viele Motoaxone korrekt in den motorischen wie inkorrekt in den kutanen Zweig. Die Auswahl der Leitschienen erfolgte demnach zufällig (BRUSHART, 1990). Diese Beobachtung weist erneut darauf hin, dass die Wahl der distalen Schwann-Scheide vermutlich nicht auf Spezifitätsmechanismen wie Neurotropismus, Kontakterkennung oder mechanische Ausrichtung beruht. Ansonsten wäre eine korrekte spezifische Innervation schon zu Beginn der Regeneration zu erwarten gewesen. Die Spezifität der motorischen Leitschienen wird demzufolge vielmehr durch Zurückstutzen der Kollateralen in sensiblen Leitschienen erreicht, während die Kollateralen in motorischen Leitschienen erhalten bleiben („pruning hypothesis“) (BRUSHART, 1988; BRUSHART, 1993). Obwohl hierbei der größte Reiz zum Zurückstutzen durch neuromuskuläre Wiedererkennung erreicht wird, kann es auch allein als Antwort auf den Zielweg erfolgen (BRUSHART, 1993).

Die verzweigte Morphologie vieler YFP-exprimierender Axone in unserem Versuch kann als morphologisches Substrat für diesen bis jetzt nur indirekt dargestellten Mechanismus verstanden werden, bei der Spezifität durch Zurückstutzen von Kollateralen erzeugt wird. Distal der Reparaturstelle konnten neben sporadischen Verzweigungen auch die Rückbildung von Kollateralen beobachtet werden. Hierbei bleibt allerdings noch zu klären, durch welche Reize dieses Stutzen ausgelöst werden kann. Mögliche Theorien beinhalten zum einen die Konkurrenz der Kollateralen eines einzigen Neurons um die für das Überleben und die axonale Verlängerung notwendigen Baustoffe und Zellorganellen (SMALHEISER und CRAIN, 1984). So konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Verbindung eines axonalen Sprosses mit einem passenden Ziel die bis dahin gleich aufgeteilte Materialverteilung zu Ungunsten der anderen Kollateralen umverteilt wird (GOLDBERG und SCHACHER, 1987; SCHACHER, 1985). Die Reinnervation des korrekten Zielweges kann damit selektiv unterstützt werden, während die Regeneration in unpassende Bahnen

erschwert wird. Ein anderer potentieller Mechanismus ist die unterschiedliche Unterstützung der Kollateralen durch neurotrophe Faktoren (SAFFRAN und CRUTCHER, 1990).

Inwieweit der Prozess der bevorzugten Muskelreinnervierung durch Motoneurone gesteigert werden kann, ist Gegenstand zahlreicher aktueller Studien (BRUSHART et al., 1998a; MEARS et al., 2003; ROBINSON und MADISON, 2003; SIMOVA et al., 2006; AL-MAJED et al., 2000a). Im Rahmen dieser Arbeit erwähnenswert ist hierbei vor allem die Beobachtung, dass elektrische Nervenstimulation die PMR beschleunigen kann (AL-MAJED et al., 2000a). Es bleibt abzuwarten, ob diese Bemühungen dazu imstande sind, potentiell klinische Verfahren zu entwickeln, die die funktionelle Spezifität der Nervenregeneration verbessern können.

#### **4.5 Elektrostimulation**

Bestrebungen mittels elektrischer Stimulation die periphere Nervenregeneration zu verbessern reichen weit ins 18. und 19. Jahrhundert zurück (siehe Einleitung). Der Nutzen dieser Behandlungen blieb jedoch bis in die Gegenwart stets umstritten. Trotz der sehr uneinheitlichen Studienlage und ungenügender Kenntnisse aus Tierversuchen wurde die muskuläre Elektrostimulation als Rehabilitationsmaßnahme an Patienten über Jahrzehnte hinweg angewendet.

Ein weit verbreitetes Verfahren nach einer Nervenverletzung ist hierbei die direkte Muskelstimulation mit einem depolarisierenden Strom. Der erwünschte Effekt liegt in der Reduktion der denervationsbedingten Veränderungen des Muskels mit dem Ziel, noch genügend funktionsfähige Muskelmasse bis zur gelungenen Reinnervation zu erhalten. Studien der letzten Jahrzehnte konnten diesen Effekt der direkten kontinuierlichen elektrischen Muskelstimulation bestätigen (KERN et al., 2005; PATERNOSTRO-SLUGA et al., 2002; WILLIAMS, 1996a; WILLIAMS, 1996b).

Häufiges Anwendungsgebiet der direkten Muskelstimulation sind auch zentral bedingte Paresen, wie zum Beispiel nach Blutungen oder Infarkten. Hierbei wird neben der verminderten Atrophie und Vermeidung von Kontrakturen auch eine positive Wirkung auf die an der Bewegung beteiligten zentralnervösen Verknüpfungen erhofft. Die Fähigkeit zur Reorganisation des zentralen

Nervensystems, auch als Plastizität bezeichnet, kann damit unterstützt werden (SHEFFLER und CHAE, 2007).

Bei peripheren Verletzungen konnten zudem verschiedene ältere Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität des Muskels einen trophischen Einfluss auf die innervierenden Motoneurone (CZECH et al., 1978), auf die terminale Verzweigung (BROWN und IRONTON, 1978) und die Transmitterfreisetzung (SNIDER und HARRIS, 1979) hat.

Als Alternative zur direkten Muskelstimulation kann der depolarisierende Strom auch in Form der indirekten Muskelstimulation an den verletzten Nerven appliziert werden. Die Auswirkungen dieses Verfahrens auf die Regeneration der Axone werden im Folgenden ausführlicher diskutiert.

#### **4.5.1 Elektrostimulation und axonale Regeneration**

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass elektrische Stimulation das Aussprossen und in gewisser Weise die frühe funktionelle Wiederherstellung nach peripherer Nervenverletzung fördert (NIX und HOPF, 1983; POCKETT und GAVIN, 1985; MANIVANNAN und TERAKAWA, 1994; SEBILLE und BONDOUX-JAHAN, 1980). In den letzten Jahren brachten neuere Untersuchungen eine Vielzahl an Erkenntnissen, die wiederum zahlreiche Fragen aufwerfen aber auch potentielle Verfahren von klinischer Bedeutung andeuten.

Die aktuellen Arbeiten deuten intensiv darauf hin, dass die niederfrequente elektrische Stimulation des verletzten Nervs die axonale Regeneration positiv beeinflussen kann (AL-MAJED et al., 2000a; AL-MAJED et al., 2000b; AL-MAJED et al., 2004; BRUSHART et al., 2002; BRUSHART et al., 2005; GEREMIA et al., 2002; GEREMIA et al., 2007). Die günstigen Wirkungen lassen sich schon durch eine einmalige Stimulation des proximalen Nervenstumpfs mit 20 Hz für eine Stunde intraoperativ erreichen (AL-MAJED et al., 2000a). Die hiermit erzeugten wiederholten Entladungen der Motoneurone durch die kurzen Wechselstromimpulse haben sich als viel versprechende Option dargestellt, die Regeneration im peripheren Nervensystem zu verbessern. Die Ergebnisse längerer Anwendungsintervalle der elektrischen Stimulation sind in der Literatur uneinheitlich. Zumeist wurden allerdings fehlende

oder auch negative Effekte auf die axonale Regeneration beschrieben (ASENSIO-PINILLA et al., 2009; GEREMIA et al., 2007). Die verwendete niedrige Frequenz von 20 Hz entspricht der physiologisch relevanten Frequenz der Entladung der Motoneurone der unteren Extremität (LOEB et al., 1987).

Soweit es aufgrund der jetzigen Studienlage zu beurteilen ist, beeinflussen die nützlichen Effekte der elektrischen Stimulation die Nervenregeneration auf unterschiedlichen Ebenen: es wird sowohl die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration (AL-MAJED et al., 2000a) – nicht zu verwechseln mit der Wachstumsgeschwindigkeit der regenerierenden Axone – als auch ihre Spezifität gesteigert (BRUSHART et al., 2002; BRUSHART et al., 2005), die Wirkungen umfassen die motorische (AL-MAJED et al., 2000a; BRUSHART et al., 2002) und sensible Regeneration (BRUSHART et al., 2005; GEREMIA et al., 2002; GEREMIA et al., 2007) und konnten auch auf spinaler Ebene nachgewiesen werden (VIVÓ et al., 2008; ASENSIO-PINILLA et al., 2009).

AL-MAJED zeigte im Rattenmodell, dass eine einstündige elektrische Stimulation die Axonregeneration nach Femoralnervdurchtrennung und –reparatur entscheidend beschleunigt (AL-MAJED et al., 2000a). Ebenfalls zeigten seine Ergebnisse erstmals eine zeitlich komprimierte Staffelung und eine beschleunigte preferential motor reinnervation (PMR) durch die elektrische Stimulation. Die erreichte Reinnervation drei Wochen nach Stimulation und Reparatur entsprach der, die sonst einen Regenerationszeitraum von acht bis zehn Wochen ohne Stimulation benötigt (AL-MAJED et al., 2000a).

Der zugrunde liegende Mechanismus der verbesserten Reinnervation nach einstündiger elektrischer Stimulation ist hierbei allerdings umstritten: Kommt es zu einem generellen Anstieg der Regenerationsgeschwindigkeit der Axone oder ist ein vermehrtes oder beschleunigtes Aussprossen aus den proximalen Axonen in den Reparaturspalt für die gesteigerte Reinnervation verantwortlich? Um diesen Mechanismus genauer zu betrachten, führten wir die vorliegenden Untersuchungen durch.

An einer Gruppe von YFP-exprimierenden Mäusen, die einzentimeterlange YFP-negative Ischiadikus-Transplantate erhalten hatten, wurde die Reparaturstelle

des N. ischiadicus intraoperativ für eine Stunde mit 20 Hz stimuliert. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften eines Anteils der regenerierenden Axone konnten die Durchquerung des Reparaturspalts sowie der Eintritt und der weitere Verlauf im distalen Nervenstumpf der Axone individuell verfolgt werden.

Um zu vermeiden, dass Axone, die im Rahmen der Regeneration mit ihren Trieben umkehren und nach proximal wachsen, doppelt gezählt werden, war die Anzahl der überhaupt zur Regeneration zur Verfügung stehenden Axone im proximalen Stumpf festgestellt worden. Die danach erhobenen Zählungen wurden stets im Verhältnis zu dieser Ausgangszahl ausgewertet.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch die elektrische Stimulation die Anzahl der regenerierenden Axone im distalen Stumpf bzw. Nerventransplantat im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrollgruppe signifikant ansteigt. In der Gruppe nach fünf Tagen war der Anstieg bis 4 mm distal der Reparaturstelle signifikant, danach konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Nach sieben Tagen zeigte sich an jedem Messpunkt entlang des distalen Stumpfs ein signifikanter Anstieg der Anzahl regenerierender Axone im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen worden sein, die wir im weiteren Versuchsverlauf untersuchten. Die größere Anzahl der nach distal regenerierenden Axone kann erstens im Sinne einer gesteigerten Rekrutierung durch vermehrtes Kreuzen proximaler Axone durch den Reparaturspalt bedingt sein. Sie kann aber auch Ausdruck eines gesteigerten Verzweigungsverhaltens der Axone sein. Eine dritte Möglichkeit wäre eine vermehrte Anzahl an Verzweigungsästen pro Verzweigung.

Mithilfe des „Crossing-Index“ als Verhältnis der kreuzenden Axonen zur Anzahl proximal verfügbarer Axone konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Stimulationsgruppe darstellen (5 Tage  $p < 0,001$ , 7 Tage  $p < 0,001$ ). Fünf Tage nach Transplantation und elektrischer Nervenstimulation kreuzten fast doppelt so viele Axone den Reparaturspalt als in der Kontrollgruppe (33,8 % in der stimulierten Gruppe versus 17 % in der Kontrollgruppe). Nach sieben Tagen waren es 46 % der proximalen Axone, bei der nichtstimulierten Gruppe 25 %. Durch die elektrische Stimulation erreichen daher signifikant mehr Axone in der gleichen Zeit den distalen Stumpf. Die elektrische Stimulation unterstützt folglich die Axone,



ihren Weg nach distal zu beginnen. Dies hat Auswirkung auf den gestaffelten Prozess der Regeneration. Wie schon oben genauer beschrieben wurde, verharrt die Mehrzahl der Axone zu Beginn der Regeneration noch im proximalen Stumpf, während einige der Axone schon den Reparaturspalt durchquert haben und schon weit in den distalen Stumpf eingedrungen sind. Erst nach und nach nehmen die anderen dann auch ihren Weg nach distal auf. Wir konnten zeigen, dass dieser gestaffelte Prozess durch die einstündige niederfrequente Elektrostimulation verkürzt und beschleunigt wird.

Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang mit früheren Beobachtungen am Rattenmodell, die zeigen konnten, dass eine einstündige elektrische Stimulation mit 20 Hz die Regeneration der Axone beschleunigt (AL-MAJED et al., 2000a) ohne allerdings die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone direkt zu beeinflussen (BRUSHART et al., 2002). Eine verkürzte gestaffelte Regeneration wurde als Ursache für dieses Phänomen vermutet (BRUSHART et al., 2002). Unsere Beobachtungen der Regeneration individueller Axone bestätigen diese Theorie. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Zeit bis zur Reinnervation des Muskels der beste Indikator für das funktionelle Endergebnis ist (KRARUP et al., 2002), lässt die Verkürzung der gestaffelten Regeneration eine Verbesserung des funktionellen Ergebnisses erhoffen.

Neben der gesteigerten Durchquerung durch den Reparaturspalt konnten wir auch ein gesteigertes axonales Verzweigungsverhalten nach elektrischer Stimulation beobachten. Bis weit distal der Reparaturstelle zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den elektrisch stimulierten Tieren, unabhängig vom Überlebenszeitraum ( $p < 0,001$ ). Das Verzweigungsverhalten eines jeden verzweigten Axons beschrieben wir mit einem Verzweigungsindex. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Äste pro verzweigtes Axon nach elektrischer Stimulation. Die Folgen der gesteigerten Verzweigungen auf die funktionelle Wiederherstellung nach einer Nervenverletzung sind im Rahmen dieser Untersuchung nur hypothetisch zu diskutieren. So kann ein verzweigtes Axon Kollateralen in unpassenden Leitbahnen zugunsten spezifisch passender stützen. Dass sich durch die elektrische Nervenstimulation die Spezifität der axonalen Regeneration verbessert, haben neuere Untersuchungen nachweisen können

(AL-MAJED et al., 2000a; BRUSHART et al., 2005; GEREMIA et al., 2007). Eine mögliche Rolle könnte hierbei die gesteigerte Verzweigungsaktivität spielen.

Der Anstieg der Anzahl regenerierender Axone nach elektrischer Stimulation ist unseren Ergebnissen zufolge eine Kombination von vermehrter Durchquerung des Reparaturspalts und gesteigerter Verzweigung. Die Anzahl der Kollateralen pro Verzweigung wird hierbei nicht verändert, ebenso wenig wie die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone (s.u.).

#### **4.5.2 Elektrostimulation und axonale Wachstumsgeschwindigkeit**

Der zugrunde liegende Mechanismus des Anstiegs der axonalen Regeneration nach einstündiger elektrischer Stimulation zum Zeitpunkt der Nervenreparatur ist in der Literatur umstritten:

Die Arbeitsgruppe um BRUSHART wies am Rattenmodell mit Radioisotopenmarkierung von Transportproteinen und durch anterograde Markierung der regenerierenden Axone nach, dass die Regenerationsgeschwindigkeit an sich durch die Stimulation nicht verändert wird. Die elektrische Stimulation fördert nach ihren Ergebnissen vielmehr den Beginn der Motoaxonregeneration. Die direkte Geschwindigkeit der Axone wird demnach nicht beeinflusst.

Anhand der Ergebnisse von ENGLISH dagegen verdoppelt die elektrische Stimulation nach peripherer Nervendurchtrennung und Reparatur im Mausmodell die zurückgelegte Distanz der regenerierenden Axone (ENGLISH et al., 2005; ENGLISH et al., 2007). Dies würde eine direkte Beeinflussung der elektrischen Stimulation auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone bedeuten. Zur operativen Versorgung wurde bei diesen Versuchen Fibrinkleber zur Stabilisierung der aneinander gefügten Nervenstümpfe verwendet (ENGLISH et al., 2005; ENGLISH et al., 2007). Die in diesem Gewebekleber enthaltenen Bestandteile Fibrin und Fibrinogen gehören zu den Proteinen der nativen Extrazellulärsubstanz. Ihre Wirkung auf die Regeneration im peripheren Nervensystem ist noch nicht vollständig geklärt. Studien, die zum Teil diese Proteine für den Einsatz in künstlichen Nervenersatzsystemen untersuchen, haben heterogene Ergebnisse gezeigt (AKASSOGLU et al., 2003; ALOVSKAYA et al.,

2007; KALBERMATTEN et al., 2008). Ein Einfluss des Fibrinklebers auf die axonale Regeneration kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Zur erneuten Erforschung des Einflusses elektrischer Stimulation auf die Beschleunigung der axonalen Regeneration wurden die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt. Um einen potentiellen Einfluss von Fibrinklebereffekten auszuschließen, erfolgten die Versuche mittels Versorgung durch alleinige Nervennaht.

Eine signifikante Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit der regenerierenden Axone konnte sich mit unseren Ergebnissen nicht nachweisen lassen. Nur bei den schnellsten 5 % der regenerierenden Axone scheint ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten zu sein. Die Gesamtsumme dieser Axone ist allerdings so gering, dass sich statistisch kein signifikanter Unterschied erkennen lässt. Die Förderung der axonalen Regeneration beruht unseren Beobachtungen zufolge vielmehr auf der Beschleunigung der gestaffelten Regeneration mit Übertritt von mehr Axonen aus dem proximalen Stumpf in den Reparaturspalt zu einem früheren Zeitpunkt. Der Beginn der distalen Reinnervation ist damit gesteigert, die Wachstumsgeschwindigkeit der regenerierenden Axone selbst bleibt größtenteils unverändert.

#### **4.5.3 Elektrostimulation und molekulare Faktoren**

Die Erforschung der molekularen Grundlagen dieser Effekte ist Gegenstand zahlreicher Studien. Im Folgenden werden diese potentiellen Erklärungswege nur angedeutet. Eine weitere Vertiefung ist im Rahmen unserer Untersuchung nicht vorgesehen.

Ein potentieller Mechanismus bei der gesteigerten Regeneration nach elektrischer Stimulierung ist der aktuellen Studienlage zufolge die Hochregulierung neurotropher Faktoren. So steigert nach Axotomie und chirurgischer Reparatur die einstündige elektrische Stimulation des proximalen Stumpfs mit 20 Hz parallel zum Anstieg der axonalen Regeneration die Expression von BDNF und seines Rezeptors *trkB* sowohl in Motoneuronen (AL-MAJED et al., 2000b) als auch in den sensiblen Neuronen der Spinalganglien (GEREMIA et al., 2007). Dem folgt eine beschleunigte und verstärkte

Hochregulierung von Proteinen des Zytoskeletts und regenerations-assoziierten Gene in den regenerierenden Neuronen (AL-MAJED et al., 2004; GEREMIA et al., 2007).

Die Hypothese, dass molekulare Faktoren für den positiven Effekt der Elektrostimulation auf die Nervenregeneration verantwortlich sind, wird durch Studien an Knockout-Mäusen gestützt: Bei Mäusen, die beispielsweise den *trkB*-Liganden *neurotrophin-4/-5* nicht exprimieren, führt elektrische Nervenstimulation nach peripherer Nervendurchtrennung zu keinem Regenerationsanstieg (ENGLISH et al., 2007).

#### **4.5.4 Klinische Bedeutung**

Wie in den vorigen Abschnitten dargestellt, ist die kurze elektrische Stimulation in der Lage, positiv auf die Regeneration nach peripherer Nervenverletzung einzuwirken. Dabei greifen ihre Effekte auf verschiedenen Ebenen der Nervenregeneration an. Sie beschleunigt signifikant die axonale Regeneration, fördert die Spezifität der Regeneration motorischer und sensibler Axone und kann Veränderungen der Erregbarkeit auf spinaler Ebene modulieren. Diese Eigenschaften werden Auswirkungen auf die Entwicklung klinisch brauchbarer Strategien haben, die das funktionelle Ergebnis nach peripherer Nervenverletzung zu verbessern versuchen.

Für die klinische Relevanz der kurzzeitigen niederfrequenten Elektrostimulation nach Nervenverletzung bleibt die Frage, ob sich die dargestellten positiven Effekte in einem verbesserten funktionellen Endergebnis widerspiegeln.

Einen Anhaltspunkt liefert eine aktuelle Studie an Mäusen, die zeigen konnte, dass eine einstündige elektrische Stimulation nach Nervendurchtrennung und –naht die Wiederherstellung der lokomotorischen Funktion beschleunigt. Das Maximum der erreichten Funktion wurde von der elektrisch stimulierten Gruppe wesentlich früher erlangt. Das funktionelle Endergebnis entsprach allerdings dem der nicht stimulierten Kontrollgruppe (AHLBORN et al., 2007).

Nagetiere wurden traditionell zu Studien über die Nervenregeneration verwendet, ohne direkten Nachweis einer Vergleichbarkeit ihrer Nervenregeneration mit der des Menschen. Unabhängige Untersuchungen haben hingegen große Ähnlichkeiten in

den Geschwindigkeitsraten der axonalen Regeneration und im prozentualen Anteil maximaler funktioneller Wiedererlangung festgestellt (ZIENOWICZ et al., 1991).

Allerdings ist die Regeneration im menschlichen peripheren Nervensystem im Vergleich zu den bei experimentellen Studien üblichen kleinen Versuchstieren wie Mäusen und Ratten durch die potentiell sehr langen Distanzen erschwert. Das Erreichen der Zielstrukturen durch die regenerierenden Axone erfordert oft Monate bis Jahre. Die Regenerationskapazität verletzter peripherer Nerven nimmt mit der benötigten Zeit und der erforderlichen Distanz ab (FENRICH und GORDON, 2004; GORDON et al., 2007). Als Ursachen für dieses progressive Versagen der Regeneration werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Dazu gehören die abnehmende Regenerationsfähigkeit chronisch axotomierter Neurone, die progressive Atrophie der Skelettmuskulatur und das fortschreitende Versagen chronisch denervierter Schwann-Zellen, die axonale Regeneration zu unterstützen. Als Hauptdeterminante bei diesem Prozess werden nach neueren Studien die Schwann-Zellen bezeichnet (GORDON et al., 2007).

Aufgrund dieser erschwerten Nervenregeneration könnten demzufolge Verfahren, die die Reinnervation beschleunigen, das funktionelle Endergebnis im Menschen zu einem größeren Ausmaß verbessern, als dies zurzeit im Tiermodell zu beobachten ist. Mit ihrer Fähigkeit, den Beginn der Regeneration durch Verkürzung des gestaffelten Prozesses zu beschleunigen, käme der Elektrostimulation hierbei eine wichtige Bedeutung zu. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es vorerst erst eine Studie, die die Wirkung niederfrequenter, einstündiger Elektrostimulation am Menschen direkt nach chirurgischer Versorgung untersucht. Die kurze, direkt postoperativ durchgeführte Elektrostimulation des N. medianus nach Dekompressionsoperation bei Karpaltunnelsyndrom zeigte in dieser Pilotstudie vielversprechende Ergebnisse in der frühen und vollständigen Reinnervation der Thenarmuskulatur (GORDON et al., 2010).

Ein weiterer potentiell klinisch wertvoller Effekt der elektrischen Stimulation nach peripherer Nervenverletzung sind die positiven Wirkungen auf die Regeneration im sensiblen Nervensystem (BRUSHART et al., 2005; GEREMIA et al., 2002; GEREMIA et al., 2007).

## 4.6 Zentrale Plastizität

Die Qualität der funktionellen Wiederherstellung nach einer peripheren Nervenverletzung hängt von mehreren Faktoren ab. Zu diesen gehören sowohl die erfolgreiche axonale Regeneration und die Genauigkeit der Reinnervation der Zielstrukturen als auch die Wiederherstellung passender Verknüpfungen auf spinaler Ebene und ihrer Vernetzung im Zentralen Nervensystem.

Dabei sind die Mechanismen, mit denen diese spinalen und zentralen Anpassungen erfolgen, sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht. Neben den günstigen funktionellen Anpassungsvorgängen erfolgt auch eine Positivsymptomatik mit Hyperreflexie, Hyperalgesie und Dysästhesie, die das klinische Bild des Patienten verschlechtert. Grundlage hierfür sind eine gesteigerte motorische Antwort auf spinaler Ebene und Veränderungen in den Primärafferenzen des Rückenmarks (NAVARRO et al., 2007).

Neben der Regenerationsmöglichkeit peripherer Axone und der Reinnervation der entsprechenden Zielstrukturen – durch die regenerierten Axone selbst oder durch kollaterale Verzweigungen benachbarter unverletzter Axone – sind Modifikationen und Neuordnungen im zentralen Nervensystem eine wichtige Möglichkeit zur Wiedererlangung der verlorenen peripheren Funktion (NAVARRO et al., 2007). Einiges spricht sogar dafür, dass diesen zentralnervösen Faktoren des kortikalen Remodellings hierbei eine Hauptrolle zukommt: Kinder bis zu einem Alter von zehn Jahren zeigen in der Regel eine ausgezeichnete funktionelle Wiedererlangung. Danach fallen die Ergebnisse steil ab (LUNDBORG und ROSEN, 2001). Diese Kapazitätskurve korreliert mit der altersabhängigen Fähigkeit der Kinder, eine Fremdsprache zu erlernen (LUNDBORG und ROSEN, 2001). Die hervorragende Lernfähigkeit des Gehirns in diesem Alter scheint auch die kortikalen Anpassungsvorgänge nach einer peripheren Nervenverletzung zu unterstützen. Ebenso hängt das funktionelle Endergebnis auch von der individuellen kognitiven Fähigkeit ab. Besonders für die verbale Lernfähigkeit und die visuell-räumliche Logik wurden Zusammenhänge mit der funktionellen Sensibilität nach Nervenverletzung nachgewiesen (ROSEN et al., 1994).

Lange Zeit wurde angenommen, dass im reifen Gehirn eines Erwachsenen die korrespondierenden Areale für bestimmte Körperregionen in der Großhirnrinde genau festgelegt und nicht reorganisierbar seien. In den letzten Jahrzehnten zeigte sich jedoch an klinischen Beobachtungen, dass auch das reife Gehirn eine bemerkenswerte Fähigkeit besitzt, Funktionsdefizite durch funktionelle Neuordnung zu kompensieren. Aus einer Verletzung im peripheren Nervensystem resultieren tief greifende Veränderungen im somatosensiblen Gebiet der Großhirnrinde, zum größten Teil aufgrund von Fehlleitung regenerierender Axone (LUNDBORG und ROSEN, 2007). Die zuvor präzise geordnete somatotopische Gliederung verändert sich so zu einem mosaikartigen Muster (WALL et al., 1986). Die Auswirkungen dieser Fehlinnervationen und der neuen kortikalen Kartographie stellen hohe Lernansprüche an das Gehirn. Bei einem verletzten Nerven der Hand zum Beispiel muss das Gehirn dementsprechend die sensiblen Afferenzen völlig neu erlernen und zuordnen, bis die Hand wieder als vollwertiges Sinnesorgan zur Verfügung steht. Zur Unterstützung dieses Lernprozesses ist eine komplexe Rehabilitation notwendig. Dies erfordert die Entwicklung neuer klinisch brauchbarer Lern- und Übungsstrategien (siehe beispielsweise LUNDBORG und ROSEN, 2007).

## 4.7 Schlussfolgerungen

Trotz kontinuierlicher Verbesserung in Theorie und Praxis stellen periphere Nervenverletzungen weiterhin eine bedeutende Ursache anhaltender Morbidität dar. Zahlreiche Parameter beeinflussen die Nervenregeneration im peripheren Nervensystem. Um eine optimale funktionelle Wiederherstellung auch nach einer schweren proximalen Verletzung zu erreichen, scheint eine Manipulation all dieser Faktoren notwendig zu sein. Dies erfordert auf Nerven Ebene eine rechtzeitige präzise mikrochirurgische Versorgung, die eine genaue Ausrichtung der Faszikelstruktur berücksichtigt. Eine drastische Weiterentwicklung der jetzt verwendeten Nahttechniken ist hierbei allerdings nicht zu erwarten. Mit unseren Untersuchungen anhand eines transgenen Mausmodells konnten wir zudem zeigen, dass die chirurgische Reparatur durch die Morphologie der axonalen Regeneration an ihre Grenzen stößt. Durch Expression eines fluoreszierenden Proteins in einem Teil der Axone konnte die Reinnervation nach Nerven transplantation auf Ebene der einzelnen Axone veranschaulicht werden. Auch bei optimaler Ausrichtung der Nervenstümpfe vollführten die regenerierenden Axone auf ihrem Weg durch den Reparaturspalt fast regelmäßig eine Auslenkung nach lateral, bildeten zahlreiche Kollateralen aus und betraten mit diesen oft weit voneinander entfernte Schwann-Scheiden des distalen Nervenstumpfs. Der Umfang der seitlichen Auslenkung war unseren Beobachtungen zufolge unabhängig von der Spaltbreite. Auch bei optimaler chirurgischer Versorgung ist daher zumindest bei Verletzungen, die eine Durchtrennung der Hüllstrukturen aufweisen und deren Nerven Axone zu unterschiedlichen Zielorganen enthalten, nur ein eingeschränktes funktionelles Ergebnis zu erwarten.

Eine Optimierung des Regenerationsprozesses wäre allerdings durch Veränderungen der axonalen Mikroumgebung denkbar. So beispielsweise durch den therapeutischen Einsatz von Wachstumsfaktoren oder indirekt durch elektrische Nervenstimulation. Unsere Untersuchungen zeigten eine gesteigerte Anzahl regenerierender Axone im distalen Nervenstumpf nach einstündiger, intraoperativer elektrischer Nervenstimulation mit 20 Hz. Dieser Anstieg stellte sich als Kombination sowohl einer vermehrten Rekrutierung von Axonen, die von proximal aussprossen,



als auch eines gesteigerten Verzweigungsverhaltens der Axone dar. Eine Steigerung der axonalen Wachstumsgeschwindigkeit konnte nicht beobachtet werden, hingegen eine beträchtliche Komprimierung des gestaffelten Regenerationsprozesses.

Dieser Anstoß der Regeneration deutet den potentiellen Nutzen der elektrischen Nervenstimulation als klinisches Hilfsmittel an. Für ein optimales Ergebnis wird ein kombiniertes Vorgehen notwendig sein: mit einer „Starthilfe“, wie beispielsweise der elektrischen Stimulation, gefolgt von Verfahren, die sich an das Neuron und die Wachstumskolben richten, um die Regeneration zu beschleunigen, an die distalen Leitbahnen, um die Ansprechbarkeit denervierter Schwann-Zellen zu erhalten, und an die Endorgane, um deren Nutzbarkeit zu erhalten.

## 5 Zusammenfassung

Die funktionelle Wiederherstellung nach Verletzung eines peripheren Nervs ist trotz optimaler chirurgischer Versorgung oft ungenügend. Eine mögliche Erklärung für dieses Versagen der funktionellen Regeneration ist in der Morphologie der axonalen Regeneration zu suchen.

Durch die Entwicklung transgener Mäuse, die fluoreszierende Proteine in einem Teil ihrer Axone exprimieren, sind wir in der Lage, die Antwort regenerierender Axone auf Nervendurchtrennung und –naht auf Ebene der individuellen Einzelstrukturen verfolgen zu können. Mäuse, die ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) in einem Teil ihrer Axone exprimieren, erhielten nach bilateraler Durchtrennung des N. ischiadicus entsprechende Transplantate aus Wildtyp-Mäusen. Die zu beobachtende Fluoreszenz im distalen Nervenstumpf entsprach somit sicher dem Einwachsen regenerierender Axone von proximal. Fünf oder sieben Tage nach der Transplantation wurden die Nerven entnommen.

Unseren Beobachtungen zufolge ist Regeneration ein gestaffelter Prozess, nur 25 % der Axone hatten die Reparaturstelle nach einer Woche durchquert. Viele Axone verzweigten sich auf ihrem Weg durch den Reparaturspalt, aber auch noch weit im distalen Stumpf und konnten so mit zahlreichen distalen Regenerationswegen interagieren. Eine Vielzahl an Axonen vollführte auf ihrem Weg durch den Reparaturspalt eine laterale Auslenkung, die sich als unabhängig von der Spaltbreite darstellte. Diese morphologischen Eigenschaften axonaler Regeneration können das Versagen präziser chirurgischer Verfahren bei der Wiedererlangung einer Normalfunktion nach Nervenverletzung erklären. Das seitliche Wandern der Axone unterliegt keiner chirurgischen Steuerbarkeit und erfordert andere Herangehensweisen, um die verletzten Axone mit geeigneten distalen Wegen zu verknüpfen.

Zahlreiche Studien der letzten Jahrzehnte deuten eine positive Beeinflussung der axonalen Regeneration durch elektrische Stimulation an. Um diesen potentiellen Einfluss auf das individuelle Regenerationsverhalten der Axone zu untersuchen, erhielt in unserem Versuch eine Gruppe der Mäuse intraoperativ eine einseitige einstündige elektrische Stimulation mit 20 Hz. Es zeigte sich ein Anstieg der Anzahl

regenerierender Axone zum frühen Zeitpunkt der Regeneration sowohl durch Rekrutierung von mehr Axonen, die den Reparaturspalt durchqueren, als auch durch eine gesteigerte Verzweigungsaktivität. Durch eine Komprimierung des gestaffelten Regenerationsprozesses wird die Reinnervation des distalen Stumpfs gefördert ohne die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone zu verändern. Dieser Anstoß der Regeneration deutet den potentiellen Nutzen der elektrischen Nervenstimulation als klinisches Hilfsmittel an. Für ein optimales Ergebnis wird ein kombiniertes Vorgehen notwendig sein: mit einer „Starthilfe“, wie beispielsweise der elektrischen Stimulation, gefolgt von Verfahren, die sich an das Neuron und die Wachstumskolben richten, um die Regeneration zu beschleunigen, an die distalen Leitbahnen, um die Ansprechbarkeit denervierter Schwann-Zellen zu erhalten, und an die Endorgane, um deren Nutzbarkeit zu erhalten.

## Literaturverzeichnis

- AHLBORN P, SCHACHNER M, IRINTCHEV A. 2007. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Exp Neurol* 208, 137-144.
- AKASSOGLU K, AKPINAR P, MURRAY S, STRICKLAND S. 2003. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. *Neurosci Lett* 338, 185-188.
- AL-MAJED AA, NEUMANN CM, BRUSHART TM, GORDON T. 2000a. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci* 20, 2602-2608.
- AL-MAJED AA, BRUSHART TM, GORDON T. 2000b. Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* 12, 4381-4390.
- AL-MAJED AA, TAM SL, GORDON T. 2004. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cell Mol Neurobiol* 24, 379-402.
- ALOVSKAYA A, ALEKSEEVA T, PHILLIPS JB, KING V, BROWN R. 2007. Fibronectin, Collagen, Fibrin - Components of Extracellular Matrix for Nerve Regeneration. *Topics of tissue Engineering* 3.
- ANDRES-BARQUIN PJ. 2001. Ramon y Cajal: a century after the publication of his masterpiece. *Endeavour* 25, 13-17.
- ASENSIO-PINILLA E, UDINA E, JARAMILLO J, NAVARRO X. 2009. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 219, 258-265.
- ASHLEY-ROSS MA, GILLIS GB. 2002. A Brief History of Vertebrate Functional Morphology. *Integr. Comp. Biol.* 42, 183-189.
- BAICHWAL RR, BIGBEE JW, DEVRIES GH. 1988. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1701-1705.
- BASMAJIAN JV, DE LUCA CJ. 1985. *Muscles alive: Their functions revealed by electromyography*. 5th, Williams and Wilkins, Baltimore
- BENEKE K. 1999. Emil Heinrich du Bois-Reymond. In: *Biographien und wissenschaftliche Lebensläufe von Kolloidwissenschaftlern, deren Lebensdaten mit 1996 in Verbindung stehen. Beiträge zur Geschichte der Kolloidwissenschaften. Mitteilungen der Kolloid-Gesellschaft. VIII.* Verlag Reinhard Knof, Nehnten, 92-105.

- BERNSTEIN J. 1902. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere. Pflüger EFW (Hrsg.) 92, 521.
- BLACK MM, LASEK RJ. 1979. Slowing of the rate of axonal regeneration during growth and maturation. Exp Neurol 63, 108-119.
- BODINE-FOWLER SC, MEYER RS, MOSKOVITZ A, ABRAMS R, BOTTE MJ. 1997. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques. Muscle Nerve 20, 29-37.
- BOPPART SA, BOUMA BE, PITRIS C et al. 1998. Intraoperative assessment of microsurgery with three-dimensional optical coherence tomography. Radiology 208, 81-86.
- BOYD JG, GORDON T. 2003. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. Mol Neurobiol 27, 277-324.
- BROWN MC, IRONTON R. 1978. Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles. J Physiol 278, 325-348.
- BRUSHART TM, MESULAM MM. 1980. Alteration in connections between muscle and anterior horn motoneurons after peripheral nerve repair. Science 208, 603-605.
- BRUSHART TM. 1988. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. J Neurosci 8, 1026-1031.
- BRUSHART TM. 1990. Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study. Restor Neurol Neurosci 1, 281-287.
- BRUSHART TM. 1991. The mechanical and humoral control of specificity in nerve repair. In: Gelberman R, H. (Hrsg.), Operative nerve repair and reconstruction. J.B. Lippincott, Philadelphia, 215-230.
- BRUSHART TM. 1993. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. J Neurosci 13, 2730-2738.
- BRUSHART TM, GERBER J, KESSENS P, CHEN YG, ROYALL RM. 1998a. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. J Neurosci 18, 8674-8681.
- BRUSHART TM. 1998b. Nerve repair and grafting. In: Green D, Hotchkiss R, Pederson W (Hrsg.), Green's operative hand surgery. Churchill Livingstone, New York, 1381-1403.
- BRUSHART TM, HOFFMAN PN, ROYALL RM et al. 2002. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. J Neurosci 22, 6631-6638.

- BRUSHART TM, JARI R, VERGE V, ROHDE C, GORDON T. 2005. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Exp Neurol* 194, 221-229.
- BURNETT MG, ZAGER EL. 2004. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 16, E1.
- CAMPANA WM. 2007. Schwann cells: Activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 522-527.
- CAMPBELL EDR. 1973. The Achievement of Duchenne. *Proc R Soc Med* 66, 18-22.
- CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- CHALFIE M. 1995. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* 62, 651-656.
- CZECH G, GALLEGOS R, KUDO N, KUNO M. 1978. Evidence for the maintenance of motoneurone properties by muscle activity. *J Physiol* 281, 239-252.
- DANIELSEN N, LUNDBORG G, FRIZELL M. 1986. Nerve repair and axonal transport: outgrowth delay and regeneration rate after transection and repair of rabbit hypoglossal nerve. *Brain Res* 376, 125-132.
- DE MEDINACELI L, SEABER AV. 1989. Experimental nerve reconnection: importance of initial repair. *Microsurgery* 10, 56-70.
- DEZAWA M. 2000. The interaction and adhesive mechanisms between axon and Schwann cell during central and peripheral nerve regeneration. *Kaibogaku Zasshi* 75, 255-265.
- DU BOIS-REYMOND EH. 1849. Untersuchungen über thierische Elektrizität. Band 2,1. Georg Reimer, Berlin.
- DUCHENNE DE BOULOGNE GB. 1855. De l'électrisation localisée et de son application à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique ; Accompagnée de 100 figures intercalées dans le texte / par le docteur Duchenne de Boulogne. Baillière, Paris.
- DUCHENNE DE BOULOGNE GB. 1860. Die örtliche Anwendung der Elektrizität in der Physiologie, Pathologie und Therapie: mit 68 eingedr. Holzschnitten. bearbeitet von Erdmann BA, 3. Aufl., Joh. Ambr. Barth, Leipzig. 295.
- EDEL H. 1991. Fibel der Elektrodiagnostik und Elektrotherapie. 6. Auflage. Verlag Gesundheit, Berlin.

- ENGLISH A, MULLIGAN A, SCHWARTZ G. 2005. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhancing autocrine/paracrine neurotrophin signaling. Soc Neurosci Abstr Program No. 29.11.2005.
- ENGLISH AW. 2003. Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. J Neurocytol 32, 943-960.
- ENGLISH AW, SCHWARTZ G, MEADOR W, SABATIER MJ, MULLIGAN A. 2007. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. Dev Neurobiol 67, 158-172.
- EVANS DH, MURRAY JG. 1956. A study of regeneration in a motor nerve with a unimodal fiber diameter distribution. Anat Rec 126, 311-333.
- FANSA H, KEILHOFF G. 2003. Faktoren, die die Regeneration peripherer Nerven beeinflussen. Handchir Mikrochir Plast Chir 35, 72-82.
- FAWCETT JW, KEYNES RJ. 1990. Peripheral Nerve Regeneration. Annual Review of Neuroscience 13, 43-60.
- FAWCETT JW. 1992. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. Trends Neurosci 15, 5-8.
- FENG G, MELLOR RH, BERNSTEIN M et al. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. Neuron 28, 41-51.
- FENRICH K, GORDON T. 2004. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. Can J Neurol Sci 31, 142-156.
- FORMAN DS, BERENBERG RA. 1978. Regeneration of motor axons in the rat sciatic nerve studied by labeling with axonally transported radioactive proteins. Brain Res 156, 213-225.
- FORMAN DS, WOOD DK, DESILVA S. 1979. Rate of regeneration of sensory axons in transected rat sciatic nerve repaired with epineurial sutures. J Neurol Sci 44, 55-59.
- FRIEDE RL, BISCHHAUSEN R. 1980. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections. J Neurol Sci 44, 181-203.
- FU SY, GORDON T. 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. Mol Neurobiol 14, 67-116.

- FUGLEHOLM K, SCHMALBRUCH H, KRARUP C. 1994. Early peripheral nerve regeneration after crushing, sectioning, and freeze studied by implanted electrodes in the cat. *J Neurosci* 14, 2659-2673.
- GEDDES LA, HOFF HE. 1971. The discovery of bioelectricity and current electricity (The Galvani-Volta controversy). *IEEE Spectrum* 8, 38-46.
- GEREMIA NM, GORDON T, AL-MAJED AA, BRUSHART TM, VERGE VM. 2002. Brief electrical stimulation promotes regeneration of sensory fibers into cutaneous and muscle branches of femoral nerve. *NsciAbst.* 535.
- GEREMIA NM, GORDON T, BRUSHART TM, AL-MAJED AA, VERGE VM. 2007. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol* 205, 347-359.
- GEREN BB, SCHMITT FO. 1954. The Structure of the Schwann Cell and Its Relation to the Axon in Certain Invertebrate Nerve Fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 863-870.
- GERNET R. 2000. Unter Strom. Zur Geschichte der Elektrotherapie. Ausstellung vom 16. November 2000 bis 4. März 2001 im Deutschen Medizinhistorischen Museum Ingolstadt. Habrich C, Deutsches Medizinhistorisches Museum, Ingolstadt, 1-99.
- GOLDBERG DJ, SCHACHER S. 1987. Differential growth of the branches of a regenerating bifurcate axon is associated with differential axonal transport of organelles. *Dev Biol* 124, 35-40.
- GORDON JW, CHESA PG, NISHIMURA H et al. 1987. Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell* 50, 445-452.
- GORDON T, BRUSHART TM, AMIRJANI N, CHAN KM. 2007. The potential of electrical stimulation to promote functional recovery after peripheral nerve injury--comparisons between rats and humans. *Acta Neurochir Suppl* 100, 3-11.
- GORDON T, AMIRJANI N, EDWARDS DC, CHAN KM. 2010. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Exp Neurol* 223, 192-202.
- GRANT GA, GOODKIN R, KLIOT M. 1999. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery* 44, 825-839; discussion 839-840.
- GUTMANN E, GUTTMANN L, MEDAWAR PB, YOUNG JZ. 1942. The rate of regeneration of nerve. *The Journal of experimental biology* 19, 14-44.
- HAMBURGER V. 1980. S. Ramon y Cajal, R. G. Harrison, and the beginnings of neuroembryology. *Perspect Biol Med* 23, 600-616.



- HEATH CA, RUTKOWSKI GE. 1998. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends Biotechnol* 16, 163-168.
- HEUMANN R, LINDHOLM D, BANDTLOW C et al. 1987. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8735-8739.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500-544.
- JABALEY ME. 1991. Electrical nerve stimulation in the awake patient. In: Gelberman R, H. (Hrsg.), *Operative nerve repair and reconstruction*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 241-257.
- JAY V. 2002. Augustus Volney Waller. *Arch Pathol Lab Med* 126, 1018-1019.
- JONES LL, SAJED D, TUSZYNSKI MH. 2003. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci* 23, 9276-9288.
- KALBERMATTEN DF, KINGHAM PJ, MAHAY D et al. 2008. Fibrin matrix for suspension of regenerative cells in an artificial nerve conduit. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61, 669-675.
- KERN H, SALMONS S, MAYR W, ROSSINI K, CARRARO U. 2005. Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle Nerve* 31, 98-101.
- KIRSCH W. 1984. Ramon y Cajal's Lebenswerk im Wandel der Wertung. Ein Beitrag aus Anlaß der 50. Wiederkehr seines Todestages. *Z Mikrosk Anat Forsch* 98, 641-658.
- KLINE DG, HACKETT ER, MAY PR. 1969. Evaluation of nerve injuries by evoked potentials and electromyography. *J Neurosurg* 31, 128-136.
- KOERBER HR, SEYMOUR AW, MENDELL LM. 1989. Mismatches between peripheral receptor type and central projections after peripheral nerve regeneration. *Neurosci Lett* 99, 67-72.
- KOSINSKI CM. 2004. Theodor Schwann (1810-1882). *Nervenarzt* 75, 1248.
- KRARUP C, ARCHIBALD SJ, MADISON RD. 2002. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol* 51, 69-81.

- KREKOSKI CA, NEUBAUER D, ZUO J, MUIR D. 2001. Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 21, 6206-6213.
- KRÜCKE W. 1974. Pathologie der peripheren Nerven. In: Olivecrona H, Tönnis W, Krenkel W (Hrsg.), *Handbuch der Neurochirurgie VII/3 Peripheres und sympathisches Nervensystem*. 1. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 56-151.
- KRUGER DH, SCHNECK P, GELDERBLUM HR. 2000. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *Lancet* 355, 1713-1717.
- LANGLEY JN, HASHIMOTO M. 1917. On the suture of separate nerve bundles in a nerve trunk and on internal nerve plexuses. *J Physiol* 51, 318-346.
- LEBLANC AC, PODUSLO JF. 1990. Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. *J Neurosci Res* 26, 317-326.
- LIU HM, YANG LH, YANG YJ. 1995. Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 487-496.
- LOEB GE, MARKS WB, HOFFER JA. 1987. Cat hindlimb motoneurons during locomotion. IV. Participation in cutaneous reflexes. *J Neurophysiol* 57, 563-573.
- LOEWY AD. 1971. Ramon y Cajal and methods of neuroanatomical research. *Perspect Biol Med* 15, 7-36.
- LUNDBORG G. 2000. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]* 25, 391-414.
- LUNDBORG G, ROSEN B. 2001. Sensory relearning after nerve repair. *Lancet* 358, 809-810.
- LUNDBORG G, ROSEN B. 2007. Hand function after nerve repair. *Acta Physiol (Oxf)* 189, 207-217.
- MACKINNON SE, DELLON AL, O'BRIEN JP. 1991. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve* 14, 1116-1122.
- MANIVANNAN S, TERAKAWA S. 1994. Rapid sprouting of filopodia in nerve terminals of chromaffin cells, PC12 cells, and dorsal root neurons induced by electrical stimulation. *J Neurosci* 14, 5917-5928.
- MANTHORPE M, ENGVALL E, RUOSLAHTI E et al. 1983. Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J Cell Biol* 97, 1882-1890.

- MCQUARRIE IG. 1985. Effect of conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of Ranvier. *J Comp Neurol* 231, 239-249.
- MEARS S, SCHACHNER M, BRUSHART TM. 2003. Antibodies to myelin-associated glycoprotein accelerate preferential motor reinnervation. *J Peripher Nerv Syst* 8, 91-99.
- MERLE M. 1997. Nervenverletzungen. In: Merle M, Dautel G, Rehart S (Hrsg.), *Chirurgie der Hand: in zwei Bänden. Bd.1 Der Notfall*. Thieme, Stuttgart, New York, 227-240.
- MILLES I H. 1985. Technik der Nerven naht und Nerven transplantation. In: Buck-Gramcko D, Nigst H (Hrsg.), *Basler Handchirurgische Arbeitstagung <7, 1982> : Nervenwiederherstellung nach traumatischen Läsionen : Bericht der VII. Basler Handchirurgischen Arbeitstagung ; [1982 ; mit 7 Tabellen]*. 1.Aufl. Hippokrates-Verlag, Stuttgart, 26-36.
- MILLES I H. 1992. *Chirurgie der peripheren Nerven*. Urban und Schwarzenberg, München; Wien; Baltimore.
- MORRIS JH, HUDSON AR, WEDDELL G. 1972a. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124, 103-130.
- MORRIS JH, HUDSON AR, WEDDELL G. 1972b. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. 3. Changes in the axons of the proximal stump. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124, 131-164.
- MUMENTHALER M, STÖHR M, MÜLLER-VAHL H et al. 2007. *Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome*. Mumenthaler M, Stöhr M, Müller-Vahl H, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- NAVARRO X, VIVO M, VALERO-CABRE A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82, 163-201.
- NGUYEN QT, SANES JR, LICHTMAN JW. 2002. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 5, 861-867.
- NIX WA, HOPF HC. 1983. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res* 272, 21-25.
- NIX WA. 1991. *Der periphere Nerv: Funktion und Verletzungen, Diagnostik und Therapie*. 2. Aufl. Einhorn-Press-Verlag, Reinbek.
- NYLEN CO. 1972. The otomicroscope and microsurgery 1921-1971. *Acta Otolaryngol* 73, 453-454.

- PATERNOSTRO-SLUGA T, RAKOS M, HOFER C et al. 2002. EMG-getriggerte Elektrostimulation chronischer Armplexusparesen - eine Pilotstudie. *Phys Rehab Kur Med* 12, 203-207.
- PESTRONK A, DRACHMAN DB, GRIFFIN JW. 1980. Effects of aging on nerve sprouting and regeneration. *Exp Neurol* 70, 65-82.
- POCKETT S, GAVIN RM. 1985. Acceleration of peripheral nerve regeneration after crush injury in rat. *Neurosci Lett* 59, 221-224.
- QIU J, CAI D, DAI H et al. 2002. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34, 895-903.
- RAMON Y CAJAL S. 1928. Degeneration and regeneration of the nervous system. DeFelipe J, Jones EG, Oxford University Press, New York.
- REMAK R. 1858. Galvanotherapie der Nerven- und Muskelkrankheiten. Verlag von August Hirschwald, Berlin.
- RILEY DA, LANG DH. 1984. Carbonic anhydrase activity of human peripheral nerves: a possible histochemical aid to nerve repair. *J Hand Surg [Am]* 9A, 112-120.
- ROBINSON GA, MADISON RD. 2003. Preferential motor reinnervation in the mouse: comparison of femoral nerve repair using a fibrin sealant or suture. *Muscle Nerve* 28, 227-231.
- ROSBERG HE, CARLSSON KS, HOJGARD S et al. 2005. Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm--analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. *J Hand Surg [Br]* 30, 35-39.
- ROSEN B, LUNDBORG G, DAHLIN LB, HOLMBERG J, KARLSON B. 1994. Nerve repair: correlation of restitution of functional sensibility with specific cognitive capacities. *J Hand Surg [Br]* 19, 452-458.
- ROTHSCHUH KE. 1964. Emil du Bois-Reymond und die Elektrophysiologie der Nerven. In: Rothschuh KE (Hrsg.), Von Boerhaave bis Berger. Die Entwicklung der kontinentalen Physiologie im 18. und 19. Jahrhundert mit besonderer Berücksichtigung der Neurophysiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 85-105.
- ROWSHAN K, JONES NF, GUPTA R. 2004. Current surgical techniques of peripheral nerve repair. *Operative Techniques in Orthopaedics* 14, 163-170.
- RUSHTON DN. 1997. Functional electrical stimulation. *Physiol Meas* 18, 241-275.
- SAARMA M, SARIOLA H. 1999. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 45, 292-302.

- SABBATINI RME. 1998. The discovery of bioelectricity. *Brain & Mind Magazine: Electronic magazine on neuroscience.* 2(6): [http://www.cerebromente.org.br/n06/historia/bioelectr\\_i.htm](http://www.cerebromente.org.br/n06/historia/bioelectr_i.htm)
- SAFFRAN BN, CRUTCHER KA. 1990. NGF-induced remodeling of mature uninjured axon collaterals. *Brain Res* 525, 11-20.
- SCHACHER S. 1985. Differential synapse formation and neurite outgrowth at two branches of the metacerebral cell of *Aplysia* in dissociated cell culture. *J Neurosci* 5, 2028-2034.
- SCHERER SS, ARROYO EJ. 2002. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst* 7, 1-12.
- SCHMUED LC, FALLON JH. 1986. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377, 147-154.
- SEBILLE A, BONDOUX-JAHAN M. 1980. Effects of electric stimulation and previous nerve injury on motor function recovery in rats. *Brain Res* 193, 562-565.
- SEDDON HJ, MEDAWAR PB, SMITH H. 1943a. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol* 102, 191-215.
- SEDDON HJ. 1943b. Three types of nerve injury. *Brain* 66, 237-288.
- SHAWE GD. 1955. On the number of branches formed by regenerating nerve-fibres. *Br J Surg* 42, 474-488.
- SHEFFLER LR, CHAE J. 2007. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation. *Muscle Nerve* 35, 562-590.
- SIMOVA O, IRINTCHEV A, MEHANNA A et al. 2006. Carbohydrate mimics promote functional recovery after peripheral nerve repair. *Ann Neurol* 60, 430-437.
- SMALHEISER NR, CRAIN SM. 1984. The possible role of "sibling neurite bias" in the coordination of neurite extension, branching, and survival. *J Neurobiol* 15, 517-529.
- SNIDER WD, HARRIS GL. 1979. A physiological correlate of disuse-induced sprouting at the neuromuscular junction. *Nature* 281, 69-71.
- STENOIEN DL, BRADY ST. 1999. Axonal Transport. In: Siegel G, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (Hrsg.), *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Part Four. Growth, Development and Differentiation.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.

- STEWART JD. 2003. Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve* 28, 525-541.
- STOLL G, GRIFFIN JW, LI CY, TRAPP BD. 1989b. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18, 671-683.
- STOLL G, MÜLLER HW. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-325.
- STOLL G, JANDER S, MYERS RR. 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 7, 13-27.
- SUNDERLAND S. 1951. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74, 491-516.
- SUNDERLAND S, MARSHALL RD, SWANEY WE. 1959. The intraneural topography of the circumflex, musculocutaneous and obturator nerves. *Brain* 82, 116-129.
- SUNDERLAND S. 1965. The connective tissues of peripheral nerves. *Brain* 88, 841-854.
- TESSIER-LAVIGNE M, GOODMAN CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- VIVÓ M, PUIGDEMASA A, CASALS L et al. 2008. Immediate electrical stimulation enhances regeneration and reinnervation and modulates spinal plastic changes after sciatic nerve injury and repair. *Experimental Neurology* 211, 180-193.
- VON BARTHELD CS. 2004. Axonal transport and neuronal transcytosis of trophic factors, tracers, and pathogens. *J Neurobiol* 58, 295-314.
- VON BÜNGNER O. 1890. Ueber die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia docendi der Hohen medicinischen Fakultät der königlichen Universität Marburg. Gustav Fischer, Jena.
- VON HELMHOLTZ H. 1850. Vorläufiger Bericht über die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Nervenreizung. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*. Hrsg. Johannes Müller, 71-73.
- WALL JT, KAAS JH, SUR M et al. 1986. Functional reorganization in somatosensory cortical areas 3b and 1 of adult monkeys after median nerve repair: possible relationships to sensory recovery in humans. *J Neurosci* 6, 218-233.

- WALLER A. 1850. Experiments on the sections of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 140, 423-429.
- WILLIAMS HB, TERZIS JK. 1976. Single fascicular recordings: an intraoperative diagnostic tool for the management of peripheral nerve lesions. *Plast Reconstr Surg* 57, 562-569.
- WILLIAMS HB. 1996a. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. *Microsurgery* 17, 589 - 596.
- WILLIAMS HB. 1996b. A clinical pilot study to assess functional return following continuous muscle stimulation after nerve injury and repair in the upper extremity using a completely implantable electrical system. *Microsurgery* 17, 597 - 605.
- WITZEL C, ROHDE C, BRUSHART TM. 2005. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* 485, 183-190.
- WWW.ZEISS.DE/CHIRURGIE. 2003. Innovationen für die Gesundheit. 50 Jahre Operationsmikroskope von Carl Zeiss. *Innovation* 13, 4-9.
- ZIENOWICZ RJ, THOMAS BA, KURTZ WH, ORGEL MG. 1991. A multivariate approach to the treatment of peripheral nerve transection injury: the role of electromagnetic field therapy. *Plast Reconstr Surg* 87, 122-129.
- ZUO J, NEUBAUER D, GRAHAM J et al. 2002. Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Neurol* 176, 221-228.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>d.h.</b>	das heißt
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>cAMP</b>	cyclic adenosine monophosphate
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>FES</b>	funktionelle elektrische Nervenstimulation
<b>GDNF</b>	glial cell-derived neurotrophic factor
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IGF-I/II</b>	insulin-like growth factor-I/II
<b>kHz</b>	Kilohertz
<b>MAG</b>	myelin-associated glycoprotein
<b>mm</b>	Millimeter
<b>n</b>	Anzahl
<b>N.</b>	Nervus
<b>NGF</b>	nerve growth factor
<b>NT-3</b>	Neurotrophin-3
<b>NT-4/5</b>	Neurotrophin-4/5
<b>p</b>	p-value
<b>PNS</b>	periphere Nervenstimulation
<b>s.</b>	siehe



---

<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>SCS</b>	spinal cord stimulator
<b>SNS</b>	subkutane Nervenstimulation
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TENS</b>	transcutaneous electrical nerve stimulation
<b>trkB</b>	tyrosine kinase receptor B
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>YFP</b>	yellow fluorescent protein
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem
<b>µm</b>	Mikrometer

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Schematische Darstellung einer markhaltigen Nervenfasern am Beispiel eines peripheren Motoneurons.	4
<b>Abb. 2</b>	Schematische Darstellung des Aufbaus eines peripheren Nervs.	5
<b>Abb. 3</b>	Schematische Darstellung der N. ischiadicus-Transplantation.	31
<b>Abb. 4</b>	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Verzweigung eines regenerierenden Axons bei Eintritt in den distalen Stumpf.	33
<b>Abb. 5</b>	100 µm dicker Längsschnitt einer Nervenreparatur fünf und zehn Tage nach Operation (x 10, Messbalken = 0,25 mm).	38
<b>Abb. 6</b>	Darstellung des unterschiedlichen Durchquerungsverhaltens regenerierender Axone durch den Reparaturspalt (x 40; Messbalken = 74 µm in a; 44 µm in b).	41
<b>Abb. 7</b>	Auswirkung der Breite des Spalts zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf auf das Regenerationsverhalten der Axone.	42
<b>Abb. 8</b>	Schematische Darstellung der Abtastkreise eines unverzweigten Axons und eines verzweigten Axons („sampling circle“).	44
<b>Abb. 9</b>	Auswirkung der Größe der Abtastkreise auf die Anzahl potentieller distaler Regenerationswege.	45
<b>Abb. 10</b>	Überlebenskurve des axonalen Auswachsens durch das Transplantat.	46
<b>Abb. 11</b>	Fortsetzung der axonalen Verzweigungen in den distalen Stumpf hinein.	47
<b>Abb. 12</b>	Axonale Regeneration 4 – 6 mm distal der Reparaturstelle (x 40; Messbalken = 20 µm).	48
<b>Abb. 13</b>	Überlebenskurve des Auswachsens regenerierender Axone durch das Transplantat nach elektrischer Nervenstimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe.	50
<b>Abb. 14</b>	Nicht-parametrischer Test der Anzahl regenerierender Axone in das Nerven­transplantat nach fünf Tagen.	51
<b>Abb. 15</b>	Nicht-parametrischer Test der Anzahl regenerierender Axone in das Transplantat nach sieben Tagen.	52

---

<b>Abb. 16</b>	Longitudinale Schnittbilder des N. ischiadicus fünf bzw. sieben Tage nach elektrischer Nervenstimulation.	53
<b>Abb. 17</b>	Crossing-Index.	54
<b>Abb. 18</b>	Fortführung des axonalen Verzweigens innerhalb des distalen Stumpfs nach elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe.	55
<b>Abb. 19</b>	Nicht-parametrischer Test der Anzahl der Verzweigungen innerhalb des Nerventransplantats nach fünf Tagen.	56
<b>Abb. 20</b>	Nicht-parametrischer Test der Anzahl der Verzweigungen innerhalb des Nerventransplantats nach sieben Tagen.	57
<b>Abb. 21</b>	Verzweigungsindex.	58

## **Danksagung**

Ich danke allen, die zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben. Einige seien hier besonders erwähnt.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Manfred Infanger, danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Für die hervorragende Betreuung gilt mein Dank Herrn Dr. med. Christian Witzel, unter dessen Anleitung diese Arbeit möglich wurde und der mir zu jeder Zeit freundschaftlich und mit Geduld zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der AG Witzel, insbesondere bei Herrn Dr. med. Georgios Koulaxouzidis, sowie bei den Mitarbeitern der Tierhaltung Garystraße für die stets freundliche Zusammenarbeit.

Meiner Familie, meinem Freund Dr. med. Daniel Bergenthal und meinen langjährigen medizinischen Weggefährtinnen Dr. med. Friederike Graz und Victoria Haberkorn gilt mein ganz besonderer Dank. Sie haben mich stets unterstützt und am Abschluss dieser Arbeit großen Anteil.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Friederike Fojuth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zur Morphologie der peripheren Nervenregeneration und zur Beeinflussung des axonalen Regenerationsverhaltens durch elektrische Nervenstimulation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 24. Juli 2010