

Aus dem
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin
Chirurgische Klinik
Campus Charité Mitte I Campus Virchow Klinikum
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johann Pratschke

Habilitationsschrift

Zur Morphologie axonaler Regeneration im peripheren Nerven - Das Verhalten regenerierender Axone in der frühen Phase nach traumatischer Nervenläsion an der Reparationsstelle und seine potentielle Beeinflussung

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Experimentelle Plastische Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Christian Witzel

Eingereicht:	Juli 2016
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel Radlach Pries
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Thomas Becker
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Thomas Volk

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund.....	1
1.2 Das Nervus-ischiadicus-Läsionsmodell der thy1 YFP-H-Maus	4
1.2.1 Etablierung des Tiermodells:	4
1.2.2 Nervenentnahme und histologische Aufbereitung:	5
1.2.3 Visualisierung und Auswertung.....	6
1.3 Ziel der Arbeit.....	8
2 Originalarbeiten	10
2.1 Die Wegfindung regenerierender peripherer Axone.	10
2.2 N-Propionylmannosamin fördert die axonale Elongation in einem Nervus-ischiadicus- Läsionsmodell der Maus.....	18
2.3 Die Verbesserung der frühen peripheren Nervenregeneration durch N-propionylmannosamin in Gegenwart der Polysialyltransferase ST8SIA2.....	26
2.4 Die topische Deaktivierung von Interleukin-6 verbessert die frühe periphere Nervenregeneration im Mausmodell.....	36
2.5 Fibrinkomponentenkleber führt zur verbesserten axonalen Elongation während der frühen peripheren Nervenregeneration im Mausmodell.	45
2.6 Elektrische Nervenstimulation erhöht das axonale Arborisierungsverhalten nach Nerventransplantation im Mausmodell ohne Einfluß auf die Regenerationsgeschwindigkeit...52	
3 Diskussion und Zukunftsperspektiven	60
4 Zusammenfassung	67
5 Literaturverzeichnis	68

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
BDNF	<i>engl.</i> Brain-derived neurotrophic factor
C57Bl6/J-Maus	<i>engl.</i> C57 Black 6 mouse aus dem Jackson Laboratory
ca.	circa
cm	Zentimeter
DRG	<i>engl.</i> Dorsal Root Ganglion
GAP-43	<i>engl.</i> Growth-associated protein 43
gp130	<i>engl.</i> Glycoprotein 130
IL-6	Interleukin-6
IL-6 ^{-/-} -Maus	Interleukin-6-Knock-out-Maus
IL-6R	membrangebundener Interleukin-6-Rezeptor
IL-6Rα	α-Untereinheit (CD126) des IL-6R + sIL-6R (s.u.)
ManNAc	N-Acetylmannosamin
ManNProp	N-Propionylmannosamin
mm	Millimeter
nm	Nanometer
N.	<i>lat.</i> Nervus
Nn.	<i>lat.</i> Nervi
NCAM	<i>engl.</i> Neural cell adhesion molecule
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Prop	N-Propionylneuraminsäure
o.g./u.g.	oben/unten genannt
PMR	<i>engl.</i> Preferential motor reinnervation
PSA	Polysialinsäure
Sia	Sialinsäure
sIL-6R	löslicher (<i>engl.</i> soluble) Interleukin-6-Rezeptor
sgp130	<i>engl.</i> soluble gp130 (s.o.)
TrkB	<i>engl.</i> Tyrosine receptor kinase B
u.a.	unter anderem
YFP	<i>engl.</i> Yellow fluorescent protein

1. Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Nur 10% der Erwachsenen erlangen nach Verletzung und mikrochirurgischer Naht eines peripheren Stammnerven wieder eine normale Funktion [1]. Häufig resultiert dies aus einer Fehlleitung regenerierender Axone zu falschen Endorganen [2]. Regenerierende Axone werden durch die Schwann'sche Zelle und ihre Basalmembran im peripheren Nerven geleitet. Bleibt diese Struktur nach Verletzung intakt, so können Axone mit einer großen Genauigkeit wieder ihre ursprünglichen Ziele erreichen [3]. Ist dieselbe Basalmembran durch eine Verletzung in ihrer Kontinuität zerstört, so ist diese Genauigkeit in der Axon-Endorgan-Zuordnung nicht mehr möglich. Richtige und falsche Projektionen sind das Ergebnis [4, 5]. Hierbei können efferente motorische Axone zu sensorischen Endorganen oder afferente Hautäste in Richtung motorische Endplatte regenerieren. Abhängig von der Ausprägung solcher Fehlleitungen resultiert dann eine Einschränkung bis hin zum vollständigen Verlust der ursprünglichen Funktion.

Die Weiterentwicklung der mikrochirurgischen Technik in den 1960er und 1970er Jahren erzeugte die Hoffnung, durch eine exakte Ausrichtung der neuralen Bestandteile während der Nervenkoaptation eine Verbesserung der funktionellen Ergebnisse zu erreichen. Es konnte zwar gezeigt werden, daß ein mikrochirurgisches Vorgehen dem makroskopischen überlegen ist [1], jedoch führte dies nicht zur gewünschten Überwindung der reduzierten Gesamtergebnisse nach Nervenverletzung [6]. Die Gründe für die eingeschränkten Resultate auch nach exakter mikrochirurgischer Nervenstumpfadaptation sind sehr heterogen. Eine exakte mikrochirurgische Nervenkoaptation alleine führt nicht zum gewünschten Ziel.

Erste detaillierte morphologische Untersuchungen zur axonalen Fehlleitung wurden durch Ramon y Cajal mit einer damals neuen Silberfärbemethode durchgeführt [7]. Hierbei hat er sehr eindrücklich Axone in ihrem lateralisierenden Verlauf auf der Schnittfläche des peripheren Nervenstumpfes beschrieben, die dann hier eine Schwann'sche Zelle penetrieren (Abbildung 1). Diese wichtigen Ergebnisse Cajals aus seinem Werk „Degeneration and Regeneration of the Nervous System“ [7] haben an Aktualität nicht verloren. Jedoch ließen damalige Techniken die Schlußfolgerungen nur auf Funktion einer Gruppe von sich unterschiedlich verhaltenden Axonen zu, nicht auf das individuelle Verhalten eines einzelnen Axons. Später entwickelte Techniken führten immer wieder zur Beschäftigung mit dieser Unzulänglichkeit, mit unterschiedlichem Erfolg. Auch wenn elektron-mikroskopische Untersuchungen zur Entdeckung verschiedenster ultrastruktureller Details führten [8-10], so blieb die Rekonstruktion gesamter Axone weiterhin unmöglich [11]. Trotz zum Beispiel neuer anterograder Anfärbemethoden [12, 13] und des immunhistochemischen Nachweises von wachstumsassoziierten Proteinen [14], die es ermöglichten, regenerierende Axone über eine lange Strecke zu visualisieren, war eine individuelle Unterscheidung axonaler Strukturen in der Unordnung der Reparationszone weiterhin unmöglich. Auch aus diesem Grunde bleibt gerade die Reparationszone mit der Schnittfläche des distalen Nervenstumpfes als Ort der Auswahl und des Eintauchens regenerierender Axone in eine Schwann'sche Zelle weiterhin Ziel genauerer morphologischer Untersuchungen.

Die Entwicklung von transgenen Mäusen, die fluoreszierende Proteine anteilig in ihren Axonen exprimieren, eröffnete neue Wege in der Erforschung des axonalen Verhaltens [3, 15]. Hierbei können individuelle Axone - in ihrem regenerierenden Verlauf die Reparationsstelle überquerend und in den distalen Nervenanteil hinein wachsend - verfolgt und beschrieben werden. Spezifische Charakteristika, wie zum Beispiel die laterale axonale Wanderung durch die Koaptationszone können somit exakt quantifiziert werden. Wir sind

nun in der Lage, Ramon y Cajals Schlußfolgerungen von der „Form zur Funktion“ auf dem Niveau eines einzelnen Axons anzuwenden. Hierüber soll das Verständnis über die Wahl der Wegfindung peripherer Axone verbessert werden.



Abbildung1:

Querschnitt eines N. ischiadicus einer Katze 72 Tage nach Nerven­trans­sek­tion und Koap­ta­tion mit proxima­lem Stumpf im o­ber­en und dista­lem Anteil im un­te­ren Bild­rand. Axo­nale Äste wan­dern von proximal (oben) zum distalen Stumpf (un­ten) und nach­dem sie sich arborisieren (verzweigen, verästeln), treten sie in oder neben eine Schwann'sche Zelle ein. Einmal eingetaucht, regenerieren sie in ihnen schnell entlang der Basalmembran weiter nach distal [7].

1.2 Das Nervus-ischiadicus-Läsionsmodell der thy1 YFP-H-Maus

1.2.1 *Etablierung des Tiermodells:*

Zur Visualisierung individueller Axone gerade auch in ihrem regenerativen Verlauf wurde das im Folgenden beschriebene Tiermodell entwickelt. Hierbei kam eine transgene Mauslinie zu Anwendung, in der ein gelb fluoreszierendes Protein (Yellow Fluorescent Protein – YFP) im axoplasmatischen Gewebe anteilig exprimiert wird ([15], thy1-YFP-H-Mauslinie). Sämtliche Untersuchungen erfolgten am Nervus ischiadicus dieser Mauslinie. Erste Versuche, bei denen eine Transsektion des Nerven mit anschließender Nervenkoaptation durchgeführt wurde, ließen nach einigen Tagen bei Nervenentnahme eine exakte Unterscheidung regenerierender Axone von Degenerations-assoziiertem Gewebe nicht sicher zu. Denn nicht nur regenerierende Axone, sondern auch die der Waller'schen Degeneration unterliegenden Gewebeanteile fluoreszierten. Aus diesem Grunde wurde das Modell um eine Nerven transplantation erweitert. Hierbei erfolgte nach Axotomie proximal der Trifurkation des Nervus ischiadicus die vollständige Resektion des distalen Nervenanteils. Das gleiche Procedere wurde in einer Geschwistermaus vom Wildtyp (C57Bl6) durchgeführt, wobei der resezierte Nervenanteil von ca. 1cm Länge als Gewebestück in die fluoreszierende YFP-Maus transplantiert und an den proximalen Nervenstumpf koaptiert wurde. Hierüber wurde sichergestellt, daß während der Auswertung detektierte Fluoreszenzen im distalen Nervenstumpf, also dem Transplantat, ausschließlich regenerativen Ursprung haben. Zur Vermeidung jeglicher Irritation des axonalen Gewebes erfolgte im Gegensatz zu einer direkten Nerven naht eine sogenannte Schienenkoaptation. Hierzu wurde aus einem 5 mm langen Silikonröhrchen (Dow Corning; innerer Durchmesser 0,020 inch) in Längsrichtung ca. 1/3 seiner Zirkumferenz herausgeschnitten. Das resultierende 2/3 - Röhrchen diente nun zur Schienung der Nervenkoaptation. Beide Nervenstümpfe wurden in die Schiene platziert, so daß deren Kontaktstelle sich nahezu in Schienenmitte befand. Nun wurden jeweilig an den Enden der Schiene epineurale

Haltenähte zu beiden Nervenanteilen gesetzt. Eine direkte Manipulation an den Nervenstümpfen konnte hierüber nahezu vollständig vermieden werden. Ein distaler Anschluß des Transplantates an die Wirtsmaus erfolgte bewußt nicht, um potentielle Einflüsse der unterschiedlichen „Endorgane“ auf die axonale Regeneration auszuschließen [16].

Die Öffnung des Röhrchens zu einem Drittel seiner Zirkumferenz erlaubte in weiteren Versuchssituationen zusätzlich die lokale Applikation von verschiedenen Substanzen [17-20].

1.2.2 Nervenentnahme und histologische Aufbereitung:

Die Entnahme der Nerven wurde nach 5 beziehungsweise 7 Tagen durchgeführt. Erste Untersuchungen von Nerven 10 Tage postoperativ ließen erkennen, daß zu diesem späteren Zeitpunkt einerseits über der Koaptationsstelle eine exakte Trennung von proximal zu distal nicht mehr sicher möglich war, andererseits zeigten einzelne Axone schon ein Auswachsen bis über das Ende des ca. 1cm langen Nerventransplantates hinaus. Somit war hier eine Auswertung hinsichtlich axonaler Regenerationsstrecke nicht mehr umfassend möglich. Aus diesem Grunde wurde eine Versuchsdauer bis maximal 7 Tage postoperativ gewählt und in die Untersuchungen und Auswertungen mit einbezogen. Vor der Fixierung der entnommenen Nerven in Paraformaldehydlösung (4%) erfolgte deren Aufspannen jeweilig auf einer kleinen Holzschiene. Ein Aufkringeln der Nerven konnte hierüber vermieden werden, was die Auswertung des axonalen Längenwachstums ermöglichte. Die sich anschließende Aufbereitung in 100 µm dicke Längsschnitte durch ein Mikrotom ermöglichte die histologische Anfärbung zur Visualisierung des Laminins als Bestandteil der Basalmembran einer jeden Schwann'schen Zelle (1. Antikörper: Sigma, St. Louis, MO; L9393, 1:250; 2. Antikörper: Alexa Fluor 568, Molecular Probes, Eugene, OR,

1:300). Die große Schnittdicke wurde bewußt gewählt, um möglichst viele der regenerierenden Axone innerhalb eines Schnittes evaluieren zu können, und die Anzahl derjenigen Axone zu reduzieren, die sich schnittübergreifend erstrecken. Ein Nervus ischiadicus ergab nur ungefähr 6 bis 7 Längsschnitte [16].

1.2.3 Visualisierung und Auswertung

Sämtliche Auswertungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Millimeter-Rasterokular (20-40x Vergrößerung, 568 und 488 nm Wellenlänge) durchgeführt. Die anteilige Fluoreszenz im axonalen Gewebe erlaubte eine detaillierte Verfolgung und Auswertung individuell regenerierender Axone. Um die Anzahl der Schwann'schen Zellen im Nervus ischiadicus zu bestimmen, wurden zunächst von 6 nicht operierten Mäusen die Nn. ischiadici entnommen und in Höhe der später durchzuführenden Wirt-Transplantat-Koaptation histologische Querschnitte angefertigt. In der hier genutzten YFP-H-Maus fluoresziert nur ein Teil der myelinisierenden Axone. Um deren Qualität (motorisch vs. sensorisch) herauszufinden, sind retrograde Anfärbungen mit Fluoro-Gold durchgeführt worden. Das lumbosakrale Rückenmark und die korrespondierenden DRGs wurden histologisch bei 40 µm geschnitten. Die Neurone mit einer Doppelfärbung von YFP und Fluoro-Gold gaben Hinweis auf die entsprechend axonalen Projektionen im N. ischiadicus [16].

Die Reparationsstelle war bis zu 7 Tage postoperativ zu einem gewissen Grad immer nachweisbar, selbst wenn die Nervenstümpfe während der Operation unter leichter Kompression standen. Um einen potentiellen Einfluß der Länge der Lücke auf eine axonale Fehlleitung zu überprüfen, untersuchten wir folgende Verhältnisse: Für individuell überquerende Axone setzten wir die Distanz beider Stümpfe in Relation zur Auslenkung des jeweiligen Axons vor seinem Eintauchen in eine Schwann'sche Zelle. Für sich verzweigende

Axone wurden Relationen der Distanz zum Durchmesser der maximalen Aufästelung hergestellt [16].

Individuelle und sich aufzweigende Axone treffen in zwei vollständig unterschiedlichen Weisen auf den distalen Nervenstumpf: Die laterale Wanderung individuell überquerender Axone auf der Schnittfläche des distalen Stumpfes kann über den Radius eines „Auswahlkreises“ definiert werden. Ein solches Axon ist somit in der Lage, eine Distanz von seiner Längsachse bis zum Erstkontakt mit dem distalen Stumpf vorbei an mehreren Schwann'schen Zellenden zu überwinden. Es ist anzunehmen, daß ihm möglich wäre, eine solche Entfernung in sämtliche Richtungen auf der Schnittfläche des distalen Nervenstumpfes zu wandern. Somit kann der Durchmesser des hierdurch entstehenden Kreises als Areal geschätzt werden, welches ein individuelles Axon „erkunden“ kann. Demgegenüber taucht ein sich aufzweigendes Axon mit seinen multiplen Ästen in mehrere distale Schwann'sche Zellen ein und beschreibt über die maximale Ausdehnung ebenso einen „Auswahlkreis“. An nicht operierten Nervenquerschnitten wurden „Auswahlkreise“ unterschiedlicher Größe gelegt und gezählt, wie viel Schwann'sche Zellenden sich jeweilig innerhalb der Kreise befinden. Hierüber war es nun möglich, innerhalb der Versuchsgruppen anhand der jeweilig gemessenen „Auswahlkreise“ die maximale Anzahl von Schwann'schen Zellen zu ermitteln, die ein jeweiliges individuelles respektive sich verzweigendes Axon auswählen kann [16].

Die erste Auszählung der Axone erfolgte im promimalen Stumpf des Nervus ischiadicus knapp proximal der Schnittfläche (Punkt -1), um die Axonzahl zu bestimmen, die überhaupt zur Regeneration zur Verfügung steht. Der nächste Ort der Auszählung war direkt an der Schnittfläche des distalen Nervensegmentes, also des Transplantates (Punkt 0). Nach jedem weiteren Millimeter distal im Transplantat (Punkt 1, Punkt 2, Punkt 3 etc.) wurden die gleichen Auszählungen der regenerierenden Axone durchgeführt. In den Abschnitten zwischen diesen Punkten (0-1, 1-2 etc.) wurden Arborisierungen detektiert und die

jeweiligen Aufzweigungen und Äste gezählt [16-22]. Um potentiell signifikante Unterschiede in den Zahlenreihen zu erkennen, sind die gewonnenen Ergebnisse dann statistischen Tests zugeführt worden.

Die Auswertungen fokussierten sich auf unterschiedliche morphologische Parameter. Über die Auszählung der regenerierenden Axone im distalen Nervenanteil konnte zum Beispiel eine Aussage über die jeweilige Regenerationsstrecke (Distanz) getroffen werden. Das Verhältnis der Zahl der Axone im proximalen Stumpf (Punkt -1) zu der am Anfang des Transplantates (Punkt 0) ergab den Anteil regenerierender Axone in jedem Nerven. Ob solch regenerierende Axone als individuelle Strukturen die Reparationszone durchwanderten und in eine distale Schwann'sche Zelle eintauchten oder vorher arborisierten, um mehrere Schwann'sche Zellen zu penetrieren, wurde für jeden Nerven bestimmt. Die hieraus berechneten Verhältnisse ergeben zusätzliche Hinweise auf das Regenerationsverhalten individueller Axone.

1.3 Ziel der Arbeit

Mit Hilfe des oben beschriebenen und etablierten Mausmodells soll eine detaillierte Beschreibung des axonalen Verhaltens in seiner frühen Regeneration nach Nerven-Transsektion und Transplantation durchgeführt werden. Hierüber sollen erstmalig individuelle Axone, in ihrem regenerativen Verlauf die Reparationszone überwindend und in den distalen Nervenanteil eintauchend, beobachtet werden können. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die unterschiedliche Art und Weise des Auftreffens auf den distalen Stumpf gelegt. Arborisierungstendenzen sollen mit Hilfe des Modells für einzelne Axone individuell untersucht werden. Darüber hinaus werden Verhaltensweisen eines jeden einzelnen Axons in Beziehung zur Gesamtheit der regenerierenden, also die Koaptationsstelle überwindenden Axone gesetzt.

Aufbauend auf die Evaluierung des axonalen Verhaltens - nach Nerven-Transsektion und Koaptation peripherer Nerven ohne sonstige Beeinflussung dieser - sollen sich Untersuchungen anschließen unter Bedingungen, die zu einer Beeinflussung des Regenerationsergebnisses führen. Ein sich darunter potentiell änderndes morphologisches Verhalten könnte Erklärungsmöglichkeiten für die jeweils gesteigerte Regeneration geben.

Bewußt wurden verschiedene Zugänge zur axonalen Regenerationsbeeinflussung gewählt, von biochemischer bis zu elektrophysiologischer. Sowohl lokale als auch systemische Anwendungen kamen zum Einsatz. Vielversprechende Ansätze sind zum Beispiel das metabolische Glykoengineering (z.B. mit N-Propionylmannosamin), Behandlungen mit Interleukinen (z.B. mit Interleukin-6), physiologische Nervenkoaptationen (z.B. mit Fibrinkomponenten) oder die elektrische Nervenstimulation vor Nervenreparation.

2 Originalarbeiten

2.1 Die Wegfindung regenerierender peripherer Axone.

Die folgende Originalarbeit stellt die schon in Abschnitt 1.2.1 bis Abschnitt 1.2.3 geschilderten Methoden dar, sowie die daraus resultierenden Ergebnisse.

<https://doi.org/10.1002/cne.20436>

2.2 N-Propionylmannosamin fördert die axonale Elongation in einem Nervus-ischiadicus-Läsionsmodell der Maus.

Nachdem die oben dargestellten Untersuchungen eine detaillierte Beschreibung des individuellen axonalen morphologischen Verhaltens nach Transsektion und Nervennaht erlaubten, sollen sich im Folgenden die Beobachtungen anschließen unter Bedingungen, die potentiell die Regeneration beeinflussen. Ein Ziel der Untersuchungen ist es, mögliche Veränderungen in der Morphologie der regenerierenden Axone aufzuzeigen. Sämtliche Versuche basieren auf dem oben dargestellten Mausmodell. Der erste Weg, die Regeneration zu beeinflussen, wird im Gebiet des metabolischen Glykoengineerings gewählt.

Die N-acetylneuraminsäure (Neu5Ac), auch bekannt als Sialinsäure (Sia) wird als terminaler Zuckerrest in den meisten Glycoproteinen und Glykolipiden (Ganglioside) exprimiert. Sie ist in multiple interzelluläre und intermolekulare Prozesse involviert. Innerhalb des Nervensystems ist Sia Bestandteil der Polysialinsäure (PSA) und bildet somit einen Teil des Adhäsionsmoleküls NCAM (neural cell adhesion molecule), als ein Prototyp der Immunglobuline [23]. Seine Polysialylierung ist in verschiedenste Entwicklungs- und Regenerationsprozesse des Nervensystems involviert [23-29]. Während der embryonalen Entwicklung des peripheren Nervensystems lassen sich deutlich erhöhte Werte von polysialyliertem NCAM im Axon und den Schwann'schen Zellen nachweisen. Seine Expression sinkt im Erwachsenenalter und steigt jedoch nach Verletzung und folgender Regeneration wieder an [23-33]. Es gibt Anzeichen, daß PSA in der Regeneration speziell motorischer Axone eine zentrale Rolle einnimmt. Jüngste Ergebnisse deuten auch daraufhin, daß der regenerationsfördernde Effekt von direkter elektrischer Nervenstimulation nach Nervenverletzung zumindest anteilig mit einer Hochregulierung der PSA Expression erklärbar ist [34-37].

Der natürliche Vorläufer der Sialinsäure ist das N-acetylmannosamin (ManNAc). Die Synthese von Polysialinsäuren wird durch das bifunktionale Enzym UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManNAc-Kinase und die Polysialinsäuretransferasen ST8SIA2 und ST8SIA4 gesteuert [38-41].

Nicht zuletzt auf Grund der Polyvalenz der an der Sialinsäuresynthese beteiligten Enzyme konnten in der Vergangenheit unterschiedliche Modifikationen der Sialinsäure etabliert werden. In gleicher Weise wurden unphysiologische Vorläufermoleküle wie z.B. das N-propionylmannosamin (ManNProp) oder andere N-acylmannosamine synthetisiert, die einen erstaunlichen Einfluß auf die Nervenregeneration haben [42-44].

Durch metabolisches Glykoengineering ist man heute in der Lage, anstelle der N-acetylneuraminsäure die N-propionylneuraminsäure (Neu5Prop) zu synthetisieren [45-49]. Neu5Prop führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem bis zu 85%igem Ersatz der natürlichen Sialinsäure [42, 43]. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß ManNProp zur Expressionssteigerung regenerations-assoziierten Gene (RAG) als auch zur gesteigerten Neuriten-Aussprossung und beschleunigten Etablierung funktionaler Synapsen führt [43, 47, 48, 50-52].

N-Propionylmannosamine stimulates axonal elongation in a murine model of sciatic nerve injury

Christian Witzel^{1, *}, Werner Reutter², G. Björn Stark³, Georgios Kouloxouzis³

1 Plastic and Reconstructive Surgery, Interdisciplinary Breast Center, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

2 Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

3 Department of Plastic and Hand Surgery, University of Freiburg Medical Centre, Freiburg, Germany

*Correspondence to:

Christian Witzel, M.D.,
christian.witzel@charite.de

doi:10.4103/1673-5374.150744

<http://www.nrronline.org/>

Accepted: 2015-02-16

Abstract

Increasing evidence indicates that sialic acid plays an important role during nerve regeneration. Sialic acids can be modified *in vitro* as well as *in vivo* using metabolic oligosaccharide engineering of the N-acyl side chain. N-Propionylmannosamine (ManNProp) increases neurite outgrowth and accelerates the reestablishment of functional synapses *in vitro*. We investigated the influence of systemic ManNProp application using a specific *in vivo* mouse model. Using mice expressing axonal fluorescent proteins, we quantified the extension of regenerating axons, the number of regenerating axons, the number of arborizing axons and the number of branches per axon 5 days after injury. Sciatic nerves from non-expressing mice were grafted into those expressing yellow fluorescent protein. We began a twice-daily intraperitoneal application of either peracetylated ManNProp (200 mg/kg) or saline solution 5 days before injury, and continued it until nerve harvest (5 days after transection). ManNProp significantly increased the mean distance of axonal regeneration (2.49 mm vs. 1.53 mm; $P < 0.005$) and the number of arborizing axons (21% vs. 16%; $P = 0.008$) 5 days after sciatic nerve grafting. ManNProp did not affect the number of regenerating axons or the number of branches per arborizing axon. The biochemical glycoengineering of the N-acyl side chain of sialic acid might be a promising approach for improving peripheral nerve regeneration.

Key Words: N-propionylmannosamine; sialic acid; glycoengineering; sciatic nerve; peripheral nerve; branching; arborisation; Thy1-YFP mouse; nerve regeneration

Witzel C, Reutter W, Stark GB, Kouloxouzis G (2015) N-Propionylmannosamine stimulates axonal elongation in a murine model of sciatic nerve injury. *Neural Regen Res* 10(6):976-981.

Introduction

N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac), or sialic acid (Sia), is expressed as terminal sugar in most glycoproteins and glycolipids. Sia is intimately connected with intermolecular and intercellular interactions. Within the nervous system, Sia is part of the polysialic acid (PSA) that prevails in the neural cell adhesion molecule (NCAM), which is a prototypic member of the immunoglobulin family of adhesion molecules (Hildebrandt and Dityatev, 2013). Polysialylation of NCAM plays an important role in brain development, nerve regeneration and neural plasticity (Daniloff et al., 1986; Maier et al., 1986; Brodkey et al., 1993; Zhou and Zhou, 1996; Franz et al., 2005; Hildebrandt et al., 2007; Jungnickel et al., 2009). PSA is a major regulator of cellular plasticity in brain development (Rutishauser, 2008; Schnaar et al., 2014). PSA modulates cell interactions *via* multiple mechanisms, including the attenuation of homophilic and heterophilic cell-cell and cell-matrix adhesion (Hildebrandt and Dityatev, 2013). During the development of the peripheral nervous system, the polysialylated form of NCAM is highly expressed in Schwann cells and axons. Its expression decreases in adulthood, but increases again after injury and during regeneration (Covault et al., 1986; Daniloff et al., 1986; Maier et al., 1986; Brodkey et al., 1993; Carratu et al., 1996; Zhou and

Zhou, 1996; Fu and Gordon, 1997; Rutishauser, 1998; Franz et al., 2005; Hildebrandt et al., 2007; Jungnickel et al., 2009). Polysialylation of NCAM during regeneration seems to be crucial for regenerating motor axons to find the appropriate motor Schwann cell tubes – a process known as preferential motor reinnervation (Brushart, 1993; Brushart et al., 1998; Franz et al., 2005, 2008). Brief electrical stimulation of the traumatized nerve enhances peripheral nerve regeneration (Gordon et al., 2008, 2009), and increasing evidence indicates that this phenomenon can be explained at least partially by up-regulation of PSA expression (Franz et al., 2008; Vogt et al., 2012).

Sialylation can be modified biochemically *in vitro* and *in vivo* using non-physiological precursors such as N-propionylmannosamine (ManNProp) and other N-acylmannosamines (Buttner et al., 2002; Gagiannis et al., 2007; Pon et al., 2007). The promiscuity of the enzymes of the Sia biosynthesis allows ManNProp to be metabolised to the respective N-propionylneuraminic acid (Neu5Prop). This process is very similar to the physiological metabolism of N-acetylmannosamine to Neu5Ac (Kayser et al., 1992; Keppler et al., 1995; Schmidt et al., 1998, 2000; Wolf et al., 2012). Posttranslational modification of glycoconjugates by Neu5Prop significantly replaces natural Sia by up to 85%

without increasing overall sialylation, as shown *in vitro* (Buttner et al., 2002) and *in vivo* (Gagiannis et al., 2007).

Biochemical glycoengineering of sialic acid has revealed unexpected new biological characteristics of Sia, *e.g.*, influencing the expression of genes involved in the neuronal differentiation (Keppler et al., 2001; Kontou et al., 2008).

In this paper, we use a mouse sciatic axotomy and transplantation model to show, for the first time, the impact that systemic application of ManNProp has on early peripheral nerve regeneration *in vivo*.

Materials and Methods

Animals

Twelve thy-1-YFP mice (YFP⁺) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) with mixed gender and a weight of 25–30 g, which express yellow fluorescent protein (YFP) in a subset of their axons (B6.Cg-Tg (thy1-YFP) 16Jrs/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), were divided into two experimental groups (Feng et al., 2000; Witzel et al., 2005). C57Bl/6 mice (*n* = 12) with mixed gender and a weight of 25–30 g served as YFP⁻ donors for peripheral nerve grafting. The State Animal Protection Committee of Berlin (Germany; Application Number G0041/07) approved all procedures.

Surgical procedure

All surgical procedures were performed on YFP⁺ mice at the age of 12–16 weeks. Anesthesia was induced with isoflurane (Forene®, Wiesbaden, Germany) and continued by intraperitoneal injection of a mixture of xylazine (16 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). A dorsal approach was used for the bilateral sciatic nerve exposure in YFP⁺ mice. After

transection of the sciatic nerve proximal to the trifurcation, the distal nerve section was completely removed and partially replaced by a 1-cm sciatic nerve graft harvested from YFP⁻ mice. Proximal coaptation of the YFP⁺ mice was performed after careful alignment, and a semicircular rubber splint was used to hold the two ends in place (Dow Corning; 0.025 inch ID) (Witzel et al., 2005). This resulted in a tension-free splint repair and avoided the irritation that would have been caused by end-to-end nerve suture. A single stitch secured the epineurium to the rubber at each end of the splint (11-0 nylon; **Figure 1**). No distal coaptation of the nerve graft was performed. The mice received a daily subcutaneous injection of 0.1 mg/kg buprenorphine as an analgesic.

Experimental groups

The first experimental group (ManNProp, *n* = 6) received a twice-daily intraperitoneal application of peracetylated ManNProp (200 mg/kg; produced in our biochemical lab) diluted in physiologic saline solution. Peracetylation renders sugars lipophilic, which means they can be transported into the cell without the need for a limited, specific monosaccharide transport system. Inside the cell, non-specific esterases quickly split off the acetyl groups. As a result, much less sugar is needed to induce biological effects. The strength and timing of the dosage of ManNProp in its peracetylated form were based on published data (Kayser et al., 1992; Gagiannis et al., 2007). The second experimental group (saline, *n* = 6) served as control and received a twice-daily intraperitoneal application of physiologic saline solution (10 mL/kg) only. Treatment started 5 days

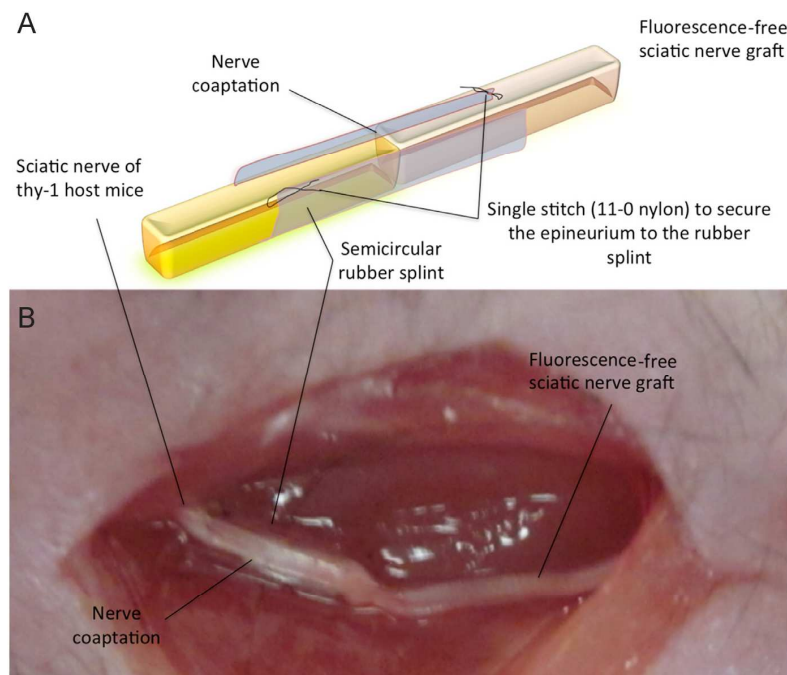


Figure 1 Visualization of the mouse model. (A) Schematic image of the semicircular silicon rubber splint that surrounds the repair site and is sutured to each nerve stump, far away from the fragile repair site. The proximal fluorescent sciatic nerve stump (left side, light yellow) is attached to the non-fluorescent nerve graft (right side, brown). (B) *In situ* aspect of the right sciatic nerve region after nerve grafting.

Table 1 Description of the outcome values

Group	25%	50%	75%	Mean	Difference	P value
ManNProp	3 mm	3 mm	2 mm	2.49 mm	0.96 mm	> 0.005
Saline	2 mm	1 mm	1 mm	1.53 mm		

ManNProp: N-Propionylmannosamine. 25%, 50%, and 75% represent 25th, 50th, and 75th percentiles, respectively.

before surgery and was continued for additional 5 days after surgery, until nerve harvest. Donor mice were not treated.

We used thy-1 mice as host animals. Their partial fluorescent axons made it easy for us to quantify regeneration distance and morphology. To exclude interference from fluorescent debris caused by Wallerian degeneration and thus difficulties in quantifying the results, we used fluorescence-free nerve grafts for the distal nerve section. The distal end of the nerve graft was not coapted, which ruled out any influence from the target organ (Frey et al., 1996). The follow-up period was limited by the length of the nerve graft (1 cm). Five to seven days after nerve repair, the fastest axons had exceeded the distal end of the graft and therefore could not be used for evaluation.

Nerve harvesting and fixation

Five days after surgery, both sciatic nerves, including the grafts, were harvested after sacrificing the mice by CO₂ inhalation. After the semicircular rubber splint had been removed, the nerve was carefully stretched out on a piece of wood and sutured with 9-0 nylon at both ends. The nerves were fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde. We produced 100- μ m longitudinal sections on a freezing microtome. For the imaging of Schwann cell tubes, we used antibodies against mouse laminin produced in rabbit in a dilution of 1:250 and an incubation time of 12 hours (Catalogue-No: L9393, Sigma, Munich, Germany) and Alexa Fluor 568 as a secondary antibody produced in a goat at a dilution of 1:300 and an incubation time of 2 hours (Catalogue-No: A-21069, Invitrogen, Darmstadt, Germany).

Evaluation of tissue sections

Regeneration distance

Sections were analyzed with standard fluorescence microscopy (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Berlin, Germany) at a wavelength of 568 nm and 466 nm for the yellow autofluorescence of the axons. All counts performed were done manually during fluorescent microscopy without using professional software. The coaptation site was set as the zero reference point. We counted the number of fluorescent axons proximal to the coaptation site. The number of axons that were present exactly 1 mm proximal to the coaptation was defined as the maximum number of axons able to regenerate. We also counted the regenerating axons at intervals of exactly 1 mm distal to the coaptation site. Retrograde regenerating axons were excluded from the count. Each axon branch was counted as one axon at each millimetre point (Figure 2).

The numbers of regenerating axons present at each millimetre distal to the coaptation site were set against the maximum number of axons able to regenerate and displayed as Kaplan-Meier curves. The mean and standard deviation of the distance, as well as the distance of the 25th, 50th and 75th percentiles (representing the fastest, middle and slowest 25% of regenerating axons), could be determined for each experimental group.

Percentage of regenerating axons

The fluorescent axons 1 mm proximal and distal to the coaptation site were counted in order to calculate the percentage of regenerating axons for each group (mean \pm SD).

Branches and arborization

The total number of regenerating axons (RA), arborizing axons (AA) and branches (B) was counted in the zone running from the transection to 2 mm inside the nerve graft. We used these results to calculate the ratio of AA to RA. We also calculated the mean count and standard deviation of branches per regenerating axon as the ratio of B to RA, and per arborizing axon as the ratio of B to AA for each experimental group.

Statistical analysis

Statistical significance of the compared Kaplan-Meier curves was determined by the log-rank test. Statistical analysis of the percentage of regenerating axons and branching was performed by Student's *t*-test after testing for normal distribution. The significance level was set at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22 software (Ehningen, Germany).

Results

After 5 days, the regeneration distance in the ManNProp group increased significantly compared to the saline group ($P < 0.005$; Figure 2). The mean regeneration distance achieved was 2.49 ± 0.05 mm for the ManNProp group and 1.53 ± 0.04 mm for the saline group. Regeneration distances of the 25th, 50th and 75th percentiles were 3, 3, and 2 mm for the ManNProp group, and 2, 1, and 1 mm for the saline group (Figure 3, Table 1). The mean percentage of arborizing regenerating axons after 5 days was higher between the ManNProp group compared with the saline group ($P < 0.05$; Figure 4). The difference of the number of regenerating axons between the ManNProp group and saline group was not found ($P > 0.05$; Figure 5). The mean number of branches per regenerating axon in the ManNProp group was similar to the saline group ($P > 0.05$; Figure 6). There were no differences found in the number of branches per arborizing axon between the ManNProp group and the saline group ($P > 0.05$; Figure 7).

Discussion

Systemic treatment of mice with ManNProp significantly increased the distance of axonal elongation and the number of arborizing axons 5 days after nerve axotomy. This supports

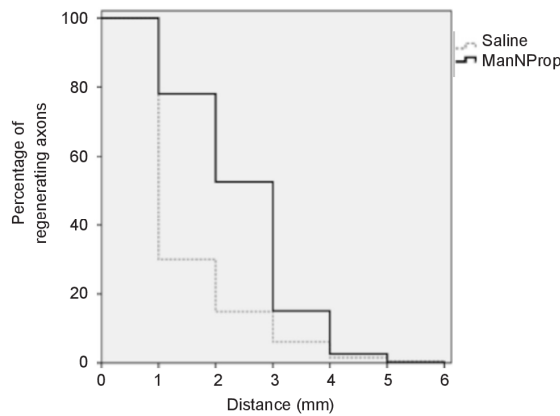


Figure 3 N-Propionylmannosamine (ManNProp) increases distance of axonal regeneration.

Treatment with ManNProp significantly increased axonal elongation at 5 days after sciatic nerve grafting ($P > 0.05$; log-rank test).

previous *in vitro* results, which showed that treating PC12 cells with ManNProp increased neurite outgrowth and accelerated significantly the reestablishment of the perforant pathway in brain slices *in vitro* (Schmidt et al., 1998, 2000; Buttner et al., 2002). Recent findings indicate that ManNProp influences signal transduction, as shown by the increased expression of phosphorylated Erk 1/2 (Kontou et al., 2008). ManNProp also stimulates the secretion of thioredoxin, a small redox protein that promotes neurite outgrowth (Kontou et al., 2008; Horstkorte et al., 2010). These phenomena might be due to ManNProp itself or to the biochemical modification of Sia in receptor glycoproteins on the cell surface enhancing the recognition and transmission of growth factor signals.

In the first few days after nerve axotomy, the biggest obstacle facing regenerating axons is crossing the repair site. The morphology of regenerating axons is mainly characterized by lateral movement, arborization and pruning (Ramón y Cajal and May, 1928). Although increased arborization is presumed to be associated with nerve malcoaptation or scarring, recent data suggest that it could also be a pathway selection mechanism that benefits regeneration specificity (Brushart, 1990, 1993; Brushart et al., 1998; Franz et al., 2005, 2008; Witzel et al., 2005). Already in 1972, it was found that transected axons produce multiple sprouts that advance distally in the so called “regenerating unit” (Morris et al., 1972; Mackinnon et al., 1991). During embryonic development of the motor nervous system and central nervous system, arborization and collateral pruning are recognized as the way that the projections fine-tune themselves (Redfern, 1970; Brown and Booth, 1983; Stelzner and Strauss, 1986). Branching is undoubtedly a substrate and energy consumptive process. Since evolution has preserved this mechanism means that it must offer some kind of benefit. Biochemical glycoengineering of sialic acid might, in future, be a promising way of beneficially influencing peripheral nerve regeneration.

Taken together, systemic treatment of mice with Man-

NProp increases the regeneration distance, the number of axons that arborize and the degree of axonal branching in mouse models of sciatic axotomy and transplantation.

Author contributions: CW and WR designed the study. CW and GK performed the research. WR and GBS interpreted the data and performed the critical revision of the paper for important intellectual content. GK was also responsible for data collection and statistical analysis and wrote the paper. All authors approved the final version of this paper.

Conflicts of interest: None declared.

References

- Brodkey JA, Gates MA, Laywell ED, Steindler DA (1993) The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules. *Exp Neurol* 123:251-270.
- Brown MC, Booth CM (1983) Postnatal development of the adult pattern of motor axon distribution in rat muscle. *Nature* 304:741-742.
- Brushart TM (1990) Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study. *Restor Neurol Neurosci* 1:281-287.
- Brushart TM (1993) Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci* 13:2730-2738.
- Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM (1998) Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci* 18:8674-8681.
- Buttner B, Kannicht C, Schmidt C, Loster K, Reutter W, Lee HY, Nohring S, Horstkorte R (2002) Biochemical engineering of cell surface sialic acids stimulates axonal growth. *J Neurosci* 22:8869-8875.
- Carratu MR, Steardo L, Cuomo V (1996) Role of polysialic acid in peripheral myelinated axons. *Microsc Res Tech* 34:489-491.
- Covault J, Merlie JP, Goridis C, Sanes JR (1986) Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol* 102:731-739.
- Daniloff JK, Levi G, Grumet M, Rieger F, Edelman GM (1986) Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J Cell Biol* 103:929-945.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.
- Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF (2005) Polysialylated neural cell adhesion molecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons. *J Neurosci* 25:2081-2091.
- Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF (2008) Intrinsic neuronal properties control selective targeting of regenerating motoneurons. *Brain* 131:1492-1505.
- Frey M, Koller R, Liegl C, Happak W, Gruber H (1996) Role of a muscle target organ on the regeneration of motor nerve fibres in long nerve grafts: a synopsis of experimental and clinical data. *Microsurgery* 17:80-88.
- Fu SY, Gordon T (1997) The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14:67-116.
- Gagiannis D, Gossrau R, Reutter W, Zimmermann-Kordmann M, Horstkorte R (2007) Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine. *Biochim Biophys Acta* 1770:297-306.
- Gordon T, Brushart TM, Chan KM (2008) Augmenting nerve regeneration with electrical stimulation. *Neuro Res* 30:1012-1022.
- Gordon T, Udina E, Verge VM, de Chaves EI (2009) Brief electrical stimulation accelerates axon regeneration in the peripheral nervous system and promotes sensory axon regeneration in the central nervous system. *Motor Control* 13:412-441.
- Hildebrandt H, Dityatev A (2013) Polysialic acid in brain development and synaptic plasticity. *Top Curr Chem* doi: 10.1007/128_2013_446.
- Hildebrandt H, Muhlenhoff M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R (2007) Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J Neurochem* 103 Suppl 1:56-64.
- Horstkorte R, Reinke S, Bauer C, Reutter W, Kontou M (2010) N-Propionylmannosamine-induced over-expression and secretion of thioredoxin leads to neurite outgrowth of PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 395:296-300.

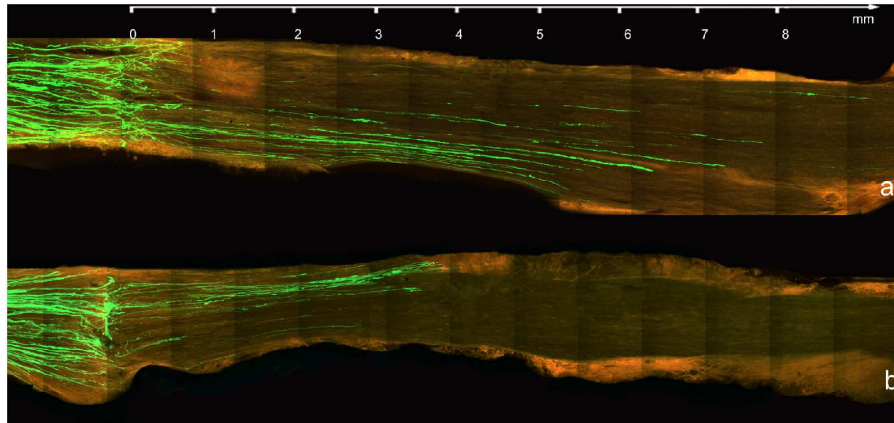


Figure 2 Overview of nerve repairs in 100 μm sections assessed by fluorescence microscopy (wavelength: 568 nm and 466 nm). The proximal fluorescent stump is on the left, the repair site runs vertically at 0 mm and the recipient non-fluorescent graft is on the right. Sensory and motor axons that express yellow fluorescent protein are greenish-yellow, while basement membrane that contains laminin is light red. The samples are harvested 5 days after nerve repair. Panel a: A nerve section sample from the *N*-propionylmannosamine (ManNProp) group showing a significantly increased regeneration distance. Panel b: A nerve section sample from the saline group showing a shorter regeneration distance than the ManNProp group.

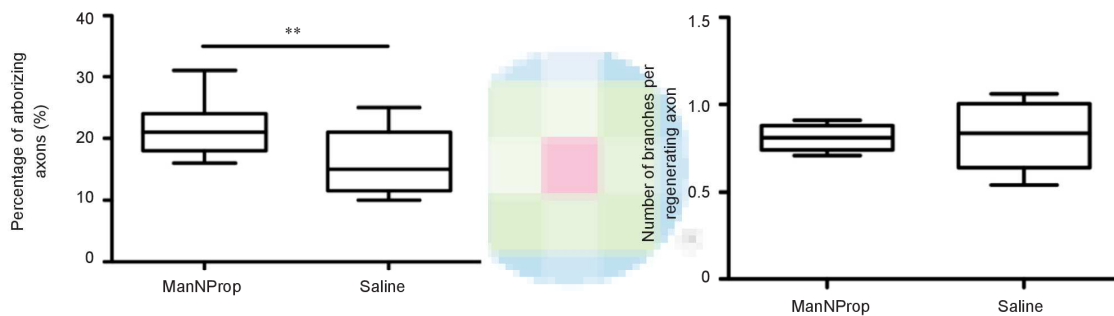


Figure 4 *N*-Propionylmannosamine (ManNProp) increases the number of arborizing axons.

We counted the number of arborizing axons in the zone running from the coaptation site to 2 mm inside the distal stump. The results were set against the total number of regenerating axons. ManNProp ($21 \pm 0.05\%$) increased the number of arborizing axons compared to saline treatment ($16 \pm 0.05\%$; $**P < 0.05$; mean \pm SD; Student's *t*-test; $n = 6$ for each group).

Figure 6 Treatment with *N*-propionylmannosamine (ManNProp) did not affect the number of branches per regenerating axon.

The mean value of branches per regenerating axon in the ManNProp group was 0.80 ± 0.07 (saline group: 0.82 ± 0.18 ; $P > 0.05$; mean \pm SD; Student's *t*-test; $n = 6$ for each group). The number was calculated as the ratio of the number of arborizing axons to the total number of regenerating axons.

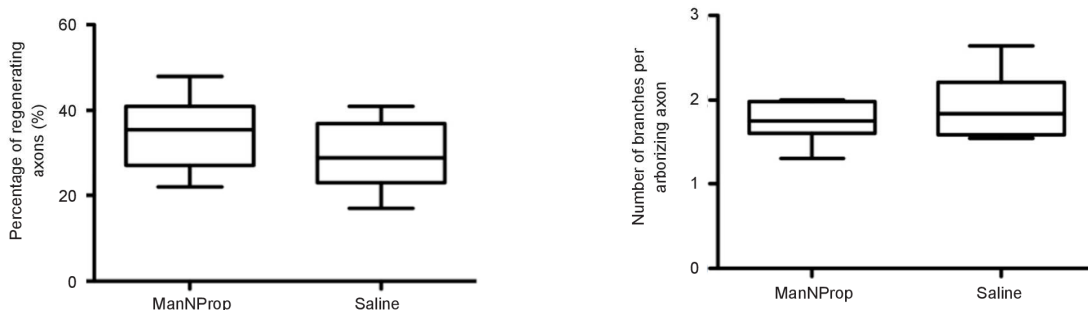


Figure 5 Treatment with *N*-propionylmannosamine (ManNProp) did not affect the number of regenerating axons.

The number of regenerating axons was $35 \pm 0.09\%$ in the ManNProp group and $30 \pm 0.09\%$ in the saline group ($P > 0.05$; mean \pm SD; Student's *t*-test; $n = 6$ for each group).

Figure 7 The number of branches per arborizing axon was comparable between the groups.

No significant difference was seen in the number of branches per arborizing axon after *N*-propionylmannosamine (ManNProp) treatment (1.75 ± 0.23) (saline group: 1.91 ± 0.37 ; $P > 0.05$; mean \pm SD; Student's *t*-test; $n = 6$ for each group). The number was calculated as the ratio of the number of branches to the total number of regenerating axons.

- Jungnickel J, Bramer C, Bronzlik P, Lipokatic-Takacs E, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Grothe C (2009) Level and localization of polysialic acid is critical for early peripheral nerve regeneration. *Mol Cell Neurosci* 40:374-381.
- Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R, Reutter W (1992) Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem* 267:16934-16938.
- Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W (2001) Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology* 11:11R-18R.
- Keppler OT, Stehling P, Herrmann M, Kayser H, Grunow D, Reutter W, Pawlita M (1995) Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses. *J Biol Chem* 270:1308-1314.
- Kontou M, Bauer C, Reutter W, Horstkorte R (2008) Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells. *Glycoconj J* 25:237-244.
- 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.
- Maier CE, Watanabe M, Singer M, McQuarrie IG, Sunshine J, Rutishauser U (1986) Expression and function of neural cell adhesion molecule during limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8395-8399.
- Morris JH, Hudson AR, Weddell G (1972) A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. IV. Changes in fascicular microtopography, perineurium and endoneurial fibroblasts. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124:165-203.
- Pon RA, Biggs NJ, Jennings HJ (2007) Polysialic acid bioengineering of neuronal cells by N-acyl sialic acid precursor treatment. *Glycobiology* 17:249-260.
- Ramón y Cajal S, May RM (1928) *Degeneration & regeneration of the nervous system*. London, Oxford university press, Humphrey Milford.
- Redfern PA (1970) Neuromuscular transmission in new-born rats. *J Physiol* 209:701-709.
- Rutishauser U (1998) Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity. *J Cell Biochem* 70:304-312.
- Rutishauser U (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9:26-35.
- Schmidt C, Stehling P, Schnitzer J, Reutter W, Horstkorte R (1998) Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor. *J Biol Chem* 273:19146-19152.
- Schmidt C, Ohlemeyer C, Kettenmann H, Reutter W, Horstkorte R (2000) Incorporation of N-propanoylneuraminic acid leads to calcium oscillations in oligodendrocytes upon the application of GABA. *FEBS Lett* 478:276-280.
- Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2014) Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 94:461-518.
- Stelzner DJ, Strauss JA (1986) A quantitative analysis of frog optic nerve regeneration: is retrograde ganglion cell death or collateral axonal loss related to selective reinnervation? *J Comp Neurol* 245:83-106.
- Vogt J, Glumm R, Schluter L, Schmitz D, Rost BR, Streu N, Rister B, Suman Bharathi B, Gagiannis D, Hildebrandt H, Weinhold B, Muhlenhoff M, Naumann T, Savaskan NE, Brauer AU, Reutter W, Heimrich B, Nitsch R, Horstkorte R (2012) Homeostatic regulation of NCAM polysialylation is critical for correct synaptic targeting. *Cell Mol Life Sci* 69:1179-1191.
- Witzel C, Rohde C, Brushart TM (2005) Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* 485:183-190.
- Wolf S, Warnecke S, Ehrlich J, Freiberger F, Gerardy-Schahn R, Meier C (2012) Chemical synthesis and enzymatic testing of CMP-sialic acid derivatives. *Chembiochem* 13:2605-2615.
- Zhou WB, Zhou CF (1996) Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid on the neuronal development and regeneration. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 27:118-122.

Copyedited by Simon NG, Luo H, Li CH, Song LP, Zhao M

2.3 Die Verbesserung der frühen peripheren Nervenregeneration durch N-propionylmannosamin in Gegenwart der Polysialyltransferase ST8SIA2.

Polysialinsäuren werden mit Hilfe der Polysialyltransferasen ST8SIA2 und ST8SIA4 synthetisiert [38-41]. Mit ST8SIA2 transduzierte Schwann'sche Zellen zeigen eine erhöhte Beweglichkeit im *in vitro* Modell und führen in einem End-zu-Seit-Transplantationsmodell zu gesteigerten funktionellen Ergebnissen [53].

Neue Möglichkeiten in der Untersuchung der Beteiligung von PSA an der peripheren Nervenregeneration wurden durch die Entwicklung von Knock-out-Mäusen für oben genannte Enzyme eröffnet (St8sia2^{-/-} oder St8sia4^{-/-}-Maus) [54, 55]. Im Nervus-ischiadicus-Quetschverletzungsmodell beider Knock-out-Mauslinien konnte die zentrale Rolle von ST8SIA2 auf die periphere Nervenregeneration gezeigt werden. Der Mangel an ST8SIA2 führte zur signifikanten Verminderung der Anzahl regenerierender Axone und deren Längenwachstum, während es durch Reduzierung von ST8SIA4 zur Steigerung des axonalen Auswachsens kam [29].

Im gewählten Mausmodell fokussieren die folgend beschriebenen Untersuchungen auf den Einfluß der Polysialyltransferase ST8SIA2 im distalen Nervenimplantat nach systemischer Applikation von ManNProp und ManNAc. Das morphologische Verhalten der regenerierenden Axone bildet wiederum einen Schwerpunkt der folgenden Originalarbeit.

<https://doi.org/10.1007/s00702-015-1397-1>

2.4 Die topische Deaktivierung von Interleukin-6 verbessert die frühe periphere Nervenregeneration im Mausmodell.

Das Interleukin-6 ist grundsätzlich bekannt durch seine Beteiligung an entzündlichen Erkrankungen, während septischer Krankheitsbilder und im Rahmen systemischer Reaktionen nach Unfall [56-59]. Als multifunktionales Zytokin spielt es auch während der peripheren Nervenregeneration eine Rolle [60-62]. Sein Signaltransduktionsweg stellt sich sehr komplex dar und involviert multiple Kofaktoren, wie zum Beispiel den membran-gebundenen IL-6-Rezeptor (IL-6Ra) [56], der zur Aktivierung des sogenannten „classic-signaling“-Transduktionsweges führt [63, 64]. Über eine konzentrations- und verhältnis-abhängige Komplexbildung mit der löslichen Form des IL-6 Rezeptors (sIL-6R), kommt es zur Aktivierung des sogenannten „trans-signaling“-Transduktionsweges [65-68]. Das Ziel beider genannten Wege ist das membrangebundene Glykoprotein gp 130 [63, 69]. War es initial nur als proinflammatorisches Zytokin bekannt, so besteht zunehmend die Überzeugung einer sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Wirkweise. Hierbei scheint die lösliche Form des IL-6 Rezeptors (sIL-6R) eine Schlüsselposition einzunehmen [57]. Spezifische Expressionsuntersuchungen am peripheren Nerven konnten IL-6 und seinen Faktor (IL-6R) in Schwann'schen Zellen, jedoch nicht in unverletzten Nervenzellen nachweisen [70-72]. Posttraumatisch hingegen ist ein Anstieg der Konzentration der beiden auch in der Nervenzelle zu zeigen. Diese resultieren wohl einerseits aus einer vermehrten Expression im Neuron, andererseits aus einem gesteigerten retrograden Transport ausgehend von der Läsion [61, 73-77]. Die Erhöhung der IL-6-Konzentrationen durch systemische Therapie *in vivo* oder durch transgene Expressionssteigerung zeigte eine regenerationsfördernde Wirkung nach peripherer Nervenläsion [73]. Eine systemische Behandlung mit den blockierenden IL-6R α -Antikörpern führte demgegenüber zu einer Reduktion der Nervenregeneration [73, 78]. Selbiges Ergebnis wurde bei IL-6^{-/-}-Mäusen

beobachtet. Die funktionellen Ergebnisse hingegen zeigten widersprüchliche Resultate [79, 80].

<https://doi.org/10.1055/s-0035-1555114>

2.5 Fibrinkomponentenkleber führt zur verbesserten axonalen Elongation während der frühen peripheren Nervenregeneration im Mausmodell.

Ein traumatisch durchtrennter peripherer Nerv wird heutzutage im klinischen Alltag durch eine epineurale mikrochirurgische Naht koaptiert [81]. Untersuchungen im Labor konnten jedoch zeigen, daß dieses Verfahren auch zur negativen Beeinflussung der Nervenregeneration führen kann [82-84]. Hierbei werden neben einer Vernarbung durch Fremdkörperreaktion auch mechanische Gewebeschädigungen beschrieben. Zusätzlich ist es bei ausgedehnten Verletzungen oder in ungeübter Hand ein zeitaufwendiges Verfahren [85, 86]. Demgegenüber positiv sind die Möglichkeiten einer exakten faszikulären Ausrichtung mit resultierender Präzision der Stumpfzuordnung und eine grundsätzliche Stabilität der Nerven-naht [87, 88].

Die Verwendung von Gewebeklebern wie zum Beispiel Fibrin ist nicht neu. Seit über 40 Jahren sind solche Komponenten als Gewebekleber kommerziell angeboten [89, 90]. In der Klinik wird Fibrin ergänzend zur klassischen Nerven-naht eingesetzt. Hierzu sind verschiedene vergleichende Untersuchungen aus der Literatur bekannt. Vorteile wie geringere Vernarbungstendenzen ohne Fremdkörperreaktionen und erhöhte Regenerationsgeschwindigkeiten werden postuliert [82, 86, 89, 91-93]. In der genaueren Analyse solcher Studien zeigen sich Widersprüche [94, 95].

Unser Ziel ist es, potentielle Unterschiede hinsichtlich Regeneration über mögliche morphologische Verhaltensweisen der regenerierenden Axone zu erklären.

Fibrin glue repair leads to enhanced axonal elongation during early peripheral nerve regeneration in an *in vivo* mouse model

Georgios Kouloxouzis^{1, *}, Gernot Reim¹, Christian Witzel²

¹ Department of Plastic and Hand Surgery, University of Freiburg Medical Centre, Freiburg, Germany

² Plastic and Reconstructive Surgery – Interdisciplinary Breast Center, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

***Correspondence to:**

Georgios Kouloxouzis, M.D.,
georgios.kouloxouzis@uniklinik-freiburg.de

doi:10.4103/1673-5374.156992

<http://www.nrronline.org/>

Accepted: 2015-04-04

Abstract

Microsurgical suturing is the gold standard of nerve coaptation. Although literature on the usefulness of fibrin glue as an alternative is becoming increasingly available, it remains contradictory. Furthermore, no data exist on how both repair methods might influence the morphological aspects (arborization; branching) of early peripheral nerve regeneration. We used the sciatic nerve transplantation model in thy-1 yellow fluorescent protein mice (YFP; $n = 10$). Pieces of nerve (1cm) were grafted from YFP-negative mice ($n = 10$) into those expressing YFP. We performed microsuture coaptations on one side and used fibrin glue for repair on the contralateral side. Seven days after grafting, the regeneration distance, the percentage of regenerating and arborizing axons, the number of branches per axon, the coaptation failure rate, the gap size at the repair site and the time needed for surgical repair were all investigated. Fibrin glue repair resulted in regenerating axons travelling further into the distal nerve. It also increased the percentage of arborizing axons. No coaptation failure was detected. Gap sizes were comparable in both groups. Fibrin glue significantly reduced surgical repair time. The increase in regeneration distance, even after the short period of time, is in line with the results of others that showed faster axonal regeneration after fibrin glue repair. The increase in arborizing axons could be another explanation for better functional and electrophysiological results after fibrin glue repair. Fibrin glue nerve coaptation seems to be a promising alternative to microsuture repair.

Key Words: nerve regeneration; fibrin glue; peripheral nerve regeneration; thy-1-YFP mice; sciatic nerve; branching; arborisation; neural regeneration

Funding: This study was supported by funding from the Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Kouloxouzis G, Reim G, Witzel C (2015) Fibrin glue repair leads to enhanced axonal elongation during early peripheral nerve regeneration in an *in vivo* mouse model. *Neural Regen Res* 10(7):1166-1171.

Introduction

Microsurgical suturing is the gold standard of nerve coaptation (Terzis et al., 1997). However, evidence also shows that suture materials can result in adverse effects, like tissue damage, inflammation, foreign body reaction and scarring, which have a negative impact on nerve regeneration (Boedts, 1987; Inaloz et al., 1997; Suri et al., 2002). Furthermore, microsurgical coaptation is considered a time-consuming procedure that requires expertise and experience. This can be an issue in cases of extensive nerve damage (Ornelas et al., 2006a, b). On the other hand, some authors consider suture repair to offer important advantages: precision of coaptation, preservation of the tensile strength of repair, and lower risk of gap formation or rupture (Cruz et al., 1986; Temple et al., 2004).

The use of tissue adhesives, like fibrin glue, seems to be a promising alternative. The earliest discussions go as far back as the 1940s (Egloff and Narakas, 1983), and ever since fibrin glue became commercially available in the 1970s, the

idea of using it in nerve repair has been becoming increasingly widespread (Isaacs et al., 2008). The advantages of repairing nerves with fibrin glue are said to be less scarring, less local inflammation, and faster surgical and recovery times (Egloff and Narakas, 1983; Boedts, 1987; Smahel et al., 1987; Narakas, 1988; Ornelas et al., 2006a; Nishimura et al., 2008). Furthermore, autologous fibrin is enriched with platelets that can release growth factors and thereby improve nerve regeneration (Choi et al., 2005). It has been reported that fibrin is deposited in the nerve after injury and hinders functional regeneration by inhibiting Schwann cell migration, a crucial event in peripheral nerve regeneration (Akassoglou et al., 2003). However, some animal studies have shown comparable or beneficial functional and electrophysiological results after fibrin glue repair (Inaloz et al., 1997; Menovsky and Beek, 2001; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006a, b).

As mentioned above, results on the usefulness of fibrin glue in nerve repair are contradictory. Furthermore, scant

evidence exists on the potential impact of fibrin glue on the morphology of nerve regeneration and axonal behaviour during early regeneration. The main challenge facing regenerating axons in the first few days after axotomy is crossing the repair site. Among other things, the morphology of regenerating axons is characterized by lateral movement, arborization and pruning (Ramón y Cajal and May, 1928). Given that function follows morphology of regeneration, we used the sciatic nerve transection and transplantation model of the thy-1-yellow fluorescent protein (YFP) mouse line to investigate these aspects (Feng et al., 2000; Witzel et al., 2005). This mouse line expresses YFP in a subset of its axons. With YFP-negative nerve grafts as the distal nerve part, we were able to use fluorescence microscopy to evaluate how many axons regenerated into the distal aspect of the nerve and how these axons behaved. This allowed us to investigate the potential influence of fibrin glue on the number of regenerating axons, the distance of regeneration, and arborization. Furthermore, the coaptation failure rate, gap size and surgical repair time were also quantified.

Materials and Methods

Animals

Ten thy-1-YFP transgenic mice (YFP⁺, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) expressing YFP in a subset of their axons (B6.Cg-Tg (thy1-YFP) 16Jrs/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) (Feng et al., 2000; Witzel et al., 2005) were used as experimental animals. C57BL/6 mice ($n = 10$) served as YFP⁻ donors for peripheral nerve grafting. The animals were kept in a temperature-controlled environment, exposed to 12-hour light-dark cycles and given food and water *ad libitum*. The State Animal Protection Committee approved all procedures.

Surgical procedure and experimental groups

All surgical procedures were performed in mice of both genders at the age of 12–16 weeks. Anaesthesia was induced with isoflurane (ForeneO, AbbVie Deutschland, Wiesbaden, Germany) and continued by intraperitoneal injection of a mixture of xylazine (16 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). A dorsal approach was used for the bilateral sciatic nerve exposure in the YFP⁺ mice. After transection of the sciatic nerve 5 mm proximal to the trifurcation, the distal nerve part was completely removed and partially replaced by a 1-cm sciatic nerve graft harvested from YFP⁻ control mice (Koulaxouzidis et al., 2015). The partially fluorescent axons of the YFP⁺ mice made it easy for us to quantify regeneration distance and morphology. To exclude interference from fluorescent debris caused by Wallerian degeneration and thus difficulties in quantifying the results, we used fluorescent-free nerve grafts for the distal nerve section (Witzel et al., 2015 in press). On one side, proximal coaptation of the nerve graft to the transected sciatic nerve of the YFP⁺ mice was performed using two single-stitch sutures (11-0 nylon). On the contralateral side, the nerve ends were fixed with a 0.25 mL two-component fibrin glue (Tissue Col Duo S Immuno 0.5 ml, Baxter SA, Germany). One component, fibrin sealant, is

made of pooled human plasma and contains fibrinogen and aprotinine. The other component contains thrombin and calcium chloride.

A randomization list was used to assign the sides, thus creating two experimental groups. One group contained the nerves coapted by sutures (Suture), and the other had the nerves coapted by fibrin glue (Fibrin). Intraindividual comparisons were possible because both types of coaptation were performed in each experimental animal. The distal end of the nerve graft was not coapted, which ruled out any influence from the target organ (Frey et al., 1996). After surgery, the animals were able to move around freely. The follow-up period was limited by the length of the nerve graft (1 cm). Seven days after nerve repair, the fastest axons had exceeded the distal end of the graft and therefore could not be used for evaluation. The mice received a daily subcutaneous injection of 0.1 mg/kg buprenorphine at the abdomen as analgesic during the repair.

Nerve harvesting and fixation

After 7 days, the sciatic nerves and their grafts were harvested and the animals were sacrificed by CO₂ inhalation. Each nerve was carefully stretched out on a piece of wood and sutured with 9-0 nylon at both ends. The nerves were fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde. We used a freezing microtome to produce 100- μ m longitudinal sections. For the imaging of Schwann cell tubes, we used antibodies against laminin (Sigma, Munich, Germany) and Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Darmstadt, Germany) as a secondary antibody.

Evaluation of tissue sections

Regeneration distance

Sections were analyzed with standard fluorescence microscopy (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Berlin, Germany) at a wavelength of 568 nm and 466 nm for the yellow autofluorescence of the nerve. The coaptation site was set as the zero reference point. We counted the number of fluorescent axons proximal to the coaptation site. The number of axons exactly 1 mm proximal to the coaptation was defined as the maximum number of axons able to regenerate. Furthermore, the regenerating axons were counted at intervals of precisely 1 mm distal to the coaptation site. Retrograde regenerating axons were excluded from the assessment. Each axon branch was counted as one axon at each millimetre interval (Figure 1) (Witzel et al., 2015).

The number of regenerating axons counted at each millimetre distal to the coaptation site was set against the maximum number of axons able to regenerate and displayed as Kaplan-Meier curves. The mean and standard deviation of the distance, and the distance of the 25th, 50th and 75th percentiles (representing the fastest 25%, the middle and the slowest 25% of regenerating axons) were determined for each experimental group.

Percentage of regenerating axons

The number of fluorescent axons 1 mm proximal to and 1 mm distal to the coaptation site were counted in order to calculate the percentage of regenerating axons for each

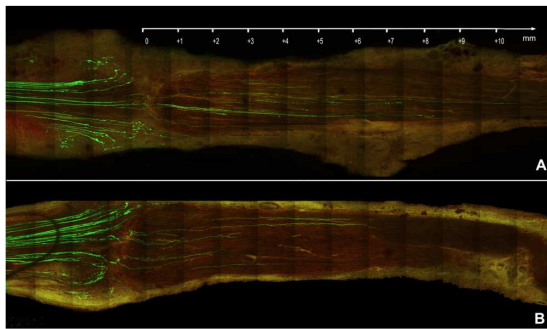


Figure 1 Overview of nerve repairs; 100 μ m sections assessed with fluorescence microscopy.

The proximal stump is on the left, the repair site runs vertically between the first and second quarters on the left of each plate, and the recipient graft is on the right. Sensory and motor axons that express yellow fluorescent protein are greenish-yellow, while basement membrane that contains laminin is light red. The samples are harvested 7 days after nerve repair. (A) Fluorescent proximal stump on the left, non-fluorescent distal nerve on the right. The nerve section shows an example of fibrin glue repair. (B) Example of a suture repair using single button sutures (11-0 nylon). Scale bar: 1 mm.

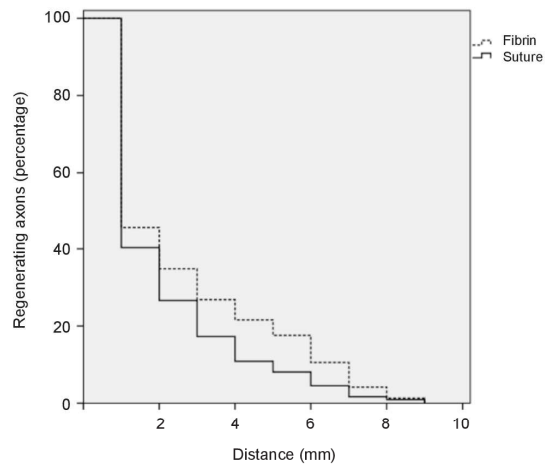


Figure 2 Using fibrin glue for peripheral nerve coaptation increases regeneration distance 7 days after surgery (percentage and travelling distance of regenerating axons).

Peripheral nerve coaptation using fibrin glue increased regeneration distance compared with suture repair ($P < 0.001$; Student's t -test).

Table 1 Description of the sciatic nerve regeneration distances following fibrin repair and suture coaptation

Group	25 th percentile	50 th percentile	75 th percentile	Mean \pm SD	Difference	P value
Fibrin	4 mm	1 mm	1 mm	2.62 \pm 0.10 mm	0.52 mm	< 0.001
Suture	3 mm	1 mm	1 mm	2.10 \pm 0.08 mm		

Student's t -test was used to analyze the intergroup difference.

group. All counts performed were done manually during fluorescent microscopy without using professional software.

Branches and arborization

The total number of regenerating axons (RA), arborizing axons (AA) and branches (B) were counted in the zone running from the transection to 2 mm inside the nerve graft. We used these values to calculate the ratio of AA to RA. Furthermore, we determined the branches per regenerating axon as a ratio of B to RA and the branches per arborizing axon as a ratio of B to AA.

Based on the ratio of branches to arborizing axons, it is possible to say whether there has been a homogeneous increase or decrease in branching, or an excessive sprouting of single regenerating axons.

Failure rate

Macroscopic rupture of the nerve coaptation was defined as complete coaptation failure. This was assessed when harvesting the nerve 7 days after grafting.

Gap size

During the microscopic evaluation, the distance between the proximal and distal stumps in each section was measured in μ m. The maximum distance between the proximal and distal nerve stumps at the repair site of a single nerve was defined as the gap size of the nerve.

Surgical repair times

The time (in seconds) needed for end-to-end nerve coaptation using either two single-stitch sutures or fibrin glue fixation was recorded for each nerve repair. The clock started at the beginning of suturing or fibrin glue application and finished when the last suture was complete or the fibrin clot had formed and was stable.

Statistical analysis

Statistical significance of the compared Kaplan-Meier curves was determined by the log-rank test. Statistical analysis of the percentage of regenerating axons, the percentage of arborizing axons, the number of branches per regenerating axon and per arborizing axon, the gap size and the surgical repair time was performed by Student's t -test after testing for normal distribution. Statistical comparison of the failure rate was performed by the chi-square test. The significance level was set at $P < 0.05$. IBM SPSS Statistics 22 software (Ehningen, Germany) was used. Data are expressed as the mean \pm SD.

Results

Regeneration distance

Fibrin glue coaptation was associated with longer regeneration distances after 7 days (Figures 1, 2) compared with suture coaptation ($P < 0.001$) (Table 1).

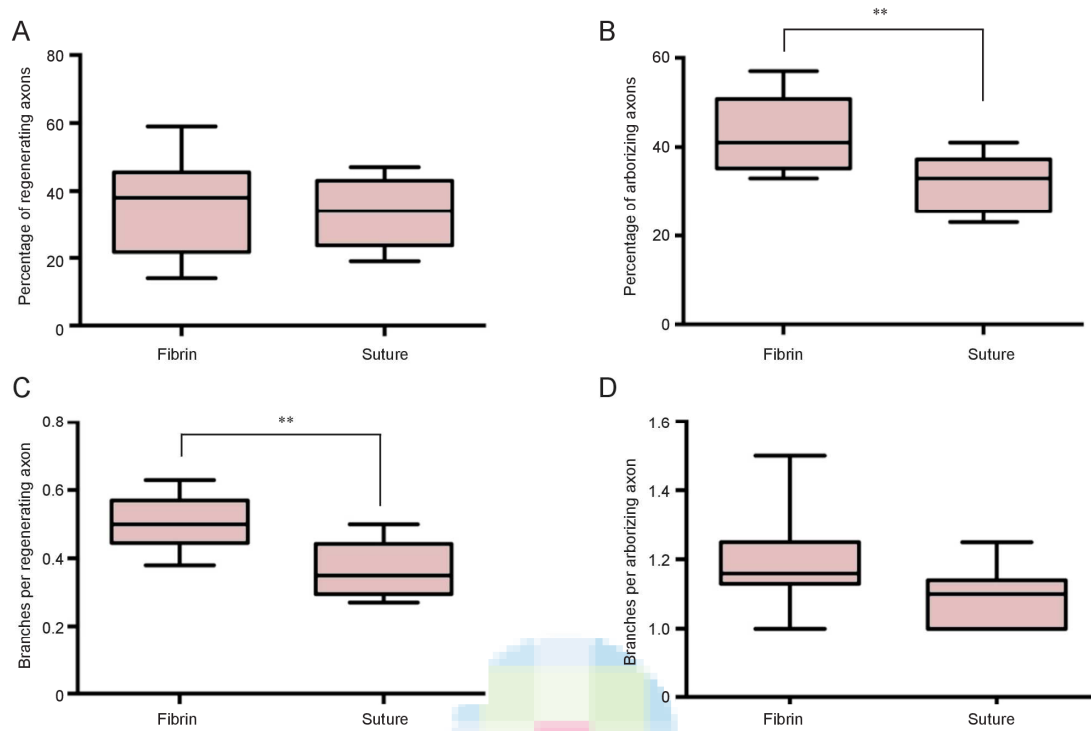


Figure 3 Percentage of regenerating axons and branching behaviour 7 days after surgery. (A) The percentage of regenerating axons did not differ significantly between the two groups ($P = 0.65$). (B) Fibrin glue coaptation significantly increased the number of arborizing axons ($**P < 0.01$). (C) The fibrin glue group had significantly more branches per regenerating axon within the first 2 mm inside the distal nerve ($**P < 0.01$). (D) The number of branches per arborizing axon did not differ significantly between the groups ($P = 0.052$). Data are expressed as the mean \pm SD. Student's *t*-test was used to analyze the intergroup difference.

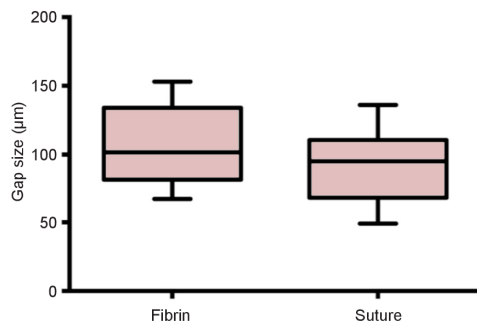


Figure 4 Gap size at the repair site at 7 days after surgery. Gap size was $106.2 \pm 9.57 \mu\text{m}$ in the fibrin glue group, and $90.6 \pm 9.08 \mu\text{m}$ ($P = 0.25$) in the microsuture group. Student's *t*-test was used for statistical comparisons. Data are expressed as the mean \pm SD.

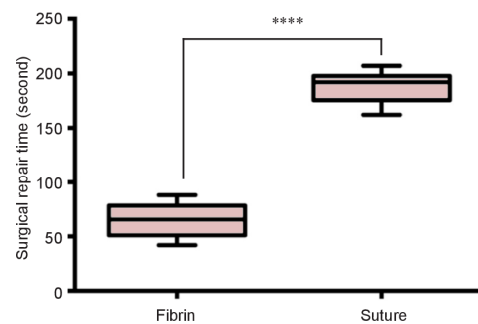


Figure 5 Surgical repair with fibrin glue versus microsutures for sciatic nerve regeneration at 7 days after surgery. The mean surgical repair time with fibrin glue was significantly shorter than with microsutures ($****P < 0.0001$). Student's *t*-test was used for statistical comparisons. Data are expressed as the mean \pm SD.

Percentage of regeneration and arborizing axons

With regard to the percentage of regenerating axons, the figures were $36.1 \pm 4.63\%$ in the fibrin glue group and $33.5 \pm 3.33\%$ in the suture group without significant difference ($P = 0.65$; **Figure 3A**).

The percentage of arborizing regenerating axons was 42.5

$\pm 2.7\%$ in the fibrin glue group and $32.13 \pm 2.26\%$ in the suture group ($P < 0.01$; **Figure 3B**).

Branches per regenerating and arborizing axon

The branches per regenerating axon were significantly increased in the fibrin glue group (0.51 ± 0.02) compared

with the suture group (0.37 ± 0.03 ; $P < 0.01$; **Figure 3C**). Fibrin glue produced 1.20 ± 0.05 branches per arborizing axon, while the sutures achieved 1.08 ± 0.03 ($P = 0.052$; **Figure 3D**).

Coaptation failure, coaptation gap size, surgical repair time

Coaptation failure did not occur in either of groups. Both groups exhibited a comparable gap size ($P = 0.25$), which measured $106.2 \pm 9.57 \mu\text{m}$ in the fibrin group and $90.6 \pm 9.08 \mu\text{m}$ in the suture group (**Figure 4**). Finally, the time needed to perform a nerve repair with fibrin glue (63.9 ± 4.75 seconds) was significantly less than the time needed to perform the same procedure with sutures (187.5 ± 4.71 seconds; **Figure 5**).

Discussion

Ever since fibrin glue was introduced in the 1970s, its use in peripheral nerve coaptation has been increasing (Bertelli and Mira, 1993). However, evidence of its benefit compared with microsutures (the gold standard of nerve repair) is scant and conflicting (Isaacs et al., 2008). Investigations have focused on comparisons of the following parameters: histopathological reaction at the repair site, time of regeneration, functional outcome, electrophysiological parameters, tensile strength, gap formation, coaptation failure rate, and repair time (Egloff and Narakas, 1983; Boedts, 1987; Smahel et al., 1987; Narakas, 1988; Inaloz et al., 1997; Menovsky and Beek, 2001; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006a, b; Nishimura et al., 2008).

Our results reveal no significant difference in coaptation failure rate and gap size at the repair site. The literature on failure rates is contradictory. Maragh et al. (1990) found a failure rate of 13% after fibrin glue repair and zero after microsuture repair in a rat model. These results were confirmed by some scholars (Suri et al., 2002; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006b; Nishimura et al., 2008). Measurements of these parameters have shown advantages of microsuture over fibrin glue repair in cadaveric studies and rabbit models (Temple et al., 2004; Isaacs et al., 2008). However, Cruz et al. (1986) found that using fibrin alone led to 80% dehiscence in a rat sciatic nerve transection model. This inconsistency in the results may be explained by variations in the animal models.

Differences in the species used, the size and specific location of the nerve, the number of stitches needed, the amount of suture material used, the stability of the epineurium, and the forces acting on the coaptation make it almost impossible to compare the results. Nevertheless, most study groups showed an increased rate of fibrosis, inflammation and granuloma formation several weeks and months after microsuture repair (Maragh et al., 1990; Myles et al., 1992; Povlsen, 1994; Menovsky and Beek, 2001; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006b). Most of the studies revealed comparable or better functional and electrophysiological results after fibrin glue repair (Boedts, 1987; Maragh et al., 1990; Inaloz et al., 1997; Suri et al., 2002; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006b). We showed that significantly less time was needed to perform a nerve repair using fibrin glue (Ornelas

et al., 2006b). However, it is currently unclear whether this is relevant in routine clinical settings and cases of extensive nerve trauma (Ornelas et al., 2006a; Sameem et al., 2011).

No data exist on how each method of nerve repair might influence the morphological aspects of early peripheral nerve regeneration, such as arborization and branching. We found that fibrin glue repair was associated with an increase in regeneration distance and percentage of arborizing axons compared with suture repair. The two methods produced no differences in the number of branches per arborizing axon and none in the number of regenerating axons crossing the repair site. The scope of this study does not extend to investigating whether or not these results are due to a probable reduction in inflammation/scarring or to fibrin glue components activating pro-regenerative molecular mechanisms. As stated above, no difference was seen in the gap size of the repair site. Previous investigations showed that there was no correlation between gap size at the repair site and degree of arborization (Witzel et al., 2005). However, the increased distance that regenerating axons travelled into the distal aspect of the nerve is in line with other results that showed faster axonal regeneration after fibrin glue repair (Egloff and Narakas, 1983; Boedts, 1987; Smahel et al., 1987; Narakas, 1988; Inaloz et al., 1997; Menovsky and Beek, 2001; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006a, b; Nishimura et al., 2008). Furthermore, the increased percentage of arborizing axons could be another explanation for better functional and electrophysiological results after fibrin glue repair (Boedts, 1987; Maragh et al., 1990; Inaloz et al., 1997; Suri et al., 2002; Martins et al., 2005; Ornelas et al., 2006b). Balanced branching might in itself be a substrate to increase regeneration specificity. Given the limited length of the nerve graft used in the mouse model, this study could only investigate the effects during the very early stages of regeneration. Predicting the subsequent and final functional results of repair should be the object of further investigations.

Nevertheless, fibrin glue seems to be a promising alternative to microsuture in cases of peripheral nerve coaptation.

Author contributions: GK and CW were responsible for study design, literature research, statistical analysis, paper preparation, editing and review of the paper, definition of intellectual content, experimental design and data analysis. GR participated in experiments, data acquisition and analysis. All authors approved the final version of the paper.

Conflicts of interest: None declared.

References

- Akassoglou K, Akpınar 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.
- Bertelli JA, Mira JC (1993) Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery* 14:135-140.
- Boedts D (1987) A comparative experimental study on nerve repair. *Arch Otorhinolaryngol* 244:1-6.
- Choi BH, Han SG, Kim SH, Zhu SJ, Huh JY, Jung JH, Lee SH, Kim BY (2005) Autologous fibrin glue in peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* 25:495-499.

- Cruz NI, Debs N, Fiol RE (1986) Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg* 78:369-373.
- Egloff DV, Narakas A (1983) Nerve anastomoses with human fibrin. Preliminary clinical report (56 cases). *Ann Chir Main* 2:101-115.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.
- Frey M, Koller R, Liegl C, Happak W, Gruber H (1996) Role of a muscle target organ on the regeneration of motor nerve fibres in long nerve grafts: a synopsis of experimental and clinical data. *Microsurgery* 17:80-88.
- Inaloz SS, Ak HE, Vayla V, Akin M, Aslan A, Sari I, Celik Y, Ozkan U (1997) Comparison of microsuturing to the use of tissue adhesives in anastomosing sciatic nerve cuts in rats. *Neurosurg Rev* 20:250-258.
- Isaacs JE, McDaniel CO, Owen JR, Wayne JS (2008) Comparative analysis of biomechanical performance of available "nerve glues". *J Hand Surg Am* 33:893-899.
- Koulaxouzidis G, Reutter W, Hildebrandt H, Stark GB, Witzel C (2015) In vivo stimulation of early peripheral axon regeneration by N-propionylmannosamine in the presence of polysialyltransferase ST-8SIA2. *J Neural Transm* doi:10.1007/s00702-015-1397-1.
- Maragh H, Meyer BS, Davenport D, Gould JD, Terzis JK (1990) Morphofunctional evaluation of fibrin glue versus microsuture nerve repairs. *J Reconstr Microsurg* 6:331-337.
- Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Godoy BO, Plese JP (2005) Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. *Arq Neuropsiquiatr* 63:601-604.
- Menovsky T, Beek JF (2001) Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg* 95:694-699.
- Myles LM, Gilmour JA, Glasby MA (1992) Effects of different methods of peripheral nerve repair on the number and distribution of muscle afferent neurons in rat dorsal root ganglion. *J Neurosurg* 77:457-462.
- Narakas A (1988) The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am* 19:187-199.
- Nishimura MT, Mazzer N, Barbieri CH, Moro CA (2008) Mechanical resistance of peripheral nerve repair with biological glue and with conventional suture at different postoperative times. *J Reconstr Microsurg* 24:327-332.
- Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante RL, Bustamante JC, Avalos P, Varela D, Lopez M (2006a) Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg* 22:123-128.
- Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante PL, Bustamante JC, Avalos P, Varela D, Lopez M (2006b) Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part I. Wave amplitude, conduction velocity, and plantar-length factors. *J Reconstr Microsurg* 22:119-122.
- Povlsen B (1994) A new fibrin seal in primary repair of peripheral nerves. *J Hand Surg Br* 19:43-47.
- Ramón y Cajal S, May RM (1928) Degeneration & regeneration of the nervous system. London: Oxford university press, Humphrey Milford.
- Sameem M, Wood TJ, Bain JR (2011) A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg* 127:2381-2390.
- Smahel J, Meyer VE, Bachem U (1987) Glueing of peripheral nerves with fibrin: experimental studies. *J Reconstr Microsurg* 3:211-220.
- Suri A, Mehta VS, Sarkar C (2002) Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India* 50:23-26.
- Temple CL, Ross DC, Dunning CE, Johnson JA (2004) Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: an in vitro biomechanical assessment of techniques. *J Reconstr Microsurg* 20:645-650.
- Terzis JK, Sun DD, Thanos PK (1997) Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. *J Reconstr Microsurg* 13:215-225.
- Witzel C, Rohde C, Brushart TM (2005) Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* 485:183-190.
- Witzel C, Reutter W, Stark G, Koulaxouzidis G (2015) N-Propionylmannosamine stimulates axonal elongation in a murine injury model. *Neural Regen Res* in press.

Copyedited by Heaton JT, Hildebrandt H, Li CH, Song LP, Zhao M

2.6 Elektrische Nervenstimulation erhöht das axonale Arborisierungsverhalten nach Nerven transplantation im Mausmodell ohne Einfluß auf die Regenerationsgeschwindigkeit.

Als eines der ersten Probleme, welches ein regenerierendes Axon zu bewältigen hat, ist das Überqueren der Reparationsstelle anzusehen. Dieser sequentiell stattfindende Prozeß, der auch als „gestaffelte Regeneration“ (staggered regeneration) bezeichnet wird, resultiert in einer verlängerten Frühphase der axonalen Regeneration. Gordon et al. beschrieben erstmalig, daß direkte elektrische Stimulation (1 Stunde, 20Hz) eines durchtrennten Nerven in der Lage ist, diese Verzögerung zu mindern [96]. Zusätzlich zeigen hierbei motorische Axone nach Überqueren der Reparationsstelle ein gezielteres Auffinden von korrekt zugeordneten Schwann'schen Zellen im distalen Nervenstumpf. Die als „präferentielle motorische Reinnervation“ (preferential motor reinnervation – PMR) bezeichnete Eigenschaft regenerierender motorischer Axone wird durch elektrische Stimulation noch verstärkt. Somit trägt dieses Verfahren zur Steigerung der Spezifität regenerierender Axone bei [97]. Wenig später war es möglich zu zeigen, daß diese Spezifitätssteigerung, also die Zunahme richtiger Axon-Schwannzell-Zuordnungen, hierüber auch bei sensorischen Fasern erreicht wird [98, 99].

Untersuchungen sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem hinsichtlich des Einflusses von elektrischer Nervenstimulation auf molekularer Ebene zeigten, daß diese kurze und direkte Nervenstimulation zu einer Erhöhung von BDNF und seines Rezeptors TrkB führt. Gleichzeitig wird im Hinter- wie auch im Vorderhorn des Rückenmarks die Konzentration des regenerationsassoziierten Gens GAP-43 gesteigert. Bei der Betrachtung motorischer Axone wurde festgestellt, daß sie nicht alle einen regenerationsfördernden Effekt erhalten. Untersuchungen ergaben, daß diese proregenerativen Wirkungen der direkten elektrischen Nervenstimulation nur solche Fasern positiv beeinflusst, die in der Lage sind, eine Expressionssteigerung von Polysialinsäuren herbeizuführen [28, 96].

<https://doi.org/10.1055/s-0036-1579540>

3 Diskussion und Zukunftsperspektiven

Ramon y Cajal beschrieb 1928 erstmalig, daß die axonale Innervation des distalen Nervenstumpfes nach traumatischer Läsion nicht in einem einzigen Schub stattfindet [7]. Mit Hilfe von radioaktiv markierten [100, 101] und retrograden [97, 102] Anfärbmethoden konnten in jüngerer Zeit diese Ergebnisse bestätigt werden. Die distale Reinnervation wird heute auch als „gestaffelter Prozess“ (staggered regeneration) bezeichnet. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß mit der Möglichkeit, einzelne Axone in ihrem Verlauf zu verfolgen, diese verzögerte frühe axonale Regeneration exakt quantifiziert werden kann. Eine Woche nach Nervenkoaptation haben erst 25% der proximal zur Verfügung stehenden Axone die Reparationszone überquert, von denen bereits die Hälfte mehr als 3 mm in den distalen Nervenstumpf hineingewachsen ist [16]. Unterschiedliche Schlußfolgerungen können hieraus resultieren: Zum einen differieren unterschiedliche Neurone sehr stark in ihrer Möglichkeit, die Reparationszone zu überwinden. Darüber hinaus wissen wir um komplexe Veränderungen des extrazellulären Milieus in der Reparationszone während der frühen Phase nach Nerventranssektion. Somit werden zu verschiedenen Zeitpunkten regenerierende Axone auch auf sehr unterschiedliche Umgebungscharakteristika stoßen, auf Basis derer sie dann Entscheidungen zur Wegfindung treffen müssen. Neurone, die sehr zeitig regenerieren, senden ihre axonalen Ausläufer in eine Zone zwischen den Nervenstümpfen, die nahezu frei ist von Laminin, als starken progenerativen Faktor [103]. Zusätzlich finden sich inhibitorische Substanzen [14]. Grundsätzlich unterliegt diese Zone zwischen den Nervenstümpfen innerhalb der frühen Phase der Regeneration dramatischen Veränderungen. Axoplasmatische Bestandteile, wie z.B. Karboanhydrasen und Cholinesterasen [104], auch das inhibitorisch wirkende Myelin assoziierte Glykoprotein – MAG [105, 106] werden im Zuge der Waller'schen Degeneration entfernt. Die Schwann'schen Zellen verändern sich von einer anfänglich myelinisierenden zu einer proliferierenden Gestalt [32], und progenerativ wirkende Wachstumsfaktoren werden in

ihrer Expression hochreguliert [107]. Ziel könnte es somit sein, regenerierende Axone zeitabhängig mit einer Auswahl an Hinweisen auszustatten, die sie in die Lage versetzen, richtige Axon-Schwannzell-Zuordnungen einzugehen [1, 12].

Regenerierende Axone, die das erste große Hindernis, die Koaptationszone, überwunden haben, verhalten sich in morphologischer Hinsicht auf zwei unterschiedliche Art und Weisen gegenüber dem distalen Nervenstumpf, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben: Einzel regenerierende Axone durchqueren die Reparationszone beinahe in einer geraden Ausrichtung. Kurz von der Schnittfläche des distalen Nervenstumpfes, also bevor sie eine Schwann'sche Zelle wählen, in die sie eintauchen, erleben sie in ihrem Verlauf eine laterale Abknickung. Einige verzweigen sich noch in eng anliegende Äste. Durch dieses Verhalten sind sie fünf wie sieben Tage nach Nerven transplantation in der Lage aus bis zu 142 Schwann'schen Zellenden auszuwählen.

Alternativ dazu können sich regenerierende Axone kurz vor dem Eintreffen am distalen Nervenstumpf arborisieren und somit multiple Schwann'sche Zellen penetrieren. Dieses Verhalten erlaubt solchen Axonen, aus bis zu 68 verschiedenen distalen Wegen auszuwählen.

Bei dieser Einteilung kommt es unvermeidlich zu Übergangsphänomenen, die eine eindeutige Zuordnung erschweren. Die limitierte Beurteilung beruht nicht zuletzt auf der Tatsache, daß mit diesem gewählten Modell und der dadurch zur Verfügung stehenden nur statischen Auswertungsmethode ein dynamisches Bild sicher nicht umfassend abgebildet werden kann. Nichtsdestotrotz können diese Ergebnisse zeigen, daß regenerierende Axone unterschiedlicher Morphologie offensichtlich immer potentiellen Zugang zu einer Vielzahl von distal gelegenen Schwann'schen Zellen haben [16].

Überraschenderweise zeigen unterschiedliche Beeinflussungen, von biochemischen bis zu elektrophysiologischen, sowohl lokal als auch systemisch appliziert, konstante Ähnlichkeiten in der Morphologie axonalen Verhaltens [16-22]. Die auffälligste

Gemeinsamkeit betrifft das sich anpassende Arborisierungsverhalten. Die weiteren oben beschriebenen morphologischen Details innerhalb der Reparationsstelle änderten sich während den verschiedenen Untersuchungsmodalitäten nicht. In allen hier präsentierten Studien ergab die jeweilige Beeinflussung der Regeneration im gewählten Mausmodell stets einen Anstieg des Prozentsatzes arborisierender Axone. Die topische Blockung von IL-6 an der Koaptationsstelle, sowohl durch einen Antikörper oder ein knock-out-Transplantat erreicht, führte zum Beispiel zur Erhöhung des Anteils arborisierender Axone (Anti IL-6Ra vs. Kontrolle: $52\% \pm 6\%$ vs. $40\% \pm 7\%$; Il-6^{-/-}-Transplantat vs. Kontrolle: $55\% \pm 5\%$ vs. $39\% \pm 7\%$, $p < 0,001$). Eine vergleichbare Steigerung des Arborisierungsverhaltens beobachteten wir nach systemischer Gabe von N-propionylmannosamin (ManNProp vs. Kontrolle: $26\% \pm 5\%$ vs. $20\% \pm 3\%$, $p < 0,001$). Auch nach direkter Nervenstimulation zeigten sich 7 Tage nach Nervenkoaptation ähnliche Ergebnisse (Stimulation vs. Kontrolle: $52\% \pm 6\%$ vs. $33\% \pm 3\%$, $p < 0,001$) [16-22].

Im Gegensatz zu dieser Steigerung des prozentualen Anteils arborisierender Axone unter den verschiedensten Bedingungen bleibt das Verhältnis der ausgebildeten Äste pro arborisierendem Axon nahezu konstant. Die Anzahl der gebildeten Äste pro arborisierendem Axon ergab in der Untersuchung topischer IL-6 Blockung keine signifikanten Unterschiede (Anti IL-6Ra vs. Kontrolle: $1,61 \pm 0,14$ vs. $1,63 \pm 0,23$; Il-6^{-/-}-Transplantat vs. Kontrolle: $1,55 \pm 0,12$ vs. $1,62 \pm 0,24$, $p > 0,05$). Auch nach systemischer Applikation von ManNProp oder elektrischer Nervenstimulation änderte sich diesbezüglich das beschriebene Verhalten nicht (ManNProp vs. Kontrolle: $1,76 \pm 0,23$ vs. $1,84 \pm 0,25$; Stimulation vs. Kontrolle: $1,62 \pm 0,12$ vs. $1,66 \pm 0,2$; $p > 0,05$) [16-22].

Schlußfolgerungen von der Morphologie zur Funktion, wie Ramon y Cajal es propagierte, ergeben heterogene Erklärungsversuche hinsichtlich des Verhaltens regenerierender Axone und lassen immer noch Raum für Spekulationen [16].

Das Arborisierungsphänomen per se wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, daß exzessives Aufzweigen einzelner Axone, welches häufig mit Vernarbung an der Reparationsstelle und einer schlechten Ausrichtung der Nervenstümpfe zueinander vergesellschaftet ist, zu negativen Folgen führt [108]. Dies beinhaltet zum Beispiel eine fehlgeleitete Innervation antagonistischer Muskeln, die Polyinnervation und die dadurch resultierende Vergrößerung von motorischen Einheiten [109-112]. Es konnte aber gezeigt werden, daß solche Phänomene meistens passager auftreten, jedoch für eine längere Zeit andauern. Letzteres könnte eine Erklärung für die widersprüchlichen Sichtweisen auf die Rolle des Arborisierungsverhaltens darstellen. Kurz nach Nervenverletzung und Koaptation zeigen sich im Vergleich zum proximalen Stumpf deutlich mehr Axone im distalen Anteil, jenseits der Reparationszone [9]. Diese größere Anzahl kann durch das Arborisierungsverhalten erklärt werden. Dieser Status persistiert in der Regel für mindestens ein Jahr nach Verletzung. Nach ungefähr 2 Jahren regulieren sich die Axonzahlen wieder auf den Ausgangswert ein [113-115]. Äste von nicht-myelinisierten Nerven bestehen für eine besonders lange Zeit [116]. Man nimmt an, daß die zeitliche Reduktion der Anzahl der Äste mit der Nervenreifung, der axonalen Feinausrichtung und der Reduktion von Fehlleitungen zusammenhängt. Dies konnte mit Hilfe von Experimenten durch retrograde Anfärbungstechniken überprüft und bestätigt werden [113-115].

Die Morphologie arborisierender Axone legt einen Mechanismus zur axonalen Wegfindung nahe, der individuellen sich nicht ästelnden Axonen nicht zur Verfügung steht, und zwar die gleichzeitige Interaktion mit einer Vielzahl von möglichen distalen Pfaden, um den geeignetsten herauszufinden [16]. Retrograde Anfärbuntersuchungen regenerierender Axone sowohl im sensiblen als auch motorischen Ast des Nervus femoralis bestätigen diese Hypothese. Kurz nach Nervennaht im proximalen Anteil des Nervus femoralis zeigen sich motorisch Äste sowohl in Richtung Haut als auch Muskulatur regenerierend. Mit zunehmender Zeit der Regeneration steigt die Anzahl der Motoneurone, die alleinig in

Richtung Muskulatur projizieren, wobei die Doppelprojektionen sinken [117]. Dies führte zur Hypothese der selektiven Rückkürzung falsch projizierter Axone als einen Mechanismus der präferenziellen motorischen Reinnervation (PMR). Hierbei zeigen motorische Axone in einem gemischten Nerven nach Verletzung und Koaptation die Tendenz, vornehmlich in motorische Pfade zu regenerieren [102]. In dieser Weise könnte sich das Arborisierungsverhalten, wie unter den hier aufgezeigten verschiedenen Bedingungen im Ergebnis darstellt, als eine Grundlage zur Spezifitätsgenerierung regenerierender Axone erweisen. Der Reiz, der die Rückkürzung von falsch geleiteten Ästen provoziert, ist bisher noch nicht bekannt. Unterschiedliche Ansätze werden hierzu in der Literatur diskutiert. 1984 etablierten Smalheiser und Crain das Konzept der „konkurrierenden Axonäste“ („sibling neurite bias“), mit dessen Hilfe die Koordination in der axonalen Elongation, die Arborisierung und daraufhin folgende Rückkürzung einzelner Äste beschrieben wird [118]. In deren Modell wird gezeigt, daß die Lebensdauer mehrerer Äste eines regenerierenden Neurons limitiert ist. Dies wird anhand zweier Konkurrenzsituationen erklärt. Auf der einen Seite befinden sich diese axonalen Äste sowohl in einer „intrazellulären Konkurrenz“ um Energieressourcen als auch in einer „extrazellulären Konkurrenz“ um trophische und extrazelluläre Faktoren.

Betrachtet man die Entwicklung des Nervensystems während der Embryogenese, so könnten Gemeinsamkeiten zu Regenerationsprozessen im Erwachsenen beschrieben werden. In der frühesten intrauterinen Entwicklung wird die axonale Arborisierung mit der sich anschließenden Rückkürzung einzelner Äste als Feinabstimmung der jeweiligen zu erzielenden Funktion und Spezifität angesehen [119-121]. Hierüber werden fehlerhafte synaptische Kontakte reduziert [119, 121-126]. Hiernach ist die Anzahl axonaler Äste eines einzelnen Neurons von dessen Produktions- und Transportkapazität verschiedener Substanzen abhängig [127-129].

Das Ausbilden von Ästen ist eine bekannte Eigenschaft regenerierender peripherer Axone [102]. Jedoch basierten die bis heute unterschiedlichen Beurteilungen von Arborisierung immer auf dem Verhalten ganzer Populationen von Axonen [9, 10, 115, 130-132]. All diese Studien können somit keine exakten Verhältnisse von arborisierenden zu nicht-arborisierenden Axonen beschreiben, oder den Grad bei welchem Arborisierung auftritt. Selbst Anfärbuntersuchungen können dies nicht genau abbilden [102]. Basierend auf dem entwickelten Mausmodell präsentieren die hier beschriebenen Versuche erstmalig systematisch das Arborisierungsverhalten einzelnen Axone.

Ausblick

Ein durchtrennter peripherer Nerv wird heute im klinischen Alltag vom chirurgisch tätigen Arzt mit Nadel und Faden zusammengefügt. Dies geschieht in vergleichbarer Art und Weise wie es seine Vorgänger vor 100 Jahren taten. Durch den Einzug des Mikroskops in den OP begleitet von modernen mikrochirurgischen Techniken konnte die Genauigkeit dieses Prozesses verbessert werden. Jedoch erlangen auch heute nur ca. 10% der Erwachsenen mit einer Stammnervenverletzung nach chirurgischer Versorgung eine normale Funktion [1]. Auch im Labor werden trotz optimaler Bedingungen und exakter Ausrichtung der neuralen Anteile nur reduzierte funktionelle Ergebnisse erreicht [133]. Die hier erstmalig quantifizierten morphologischen Details, wie die laterale Wanderung oder das Arborisieren von regenerierenden Axonen, erklären eindrücklich die Limitationen einer solchen rein chirurgischen Nervenreparatur. Eine mikroskopisch kleine Lücke trennt den proximalen vom distalen Nervenstumpf und verhindert damit den Kontakt der sich gegenüber stehenden Basalmembranen der Schwann'schen Zellen. Die regenerierenden Axone müssen diese „Hürde“ überqueren, um dann einen geeigneten distalen Pfad zum richtigen Erfolgsorgan auszuwählen. Um die funktionellen Ergebnisse zu verbessern, müssen wir über eine rein mechanische Reparatur hinausgehen und einen biologischen Zugang etablieren, der es

regenerierenden Axonen erlaubt, sich in ausreichender Zahl mit dem geeigneten Endorgan zu verbinden.

Ein potentiell erster Schritt, der Kontakt einer gesteigerten Anzahl arborisierender Axone mit einer vielfachen Auswahl möglicher distaler Pfade, konnte in verschiedenen regenerationsfördernden Ansätzen hier demonstriert werden. In wieweit hierüber auch eine Verbesserung der richtigen Projektionen erreicht werden kann, gilt es zukünftig zu überprüfen.

4 Zusammenfassung

Eine Vielzahl von molekularen und zellulären Prozessen hat Einfluß auf die periphere Nervenregeneration. Sie bilden sich zum Teil auch im morphologischen Verhalten einzelner regenerierender Axone ab. Ramon y Cajal beschrieb vor mehr als einhundert Jahren erstmalig das generelle Verhalten regenerierender Axone als Antwort auf das jeweilig bestehende Milieu ihrer Umgebung. Mit dem hier etablierten Mausmodell, bei dem anteilig axoplasmatisches Gewebe im peripheren Nerven fluoresziert, sind wir in der Lage, das individuelle Verhalten einzelner Axone als Antwort auf Nerventranssektion und Koaptation zu untersuchen. Der frühe Regenerationsprozess läuft gestaffelt ab, eine Woche nach Nervennaht haben erst 25% der regenerierenden Axone die Reparations-stelle überquert. Danach treffen sie in zwei fundamental unterschiedlichen Art und Weisen auf den distalen Nervenstumpf: neben individuell überquerenden Axonen, die vor dem Eintauchen in eine distale Schwann'sche Zelle eine laterale Deviation ihres Verlaufes erfahren, gibt es eine große Anzahl von Axonen, die hier arborisieren. Einzelne regenerierende Axone können aus über 100 möglichen Schwann'schen Zellen ihren distalen Regenerationsweg wählen. Da die funktionellen Ergebnisse nach peripherer Nervennaht auch heute noch sehr reduziert sind, wird diese Entscheidung des Axons wohl eher auf lokale Faktoren basierend als auf eine korrekte Endorgan-Zuordnung getroffen werden. Verschiedene Versuchsansätze zur Beeinflussung der axonalen Regeneration ergaben in morphologischer Hinsicht immer eine Steigerung des Anteils der sich arborisierenden Axone. Demgegenüber blieb die Anzahl der Äste pro arborisierendem Axon konstant. Die Morphologie arborisierender Axone legt einen Mechanismus zur axonalen Wegfindung nahe, der individuellen, sich nicht ästelnden Axonen nicht zur Verfügung steht, und zwar die gleichzeitige Interaktion mit einer Vielzahl von möglichen distalen Pfaden, um den geeignetsten herauszufinden. Dieses und die im weiteren Verlauf stattfindende Rückkürzung solcher Kollateraläste (collateral pruning), könnten insgesamt zur Erhöhung der Spezifität bei der Regeneration beitragen.

5 Literaturverzeichnis

1. Brushart, T.M., et al., *Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8674-81.
2. Brushart, T.M., *Central course of digital axons within the median nerve of Macaca mulatta*. J Comp Neurol, 1991. **311**(2): p. 197-209.
3. Nguyen, Q.T., J.R. Sanes, and J.W. Lichtman, *Pre-existing pathways promote precise projection patterns*. Nat Neurosci, 2002. **5**(9): p. 861-7.
4. Brushart, T.M. and M.M. Mesulam, *Alteration in connections between muscle and anterior horn motoneurons after peripheral nerve repair*. Science, 1980. **208**(4444): p. 603-5.
5. Koerber, H.R., A.W. Seymour, and L.M. Mendell, *Mismatches between peripheral receptor type and central projections after peripheral nerve regeneration*. Neurosci Lett, 1989. **99**(1-2): p. 67-72.
6. Gaul, J.S., Jr., *Electrical fascicle identification as an adjunct to nerve repair*. Hand Clin, 1986. **2**(4): p. 709-22.
7. Ramon Y Cajal, S. and R.M. May, *Degeneration & regeneration of the nervous system*. 1928, London, : Oxford university press, Humphrey Milford.
8. McQuarrie, I.G., *Effect of conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of Ranvier*. J Comp Neurol, 1985. **231**(2): p. 239-49.
9. Morris, J.H., A.R. Hudson, and G. Weddell, *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, 1972. **124**(1): p. 103-30.
10. Scherer, S.S. and S.S. Easter, Jr., *Degenerative and regenerative changes in the trochlear nerve of goldfish*. J Neurocytol, 1984. **13**(4): p. 519-65.
11. Friede, R.L. and R. Bischhausen, *The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections*. J Neurol Sci, 1980. **44**(2-3): p. 181-203.
12. Brushart, T.M., et al., *Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron*. J Neurosci, 2002. **22**(15): p. 6631-8.
13. Miwa, H., et al., *Tracing axons in the peripheral nerve using lacZ gene recombinant adenovirus and its application to regeneration of the peripheral nerve*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(7): p. 671-5.
14. Krekoski, C.A., et al., *Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 6206-13.
15. Feng, G., et al., *Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 41-51.
16. Witzel, C., C. Rohde, and T.M. Brushart, *Pathway sampling by regenerating peripheral axons*. J Comp Neurol, 2005. **485**(3): p. 183-90.
17. Koulaxouzidis, G., et al., *In Situ Deactivation of Interleukin-6 Enhances Early Peripheral Nerve Regeneration in a Murine Injury Model*. J Reconstr Microsurg, 2015. **31**(7): p. 508-15.
18. Koulaxouzidis, G., et al., *In vivo stimulation of early peripheral axon regeneration by N-propionylmannosamine in the presence of polysialyltransferase ST8SIA2*. J Neural Transm (Vienna), 2015. **122**(9): p. 1211-9.
19. Koulaxouzidis, G., W. Reutter, and C. Witzel, *N-Propionylmannosamine: using biochemical glycoengineering to promote peripheral nerve regeneration*. Neural Regen Res, 2015. **10**(12): p. 1947-8.
20. Witzel, C., et al., *N-Propionylmannosamine stimulates axonal elongation in a murine model of sciatic nerve injury*. Neural Regen Res, 2015. **10**(6): p. 976-81.

21. Koulaxouzidis, G., G. Reim, and C. Witzel, *Fibrin glue repair leads to enhanced axonal elongation during early peripheral nerve regeneration in an in vivo mouse model*. *Neural Regen Res*, 2015. **10**(7): p. 1166-71.
22. Witzel, C., et al., *Electrical Nerve Stimulation Enhances Perilesional Branching after Nerve Grafting but Fails to Increase Regeneration Speed in a Murine Model*. *J Reconstr Microsurg*, 2016. **32**(6): p. 491-7.
23. Hildebrandt, H., et al., *Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development*. *J Neurochem*, 2007. **103 Suppl 1**: p. 56-64.
24. Daniloff, J.K., et al., *Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair*. *J Cell Biol*, 1986. **103**(3): p. 929-45.
25. Maier, C.E., et al., *Expression and function of neural cell adhesion molecule during limb regeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(21): p. 8395-9.
26. Brodkey, J.A., et al., *The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules*. *Exp Neurol*, 1993. **123**(2): p. 251-70.
27. Zhou, W.B. and C.F. Zhou, *[Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid on the neuronal development and regeneration]*. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 1996. **27**(2): p. 118-22.
28. Franz, C.K., U. Rutishauser, and V.F. Rafuse, *Polysialylated neural cell adhesion molecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons*. *J Neurosci*, 2005. **25**(8): p. 2081-91.
29. Jungnickel, J., et al., *Level and localization of polysialic acid is critical for early peripheral nerve regeneration*. *Mol Cell Neurosci*, 2009. **40**(3): p. 374-81.
30. Carratu, M.R., L. Steardo, and V. Cuomo, *Role of polysialic acid in peripheral myelinated axons*. *Microsc Res Tech*, 1996. **34**(6): p. 489-91.
31. Covault, J., et al., *Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle*. *J Cell Biol*, 1986. **102**(3): p. 731-9.
32. Fu, S.Y. and T. Gordon, *The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration*. *Mol Neurobiol*, 1997. **14**(1-2): p. 67-116.
33. Rutishauser, U., *Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity*. *J Cell Biochem*, 1998. **70**(3): p. 304-12.
34. Gordon, T., T.M. Brushart, and K.M. Chan, *Augmenting nerve regeneration with electrical stimulation*. *Neurol Res*, 2008. **30**(10): p. 1012-22.
35. Gordon, T., et al., *Brief electrical stimulation accelerates axon regeneration in the peripheral nervous system and promotes sensory axon regeneration in the central nervous system*. *Motor Control*, 2009. **13**(4): p. 412-41.
36. Franz, C.K., U. Rutishauser, and V.F. Rafuse, *Intrinsic neuronal properties control selective targeting of regenerating motoneurons*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 6): p. 1492-505.
37. Vogt, J., et al., *Homeostatic regulation of NCAM polysialylation is critical for correct synaptic targeting*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(7): p. 1179-91.
38. Eckhardt, M., et al., *Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1*. *Nature*, 1995. **373**(6516): p. 715-8.
39. Nakayama, J., et al., *Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(15): p. 7031-5.
40. Scheidegger, E.P., et al., *A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(39): p. 22685-8.
41. Yoshida, Y., et al., *Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(24): p. 14628-33.
42. Gagiannis, D., et al., *Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1770**(2): p. 297-306.
43. Buttner, B., et al., *Biochemical engineering of cell surface sialic acids stimulates axonal growth*. *J Neurosci*, 2002. **22**(20): p. 8869-75.

44. Pon, R.A., N.J. Biggs, and H.J. Jennings, *Polysialic acid bioengineering of neuronal cells by N-acyl sialic acid precursor treatment*. *Glycobiology*, 2007. **17**(3): p. 249-60.
45. Kayser, H., et al., *Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(24): p. 16934-8.
46. Keppler, O.T., et al., *Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(3): p. 1308-14.
47. Schmidt, C., et al., *Incorporation of N-propanoylneuraminic acid leads to calcium oscillations in oligodendrocytes upon the application of GABA*. *FEBS Lett*, 2000. **478**(3): p. 276-80.
48. Schmidt, C., et al., *Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 19146-52.
49. Wolf, S., et al., *Chemical synthesis and enzymatic testing of CMP-sialic acid derivatives*. *Chembiochem*, 2012. **13**(17): p. 2605-15.
50. Keppler, O.T., et al., *Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications*. *Glycobiology*, 2001. **11**(2): p. 11R-18R.
51. Kontou, M., et al., *Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells*. *Glycoconj J*, 2008. **25**(3): p. 237-44.
52. Kontou, M., et al., *The key enzyme of sialic acid biosynthesis (GNE) promotes neurite outgrowth of PC12 cells*. *Neuroreport*, 2008. **19**(12): p. 1239-42.
53. Gravvanis, A.I., et al., *Effect of genetically modified Schwann cells with increased motility in end-to-side nerve grafting*. *Microsurgery*, 2005. **25**(5): p. 423-32.
54. Weinhold, B., et al., *Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(52): p. 42971-7.
55. Galuska, S.P., et al., *Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(42): p. 31605-15.
56. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. *Biochem J*, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
57. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
58. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(2): p. 227-36.
59. Scheller, J., N. Ohnesorge, and S. Rose-John, *Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer*. *Scand J Immunol*, 2006. **63**(5): p. 321-9.
60. Lee, H.K., et al., *Interleukin-6 is required for the early induction of glial fibrillary acidic protein in Schwann cells during Wallerian degeneration*. *J Neurochem*, 2009. **108**(3): p. 776-86.
61. Reichert, F., R. Levitzky, and S. Rotshenker, *Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves*. *Eur J Neurosci*, 1996. **8**(3): p. 530-5.
62. Simpson, R.J., et al., *Interleukin-6: structure-function relationships*. *Protein Sci*, 1997. **6**(5): p. 929-55.
63. Knupfer, H. and R. Preiss, *sIL-6R: more than an agonist?* *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(1): p. 87-91.
64. Rose-John, S., et al., *The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches*. *Expert Opin Ther Targets*, 2007. **11**(5): p. 613-24.
65. Diamant, M., et al., *Stimulation of the B9 hybridoma cell line by soluble interleukin-6 receptors*. *J Immunol Methods*, 1994. **173**(2): p. 229-35.

66. Grotzinger, J., et al., *IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?* Biol Chem, 1999. **380**(7-8): p. 803-13.
67. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function.* Biochem J, 1994. **300 (Pt 2)**: p. 281-90.
68. Su, J.L., et al., *A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor (gp80) inhibits angiogenesis and tumor growth.* Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4827-35.
69. Peters, M., A.M. Muller, and S. Rose-John, *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis.* Blood, 1998. **92**(10): p. 3495-504.
70. Bourde, O., et al., *Quantification of interleukin-6 mRNA in wallerian degeneration by competitive reverse transcription polymerase chain reaction.* J Neuroimmunol, 1996. **69**(1-2): p. 135-40.
71. Kurek, J.B., et al., *Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation.* Neuromuscul Disord, 1996. **6**(2): p. 105-14.
72. Lara-Ramirez, R., et al., *Expression of interleukin-6 receptor alpha in normal and injured rat sciatic nerve.* Neuroscience, 2008. **152**(3): p. 601-8.
73. Hirota, H., et al., *Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2627-34.
74. Bolin, L.M., et al., *Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury.* J Neurochem, 1995. **64**(2): p. 850-8.
75. Ito, Y., et al., *Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves.* Brain Res, 1998. **793**(1-2): p. 321-7.
76. Murphy, P.G., et al., *Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons.* J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 2): p. 5130-8.
77. Richardson, P.M., et al., *Responses of the nerve cell body to axotomy.* Neurosurgery, 2009. **65**(4 Suppl): p. A74-9.
78. Galiano, M., et al., *Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice.* Eur J Neurosci, 2001. **14**(2): p. 327-41.
79. Insera, M.M., et al., *Peripheral nerve regeneration in interleukin 6-deficient mice.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000. **126**(9): p. 1112-6.
80. Zhong, J., et al., *Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice.* J Neurosci, 1999. **19**(11): p. 4305-13.
81. Terzis, J.K., D.D. Sun, and P.K. Thanos, *Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair.* J Reconstr Microsurg, 1997. **13**(3): p. 215-25.
82. Boedts, D., *A comparative experimental study on nerve repair.* Arch Otorhinolaryngol, 1987. **244**(1): p. 1-6.
83. Inaloz, S.S., et al., *Comparison of microsuturing to the use of tissue adhesives in anastomosing sciatic nerve cuts in rats.* Neurosurg Rev, 1997. **20**(4): p. 250-8.
84. Suri, A., V.S. Mehta, and C. Sarkar, *Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study.* Neurol India, 2002. **50**(1): p. 23-6.
85. Ornelas, L., et al., *Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment.* J Reconstr Microsurg, 2006. **22**(2): p. 123-8.
86. Ornelas, L., et al., *Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part I. Wave amplitude, conduction velocity, and plantar-length factors.* J Reconstr Microsurg, 2006. **22**(2): p. 119-22.

87. Cruz, N.I., N. Debs, and R.E. Fiol, *Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs*. *Plast Reconstr Surg*, 1986. **78**(3): p. 369-73.
88. Temple, C.L., et al., *Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: an in vitro biomechanical assessment of techniques*. *J Reconstr Microsurg*, 2004. **20**(8): p. 645-50.
89. Egloff, D.V. and A. Narakas, *Nerve anastomoses with human fibrin. Preliminary clinical report (56 cases)*. *Ann Chir Main*, 1983. **2**(2): p. 101-15.
90. Isaacs, J.E., et al., *Comparative analysis of biomechanical performance of available "nerve glues"*. *J Hand Surg Am*, 2008. **33**(6): p. 893-9.
91. Narakas, A., *The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves*. *Orthop Clin North Am*, 1988. **19**(1): p. 187-99.
92. Nishimura, M.T., et al., *Mechanical resistance of peripheral nerve repair with biological glue and with conventional suture at different postoperative times*. *J Reconstr Microsurg*, 2008. **24**(5): p. 327-32.
93. Smahel, J., V.E. Meyer, and U. Bachem, *Glueing of peripheral nerves with fibrin: experimental studies*. *J Reconstr Microsurg*, 1987. **3**(3): p. 211-20.
94. Choi, B.H., et al., *Autologous fibrin glue in peripheral nerve regeneration in vivo*. *Microsurgery*, 2005. **25**(6): p. 495-9.
95. Akassoglou, K., et al., *Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice*. *Neurosci Lett*, 2003. **338**(3): p. 185-8.
96. Al-Majed, A.A., T.M. Brushart, and T. Gordon, *Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons*. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(12): p. 4381-90.
97. Al-Majed, A.A., et al., *Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration*. *J Neurosci*, 2000. **20**(7): p. 2602-8.
98. Brushart, T.M., et al., *Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration*. *Exp Neurol*, 2005. **194**(1): p. 221-9.
99. Geremia, N.M., et al., *Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression*. *Exp Neurol*, 2007. **205**(2): p. 347-59.
100. Danielsen, N., G. Lundborg, and M. Frizell, *Nerve repair and axonal transport: outgrowth delay and regeneration rate after transection and repair of rabbit hypoglossal nerve*. *Brain Res*, 1986. **376**(1): p. 125-32.
101. Forman, D.S. and R.A. Berenberg, *Regeneration of motor axons in the rat sciatic nerve studied by labeling with axonally transported radioactive proteins*. *Brain Res*, 1978. **156**(2): p. 213-25.
102. Brushart, T.M., *Motor axons preferentially reinnervate motor pathways*. *J Neurosci*, 1993. **13**(6): p. 2730-8.
103. Manthorpe, M., et al., *Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons*. *J Cell Biol*, 1983. **97**(6): p. 1882-90.
104. Riley, D.A., et al., *Identifying motor and sensory myelinated axons in rabbit peripheral nerves by histochemical staining for carbonic anhydrase and cholinesterase activities*. *Brain Res*, 1988. **453**(1-2): p. 79-88.
105. Li, M., et al., *Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse*. *J Neurosci Res*, 1996. **46**(4): p. 404-14.
106. Mukhopadhyay, G., et al., *A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration*. *Neuron*, 1994. **13**(3): p. 757-67.
107. Boyd, J.G. and T. Gordon, *Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury*. *Mol Neurobiol*, 2003. **27**(3): p. 277-324.
108. Klimaschewski, L., B. Hausott, and D.N. Angelov, *The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration*. *Int Rev Neurobiol*, 2013. **108**: p. 137-71.

109. Gordon, T., et al., *The resilience of the size principle in the organization of motor unit properties in normal and reinnervated adult skeletal muscles*. Can J Physiol Pharmacol, 2004. **82**(8-9): p. 645-61.
110. Ito, M. and M. Kudo, *Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig*. Acta Anat (Basel), 1994. **151**(2): p. 124-30.
111. Rich, M. and J.W. Lichtman, *Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers*. Neuron, 1989. **3**(6): p. 677-88.
112. Son, Y.J. and W.J. Thompson, *Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells*. Neuron, 1995. **14**(1): p. 133-41.
113. Bray, G.M. and A.J. Aguayo, *Regeneration of peripheral unmyelinated nerves. Fate of the axonal sprouts which develop after injury*. J Anat, 1974. **117**(Pt 3): p. 517-29.
114. Hennig, R. and E. Dietrichs, *Transient reinnervation of antagonistic muscles by the same motoneuron*. Exp Neurol, 1994. **130**(2): p. 331-6.
115. Mackinnon, S.E., A.L. Dellon, and J.P. O'Brien, *Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model*. Muscle Nerve, 1991. **14**(11): p. 1116-22.
116. Toft, P.B., K. Fugleholm, and H. Schmalbruch, *Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat*. Muscle Nerve, 1988. **11**(8): p. 880-9.
117. Brushart, T.M., *Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study*. Restor Neurol Neurosci, 1990. **1**(3): p. 281-7.
118. Smalheiser, N.R. and S.M. Crain, *The possible role of "sibling neurite bias" in the coordination of neurite extension, branching, and survival*. J Neurobiol, 1984. **15**(6): p. 517-29.
119. Brown, M.C. and C.M. Booth, *Postnatal development of the adult pattern of motor axon distribution in rat muscle*. Nature, 1983. **304**(5928): p. 741-2.
120. Redfern, P.A., *Neuromuscular transmission in new-born rats*. J Physiol, 1970. **209**(3): p. 701-9.
121. Stelzner, D.J. and J.A. Strauss, *A quantitative analysis of frog optic nerve regeneration: is retrograde ganglion cell death or collateral axonal loss related to selective reinnervation?* J Comp Neurol, 1986. **245**(1): p. 83-106.
122. Brown, M.C. and C.M. Booth, *Segregation of motor nerves on a segmental basis during synapse elimination in neonatal muscles*. Brain Res, 1983. **273**(1): p. 188-90.
123. Changeux, J.P. and A. Danchin, *Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks*. Nature, 1976. **264**(5588): p. 705-12.
124. Jenq, C.B., K. Chung, and R.E. Coggeshall, *Postnatal loss of axons in normal rat sciatic nerve*. J Comp Neurol, 1986. **244**(4): p. 445-50.
125. Riley, D.A., *Spontaneous elimination of nerve terminals from the endplates of developing skeletal myofibers*. Brain Res, 1977. **134**(2): p. 279-85.
126. Riley, D.A., *Multiple innervation of fiber types in the soleus muscles of postnatal rats*. Exp Neurol, 1977. **56**(2): p. 400-9.
127. Black, M.M. and R.J. Lasek, *Axonal transport of actin: slow component b is the principal source of actin for the axon*. Brain Res, 1979. **171**(3): p. 401-13.
128. Devor, M., *Neuroplasticity in the sparing or deterioration of function after early olfactory tract lesions*. Science, 1975. **190**(4218): p. 998-1000.
129. Ochs, S., *Calcium and the mechanism of axoplasmic transport*. Fed Proc, 1982. **41**(7): p. 2301-6.
130. Evans, D.H. and J.G. Murray, *A study of regeneration in a motor nerve with a unimodal fiber diameter distribution*. Anat Rec, 1956. **126**(3): p. 311-33.
131. Shawe, G.D., *On the number of branches formed by regenerating nerve-fibres*. Br J Surg, 1955. **42**(175): p. 474-88.

132. Thomas, R.W. and H.A. Davenport, *Axon branching in nerve regeneration and its trophic effect on muscle*. Q Bull Northwest Univ Med Sch, 1949. **23**(2): p. 170-6.
133. de Medinaceli, L. and A.V. Seaber, *Experimental nerve reconnection: importance of initial repair*. Microsurgery, 1989. **10**(1): p. 56-70.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Johann Pratschke, Direktor der Chirurgischen Klinik. Ohne seine großzügige und unermüdliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht realisiert worden.

Danken möchte ich insbesondere auch Herrn Prof. Thomas M. Brushart, Direktor der Abteilung für Handchirurgie und Leiter des Labors für Periphere Nervenforschung am Johns Hopkins Hospital in Baltimore, der während eines Forschungsaufenthaltes in mir die Neugier hinsichtlich dieses Fachgebietes weckte. Ich danke ihm für den anhaltenden kritischen Austausch auch über die Wissenschaft hinaus. Er ist ein wichtiger Lehrer und ein großes Vorbild in meinem Leben.

Ein großer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Werner Reutter. Ein wichtiger Teil der Arbeiten wurde durch ihn unterstützt. Ich danke ihm für seine Geduld und den intensiven fachlichen Austausch. Leider kann er das Abschließen dieser Arbeit nicht mehr miterleben.

Einen weiteren Dank möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Heppner, Direktor des Instituts für Neuropathologie der Charité, aussprechen. In den zurückliegenden Jahren hat er meine Arbeit eng begleitet. Ich danke ihm für die immer währende Unterstützung nicht zuletzt in der histologischen Aufarbeitung vieler Proben, und die vielen motivierenden Gespräche.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Manfred Infanger. Während der fachärztlichen Weiterbildung empfing ich durch ihn, als meinen Lehrer, große Unterstützung auch in der Umsetzung und Durchführung wichtiger wissenschaftlicher Experimente. Vielen Dank auch an die Doktorandin Frau Dr. Friederike Fojuth, die an ersten Projekten dieser Arbeit intensiv mitwirkte.

Herrn Dr. med. Georgios Koulaxouzidis möchte ich herzlich für die enge Zusammenarbeit während vieler wissenschaftlicher Projekte danken. Sein Engagement und seine konstruktive Kritik haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Reinhard Roßdeutscher, einem guten Freund, der die Arbeit mit großer Sorgfalt stilistisch revidierte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ich danke meinen Eltern für ihre andauernde Hilfe. Besonders danke ich meiner Frau für Ihre nicht endende Unterstützung, ihre große Toleranz und ihr Vertrauen. Ohne ihr Verständnis wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Dr. med. Christian Witzel