

## Sproženje kolateralnega brstenja senzoričnih aksonov pri podgani\*

### Induction of collateral sprouting of sensory axons in the rat\*

Maja Pavčnik\*\*, Uroš Kovačič\*\*\*

Ključne besede  
aksoni  
živec, degeneracija  
živec, regeneracija  
peronealni živec  
suralni živec  
podgane

Key words  
axons  
nerve degeneration  
nerve regeneration  
peroneal nerve  
sural nerve  
rats

**Izvleček.** Kolateralno brstenje v perifernem živčevju je razvejeno izraščanje poganjkov iz nepoškodovanih aksonov v sosednja področja denerviranega tarčnega tkiva. Pri sproženju kolateralnega brstenja aksonov verjetno hkrati delujejo dejavniki iz degeneriranih živčnih poti, denerviranega tarčnega tkiva in morebitno medsebojno delovanje poškodovanih na nepoškodovane nevrone v spinalnem gangliju (transnevronska spodbuda). Uporabili smo model, pri katerem je na nepoškodovan suralni živec od strani prišit odsek drugega živca (*end-to-side* anastomoza). V skupini A smo na nepoškodovani suralni živec od strani prišili odsek peronealnega živca iz nasprotne noge, tako da na strani anastomoze ni bil poškodovan noben živec. V skupini B smo naredili enako, poleg tega pa smo na strani anastomoze prerezali še dorzokutane živce iz spinalnih segmentov L4–L6 in tako poškodovali nevrone v spinalnem gangliju suralnega živca, koža v okolici končičev suralnega živca pa ni bila denervirana. V skupini C smo izrezali odsek peronealnega živca in ga od strani prišili na nepoškodovani suralni živec na isti nogi. S tem in s prerezanjem safeničnega živca smo denervirali tudi kožo v okolici področja oživitvenja suralnega živca. Vraščanje nociceptivnih aksonov v odseke živcev, od strani prišitih na suralni živec, smo ugotavljali s testom vščipa živca in s štetjem mieliniziranih aksonov na prečnih rezih teh odsekov. S testom vščipa živca pri živalih v skupini A po 8 tednih nikjer nismo ugotovili brstenja aksonov suralnega živca v od strani prišite odseke peronealnega

**Abstract.** Collateral sprouting of axons in the peripheral nervous system is a branching outgrowth of new axon terminals from non-injured axons into adjacent denervated regions of target tissue. The initiation of collateral sprouting is probably triggered by the interaction between the factors released by degenerated neural pathways or denervated target tissue, and putative interaction between the injured and non-injured neurons within a dorsal root ganglion (transneuronal mechanism). Sprouting of axons along the neurilemmal tubes of Schwann cells was investigated by an end-to-side anastomosis of a peroneal nerve segment to the intact sural nerve on the hind limb of the rat. In group A, the peroneal nerve segment from the contralateral limb was attached to the sural nerve. None of the nerves on the side of the anastomosis were injured. In group B, the same procedure was used as in group A. In addition, dorso-cutaneous nerves from the L4–L6 spinal segments were cut. Injured neurons were therefore present in the dorsal root ganglia from which axons of the sural nerve arise. The skin of the limb was not denervated. In group C, an end-to-side anastomosis of the peroneal nerve segment from the ipsilateral limb was made on the sural nerve. On the same limb, the saphenus nerve was cut and ligated. The skin around the terminal innervation field of the sural nerve was therefore denervated. The growth of sensory axon sprouts into the anastomosed nerve segments was monitored by the nerve-pinch test. In addition, the number of myelinated axons in the anastomo-

\*Objavljeno je skrajšano delo, ki je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1997.

\*\*Maja Pavčnik, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

\*\*\*Uroš Kovačič, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

živca. Nasprotno pa smo brstenje ugotovili v vseh odsekih pri živalih v skupini C in pri štirih od petih odsekov v skupini B. Histološko smo v prišitih odsekih živca v skupini A našli le posamezne mielinizirane aksone, kar je bilo statistično značilno manj kot v skupinah B in C ( $p < 0,05$ ). Število aksonov pri skupini C pa je bilo statistično značilno večje kot pri skupini B ( $p < 0,02$ ). Ugotovili smo, da za sprožitev kolateralnega brstenja prisotnost praznih, degeneriranih živčnih poti ne zadostuje, ampak je potrebno denervirano tarčno tkivo (ali transnevronska spodbuda). Transnevronska spodbuda je pomemben sprožilni dejavnik kolateralnega brstenja.

sed nerve cross-sections was counted. Eight weeks after surgery the nerve-pinch test showed no sprouting of the sural nerve into the anastomosed nerve segments of the peroneal nerve in any animal in group A. In contrast, we detected sprouting in all group C animals and in four out of five animals in group B. We found only few myelinated fibres in the anastomosed peroneal nerves in group A. This was statistically significantly less than in groups B and C ( $p < 0.05$ ). Myelinated fibres in the anastomosed peroneal nerve in group B significantly outnumbered those in group C ( $p < 0.02$ ). We found out that collateral sprouting cannot be induced by Schwann cell tubes alone, but rather denervated target tissue or transneuronal mechanisms are needed to induce the process. Transneuronal mechanism is an important factor stimulating the initiation of collateral sprouting.

---

## Uvod

### Kolateralno brstenje

Pollock je v kliničnih študijah ugotovil, da se je koža po senzorični denervaciji tkiva delno oživčila, še preden bi lahko prišlo do regeneracije aksonov iz proksimalnega krna (1). Ugotovili so, da je to posledica izraščanja živčnih poganjkov iz nepoškodovanih aksonov neprizadetega sosednjega živca, zaradi česar se inervacijsko področje tega živca širi v tuje področje bližnjega prizadetega živca (2). Ta pojav so poimenovali kolateralno brstenje.

### Kolateralno brstenje senzoričnih aksonov v koži

Kolateralno brstenje visokopražnih nociceptivnih živčnih vlaken (A $\delta$ ) v koži zajčjega stopala so histološko dokazali že Weddell in sodelavci (2). Kasneje so kolateralno brstenje vlaken A $\delta$  potrdile številne morfološke in funkcionalne raziskave na različnih poskusnih živalih (3–11). Klinična opažanja kažejo, da ta vlakna brstijo tudi pri človeku (12–14).

Nasprotno temu pa se rezultati poskusov, ki so bili narejeni na različnih odraslih sesalcih, glede kolateralnega brstenja vlaken C (15–18) in vlaken A $\beta$  (6, 7, 19–21) ne ujemajo. Zdi se, da kolateralno brstenje vlaken A $\beta$  in C, če že obstaja, pri odraslem sesalcu funkcionalno ni pomembno (22).

Po poškodbi senzoričnih aksonov njihovi distalni krni, ki se nahajajo v perinevrijskih cevkah v dermisu, hitro propadejo in izginejo (2, 23). Kolateralni brsti, izvirajoči iz sosednjih nepoškodovanih aksonov, vdrejo v izpraznjene perinevrijske cevke, v katerih so bili prej aksoni poškodovanega živca, in po njih rastejo v subepidermalno horizontalno mrežo cevk, ki jih tvorijo Schwannove celice propadlih aksonov (9, 24).

Kolateralni brsti v koži torej rastejo po že obstoječih razpoložljivih poteh, podobno kot regenerirajoči aksoni rastejo vzdolž degeneriranega distalnega krna živca. Kako brsti najdejo prazne perinevrijske cevke, ki vodijo do denerviranih tarčnih celic, ni znano.

## Sproženje kolateralnega brstenja

### Vpliv denerviranega tarčnega tkiva

Domnevo, da naj bi sproščanje rastnih dejavnikov iz denerviranih tarčnih tkiv spodbudilo brstenje sosednjih nepoškodovanih aksonov, so podprli Diamond in sodelavci z ugotovitvijo o odločilnem pomenu živčnega rastnega dejavnika (angl. *nerve growth factor* – NGF) za brstenje senzoričnih nevronov v denervirano področje kože (23). Potem ko so v denervirani koži ugotovili povečano sintezo NGF, so proučili vpliv protiteles proti NGF na kolateralno brstenje in ugotovili, da so omenjena protitelesa popolnoma zavrla kolateralno brstenje senzoričnih (23) in simpatičnih (25) aksonov.

Izvor endogenega NGF, ki naj bi vplival na brstenje, še ni pojasnjen. Prisotnost NGF in NGF-mRNA v koži odraslega so opisali v keratinocitih, fibroblastih ter Schwannovih celicah (26, 27). Do povišane koncentracije NGF v denervirani koži bi lahko prišlo zaradi odsotnosti živčnih končičev, ki normalno privzemajo NGF (28, 29) in/ali lokalnega povečanja sinteze NGF (30). Nedavno so Mearow in sodelavci dokazali, da se raven NGF-mRNA po denervaciji kože poviša (31). Glavni vir povišane koncentracije NGF v denervirani koži bi lahko bile epidermalne celice in/ali Schwannove celice v degeneriranih živčnih poteh. Relativen pomen NGF iz epidermisa ali takih Schwannovih celic za sproženje aksonskega brstenja ni znan, saj pri običajnih razmerah kolateralnega brstenja v koži oba dejavnika vedno nastopata skupaj.

### Transnevronske mehanizem

Rotshenker (32) je opazil, da po unilateralni denervaciji mišice pri žabi pride do brstenja aksonov in vzpostavljanja novih sinaps tudi v kontralateralni mišici (33). Sproženje takega brstenja je pripisal prenosu nekega dražljaja med nevroni v hrbtnjači (transnevronske mehanizem). Po tem mehanizmu naj bi celično telo poškodovanega motonevrona preko transnevronske povezave vplivalo na celično telo kontralateralnega nepoškodovanega nevrona istega segmenta hrbtnjače in sprožilo brstenje le-tega (32). Ker so tudi pri poškodbah perifernih živcev, ki jim sledi kolateralno brstenje kožnih aksonov iz sosednjih živcev, v istih spinalnih ganglijih tako poškodovani kot nepoškodovani nevroni, bi tudi med temi lahko prišlo do transnevronskega spodbujanja brstenja. O tem v literaturi nismo našli nič znanega.

### Izvor aksonskih brstov pri kolateralnem brstenju

Naše znanje o izvoru brstov temelji na spoznanjih o kolateralnem brstenju motoričnih aksonov. Ugotovili so, da v delno denerviranih mišicah brsti izraščajo iz preterminalnih Ranvierovih zažemkov preostalih nepoškodovanih mieliniziranih aksonov, kar so poimenovali nodalno brstenje (34, 35). Slack in sodelavci so opazili, da je glavni dejavnik, ki odloča o tem, iz katerih Ranvierovih zažemkov bo prišlo do brstenja, oddaljenost zažemka

od denerviranih tarčnih celic (36). Brsti rastejo po tistih izpraznjenih nevrilemskih cevkah, po katerih bo pot aksonov do denerviranih tarčnih celic najkrajša. Brsti pa lahko izraščajo tudi iz nepoškodovanih nemieliniziranih aksonskih končičev, kar so poimenovali terminalno brstenje (36). Nič pa ni znanega o izvoru brstov pri kolateralnem brstenju kožnih senzoričnih aksonov. Še posebej ni znano, ali lahko brstijo aksoni le v svojih terminalnih predelih ali tudi bolj proksimalno vzdolž njihovega poteka v perifernem živcu.

### Namen in hipoteza

Da bi pojasnili nekatere omenjene odprte probleme, smo za proučevanje kolateralnega brstenja uporabili model, pri katerem je na en živec od strani prišit drug živec (*end-to-side* anastomozo). V ta namen smo izkoristili opažanja drugih raziskovalcev, da začnejo nepoškodovani aksoni prvega perifernega živca brsteti v distalni krn drugega, prerezanega živca, ki so ga s prerezano površino od strani prišli na nepoškodovani prvi živec (37, 38).

V raziskavi smo preverjali tri hipoteze:

- za sprožitev brstenja prisotnost praznih, degeneriranih živčnih poti ne zadostuje, potrebno je denervirano tarčno tkivo (ali transnevronska spodbuda);
- transnevronska spodbuda pomembno prispeva kot sprožilni dejavnik kolateralnega brstenja;
- aksonski brsti izvirajo samo iz tistih delov senzoričnih aksonov, ki so v neposredni bližini degeneriranih živčnih poti.

### Materiali in metode

#### Živali

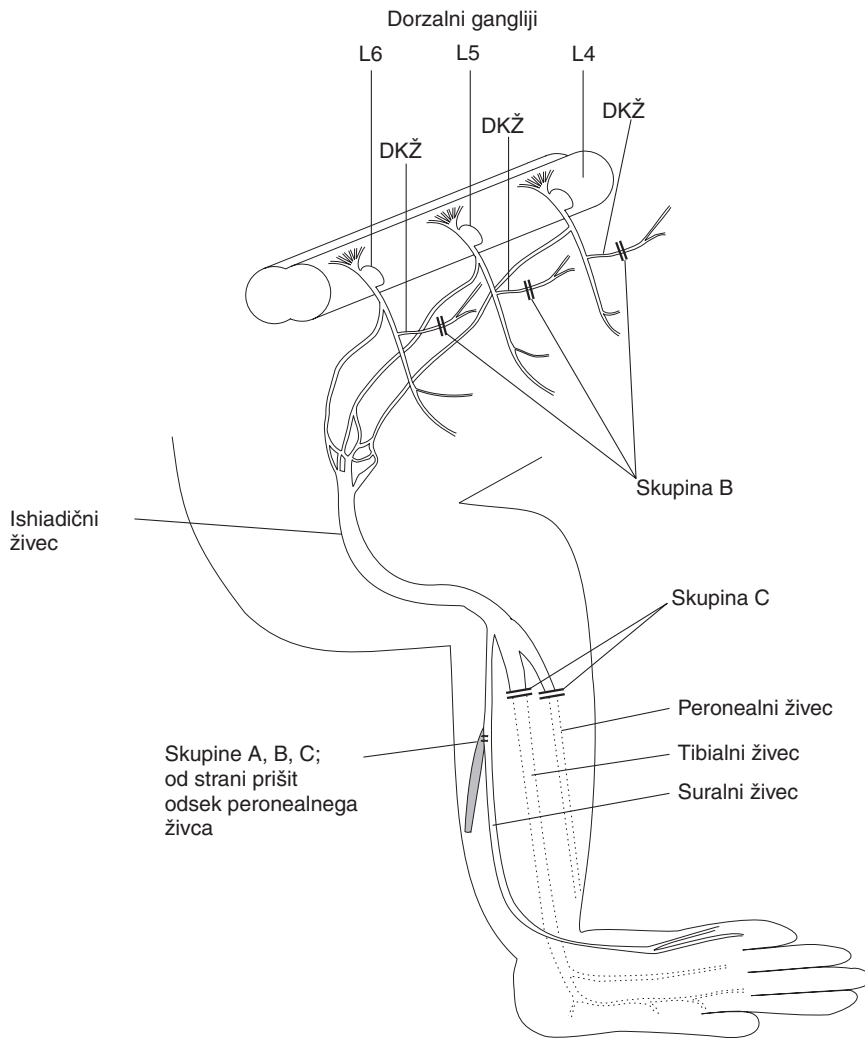
Poskuse smo opravili na samicah belih podgan (soj Wistar), ki so ob prvi operaciji tehtale med 200–220 g. Kot anestetik smo pri kirurških posegih uporabljali mešanico dihidrotiazina (Rompun, Bayer AG Leverkusen, 8 mg/kg) in ketaminhidroklorida (Ketalar, Parke-Davis & GMBH, AG Berlin, 60 mg/kg), ki smo jo živalim vbrizgali v peritonealno votlino. Med testom vščipa živca pa so bile živali le delno anestezirane z mešanico dihidrotiazina (2 mg/kg) in ketaminhidroklorida (15 mg/kg).

#### Operativni postopki

Da bi preverili postavljene hipoteze, smo naredili poskuse na treh skupinah živali (slika 1).

**Skupina A (n = 5).** Iz leve zadnje noge smo izolirali približno 2 cm dolg odsek peronealnega živca. Izrezani odsek peronealnega živca smo nato od strani prišli na nepoškodovani suralni živec desne kontralateralne zadnje noge. Vse periferne živce na desni strani vključno z DKŽ (dorзокutani živci – to so kožne veje zadnjih vej spinalnih živcev) smo pustili nepoškodovane (39).

**Skupina B (n = 5).** Iz leve zadnje noge smo izrezali približno 2 cm dolg odsek peronealnega živca in ga od strani prišli na nepoškodovani suralni živec desne noge. Vse periferne živce, ki na desni strani, kjer smo naredili anastomozo, oživčujejo področje kože



Slika 1. Shematski prikaz anatomskih razmer in operativnih postopkov pri poskusnih živalih. Skupina A – samo od strani prišit odsek živca; skupina B – od strani prišit odsek živca in prerezani DKŽ (dorzokutani živci); skupina C – od strani prišit odsek živca in prerezani suralnem živcu sosednji periferni živci.

na meji s področjem oživčenja suralnega živca na stopalu, smo pustili nepoškodovane. DKŽ iz ledvenih spinalnih segmentov L4–L6 na tej strani živali pa smo prerezali. S tem smo poskusili sprožiti kolateralno brstenje aksonov suralnega živca v od strani prišit odsek živca prek transnevronske mehanizme v dorzalnih ganglijah (predvsem dorzalni ganglij iz petega ledvenega segmenta hrbtenjače), iz katerih izvirajo tudi nociceptivna

vlakna suralnega živca (40). DKŽ, ki smo jih prerezali, so senzorični živci, ki imajo svoja področja oživčenja na koži glutealnega področja in ne mejijo na področje oživčenja suralnega živca, ki se razteza po lateralni strani stopala in sega do sredine meč.

**Skupina C (n=5).** Na desni zadnji nogi smo izrezali približno 2 cm dolg odsek peronealnega živca in ga tako kot pri prejšnjih skupinah od strani prišli na nepoškodovani suralni živec na isti nogi. Na tej nogi smo nato prerezali še safenični živec, proksimalna konca safeničnega in peronealnega živca pa smo podvezali ter tako preprečili regeneracijo obeh živcev. Kožo stopala v okolici področja oživčenja suralnega živca na operirani strani smo na ta način denervirali. DKŽ smo pustili nepoškodovane.

Pri vseh poskusnih živalih smo brstenje aksonov suralnega živca v od strani prišite odseke peronealnega živca po 8 tednih preverili z vščipom živca. Nato smo živali žrtvovali z izkrvavitvijo v anesteziji in odvzeli vzorce živcev za histološki prikaz mieliniziranih vlaken, ki smo jih nato na prečnem rezu živca tudi prešteli.

### Podrobnejši opis kirurških postopkov

Kirurški postopki, ki smo jih opravili na poskusnih živalih v globoki anesteziji, so vključevali prerezanje posameznih perifernih živcev na zadnji nogi podgane, šivanje živcev na način *end-to-side* in prerezanje DKŽ v ledvenem in križnem predelu hrbta.

Potem ko smo prerezali kožo in mišice na zadnji strani stegna, smo si ogledali podkolensko kotanjo z ishiadičnim živcem in njegovimi vejami. Izbrane veje tega živca (peronealni in suralni živec) smo izpreparirali. Peronealni živec smo podvezali in distalno izrezali 2 cm dolg odsek tega živca in ga shranili v fiziološko tekočino.

*End-to-side* anastomozo smo napravili na suralnem živcu. Odsek peronealnega živca smo od strani prišli na suralni živec s štirimi epinevrijskimi šivi 11/0. Živce smo šivali s pomočjo operacijskega mikroskopa. Posebej smo pazili, da pri šivanju nismo poškodovali aksonov v suralnem živcu in da so šivi potekali samo skozi epinevrij.

Do safeničnega živca smo pristopili v področju dimelj. Prerezali smo kožo, nato pa izpreparirali in podvezali živec. Distalno smo izrezali približno 2 cm dolg odsek živca in tako preprečili regeneracijo živca.

V poskusih, kjer je bilo treba poškodovati DKŽ, smo v koži ledvenega predela hrbta 1 cm desno od mediane linije napravili 4–5 cm dolg rez ter na ta način dobili pristop do DKŽ. Izbrane DKŽ iz hrbtenjačnih segmentov L4–L6 smo v čim večjem obsegu (približno 2 cm) izrezali ter na ta način preprečili popolno regeneracijo živcev.

### Testiranja in meritve

#### Razdalja, ki so jo dosegli brsteči aksoni v od strani prišitem živčnem odseku

Pri testiranju smo odseke živcev, od strani prišitih na suralni živec, očistili od vseh strani in jih na distalnem koncu odrezali. Vraščanje nociceptivnih aksonov v odseke živcev smo ugotovili z vščipom živca pri rahlo anestezirani živali. Žival je v primeru prisotnosti nociceptivnih aksonov na vščip reagirala z umikom noge. Testiranje smo začeli na najbolj distalnem koncu živčnega odseka in ga nadaljevali v milimetrskih korakih v smeri

proti anastomozi. Izmerili smo razdaljo od anastomoze do najbolj distalne točke, na kateri je žival reagirala na vščip živca (točka pozitivnega vščipnega testa).

### **Analiza prečnih rezin vzorcev živcev**

#### **Izdelava poltankih rezin vzorcev živcev**

Za histološki prikaz mieliniziranih vlaken smo 8 tednov po operaciji odvzeli vzorce iz od strani prišitega odseka peronealnega živca 4 in 8 mm distalno od anastomoze. Vzorce suralnega živca smo pri obravnavanih živalih odvzeli 4 mm proksimalno in 4 mm distalno od *end-to-side* anastomoze. Pri normalnih neobravnavanih živalih ( $n=4$ ) so bili vzorci suralnega živca vzeti iz anatomskih mest, ki sta ustrezali mestoma vzorcev pri obravnavanih živalih. Vzorce smo namočili v fiksativ (2 % glutaraldehid in 2 % paraformaldehid v veronal-acetatnem puftru, pH 7,4) za 12 ur. Fiksaciji je sledilo spiranje v veronal-acetatnem puftru, dehidracija skozi alkohole naraščajočih koncentracij in vklapljanje v epon. Po dveh dneh sušenja eponske smole smo vzorce prečno narezali na poltanke rezine in jih obarvali z barvilom Azur II. Mielinizirani aksoni se na preparatu prikažejo kot obarvani obročki. Le-te smo nato prešteli na celotnem prečnem prerezu živca.

#### **Štetje mieliniziranih aksonov v od strani prišitih odsekih živcev in analiza prečnih presekov in števila aksonov v suralnem živcu**

Mielinizirane aksone v histoloških preparatih od strani prišitih odsekov živcev smo štetli s pomočjo sistema za računalniško analizo slike s programom Horizon. Število in površino mieliniziranih aksonov v preparatih prečnih rezov suralnega živca smo izmerili s pomočjo računalniškega sistema za analizo slike s programom *The microcomputer imaging device* (MCID), verzija M4. Poleg omenjenih programov aparaturo sestavljajo še svetlobni mikroskop, videokamera, TV-zaslon, osebni računalnik IBM PC AT in miška. Sistem omogoča sistematično pregledovanje mikroskopske slike histološkega preparata na TV-zaslону.

Izbrane prereze smo opazovali z objektivom s 40-kratno povečavo. S premikanjem miške po podlagi smo s kazalcem na zaslonu označili aksone v od strani prišitih odsekih živcev in jih prešteli. Aksone v suralnem živcu smo s kazalcem obkrožili, jih tako prešteli in izmerili površino njihovih prečnih presekov.

### **Statistična obdelava podatkov**

Ker smo spremljali vraščanje aksonov iz suralnega živca v od strani prišite odseke peronealnega živca s pomočjo vščipnega testa in ker smo le reakcijo podgane na ščipanje od strani prišitega odseka peronealnega živca upoštevali kot pozitiven odgovor, smo rezultate, ki smo jih dobili z vščipnim testom, med skupinami primerjali s testom  $\chi^2$ . Število mieliniziranih vlaken v živcih smo predstavili kot srednjo vrednost  $\pm$  SE (iz angl. *standard error* – standardna napaka). Vrednosti v živcih iz različno obravnavanih živali smo med seboj primerjali in pri tem uporabili t-test oziroma neparametrični Wilcoxonov test z vsoto rangov za preverjanje statistične značilnosti razlik.

## Rezultati

### Kolateralno brstenje aksonov v od strani prišite odseke živcev

Osem tednov po tem, ko smo na suralni živec od strani prišli odsek peronealnega živca, smo z vščipnim testom na omenjenih odsekih preverili, kako daleč so v te odseke vrasli na vščip občutljivi aksoni suralnega živca (tabela 1). V vseh odsekih peronealnega živca v skupini živali z denervirano kožo v soseščini področja suralnega živca (skupina C) smo ugotovili točko pozitivnega vščipnega testa približno 20 mm distalno od mesta anastomoze (oziroma tako daleč, kot je bilo mogoče testirati). Nasprotno pa v skupini živali, pri kateri smo samo prišli odsek peronealnega na suralni živec, tako periferne živce na nogi kot tudi DKŽ pa smo pustili nepoškodovane (skupina A), nikjer nismo uspeli izzvati reakcije podgane z vščipom prišitega živčnega odseka. Statistično značilnost razlike smo ocenili s testom  $\chi^2$  glede na to, ali je bil vščipni test v prišitem odseku pozitiven ali negativen. Razlika med omenjenima skupinama A in C je bila statistično značilna ( $p < 0,005$ ). V skupini živali, pri kateri smo s prerezanjem DKŽ poškodovali nevrone v spinalnem gangliju, iz katerega izhajajo aksoni suralnega živca (skupina B), smo ugotovili pozitiven vščipni test pri štirih od petih od strani prišitih odsekih peronealnega živca, medtem ko pri eni izmed poskusnih živali reakcije nismo uspeli izzvati. Le pri dveh od štirih pozitivnih odgovorov smo ugotovili točko pozitivnega vščipnega testa že na največji možni oddaljenosti od mesta anastomoze (približno 20 mm). S testom  $\chi^2$  smo ugotovili, da je razlika med to skupino in skupino A (anastomoza brez drugih poškodb) glede števila odsekov s pozitivnim testom statistično značilna ( $p < 0,01$ ). Skupini B (prerezani DKŽ) in C (denervirana koža okoli področja suralnega živca) pa smo primerjali glede na to, ali je bil vščipni test že pozitiven v najbolj oddaljeni točki od anastomoze, to je na koncu prišitega odseka peronealnega živca. Test  $\chi^2$  je pokazal, da je razlika med skupinama statistično značilna ( $p < 0,05$ ).

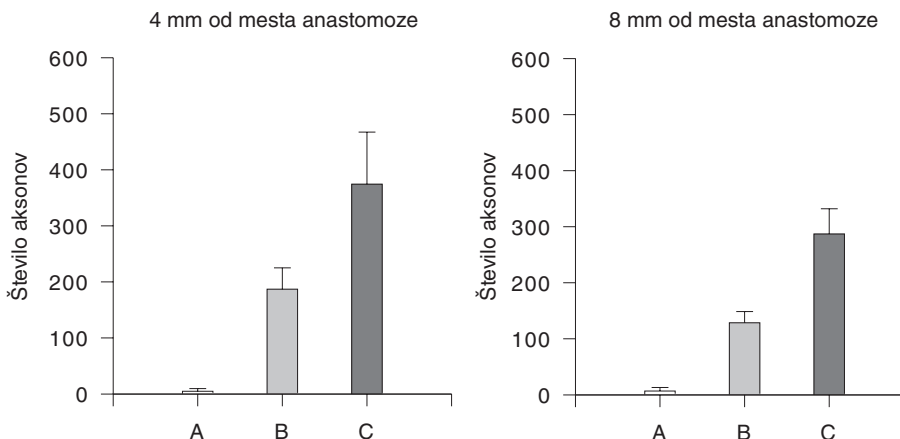
Tabela 1. Oddaljenost točke pozitivnega vščipnega testa od mesta anastomoze na od strani prišitem odseku peronealnega živca na suralni živec osem tednov po prišitju anastomoze. Skupina A – samo od strani prišit odsek živca; skupina B – od strani prišit odsek živca in prerezani dorzokutani živci; skupina C – od strani prišit odsek živca in prerezani suralnim živcu sosednji periferni živci.

SKUPINA	Razdalja od točke pozitivnega vščipnega testa do anastomoze (mm)				
A	0	0	0	0	0
B	20	10	12	0	20
C	20	20	20	20	20

### Število mieliniziranih vlaken v živčnih odsekih peronealnega živca, od strani prišitih na suralni živec

Pri vseh treh skupinah živali smo osem tednov po začetku poskusa vzeli vzorce iz od strani prišitih odsekov peronealnega živca na razdalji 4 in 8 mm distalno od mesta anastomoze s suralnim živcem. V prečnih rezinah iz teh vzorcev smo pod mikroskopom prešteli mielinizirana vlakna (slika 2).



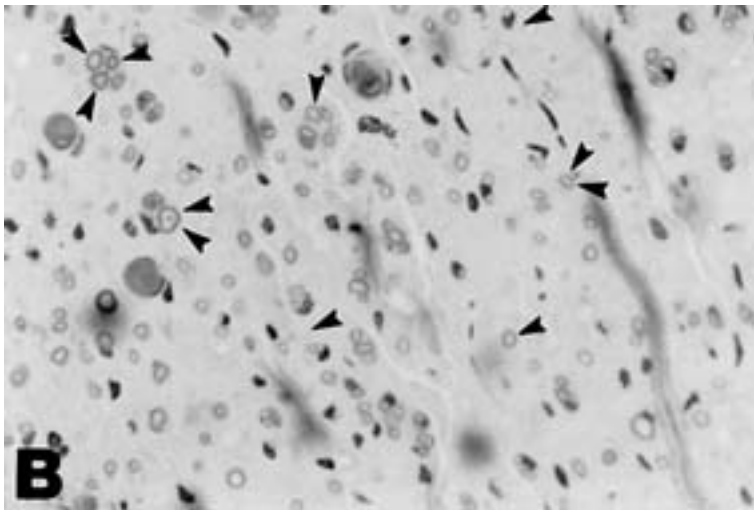
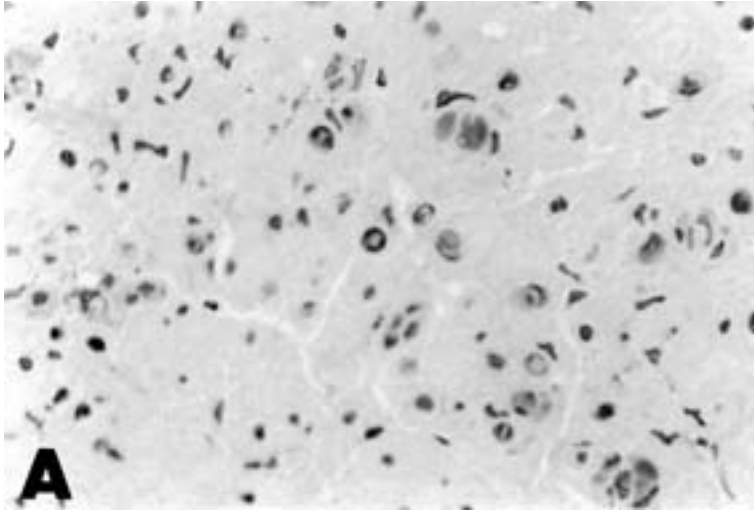


Slika 2. Število aksonov (srednje vrednosti  $\pm$  SE) v od strani prišitem odseku peronealnega živca 4 mm in 8 mm od mesta anastomoze. Skupina A ( $n = 5$ ) – samo od strani prišit odsek živca; skupina B ( $n = 5$ ) – od strani prišit odsek živca in prerezani DKŽ (dorzokutani živci); skupina C ( $n_{4mm} = 5$ ;  $n_{8mm} = 4$ ) – od strani prišit odsek živca in prerezani suralnem živcu sosednji periferni živci.

Na obeh razdaljah od anastomoze smo v preparatih skupine A (samo anastomoza) našli le posamezne mielinizirane aksone, kar je bilo statistično značilno manj kot v skupini B (prerezani DKŽ) in skupini C (denervirana koža okoli področja suralnega živca) ( $p < 0,05$ ). Razlika v številu aksonov med skupinama B in C na razdalji 4 mm ni bila statistično značilna zaradi velike variabilnosti v skupini C, 8 mm distalno od mesta anastomoze pa je bilo v prišitih odsekih statistično značilno več aksonov pri skupini C kot pri skupini B ( $p < 0,02$ ). V večini preparatov smo mielinizirane aksone opazili tudi zunaj epinevrija, vendar jih nismo vključili v analizo. Fotografski posnetki značilnih primerov prečnih rezin iz vzorcev od strani prišitih odsekov živcev iz vseh treh skupin so prikazani na sliki 3.

### Število mieliniziranih živčnih vlaken v suralnem živcu proksimalno in distalno od anastomoze

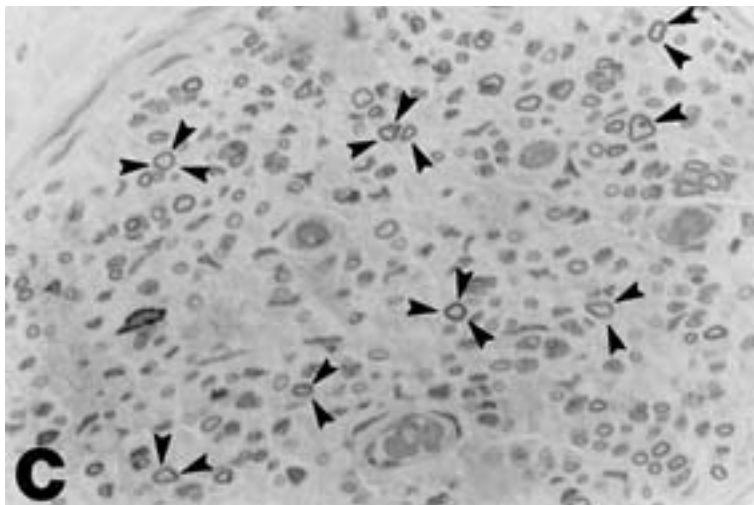
Ob izolaciji vzorcev iz od strani prišitih odsekov peronealnega živca smo pri skupinah A in C štiri milimetre proksimalno in distalno od anastomoze vzeli tudi vzorce suralnega živca. Vzorce iz neobravnavanih živali (skupina N) smo vzeli na anatomsko primerljivih mestih na suralnem živcu. V prečnih rezinah iz vzorcev iz vseh treh skupin smo pod mikroskopom prešteli mielinizirana vlakna (slika 4) in jim izmerili površino prečnih presekov. Razlike v številu vlaken med posameznimi skupinami niso bile statistično značilne ( $p > 0,05$ ). Tudi analiza frekvenčne porazdelitve aksonov v suralnem živcu glede na površino njihovih prečnih presekov (slika 5), je pokazala, da med skupino A, kjer aksoni suralnega živca niso brsteli, in skupino C, kjer je bilo brstenje aksonov suralnega živca najbolj izrazito, ni bilo pomembne razlike v porazdelitvi presekov mieliniziranih vlaken.



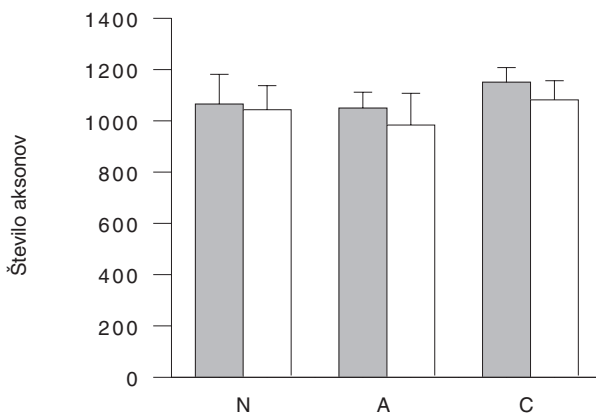
## Razpravljanje

### Pomen modela *end-to-side* anastomoze za proučevanje kolateralnega brstenja aksonov

Pri običajnem načinu sproženja kolateralnega brstenja aksonov (prekinitvev sosednjega perifernega živca) hkrati delujejo različni možni sprožilni mehanizmi (degenerirane živčne poti, denervirano tarčno tkivo, transnevronske mehanizmi), zato smo za proučevanje

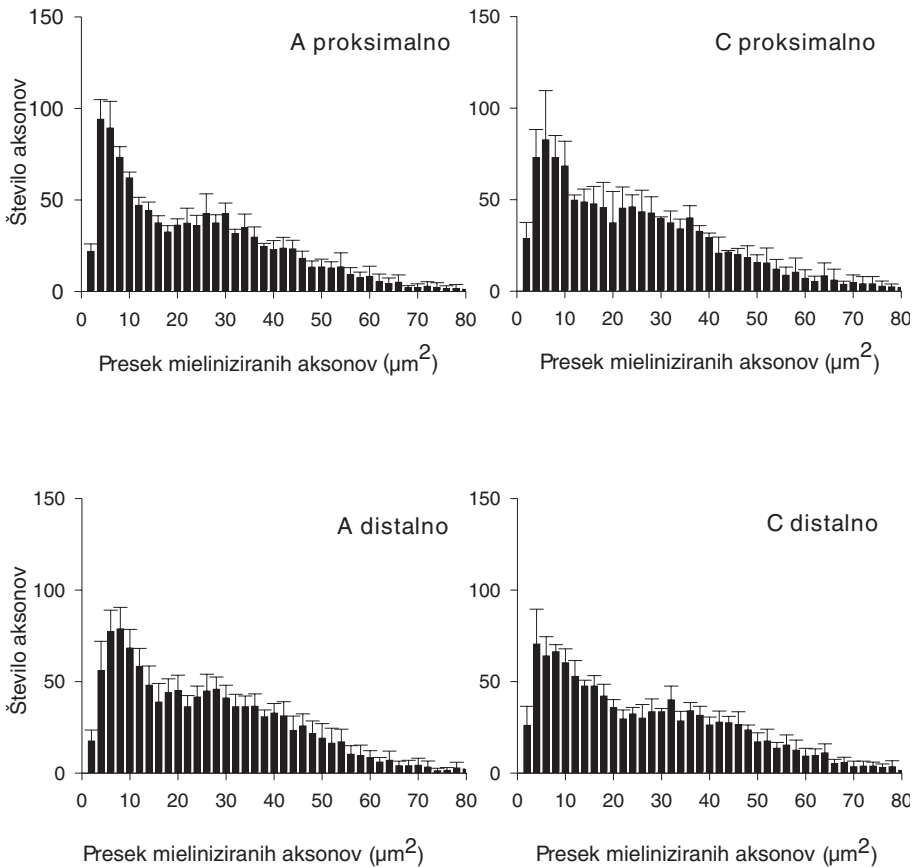


Slika 3. Histološka slika prečnega prereza odseka peronealnega živca, od strani prišitega na suralni živec. Vzorci so bili vzeti 4 mm distalno od mesta anastomoze. Mielinizirani aksoni so prikazani kot temni obročki s svetlo notranjostjo (puščice). Povečava objektiva 40-krat. A – samo od strani prišit odsek živca; B – od strani prišiti odsek živca in prerezani dorzokutani živec; C – od strani prišit odsek živca in prerezani suralnim živcu sosednji živec.



Slika 4. Število mieliniziranih aksonov v suralnim živcu proksimalno (temni stolpec) in distalno (svetli stolpec) od anastomoze z od strani prišitim odsekom peronealnega živca. N – neobravnjavani normalni suralni živec ( $n = 4$ ); A – živci iz skupine A, kjer ni bilo brstenja njegovih aksonov v odsek peronealnega živca ( $n_p = 3$ ;  $n_d = 5$ ); C – živci iz skupine C, kjer so aksoni suralnega živca brsteli v odsek peronealnega živca ( $n_p = 3$ ;  $n_d = 4$ ). Prikazane so srednje vrednosti in standardna deviacija vzorcev.

pomena posameznih mehanizmov za sproženje brstenja uporabili model, pri katerem je na nepoškodovani živec od strani prišit drug živec (*end-to-side* anastomoza). S tem modelom smo lahko opazovali brstenje aksonov pod vplivom samo enega, dveh ali vseh treh



Slika 5. Frekvenčna porazdelitev aksonov glede na površino prečnih presekov mieliniziranih aksonov v suralnem živcu 4 mm proksimalno in distalno od anastomoze z od strani prišitim odsekom peronealnega živca. A proksimalno/distalno – živci iz skupine A, kjer ni bilo brstenja aksonov suralnega živca v odsek peronealnega živca; C proksimalno/distalno – živci iz skupine C, kjer so aksoni suralnega živca brsteli v odsek peronealnega živca.

možnih sprožilnih mehanizmov hkrati. V zadnjem času so o brstenju nepoškodovanih motoričnih kot tudi senzoričnih aksonov v od strani prišite živce poročali tudi iz drugih raziskovalnih laboratorijev (37, 38). V naši raziskavi smo odrezane odseke peronealnega živca prišli na nepoškodovani suralni živec, ki je za proučevanje brstenja senzoričnih aksonov še posebej primeren, saj je okrog 95 % njegovih aksonov senzoričnih (40).

### Pomen prisotnosti degeneriranih živčnih poti za sprožitev brstenja

V naših poskusih smo ugotovili, da pri živalih brez denervirane kože v sosesčini senzoričnih končičev suralnega živca in brez poškodovanih nevronov v petem lumbalnem

дорзалnem gangliju (angl. *dorsal root ganglion L5* – DRG L5) ni bilo mogoče dokazati aksonov iz suralnega živca v od strani prišitih odsekih peronealnega živca, saj je bil vščipni test negativen, pa tudi histološko v večini primerov nismo videli aksonov v prišitem odseku. Nasprotno temu pa smo pri kontrolni skupini, pri kateri je bila koža v okolici končičev suralnega živca denervirana in so bili poškodovani nevroni v DRG L5, z omenjenima metodama zanesljivo ugotovili prisotnost senzoričnih aksonov v prišitih odsekih peronealnega živca.

Možni razlogi za negativen vščipni test in odsotnost mieliniziranih aksonov v prišitem odseku peronealnega živca pri živalih v poskusni skupini v primerjavi s kontrolnimi živalmi bi bili lahko poleg odsotnosti brstenja zaradi pomanjkanja denerviranega tarčnega tkiva (ali transnevronske spodbude) tudi naslednji.

Pri šivanju *end-to-side* anastomoz bi lahko poškodovali aksone v suralnem živcu, zaradi česar bi prišlo do regeneracije teh aksonov v prišite odseke peronealnega živca pri živalih v kontrolni skupini. Vendar je malo verjetno, da bi do take poškodbe vedno prišlo le pri živalih v kontrolni skupini, pri živalih v poskusni skupini pa nikoli. V naših poskusih smo še posebej pazili, da ne bi pri šivanju poškodovali aksonov suralnega živca in tako sprožili regeneracije njegovih aksonov v od strani prišiti odsek peronealnega živca. Morebitno obsežnejšo poškodbo aksonov v suralnem živcu smo izključili tudi s primerjavo števila mieliziranih aksonov v prerezih vzorcev suralnega živca nad in pod anastomozo, kjer nismo ugotovili razlike, ki bi kazala na degeneracijo aksonov v distalnem delu suralnega živca (slika 4).

Aksoni, ki smo jih našli v od strani prišitem odseku peronealnega živca pri živalih v kontrolni skupini, morda niso brsteli iz suralnega živca, ampak bi lahko vrasli v živčni odsek iz okolice. Tudi ta možnost je zelo malo verjetna. Vraščanje aksonov v prišiti živčni odsek na njegovem distalnem koncu smo praktično izključili tako, da smo odsek peronealnega živca na distalnem koncu prišili na mišico. Prekinjene sosednje živce pri živalih kontrolne skupine smo na koncih proksimalnih krnov zašili in tako močno zmanjšali možnost izraščanja aksonov iz njih. Test vščipa živca je bil narejen tako, da ni zaznaval prisotnosti aksonov, ki bi vrasli v odseke peronealnega živca iz okolice. Pred testom vščipa smo namreč prišiti živčni odsek očistili od strani in ga na distalnem koncu odrezali, tako da smo testirali samo prisotnost aksonov, ki so vrasli v živčni odsek iz glavnega debla suralnega živca skozi anastomozo.

Na temelju vsega navedenega je zato najbolj verjetno, da pri živalih poskusne skupine aksoni suralnega živca, kljub prisotnosti degeneriranih živčnih poti, niso brsteli v od strani prišiti odsek peronealnega živca, ker ni bilo denervirane kože okrog končičev suralnega živca niti poškodovanih nevronov v spinalnem gangliju L5, iz katerega izvirajo tudi senzorični aksoni suralnega živca. Ta rezultat podpira našo prvo hipotezo, da sama prisotnost degeneriranih živčnih poti ne zadostuje za spodbuditev kolateralnega brstenja senzoričnih aksonov.

Znano je, da se raven NGF-mRNA v denervirani koži poviša (31). Izvor tega NGF so tako epidermalne celice kot tudi Schwannove celice v degeneriranih živčnih poteh (26, 27). Relativen pomen NGF iz epidermisa ali takih Schwannovih celic za sproženje aksonskega brstenja doslej ni bil znan. Glavni vir NGF v denervirani koži bi lahko bile epidermalne

celice, saj je tudi prostorninski delež kože, ki ga zasedajo te celice, v primerjavi z živci razmeroma velik. Možen vzrok za odsotnost brstenja pri poskusni skupini živali, pri kateri tarčno tkivo suralnega živca ni bilo denervirano, bi torej lahko bila premajhna količina NGF, ki ga prispevajo Schwannove celice v degeneriranih živčnih poteh.

Na podlagi omenjenih ugotovitev lahko rečemo, da NGF ali drugi rastni dejavniki v degeneriranih živčnih poteh verjetno nimajo odločilnega vpliva na sproženje kolateralnega brstenja.

Vendar pa moramo pri razlagi teh rezultatov in rezultatov naših poskusov upoštevati tudi možnost transnevronske spodbude brstenja. V našem poskusu pri poskusni skupini, kjer ni bil prerezan noben sosednji živec suralnega živca, v dorzalnih ganglijih, iz katerih izvirajo vlakna suralnega živca, ni bilo poškodovanih nevronov. Možno bi bilo, da je prisotnost takih poškodovanih nevronov nujna, ker bi le-ti po transnevronskega mehanizmu spodbudili odzivnost sosednjih nepoškodovanih nevronov za brstenje.

### **Pomen transnevronske spodbude za sprožitev brstenja**

Sproženje rasti aksonov verjetno ni odvisno samo od neposrednega medsebojnega delovanja med nevronom in njegovim tarčnim tkivom, ampak tudi od medsebojnega delovanja z drugimi nevroni v osrednjem živčevju. Transnevronskega mehanizma predpostavljamo, da celično telo poškodovanega nevrona prek transnevronskega povezav vpliva na celično telo drugega nepoškodovanega nevrona in sproži njegovo brstenje. V našem poskusu smo prerežali DKŽ, ki imajo celična telesa v istih dorzalnih ganglijih, iz katerih izvirajo tudi vlakna suralnega živca, in s tem poskusili sprožiti kolateralno brstenje aksonov suralnega živca v prišiti odsek peronealnega živca prek transnevronskega mehanizma. DKŽ pri podgani, ki smo jih v naših poskusih prerežali, imajo svoja področja oživčenja na koži glutealnega področja in ne mejijo na področje oživčenja suralnega živca, ki se razteza po lateralni strani stopala in sega do sredine meč. Ker so bili vsi periferni živci na operirani okončini nepoškodovani, je bilo sproženje kolateralnega brstenja zaradi denervacije kože v okolici področja suralnega živca preprečeno. Tako s testom vščipa kot s histološko analizo smo dva meseca po prekinitvi DKŽ v prišitih odsekih peronealnega živca našli aksone suralnega živca. Njihovo število je bilo značilno večje kot pri živalih brez poškodbe DKŽ (kjer aksonov skoraj nismo mogli dokazati). Da je šlo res za brstenje iz suralnega živca in ne za druge načine vraščanja aksonov, nam potrjujejo isti dokazi, ki smo jih že navedli v prejšnjem podpoglavju razprave. Možno bi bilo, da je do brstenja po prekinitvi DKŽ prišlo tudi zaradi sistemskega učinka NGF iz denerviranega področja oživčenja DKŽ. Vendar pa proti temu govori opažanje, da v kontrolni skupini, pri kateri smo na nepoškodovani suralni živec prišli odsek perifernega živca iz nasprotni okončine, kljub denervirani koži na nasprotni okončini do brstenja ni prišlo.

Ker v okolici področja oživčenja suralnega živca, ki je brstel, ni bilo denervirane kože, lahko torej sklepamo, da denervirano tarčno tkivo ni nujno potrebno za sprožitev kolateralnega brstenja senzoričnih aksonov. To se sklada tudi z rezultati poskusa blokade aksonskega transporta s kolhicinom, kjer je tudi prišlo do brstenja kljub odsotnosti degeneriranih živčnih poti in denerviranega tarčnega tkiva (41, 42). Rezultati potrjujejo našo

hipotezo, da je transnevronske mehanizem pomemben sprožilni dejavnik kolateralnega brstenja senzoričnih aksonov.

Kljub temu da denervirano tarčno tkivo v neposredni okolici aksonskih končičev ni nujno potrebno za sprožitev kolateralnega brstenja, pa verjetno lahko prispeva k brstenju. Primerjava kolateralnega brstenja v poskusni skupini, kjer smo brstenje suralnega živca spodbudili prek transnevronske mehanizmov, ter v kontrolni skupini, kjer smo s prerezanjem sosednjih živcev brstenje spodbudili tako z denervacijo sosednjega področja oživčenja kot tudi prek transnevronske mehanizmov v dorzalnem gangliju, pokaže, da je bil obseg kolateralnega brstenja značilno večji v primeru dvojne spodbude brstenja. To potrjuje domnevo, da denervirano tarčno tkivo lahko prispeva k brstenju. Ne moremo pa opredeliti, kako velik je vpliv denerviranega tarčnega tkiva pri sprožitvi brstenja v primerjavi z vplivom transnevronske spodbude. Upoštevati namreč moramo, da s prerezanjem DKŽ verjetno poškodujemo v spinalnih ganglijih manjše število nevronov kot s prerezanjem več perifernih živcev, ki oživčujejo področje kože na meji s področjem oživčenja suralnega živca. Zato ostaja vprašanje relativnega pomena transnevronske spodbude za sprožitev kolateralnega brstenja v primerjavi s spodbudo iz denerviranega tarčnega tkiva odprto.

Kolikor nam je znano, smo s to študijo prvi dokazali, da verjetno v DRG obstaja transnevronske mehanizem spodbujanja brstenja, ki prispeva pri kolateralnem brstenju nociceptivnih aksonov v koži. Signal, ki po poškodbi nekaterih nevronov v DRG lahko spodbudi nepoškodovane nevrone k brstenju njihovih aksonov, seveda ni znan. Obstaja pa nekaj posrednih namigov, da bi to lahko bili trofični dejavniki, kot sta NGF ali sorodni BDNF (angl. *brain derived growth factor*). Ugotovili so namreč, da se ekspresija mRNA za NGF po aksonotmezi ishiadičnega živca v ustreznih DRG poveča trikrat, BDNF pa dvakrat. Katere celice v DRG (nevroni ali druge celice) so vir tega povečanja, ni znano (43). Nekaj je znanega tudi o spremembah v celičnem telesu nepoškodovanega nevrona, ki brsti. Mearow in sodelavci so poročali, da pride do povečane sinteze receptorjev za NGF (NGFR) v celičnih telesih brstečih nevronov (44). Zvišani koncentraciji NGF v koži po delni denervaciji sledi povečano izražanje mRNA za oba tipa NGFR v brstečih nevronih (receptor z nizko afiniteto vezave za NGF – p75 NGFR in receptor z visoko afiniteto vezave za NGF – trkA NGFR). V skladu s to ugotovitvijo so tudi opažanja, da proti NGF usmerjena protitelesa, za katera je znano, da blokirajo kolateralno brstenje, preprečijo tudi z brstenjem povezan dvig NGFR mRNA v celičnem telesu nevronov v DRG, ki naj bi brsteli (44). V celičnem telesu poškodovanega nevrona takih sprememb ravni NGFR mRNA niso opazili. Porast tako tvorbe NGF v DRG s poškodovanimi nevroni kot povečana ekspresija receptorjev za NGF v nepoškodovanih nevronih, katerih aksoni brstijo, uvrščata NGF med verjetne kandidate za signal transnevronskega mehanizma za spodbuditev brstenja. Vendar so pri tem morda udeleženi še drugi trofični dejavniki, kot sta že omenjeni BDNF ali pa transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$ -1 (TGF  $\beta$ -1), katerega sinteza se v nevronih DRG tudi močno poveča že nekaj ur po poškodbi njihovih aksonov (45), sicer pa je mitogeni in diferenciacijski dejavnik za Schwannove celice. Ob celičnih telesih nepoškodovanih nevronov, ki brstijo, so opazili tudi proliferacijo nenevronske celice (46), spremembe v sintezi beljakovin (47) ter spremenjeno sproščanje neurotransmiterjev (48).

Pomen teh sprememb za brstenje in narava signala, ki jih sproži, ostajata neznan, kar predstavlja velik izziv za raziskave v prihodnosti.

### Izvor aksonskih brstov pri kolateralnem brstenju

O mestu nastanka kolateralnih brstov v senzoričnih aksonih v literaturi ni podatkov. Brsti bi lahko izvirali iz delov aksonov, ki so v neposredni bližini denerviranega tkiva oziroma degeneriranih živčnih poti, ali pa tudi iz drugih, bolj proksimalnih delov aksonov, če bi izraščali naključno. V naših poskusih smo ugotovili, da je število aksonov proksimalno in distalno od mesta anastomoze v suralnem živcu, ki je brstel v prišiti odsek, enako kot v nebrstečih živcih. Tudi glede razporeditve površin prečnih presekov aksonov med obema vrstama živcev ni bilo pomembnih razlik. To opažanje govori v prid naši domnevi, da brsti izraščajo samo neposredno ob mestu anastomoze. Če bi namreč izraščali bolj proksimalno ali distalno, bi pričakovali, da bo število aksonov, vključno z brsti, nad mestom anastomoze večje v brstečih kot nebrstečih živcih, še posebej pa bi prevladovali drobni aksoni. Omejeno izraščanje aksonskih brstov podpira našo hipotezo, da bližina denerviranih živčnih poti določa mesto, kjer aksonski brsti izraščajo iz matičnih aksonov. V skladu s tem so tudi ugotovitve Slacka in sodelavcev, da je glavni dejavnik, ki odloča o tem, iz katerih Ranvierovih zažemkov motonevronov bo prišlo do brstenja, oddaljenost zažemka od denerviranih tarčnih celic (36). Brsti rastejo po tistih izpraznjenih nevrilemskih cevkah, po katerih bo pot aksonov do denerviranih tarčnih celic najkrajša.

Mehanizem, kako denervirano tkivo oziroma degenerirane živčne poti določijo mesto izvora aksonskih brstov, ni znan. NGF, katerega sinteza se v Schwannovih celicah degeneriranih živčnih poti po poškodbi živca močno poveča, bi lahko trofično in tropično vplival na nepoškodovane aksone, da bi na mestu največje koncentracije NGF začeli tvoriti brste (49). Znano je, da ima NGF kemotaktičen vpliv na aksone v kulturi (50–52). Tudi glede tega problema ostaja torej več vprašanj kot odgovorov.

### Zahvala

Zahvaljujema se svojemu mentorju prof. dr. Janezu Sketlju, dr. med., ki naju je strokovno vodil med raziskovalnim delom in nama pomagal pri učenju prvih korakov v svetu raziskovanja in znanosti. Hvala najinemu prijatelju in učitelju mag. Fajku Bajroviću, dr. med., za številne zašite *end-to-side* anastomoze in za pomoč pri iskanju poti iz labirinta neznanja. S svojo vztrajnostjo in zagnanostjo naju je očaral in zvilil v raziskovalno delo ter nama omogočil, da sva v njem našla zadovoljstvo in užitek. Zahvaljujema se tudi gospe Duši Čuček, dipl. ing. biol., gospe Simoni Pucihar, gospodu Borisu Pečenku in gospodu Marjanu Kaduncu, ki so pomagali pri nastajanju te naloge.

---

### Literatura

1. Pollock LJ. Nerve overlap as related to the relatively early return of pain sense following injury to the peripheral nerves. *J Comp Neurol* 1920; 32: 357.
2. Weddell G, Guttman L, Guttman E. The local extension of nerve fibers into denervated areas of skin. *J Neurol Psych* 1941; 4: 206–25.



3. Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 1979; 185: 221–20.
4. Robinson PP. Reinnervation of teeth, mucous membrane and skin following section of the inferior alveolar nerve in the cat. *Brain Res* 1981; 220: 241–53.
5. Jackson PC, Diamond J. Regenerating axons reclaim sensory targets from collateral nerve sprouts. *Science* 1981; 214: 926–8.
6. Jackson PC, Diamond J. Temporal and spatial constraints of the collateral sprouting of low-threshold mechanosensory nerves in the skin of rats. *J Comp Neurol* 1984; 226: 336–45.
7. Jackson PC, Diamond J. Failure of intact cutaneous mechanosensory axons to sprout functional collaterals in skin of adult rabbits. *Brain Res* 1983; 273: 277–83.
8. Pomeranz B, Mullen M, Markus H. Effect of applied electrical fields on sprouting of intact saphenous nerve in adult rat. *Brain Res* 1984; 303: 331–6.
9. Nixon BJ, Doucette R, Jackson PC, Diamond J. Impulse activity evokes precocious sprouting of nociceptive nerves into denervated skin. *Somatosens Res* 1984; 2: 97–126.
10. Beuerman RW, Rozsa AJ. Collateral sprouts are replaced by regenerating neurites in the wounded corneal epithelium. *Neurosci Lett* 1984; 44: 99–104.
11. Robinson PP. Regenerating nerve fibers do not displace the collateral reinnervation of cat teeth. *Brain Res* 1984; 310: 303–10.
12. Inbal R, Rouso M, Ashur H, Wall PD, Devor M. Collateral sprouting in skin and sensory recovery after nerve injury in man. *Pain* 1987; 28: 141–54.
13. Robinson PP. Observations on the recovery of sensation following inferior alveolar nerve injuries. *Brit J Oral Maxiofacial Surg* 1988; 26: 177–89.
14. Healy C, LeQuesne PM, Lynn B. Collateral sprouting of cutaneous nerves in man. *Brain* 1996; 119: 2063–72.
15. Jansco G, Kiraly E. Cutaneous nerve regeneration in the rat: reinnervation of the denervated skin by regenerative but not by collateral sprouting. *Neurosci Lett* 1983; 36: 133–7.
16. Brenan A. Collateral reinnervation of skin by C-fibres following nerve injury in the rat. *Brain Res* 1986; 385: 152–5.
17. Pertovaara A. Collateral sprouting of nociceptive C-fibers after cut or capsaicin treatment of the sciatic nerve in adult rats. *Neurosci Lett* 1988; 90: 248–55.
18. Wiesenfeld-Hallin Z, Kinnman E, Aldskogius H. Expansion of innervation territory by afferents involved in plasma extravasation after nerve regeneration in adult and neonatal rats. *Exp Brain Res* 1989; 76: 88–96.
19. Horch K. Absence of functional collateral sprouting of mechanoreceptor axons into denervated areas of mammalian skin. *Exp Neurol* 1981; 74: 313–8.
20. Yasargil GM, Macintyre L, Doucette R, Visseau B, Holmes M, Diamond J. Axonal domains within shared touch domes in the rat: a comparison of their fate during conditions favoring collateral sprouting and following axonal regeneration. *J Comp Neurol* 1988; 270: 301–12.
21. Doubleday B, Robinson PP. Nerve growth factor depletion reduces collateral sprouting of cutaneous mechanoreceptive and tooth-pulp axons in ferrets. *J Physiol* 1994; 481: 709–18.
22. Kinnman E. Collateral sprouting of sensory axons in the hairy skin of the trunk: a morphological study in adult rats. *Brain Res* 1987; 414: 385–9.
23. Diamond J, Coughlin M, Macintyre L, Holmes M, Visseau B. Evidence that endogenous nerve growth factor is responsible for collateral sprouting, but not the regeneration, of nociceptive axons in adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6596–600.
24. Fitzgerald M, Woolf CL, Shortland P. Collateral sprouting of the central terminals of cutaneous primary afferent neurons in the rat spinal cord: pattern, morphology, and influence of targets. *J Comp Neurol* 1990; 300: 370–85.
25. Gloster A, Diamond J. Sympathetic nerves in adult rats regenerate normally and restore pilomotor function during an anti-NGF treatment that prevents their collateral sprouting. *J Comp Neurol* 1992; 326: 363–74.
26. Tron VA, Coughlin MD, Jang DE, Stanisz J, Sauder DN. Expression and modulation of nerve growth factor in murine keratinocytes (PAM 212). *J Clin Invest* 1990; 85: 1085–9.

27. Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: Inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 1991; 7: 265–75.
28. Korsching S, Thoenen H. Nerve growth factor supply for sensory neurons: site of origin and competition with the sympathetic nervous system. *Neurosci Lett* 1985; 54: 201–5.
29. Shelton DL, Reichardt LF. Studies on  $\beta$ -nerve growth factor gene expression in the rat iris: the level of mRNA-encoding nerve growth factor is increased in irises placed in explant cultures in vitro, but not in irises deprived of sensory or sympathetic innervation in vivo. *J Cell Biol* 1986; 102: 1940–8.
30. Diamond J, Cooper E, Turner C, Macintyre L. Trophic regulation of nerve sprouting. *Science* 1976; 193: 371–7.
31. Mearow KM, Kril Y, Diamond J. Increased NGF mRNA expression in denervated rat skin. *Neuro Report* 1993; 4: 351–4.
32. Rotshenker S. Multiple modes and sites for induction of axonal growth. *TINS* 1988; 11: 363–6.
33. Rotshenker S. Synapse formation in intact innervated cutaneous-pectoralis muscles of the frog following denervation of opposite muscle. *J Physiol* 1979; 292: 535–47.
34. Edds MV. Collateral regeneration of residual motor axons in partially denervated muscles. *J Exp Zool* 1950; 113: 517–52.
35. Hoffman H. Local reinnervation in partially denervated muscle: A histophysiological study. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1950; 28: 211–9.
36. Slack JR, Hopkins WG, Williams MN. Nerve sheaths and motoneurone collateral sprouting. *Nature* 1979; 282: 506–7.
37. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Neto AM. Latero-terminal neurotomy without removal of the epineurial sheath. Experimental study in rats. *Rev Paul Med* 1992; 110: 267–75.
38. Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg* 1994; 19B: 277–82.
39. Greene EC. *Anatomy of the rat*. New York: Hafner Publ Co., 1959: 121.
40. Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1991; 114: 82–103.
41. Aguilar CE, Bisby MA, Cooper E, Diamond J. Evidence that axoplasmic transport of trophic factors is involved in the regulation of peripheral nerve fields in salamanders. *J Physiol* 1973; 234: 449–64.
42. Rotshenker S. Sprouting and synapse formation by motor axons separated from their cell bodies. *Brain Res* 1981; 223: 141–5.
43. Sebert ME, Shooter EM. Expression of mRNA for neurotrophic factors and their receptors in the rat dorsal root ganglion and sciatic nerve following nerve injury. *J Neurosci Res* 1993; 36: 357–67.
44. Mearow KM, Krill Y, Gloster A, Dimond J. Expression of NGF receptor and GAP-43 mRNA in DRG neurons during collateral sprouting and regeneration of dorsal cutaneous nerves. *J Neurobiol* 1994; 25: 127–42.
45. Delr e P, Ribbens C, Martin D, Rogister B, Lefebvre PP, Rigo JM, Leprince P, Schoenen J, Moonen G. Plasticity of developing and adult dorsal root ganglion neurons as revealed in vitro. *Brain Res Bull* 1993; 30: 231–7.
46. Watson WE. Cellular responses to axotomy and to related procedures. *Br Med Bull* 1974; 30: 112–5.
47. Greenberg SG, Lasek RJ. Neurofilament protein synthesis in dorsal root ganglia neurons decreases more after peripheral axotomy than after central axotomy. *J Neurosci* 1988; 8: 1739–46.
48. Noguchi K, Senba E, Morita Y, Sato M, Tohyama M. Prepro-VIP and preprotachykinin mRNAs in the rat dorsal root ganglion cells following peripheral axotomy. *Molec Brain Res*; 6: 327–30.
49. Taniuchi M, Clarke HB, Johnson EM. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4094–8.
50. Letourneau PC. Chemocactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev Biol* 1978; 66: 183–96.
51. Campenot RB. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. *Dev Biol* 1982; 93: 1–12.
52. Liu CN, Chambers WW. Intrasprouting of dorsal root axons. *Arch Neurol (Chicago)* 1958; 79: 46–61.