

## Streszczenie

### Wstęp:

W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby pacjentów z urazami nerwów obwodowych spowodowanej wzrastającą ilością konfliktów zbrojnych, klęsk żywiołowych oraz wypadków komunikacyjnych. W USA wykonuje się około 185 tysięcy amputacji kończyn rocznie i szacuje się, że u około 25% pacjentów poddanych amputacjom kończyn rozwija się nerwiak pourazowy.

Nerwiak pourazowy powstający w wyniku urazu lub niewłaściwego postępowania chirurgicznego definiowany jest jako zwiększenie średnicy kikuta nerwu związane z chaotycznym i zdezorganizowanym układem włókien nerwowych w jego obrębie. W wyniku interakcji przeciętych aksonów z tkankami okołonerwowymi dochodzi do stymulacji aksonów uszkodzonego nerwu, co prowadzi do występowania bólu, który wpływa na pogorszenie jakości życia.

Zarówno w modelach doświadczalnych jak i w postępowaniu klinicznym wykorzystywano wiele technik w prewencji oraz leczeniu nerwiaków pourazowych, od prostego podwiązania uszkodzonego nerwu, implantacji do sąsiednich mięśni, kości lub naczyń, stosowania syntetycznych i naturalnych osłonek nerwowych (ang.: *capping*), do skomplikowanych połączeń nerwowych (ang.: *end-to-side neurorrhaphy*). Jednakże, wyniki odległe wykazują, że nawet 67% pacjentów nie odczuwa istotnej poprawy po chirurgicznym leczeniu nerwiaków.

Odizolowanie kikuta nerwu od innych tkanek jest kluczowe w kontekście prewencji powstawania nerwiaków pourazowych. Pochewka epineuralna (*Epineural Sheath Jacket, ESJ*) pozyskiwana z *epineurium* jest naturalnym, integralnym składnikiem nerwu, wykazującym właściwości neurogenne i angiogenne. Duża dostępność, łatwość preparowania i trwałość struktura pochewki epineuralnej sprawiają, że stanowi ona dobry element ochronny kikuta nerwu. Pochewka tworzy nieprzepuszczalną barierę uniemożliwiającą interakcję pomiędzy otaczającymi tkankami, a regenerującymi aksonami. Pochewka epineuralna nie generuje reakcji zapalnej w odpowiedzi na ciało obce oraz nie wymaga stosowania immunosupresji. Dzięki swej elastyczności umożliwia optymalny dobór pochewki pod względem średnicy kikuta nerwu i jego długości.

### Cele pracy:

- Wypreparowanie pochewki epineuralnej z *epineurium* nerwu kulszowego i jej zastosowanie w zapobieganiu tworzenia nerwiaka pourazowego w modelu pourazowym nerwu kulszowego szczura.

- Ocena integralności i skuteczności zastosowania pochewki epineuralnej w okresie 12- i 24-tygodniowej obserwacji.
- Ocena wpływu ochronnego pochewki epineuralnej na układ przestrzenny aksonów oraz ilość tkanki łącznej w obrębie kikuta nerwu.
- Porównanie skuteczności zastosowania pochewki epineuralnej z techniką implantacji kikuta nerwu do mięśnia.

#### Materiał i metody:

Do badania wykorzystano 9-10 tygodniowe szczury płci męskiej, szczepu Lewis (Lew/Crl, Charles Rivers Laboratories, USA) o masie ciała między 225 a 250 gramów.

W badaniu wykorzystano 72 szczury, które przydzielono do sześciu grup doświadczalnych (sześć zwierząt w każdej grupie) i obserwowano w dwóch okresach: 12- i 24-tygodniowym. Grupy doświadczalne: Grupa I - proksymalny kikut nerwu pozostawiony bez żadnej ochrony; Grupa II - proksymalny kikut nerwu implantowany do mięśnia; Grupa III - zastosowanie pochewki epineuralnej (*ESJ*); Grupa IV - zastosowanie *ESJ* i implantacja do mięśnia; Grupa V - zastosowanie *ESJ* wypełnionej autologiczną tkanką tłuszczową; Grupa VI - zastosowanie *ESJ* wypełnionej autologiczną tkanką tłuszczową i implantacja do mięśnia.

Po znieczuleniu szczura, w warunkach jałowych, przy pomocy mikroskopu operacyjnego, wytworzono 20 mm ubytek prawego nerwu kulszowego w jego odcinku udowym. Z 20 mm fragmentu nerwu usunięto włókna nerwowe wykorzystując technikę *pull-out* wytwarzając w ten sposób pustą tubę epineuralną. Z uzyskanej tuby epineuralnej resekowano 7 mm fragment epineurium i jeden z jego końców zawiązywano szwem nylonowym 10-0, tworząc w ten sposób pochewkę epineuralną (*Epineural Sheath Jacket*), którą aplikowano na proksymalny kikut nerwu kulszowego, mocując ją czterema szwami nylonowymi 10-0 (technika *epineural sleeve*) (group III). W grupach IV-VI poza standardową aplikacją pochewki epineuralnej, zastosowano także dodatkowy element prewencyjny kikuta nerwu w postaci: autologicznej tkanki tłuszczowej wstrzykniętej do pochewki epineuralnej i/lub implantację do mięśnia.

Tworzenie nerwiaków pourazowych oceniano przy pomocy przyżyciowych analiz klinicznych: ocena przyrostu masy ciała, obecność zachowań samookaleczających, test *pinprick*, objaw Tinela (analizy przeprowadzano raz na tydzień), oraz oceny makroskopowej, mikroskopowej i liczby komórek nerwowych w zwojach korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego.

#### Wyniki:

Na podstawie przeprowadzonych testów i analiz wykazano:



- Nie obserwowano znamienności statystycznej w przyroście masy ciała pomiędzy grupami badawczymi w obu okresach obserwacji.
- We wszystkich grupach badawczych, w obu okresach obserwacji zachowania samookaleczające ograniczone były jedynie do pazurów kończyny operowanej ( $AS=1$ ). Niemniej, w grupie I liczba zwierząt prezentująca objawy samookaleczenia ( $AS=1$ ) była znamienne statystycznie wyższa w obu okresach obserwacji w porównaniu z grupami, w których zastosowano pochwękę epineuralną.
- Pozytywny objaw Tinela obserwowano u 83% i 67% zwierząt w grupie I, odpowiednio w 12- i 24-tygodniowym okresie obserwacji, u 50% zwierząt w grupie II (24-tygodniowy okres obserwacji), podczas gdy w żadnej z grup badawczych z zastosowaną pochwęką epineuralną liczba zwierząt z pozytywnym objawem Tinela nie przekraczała 33% w żadnym okresie obserwacji.
- Porównując wartości testu uszczyplenia (*Pinprick test, PP*) znamienność statystyczną wykazano jedynie porównując wyniki *PP* pomiędzy grupą I oraz grupą IV w 12-tygodniowej obserwacji.
- Średnia liczba neuronów *DRG L4* oraz *DRG L5* w 12-tygodniowej obserwacji była większa w grupach eksperymentalnych, w których wykorzystano pochwękę epineuralną w porównaniu do grup kontrolnych.
- Średnia wartość parametru zwiększenia średnicy proksymalnego kikuta nerwu (*bulb-shaped, BS*) była najwyższa w grupie I w obu okresach obserwacji. Wartości *BS* w grupach z zastosowaną pochwęką epineuralną oraz w grupie II były porównywalne.
- W grupach z zastosowaną pochwęką epineuralną nie obserwowano tworzenia wypustek włókien nerwowych,  $FS=0$  (z wyjątkiem dwóch zwierząt w grupie V). W grupie I wartości *FS* były znamienne statystycznie wyższe w porównaniu do grup z zastosowaną pochwęką. W grupie II, pomimo zastosowanej implantacji kikuta nerwu do mięśnia, obserwowano tworzenie się wypustek nerwowych.
- Ocena występowania zrostów okołonerwowych (*perineural adhesion, PA*) wykazała najwyższe wartości w grupie I (w obu okresach obserwacji). Wyniki *PA* w grupach z zastosowaną pochwęką epineuralną były porównywalne do wyników w grupie II.
- Najniższą wartość stosunku tkanki nerwowej do tkanki łącznej (*N/C*) wykazano w grupie I (w obu okresach obserwacji), podczas gdy wartości *N/C* w grupach z zastosowaną pochwęką epineuralną były porównywalne z wynikami w grupie II.
- Pomimo porównywalnych wartości *N/C* w grupach z zastosowaną pochwęką oraz w grupie z implantacją kikuta nerwu do mięśnia, na podstawie analizy mikroskopowej (barwienie *Toluidine blue* oraz *S-100*) wykazano większą dezorganizację i chaotyczny układ włókien w grupie II.

### Wnioski:

- Przeprowadzone doświadczenie potwierdziło możliwość wypreparowania pochewki epineuralnej z *epineurium* nerwu kulszowego szczura oraz potwierdziło jej skuteczność w zapobieganiu tworzenia nerwiaków pourazowych.
- Analiza makroskopowa potwierdziła zachowanie integralności pochewki epineuralnej oraz jej funkcję ochronną dla przeciętego nerwu w okresie 12- oraz 24-tygodniowej obserwacji.
- Prewencyjny efekt pochewki epineuralnej potwierdziły badania histologiczne wykazujące wyższy współczynnik tkanki nerwowej do łącznej (*N/C ratio*) oraz lepiej zorganizowaną budowę przestrzenną aksonów (analiza *S-100* oraz *Toluidine blue*) w grupach z zastosowaniem pochewki epineuralnej.
- Wyniki badań potwierdziły efektywność pochewki epineuralnej w zapobieganiu powstawania nerwiaków, porównywalne z techniką implantacji kikuta nerwu do mięśnia, stąd zastosowanie w pracy pochewki epineuralnej reprezentuje nową, alternatywną metodę prewencji oraz leczenia nerwiaków.

### Słowa kluczowe:

Nerwiak pourazowy, epineurium, pochewka epineuralna, model zwierzęcy