



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Συγκριτική μελέτη τεχνικών γεφύρωσης βραχέος νευρικού ελλείμματος διά  
διαφόρων τύπων επινευρικών κρημνών επί του ισχιακού νεύρου του κονίκλου**

**ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΙΓΝΑΤΙΑΔΗΣ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015**











**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Συγκριτική μελέτη τεχνικών γεφύρωσης βραχέος νευρικού ελλείμματος διά  
διαφόρων τύπων επινευρικών κρημνών επί του ισχιακού νεύρου του κονίκλου**

**ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΙΓΝΑΤΙΑΔΗΣ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015**



**«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2, (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)».**



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Ιγνατιάδη Ιωάννη:** 23-11-2000

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 438<sup>α</sup>/5-4-2001

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Σουκάκος Παναγιώτης, Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μπερής Αλέξανδρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ξενάκης Θεόδωρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 7-5-2001

*«Συγκριτική μελέτη τεχνικών γεφύρωσης βραχέως νευρικού ελλείμματος δια διαφόρων τύπων επινευρικών κρημνών επί του ισχιακού νεύρου του κονίκλου»*

**Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 607<sup>α</sup>/29-5-2007

Επιβλέπων

Μπερής Αλέξανδρος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Σουκάκος Παναγιώτης, Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ξενάκης Θεόδωρος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** 782<sup>α</sup>/13-11-2015

<b>Αναστασόπουλος Δημήτριος</b>	Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Γεωργούλης Αναστάσιος</b>	Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Κορομπίλιας Αναστάσιος</b>	Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Μπερής Αλέξανδρος</b>	τ. Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Ξενάκης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Σουκάκος Παναγιώτης</b>	ομότιμος Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του



**Βεκρής Μάριος**

Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών  
Αναπληρωτή Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» την 1-12-2015

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**Η Γραμματέας του Τμήματος**



**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**





***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:***

***ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΤΗΣ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ  
ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:***

- 1. Στην Ελληνική Εταιρεία Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής με τη «Χορηγία Πέτρος Κόκκαλης 2000» – ως βράβευση για το καλύτερο πειραματικό πρωτόκολλο χειρουργικής των περιφερικών νεύρων δεκαετίας 1990-2000.*
- 2. Στην εταιρεία INTRACOM ως οικονομικό χορηγό του παραπάνω βραβείου.*
- 3. Στο Ερευνητικό-Πειραματικό Κέντρο “ELPEN Pharma Co” υπό τη διεύθυνση του Δρα Απόστολου Παπαλόη και στο προσωπικό του εργαστηρίου.*

***ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ & ΗΘΙΚΗ ΣΤΗΡΙΞΗ:***

- 4. Στην τριμελή επιτροπή της διατριβής.*
- 5. Στον επιβλέποντα τη διατριβή καθηγητή Κο Αλέξανδρο Μπερή.*
- 6. Στόν «διαχρονικό» μας καθηγητή Κο Παναγιώτη Ν.Σουκάκο*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ:

Οι κακώσεις των περιφερικών νεύρων συμβαίνουν συχνά και καταλείπουν ενίοτε κάποια αναπηρία. Η πρόγνωση μιας χειρουργηθείσης βλάβης νεύρου εξαρτάται εκτός άλλων και απ'το εάν υπάρχει έλλειμμα ή όχι. Καθοριστικός παράγων είναι το μήκος του δημιουργηθέντος ελλείμματος (η δυνατότητα για τελικό-τελική συρραφή του διατμηθέντος νεύρου η οποία δεν είναι πάντα εφικτή ή η καταφυγή σε παρεμβολή νευρικών μοσχευμάτων).

Η επιτυχής θεραπεία των περιφερικών νευρικών κακώσεων με έλλειμμα είναι μια από τις προκλήσεις στη χειρουργική των περιφερικών νεύρων, ενώ η παρεμβολή νευρικών αυτομοσχευμάτων αποδίδει μέν, αλλά σχετίζεται με νοσηρότητα της δότριας περιοχής.

Η νευρική αναγέννηση για μικρού μήκους ελλείμματα (κλινικά μέχρι 3 εκατοστά-κυρίως σε αισθητικά νεύρα) είναι εφικτή διά γεφύρωσης του κενού και μέσω αγωγών από άλλους ιστούς ή υλικά. Πειραματικά η αναζήτηση ενός ιδανικού υλικού (πολυγλυκολικό οξύ, πολυγλακτίνη) ή ιστού όπως φλέβες, ως αγωγού, οδήγησε στη χρήση αυτών με μέτρια αποτελέσματα.

Στην αναζήτηση ιδανικού μέσου για αγωγούς γεφύρωσης βραχέων νευροελλειμάτων το επινεύριο που θα μπορούσε να είναι μια ισότιμη σε αποτελεσματικότητα με τις άλλες μέθοδος, ίσως προτιμητέα κυρίως λόγω του χαμηλότερου βαθμού νοσηρότητας της δότριας περιοχής (όπως με τα αυτομοσχεύματα) αλλά και του μηδενικού κόστους (όπως με τα συνθετικά).

Δοκιμάσαμε επινευρικούς κρημούς επί ισχιακού νεύρου κονίκλου για τη γεφύρωση βραχέος νευρικού ελλείμματος που συγκρίνονται με μάρτυρα-γέφυρα το νευρικό αυτομόσχευμα.

Με την ελπίδα ότι θα προστεθεί έστω και μια πληροφορία επι πλέον ως ένα μικρό ψηφίο στο πάζλ της πειραματικής έρευνας για τη χειρουργική των περιφερικών νεύρων, εκπονούμε τη μελέτη αυτή. Η πρόοδος στη έρευνα της Νευροβιολογίας, η εξέλιξη της Μικροχειρουργικής και η βελτίωση των χειρουργικών μικροσκοπίων και εργαλείων, υπόσχονται πολλά για το μέλλον. «Η εξέλιξη της επανορθωτικής Μικροχειρουργικής δεν έχει όρια».



## Πίνακας περιεχομένων

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ).....	1
	<b>1α. Ιστορική Αναδρομή –Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – Αναγέννηση περιφερικών νεύρων και γεφύρωση των ελλειμμάτων τους.....</b>	<b>1</b>
	<b>1β. Σκοπός έρευνας - (Περίληψη Πρωτοκόλλων 1–9): .....</b>	<b>52</b>
2.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ & ΥΛΙΚΟ). ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟ ΚΟΛΛΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ.....	57
	<b>2α. Πρωτόκολλο 1: Γεφύρωση Βραχέος Ελλείμματος του Ισχιακού Νεύρου του Κόνικλου διά Προωθητικού Επινευρικού Κρημονού.....</b>	<b>57</b>
	<b>2β. Πρωτόκολλο 2: Γεφύρωση Βραχέος Ελλείμματος Ισχιακού Νεύρου του Κόνικλου δι’ Αναστροφού Αγγειούμενου Επινευρικού Κρημονού Ληφθέντος εκ του Κεντρικού Νευρικού Κολοβώματος .....</b>	<b>66</b>
	<b>2γ. Πρωτόκολλο 3: Γεφύρωση Βραχέος Ελλείμματος Ισχιακού Νεύρου του Κόνικλου δι’ Αναστροφού Αγγειούμενου Επινευρικού Κρημονού Ληφθέντος εκ του Περιφερικού Νευρικού Κολοβώματος .....</b>	<b>73</b>
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	93
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ:.....	123
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	137
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	141
7.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ .....	145
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	155



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ)

### 1α. Ιστορική Αναδρομή –Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – Αναγέννηση περιφερικών νεύρων και γεφύρωση των ελλειμμάτων τους.

#### **Ανατομία και Φυσιολογία Περιφερικού νεύρου<sup>1a1b</sup>:**

Τα νευρικά κύτταρα ή αλλιώς Νευρώνες, αντιπροσωπεύουν τις βασικές βιολογικές μονάδες του νευρικού συστήματος. Με τον όρο νευρώνας ορίζουμε το κύτταρο που αποτελεί εκτός από δομικό μέρος και τη λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος.

Κάθε νευρώνας περιλαμβάνει το κυτταρικό Σώμα και τις αποφυάδες του (εικόνα 1Α): 1) ένα πλήθος από Δενδρίτες συνδεδεμένους με το Σώμα και 2) συνήθως μια επιμήκη προέκταση – τον άξονα- καταλήγοντα σε περιφερικές συναπτικές απολήξεις. Αναλυτικά ο Νευρώνας αποτελείται από ένα κυτταρικό σώμα, που περιλαμβάνει τον πυρήνα και μεγάλο αριθμό οργανιδίων, και από μία ή περισσότερες αποφυάδες. Αυτές ονομάζονται "δενδρίτες" όταν συλλέγουν τα σήματα που στέλνονται στο κύτταρο, και "άξονες" όταν μεταδίδει ώσεις από το κυτταρικό σώμα.

Οι άξονες των κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος καλύπτονται από ένα μυελώδες έλυτρο, προστατευτικό περίβλημα, που σχηματίζεται από μια μεγάλη αλυσίδα κυττάρων *Schwann*: το σύστημα αυτό διασφαλίζει την διάδοση των νευρικών ώσεων (Spike) κατά μήκος του άξονα, με ταχύτητα περίπου 100 μ./δευτερόλεπτο. Ο αριθμός των ώσεων (spikes) ανά δευτερόλεπτο ( $F_i = \text{Spike/sec}$ ) ορίζεται ως η "συχνότητα κένωσης" ή συχνότητα νεύρωσης του νευρώνα. Οι δίκην ηλεκτρικού ρεύματος νευρικές ώσεις (spikes) προκαλούνται από έναν μηχανισμό πόλωσης και εκπόλωσης της μεμβράνης του νευρώνα. Ανάμεσα στα έλυτρα υπάρχει ένα κενό, στο οποίο ο νευράξονας είναι γυμνός. Αυτό το

σημείο ονομάζεται κόμβος Ρανβιέ και είναι πλούσιο σε διαύλους νατρίου. Σε κάθε κόμβο το σήμα ενδυναμώνεται ξανά. Οι άξονες των κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος καλύπτονται από έλυτρα μυελίνης που φτιάχνονται από ειδικά νευρογλοιακά κύτταρα, τους ολιγοδενδρίτες.

Ο κάθε νευρώνας έχει πολλούς δενδρίτες με πολλές διακλαδώσεις. Αυτές οι δομές αποτελούν το δίκτυο με το οποίο ο νευρώνας προσλαμβάνει σήματα από άλλα κύτταρα. Τα κύματα αυτά φτάνουν στους δενδρίτες του κάθε νευρικού κυττάρου από νευρίτες (έναν ή περισσότερους) άλλων νευρικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό συνδέονται, διακλαδίζονται και συνεργάζονται μεταξύ τους τα νευρικά κύτταρα, κατά ομάδες, για να επιτελέσουν το σκοπό για τον οποίο κατασκευάστηκαν, τη διάδοση των ερεθισμάτων από την περιφέρεια προς το κέντρο (εγκέφαλο) και το αντίστροφο. Στην άκρη των δενδριτών βρίσκονται τα προσυναπτικά κομβία και οι συνάψεις και από εκεί το κύτταρο λαμβάνει ή μεταδίδει τα σήματα.

Τόσο ο νευράξονας όσο και οι δενδρίτες έχουν τυπικό μέγεθος διαμέτρου γύρω στο 1  $\mu\text{m}$ , ενώ το Σώμα είναι γύρω στα 25  $\mu\text{m}$ , όχι πολύ μεγαλύτερο από τον πυρήνα που περιέχει. Ο νευράξονας ενός κινητικού νευρώνα μπορεί να είναι μεγαλύτερος από 1 μέτρο σε μήκος, συνδέοντας, για παράδειγμα, τη βάση της σπονδυλικής στήλης με τα δάκτυλα των ποδιών. Ο αριθμός των νευρικών κυττάρων είναι τεράστιος και είναι αδύνατο να μετρηθεί, ούτε να υπολογιστεί ακριβώς. Οι παλαιοί ανατόμοι είχαν υπολογίσει ότι στον ανθρώπινο εγκέφαλο υπάρχουν δύο τρισεκατομμύρια νευρώνες.

Η αναλογία μεταξύ του μεγέθους Σώματος και άξονα ποικίλει ανάλογα με το είδος του νεύρου και το επίπεδο του σώματος. Οι άξονες (Νευράξονες) μπορεί εκτείνονται σε μια



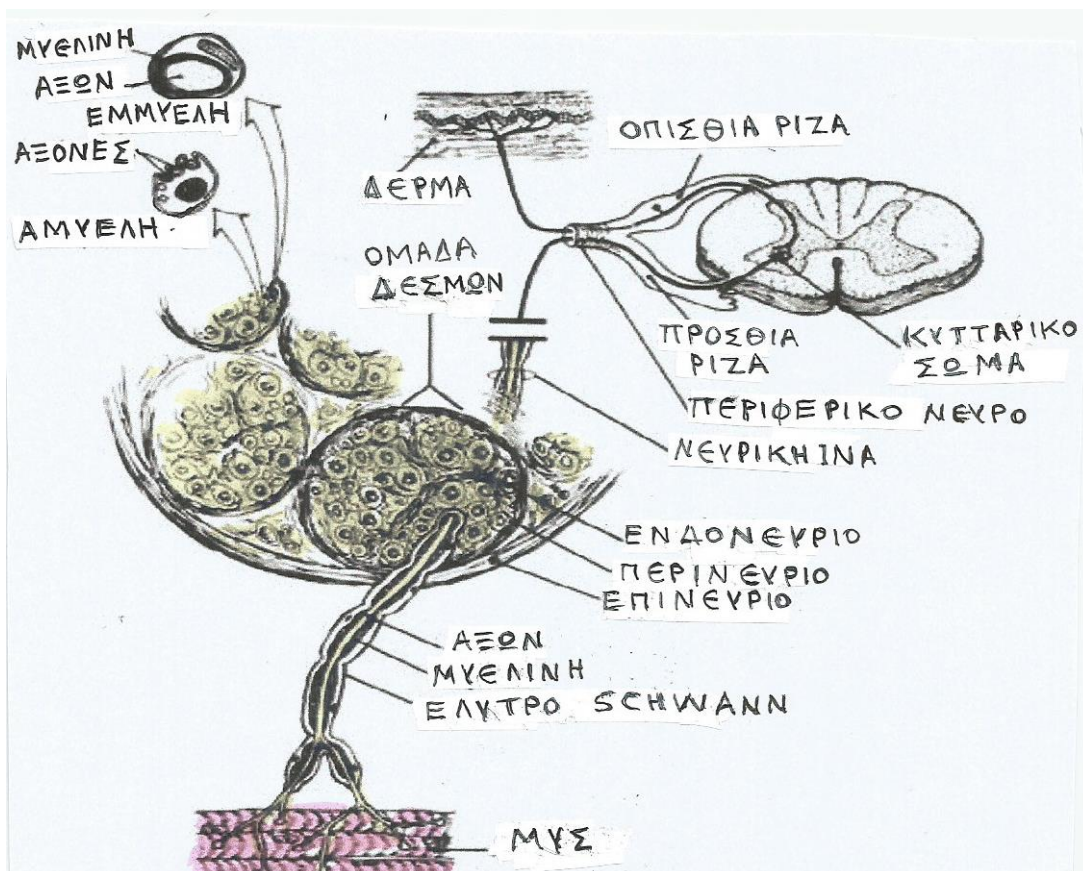
απόσταση χιλιάδων φορών μεγαλύτερη της διαμέτρου του νευρικού σώματος, για παράδειγμα ένας κινητικός Νευρώνας στο Νωτιαίο Μυελό που νευρώνει ένα μικρό μυ του ποδός μπορεί να έχει ένα μήκος νευράξονα που να φθάνει περίπου 10.000 φορές το μήκος της διαμέτρου του σώματος του. Αυτό το γεγονός επιβάλλει ειδικές απαιτήσεις στο σύστημα επικοινωνίας μεταξύ των κεντρικών και περιφερικών τμημάτων του κυττάρου. Μία αμφίδρομη ανταλλαγή χημικών μηνυμάτων μεταξύ των ακραίων τμημάτων του νεύρου συντηρείται με ορθοδρομικούς και οπισθενεργούς (retroactive) ενδοαξονικούς μηχανισμούς μεταφοράς.

Όλοι οι άξονες μπορεί να εκτείνονται πολύ μακριά στην περιφέρεια, ενώ το σώμα του νεύρου είναι πάντα εγκατεστημένο σε κεντρικό επίπεδο: Οι μεν κινητικοί Νευρώνες στα πρόσθια κέρατα του Νωτιαίου Μυελού, ενώ οι Αισθητικοί στα Νωτιαία γάγγλια των οπισθίων ριζών. Οι Νευρώνες του ΠΝΣ (Περιφερικού Νευρικού Συστήματος) είναι πολωμένοι εξαιρετικά. Οι κύριες μεταβολικές λειτουργίες και βιοσυνθετικοί μηχανισμοί είναι συγκεντρωμένοι στο σώμα όπου όπου η μετάδοση των ηλεκτρικών ερεθισμάτων και έκκριση των νευροδιαβιβαστών συμβαίνουν σε πολύ μεγάλες αποστάσεις από τα βασικά μεταβολικά κέντρα. Τοιουτοτρόπως τα απομακρυσμένα και πλέον κεντρικά τμήματα των νευρικών κυττάρων έχουν λειτουργική εξάρτηση (Interaction) μεταξύ τους. Το περιφερικό Νεύρο είναι ένα «καλώδιο» περιβαλλόμενο από το επινεύριο, που αποτελείται από χιλιάδες νευράξονες επιμήκως διατεταγμένους εντός του, ομαδοποιημένους σε δέσμες (fascicles) περιβαλλόμενες από ενδονεύριο οι οποίες με τη σειρά τους είναι και αυτές ομαδοποιημένες σε μεγαλύτερες ομάδες (group fascicles) περιβαλλόμενες από το περινεύριο. Η αιμάτωση των περιφερικών νεύρων είναι εξωγενής (τμηματική) και ενδογενής (επιμήκης) (EIKONA 1B). Η εξωγενής αιμάτωση προέρχεται από το

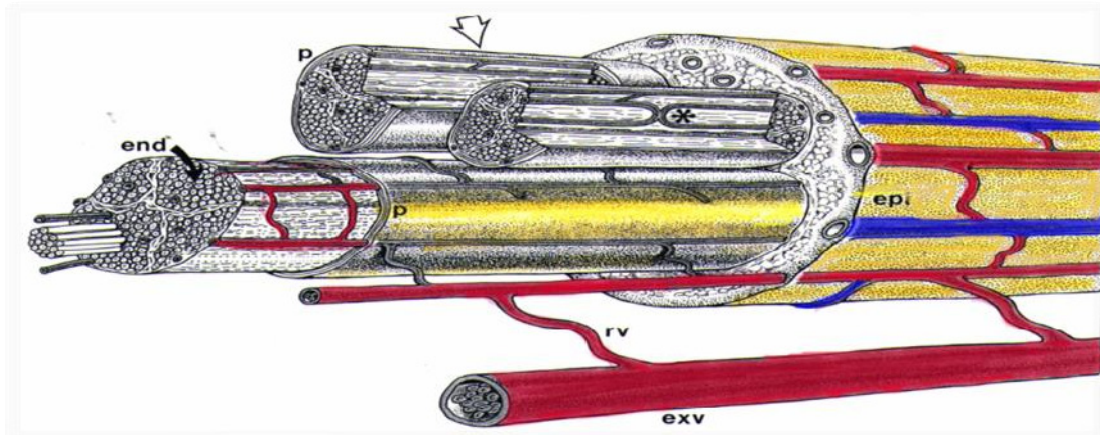
μεσονεύριο που αποτελεί χαλαρό συνδετικό ιστό μεταξύ του επινευρίου και των παρακείμενων ιστών. Όπως προαναφέρθηκε η ενδογενής επιμήκης αιμάτωση των περιφερικών νεύρων που γίνεται μέσω του επινευρίου, περινευρίου και ενδονευρίου είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένη και επιτρέπει την χειρουργική κινητοποίηση του νεύρου χωρίς την πλήρη απαγγείωση του.

Μια βλάβη σε ένα τμήμα του νεύρου έχει καταλυτικές συνέπειες για τα άλλα τμήματα του κυττάρου. Η διατομή ενός περιφερικού τμήματος ενάγει χαρακτηριστικές βιοχημικές - μεταβολικές αλλαγές στο σώμα και προκαλεί εκφύλιση των περιφερικών τμημάτων των αξόνων.

**Εικ 1Α: Ανατομία περιφερικού νεύρου, νευρώνας, νευράξονες, τελικά κινητικά και αισθητικά όργανα.**



**Εικ 1B: Εγκάρσια τομή περιφερικού νεύρου. - (αιμάτωση επινευρική και ενδονευρική).**



### **Μηχανισμός κάκωσης Περιφερικού νεύρου - Βαλλεριανή εκφύλιση - Αναγέννηση νεύρου<sup>1a, 6</sup>**

Η κάκωση ενός περιφερικού νεύρου πυροδοτεί μια αλυσιδωτή αντίδραση η οποία περιλαμβάνει μια αλληλουχία βιοχημικών και μορφολογικών μεταβολών. Η κατανόηση της βιολογίας των περιφερικών νεύρων και η συσχέτιση αυτής με τη διαδικασία της νευρικής αναγέννησης είναι ουσιώδης για μια επιτυχή επιδιόρθωση της προηγηθείσης βλάβης. Μετά τη διατομή-διάσπαση των νευραξόνων, μια αναμενόμενη αλληλουχία μεταβολών συμβαίνει στις τελικές αποφύσεις (άξονες με τελικές κινητικές πλάκες και αισθητήρια όργανα) και ταυτόχρονα αρχίζει και στο κυτταρικό σώμα των νευρώνων μόλις διοχετευθεί η πληροφορία της βλάβης βάσει των βιοχημικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα<sup>1a,6</sup>.

Επομένως αντιλαμβανόμαστε ότι δεν επισυμβαίνει του τραυματισμού μόνο ένα τοπικό φαινόμενο που απαιτεί τοπική μόνο επανορθωτική διαδικασία για το νεύρο. Η διατομή του

νεύρου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που έχει άμεσα και μακροπρόθεσμα λειτουργικές διαταραχές, ενώ διέπεται από βιοχημικές και κυτταρικές μεταβολές σε πολλαπλά επίπεδα όπου αρχίζουν από αισθητικούς μηχανικούς υποδοχείς και μύες στόχους (τελικές κινητικές πλάκες και αισθητήρια όργανα) στην περιφέρεια έως και την σωματοαισθητική και κινητική περιοχή του εγκεφαλικού φλοιού (Cajal 1928; Lundborg 2002-2003).

Αναγκαία συνθήκη για την αξονική αναγέννηση είναι η επιβίωση των αναλόγων κυτταρικών σωμάτων (Νευρώνες). Για τα περιφερικά νεύρα, κάθε νευράξονας αντιπροσωπεύει μια προέκταση του νευρικού σώματος του ευρισκόμενου στα νωτιαία γάγγλια των οπισθίων ριζών (αισθητικοί νευρώνες) ή στα πρόσθια κέρατα του Νωτιαίου Μυελού (Κινητικοί Νευρώνες). Ο τραυματισμός επιφέρει ακρωτηριασμό ενός μεγάλου αριθμού του κυτταρικού αξονοπλάσματος κάθε νευρώνα, μία δραματική βλάβη με καταλυτικές συνέπειες για το σώμα του νευρώνα. Το σώμα του νευρώνα υποβάλλεται σε χρωματολυτική διαταραχή, την απαρχή μιας πρωτεϊνικής σύνθεσης περνώντας από μια κατάσταση συντήρησης σε μια κατάσταση αναγέννησης και αύξησης. Η αξονότμηση μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του νευρώνα, ενώ ένα ποσοστό μάζας 40-50% του νευρώνα μπορεί να νεκρωθεί ως αποτέλεσμα του τραυματισμού. Και βέβαια η επιβίωση του Νευρώνα είναι αναγκαία συνθήκη για να αρχίσει η ανάπτυξη των αξόνων.

Στα πλαίσια του τραυματισμού, κάθε διατμηθείς άξων παράγει ένα μεγάλο αριθμό από κύματα αναγέννησης (sprue) τα οποία εκφράζουν παραγωγή από κύτταρα Schwann που μεταναστεύουν προς το περιφερικό νεύρο προσπαθώντας να γεφυρώσουν το τραύμα.

Ο άξονας που βρίσκεται περιφερικά του σημείου αποκοπής υφίσταται Βαλλεριανή εκφύλιση και η ικανότητα του περιφερικού νευράξονα να μεταδίδει δυναμικά ενέργειας

ελαττώνεται καθώς η διαδικασία συνεχίζεται. Το κυτταρικό σώμα αντιδρά στην διατομή του άξονα αυξάνοντας την μεταβολική του δραστηριότητα, προετοιμάζοντας την αναγέννηση. Η εξέταση των ιστολογικών τομών παρουσιάζει εκφύλιση του αξονοπλάσματος και των σχετιζόμενων δομών περιφερικά του σημείου της κάκωσης. Κεντρικά της πλευράς της κάκωσης, σημειώνονται εκφυλιστικές μεταβολές στο αξονόπλασμα σε δύο με τρεις κόμβους του Ranvier κεντρικά του σημείου της βλάβης.

Ο χρόνος (Momentum)<sup>1g</sup> της επέμβασης (επανορθωτικής χειρουργικής αποκατάστασης) μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την έκταση της νέκρωσης των αισθητικών κυττάρων. Σε ένα πειραματικό μοντέλο επίμυος, ο κυτταρικός θάνατος νευρώνων μετά τη διατομή του νεύρου βρέθηκε να είναι 21%, ενώ αυτό δεν είχε επανορθωθεί. Σε νεύρα όπου είχε γίνει άμεση επανόρθωση ο ανάλογος κυτταρικός θάνατος περιορίστηκε στο 4,8%, ενώ όταν η επανόρθωση του νεύρου πραγματοποιήθηκε με καθυστέρηση μίας εβδομάδος το ποσοστό κυτταρικού θανάτου στους νευρώνες ανήλθε στο 12,4%. Η περιγραφείσα αρχή ισχύει και έχει αξία και στη πρόιμη επανόρθωση του τραυματισμένου Βραχιονίου πλέγματος (Ma et al 2003).

### **Βαλλεριανή εκφύλιση (Wallerian Degeneration)<sup>1a,3,6,</sup>**

Η ολοκλήρωση της βλάβης σ'ένα περιφερικό νεύρο παράγεται σε μια πληθώρα συνθέσεων, οργανωμένων σ'ένα παθοφυσιολογικό φαινόμενο με περιεγραμμένες αλληλοδιαδεχόμενες φάσεις εκφύλισης και αναγέννησης.

Αμέσως μετά τη βλάβη του νεύρου, επισυμβαίνουν προβλέψιμες αλλαγές σε κεντρικό επίπεδο του κυτταρικού σώματος, εντός του εγγύς νευρικού τεμαχίου (κολοβώματος), επί

του σημείου της διατομής του νεύρου αλλά και εντός του περιφερικού της διατομής τεμαχίου, όπως και επί τελικών κινητικών πλακών και των τελικών αισθητικών οργάνων.

Μερικές ώρες μετά την νευρική διατομή, σημειώνεται χρωματόλυση σε κεντρικό κυτταρικό επίπεδο και αυξάνει η περιεκτικότητα του σε RNA, ενώ το σχήμα του νευρώνα στρογγυλοποιείται και ο πυρήνας του μεταναστεύει στη περιφέρεια κοντά στο «λοφίσκο» (μίσχο) του νευράξονα.

Ο μεταβολισμός αλλάζει από «παραγωγός Νευροδιαβιβαστών» σε «συνθέτη πρωτεϊνών βασικής μεμβράνης» όπως η β-τουμπουλίνη στη προσπάθεια να ανακατασκευάσει τον αξονικό σκελετό του νεύρου. Επίσης λαμβάνουν χώρα ειδικές βιοχημικές αλλαγές, ιδίως μία αύξηση στην σύνθεση των λιπιδίων προκειμένου να αναπληρωθούν οι μεμβράνες των κυττάρων Schwann (Σβαννοκυττάρων). Το 1850 ο Waller περιγράφει τις εξειδικευμένες αλλαγές που συμβαίνουν στο περιφερικό τμήμα των διατμηθέντων Γλωσσοφαρυγγικού και Υπογλωσσίου Νεύρων. Αυτές οι συγκεκριμένες μεταβολές έχουν επίσης παρατηρηθεί στο εγγύς κολόβωμα του νεύρου σε κάποια απόσταση, ανάλογα με την σοβαρότητα της κάκωσης, πιθανά κεντρικότερα της εντομής του Ranvier. Η Βαλλεριανή εκφύλιση ουσιαστικά αναφέρεται σε μεταβολές στο περιφερικό τμήμα του εμμύελου νεύρου.

Εν τούτοις, οι μεταβολές που επισυμβαίνουν κατά τη διατομή ενός νεύρου είναι παρόμοιες τόσο κεντρικά, όσο και περιφερικά.

Αρχικά οι νευράξονες και το έλυτρο μυελίνης διασπώνται. Τα μακροφάγα, μεταγενέστερα απορροφούν τα υπολείμματα των αξόνων και της μυελίνης και ενεργοποιούν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει μέχρι 3 μήνες για να ολοκληρωθεί η εκκαθάριση της αξοπλασμίνης. Επιπλέον περισσότερα μακροφάγα

παράγουν 2 σημαντικές Κυτοκίνες: Η πρώτη είναι η Ιντερλευκίνη-1(IL-1) η οποία με τη σειρά της εκλύει τοπική παραγωγή NGF. Επίσης τα μακροφάγα παράγουν τον «Insuline like Growth Factor- type I», ο οποίος προάγει την αύξηση των νευραξόνων. Ο ενδονευρικός αγωγός αποτελείται από το άθικτο ενδονεύριο και την βασική Μembrάνη των κυττάρων Schwann και κατά συνέπεια κολαπσάρεται και ποικίλει σε διάμετρο. Ενδεχομένως οι άξονες απορροφούνται και τα κύτταρα Schwann και τα Μακροφάγα πληρούν το χώρο του αγωγού. Αυτές οι συστοιχίες των κυττάρων του Schwann που πληρούν τους αγωγούς ονομάζονται “ζώνες του Bungner”. Οι μοριακές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα Schwann με σκοπό την προετοιμασία της ανανεύρωσης περιλαμβάνουν έκθεση των επιφανειακών υποδοχέων και θετική επαναρρύθμιση της Λαμινίνης-1 (L1), συγκόλληση νευρώνων, μορίου (N-CAM) και Τενασίνης, όλα όντας αυξητικοί καταλύτες. Η πρωτεΐνη NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), είναι μια πρωτεΐνη ομοφυλικά συνδεδεμένη που δραστηριοποιείται στην επιφάνεια των νευρώνων, στη νευρογλοία, τούς σκελετικούς μύες και τα “Killer” λεμφοκύτταρα και ενέχεται στην κυτταρική συγκόλληση, την ανάπτυξη των νευριτών, την λειτουργία των συνάψεων, ενώ συμμετέχει και στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης, αποτελεί πρωτεϊνικό σύμπλεγμα (συστάδα κυττάρων) διαφοροποίησης CD56. Πειραματικές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους απέδειξαν τις μυϊκές μεταβολές που επισυμβαίνουν της απονεύρωσης και της μετέπειτα λειτουργικής αποκατάστασης.

Εντός μηνός από την απονεύρωση, οι μύες αρχίζουν να χάνουν όγκο. Μυϊκές βιοψίες δείχνουν ατροφία και κατακερματισμό ινών. Το νωρίτερο 3 μήνες μετεγχειρητικά επισυμβαίνει μυϊκή ίνωση, κυρίως στον διάμεσο χώρο, με πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και της εναπόθεσης κολλαγόνου στο περιμύιο αρχικά και στο ενδομύιο αργότερα. Το περιμύιο που περιβάλλει τις μυϊκές ίνες υπερτρέφεται, διαχωρίζοντας τις

υποκείμενες ατροφικές μυϊκές ίνες όπως επίσης και τīs νευρικές δεσμίδες. Η παθητική κινητοποίηση και η ναρθηκοποίηση μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της ίνωσης κατά τη διάρκεια τής διαδικασίας της απονεύρωσης. Η πτωχή λειτουργική αποκατάσταση μετά από μακρά περίοδο απονεύρωσης οφείλεται σε εκφυλισμό των ενδομυϊκών νευρικών οδών, σε αντίθεση με την ίδια τη μυϊκή ατροφία. Οι ανανευρωμένες μυϊκές ίνες προϋποθέτουν τη σύσπαση – χαρακτηριστικό του ανανευρωμένου μυός. Η επάνοδος της μυϊκής λειτουργίας ως επακόλουθο της ανανεύρωσης εξαρτάται πρωτίστως και από τη διάρκεια της περιόδου ανανεύρωσης. Πολύ καλή έως πλήρης αποκατάσταση παρατηρήθηκε για περιόδους έως 12-18 μηνών από την κάκωση μέχρι την ανανεύρωση. Η ιδανική ανανεύρωση είναι αυτή που αποκτάται εντός 1 έτους από τη κάκωση, ενώ καμία επιπλέον ανανεύρωση δεν μπορεί να αναμένεται μετά την τριετία.

Οι αισθητικές ίνες των περιφερικών νευρών μπορεί να είναι: 1) ελεύθερες νευρικές απολήξεις, 2) ελεύθερες νευρικές απολήξεις με αιχμηρές επεκτάσεις, 3) ελεύθερες ειδικές νευρικές απολήξεις με εγκυστωμένες αιχμές, και 3) ελεύθερες ειδικούς υποδοχείς με εγκυστωμένες απολήξεις.

Οι ελεύθερες νευρικές απολήξεις ευρίσκονται σε όλους τους τύπους δερματικών επιθηλίων και βλεννογονικών επιφανειών: Τα συμπλέγματα Merkel των νευριτικών κυττάρων σε λεία επιδερμίδα ενώ τα συμπλέγματα Ruffini σε τριχωτό δέρμα. Τα σωματίδια Pacini και Meissner αποτελούν εγκυστωμένες αισθητικές απολήξεις ευρισκόμενες αποκλειστικά σε λείο δέρμα.

Η ανανεύρωση στα σωματίδια Pacini ανευρέθη σε πρωτεύοντα (πιθήκους), αν και λιγότερο συχνή και έντονη από εκείνης που συμβαίνει στα σωματίδια Meissner. Μετά την



απονεύρωση, τα σωματία Pacini πληρώνονται με ινώδη ιστό, ενώ έτσι επιτελείται μια μηχανική απόφραξη εντός του ενδονευρικού σωλήνα, οφειλόμενη σε επιπλέον ινώδη ιστό και τρίμματα μυελίνης.

Ο Jabalely και συνεργάτες περιέγραψαν ότι η ανανεύρωση των σωματίων Meissner είναι ατελής συμβαίνοντας στο 70% των περιπτώσεων (16 στις 27 βιοψίες πολφών δακτύλων μετά από αποκατάσταση τραύματος νεύρου). Ανεξάρτητα απ'τό εάν επετεύχθη ή όχι ανανεύρωση (Jabalely et al), το πλέον σημαντικό είναι το ότι δεν έγινε συσχετισμός με κλινική εξέταση ή με υποκειμενική αίσθηση. Άλλοι υποδοχείς που επιδέχονται ανανευρώσεως είναι οι Ruffini και τα κύτταρα Merkel.

Σε αντίθεση με τους μύες (τελικές κινητικές πλάκες), οι αισθητικοί υποδοχείς είναι ανανευρώσιμοι για πολλά έτη μετά την αρχική βλάβη. Αν και δεν έχει προσδιοριστεί κάποιο όριο χρονικής περιόδου που να έπεται του τραύματος και πέρα από το οποίο η ανάκτηση της ωφέλιμης αισθητικότητας να θεωρείται ανέφιχτη, το εξάμηνο και εδώ θεωρείται μια εύλογη χρονική περίοδος όπου μέσα στην οποία είναι καλύτερα να πραγματοποιείται η επανόρθωση, γιατί πέραν του ορίου των 6 μηνών η αποκατάσταση είναι πτωχότερη (έλεγχος με TPD test).

Όψιμη νευρική επανόρθωση σε αισθητικό νεύρο, έχει αποδειχθεί ότι επιτρέπει ανάκτηση μόνο μετρίου βαθμού προστατευτικής αισθητικότητας. Για τραυματικές απονευρώσεις παλαιότερες του 1 έτους, μόνο προστατευτική αίσθηση με το ελάχιστο σε βαθμολογία TPD-test αναμένεται (ένα σταυρό +). Είναι ενδιαφέρον ότι το NGF ελέγχει τις παράπλευρες «εκθύσεις» (κύματα = sprue) αναγέννησης νευραξόνων από άθικτους

παρακείμενους νευρώνες, προκειμένου να ανανευρώσει περιοχές με βεβλαμμένους άξονες που δεν αναγεννήθηκαν.

Η ικανότητα ενός κακοποιημένου νεύρου για αναγέννηση εξαρτάται από το βαθμό της παραμένουσας συνέχειας του νευρικού στελέχους μετά την κάκωση. Διάφοροι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες συμβάλλουν στην επιτυχή νευρική αποκατάσταση – επούλωση, όπως το είδος, η ηλικία, η κατάσταση θρέψης του ιστού, το χρονικό διάστημα που παρήλθε μετά από την κάκωση, ο τύπος της κάκωσης και το επίπεδο βλάβης. Δύο από τις σπουδαιότερες δυσκολίες στην επίτευξη ιδανικών χειρουργικών αποτελεσμάτων είναι η ενδογενής ανάπτυξη συνδετικού ιστού από γειτονικές περιοχές και η πρόληψη της αποδιοργανωμένης αξονικής μετανάστευσης που οδηγούν σε σχηματισμό νευρινώματος.

#### **Νευρικό έλλειμμα – Γεφύρωση με νευρικά μοσχεύματα <sup>1d,1f,7-9</sup>**

Οι κακώσεις των περιφερικών νεύρων συμβαίνουν συχνά και καταλείπουν σημαντική και μόνιμη αναπηρία. Η πρόγνωση μιας αντιμετωπισθείσας χειρουργικά διατομής νεύρου εξαρτάται από παράγοντες όπως το ύψος και η ποιότητα της κάκωσης, η ηλικία και η γενική κατάσταση του ασθενή, η ποιότητα της χειρουργικής τεχνικής και τελικά καθοριστικός παράγον είναι το μήκος του δημιουργηθέντος ελλείμματος και το εφικτό ή μη τελικό-τελικής συρραφή του διατμηθέντος νεύρου ή η ανάγκη πρεμβολής νευρικών μοσχευμάτων.

Η άμεση τελικοτελική συρραφή δεν είναι πάντοτε δυνατή (μεγάλα ελλείμματα) και δεν ενδείκνυται σε όλες τις νευρικές κακώσεις (π.χ σε περίπτωση ανάγκης εφαρμογής τάσης επί της συρραφής προκειμένου να επιτευχθεί η συμπλησίαση των νευρικών κολοβωμάτων).

Η αντιμετώπιση των περιφερικών νευρικών κακώσεων όταν υπάρχει νευρικό έλλειμμα είναι μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη χειρουργική των περιφερικών νεύρων<sup>1-3</sup>.

Σημαντικό έλλειμμα νευρικού ιστού κάνει απαραίτητη τη χρήση νευρικών μοσχευμάτων.

Η νευρική αναγέννηση διαμέσου ενός μεγάλου περιφερικού ελλείμματος δεν είναι εφικτή εάν δεν παρεμβληθεί ένα νευρικό μόσχευμα-αγωγός.

Βιβλιογραφικές αναφορές επιτυχούς συρραφής περιφερικών νεύρων εμφανίζονται από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, αλλά η χειρουργική αντιμετώπιση των νευρικών κακώσεων με παρεμβολή ιστού παρέμεινε ανεπιτυχής μέχρι την εμφάνιση της μεταμοσχεύσης με νευρικά αυτομοσχεύματα με μικροχειρουργικές τεχνικές. Η τοποθέτηση αυτόλογων νευρικών μοσχευμάτων η οποία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος επιδιόρθωσης ενός νευρικού ελλείμματος που παρέχει καλό τελικό αποτέλεσμα αλλά σχετίζεται με νοσηρότητα της δότριας περιοχής και μειωμένη διαθεσιμότητα<sup>1d,7,8,9,10,11</sup>, παραμένει η επικρατούσα τεχνική για την αντιμετώπιση ελλειμμάτων περιφερικών νεύρων. Τα αυτόλογα νευρικά μοσχεύματα<sup>1f</sup> πληρούν τα κριτήρια για ένα ιδανικό αγωγό διότι αυτά εξασφαλίζουν ένα διαπερατό αλλά και ευοδωτικό αγωγό-καλούπι (βασική Λαμινίνη) κυττάρων Schwann όπως επίσης κύτταρα που παράγουν νευροτροφικούς παράγοντες και κατάλληλα συμπληρωματικά-μόρια. Τα κύτταρα Schwann ενός μοσχεύματος επιβιώνουν αιματούμενα δια διαχύσεως, με τη προϋπόθεση ότι το μόσχευμα είναι αρκετά λεπτό έως ότου η επαναγγείωση του να αρχίσει από την 3<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα (Almgren 1975). Η αναγέννηση δια μέσου των νευρικών μοσχευμάτων έχει μελετηθεί από μεγάλο αριθμό ερευνητών (Hudson et al 1972, Miyamoto et al 1981, Mackinnon & Dellon 1986, H. Milessi 1972, J. Terzis 1975, Rodkey 1980, Stevens 1985, Wong 1991, Hentz 1993, Maeda 1999). Κατά την πορεία της αναγέννησης επί εφαρμογής νευρικών αυτομοσχευμάτων

παρατηρήθηκε εκτεταμένη διαμερισματοποίηση ομάδων νευραξόνων, τόσο στη εγγύς όσο και στην άπω αναστόμωση (Hanson et 1972) αλλά και κατά μήκος του κορμού του μοσχεύματος (Mackinnon & Dellon 1986)<sup>1b,5,6</sup>. Εξωδεσμικές ίνες παρατηρήθηκε ν' αναπτύσσονται καθ' όλο το μήκος του περινευρίου του μοσχεύματος σε επίμυες (Mackinnon & Dellon 1986)<sup>1b,2,3</sup>, παρόλο που οι ίνες αυτές δε θα έρθουν ποτέ σε συνέχεια με το υπόλοιπο νεύρο. Επίσης 4-6 μήνες μετεγχειρητικά θα έχει ολοκληρωθεί οριστικά ο αριθμός των νευρικών ινών που διατηρήθηκαν στο κεντρικό τμήμα του νεύρου, ενώ ένας μειωμένος αριθμός ινών λεπτότερης διαμέτρου θα παρατηρηθεί εντός του μοσχεύματος και ένας ακόμα μικρότερος αριθμός εντός του περιφερικού (άπω) τμήματος του νεύρου που καταμαρτυρώ τη διακλάδωση των ινών στο επίπεδο συρραφών και επαγωγικά την απώλεια ινών σε αυτές. Το κριτικό μήκος ενός ελλείμματος και η μέγιστη ανεκτή τάση στην πειραματική επανορθωτική χειρουργική νευρών είναι δύσκολο να προσδιοριστούν και έχει αποτελέσει αντικείμενο αντιπαράθεσεων. Πειραματικές μελέτες συγκρίνοντας τελικό-τελική συρραφή με νευρικά μοσχεύματα διαφορετικών μηκών μέχρι 20 εκατοστά έχουν αποδώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα σε εργασίες από τους παραπάνω αναφερθέντες ερευνητές μετά το 1972. Η χρήση μοσχευμάτων με καθ' ομάδας δεσμιδική συρραφής (group fascicular) πιστεύεται ότι είναι ο χρυσός κανόνας για την αντιμετώπιση των ελλειμμάτων περιφερικών νεύρων (Millessi <sup>6</sup>, Brunelli, Terzis, Mackinnon <sup>10</sup>, Dellon <sup>10</sup>) και συγκρίνεται με άλλες νέες τεχνικές.

### **Γεφύρωση με αγωγούς (αυτόλογους-τεχνητούς)** <sup>1e,1f, 7,10-26</sup>

Η νευρική αναγέννηση μπορεί για συγκεκριμένου μήκους ελλείμματα να πραγματοποιείται διά γεφύρωσης του κενού (gap) μέσω αγωγών νευρικού και μη νευρικού ιστού. Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα η αναζήτηση ενός ιδανικού υλικού ως αγωγού, οδήγησε στη

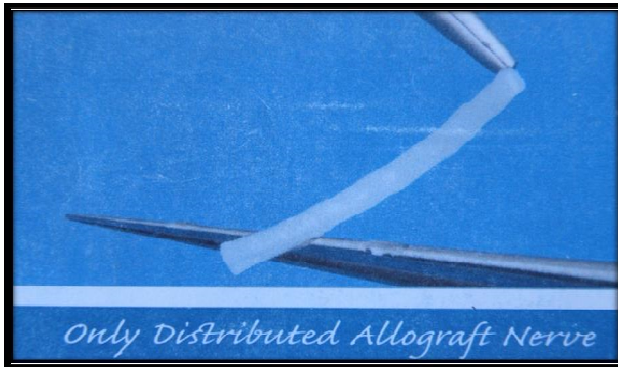
χρήση αυτολόγων και πρόσφατα και άλλων τεχνητών υλικών, και πλέον πρόσφατα ενδεχομένως και σε συνδυασμό με νευροτροφικούς (αυξητικούς) παράγοντες<sup>11-20</sup>.

Η κλινική εφαρμογή των αγωγών εστιάστηκε στη χρήση αυτολόγων ιστικών μοσχευμάτων (φλέβες, αρτηρίες, ψευδοέλυτρα, νευρικά μοσχεύματα) και παροδικά τεχνητών αγωγών (σιλικόνη, πολυγλυκολικό οξύ και πλέγμα πολυγλακτίνης)<sup>7,8,21</sup> και αυτή δοκιμάστηκε κυρίως στην γεφύρωση αισθητικών νεύρων.

Έχει επιτευχθεί πειραματικά η δημιουργία «Ψευδονεύρων» περιέχοντα επιμήκης στήλες από Σβανοκύτταρα χωρίς πραγματικούς άξονες μέσα σε σωλήνες σιλικόνης, εισάγοντας δύο άκρα διατμηθέντος νεύρου στην είσοδο και έξοδο αντιστοίχως του προαναφερθέντος σωλήνος. Σε 4 εβδομάδες παρατηρήθηκε μια δομή νεύρου στερούμενη νευραξόνων γεφυρώνοντας το κενό εντός σωλήνα σιλικόνης (Zhao et al 1992a, 1997b.) Το ψευδονεύρο που μπορεί να φθάσει σε μήκος τα 10 χιλιοστά σε επίμυες, περιβάλλεται από ένα παρόμοιο με περινεύριο ιστό. Όταν πρόκειται να επιχειρηθεί γεφύρωση κενού μέχρι 10 χιλιοστά με ψευδονεύρο, παρουσιάζονται σε αυτό παρόμοιες δυνατότητες και ιδιότητες όπως αυτές ενός πραγματικού νευρικού μοσχεύματος. Μεταξύ των κολοβωμάτων του διατμηθέντος νεύρου παρατηρήθηκε ότι αναπτύχθηκαν στήλες από Σβανοκύτταρα σχηματίζοντας νευρικό αγωγό περιέχοντα τα φυσικά στοιχεία ενός νευρικού μοσχεύματος. Εναλλακτικοί τρόποι γεφύρωσης όπως αυτός του ψευδονεύρου για κάπως μεγαλύτερα των 10 mm ελλείμματα που να εξασφαλίζουν το ελάχιστο κόστος σε θυσία αυτολόγων ιστών δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας αρχικά πολύ μικρά νευρικά τεμάχια τοποθετημένα σε σωλήνες - αγωγούς σιλικόνης, παίζοντας ρόλο πηγών -προμηθευτών Σβανοκυττάρων και

νευρο-καθοδήγησης των αναγεννώμενων νέο-αξόνων (Maeda et al 1993, Francel et al 1997).

## Εικόνα 2: Πτωματικό Κατεψυγμένο νευρικό αλλομόσχευμα



### Πτωματικά Κατεψυγμένα νευρικά αλλομοσχεύματα και συνδυασμός αυτών με ευοδωτικούς παράγοντες<sup>32-40</sup>:

Τα πτωματικά (κατεψυγμένα) παρουσιάζουν παρόμοια πλεονεκτήματα με τα αυτομοσχεύματα, διατηρώντας ως ικρίωμα το εκμαγείο τρισδιάστατης δομής του νεύρου, αλλά ταυτόχρονα είναι και ακυτταρικό δεδομένου του ότι έχουν αφαιρεθεί κύτταρα, νεκροί ιστοί, χονδροϊτίνη, αξονικά στοιχεία, Θεϊκές πρωτεογλυκάνες, στοιχεία που είναι μάλλον ανασταλτικά της νευρικής αναγέννησης<sup>32</sup>.

Σε πειραματικές μελέτες με διατηρημένα σε κατάψυξη αλλομοσχεύματα σε γεφύρωση κερκιδικού νεύρου πρωτεύοντων (Rhesus <sup>32</sup>) έχουν επιχειρηθεί σε συνδυασμό με διήθηση από κύτταρα από το μυελό των οστών, και σε ωλένιο νεύρο πρωτεύοντων (Macaca <sup>33</sup>) όπου ο συνδυασμός αλλομοσχεύματος γίνεται με κύτταρα Schwann, ελήφθησαν πολυ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επίσης πειράματα σε ισχιακό νεύρο σε επίμυες χρησιμοποιώντας νευρικά αλλομοσχεύματα σε συνδυασμούς με EGb 761 (Ginkgo Biloba Extract)<sup>34</sup> και με Insulin-Like Factor <sup>35</sup> καθώς και με Κύτταρα Schwann <sup>37</sup> έδωσαν θετικά

αποτελέσματα συγκρίσιμα με εκείνα των νEURων των των μαρτύρων γεφυρωθέντα με αυτογενές νευρικό μόσχευμα. Σε κλινικές μελέτες σε ασθενείς με διατομές Βραχιονίου πλέγματος<sup>37,38</sup> χρησιμοποιήθηκαν σε νευρομεταθέσεις αντί αυτολόγων μοσχευμάτων τα κατεψυγμένα αλλομοσχεύματα με πολύ θετικά αποτελέσματα. Επίσης έγιναν δύο προσπάθειες για μελέτες - REVIEW<sup>39,51</sup> όπου είχαμε εκτίμηση αποτελεσματικότητας και σύγκριση πρωτοκόλλων με αλλομοσχεύματα, αγωγούς και αυτομοσχεύματα, όπου φαίνεται ότι η χρήση των αγωγών είναι δόκιμη με θετικά αποτελέσματα και χωρίς νοσηρότητα δότριας περιοχής, πλην όμως εκεί όπου έγινε επί ίσους όροις η σύγκριση με τα αυτομοσχεύματα φαίνεται ότι τα τελευταία υπερέχουν και μάλιστα όταν πρόκειται για γεφύρωση κενών μεγαλύτερων των 10-15 mm σε επίμυες ή σε 3-3,5 cm σε κλινική χρήση.

### Εικόνα 3: Αγωγός εκ Σιλικόνης.



**Εκτός των νευρικών μοσχευμάτων σε πειραματικό επίπεδο έχουν δοκιμαστεί κατα διαστήματα:**

**Αγωγοί Σιλικόνης**<sup>1f,11,12,19</sup>: Το μοντέλο αγωγού Σιλικόνης (εικόνα 3) για πειραματική γεφύρωση και επανόρθωση περιφερικού νEURου αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 90' (Lundborg et al 1982b,1982d) βασιζόμενο σε προηγούμενες μελέτες αφορώσες χρήση αγωγών μεσοθηλίου για γεφύρωση παρομοίων ελλειμμάτων (Lundborg and Hansson 1979,1980, Lundborg et al 1981, 1982b, Danielsen et al 1983). Βρέθηκε ότι το εν λόγω

μοντέλο προσέφερε νέες ευκαιρίες για καλύτερες μελέτες των βασικών βιολογικών μηχανισμών και του μικροπεριβάλλοντος της νευρικής αναγέννησης και της λεπτομερέστερης ανάλυσης των φαινομένων και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων ακριβώς στο σημείο της επανόρθωσης. Η αρχή της γεφύρωσης με αγωγούς βασίστηκε στην υπόθεση της ανάγκης για «λιγότερο επεμβατικές» θεραπείες οι οποίες ευνοούν την νευρική αναγέννηση, κυρίως όταν αφορούν βραχέα νευρικά ελλείμματα όπου είναι δυνατόν τα κολοβώματα του νεύρου να εφαρμοσθούν στις εισόδους σωλήνα-αγωγού, επιτρέποντας την συσσώρευση Νευροτροφικών παραγόντων που παράγονται φυσιολογικά από το τραυματισθέν νεύρο. Πιστεύετο ότι η απουσία ραμμάτων στα άκρα του νεύρου ευνοούσε την αναγέννηση και την προώθηση αξόνων μέσα στους αγωγούς. Βρέθηκε ότι είναι δυνατή η ανάπτυξη νέου νευρικού ιστού με σχεδόν φυσιολογική δομή νεαρού νεύρου κατά μήκους του αγωγού σιλικόνης σε γεφυρωμένα ελλείμματα μέχρι 10mm σε επίμυες, ενώ η πλήρης γεφύρωση και πλήρωση του σωλήνα απαιτούσε χρόνο 4 εβδομάδων. Σε όλες τις περιπτώσεις ελλειμμάτων μέχρι 10 mm παρατηρήθη πλήρης αναγέννηση νεύρου, ενώ για μεγαλύτερα μήκη ελλειμμάτων (μεταξύ 10-15mm) δεν παρατηρήθη επαρκής ή ακόμη και καθόλου αναγέννηση νεύρου (Lundborg et al 1982b,c Williams et al 1983).

Μέσα στο σωλήνα σιλικόνης έγινε δυνατή η συλλογή και ανάλυση διαφόρων ουσιών κυττάρων και ιστών στα διάφορα στάδια μελέτης της αναγέννησης. Τίς πρώτες ώρες μετά τη διατομή νεύρου (ιδίως μετά από 3-6 ώρες) παρατηρήθη συσσώρευση υγρών μέσα στον αγωγό υγρού με νευροτροφικούς παράγοντες (NGF και CTNF) (Lundborg et al 1982d, Longo et al 1983a,b, Danielsen and Varon 1995, 1984, Lundborg 1988) καθώς και αντιφλεγμονώδη κύτταρα (Κυτοκίνες) (Longo et al 1983a,b, Danielsen and Varon 1995), τα οποία όταν συνελέγησαν και εφηρμόσθησαν σε νευρικά κύτταρα διατμηθέντα από



νεογέννητους επίμυες όπου διεπιστώθη ισχυρή νευροτροφική δράση. Τίς πρώτες ημέρες δημιουργείται ένα οργανωμένο επιμήκως προσανατολισμένο πήγμα ινικής μέσα στο σωλήνα. Μπορεί να βρεθεί επίσης λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη μέσα στο πήγμα ινικής, που προσεβλήθη από μακροφάγα (Danielsen et al 1993, Zhao et al 1993, Dalin 1995). Κύτταρα Schwann, ινοβλάστες και μικροαγγεία εισβάλλουν επιμήκως στο υπόστρωμα ινικής και από τα δύο άκρα και αυτές οι δομές επαναγγειώνονταν πρώιμα (Podhasky and Mayers 1994). Τα Σβανοκύτταρα εισέρχονται στην ινική τόσο από το κέντρο όσο και από την περιφέρεια, ενώ οι νευράξονες αναπτύσσονται σε συνδυασμό με τα Σβανοκύτταρα απ'τό κεντρικό νευρικό κολόβωμα. Σε 4 εβδομάδες οι νευράξονες φθάνουν στο άπω νευρικό τμήμα.

Το αξιολογηθέν περιεχόμενο του σωλήνα ήταν ένα νεύρο φυσιολογικής δομής γεφυρώνοντας το κενό στην κεντρική γραμμή χωρίς συμφύσεις στο έσω τοίχωμα του σωλήνα. Ένα βασικό θέμα είναι ο σχηματισμός θρόμβου μέσα στο σωλήνα. Ο θάλαμος σιλικόνης είναι αδιαπέραστος σε κύτταρα και αγγεία που σημαίνει ότι ο πρώιμος σχηματισμός πήγματος ινικής πρέπει να διαπεραστεί από αγγεία και κύτταρα από τις 2 εισόδους του αγωγού. Σε ένα βραχύ αγωγό 10mm ή μικρότερο αυτό συμβαίνει πριν ο θρόμβος διαλυθεί από ινοδύλυση. Επομένως σε επιμηκέστερους αγωγούς ο θρόμβος διαλύεται και εξαφανίζεται πριν επιτελεσθεί αγγειακή και κυτταρική ανάπτυξη που εξηγεί την ανικανότητα αναγέννησης στους επιμήκεις αγωγούς σιλικόνης. Για γεφύρωση επιμηκέστερων αγωγών, διαπερατών από αγγεία και κύτταρα, θα χρειαζόταν όπως το πήγμα ινικής υποβληθεί σε ινοδύλυση

**Αγωγοί Κολλαγόνου<sup>1f</sup>:** Μεταξύ διαφόρων βιοαπορροφήσιμων εναλλακτικών έναντι των συνθετικών, είναι οι αγωγοί Κολλαγόνου που αντιπροσωπεύουν μια ενδιαφέρουσα λύση με σημαντική κλινική δυναμική (Watanabe et al 2001, Itoh et al 2002, Toba et al 2002).

Οι αγωγοί Σιλικόνης φαίνεται να υποστηρίζουν την αναγέννηση επί των νευρικών ελλειμμάτων σε επίμυες και μύες (Kim et al 1993, Gomez 1996, Navaro 1996), Κονίκλους (Kim et al 1993, όπως και τα ανθρωποειδή (MacKinnon and Dellon 1993, Artsibald et al 1991,1995, Li et al 1992, Maddisson 1996, Krarup 2002). Οι Krarup και συνεργάτες εκτέλεσαν εκτεταμένες έρευνες σε ανθρωποειδή πάνω στη αποτελεσματικότητα χρήσης αγωγών κολλαγόνου σε νευρικά ελλείμματα. Νευρικά ελλείμματα μέχρι και 5 εκατοστά γεφυρώθηκαν επιτυχώς με οδηγούς κολλαγόνου. Μετά από παρατηρήσεις τετραετίας ευρέθη ότι η απόσταση προς γεφύρωση του νευρικού κενού επηρέαζε σημαντικά την δυνατότητα για επιτυχή μυϊκή ανανέωση.

**Αγωγοί Βιοαπορροφούμενων Πολυμερών (Πολυγλακτίνη & Πολυγλυκολικό Οξύ)<sup>1f</sup>:**

Οι αγωγοί Πολυμερών (εικόνα 4a,4b) χρησιμοποιήθηκαν τόσο πειραματικά όσο και κλινικά (Reid et al 1978, Molander et al 1982-83, Dellon & MacKinnon 1988, MacKinnon & Dellon 1990, Gipson et al 1991, Keeley et al 1991, Berger et al 1994 Toba et al 2002, Schlosshauer et al 2004). Στα πρωτεύοντα οι εν λόγω αγωγοί απεδείχθη ότι υποστηρίζουν επιτυχώς την αναγέννηση νευρών σε μήκος ελλείμματος 3εκατοστών (Dellon & Mackinnon 1988), όπως επίσης και αγωγοί από το υλικό Polyglyconate Maxon (Glycolic trimethylene carbonate) χρησιμοποιήθηκαν για να γεφυρωθούν επιτυχώς ελλείμματα 2 εκατοστών (MacKinnon & Dellon 1990). Οι προαναφερθέντες αγωγοί προάγουν εν μέρει την αναγέννηση σε μήκος ελλειμμάτων ακόμα και μέχρι 5 εκατοστά. Οι αγωγοί

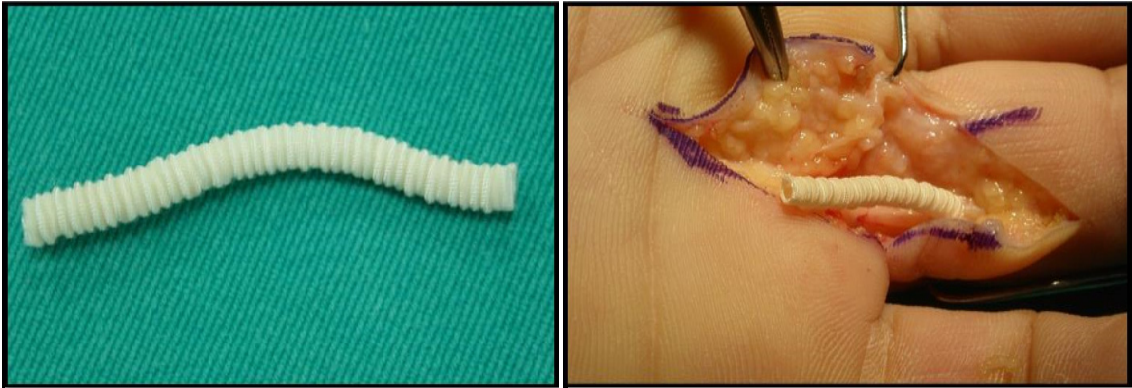
πολυγλακτίνης χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς κλινικά σε γεφύρωση δακτυλικών (αισθητικών) νευρών (Weber et al 2000) και νευρών περιοχής του προσωπικού κρανίου (Crawley and Dellon 1992). Σε εκτεταμένες πειραματικές έρευνες βρέθηκε ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονταν από απόπειρες γεφύρωσης αγωγών από βιοαπορροφήσιμα υλικά ήταν ανώτερα ποιοτικά από εκείνα που λαμβάνονταν σε αγωγούς από μη απορροφήσιμα υλικά όπως Σιλικόνη ή Teflon (Navaro et al 1994, 1996, Buti et al 1996, Gomez et al 1996, Rodriguez et al 1999, 2000, Valero-Cabre et al 2001).

Βιοδιασπώμενοι αγωγοί (DL-lactide-epsilon-caprolactone) αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί στην ευόδωση αναγέννησης αξόνων στα νευρικά ελλείμματα (den Dunnen et al 1995, 1996a, 1996b).

Σε πειραματικό μοντέλο Ισχιακού Νεύρου του επίμυος τέτοιου τύπου αγωγοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για γεφύρωση ελλειμμάτων 15 χιλιοστών επιτυγχάνοντας μερική αναγέννηση με κάποια ανάκτηση κινητικής λειτουργίας (Meek et al 2003).

Για γεφύρωση κενών μέχρι 10 mm με αγωγό από το προαναφερθέν υλικό και στο ίδιο μοντέλο είχαμε καλή κινητική αποκατάσταση (den Dunnen et al 1996a), ενώ για 7 mm νευρικά ελλείμματα στο ίδιο μοντέλο γεφυρωθέν με ακριβώς τον ίδιο αγωγό αναφέρθηκε αποκατάσταση με καλύτερα λειτουργικά αποτελέσματα ακόμα και από εκείνη που επιχειρήθηκε με αυτόλογο νευρικό μόσχευμα (den Dunnen et al 1996b). Αναφέρθηκε πείραμα με τούς παραπάνω αγωγούς με πολύ λεπτό όμως τοίχωμα, εμπλουτισμένους εσωτερικά με αποπρωτεινοποιημένο μυ (Meek et al 1997, 1999b).

Εικόνες 4α: Αγωγός Πολυγλυκού οξέος, 4β: Κλινική εφαρμογή αγωγού Πολυγλυκολικού.



#### Νευροκαθοδήγηση - σωληνωτοί αγωγοί νευρικής καθοδήγησης <sup>1f</sup>:

Ποικιλία από Συνθετικά ή βιολογικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως υλικά των νευρικών αγωγών (Fields et al 1989, Dolphy et al 1996, Schlosshauer and Lieds 2004). Οι αγωγοί μπορεί να είναι διαπερατοί ή αδιαπέραστοι σε θρεπτικές ουσίες, κύτταρα και αγγεία και μπορεί να είναι Βιοαπορροφήσιμοι ή μη απορροφήσιμοι. Οι διαπερατοί σωλήνες που επιτρέπουν τη διάχυση των θρεπτικών ουσιών και την ανάπτυξη αγγείωσης παρουσίασαν μια βελτιωμένη αναγεννητική ικανότητα (Jenq and Coggeshall 1985). Η περιοχή του αυλού του αγγείου και η υφή και μικροσκοπική δομή της εσωτερικής επιφανείας του αυλού είναι σημαντική για την οργάνωση της αύξησης των νευραξόνων και του τελικού αποτελέσματος (Williams 1987a, Aebicher et al 1990, Kim et al 1993, Buti et al 1996, Navarro et al 1996, Valero-Cabre et al 2001). Αγωγοί από Gore-Tex (expanded polytetrafluorethilene) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για γεφύρωση νευρικών ελλειμμάτων (Cuadros and Granatir 1987, Stanec and Stanec 1998, Miloro and Meicy 2000, Vasconcelos and Gey-Escoda 2000, Miloro et al 2002)

Οι αγωγοί Gore-Tex με λεία εσωτερική επιφάνεια έδειξαν καλύτερη και πιο ομαλή νευρική ανάπτυξη σε σύγκριση με αγωγούς ανώμαλης εσωτερικής επιφανείας (Danielsen et al 1988c).

Το μοντέλο του σωληνωτού αγωγού είναι ιδανικό για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων διαφόρων πειραματικών χειρισμών κατά το φαινόμενο της αναγέννησης.

Η πλήρωση του αγωγού σιλικόνης με διαλυόμενο πλάσμα ή με Λαμινίνη, Κολλαγόνο, Ινικής ή Φιμπρονεκτίνη έχει θετική επίρεια στην αναγέννηση (Madison et al 1985,1987, Muller et al 1987, Valentini et al 1987, Madison et al 1988, Rosen et al 1990, Kljavin and Madison 1991, Bailey et al 1993, Tong et al 1994, Zeng et al 1995, Labrador et al 1998, Rodriguez et al 2000, Verdu et al 2002).

**Σωληνωτοί Αγωγοί + Ευοδωτικές ουσίες:** Η εισαγωγή της Τεστοστερόνης, Γαγγλιοζιδίων (Muller et al 1987), του Matrigel (Guenard et al 1992), ή Υαλουρονικού Οξέος (Seckel et al 1995) απεδείχθη ότι ευοδώνουν επίσης την αναγέννηση. Ο NGF (Nerve Growth Factor) <sup>14,23</sup> και ο GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) που συντίθεται από το γονίδιο GDNF και ανήκει στην οικογένεια των Ligands = «συνδετών», εφαρμοζόμενοι σε συνθετικούς αγωγούς βοηθούν την αναγέννηση σε εκτεταμένα νευρικά ελλείμματα (Fine et al 2002). Η συνδυαστική χρήση Νευροτροφικών ουσιών και αγωγών θα αναπτυχθεί παρακάτω στο ομώνυμο κεφάλαιο.

**Σωληνωτοί Αγωγοί + Κύτταρα Schwann <sup>1g,60</sup>:** Η χρήση καλλιιεργημένων Σβανοκυττάρων (Κυττάρων Schwann) αποτελεί μια ελκυστική ιδέα από τη στιγμή που τα εν λόγω ζώντα κύτταρα είναι ικανά να ενεργοποιούν την έκλυση Νευροτροφικών

(ευοδωτικών αναγέννησης) παραγόντων με μεγαλύτερη ακρίβεια απ' ότι εάν παράγονται ελεύθερα αλλά βραδέως μέσα στη θεμέλιο ουσία.

Τα κύτταρα Schwann απελευθερώνουν επουλωτικές και αναγεννητικές ουσίες, κύτταρα και Νευροτροφικούς παράγοντες και η παρουσία τους είναι θεμελιώδης κατά μήκος των νευρικών ελλειμμάτων. Τα Σβαννοκύτταρα εφαρμοζόμενα κατά μήκος του αυλού δείχνουν να συμμετέχουν στη νευρική αναγέννηση (Gulati 1998, Guenard et al 1992, Kim et al 1994, Gulati et al 1995, Dumont et al 1996, Anselin et al 1997, Levi et al 1997, Nishihara et al 2000, Rodriguez et al 2000, Verdu et al 2000, Shen et al 2001, Dahlin and Lundborg 2004). Πάντως για να αποφευχθεί η απόρριψη των Κυττάρων Schwann θα ήταν προτιμότερο να κύτταρα αυτά να είναι αυτόλογα. Επιπλέον η καλλιέργεια Σβαννοκυττάρων προϋποθέτει απώλεια πολύτιμου χρόνου για τη διαδικασία. Ενδιαφέρουσες εναλλακτικές προτάσεις είναι η παρεμβολή αυτολόγων Σβαννοκυττάρων μαζί με αφαιρεθέν τεμάχιο νεύρου (Smahel Jentsch 1986, Maeda et al 1993) καθώς η χρήση οξέως αφαιρεθέντων (ληφθέντων μετά από οξεία διαδικασία πρόκλησης-έκλυσης) αυτολόγων κυττάρων Schwann (Brand et al 2004, Nilsson et al 2004). Επι πλέον μεταμόσχευση με αρχέγονα νευρικά κύτταρα (βλαστικές μορφές) σε νευρικά ελλείμματα αναφέρθηκε ότι έδωσε θετικά αποτελέσματα ευοδώνοντας την νευρική αναγέννηση (Murakami et al 2003, Schlosshauer and Lietz 2004).

**Αγωγή από πολυμερές υλικό PHBV(με δομή νάνο-ινών) με κύτταρα Schwann<sup>61</sup>:**

Μελέτη στους επίμυες από τους Esmail Biazar and Saeed Heidari Keshel (2013) έδωσε θετικά αποτελέσματα ακόμα και σε 30 mm έλλειμμα σε επίμυες !

Το PHBV (Poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) είναι ένα πολυμερές ατοξικό βιοσυμβατό πλαστικό υλικό παραγόμενο από βακτηρίδια και αποτελεί την ιδανική εναλλακτική σε πολλά μη βιοδιασπώμενα συνθετικά πολυμερή υλικά, είναι ένας θερμοπλαστικός αλιφατικός πολυεστέρας.

### **Βιολογικοί αυτόλογοι αγωγοί.**

**Φλεβικοί αγωγοί**<sup>1f,5,7,8,9</sup>: Οι αυτόλογοι αγωγοί με αιμοφόρα αγγεία αποτελούν ενδιαφέρουσες σωληνωτές δομές για γεφύρωση νευρικών ελλειμμάτων, ενώ τόσο αρτηρίες (Anderson and Turmaine 1986) όσο και φλέβες (Heijke et al 1993, Tang et al 1995), καθώς και οι “inside-out” τύποι φλεβικών αγωγών (Wang et al 1995). Έχουν δοκιμαστεί επιτυχώς πειραματικοί φλεβικοί αγωγοί 4-15mm (Suematsu et al 1988, Wang et al 1993, Benito-Ruiz 1994, Strauch et al 1996, Strauch 2000) ως αγωγοί γεφύρωσης νευρικών ελλειμμάτων. Σε πειραματικό μοντέλο κονίκλου, επετεύχθη καλή ανάπτυξη νευραξόνων δια μέσου φλεβικών αγωγών μήκους έως 30mm (Strauch et al 1996, Strauch 2000). Επιτυχής απεδείχθη και η χρήση φλεβικών μοσχευμάτων σε αισθητικά νεύρα άνω άκρου (Malizos et al, 1997). Ενδιαφέρουσα είναι και εργασία που πειραματίζεται με περιτύλιξη των νευρικών μοσχευμάτων με προστατευτικές λωρίδες φλεβός για το σημείο νευρορραφής για καλύτερο αποτέλεσμα νευρικής αναγέννησης (Varytimidis et al 2000)<sup>7</sup>.

### **Κατεψυγμένος και συντεθλιμμένος - επεξεργασμένος (αποπρωτεϊνισμένος) μυς**<sup>1f,29,30,31</sup>

Εξετάζοντας την δυνατότητα της μυϊκής ίνας (εικόνα 5) να χρησιμεύσει ως ιδανικός αγωγός γεφύρωσης νεύρων και διέλευσης των αναγεννηθέντων νευραξόνων, εντός της θεμελίου ουσίας (βασικής μεμβράνης), προκύπτουν τα εξής: Επειδή τα πρωτεϊνικά συνθετικά συστατικά του μυός είναι τα δομικά εκείνα που εμποδίζουν την ταχεία και

εύκολη διέλευση των νεοσχηματισθέντων νευραξόνων μέσα στη μυϊκή ίνα, εκρίθη αναγκαίο από τους πρώτους πειραματιστές<sup>26,27,28</sup> που ασχολήθηκαν με τη χρήση της μυϊκής ίνας ως αγωγού ότι υπάρχει ανάγκη αποβολής των πρωτεϊνικών στοιχείων (πλην της λαμινίνης = ουσία ευοδωτική της νευρικής αναγέννησης). Η αποβολή των πρωτεϊνών ή αποπρωτεϊνοποίηση, δηλαδή ένα είδος διαδικασίας εκφύλισης (DENATURATION) της μυϊκής ίνας μπορούσε να επιτευχθεί δια της οσμωτικής διασπαστικής δράσης επί των πρωτεϊνών ειδικών τεχνικών όπως η κατάψυξη με πρωτοξείδιο του αζώτου (N<sub>2</sub>O) και σύνθλιψη της μυϊκής ίνας πριν αυτή τοποθετηθεί ως μέσον γεφύρωσης (Keynes-1984, Glasby 1986, Chen –1994<sup>29-31</sup>). Πειραματικές μελέτες σε Ισχιακό και Γαστροκνήμιο νεύρο σε επίμυες (Keynes et al 1984)<sup>29</sup>, σε ωλένια νεύρα πιθήκων Μαρμοζέτ (Glasby et al 1986<sup>30</sup>) και σε Ισχιακό νεύρο μεγάλης ομάδος επιμύων και μελετηθέντα για 6 μήνες (Chen et al 1994<sup>31</sup>), έδειξαν ότι σε σύγκριση με ζώα μάρτυρες όπου χρησιμοποιήθηκαν νευρικά μοσχεύματα, αρχικά (στους 2-3 μήνες μετεγχειρητικά) οι σειρές πειραμάτων υστερούσαν ως προς την ποιοτική αναγέννηση, ενώ αργότερα (3 με 6 μήνες) η αξονοποίηση της μυϊκής ίνας (αντικατάσταση μυϊκού ιστού με εμμύελες νευρικές ίνες) ήταν η ίδια με αυτή στις χειρουργηθείσες σειρές με νευρικά μοσχεύματα.

**Μυς εντός φλεβός<sup>45-54</sup>: Νωπός μυς σε φλέβα:** Χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς αγωγοί από νωπό μυϊκό ιστό εντός φλεβός βασιζόμενοι στη θεωρία ότι ο μυς θα κρατήσει την έκπτυξη της φλέβας (εσωτερική ναρθηκοποίηση) και επίσης παρέχει θεμέλιο βασική ουσία που ευοδώνει την ανάπτυξη των νευραξόνων (Brunelli et al 1993, Batiston et al 2000a, 2000b, Toss et al 2000, Fornaro et al 2001), Επομένως 1-2 εκ κενά στο ισχιακό νεύρο του επίμυος έχουν γεφυρωθεί με επιτυχία. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα από κλινική χρήση του συνδυασμού μύος - φλεβός έχουν επίσης ανακοινωθεί.



### Εικόνα 5: Μυϊκή δέσμη ως αγωγός πρό της επεξεργασίας με N<sub>2</sub>O.



**Ίνες κολλαγόνου - Αυτόλογοι τένοντες<sup>1f</sup>:** Οι ίνες κολλαγόνου έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως αγωγοί γεφύρωσης νευρικών ελλειμμάτων έως και 30mm (Yoshii et al 2001,2002,2003). Οι ίνες κολλαγόνου δύνανται να συλλεχθούν από αυτολόγους τένοντες και χρησιμοποιήθηκαν για γεφύρωση ελλειμμάτων διαφόρων μηκών στο ισχιακό νεύρο του επίμου (Brand al 1999a, 1999b, 2002). Στα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κολλαγόνοι ίνες από ουρά επίμου είτε στο αρχικό τους σχήμα, είτε σε μεταποιημένο και συνεπώς τυλιγμένο σχηματίζοντας ένα χαλαρό ρολό κολλαγόνου για γεφύρωση ελλειμμάτων 10-15 mm. Η αναγέννηση έλαβε χώραν κατά μήκος αυτών των αγωγών αποδείχθηκε το ίδιο αποτελεσματική όπως εκείνη στο πείραμα με τους αγωγούς από κατεψυγμένο και συντεθλιμμένο μυ (Brandt et al 2002). Επίσης αναφέρθηκε ως αγωγός «τενόντιο αυτομόσχευμα αποικισμένο με πειραματικώς καλλιεργημένα Σβανοκύτταρα πριν την μεταμόσχευση», όπου η διαδικασία της αναγέννησης απεδείχθη ενισχυμένη σημαντικά (Nishiura et al 2004). Αξιοσημείωτο είναι ότι τα Σβανοκύτταρα μπορεί να διασπασθούν οξέως από τα κολοβώματα ενός μόλις διατμηθέντος νεύρου και να ενοφθαλμισθούν δια του τενοντίου αυτομοσχεύματος για γεφύρωση του νευρικού ελλείματος, αυξάνοντας την αναγεννητική ικανότητα εντός του σχηματισθέντος αγωγού

(Brandt et al 2004). Το πείραμα απεικονίζει ένα ενδιαφέροντα τύπο της μηχανικής του ιστού όπου αυτόλογα κυτταρικά στοιχεία χρησιμοποιήθηκαν για να βελτιώσουν ικανότητα αναγέννησης ενός κατασκευασμένου μοσχεύματος απο το ίδιο είδος.

**Αγωγοί Αλγινικού Νατρίου<sup>45</sup>:** Διάφοροι τύποι αγωγών Αλγινικού Νατρίου αποδείχθηκαν χρήσιμοι για γεφύρωση νευρικών ελλειμμάτων (Mosahebi et al 2001,2003). Κενά μέχρι 15 mm σε ισχιακό νεύρο γαλής γεφυρώθηκαν επιτυχώς με κατεψυγμένη αποξηραμένη γέλη Αλγινικού Νατρίου καλυμμένη με πολυγλυκολικό οξύ (Suzuki et al 1999,2000, Sufan et al 2001, Hasimoto et al 2002). Τα Αλγινικά χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά επίσης σε επανόρθωση του προσωπικού νεύρου. Σε γαλή χρησιμοποιήθηκαν σπόγγοι Αλγινικών για γεφύρωση προσωπικού νεύρου με καλά αποτελέσματα λειτουργικά και ιστολογικά σε 4 μήνες (Wu et al 2002). Η προσθήκη Φιμπρονεκτίνης σε ουσία Αλγινικών βελτιστοποιεί την νευρική αναγέννηση (Mosahebi et al 2003).

Τα Αλγινικά επίσης χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της επιμήκυνσης διατετμημένων αξόνων νωτιαίου μυελού σε βρέφη επιμύων (Kataoka et al 2001).

**Poly-3-Hydroxy-butyrate (PHB):** Το PHP είναι Βιοδιασπώμενο πολυμερές φυσικής προέλευσης χρησιμοποιηθέν ως ένα προϊόν αποθήκευσης βακτηρίων. Το PHP τυλιγμένο γύρω από ένα σημείο συρραφής νεύρου χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ως εναλλακτική συρραφής νεύρου σε επίμυ (Hazari et al 199a,199b, Ljungberg et al 1999). Η εν λόγω ουσία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς προς γεφύρωσιν ελλειμμάτων 40 mm στο κοινό περονιαίο νεύρο κονίκλου (Young et al 2002).

**Γενικά για αγωγούς<sup>1f</sup>:** Το κριτικό μήκος ελλείμματος προς αναγέννηση μέσω αγωγού σιλικόνης στο ισχιακό νεύρο του επίμυος, είναι 10mm, αλλά η εισαγωγή επιμηκών

συνθετικών νευρονηματίων δύνανται να σταθεροποιήσει τη θεμέλιο ινική ουσία και να επιτρέψει την αναγέννηση σε ελλείμματα έως το λιγότερο 15 mm (Lundborg and Kanje 1996, Lundborg et al 1997). Όταν τα επιμήκη νηματία χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό μία ζωηρή αύξηση των νευραξόνων παρατηρήθηκε μεταξύ των νηματίων, τα νηματία τα ίδια καλύφθηκαν από μακροφάγα κύτταρα, τοιουτοτρόπως ερεθίζοντας τη διαδικασία της αναγέννησης (Lundborg and Kanje 1996, Lundborg et al 1997, Terada et al 1997a, 1997b, 1997c, Dahlin and Lundborg 1999, Stieuar et al 1999, Arai et al 2000, Schlosshauer et al 2003, Schlosshauer and Lietz 2004). Οι αγωγοί σιλικόνης χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς σε ελλείμματα ωλενίου και μέσου νεύρου.

#### **Απόπειρα γεφύρωσης με επινεύριο 22,23,24,25,26,27,51,52,54-56**

Στην αναζήτηση του ιδανικού υλικού για αγωγούς έχει χρησιμοποιηθεί επίσης το επινεύριο. Ένας ανασταλτικός παράγων που μάς κάνει να αντιμετωπίζουμε το παραπάνω ενδεχόμενο με σκεπτικισμό είναι ότι το επινεύριο φέρει την πλειοψηφία των νευρικών αγγείων όπως το κύριο επίμηκες τροφικό αγγείο του νεύρου (Vasa nervorum). Όπως προαναφέρθηκε η αιμάτωση των περιφερικών νεύρων είναι εξωγενής (τμηματική) και ενδογενής (επιμήκης). Η ενδογενής επιμήκης αιμάτωση των περιφερικών νεύρων που γίνεται μόνον μέσω του επινευρίου με το ίδιο αγγείο του νεύρου που φαίνεται επιφανειακά, αλλά και αγγεία του περινευρίου και ενδονευρίου με δικούς τους ενδογενείς αγγειακούς άξονες είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη και επιτρέπει την χειρουργική κινητοποίηση του νεύρου χωρίς την πλήρη απαγγείωση του.

Επειδή λοιπόν έχει ανιχνευθεί ότι πρόσθετη αγγείωση-αιμάτωση παρέχεται από επιμήκεις αγγειακούς άξονες από το το ενδονευρικό αγγειακό πλέγμα και από διάφορους

διατιτραίνοντες κλάδους και επειδή επίσης υπάρχει ακόμα ένας άλλος τύπος αγγειακής παροχής από περιφερικά προς κεντρικά (reversed flow) που περιλαμβάνει βραχύτερα αγγεία από τους βασικούς κλάδους<sup>1,7</sup> εκρίθη ότι και εάν ακόμη στερηθεί την επιφανειακή κυκλοφορία του το νεύρο, η εν τω βάθει κυκλοφορία του ενδέχεται να επαρκεί ώστε το επινεύριο να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν αυτόλογος αγωγός στην γεφύρωση βραχέων νευρικών ελλειμμάτων. Η τεχνική του επινευρικού πετάλου<sup>51,52</sup> περιεγράφη από τον Snyder et al, το 1974 και εφαρμόστηκε σε ζώα και ανθρώπους. Από τότε η τεχνική αξιοποιήθηκε σε διάφορες πειραματικές μελέτες. Οι πλέον ενδιαφέρουσες αναφορές που αφορούν ή πλησιάζουν το θέμα της παρούσης έρευνας ήταν η εργασία της Κας Seimeionon<sup>54,55</sup> η οποία όμως αφορά δημιουργία ελλείμματος νεύρου με διατήρηση ακεραίου του επινευρίου και όχι την παρασκευή επινευρικού σωληνωτού κρημνού προς γεφύρωσιν ελλείμματος (επομένως δεν αντιστοιχεί ακριβώς στην ιδέα της έρευνας μας) και ομάδας χειρουργών της Κωνσταντινουπόλεως (Karacaoglu et al)<sup>22</sup> που όμως 1) αφενός δεν εξετάζει ξεχωριστό group πειραματοζώων με επινευρική τεχνική ενώ ομιλεί για ομάδες με χρήση αγγείων, μυών και επινευρίων, 2) αφ'ετέρου δεν περιγράφει ευκρινώς την τεχνική συρραφής ή εφαρμογής των επινευρικών κρημών που χρησιμοποίησαν, επίσης 3) εξάγει συμπεράσματα επι αποτελεσμάτων που λαμβάνονται συνολικά αξιολογώντας συλλήβδην όλα τα είδη αυτογενών αγωγών, συμπεραίνοντας τελικά γενικά και κάπως αόριστα ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση στην ποιότητα των αποτελεσμάτων ξεχωριστά για κάθε τύπο αγωγού, και 4) το πείραμα τους δεν έγινε σε κονίκλους, παρά σε επίμυες όπου όπως διαπιστώσαμε η ασφαλής λεπτομερής παρασκευή του επινευρίου ακόμα και με χρήση μικροσκοπίου είναι πρακτικά σχεδόν αδύνατη.

Συμπερασματικά στο παραπάνω άρθρο <sup>22</sup> βλέπουμε ότι χρήση του επινευρίου ως ελεύθερου σωληνωτού αγωγού εξετάστηκε επίσης σε μοντέλο επίμυος με έλλειμμα ισχιακού νεύρου μαζί με μοντέλο φλεβός και αρτηρίας, χωρίς λεπτομερή περιγραφή της τεχνικής συρραφής επινευρίου και με μη διακριτά και σαφή αποτελέσματα όσον αφορά τη νευρική αναγέννηση, επομένως δεν είναι πείραμα συγκρίσιμο με τη παρούσα μελέτη.

Στη παρούσα μελέτη που εκτελείται επί λευκού κόνικλου Νέας Ζηλανδίας χρησιμοποιήθηκαν 3 παραλλαγές επινευρικού κρημνού για τη γεφύρωση βραχέος νευρικού ελλείμματος ισχιακού νεύρου σε κουνέλι 10 mm και συγκρίνονται ηλεκτρομυογραφικά, μικροσκοπικά και ανοσοϊστοχημικά με ομάδα μάρτυρα όπου χρησιμοποιείται απλά η παρεμβολή νευρικού αυτολόγου μοσχεύματος για τη γεφύρωση του εν λόγω ελλείμματος.

### **Εκτίμηση και σύγκριση αποτελεσματικότητας μελετών χρήσης διαφόρων ειδών αγωγών για γεφύρωση νευρικού ελλείμματος.**

Μέχρι τώρα, η ποικιλία των υλικών ή η διαφορετική φύση των αγωγών, τεχνητών ή αυτολόγων, δεν έδειξαν σημαντική συμμετοχή στη βελτίωση του αποτελέσματος όσον αφορά τη νευρική αναγέννηση σε σύγκριση με την τοποθέτηση αυτόλογων μοσχευμάτων. Ελαφρά μόνο ίσως υπερέχουν ως προς στην αποτελεσματικότητα οι βιοαπορροφήσιμοι και βιοδιασπώμενοι αγωγοί και οι αυτόλογοι έναντι των μη απορροφήσιμων πχ σιλικόνης. Το μεγαλύτερο εμπόδιο στη χρήση των αγωγών είναι το μήκος του νευρικού ελλείμματος που μπορεί να γεφυρωθεί επιτυχώς το οποίο πειραματικά φθάνει σε κόνικλο ή επίμυ τα 10-12 mm, ενώ κλινικά (στον άνθρωπο) είναι 2,5-3 εκ.

Ίσως εάν συνδυασθεί με ταυτόχρονη χορήγηση Νευροτροφικών παραγόντων και Σβαννοκυττάρων να μπορούν να γεφυρωθούν ελαφρώς μεγαλύτερα μήκη κενών, πχ

μεγαλύτερα κατά 10%. Τα παραπάνω αναφερόμενα μήκη σε πειραματικό και κλινικό επίπεδο μπορούν να χαρακτηρισθούν με τον όρο «BRACHY ΝΕΥΡΙΚΟ ΕΛΛΕΙΜΜΑ» και αποτελούν ανυπέρβλητο αντικειμενικό εμπόδιο για την καθιέρωση των αγωγών στην γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος (LIMITING FACTOR).

Σε περίπτωση μεγαλύτερων σε μήκος ελλειμμάτων όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος της διατριβής είναι απαραίτητη η χρήση νευρικών ομόλογων μοσχευμάτων.

**Οδηγίες της Peripheral Nerves Society (PNS) για κλινική χρήση αγωγών στα νευρικά ελλείμματα<sup>82</sup>:** Πέντε προϊόντα μοσχευμάτων έλαβαν άδεια χρήσης (αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα), όλα διαμορφωμένα σε κοίλους σωλήνες, προσφερόμενα απλά ως μηχανικό κρίωμα, αποκλειστικά για χρήση σε βραχύ νευρικό έλλειμμα (< 3-5 cm).

**ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΑΓΩΓΟΥΣ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗΣ ΑΠ ΤΗΝ ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ<sup>82</sup>.**

ΟΝΟΜΑ (ΠΡΟΙΟΣ)	ΥΛΙΚΟ	ΔΙΑΜΕΤΡΟΣΧΛΗΚΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
NEUROTUBE	POLYGLYCOLIC ACID	2-8 mm x 4 cm	3 μήνες	Synovis Micro Co-UK
NEUROMATRIX NEUROFLEX	COLLAGEN-TI	2-6 mm x 2,5cm	7 μήνες	Collagen matrix Inc Franklin NJ, USA
NEUROLAC	PolyDL-Lactide- Caprolactone	1,5-10mm x 3cm	16 μήνες	Polyglycanics BV The Netherlands
NEURAGEN	COLLAGEN TI	2-7mm x 2cm	4 έτη	Integra Neuroscience NJ U.S.A
SALU BRIDGE	POLYVINIL ALCOOL HYDROGEL	2-10mm x 6,35cm	OXI	Salumedia LLC Atlanta U.S.A

Εγκυρες δημοσιεύσεις με κλινικά δεδομένα υπάρχουν μόνο για τα προϊόντα Neuragen & Neurolac.

### **Βασικές προδιαγραφές νευρικών αγωγών (από την Peripheral Nerve Society):**

Κάθε υλικό που επιλέγεται πρέπει να προσφέρεται για κατασκευή αγωγού, να είναι συρράψιμο, αποστειρώσιμο, πορώδες, χαμηλής αντιγονικότητας, ανθεκτικό σε συμπίεση και καθίζηση και κατά την αναγέννηση του νεύρου και βιοδιασπώμενο μετά, ελαστικό.

Η Νανοτεχνολογία<sup>83</sup> συμβάλλουσα στη κατασκευή προχωρημένων υλικών από πολυμερές υλικό PHBV(με δομή νάνο-ινών) ή PLGA έφθασε σε παραγωγή τους ακόμα και με εκτυπωτές τρισδιάστατης απόδοσης 3d αγωγών (MicroFabCorporation).

Επίσης μεγάλη πρόοδος σημειώθηκε όσον αφορά τη χορήγηση ευοδωτικών παραγόντων με τα συστήματα μικροσφαιριδίων βραδείας απελευθέρωσης (MicrosphereDelivery Systems) όπως πχ Chitin Tubes<sup>84</sup> με PLGA Microsphere ή PHEMA Tubes<sup>85</sup> με PLGA Microspheres.

### **Αυξητικός παράγων (NGF) και άλλοι ευοδωτικοί παράγοντες της νευρικής αναγέννησης**<sup>1c,1g, 24,28-34, 65,66,67,68</sup>

Εδώ και πενήντα έτη με την ανακάλυψη του NGF (Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα) από τους Levi-Montalcini & Hamburger (1953), άρχισε μια ανερχόμενη ανάπτυξη της πειραματικής και κλινικής έρευνας στο εν λόγω πεδίο και έκτοτε όλο και περισσότεροι νέοι νευροτροφικοί παράγοντες περιγράφονται. Οι νευροτροφικοί παράγοντες είναι μια ομάδα από μοριακούς διαλυτούς παράγοντες με ισχυρή επίδραση επί της διαδικασίας επιβίωσης και αναγέννησης του νευρώνα και στην ανάπτυξη και αύξηση των νευραξόνων ή δενδριτών. Πολλές αναφορές, πειραματικές μελέτες και ανασκοπήσεις αρχίζοντας από το 1995 εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία που καλύπτουν όλο το φάσμα και τις πλευρές δράσης και αλληλεπιδράσεων των εν λόγω νευροτροφικών ουσιών (Canahan & Nawa 1995, Conover & Yanacopoulos 1997, Terzis et al 1997). Σε μια ιστορική αναδρομή

της εισαγωγής χρήσης των εν λόγω παραγόντων πριν ακόμα χρησιμοποιηθούν για ενίσχυση της νευρικής αναγέννησης σε τεχνικές επανόρθωσης, εφαρμόστηκαν για την ελαχιστοποίηση της μετατραυματικής νέκρωσης του νευρικού κυττάρου.

Η πρώτη βασική προϋπόθεση για την αναγέννηση και αύξηση των νευραξόνων είναι η μετατραυματική επιβίωση του νευρώνα. Στη πειραματική ιατρική ο μετατραυματικός θάνατος των DRG κυττάρων (Dorsal Roots Ganglion) μπορεί να ελαττωθεί ουσιαστικά δια τοπικής εφαρμογής του **NGF** στο επίπεδο επανόρθωσης (Rich et al 1987,1989, Wiberg et al 1989). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν επίσης μετά την ενδοθηκική διήθηση με **NGF & NT-3** (Liungberg 1999). Ο NT Factor είναι συνδυασμός Γλυκοφωσφολιπιδίων με προβιοτικά και αντιοξειδωτικά μέσα, παρεμβαίνει στον αναβολισμό των οξειδωμένων Φωσφολιπιδίων σε μιτοχονδριακό επίπεδο.

Επίσης παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατόπιν τοπικής χορήγησης **1-Ιντερλευκίνης** (Da Silva et al 1990).

Επίσης η συστηματική χορήγηση αμινοξέων **Ακετυλ-L καρνιτίνης** και **N-Ακετυλ-κυστεΐνης**

(**NAC**) απέκλεισε εικονικά τον θάνατο των αισθητικών κυττάρων σε επίμυες (Mc Key Hart et al 2002a; Hart 2004).

Η απώλεια των κινητικών νευρώνων μπορεί να περιορισθεί με τη χορήγηση **BDNF**, **GDNF** (Li et al 1994,1995,1998, Novikov et al 1991, 1995, 96, 97, Novikov 1999). Επί πλέον, αναφέρεται ότι η χρήση **NAC** (NAC transcription factor), μία πρωτεΐνη που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των «plant-specific transcription factors» περιορίζει το κυτταρικό θάνατο σε τραυματισμούς των κινητικών νευρώνων (Wiberg et al 2003).



Ο **NGF**<sup>14,23</sup> στη πειραματική ιατρική, μπορεί να ευοδώσει την ανάπτυξη των νευραξόνων κατά μήκος μέσα σε νευρικούς αγωγούς (Rich et al 1989, Da Silva et al 1990, Derby et al 1993) χορηγούμενος συστηματικά ή τοπικά δια χρήσεως μίας οσμωτικής αντλίας χορήγησης (Wong and Scot 1991), ή δια μιας εμφυτεύσιμης δεξαμενής εκ σιλικόνης (Santow et al, 1998, 1999a, 1999b), ή χορηγούμενη μέσω ενός ενεργού δικτύου Φιμπρονεκτίνης (Whithworth et al 1996). Επιπροσθέτως και διάφοροι άλλοι Νευροτροφικοί παράγοντες μπορεί να ενισχύσουν την ανάπτυξη των νευραξόνων (Frostick and Kemp 1998, Yin et al 1998, Meek and Cort 2002). Η τοπική εφαρμογή δια συστημάτων αντλιών **BDNF**<sup>1c,1g,66</sup> (Brain-derived neurotrophic factor) και **CNTF**<sup>1f,1g,65</sup> (Ciliary neurotrophic factor) βελτιώνουν τα αποτελέσματα και τη ποιότητα της λειτουργικής αποκατάστασης σε χειρουργηθέντα Ισχιακά νεύρα επιμύων (Lewin et al 1997).

Ο **BDNF**<sup>1c,1g,66</sup> εφηρμοσμένος δια παροχής σε αγωγούς σιλικόνης φάνηκε να αυξάνει την ικανότητα αναγέννησης νEURων δια γεφύρωσης με αγωγούς (Udley et al 1996) και επίσης έχει θετικό αποτέλεσμα σε αναγέννηση μετά από άμεση νευρική επανόρθωση (Ho et al 1998).

Η Συστηματική ή η τοπική εφαρμογή του πολυπεπτιδίου **CNTF**<sup>1f,65</sup> βρέθηκε ότι αυξάνει ο αριθμός των νευραξόνων στη άπω πλευρά του συνδεθέντος νEURου (Sahenk et al 1994 από την ομάδα ερευνητών πανεπιστημίου του Ohio).

Η τοπική εφαρμογή **IGF-1 (Insulin-like growth factor 1)**<sup>1c,1g</sup> στο Ισχιακό νEURο του κονίκλου αυξάνει τη ταχύτητα της ανάπτυξης των νευραξόνων σε συγκεκριμένη συγκέντρωση (Kanje et al 1989, Sjoberg and Kanje 1989), μια δράση που μπορεί να εξουδετερωθεί εάν χορηγηθούν αντισώματα στο IGF-1. Ο **IGF-1 (Insulin-like growth**

**factor 1)** ή άλλως καλούμενη **somatomedin C**, είναι μία πρωτεΐνη που στο ανθρώπινο είδος είναι κωδικοποιημένη από το γονίδιο **IGF1**.

**O FGFs (Fibroblast Growth Factors)**<sup>1c,1g</sup> ευοδώνει την ανάπτυξη των νευραξόνων σε συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (Danielsen et al 1998b, Coreido et al 1989, Walter et al 1993, Fujimoto et al 1997), ο GDNF και ο NGF χορηγούμενοι από συνθετικούς αγωγούς καθοδήγησης ευνοούν την νευρική αναγέννηση κατά μήκος των νευρικών ελλειμμάτων (Fine et al 2002).

Παρότι η χρήση των ευοδωτικών αυξητικών παραγόντων παρουσιάζει μια τεκμηριωμένη ουσιώδη δυναμική για κλινική χρήση των περιφερικών νεύρων (Olson et al 1997)<sup>1c,1g</sup>, οι εν λόγω ουσίες δεν έχουν ακόμα ενταχθεί στη κλινική θεραπευτική της νευρικής επανόρθωσης. Δεν γνωρίζουμε ποίοι παράγοντες, σε τί μορφή, σε τι δόση και για πόσο χρόνο πρέπει να χορηγηθούν και τι παρενέργειες και τι τοξικότητα ή καρκινογενετική δυναμική παρουσιάζουν. Πάντως φαίνεται ότι παρουσιάζουν στρατηγικό ενδιαφέρον στο σχεδιασμό της αντιμετώπισης του τραύματος του περιφερικού νεύρου για το εγγύς μέλλον. Διάφοροι παράγοντες σε διάφορες μορφές, είτε δια συστηματικής χορηγήσεως, είτε δια τοπικών εγχύσεων με ειδική αντλία, πολυμερή, μορφή γέλης ή μικροσφαίρες.

**O παράγων Fk-506 (Tacrolimus)**<sup>64</sup> είναι μια ουσία με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες συχνά χρησιμοποιούμενη σε μεταμοσχεύσεις διαφόρων ιστών και οργάνων με σκοπό την πρόληψη και αποφυγή των απορρίψεων μοσχευμάτων. Πρόσφατα απέκτησε μεγάλο ενδιαφέρον η έρευνα της συμβολής του Fk-506 στην νευρική αναγέννηση όταν έγινε αντιληπτό ότι στα μεταμοσχευμένα μέλη (χέρια) τα νεύρα αναγεννώντο ταχύτερα στους

ασθενείς που είχαν λάβει τον Fk-506 (Jones et al 2000, Owen et al 2001, Piza-Katzer 2001, Dubernard et al 2002).

Τα θετικά αποτελέσματα που αφορούσαν την νευρική αναγέννηση όπου εφαρμόστηκε ο Fk-506<sup>64</sup> οφείλονται σ'έναν αριθμό επιδράσεων του εν λόγω παράγοντα επί του νευρικού συστήματος (Gold 2000, Gu et al 2001, Owen et al 2001).

Φαίνεται από την βιβλιογραφία ότι στην τύχη των περιστατικών όπου εφαρμόστη ο Fk-506 έπαιξαν ρόλο μεταξύ άλλων, η χρονική στιγμή που άρχισε να χορηγείται και το χρονικό διάστημα χορήγησης καθώς και ο τύπος της επιλεγείσας βλάβης (τραύμα) που επελέγη για να χορηγηθεί η ουσία (Kvist et al 2003).

Σε πρόσφατη μελέτη σύγκρισης<sup>67</sup> αποτελεσματικότητας ως ισχυρότερων ευοδωτών νευρικής αναγέννησης μεταξύ **Fk-506 (Tacrolimus)** και **b-FGF (fibroblast growth factor)** ευρέθη ότι αμφότεροι φέρου το ίδιο ευεργετικό αποτέλεσμα.

Σε μελέτη<sup>68</sup> που ερευνά την αποτελεσματικότητα της ευοδωτικής δράσης των αυτολόγων **αυξητικών παραγόντων P.R.P.** (Platelets rich in Plasma) ληφθέντων και απομονουμένων δια φυγοκέντρησης από το περίβλημα των αιμοπεταλίων του περιφερικού αίματος, έδειξε ότι υπάρχει σημαντικού βαθμού ευόδωσης με περιθώρια να δοκιμασθεί και κλινικά στο μέλλον ή και πειραματικά σε συνδυασμό με αγωγούς και «κύτταρα».

**Αγωγοί και βλαστοκύτταρα:** Πρόσφατες αναφορές (2012)<sup>48,58</sup> όπου φαίνεται ότι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως προς την νευρική αναγέννηση και τα Βλαστοκύτταρα - **iPSc** (πολυδύναμο βλαστοκυτταρικό μίγμα) αν χορηγηθούν υπό μορφή

μικροσφαιριδία, εντός του αγωγού γεφύρωσης του νευρικού ελλείμματος απ' ότι ανακοινώνεται σε Ιαπωνική μελέτη<sup>48,58</sup>.

**Συνδυασμός χρήσης 1) αγωγών, 2) νευροτροφικών ουσιών BfgF (basic fibroblast growth factor) και 3) Βλαστοκυττάρων - iPSc (πολυδύναμο βλαστοκυτταρικό μίγμα):** Σε ακόμα πιο πρόσφατη (2013) κοινή μελέτη των πανεπιστημίων Ozaka, Kyoto και Nara (Japan)<sup>52,62</sup>.

Παρόμοια μελέτη είναι αυτή των A F Quigley, K J Bulluss, I L B Kyratzis et al (2102)<sup>53,63</sup> που περιγράφει κατασκευή πολυδύναμου αγωγού: “multimodal conduit” από ίνες πολυγαλακτικού οξέος: polylactic acid (PLA) (PLA): poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) fibers.

Διάφορες τροποποιήσεις όπως η προσθήκη Σβαννοκυττάρων ή η ενσωμάτωση NGF σε τεχνικές γεφύρωσης με βιοαπορροφήσιμους αγωγούς εξετάστηκαν πειραματικά ως ενισχυμένες εναλλακτικές στην επανόρθωση των περιφερικών νεύρων.

Ωστόσο, δεν υπάρχουν αναφορές σε κλινική πειραματική εφαρμογή όπου να αναφέρεται η ταυτόχρονη εφαρμογή κυττάρων και παραγόντων σε χρήση αγωγών, ως αναγεννητική τεχνική επανόρθωσης περιφερικών νεύρων.

Στην προαναφερθείσα μελέτη των A F Quigley, K J Bulluss, I L B Kyratzis et al (2102)<sup>60</sup>, το έλλειμμα του Ισχιακού νεύρου του επίμουσ αποκαταστάθηκε στις ακόλουθες – προσφερόμενες πρὸς σύγκριση-ομάδες:

- 1) Ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε απλά 1 αγωγός πρὸς γεφύρωσιν του ελλείμματος(Ομάδα Μάρτυρας),

- 2) Ομάς όπου χρησιμοποιήθηκε αγωγός επενδυμένος εσωτερικά με ενεργοποιημένα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSc)-εμπεριεχόμενα σε μικροσφαιρίδια (Νευροσφαίρες) (iPSc group),
- 3) Ομάς όπου χρησιμοποιήθηκε αγωγός επενδυμένος με ενεργοποιημένα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSc)-σε Νευροσφαίρες (iPSc group) αλλά και τον παράγοντα «basic fibroblast growth factor» (bFGF)- εγκλεισμένα σε μικροσφαιρίδια ζελατίνης (iPSc + bFGF group), και τελικά
- 4) Νευρικό αυτομόσχευμα.

Μετά από παρακολούθηση 12 εβδομάδων και εκτίμηση, αξιολογήθηκε κατά σειράν ταχύτητας και ποιότητας λειτουργικής αποκατάστασης η αξονική αναγέννηση ως εξής:

- α) Πρώτα στην ομάδα 4 όπου η γεφύρωση έγινε με τα νευρικά αυτομοσχεύματα,
- β) δεύτερον στην ομάδα 3 με τον πλήρη συνδυασμό αγωγού με κύτταρα και ευοδωτικό παράγοντα δηλαδή με iPSc + bFGF group,
- γ) Τρίτη η ομάδα 2 με χρήση αγωγού και κυττάρων iPSc, ενώ τελευταία
- δ) η ομάς μάρτυρ με μόνη τη χρήση αγωγού (κενού αγωγού).

Τοιουτοτρόπως, η αναγέννηση και λειτουργική αποκατάσταση των νεύρων χρησιμοποιώντας νευρικούς αγωγούς σε ισχιακά νεύρα επιμύων απεδείχθη ότι ευοδώνονται και επιταχύνονται από έναν ενισχυτικό διπλό συνδυασμό προσθήκης ενεργοποιημένων Σβαννοκυττάρων iPSc-σε μορφή μικροσφαιριδίων (neurospheres) και επίσης προσθήκη ευοδωτικού παράγοντα “basic fibroblast growth factor” (bFGF) σε μικροζελατινικά σφαιρίδια.

Τελικά απ' ότi απεδείχθη μόνο ο τριπλός πολυδύναμος συνδυασμός και των 3 μεθόδων μεταξύ μεθόδου με τη γεφύρωση δια των νευρικών αυτομοσχευμάτων, ήτοι: I) Βιοαπορροφήσιμοι νευρικοί αγωγοί χρησιμοποιούμενοι ως κριώματα, με II) iPSc τεχνολογία υποστηρικτικών κυττάρων(Schwann cells), και III) Σύστημα απελευθέρωσης (μικροσφαιρίδια) αυξητικών παραγόντων bFGF, (peripheral nerve regenerative therapy. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part A, 2013).

### **Αγωγοί και βλαστικά λιποκύτταρα <sup>61</sup>:**

Σε πρόσφατη Ισπανική μελέτη (2023) δοκιμάσθηκε συνδυασμός πηκτής ινικής αγαρόζης και μεσεγγυματικών βλαστικών μορφών λιποκυττάρων (fibrin-agarose hydrogels & “adipose - derived mesenchymal stem cells”) σε γεφύρωση ισχιακού επίμους, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα και ευρήματα που αφορούν την έντονη παρουσία Σβανοκυττάρων στον αναγεννημένο ιστό.

### **Βιοαπορροφήσιμο Πολυμερές (Polyamidoamine) σε μορφή Υδρογέλης ως κριώμα για καλλιέργεια Σβανοκυττάρων (Schwann cells) <sup>62</sup>.**

Αυτή την έρευνα αναφέρεται στην σύνθεση και φυσικοχημική, μηχανική και βιολογική κατασκευή 2 sets από poly(amidoamine) (PAA) hydrogels με δυναμική κριωμάτων για in vivo αναγέννηση περιφερικών νεύρων. Το PAA hydrogel, μετά από πολυπροσθήκη Πιπεραζίνης με N -methylenebis (acrylamide) ή 1,4 bis(acryloyl) piperazine με 1,2-diaminoethane ελήφθη ως πολυσυνδεδεμένος παράγων και παρουσίαζε ένα συνδυασμό από σημαντικές ιδιότητες, όπως μηχανική αντοχή, βιοσυμβατότητα, βιοαπορροφησιμότητα, ικανότητα να εισαγάγουν πολλαπλασιασμό συγκέντρωση και προσκόλληση των κυττάρων Schwann (SCs) διατηρώντας την βιωσιμότητα τους.

Εξ' άλλου, οι πλέον φερέλπιδες υδρογέλες Moreover, οι οποίες είναι αυτές που προκύπτουν από 1,4-bis (acryloyl) piperazine, επιτρέπουν την in vitro ανάπτυξη των αισθητικών νευρώνων των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών, φθάνοντας έτσι σ' ένα κριτικό σημείο όσον αφορά τον σχεδιασμό των αγωγών για νευρική αναγέννηση.

**“Limiting factor”<sup>1,3,7</sup> - Το «περιοριστικό» φράγμα των 3-4 cm στη κλινική χειρουργική και 10-12 mm σε πειραματικά μοντέλα <sup>1,3,7</sup>.**

Από τις απόπειρες γεφύρωσης ακόμα με αγγειακούς αγωγούς τίθετο το ερώτημα, πόσο μήκος νευρικού ελλείμματος μπορεί να καλύψει επιτυχώς ένας τέτοιος σωλήνας.

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 90 η αξία της χρήσης φλεβικού μοσχεύματος ως αγωγού γεφύρωσης νευρικών ελλειμμάτων είχε επιβεβαιωθεί.

Πολυάριθμες εργασίες στη βιβλιογραφία εφαρμόστηκαν για πειραματική γεφύρωση ελλειμμάτων από 8-15 mm σε μήκος χρησιμοποιώντας παρεμβολή φλεβικών μοσχευμάτων ως αγωγούς με καλή αναγέννηση των αξόνων. Το μέγιστο μήκος των χρησιμοποιηθέντων φλεβών ως νευρικοί αγωγοί δεν είχε πλήρως καθορισθεί.

Σε πειραματικό μοντέλο κονίκλου οι συγγραφείς αποδεικνύουν ότι επιτυγχάνεται ικανοποιητική αναγέννηση νευραξόνων δια μέσου αυτογενούς φλεβικού αγωγού (AVNC) έως 3 εκ. σε μήκος. Με φλεβικό μόσχευμα AVNC από 3,5-5,25 cm σε μήκος, πτωχή μόνο αναγέννηση ήταν εμφανής, ενώ σε γεφύρωση ενός κενού 6 cm, η αναγέννηση ήταν εμφανής μόνο σένα μήκος αγωγού μέχρι 1,45 cm. Μήκη φλεβικών μοσχευμάτων AVNC μεγαλύτερα των 3cm δεν συνιστώνται στην κλινική χρήση. Η επιτυχής χρήση φλεβικών μοσχευμάτων AVNCs για νευρική αναγέννηση αισθητικών νευρών επικυρώθηκε κλινικά από τους Chiw & Strauch in 1990. Αnéφεραν ότι νευρικά ελλείμματα μέχρι 3 cm σε μη

ουσιώδη αισθητικά νεύρα επιδέχονται επιδιόρθωση με την εν λόγω μέθοδο. Η αποκατάσταση καλής αισθητικότητας επετεύχθη, μετρούμενη με TPD (2 point discrimination) test, όπως επίσης με το 10 test, ένα ανάλογο με τη κλίμακα του TPD test για την εκτίμηση αισθητικών νεύρων. Παρότι η ανωτερότητα του νευρικού αυτομοσχεύματος σε σχέση με το φλεβικό AVNC είναι φανερή, εν τούτοις είναι σαφές ότι η χρήση του αυτογενούς φλεβικού AVNC για θεραπεία μη σημαντικών αισθητικών νεύρων με βραχεία (<3cm) μόνο ελλείμματα είναι εφαρμόσιμη και κλινικά. Αρχικά οι αναφορές έδειξαν επιτυχή χρήση αγωγών 1-3 cm AVNCs στην οξεία φάση, όχι όμως σε όψιμη επανόρθωση. Οι Chiw & Srrauch έδειξαν την αποτελεσματικότητα των φλεβικών αγωγών AVNCs και στις όψιμα αντιμετωπισθείσες βλάβες.

Κλινική αναφορά έδειξε καλά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας αυτούς τους αγωγούς, ενώ ακόμη πιο πρόσφατα ο Tang reported ανέφερε ότι αξιόπιστα αποτελέσματα ελήφθησαν μέχρι το πολύ 4.5 cm όταν φλεβικά μοσχεύματα χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές μελέτες επανορθώσεων αισθητικών μόνο νεύρων. Ο ίδιος ακριβώς περιορισμός των 3-4 cm ισχύει και για τους συνθετικούς αγωγούς.

Ο Lundborg και οι συνεργάτες του απέδειξαν πειραματικά ότι, σε ελλείμματα 15mm ή μεγαλύτερα χρησιμοποιώντας αγωγό σιλικόνης (silicon chamber) δεν είχαμε αποτελέσματα αναγέννησης ακόμη και εάν το περιφερικό κολόβωμα του νεύρου εισάγονταν μέσα στο περιφερικό άκρο του σωλήνα σιλικόνης. Οι αγωγοί σιλικόνης χρησιμοποιούνται κλινικά αρχικά για γεφύρωση ελλειμμάτων δακτυλικών νεύρων, αλλά δοκιμάστηκαν με ικανοποιητική απόδοση και σε μικτά μεγαλύτερα νεύρα, όμως εκεί με αυστηρό περιορισμό για βραχεία ελλείμματα < 3 cm.



Η προαναφερθείσα τεχνική δεν απεδείχθη χρήσιμη για γεφύρωση εκτεταμένων ελλειμμάτων, ωστόσο και άλλοι ερευνητές δεν μπόρεσαν να επιτύχουν σημαντική νευρική αναγέννηση με τις παραπάνω συνθήκες.

Επιπλέον προβλήματα που σημειώθηκαν με τη κλινική χρήση αγωγών σιλικόνης όπως χρόνια νευρική πίεση, ερεθισμός στο σημείο εισόδου του αγωγού που απαιτεί καταπολέμηση της φλεγμονής με αφαίρεση φλεγμονωδών ή ινωδών ιστών που εμποδίζουν την λειτουργία του νεύρου, όπως και η αδιαπερατότητα του υλικού της σιλικόνης απ'το οξυγόνο και τις θρεπτικές ουσίες.

Καλύτερα αποτελέσματα με ένα άλλο μη βιοαπορροφήσιμο υλικό αναφέρθηκαν από τους Stanec & Stanec, χρησιμοποιώντας ευρέως αγωγούς από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (Poly-tetra-fluoroethilen). Αγωγοί από πολυεστέρα (Poly-ester) χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχή αποτελέσματα.

Αρχίζοντας από το 1946 και χρησιμοποιώντας διάφορα ζωικά μοντέλα σε σχετικά βραχεία ελλείμματα (<3cm), διάφοροι ερευνητές δημοσίευαν τα αποτελέσματα τους χρησιμοποιώντας αγωγούς κολλαγόνου, ψευδοέλυτρα ή αμνιακή μεμβράνη σε σχήμα αγωγού και άλλα.

Οι περισσότεροι απ'τους βιολογικούς αγωγούς απεδείχθη ότι υποστηρίζουν την νευρική αναγέννηση, όμως προβλήματα παραμένουν όταν επιχειρείται η γεφύρωση μεγαλύτερων ελλειμμάτων, υπερτροφικές ουλές, και πρόωμη απορρόφηση.

Μία πρόωμη αναφορά δοκιμής βιοαπορροφήσιμων αγωγών έγινε απ'τους Molander and Olsson το 1982. Χρησιμοποιώντας ένα αγωγό από πλέγμα Polyglactine σε ένα βραχύ

νευρικό κενό (1cm) σε κόνικλο, έχοντας ως μάρτυρα γεφύρωση με συμβατικό νευρικό μόσχευμα. τα ευρήματα τους έδειξαν ότι η χρήση της Polyglactine δεν αναστέλλουν την νευρική αναγέννηση συγκρινόμενα με εκείνα που αποδίδει η τεχνική του συμβατικού νευρικού μοσχεύματος.

Σ' ένα κατοπινό άρθρο (1993) οι συγγραφείς βρίσκουν ότι ο απορροφήσιμος αγωγός προλαμβάνει τη δημιουργία νευρινώματος, και επηρεάζει την κατεύθυνση που λαμβάνει το αναγεννώμενο νεύρο. Οι Mackinnon and Dellon χρησιμοποιώντας βιοαπορροφήσιμο αγωγό από πολυγλυκολικό οξύ για γεφύρωση ελλειμάτων έως 3 cm, έδειξαν κλινικά ότι τα αποτελέσματα τους ήταν εφάμιλλα με εκείνα των σειρών μαρτύρων με συμβατικά νευρικά μοσχεύματα. Παρ' ότι όμως με το προαναφερθέν υλικό ελήφθησαν πολύ καλά αποτελέσματα, το εφικτό μήκος κενού για επιτυχή γεφύρωση περιοριζέτο και πάλι στα 3 cm.

**Νοσηρότητα δότριας περιοχής <sup>22,42,43,44</sup> - βιβλιογραφικά δεδομένα - Εκτέλεση συντόμου πρόδρομου πειράματος (εξέταση βαρύτητας και διαρκείας βλάβης νεύρου σε τμηματική αφαίρεση επινευρίου).**

Ενώ δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που να ασχολούνται πειραματικά ή κλινικά με το βαθμό βλάβης που συμβαίνει σε ένα νεύρο όταν αφαιρεθεί περιμετρικά ένα σωληνωτό τμήμα επινευρίου, υπάρχει προς σύγκριση και δη ξεχωριστή ομάδα επιμύων με τέτοια χαρακτηριστικά (αποκόλληση-απογύμνωση επινευρίου) στο πρωτόκολλο Karacaoglu et al <sup>22</sup> (2001 Microsurgery) όπου δε φαίνεται η απογύμνωση του νεύρου σε τμήμα μήκους 10 mm να επιφέρει μόνιμη βλάβη.

Για του λόγου το αληθές και όπως προαναφέρθηκε λόγω ελλείψεως πλήθους αναφορών, αλλά και επειδή το πείραμα Karacaoglu et al<sup>22</sup> έγινε σε επίμυες και όχι σε κόνικλο, πριν

αρχίσουμε την εκπόνηση των πρωτοκόλλων της παρούσης διατριβής, σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε η παραπάνω ιδέα (έλεγχος βαθμού και μονιμότητας ενδεχόμενης βλάβης σε νεύρο με σωληνωτή αποκόλληση επινευριού) πειραματικά ως ένα πρόδρομο δοκιμαστικό προ-πρωτόκολλο επί ομάδος 6 λευκών κόνικλων Νέας Ζηλανδίας 3,0-3,5 Kg. υπό Ε.Φ. αναισθησία Hypnovel (fentanyl και fluanison, Janssen Pharmaceuticals Ltd) 3 ml/ Kg και μία Ε.Μ. ένεση Hypnorm (midazolam, Roche Products Ltd.) Η διατήρηση της αναισθησίας πραγματοποιήθηκε με μάσκα 2% Halotane (May & Baker, Rhone –Poulenc Group, U.K.) με μίγμα ροής αερίου O<sub>2</sub> 1l/min και N<sub>2</sub>O 500 ml/min. Σχεδιάστηκε επί του αριστερού Ισχιακού νεύρου και εκτελέστηκε μια απλή αφαίρεση κυκλοτερούς λωρίδος (πλήρους σωληνωτού τεμαχίου) επινευριού μήκους 10mm, προκειμένου να συγκριθεί κλινικά και εργαστηριακά με το υγιές ετερόπλευρο αντίστοιχο νεύρο για να μελετηθεί σε γενικές γραμμές βαθμός επιπτώσεων και η βαρύτητα της βλάβης που ενδέχεται να επέλθει στο νεύρο.

Ορίστηκε να εξετασθεί κλινικά και ανάλυση με βηματογράφημα (παρατήρηση και ποιοτική συγκριτική εκτίμηση) στις 2,4-και 8 εβδομάδες, ενώ στις 8 εβδομάδες εκτός από τις παραπάνω εκτιμήσεις προγραμματίστηκε να γίνει έλεγχος της μυϊκής συσταλτικότητας Ηλεκτρομυογραφικά με ακίδες υπό νάρκωση και αποκάλυψη του γαστροκνημίου μύος, ενώ κατόπιν οι κόνικλοι θα θυσιασθούν.

Η βραχεία αυτή μελέτη δεν εκρίθη σκόπιμο να αποτελέσει αντικείμενο δημοσίευσης ούτε συμπεριελήφθη στο κυρίως πρωτόκολλο που ακολουθεί διότι έγινε σε μικρό δείγμα, και η σημασία της ήταν μία πρόδρομη διερευνητική ενδεικτική μελέτη (εφόσον δεν υπήρχε πλήθος με παρόμοιες κλινικές ή πειραματικές μελέτες) προκειμένου να εξετασθεί εάν η

στέρηση σωληνωτού τεμαχίου επινευρίου (κυκλοτερούς λωρίδας) προκαλεί βαρεία ή ανεπανόρθωτη βλάβη στη νευρική λειτουργία. Επίσης αναφέρουμε ότι επειδή το βηματογράφημα – GATE ANALYSIS ή WALKING TRACK ANALYSIS (δεν αποτελεί στάνταρ εξέταση για εκτίμηση στο κόνικλο ενώ είναι σύνηθες να εκτελείται σε μύες και επίμυες, αλλά και επειδή το βήμα και το πέλμα των 2 ειδών δεν είναι συγκρίσιμα, δεν προβήκαμε σε προσπάθεια εκτίμησης των 4 συγκεκριμένων παραμέτρων (μεγεθών)<sup>42,43,44</sup> που μετρώνται ως standards προς εκτίμηση στους επίμυες :(Η σχέση χρόνου και χώρου ενός πελματιαίου αποτυπώματος με το άλλο κατά τη διάρκεια της βάδισης, μετρήσεις που λαμβάνονται απ' το πελματιαίο αποτύπωμα στον επίμυ: PL — Η απόσταση από τη πτέρνα στο 3 δάκτυλο, η εκτύπωση του μήκους; TS — Η απόσταση από το πρώτο στο πέμπτο δάκτυλο, η επέκταση του δακτύλου; ITS — Η απόσταση από το δεύτερο στο τέταρτο δάκτυλο, η ενδιάμεση επέκταση του δακτύλου; TOF — Η απόσταση με το αντίθετο πόδι.), αλλά το αναλύσαμε ποιοτικά. Ποιοτικά σημαίνει ότι εκτιμάμε την ένταση (και σχήμα) εκτύπωσης του αποτυπώματος του πέλματος του χειρουργηθέντος άκρου επί του χάρτινου διαδρόμου και συγκρίνοντας την με εκείνη των αποτυπωμάτων των άλλων πελμάτων, εφαρμόζοντας χρώση μελάνης επί των πελμάτων και βάδισης επί διαδρόμου. Το αποτέλεσμα συνδυάστηκε με κλινική και Ηλεκτρομυογραφική εκτίμηση.

Πρωτόκολλο: Η πρόδρομη μελέτη εκτελέστηκε και μετεγχειρητικά παρατηρήθηκαν τα εξής:

**Στις 2 εβδομάδες:** I Κλινική παρατήρηση (ποιότητας και τρόπου βάδισης)

II. Ανάλυση βήματος - βάδισης (Gate analysis, ή Walking track analysis) με Πελματογράφημα εν κινήσει (foot step printing): Η εκτίμηση (ποιοτική εκτίμηση) έγινε κυρίως ποιοτικά δηλαδή με εκτύπωση του βήματος και σύγκριση της έντασης του αποτυπωμένου χρώματος, αν και στο κόνικλο δε είναι εφαρμοσμένη ευρέως η μέθοδος.

**Στις 4 εβδομάδες:** I. Κλινική παρατήρηση

II. Ανάλυση βάδισης.

**Στις 8 εβδομάδες:** I. Κλινική παρατήρηση (Εικόνα 6a)

II. Ανάλυση βάδισης (Εικόνα 6b)

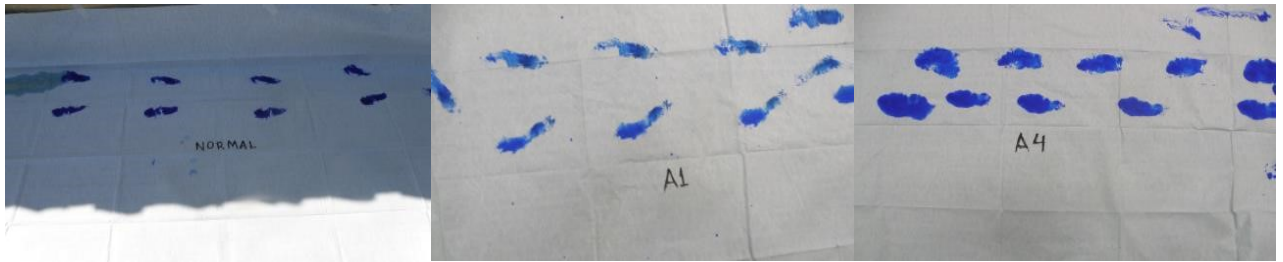
III. Μέτρηση Μυϊκής Συσταλτικότητας

Γαστροκνημίου μυός (ΗΜΓ) (Εικόνα 6c) και πίνακας 1.

**Εικ.6a: Κλινική παρατήρηση βάδισης κονίκλων.**



**Εικ.6b: Ανάλυση βάδισης και σύγκριση αποτυπωμάτων.**



**Εικ.6c: Έλεγχος μυϊκής συσταλτικότητας με ΗΜΓ**



### **Αποτελέσματα:**

Πραγματοποιήθηκε και προσετέθη στο Γενικό μέρος, ως προηγθέν του βασικού πρωτοκόλλου ταχύρρυθμο πείραμα σε ομάδα 6 κονίκλων που να εκτιμά την πιθανή επικείμενη βλάβη του νεύρου όταν αποκολληθεί επινευρικό σωληνοειδές τμήμα μήκους 10 mm από αυτό. Έγινε εκτίμηση κλινική και με ανάλυση βήματος επί λευκού διαδρόμου στις 2, 4 εβδομάδες και επανελήφθη στις 8 εβδομάδες, ενώ αμέσως μετά εκτελέστηκε ΗΜΓ σε απογυμνωθέντα γαστροκνήμιο μυ υπό νάρκωση.

Τίς πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες κατά τη κλινική παρατήρηση το χειρουργηθέν μέλος δεν ακολουθούσε συμμετρικά το άλλο κατά τη βάδιση (ακολουθούσε με καθυστέρηση), είτε λόγω άλγους (μετεγχειρητικού) είτε λόγω διεγχειρητικής κακοποίησης μυών είτε

λόγω κάποιου βαθμού ενδεχόμενης. Στις 2 εβδομάδες κατά την ανάλυση του βήματος (βηματογράφημα) το αποτύπωμα του πέλματος του χειρουργηθέντος μέλους ήταν λιγότερα έντονα χρωματισμένο από τα άλλα τρία αποτυπώματα των φυσιολογικών πελμάτων.

Στις 4 εβδομάδες το χειρουργηθέν μέλος υπολείπετο μόνο ελαφρώς κατά τη βάδιση σε παρακολούθηση του βήματος και επίσης υπολείπετο ελαφρά σε ένταση χρωματισμού του αποτυπώματος, ενώ στις 8 εβδομάδες οι κόνικλοι βάδιζαν σχεδόν φυσιολογικά και ηδύναντο να τρέξουν, κλινική εικόνα που επιβεβαιώθηκε και από τη ποιοτική εικόνα ανάλυσης βήματος (Gate step analysis) σε διάδρομο (ομοιόμορφα χρωματισμένα αποτυπώματα των 4 πελμάτων), αλλά και από ΗΜΓ για εκτίμηση μυϊκής συσταλτικότητας γαστροκνημίου μυός. Παρατίθενται τα αποτελέσματα χωρίς στατιστικές αναλύσεις και χωρίς απόπειρα δημοσίευσης λόγω της μικρής έκτασης του πειράματος που μπορεί να θεωρηθεί ως σύντομο πρόδρομο δοκιμαστικό πείραμα για να μπορέσουμε μετά από αδρή εκτίμηση να προχωρήσουμε απρόσκοπτα στη βασική μελέτη.

Παράδειγμα διαγραμματικής απεικόνισης της ΗΜΓ εξέτασης του 1<sup>ου</sup> κονίκλου.

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Γ.Ν.Α. ....**

Patient: RABBIT 1

User line 1: RABBIT

Patient ID: 2006/0519

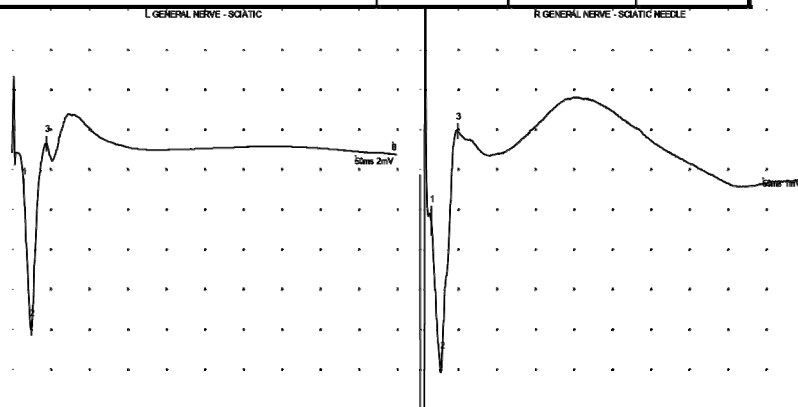
User line 2: 2006

Notes:

OYDOS 2

Motor NCS

Nerve / Sites	Area mV · ms	Latency Ms	Ampl mV
<b>L GENERAL NERVE – SCIATIC</b>			
1.	9	1.45	7.01
<b>R GENERAL NERVE - SCIATIC NEEDLE</b>			
1.	7.8	1.45	5.49



**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ:** Παράδειγμα ΗΜΓ για μέτρηση μυϊκής συσταλτικότητας (πειραματόζωο 1), φαίνεται ότι το ισχιακό αναλαμβάνει – με τιμές συγκρίσιμες



**ΠΙΝΑΚΑΣ 1:**

**Ηλεκτρομυογραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων του  
Προδρόμου πειράματος ομάδος 6 κονίκλων για εκτίμηση βαθμού  
«νοσηρότητας» (βλάβης) νεύρου σε απόπειρα αφαίρεσης κυκλοτερούς λωρίδος  
επινευρίου μήκους 10mm**

Number of Rabbits	Normal			Operated		
	Latency Msec	Amplitude mV	Area mVmsec	Latency Msec	Amplitude mV	Area mVmsec
(1)	1,45ms	7,01	9	1,45 msec	5,69mV	7,9mVms
(2)	1,02 ms	6,1 Mv	8,2	1,0 msec	5,8 mV	8 mVms
(3)	1,4 msec	5,9 Mv	8,0	1,45	5.04	7,8
(4)	1,2	10,6	8,9	1,3	8,6	9.00
(5)	1,0	9,2	9,2	1,25	7,3	7,4
(6)	1,3	5,95	6,8	1,35	4,9	6,07

**Συμπέρασμα:** 1)Κλινικά και 2) Βηματογραφικά με ποιοτική εκτίμηση (παρατήρηση έντασης αποτυπώματος) φαίνεται ραγδαία βελτίωση μιας αρχικής μυϊκής έκπτωσης (βαθμός νευραπραξίας ισχιακού) από τις 2 στις 4 και από τις 4 στις 8 εβδομάδες, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τον τελικό Ηλεκτρομυογραφικό έλεγχο που δείχνει ότι το νεύρο στις 4 εβδομάδες έχει σχεδόν άρτια λειτουργία.

### 1β. Σκοπός έρευνας-(Περίληψη Πρωτοκόλλων 1-9):

Οι διατομές τών περιφερικών νεύρων είναι συχνά σοβαρές βλάβες, ιδιαίτερα όταν είναι πλήρεις και όταν αφορούν κινητικά ή μικτά νεύρα και αφήνουν αναπηρίες προσωρινές ή και μόνιμες, μερικές ή ακόμα και ολικές (κυρίως όταν αφορούν βλάβες περισσοτέρων του ενός νεύρων).

Ιστορικά, απόπειρες συρραφών νεύρων αναφέρονται ακόμα και από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα, πλήν όμως η μεγάλη πρόοδος στη χειρουργική αυτού του τομέα έγινε με την εισαγωγή της μικροχειρουργικής τεχνικής, των μικροσκοπίων χειρουργείου, μικροραμμάτων και εργαλείων και κατόπιν με την εισαγωγή χρήσης τών νευρικών αυτομοσχευμάτων.

Η σημασία τής επιδιόρθωσης νευρικών ελλειμμάτων δια τοποθετήσεως νευρικών μοσχευμάτων λαμβάνει μεγάλη αξία όταν δεν είναι εφικτή η τελικο-τελική συρραφή του νεύρου και συγκεκριμένα όταν πρόκειται για σημαντικά νευρικά ελλείμματα, τότε είναι αναγκαία η χρήση μοσχεύματος, ενώ πίο πρόσφατα για βραχύτερα ελλείμματα εισήχθη εναλλακτικά και η χρήση αγωγών (conduits, chambers, tubes). Τα αυτόλογα νευρικά μοσχεύματα<sup>1a.1b.1c-9</sup> είναι η πλέον καθιερωμένη τεχνική για να επιδιορθωθεί ένα νευρικό έλλειμμα αποδίδοντας καλά τελικά αποτελέσματα, αλλά η μέθοδος υστερεί στό θέμα τής υπολειμματικής νοσηρότητας της δότριας περιοχής (αιμωδίες, υπαισθησίες, νευρινώματα με καυσαλγίες και παραισθησίες) και της περιορισμένης διαθεσιμότητας ιστικού αποθέματος, λόγω του πεπερασμένου του διαθέσιμου μήκους νεύρου, αλλά και ενίοτε εξαιτίας του υποκειμενικού παράγοντα ασθενή που μπορεί να μην συμφωνεί πάντοτε με την ιδέα της αυτομεταμόσχευσης. Η εισαγωγή της τεχνικής “group fascicular” (καθ’ ομάδας - δεσμιδικής συρραφής) είναι το «gold standard» για αντιμετώπιση των διατομών

αλλά και των ελλειμμάτων των περιφερικών νεύρων, τόσο σε τελικο-τελική συρραφή νεύρων όσο και στην τοποθέτηση των νευρικών μοσχευμάτων σε σύγκριση με όλες τις άλλες προυπάρχουσες τεχνικές, γιατί με τη “group fascicular” τεχνική γίνεται καλύτερη τοπογραφική αντιστοίχιση των νευρικών δεσμίδων συνεπικουρούμενων και από την σχετική ιδιότητα των νευραξόνων για επαναπροσανατολισμό (tissue specificity, target specificity) και ταυτόχρονα δεν γίνονται ακραίες τραυματικές πρακτικές παρασκευής νεύρου όπως π.χ. στην κατεξοχήν δεσμιδική συρραφή (fascicular).

Όπως προαναφέρθηκε νευρική αναγέννηση μπορεί να πραγματοποιηθεί δια μέσου νευρικών μοσχευμάτων αλλά και δια μέσου άλλων ιστών χρησιμοποιούμενων ως αγωγούς.

Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα η έρευνα για την ανεύρεση ενός ιδανικού υλικού για δημιουργία ή κατασκευή αγωγού νευρικής αναγέννησης μας οδήγησε αρχικά στη χρήση των αυτογενών (φλέβες, αρτηρίες, ψευδομεμβράνες) και πτό πρόσφατα και τεχνητών αγωγών (σιλικόνη, πολυγλυκολικό οξύ, ιστός πολυγλακτίνης)<sup>1f,g,2-19</sup> μόνους τους ή σε συνδυασμό με ευοδωτικούς παράγοντες της νευρικής αναγέννησης (νευροτροφικούς παράγοντες)<sup>1-18</sup>.

Μέχρι τώρα ο τύπος ιστού ή υλικού των αγωγών<sup>1,6,7,8,9</sup> που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται να μη παίζει μείζονα ρόλο όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της ευόδωσης της νευρικής αναγέννησης, και τελικά κανένας τύπος αγωγού να μην είναι αποτελεσματικότερος των συμβατικών κλασσικών νευρικών μοσχευμάτων.

Ο «περιοριστικός» παράγων (LIMITING FACTOR<sup>1,3,7</sup>) που φαίνεται ότι παίζει κύριο ρόλο στο θέμα της γεφύρωσης νευρικών ελλειμμάτων είναι το «περιοριστικό» ανώτερο όριο μήκους 2,5 - 3 cm στη κλινική πράξη ή 10 περίπου mm στη πειραματική έρευνα<sup>1,3,7</sup>

σε επίμυες και κονίκλους, που μας επιτρέπει να επιχειρήσουμε γεφύρωση με κάποιο είδος αγωγού.

Γιά τη γεφύρωση ελλειμμάτων επιμηκεστέρων των 3 cm, καταφεύγουμε κατ' ανάγκη και πάλι στη λύση των νευρικών μοσχευμάτων.

Ένας τύπος ιστού που δεν είχε χρησιμοποιηθεί ακόμα ως αγωγός τη δεκαετία 1990-2000 ήταν το επινεύριο.

Η μόνη εξαίρεση στη παραπάνω αναφορά ήταν κάποια πειράματα με το epineural cuff (Snyder et al.<sup>24,28,51-52</sup>), όμως στο συγκεκριμένο πείραμα δεν πρόκειται για γεφυρωτικό αγωγό παρεμβολής αλλά για εκκένωση (άδειασμα) περιεχομένου ακέραιου νεύρου και δημιουργία αγωγού επινευρίου με αφαιρετική μέθοδο (epineural cuff), όπου απλά παραμένει το περίβλημα του νεύρου (επινεύριο) στη θέση του ενώ αφαιρέθηκαν οι νευράξονες.

Το επινεύριο είναι ένα στρώμα χαλαρού συνδετικού ιστού, το οποίο περιβάλλει τις νευρικές δεσμίδες προστατεύοντάς τις από διάταση και εξωγενές τραύμα, ενώ μεταφέρει αιματική παροχή. Το επινεύριο μπορεί να ταξινομηθεί σε εξωτερικό και εσωτερικό, το οποίο αφορίζει και τις νευρικές δεσμίδες <sup>1a</sup>

Μέχρι τη περασμένη δεκαετία η χρήση του επινευρίου<sup>22,23,24,28</sup> ως νευρικού αυτογενούς αγωγού για γεφύρωση νευρικών ελλειμμάτων αποτελούσε “taboo” ως λύση στη χειρουργική περιφερικών νεύρων, προφανώς λόγω της συμβολής του στην αιμάτωση του νεύρου, βασικά υπολογίζοντας την σημασία της ακεραιότητας του «κυρίου αγγείου» του νεύρου (vasa nervorum).

Παρά την ορθότητα της παραπάνω άποψης με τη πρόοδο της ανατομικής και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι γνωστό πλέον ότι εκτός του αγγείου του επινευρίου

περιγράφονται επίσης και άλλοι επιμήκεις παράλληλοι προς το αγγείο του επινευρίου αρτηριακοί άξονες<sup>1a</sup>, πορευόμενοι από το κέντρο προς τη περιφέρεια επί τών διαφαραγματίων του ενδονευρίου (ενδονευρική αγγείωση) και περινευρίων που περιβάλλουν τις δεσμιδικές ομάδες “group-fascicles” και συνδεόμενοι μεταξύ τους με εγκάρσιες διατιτρώσες (perforators).

Λαμβάνοντας υπόψιν την παραπάνω θεωρία της συνύπαρξης παράλληλης «ενδογενούς επιμήκους» αιμάτωσης του αγγείου, σχεδιάσαμε και εφαρμόσαμε βάσει πρωτοκόλλου την εισαγωγή της χρήσης επινευρίου στην πειραματική επανορθωτική χειρουργική γεφύρωσης νευρικού ελλείμματος με αυτογενή αγωγό, λαμβανόμενο από το κεντρικό νευρικό κολόβωμα και κατασπώμενου προς το περιφερικό και συγκεκριμένα με τη μορφή 1.«προωθητικού επινευρικού κρημνού» ή 2.«ανάστροφου επινευρικού κρημνού» (πρωτόκολλα 1,2) **(Εικόνες 7a,8)**.

Επίσης η εισαγωγή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στην πειραματική ιατρική δείχνει ότι εκτός από την κλασική αγγείωση του νεύρου με ορθόδρομη κυκλοφορία αίματος, υπάρχει και ένας άλλος τύπος αγγείωσης στο νεύρο με ανάστροφη ροή αίματος, αρκετά ασθενέστερης της ορθόδρομης, και με μικρότερο διαμέτρημα αγγείων, γι’ αυτό και όταν ένα νεύρο διαταμεί και χρήζει παρασκευής προς επίτευξιν συρραφής προτιμάται η παρασκευή του περιφερικού κολοβώματος<sup>3,9</sup> (οπότε δεν απαγγειώνεται το κεντρικό κολόβωμα που εξασφαλίζει ισχυρότερης ροής και αιμάτωση στο νεύρο, άρα και καλύτερη επουλωτική και αναπλαστική δραστηριότητα). Επί της προαναφερθείσης αρχής ανάστροφης αιμάτωσης, βασίσαμε την τρίτη πειραματική μελέτη με το τίτλο «ανάστροφος επινευρικός κρημνός λαμβανόμενος από το περιφερικό κολόβωμα» και κατασπώμενος προς το περιφερικό (Πρωτόκολλο 3) **(Εικόνα 9)**. Βασιζόμενοι λοιπόν στις παραπάνω αναφερθείσες αρχές ανατομικής και φυσιολογίας περιφερικών νεύρων, σχεδιάσαμε τούς

προαναφερθέντες επινευρικούς κρημνούς (τύπος 1 και 2 ληφθέντες από το κεντρικό κολόβωμα και τύπο 3 ληφθέντος από το περιφερικό) με σκοπό να ερευνηθεί εάν η χρήση του επινευρίου ως αγωγού γεφύρωσης νευρικών ελλειμμάτων είναι δόκιμη τεχνική και ποιός από τους τύπους 1,2, ή 3 είναι ο αποτελεσματικότερος στην εφαρμογή. Κίνητρο για την εκπόνηση της παραπάνω έρευνας αποτελέσαν τα εξής διαφαινόμενα πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μέχρι τώρα περιγραφέντων τύπων αγωγών:

- 1) Με τή χρήση επινευρίου αποφεύγουμε επιπλέον βλάβη άλλου ανατομικού στοιχείου όπως άλλου νεύρου ή αγγείου (DONOR SITE DEFECT ή DONOR SITE MORBIDITY <sup>22,42,43,44</sup>).
- 2) Αποφεύγουμε δεύτερη τομή σε άλλο σημείο ή μέλος πρὸς λήψη αυτομοσχεύματος.
- 3) Δεν έχουμε ανάγκη χρήσης κάποιου υλικού για τεχνητό αγωγό που πιθανόν να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση ή να έχει πολύ υψηλό κόστος (πολυγλακτίνη, πολυγλυκολικό οξύ). 4) Το επινεύριο, όντας το φυσικό περίβλημα του νεύρου πιθανά να ευνοεί καλύτερα την εντός αυτού επιμήκη ανάπτυξη τών νευραξόνων (tissue specificity). Το μοντέλο που επελέγη για τα 3 πρωτόκολλα της παρούσης έρευνας είναι αυτό του ελλείμματος 10 χιλιοστών επί του Ισχιακού νεύρου του Λευκού Κονίκλου Νέας Ζηλανδίας <sup>23,24,28</sup> λόγω ομοιότητάς του σε υφή και μέγεθος με τα νεύρα του άνω άκρου του ανθρώπου, ενώ κάποιο άλλο μοντέλο που είναι εκείνο του επίμυος instar που εφαρμόστηκε στις ελάχιστες πειραματικές έρευνες που αφορούν το αντικείμενο μετά το 2000<sup>22,53-55</sup>. Οι τρεις τύποι των προαναφερθέντων επινευρικών κρημνών εφαρμοζόμενοι στο επίσης παραπάνω αναφερόμενο ζωικό πειραματικό μοντέλο περιγράφονται συνοπτικά στην επομένη παράγραφο και αναπτύσσονται λεπτομερώς καθώς και οι μέθοδοι εργαστηριακής τους εκτίμησης στο ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ της διατριβής.

**2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ & ΥΛΙΚΟ). ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΩΝ  
ΠΡΩΤΟ ΚΟΛΛΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ  
19.22.28.56**

2α. Πρωτόκολλο 1: Γεφύρωση Βραχέος Ελλείμματος του Ισχιακού Νεύρου του Κόνικλου διά Προωθητικού Επινευρικού Κρημνού

**Μέθοδος και υλικά 19.22.28.56**

**α. Ζώα και εγχειρήσεις:**

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ομάδες λευκών κόνικλων (αρ=36 στη πρώτη και 6 στη δεύτερη) Νέας Ζηλανδίας βάρους 3,0-3,5 Kg. Τα ζώα αναισθητοποιούνται δια Ε.Φ. ενέσεως Hypnovel (fentanyl και fluanison, Janssen Pharmaceuticals Ltd) 3 ml/ Kg και μία Ε.Μ. ένεση Hypnorm (midazolam, Roche Products Ltd.) Η διατήρηση της αναισθησίας πραγματοποιείται με μάσκα 2% Halotane (May & Baker, Rhone –Poulenc Group, U.K.) με μίγμα ροής αερίου O<sub>2</sub> 1l/min και N<sub>2</sub>O 500 ml/min.

Το δέρμα του αριστερού μηρού ξυρίσθηκε επί της έξω πλαγίας πλευράς του.

Έγινε τομή δέρματος εις το μέσον του μηρού από το Ισχιακό κύρτωμα έως το γόνατο και αποκαλύφθηκε το Ισχιακό νεύρο (αρ.). Σχεδιάσθηκε και εκτελέσθηκε διατομή του νεύρου εις το μέσον του και άνωθεν του διχασμού του, δημιουργώντας ένα έλλειμμα 10 χιλ. (λόγω της συρρίκνωσης των νευρικών κολοβωμάτων). Στη πρώτη ομάδα (36 ζώα) χρησιμοποιώντας το χειρουργικό μικροσκόπιο (16x) σχεδιάσθηκε ένας προωθητικός κρημνός 10 χιλ. επί του επινευρίου του κεντρικού κολοβώματος του νεύρου (εικ. 7αα, εικ.10b,10c). Διατηρήθηκε ανέπαφη μια “επιχείλιος ταινία” εύρους 2 χιλ. καθ’ όλο το

μήκος του χείλους του κολοβώματος δότη (εικ. 7aa). Η προαναφερθείσα “επιχείλιος ταινία” χρησίμευσε κατόπιν προς συρραφή (στερέωση) του προωθητικού κρημνού μετά από την κατά 10 χιλ. κινητοποίηση του για τη γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος (εικ. 7ab).

Διατηρήθηκε επίσης ανέπαφη μια επιμήκης περιαγγειακή ταινία εύρους 2χιλ., η οποία έφερε το βασικό (μεγαλύτερο) αγγείο του νεύρου, τόσον επι του κεντρικού, όσον και επί του περιφερικού κολοβώματος του νεύρου, διατηρώντας έτσι, σημαντικό μέρος της αγγείωσης (εικ. 7ab). Ο επινευρικός κρημνός παρασκευάστηκε, αφού έγινε τομή βασισμένη σε 2 παράλληλες γραμμές σχεδιασμένες σε απόσταση 2 χιλ εκατέρωθεν του βασικού αγγείου (αρτηρίας) και 2 κάθετες γραμμές οι οποίες ενώναν τις προαναφερθείσες παράλληλες γραμμές (εικ. 7aa,7ab). Το επινεύριο αποκολλήθηκε εκτός των προαναφερθέντων ταινιών, φάρδους 2 χιλ. και έγινε προώθηση του κρημνού μήκους 10 χιλ. προς γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος από το κέντρο προς την περιφέρεια.

Οι δύο παράλληλα διατηρηθείσες οριζόντιες ακμές του επινευρίου συνεργράφησαν μεταξύ τους με 5 ανεξάρτητες ραφές με ράμα 10-0 Ethilon (black monofilament nylon, Ethicon-Johnson & Johnson), ενώ οι δύο κάθετες ακμές του κρημνού συνεργράφησαν στα νευρικά κολοβώματα δια τεσσάρων ανεξαρτήτων συρραφών 10-0 Ethilon (εικ. 7ab). Ένα προσωρινό σωληνάριο σιλικόνης χρησιμοποιήθηκε (10d) για εσωτερική ναρθηκοποίηση του αυλού του αγωγού προ της συρραφή ενώ αφαιρέθηκε λίγο πριν τη τοποθέτηση του τελευταίου ράμματος στο περιφερικό κολοβώμα (εικ 10e) Πριν ολοκληρωθεί η συρραφή τού επινευρικού κρημνού τοποθετήθηκε εντός του αυλού του πήγμα αίματος και Saline buffer πηρός αποφυγής σύμπτωσης των επινευρικών τοιχωμάτων (εικ 10f). Οι μύες



συνερράφησαν (και στις δύο τομές) με 5-0 ράμμα (Prolene, blue monofilament polypropylene Ethicon, Johnson & Johnson) και το δέρμα με 4-0 ράμμα (Ti-Cron, blue-braided polyester fiber, Davis & Geck).

Οι κόνικλοι επιβίωσαν για 21(αρ=12), 42(αρ=12), και 91(αρ=12) ημέρες μετεγχειρητικά.

Ακολουθεί μετεγχειρητική E.M. αντιβίωση επι 4 ημέρες.

Σημείωση: Για ευκολότερη και ταχύτερη εκτέλεση της εγχείρησης συνιστάται ο σχεδιασμός και η παρασκευή τού επινευρικού κρημνού γίνονται πριν τη διατομή του νεύρου. Επίσης προς διευκόλυνση τής επιμήκους συρραφής τών χειλέων τού κρημνού συνιστάται όπως αναφέρθηκε η χρήση πλαστικού αγωγού (εικ 10 d) διαμέτρου περί τα 2 mm δίκην εσωτερικού νάρθηκος και η αφαίρεση του πριν την τοποθέτηση τής τελευταίας επιμήκους συρραφής (10e).

Στη δεύτερη ομάδα (6 ζώα) ή «ομάδα μάρτυρα» για σύγκριση αφορώσα την Ηλεκτρομυογραφική εκτίμηση, το νευρικό έλλειμμα του ισχιακού νεύρου μήκους 10 mm. γεφυρώθηκε χρησιμοποιώντας νευρικό τεμάχιο προηγουμένως αφαιρεθέν εκ του ιδίου νεύρου μήκους 10χιλ. και επανατοποθετώντας το ως ομόλογο νευρικό μόσχευμα. Η στερέωση (συρραφή) κάθε άκρου του μοσχεύματος στα νευρικά κολοβώματα έγινε δια τεσσάρων συρραφών με ράμμα 10-0 Ethilon. Η λοιπή προεγχειρητική και μετεγχειρητική τεχνική και μέριμνα είναι οι αυτές με την βασική σειρά των 36 ζώων.

Η θυσία τής σειράς μάρτυρα έγινε στις 91 ημέρες, μαζί με την τελευταία ομάδα τής βασικής σειράς

## **β) Ανοσοϊστοχημεία**

Οι κόνικλοι θυσιάστηκαν 21(αρ=6), 42(αρ=6), και 91(αρ=6) ημέρες μετά την εγχείρηση. Ο επινευτικός αγωγός παρασκευάστηκε και αφαιρέθηκε. Το περιεχόμενο του αγωγού (νεοσχηματισθείς νευρικός ιστός-εικόνα 7b) παρασκευάστηκε και διαχωρίστηκε (εικ. 10i1, 10i2) με προσοχή από το επινευτικό τοίχωμα και τον ουλώδη ιστό και εκπλύνεται σε παγωμένο PBS και εμβυθίστηκε (εικ. 10k1) σε υλικό (ιστό) Tek O.C.T. Μείγμα 4583(10.24% w/w πολυβυνιλιούχου αλκοόλης, 4.26%w/w πολυαιθυλαινιούχου γλυκόλης, 85.50% w/w αδρανή συστατικά, Miles, USA). Στα 3 τεμάχια αναγεννημένου νευρικού σωλήνα (εικ. 10k2) ελήφθησαν εγκάρσιες (S3,S6,S9 πάχους 3μm) (εικ. 7c) τομές και στα έτερα 3 τεμάχια επιμήκεις διατομές (S4 μήκους 10χιλ.) επί κρουστάτου (εικ. 7c).

Μετά μονιμοποίηση σε παγωμένη ακετόνη ή 2.5% παραφορμαλδεύδη, οι τομές εξετέθησαν ξεχωριστά σε ποικίλα βασικά αντισώματα (DAKO- Copenhagen, Denmark) προς αναγνώριση των συστατικών του νεοσχηματισθέντος νευρικού ιστού, περιλαμβάνοντας 70kD πρωτεϊνών των νευρονηματίων, κυττάρων Schwann, Fibronectine, ινοδογόνου και ινικής. Οι μέθοδοι της χρώσης περιγράφονται λεπτομερώς στο τέλος τού πρωτοκόλλου.

## **γ) Εκτίμηση δια οπτικού μικροσκοπίου**

Οι κόνικλοι θυσιάστηκαν 21(αρ=6), 42(αρ=6), και 91(αρ=6) ημέρες μετά την εγχείρηση. Στην ομάδα των 91 ημερών, η ισχύς της μυϊκή συσταλτικότητα μετρήθηκε πριν θυσιαστούν οι κόνικλοι (βλ. παρακάτω).

Ο επινευτικός αγωγός εξετάμη (7b) και εμβαπτίστηκε σε 2,5% Γλουταραλδεύδη σε 0,1%M ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού Νατρίου pH 7,2. Κατασκευάστηκε θυρίδα επί

του τοιχώματος του ουλοποιηθέντος επινευρίου για να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή έκθεση του νευρικού ιστού στο στερεωτικό. Αφού έγινε επιμονιμοποίηση σε 1% τετροξείδιο του Οσμίου και αφυδάτωση σε μια σειρά διαλυμάτων Εθανόλης, το παρασκεύασμα εμβυθίστηκε σε ρητίνη άγαρ 100. Πριν από την στερεοποίηση του πλαστικού, ελήφθησαν από το νεοσχηματισθέντα νευρικό ιστό, τομές 3 χιλ. σε αποστάσεις 3, 6 και 9 χιλ. από το κεντρικό κολόβωμα του νεύρου όπως και για την ανοσοϊστοχημεία (εικόνα 7c). Σέ 3 τεμάχια αναγεννημένου νεύρου ελήφθησαν εγκάρσιες τομές 1 μm (ονομαζόμενες ως τομές S<sub>3</sub>, S<sub>6</sub> και S<sub>9</sub>) από το περιφερικό μέρος των προαναφερομένων τεμαχίων μήκους 3 χιλ. και σε έτερα 3 τεμάχια επιμήκεις τομές S<sub>4</sub>, κεχρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου και Αζούρ-II και υπεβλήθησαν σε εξέταση δια οπτικού μικροσκοπίου.

Οι μέθοδοι της χρώσης περιγράφονται στο τέλος τού πρωτοκόλλου.

#### **δ) Μέτρηση της Μυϊκής συσταλτικότητας (εικ. 15a,b,c).**

Η ισομετρική δύναμη σύσπασης του Γαστροκνημίου μύος νευρουμένου δια του Κνημιαίου νεύρου μετρήθηκε 91 ημέρες μετά την εγχείρηση (α<sub>ρ</sub>=6).

Τα πειραματόζωα ναρκώθηκαν εκ νέου και χειρουργικά αμφοτερόπλευρα τα ισχιακά νεύρα και οι Γαστροκνήμιοι μύες. Εφαρμόστηκαν υπερμεγέθη ηλεκτρικά ερεθίσματα κεντρικά της χειρουργηθείσης περιοχής δια Μυοδιεγέρτου Grass-SD-9 σε συχνότητα 100 Hz για 0,6 ms. Η τετανική ισχύς του Γαστροκνημίου μύος εκφράζεται ως ποσοστιαία σχέση με την ανιχνευόμενη τιμή εκείνης του αντίστοιχου υγιούς μύος. Μετά τις παραπάνω μετρήσεις και καταγραφές ελήφθησαν παρασκευάσματα από τα τεμάχια μοσχεύματος που θα εξετάμησαν και υπεβλήθησαν σε εξέταση με οπτικό μικροσκόπιο όπως έχει παραπάνω περιγραφεί.

Επίσης η ισομετρική δύναμη σύσπασης του Γαστροκνημίου μυός<sup>14,15</sup> μετρήθηκε και στη σειρά μάρτυρα (δια παρεμβολής νευρικού μοσχεύματος) (α<sub>ρ</sub>=6) με την ίδια τεχνική και στον ίδιο μετεγχειρητικό χρόνο (91 ημέρες).

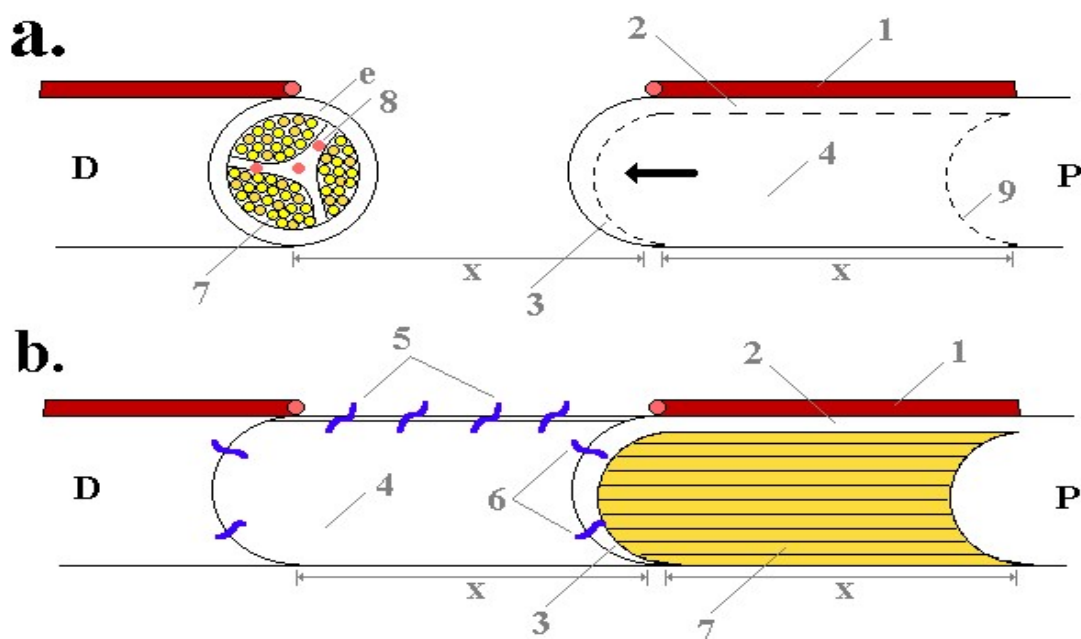
Εφαρμόστηκε συνδυασμένο t-τεστ προς ανάλυση των δεδομένων.

Οι παράμετροι πού εξετάστηκαν (“Amplitude”, “latency”, “Area”) αναλύθηκαν μετά το πέρας του πρωτοκόλλου.

**Εικ 7α: Πρωτόκολλο 1.**

7αα. Ισχιακό νεύρο με έλλειμμα 10 χιλ.

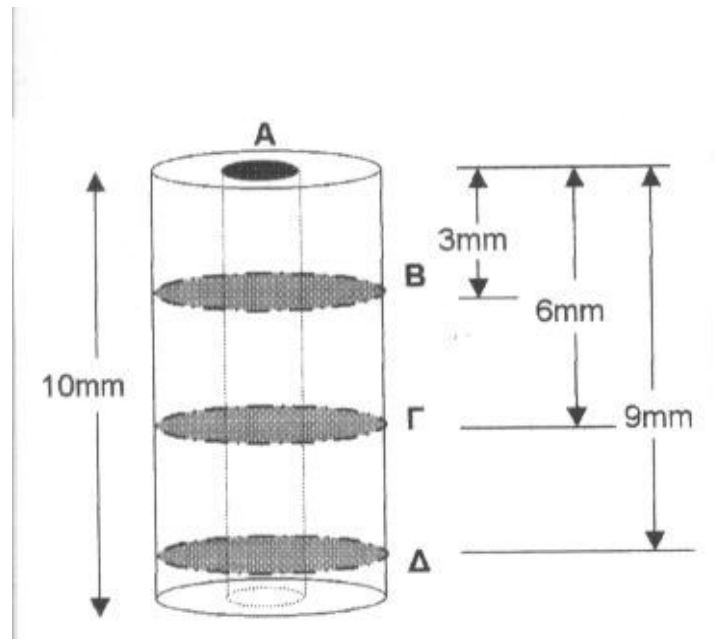
7αβ. Γεφύρωση με προωθητικό κρημνό μήκους 10 χιλ. ληφθέντος από το κεντρικό νευρικό κολόβωμα

**P = Κεντρικό κολόβωμα. D = Περιφερικό κολόβωμα.****e = Επινεύριο.****1 = Βασικό επίμηκες αγγείο νεύρου.****2 = Περιαγγειακή διατηρούμενη ζώνη.****3 = Επιχείλιος ζώνη.****4 = Επινευρικός προωθητικός κρημνός.****5, 6 = Σταθεροποιητικές ραφές Επινευρίου.****7 = Νευρικές δεσμίδες.****8 = Εσωτερικοί αγγειακοί άξονες.****9 = Περίγραμμα τομής. x = Απόσταση 10 χιλ (νευρικό έλλειμμα).**

**Εικόνα 7b: Ο πραγματικός Σωλήνας αναγεννημένου νευρικού ιστού ληφθείς μετά τη θυσία τού πειραματοζώου (3,6 και 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά).**



**Εικόνα 7c: Σχεδιάγραμμα Σωλήνα αναγεννημένου νευρικού ιστού ληφθέντος μετά τη θυσία τού πειραματόζώου (3,6 και 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά).**



**B,Γ,Δ= εγκάρσιες τομές S1,S2,S3 (πάχους 3μm εκάστη) στα 3,6 και 9 cm αντιστοίχως.**

**Εφαρμογή για τα πρώτα 3 ζώα κάθε εξάδας.**

**A= επιμήκης τομή S4 μήκους 10mm. Εφαρμογή στα υπόλοιπα 3 ζώα κάθε εξάδας.**

2β. Πρωτοκόλλο 2: Γεφύρωση Βραχέος Ελλείμματος Ισχιακού Νεύρου του Κόνικλου δι' Αναστροφού Αγγειούμενου Επινευρικού Κρημνού Ληφθέντος εκ του Κεντρικού Νευρικού Κολοβώματος (Εικόνες 10a-10g).

**Μέθοδος και υλικά** <sup>19.22.28.56</sup>

**α. Ζώα και εγχειρήσεις:**

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ομάδες λευκών κόνικλων (αρ=36 στη πρώτη και 6 στη δεύτερη) Νέας Ζηλανδίας βάρους 3,0-3,5 Kg. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν δια Ε.Φ. ενέσεως Hypnovel (fentanyl και fluanison, Janssen Pharmaceuticals Ltd) 3 ml/ Kg και μία Ε.Μ. ένεση Hypnorm (midazolam, Roche Products Ltd.) Η διατήρηση της αναισθησίας πραγματοποιήθηκε με μάσκα 2% Halotane (May & Baker, Rhone –Poulenc Group, U.K.) με μίγμα ροής αερίου O<sub>2</sub> 1l/min και N<sub>2</sub>O 500 ml/min.

Το δέρμα του αριστερού μηρού ξυρίστηκε επί της έξω πλαγίας πλευράς του.

Έγινε τομή δέρματος εις το μέσον του μηρού από το Ισχιακό κύρτωμα έως το γόνατο και αποκαλύφθηκε το Ισχιακό νεύρο (αρ.). Σχεδιάζεται και εκτελέσθηκε διατομή του νεύρου εις το μέσον του και άνωθεν του διχασμού του, δημιουργώντας ένα έλλειμμα 10 χιλ. (λόγω της συρρίκνωσης των νευρικών κολοβωμάτων).

Στή πρώτη ομάδα (36 ζώα) χρησιμοποιώντας το χειρουργικό μικροσκόπιο (16x) σχεδιάσθηκε ένας ανάστροφος αγγειούμενος κρημνός 12 χιλ. επί του επινευρίου του κεντρικού κολοβώματος του νεύρου (εικ. 8a). Διατηρήθηκε ανέπαφη μια “επιχείλιος ταινία” εύρους 2 χιλ. καθ’ όλο το μήκος του χείλους του κολοβώματος δότη (εικ. 8a) η οποία χρησίμευσε ως βάση για τον ανάστροφο επινευρικό κρημνό μετά από την κατά 12



χιλ.ανάστροφη κινητοποίηση του για τη γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος (εικ. 8b). Τοποθετούνται 2 προστατευτικές ραφές (αμφω) 10-0 Ethilon (Μαύρο μονόκλωνο nylon,Ethicon,Johnson &Johnson) για πρόληψη ενδεχόμενης αποκόλλησης της επιχειλίου ζώνης.

Διατηρήθηκε επίσης ανέπαφη μια επιμήκης περιαγγειακή ταινία εύρους 2χιλ., η οποία έφερε το βασικό (μεγαλύτερο) αγγείο του νεύρου, τόσον επι του κεντρικού, όσον και επί του περιφερικού κολοβώματος του νεύρου, διατηρώντας έτσι, σημαντικό μέρος της αγγείωσης (εικ. 8a).Ο επινευρικός κρημνός παρασκευάστηκε, αφού γίνει τομή βασισμένη σε 2 παράλληλες οριζόντιες γραμμές σχεδιασμένες σε απόσταση 2 χιλ εκατέρωθεν του βασικού αγγείου(αρτηρίας) και 1 κάθετη γραμμή που ενώνει τις προαναφερθείσες παράλληλες γραμμές (εικ. 8ab). Το επινεύριο αποκολλήθηκε εκτός των προαναφερθέντων ταινιών, φάρδους 2 χιλ. και έγινε ανάστροφη κατάσπαση του κρημνού μήκους 12 χιλ. προς γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος από το κέντρο προς την περιφέρεια Οι δύο παράλληλα διατμηθείσες οριζόντιες ακμές του επινευρίου συνερράφησαν μεταξύ τους με 5 ανεξάρτητες ραφές με ράμμα 10-0 Ethilon (black monofilament nylon, Ethicon- Johnson & Johnson), ενώ η κάθετη ακμή του κρημνού συνερράφη στο περιφερικό νευρικό κολόβωμα δια τεσσάρων ανεξαρτήτων συρραφών 10-0 Ethilon.(εικ. 8b).

Πριν ολοκληρωθεί η συρραφή τού επινευρικού κρημνού τοποθετήθηκε εντός του αυλού του πήγμα αίματος και Saline buffer πηρός αποφυγήν σύμπτωσης των επινευρικών τοιχωμάτων. Οι μύες συνερράφησαν (και στις δύο τομές) με 5-0 ράμμα (Prolene, blue monofilament polypropylene Ethicon, Johnson & Johnson) και το δέρμα με 4-0 ράμμα (Ti-Cron, blue-braided polyester fiber, Davis & Geck).

Οι κόνικλοι επιβίωσαν για 21(αρ=12), 42(αρ=12), και 91(αρ=12)ημέρες μετεγχειρητικά.

Μετεγχειρητικά χορηγήθηκε E.M. αντιβίωση επι 4 ημέρες.

Σημείωση: Για ευκολότερη και ταχύτερη εκτέλεση της εγχείρησης θεωρήθηκε σκόπιμο ο σχεδιασμός και η παρασκευή τού επινευρικού κρημνού να γίνουν πριν τη διατομή του νεύρου. Επίσης προς διευκόλυνση τής επιμήκους συρραφής των χειλέων τού κρημνού έγινε χρήση πλαστικού σωληνωτού αγωγού διαμέτρου περί τα 2mm δίκην εσωτερικού νάρθηκος και η αφαίρεση του πριν την τοποθέτηση τής τελευταίας επιμήκους συρραφής.

Στη δεύτερη ομάδα (6 ζώα) ή «ομάδα μάρτυρα» για σύγκριση αφορώσα την Ηλεκτρομυογραφική εκτίμηση, το νευρικό έλλειμμα του ισχιακού νεύρου μήκους 10 mm. γεφυρώθηκε χρησιμοποιώντας νευρικό τεμάχιο προηγουμένως αφαιρεθέν εκ του ιδίου νεύρου μήκους 10χιλ. και επανατοποθετώντας το ως ομόλογο νευρικό μόσχευμα.. Η στερέωση (συρραφή) κάθε άκρου του μοσχεύματος στα νευρικά κολοβώματα έγινε δια τεσσάρων συρραφών με ράμμα 10-0 Ethilon. Η λοιπή προεγχειρητική και μετεγχειρητική τεχνική και μέριμνα είναι οι αυτές με την βασική σειρά των 36 ζώων.

Η θυσία τής σειράς μάρτυρα έγινε στις 91 ημέρες, μαζί με την τελευταία ομάδα τής βασικής σειράς.

### **β) Ανοσοϊστοχημεία.**

Οι κόνικλοι θυσιάστηκαν 21(αρ=6), 42(αρ=6), και 91(αρ=6) ημέρες μετά την εγχείρηση. Ο επινευτικός αγωγός παρασκευάστηκε και αφαιρέθηκε. Το περιεχόμενο του αγωγού (νεο-σχηματισθείς νευρικός ιστός-εικόνα 7b) παρασκευάστηκε και διαχωρίστηκε με προσοχή από το επινευτικό τοίχωμα και τον ουλώδη ιστό και εκπλύθηκε σε παγωμένο PBS και εμβυθίστηκε σε υλικό (ιστό) Tek O.C.T. Μείγμα 4583(10.24% w/w πολυβινυλιούχου αλκοόλης, 4.26%w/w πολυαιθυλαινιούχου γλυκόλης, 85.50% w/w αδρανή συστατικά, Miles, USA). Στα 3 τεμάχια αναγεννημένου νευρικού σωλήνα (10k1) ελήφθησαν εγκάρσιες (S3,S6,S9 πάχους 3μm) (10k2) τομές και στά έτερα 3 τεμάχια επιμήκεις διατομές (S4 μήκους 10χιλ.) επί κρυοστάτου (εικόνα 7c).

Μετά μονιμοποίηση σε παγωμένη ακετόνη ή 2.5% παραφορμαλδεύδη, οι τομές εξετέθησαν ξεχωριστά σε ποικίλα βασικά αντισώματα (DAKO- Copenhagen,Denmark) προς αναγνώριση των συστατικών του νεοσχηματισθέντος νευρικού ιστού, περιλαμβάνοντας 70kD πρωτεϊνών των νευρονηματίων, κυττάρων Schwann, Fibronectine, ινοδογόνου και ινικής. Οι μέθοδοι της χρώσης περιγράφονται λεπτομερώς στο τέλος του πρωτοκόλλου.

### **γ) Εκτίμηση δια οπτικού μικροσκοπίου.**

Οι κόνικλοι θυσιάστηκαν 21(αρ=6), 42(αρ=6), και 91(αρ=6) ημέρες μετά την εγχείρηση. Στην ομάδα των 91 ημερών, η ισχύς της μυϊκή συσταλτικότητας μετρήθηκε πριν θυσιαστούν οι κόνικλοι (βλ. παρακάτω).

Ο επινευτικός αγωγός εξετάμη και εμβαπτίσθη σε 2,5% Γλουταραλδεύδη σε 0,1%Μ ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού Νατρίου pH 7,2. Κατασκευάστηκε θυρίδα επί του

τοιχώματος του ουλοποιηθέντος επινευρίου για να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή έκθεση του νευρικού ιστού στο στερεωτικό. Αφού έγινε επιμονιμοποίηση σε 1% τετροξείδιο του Οσμίου και αφυδάτωση σε μια σειρά διαλυμάτων Εθανόλης, το παρασκεύασμα εμβυθίστηκε σε ρητίνη άγαρ 100. Πριν από την στερεοποίηση του πλαστικού, ελήφθησαν από το νεοσχηματισθέντα νευρικό ιστό, τομές 3 χιλ. σε αποστάσεις 3, 6 και 9 χιλ. από το κεντρικό κολόβωμα του νεύρου όπως και για την ανοσοϊστοχημεία (εικόνα 7c). Σέ 3 τεμάχια αναγεννημένου νεύρου ελήφθησαν εγκάρσιες τομές 1 μm (ονομαζόμενες ως τομές S<sub>3</sub>, S<sub>6</sub> και S<sub>9</sub><sup>11,12</sup>) από το περιφερικό μέρος των προαναφερομένων τεμαχίων μήκους 3 χιλ. και σε έτερα 3 τεμάχια επιμήκεις τομές S<sub>4</sub>, κεχρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου και Αζούρ-II και υπεβλήθησαν σε εξέταση δια οπτικού μικροσκοπίου.

Οι μέθοδοι της χρώσης περιγράφονται λεπτομερώς στο τέλος τού πρωτοκόλλου.

**δ) Μέτρηση της Μυϊκής συσταλτικότητας (Εικον. 15a,b,c).**

Η ισομετρική δύναμη σύσπασης του Γαστροκνημίου μύος νευρουμένου δια του Κνημιαίου νεύρου μετρήθηκε 91 ημέρες μετά την εγχείρηση (αρ=6).

Τα πειραματόζωα ναρκώθηκαν εκ νέου και αποκαλύφθηκαν χειρουργικά αμφοτερόπλευρα τα ισχιακά νεύρα και οι Γαστροκνήμιοι μύες. Εφαρμόστηκαν υπερμεγέθη ηλεκτρικά ερεθίσματα κεντρικά της χειρουργηθείσης περιοχής δια Μυοδιεγέρτου Grass-SD-9 σε συχνότητα 100 Hz για 0,6 ms. Η τετανική ισχύς του Γαστροκνημίου μύος εκφράστηκε ως ποσοστιαία σχέση με την ανιχνευόμενη τιμή εκείνης του αντίστοιχου υγιούς μύος. Μετά τις παραπάνω μετρήσεις και καταγραφές ελήφθησαν παρασκευάσματα από τα τεμάχια μοσχεύματος που εξετάμησαν και υπεβλήθησαν σε εξέταση με οπτικό μικροσκόπιο όπως έχει παραπάνω περιγραφεί.

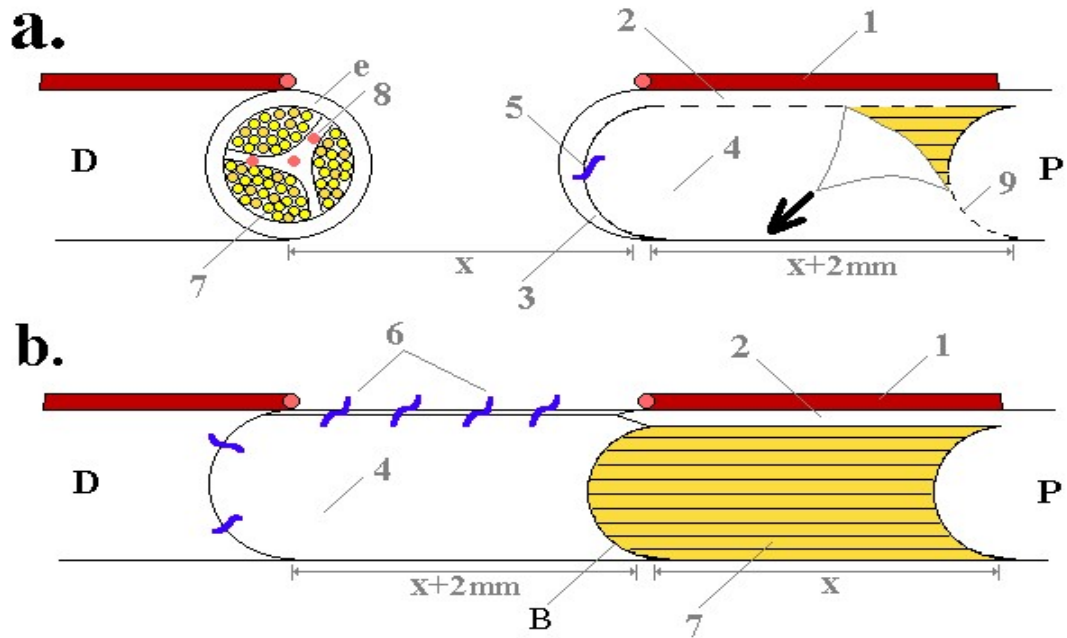
Επίσης η ισομετρική δύναμη σύσπασης του Γαστροκνημίου μύος<sup>11,12</sup> μετρήθηκε και στη σειρά μάρτυρα (δια παρεμβολής νευρικού μοσχεύματος) (αρ=6) με την ίδια τεχνική και στον ίδιο μετεγχειρητικό χρόνο (91 ημέρες).

Εφαρμόστηκε συνδυασμένο t-τεστ προς ανάλυση των δεδομένων.

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν (“Amplitude”, “latency”, “Area”), αναλύθηκαν μετά το πέρας του πρωτοκόλλου.

Εικ 8: Πρωτόκολλο 2: 8a. Ισχιακό νεύρο με έλλειμμα 10 χιλ.

8b. Γεφύρωση με ανάστροφο αγγειούμενο κρημνό μήκους 12 χιλ ληφθέντος από το κεντρικό νευρικό κολόβωμα.



P = Κεντρικό κολόβωμα διατμηθέντος νεύρου. D = Περιφερικό κολόβωμα.

e = Επινεύριο.

1 = Βασικό αγγείο.

2 = Περιαγγειακή ζώνη φάρδους 2 χιλ.

3 = Επιχείλιος ζώνη φάρδους 2 χιλ.

4 = Επινευρικός κρημνός.

5 = Προστατευτική ραφή για σταθεροποίηση επιχειλίου ζώνης.

6 = Σταθεροποιητικές ραφές Επινευρίου.

7 = Νευρικές δεσμίδες.

8 = Εσωτερικοί αγγειακοί άξονες.

9 = Περίγραμμα τομής. x = Απόσταση 10 χιλ ισοδναμώσα με το νευρικό έλλειμμα..

b = Βάση ανάστροφου κρημνού-όριο μεταξύ επιχειλίου ζώνης & ανάστροφου κρημνού

2γ. Πρωτοκόλλο 3: Γεφύρωση Βραχέος Ελλείμματος Ισχιακού Νεύρου του Κόνικλου δ' Αναστροφού Αγγειούμενου Επινευρικού Κρημονού Ληφθέντος εκ του Περιφερικού Νευρικού Κολοβώματος (Εικόνες 9a,9b).

**Μέθοδος και υλικά** 19,22,28,56

**α. Ζώα και εγχειρήσεις:**

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ομάδες λευκών κόνικλων (αρ=36 στη πρώτη και 6 στη δεύτερη) Νέας Ζηλανδίας βάρους 3,0-3,5 Kg. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν δια Ε.Φ. ενέσεως Hypnovel (fentanyl και fluanison, Janssen Pharmaceuticals Ltd) 3 ml/ Kg και μία Ε.Μ. ένεση Hypnorm (midazolam, Roche Products Ltd.) Η διατήρηση της αναισθησίας πραγματοποιήθηκε με μάσκα 2% Halotane (May & Baker, Rhone –Poulenc Group, U.K.) με μίγμα ροής αερίου O<sub>2</sub> 1l/min και N<sub>2</sub>O 500 ml/min.

Το δέρμα του αριστερού μηρού ξυρίστηκε επί της έξω πλαγίας πλευράς του.

Έγινε τομή δέρματος εις το μέσον του μηρού από το Ισχιακό κύρτωμα έως το γόνατο και αποκαλύφθηκε το Ισχιακό νεύρο (αρ.). Σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε διατομή του νεύρου εις το μέσον του και άνωθεν του διχασμού του, δημιουργώντας ένα έλλειμμα 10 χιλ. (λόγω της συρρίκνωσης των νευρικών κολοβωμάτων).

Στη πρώτη ομάδα (36 ζώα) χρησιμοποιώντας το χειρουργικό μικροσκόπιο (16x) σχεδιάστηκε ένας ανάστροφος αγγειούμενος κρημόνος 12 χιλ. επί του επινευρίου του περιφερικού κολοβώματος του νεύρου (εικ 9a). Διατηρήθηκε ανέπαφη μια “επιχείλιος ταινία” εύρους 2 χιλ. καθ' όλο το μήκος του χείλους του κολοβώματος δότη (εικ 9a) η οποία χρησίμευσε ως βάση για τον ανάστροφο επινευρικό κρημόνο μετά από την κατά 12 χιλ. ανάστροφη κινητοποίηση του για τη γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος (εικ. 9ab).

Τοποθετήθηκαν 2 προστατευτικές ραφές (αμφω) 10-0 Ethilon (Μαύρο μονόκλωνο nylon, Ethicon, Johnson & Johnson) για πρόληψη ενδεχόμενης αποκόλλησης της επιχειλίου ζώνης.

Διατηρήθηκε επίσης ανέπαφη μια επιμήκης περιαγγειακή ταινία εύρους 2χιλ., η οποία έφερε το βασικό (μεγαλύτερο) αγγείο του νεύρου επί του περιφερικού κολοβώματος του νεύρου, διατηρώντας έτσι, σημαντικό μέρος της ανάστροφης αγγείωσης (εικ. 9b). Ο επινευρικός κρημνός παρασκευάστηκε, αφού έγινε τομή βασισμένη σε 2 παράλληλες οριζόντιες γραμμές σχεδιασμένες σε απόσταση 2 χιλ εκατέρωθεν του βασικού αγγείου (αρτηρίας) και 1 κάθετη γραμμή που ενώνει τις προαναφερθείσες παράλληλες γραμμές (εικ 9b). Το επινεύριο αποκολλήθηκε εκτός των προαναφερθέντων ταινιών, φάρδους 2 χιλ. και επιχειρήθηκε ανάστροφη κατάσπαση του κρημνού μήκους 12 χιλ. προς γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος από την περιφέρεια προς το κέντρο. Οι δύο παράλληλα διαμηθείσες οριζόντιες ακμές του επινευρίου συνερράφησαν μεταξύ τους με 5 ανεξάρτητες ραφές με ράμμα 10-0 Ethilon (black monofilament nylon, Ethicon- Johnson & Johnson), ενώ η κάθετη ακμή του κρημνού συνερράφη στο κεντρικό νευρικό κολόβωμα δια τεσσάρων ανεξαρτήτων συρραφών 10-0 Ethilon.(εικ. 9b, εικ 10g).

Πριν ολοκληρωθεί η συρραφή τού επινευρικού κρημνού τοποθετήθηκε εντός του αυλού του πήγμα αίματος και Saline buffer προς αποφυγήν σύμπτωσης των επινευρικών τοιχωμάτων. Οι μύες συνερράφησαν (και στις δύο τομές) με 5-0 ράμμα (Prolene, blue monofilament polypropylene Ethicon, Johnson & Johnson) και το δέρμα με 4-0 ράμμα (Ti-Cron, blue-braided polyester fiber, Davis & Geck).

Οι κόνικλοι επιβίωσαν για 21 ( $\alpha\rho=12$ ), 42 ( $\alpha\rho=12$ ), και 91 ( $\alpha\rho=12$ ) ημέρες μετεγχειρητικά.

Μετεγχειρητικά χορηγήθηκε E.M. αντιβίωση επι 4 ημέρες.



Σημείωση: Για ευκολότερη και ταχύτερη εκτέλεση της εγχείρησης ο σχεδιασμός και η παρασκευή του επινευρικού κρημονού έγιναν πριν τη διατομή του νεύρου. Επίσης προς διευκόλυνση της επιμήκους συρραφής των χειλέων του κρημονού έγινε χρήση πλαστικού σωληνωτού αγωγού διαμέτρου περί τα 2mm δίκην εσωτερικού νάρθηκος και αφηρέθη του πριν την τοποθέτηση της τελευταίας επιμήκους συρραφής.

Στη δεύτερη ομάδα (6 ζώα) ή «ομάδα μάρτυρα» για σύγκριση αφορώσα την Ηλεκτρομυογραφική εκτίμηση, το νευρικό έλλειμμα του ισχιακού νεύρου μήκους 10 mm. γεφυρώθηκε χρησιμοποιώντας νευρικό τεμάχιο προηγουμένως αφαιρεθέν εκ του ιδίου νεύρου μήκους 10χιλ. και επανατοποθετώντας το ως ομόλογο νευρικό μόσχευμα. Η στερέωση (συρραφή) κάθε άκρου του μοσχεύματος στα νευρικά κολοβώματα έγινε δια τεσσάρων συρραφών με ράμμα 10-0 Ethilon. Η λοιπή προεγχειρητική και μετεγχειρητική τεχνική και μέριμνα είναι οι αυτές με την βασική σειρά των 36 ζώων.

Η θυσία της σειράς μάρτυρα έγινε στις 91 ημέρες, μαζί με την τελευταία ομάδα της βασικής σειράς.

### **β)Ανοσοϊστοχημεία**

Οι κόνικλοι θυσιάστηκαν 21(αρ=6), 42(αρ=6), και 91(αρ=6) ημέρες μετά την εγχείρηση.

Ο επινευρικός αγωγός παρασκευάστηκε και αφαιρέθηκε. Το περιεχόμενο του αγωγού (νεο-σχηματισθείς νευρικός ιστός-εικόνα 7b) παρασκευάστηκε και διαχωρίστηκε με προσοχή από το επινευρικό τοίχωμα και τον ουλώδη ιστό και εκπλύθηκε σε παγωμένο PBS και εμβυθίζεται σε υλικό (ιστό) Tek O.C.T. Μείγμα 4583 (10.24% w/w πολυβινυλιούχου αλκοόλης, 4.26%w/w πολυαιθυλαινιούχου γλυκόλης, 85.50% w/w αδρανή συστατικά, Miles, USA). Στα 3 τεμάχια αναγεννημένου νευρικού σωλήνα (10k1)

ελήφθησαν εγκάρσιες (S3,S6,S9 πάχους 3μm) (10k2) τομές και στα έτερα 3 τεμάχια επιμήκεις διατομές (S4 μήκους 10χιλ.) επί κρυστάτου (όπως στην εικόνα 7c).

Μετά μονιμοποίηση σε παγωμένη ακετόνη ή 2.5% παραφορμαλδεύδη, οι τομές εξετέθησαν ξεχωριστά σε ποικίλα βασικά αντισώματα (DAKO- Copenhagen,Denmark) προς αναγνώριση των συστατικών του νεοσχηματισθέντος νευρικού ιστού, περιλαμβάνοντας 70kD πρωτεϊνών των νευρονηματίων,κυττάρων Schwann, Fibronectine, ινοδογόνου και ινικής. Οι μέθοδοι της χρώσης περιγράφονται λεπτομερώς στο τέλος τού πρωτοκόλλου.

### **γ) Εκτίμηση δια οπτικού μικροσκοπίου.**

Οι κόνικλοι θυσιάσθηκαν 21(αρ=6), 42(αρ=6), και 91(αρ=6) ημέρες μετά την εγχείρηση. Στην ομάδα των 91 ημερών, η ισχύς της μυϊκή συσταλτικότητα μετρήθηκε πριν θυσιαστούν οι κόνικλοι (βλ. παρακάτω).

Ο επινευρικός αγωγός εξετάμη και εμβαπτίσθηκε σε 2,5% Γλουταραλδεύδη σε 0,1%Μ ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού Νατρίου pH 7,2. Κατασκευάσθηκε θυρίδα επί του τοιχώματος του ουλοποιηθέντος επινευρίου για να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή έκθεση του νευρικού ιστού στο στερεωτικό. Αφού έγινε επιμονιμοποίηση σε 1% τετροξείδιο του Οσμίου και αφυδάτωση σε μια σειρά διαλυμάτων Εθανόλης, το παρασκεύασμα εμβυθίσθη σε ρητίνη άγαρ 100. Πριν από την στερεοποίηση του πλαστικού, ελήφθησαν από το νεοσχηματισθέντα νευρικό ιστό, τομές 3 χιλ. σε αποστάσεις 3, 6 και 9 χιλ. από το κεντρικό κολόβωμα του νεύρου όπως και για την ανοσοϊστοχημεία (εικόνα 7c). Σέ 3 τεμάχια αναγεννημένου νεύρου ελήφθησαν εγκάρσιες τομές 1 μm (ονομαζόμενες ως τομές S3, S6 και S9<sup>11,12</sup>) από το περιφερικό μέρος των προαναφερομένων

τεμαχίων μήκους 3 χιλ. και σε έτερα 3 τεμάχια επιμήκεις τομές S4, κεχρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου και Αζούρ-II και υπεβλήθησαν σε εξέταση δια οπτικού μικροσκοπίου.

Οι μέθοδοι της χρώσης περιγράφονται λεπτομερώς στο τέλος τού πρωτοκόλλου.

#### **δ) Μέτρηση της Μυϊκής συσταλτικότητας (Εικον. 15a,b,c).**

Η ισομετρική δύναμη σύσπασης του Γαστροκνημίου μύος νευρουμένου δια του Κνημιαίου νεύρου μετρήθηκαν 100 ημέρες μετά την εγχείρηση (αρ=6).

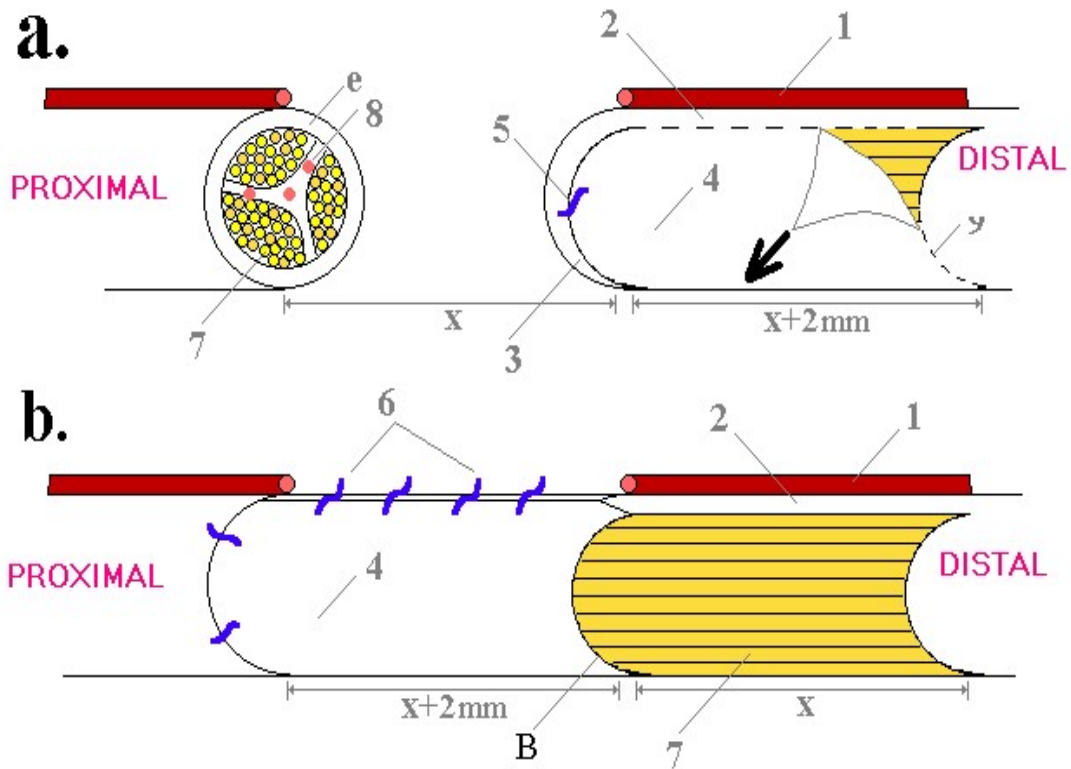
Τα πειραματόζωα ναρκώθηκαν εκ νέου και αποκαλύφθηκαν χειρουργικά αμφοτερόπλευρα τα ισχιακά νεύρα και οι Γαστροκνήμιοι μύες. Εφαρμόσθηκαν υπερμεγέθη ηλεκτρικά ερεθίσματα κεντρικά της χειρουργηθείσης περιοχής δια Μυοδιεγέρτου Grass-SD-9 σε συχνότητα 100 Hz για 0,6 ms. Η τετανική ισχύς του Γαστροκνημίου μύος εκφράσθηκε ως ποσοστιαία σχέση με την ανιχνευόμενη τιμή εκείνης του αντίστοιχου υγιούς μύος. Μετά τις παραπάνω μετρήσεις και καταγραφές ελήφθησαν παρασκευάσματα από τα τεμάχια μοσχεύματος που εξετάμησαν υποβλήθηκαν σε εξέταση με οπτικό μικροσκόπιο όπως έχει παραπάνω περιγραφεί.

Επίσης η ισομετρική δύναμη σύσπασης του Γαστροκνημίου μύος<sup>11,12</sup> μετρήθηκε και στη σειρά μάρτυρα (δια παρεμβολής νευρικού μοσχεύματος) (αρ=6) με την ίδια τεχνική και στον ίδιο μετεγχειρητικό χρόνο (91 ημέρες).

Εφαρμόσθηκε συνδυασμένο t-τεστ προς ανάλυση των δεδομένων. Οι παράμετροι που εξετάσθηκαν (“Amplitude”, “latency”, “Area”) αναλύονται μετά το πέρας του πρωτοκόλλου.

Εικ 9: Πρωτόκολλο 3: 9α. Ισχιακό νεύρο με έλλειμμα 10 χιλ.

9b. Γεφύρωση με ανάστροφο αγγειούμενο κρημνό μήκους 12 χιλ ληφθέντος από το περιφερικό νευρικό κολόβωμα



PROXIMAL= Κεντρικό κολόβωμα.

DISTAL = Περιφερικό κολόβωμα.

e = Επινεύριο.

1 = Βασικό αγγείο.

2 = Περιαγγειακή ζώνη φάρδους 2 χιλ.

3 = Επιχειλίος ζώνη φάρδους 2 χιλ.

4 =Επινευρικός κρημνός.

5=Προστατευτική ραφή για σταθεροποίηση επιχειλίου ζώνης.

6 =Σταθεροποιητικές ραφές Επινευρίου. 7 = Νευρικές δεσμίδες.

8=Ενδονευρικά αγγεία 9=Περίγραμμα τομής x=Απόσταση 10 χιλ

b=Βάση ανάστροφου κρημνού (όριο μεταξύ επιχειλίου ζώνης & ανάστροφου κρημνού)

**Σημείωση: (Τεχνικές λεπτομέρειες - διευκρινίσεις):**

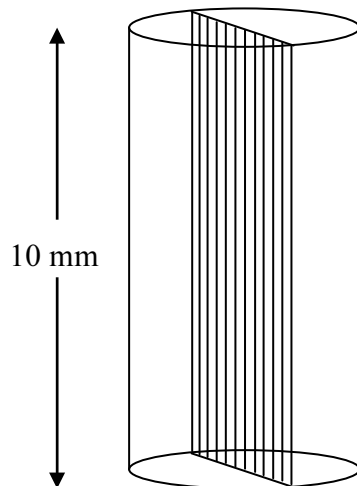
- 1) Στο χειρουργικό μέρος του ερευνητικού πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκε χειρουργικό μικροσκόπιο με μεγεθύνσεις από 8x έως 20x ανάλογα με τη φάση της εγχείρησης, Στη παρασκευή του επινευρίου είχαμε μεγέθυνση έως 20x, ενώ στή φάση των συρραφών και δη στην φάση του δεσίματος των κόμπων μόλις 8x.
- 2) Στην διαδικασία της ανάλυσης παρασκευασμάτων με οπτική μικροσκοπία, η αρχική τεχνική συντήρησης έγινε με τοποθέτηση τους εντός μικρών καψιδίων, εμβαπτιζόμενα εντός γλουταραλδεύδης 2,5%. (Βλέπε 2α: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1, υποκεφάλαιο γ: Οπτική Μικροσκοπία.)
- 3) Στα παρασκευάσματα που απευθύνοντο για εξέταση με ανοσοϊστοχημεία τα παρασκευάσματα αρχικά υπεβλήθησαν προσωρινά σε βαθιά κατάψυξη 70° ενώ υγράνθηκαν με ορό απλωμένα επί φελλού και τοποθετήθηκαν εντός πλαστικής κάψουλας και κατόπιν μόλις μετεφέρθησαν στο εργαστήριο ακολούθησε η τεχνική παραφίνωσης (Βλέπε ΕΠΟΜΕΝΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ)

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**  
**για το μέρος της ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ**

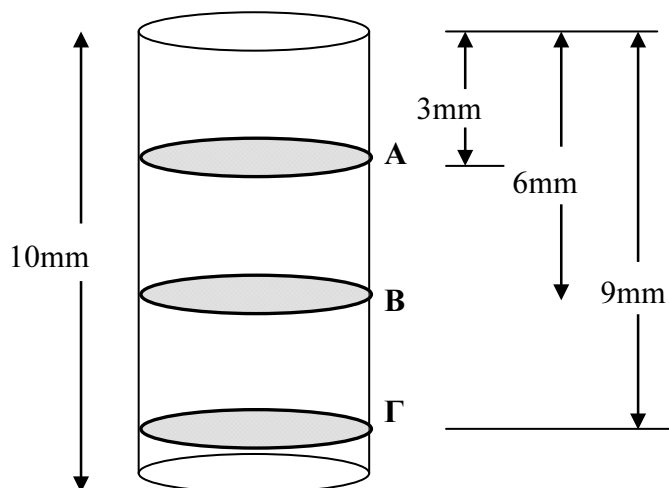
Κάθε σειρά περιλαμβάνει 36 ζώα, από τα οποία **18 αφορούν το κομμάτι ανοσοϊστοχημείας**. Τα 18 ζώα θυσιάσθηκαν **ανά έξι σε τρεις χρονικές περιόδους**: 21, 42, 91 ημέρες (3,6,13 εβδομάδες)

Σε κάθε ζώο έγινε διατομή του ισχιακού νεύρου, και αφαίρεση τεμαχίου **μήκους 10 mm**.

Τα έξι ζώα κάθε χρονικής περιόδου, χωρίστηκαν σε **δύο ομάδες των τριών ατόμων**. Στην πρώτη ομάδα έγινε **επιμήκης τομή** στο μέσο του αναγεννημένου ισχιακού νεύρου, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Στη δεύτερη ομάδα έγιναν **εγκάρσιες διατομές** του αναγεννημένου ισχιακού νεύρου, στις θέσεις A, B, Γ, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Πιο συγκεκριμένα έγιναν εγκάρσιες τομές στις ακόλουθες θέσεις:

- Θέση Α.** 3mm από το άκρο του νευρικού κολοβώματος  
**Θέση Β.** 6mm από το άκρο του νευρικού κολοβώματος  
**Θέση Γ.** 9mm από το άκρο του νευρικού κολοβώματος

**Τοιουτοτρόπως έγιναν οι ακόλουθες τομές:**

<b><u>1<sup>η</sup> ομάδα</u></b>	<b><u>Τομές</u></b>
Σε κάθε άτομο, για κάθε αντίσωμα	1
Σε κάθε άτομο, για όλα τα αντισώματα (x3)	3
Σε όλα τα άτομα μιας περιόδου για όλα τα αντισώματα (x3)	9
Για όλες τις περιόδους (x3)	27
Για όλες τις πειραματικές σειρές & όλες τις περιόδους (x3)	81
<b><u>2<sup>η</sup> ομάδα</u></b>	<b><u>Τομές</u></b>
Σε κάθε άτομο, για κάθε αντίσωμα	3
Σε κάθε άτομο, για όλα τα αντισώματα (x3)	9
Σε όλα τα άτομα μιας περιόδου για όλα τα αντισώματα (x3)	27
Για όλες τις περιόδους (x3)	81
Για όλες τις πειραματικές σειρές & όλες τις περιόδους (x3)	243
<b>Σύνολο τομών για ανοσοϊστοχημεία</b>	<b>324</b>

Μετά τη χειρουργική αφαίρεσή του, το αναγεννημένο τμήμα τοποθετήθηκε σε Neutral Buffered Formalin για 2-5h. Ακολούθως, έγινε έγκλιση του παρασκευάσματος σε παραφίνη, προσέχοντας τον κατάλληλο προσανατολισμό των ιστοτεμαχίων. Εάν δεν ήταν εφικτή η άμεση μονιμοποίηση του ιστού σε φορμαλδεΐδη, εναλλακτικά θα ήτο δυνατό να καταψυχθεί ο ιστός σε υπερκατάψυξη (70°C), αφού προηγουμένως καλυφθεί μερικώς με φυσιολογικό ορό.

Τα μπλοκ παραφίνης κόπηκε σε μικροτόμο και οι τομές πάχους 5 μm τοποθετήθηκε σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες superfrost. Οι πλάκες, στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε κλίβανο 5053°C για 6-12h, προκειμένου να στεγνώσουν. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν και μπορούν ανά πάσα στιγμή να χρησιμοποιηθούν

Η επεξεργασία των τομών με τα αντισώματα και οι χρώσεις έγιναν όπως αναφέρεται στο ακόλουθο πρωτόκολλο.

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ**

(ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΡΕΠΤΑΒΙΔΙΝΗΣ – ΒΙΟΤΙΝΗΣ – ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ)

**ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ**

Οι τομές τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 50-53°C για 6-12h.

**ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ**      Επώαση σε ξυλόλη (x3) για 5 min.

1. Σταδιακή ενυδάτωση με περάσματα από: α. EtOH 100% για 3 min (x3)      β. EtOH 95% για 3 min (x2), γ. EtOH 70% για 3 min (x2)
2. Ξέπλυμα σε dH<sub>2</sub>O ( 5 βουτιές)
3. Τοποθέτηση σε Phosphate Buffered Saline (PBS) για 8-10 min (προαιρετικό)  
(Αλλαγή δ/των κάθε 80-100 πλακάκια)

**ΜΠΛΟΚΑΡΙΣΜΑ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ**

1. Επώαση σε φρέσκο δ/μα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε απόλυτη μεθανόλη για 20-30 min, σε σκοτεινό μέρος.
2. Ξέπλυμα με dH<sub>2</sub>O και τοποθέτηση στο PBS.

**ΑΠΟΚΑΛΥΨΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ** (προαιρετικά, αναλόγως αντισώματος)

1. Προθέρμανση δ/τος 10mM κιτρικού οξέος, pH 6.0.
2. Θέρμανση των τομών στο κιτρικό οξύ (5 min x2). Ενδιαμέσως ελέγχεται η στάθμη του κιτρικού και συμπληρώνουμε εάν δεν καλύπτει τις τομές.
3. Αφέθησαν οι τομές να κρυώσουν στο κιτρικό για ~20-30 min σε θερμοκρασία δωματίου, προσέχοντας να καλύπτονται από το δ/μα.
4. Ξέπλυμα σε dH<sub>2</sub>O και τοποθέτηση στο PBS για 10 min.

**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΩΣΗΣ**

1. Τοποθετήθηκαν τα πλακίδια στις θήκες με την τομή προς την επιφάνεια της θήκης.
2. Προσετέθησαν 3 στυ. Protein Blocking Agent (CAS block, ZYMED) για 10 min, προκειμένου να μπλοκαριστούν οι θέσεις μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος.
3. Προσετέθησαν 120μl από το πρωτοταγές Ab και τοποθετούμε σε θερμοκρασία δωματίου, για 45-50 min.
4. Ξεπλύθηκαν με PBS (3 min x3).
5. Προσετέθη το πολυμερές Picture kit της ZYMED για 20 min.
6. Ξεπλύναμε με PBS (3 min x3).
7. Προσετέθησαν 120μl φρέσκου δ/τος DAB για 3-5.
8. Ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό για 2 min.
9. Αφαιρέθησαν τα πλακίδια από τις θήκες και τις τοποθετούμε σε dH<sub>2</sub>O.
10. Εμβαπτίσθη σε αιματοξυλίνη Harris για 45-50 sec.
11. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών και επικάλυψη με καλυπτρίδα.

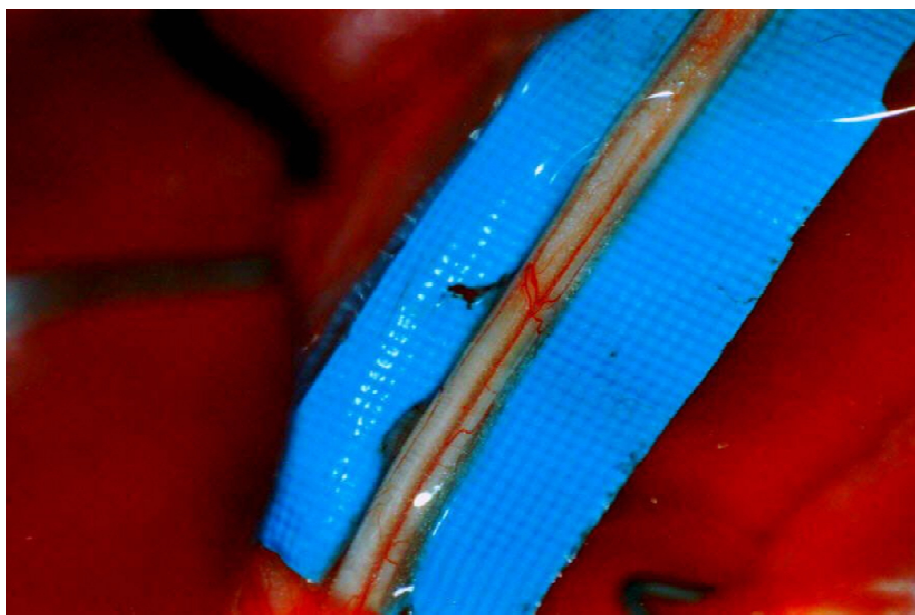


### **Πρωτοταγή αντισώματα**

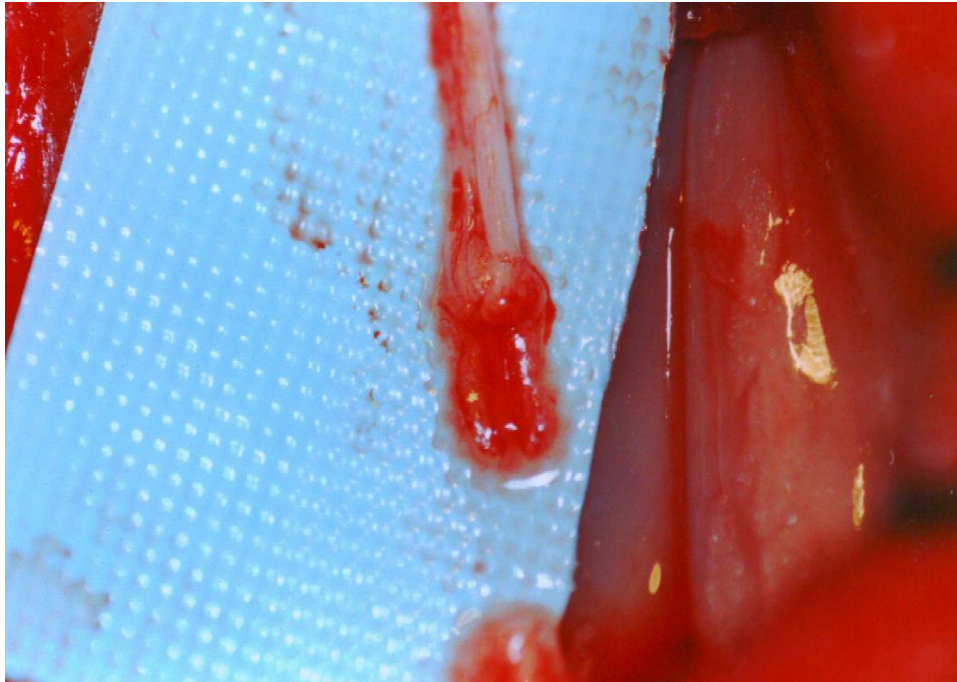
1. DAKO, Monoclonal Rabbit Anti-Human Neurofilament Protein, clone 2F11, Cat. M0762.
2. DAKO, Polyclonal Rabbit Anti-Human S-100, Cat. Z0311.
3. DAKO, Polyclonal Rabbit Anti-Human Fibronectin, Cat. A0245.
4. DAKO, Monoclonal Rabbit fibrine Protein

### **Εικόνα10: ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ.**

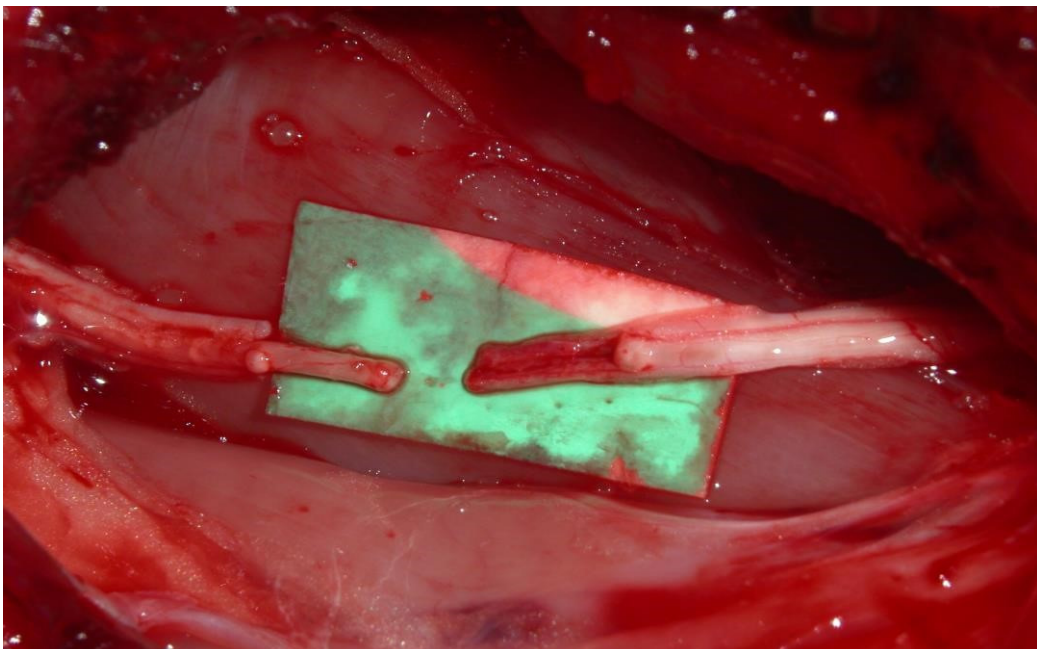
#### **Εικ. 10α. Παρασκευή Ισχιακού Νεύρου**



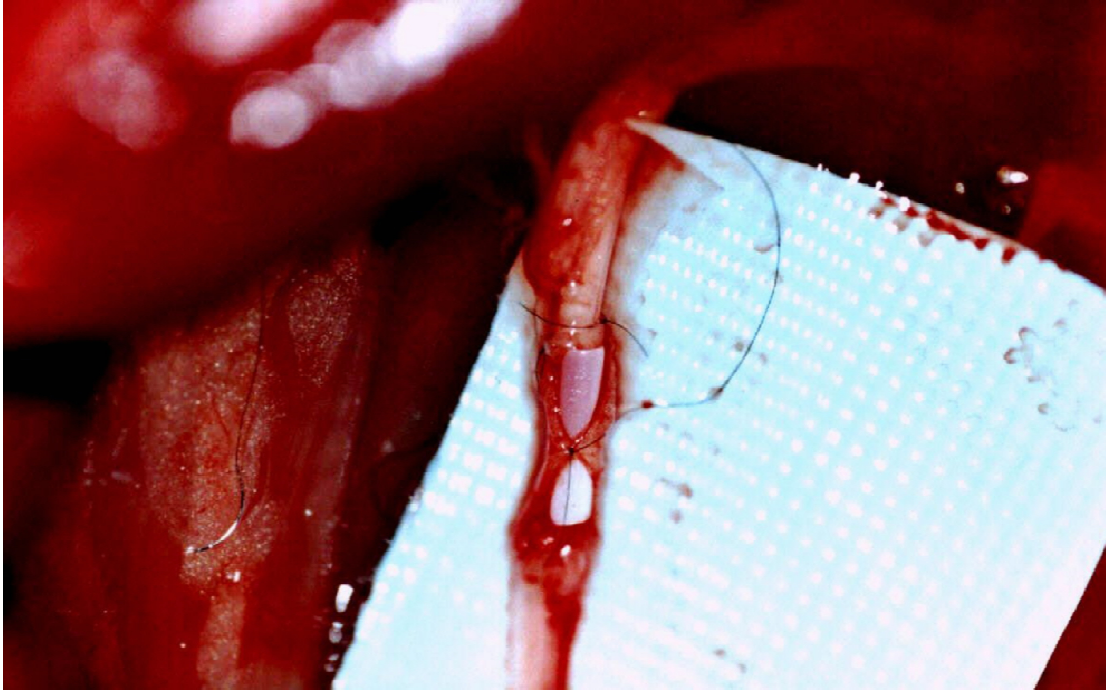
**Εικ.10b: Τεχνική γεφύρωσης με επινευρικό κρημό από το εγγύς κείμενο νευρικό κολόβωμα, Ο κρημός έχει ήδη παρασκευασθεί.**



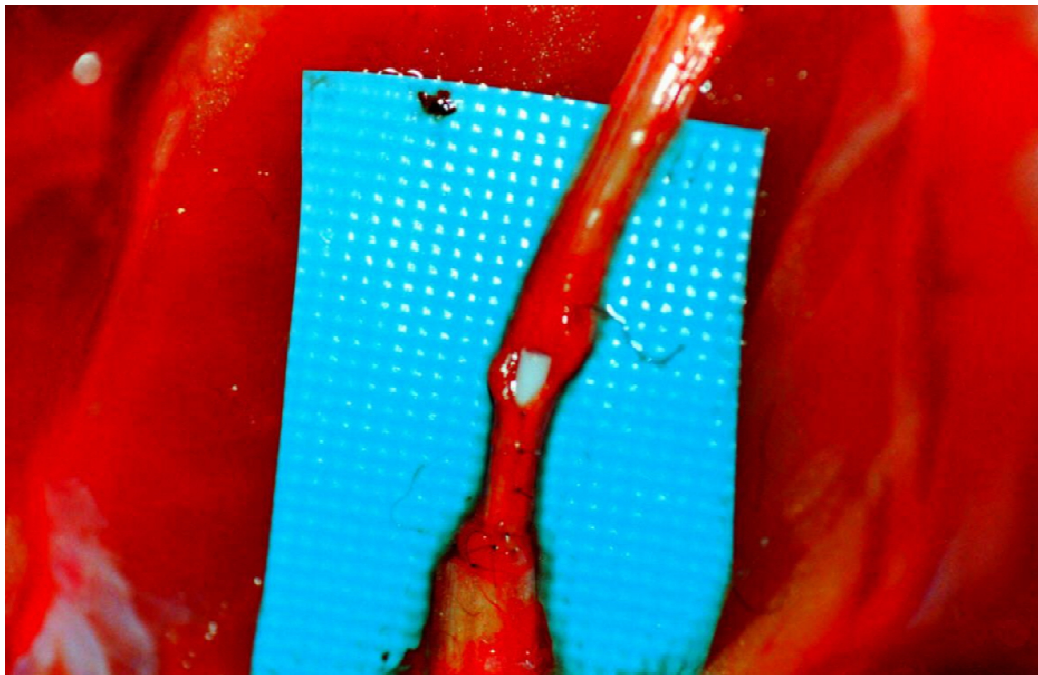
**Εικ.10c: Οι ομάδες των νευρικών δεματίων φαίνονται τόσο εγγύς όσο και στο άπω νευρικό κολόβωμα.**



**Εικ.10d:** Ένας σωλήνας σιλικόνης έχει τοποθετηθεί προσωρινά στον αυλό του συρραφομένου νεύρου για να προληφθεί η σύμπτωση των τοιχωμάτων του κατά τη διάρκεια της συρραφής με 10-0 nylon.

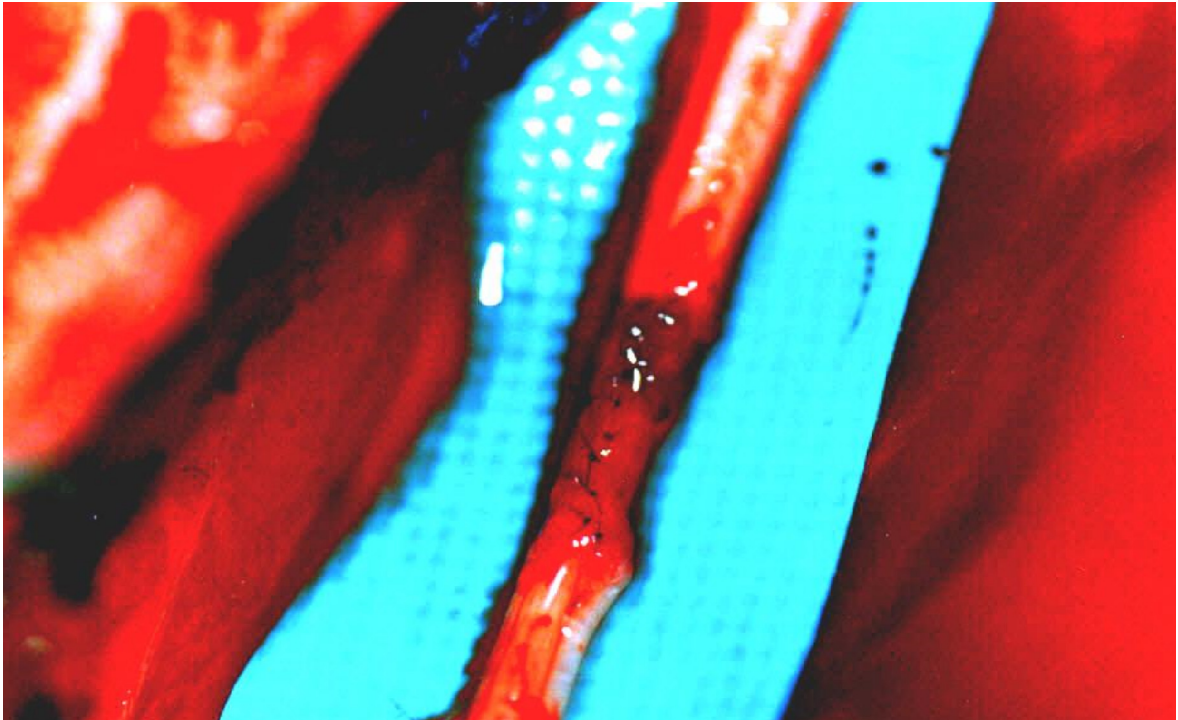


**Εικ. 10e:** Πριν από την εφαρμογή του τελευταίου ράμματος ο σωλήνας έτοιμος για αφαίρεση.

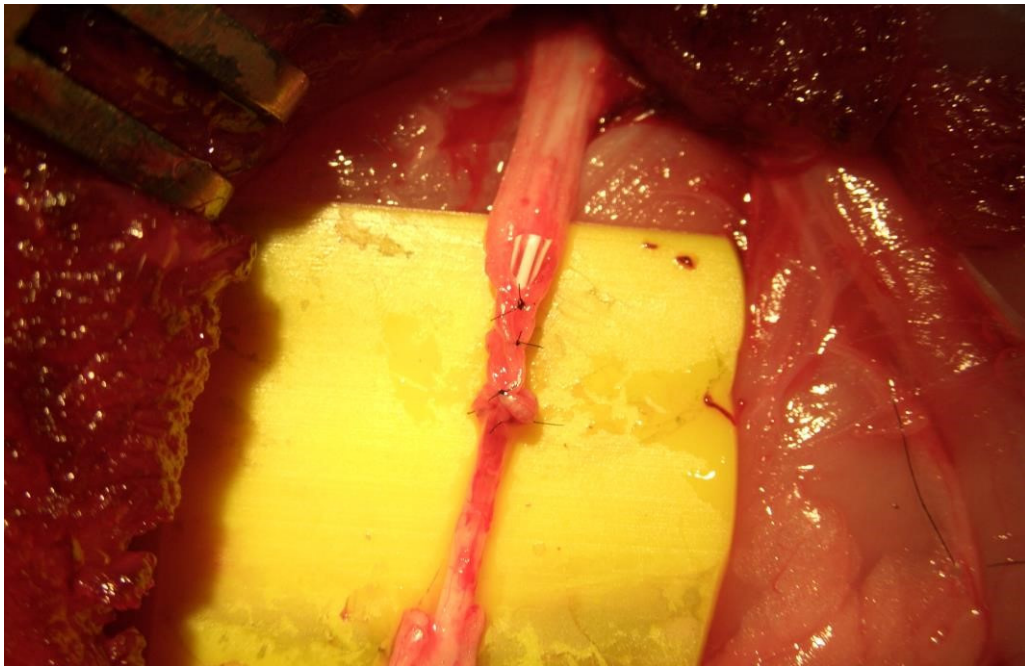




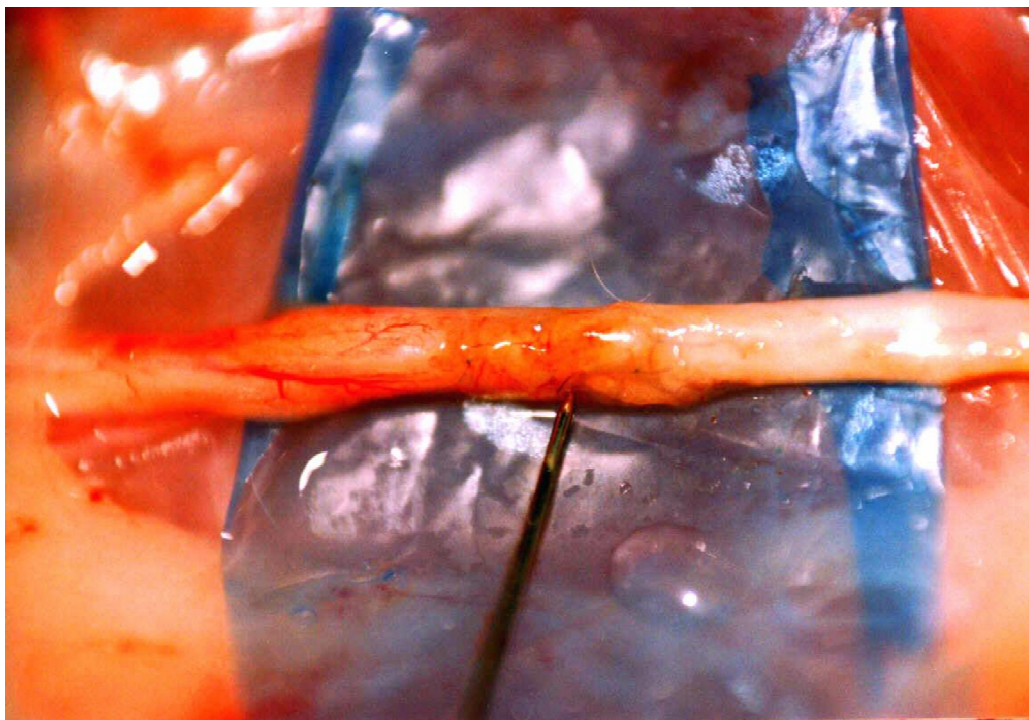
**Εικ 10f:** Τελικά μετά τη συρραφή του κρημνού ο αγωγός πληρούται με αίμα για να προληφθεί η σύμπτωση των τοιχωμάτων του.



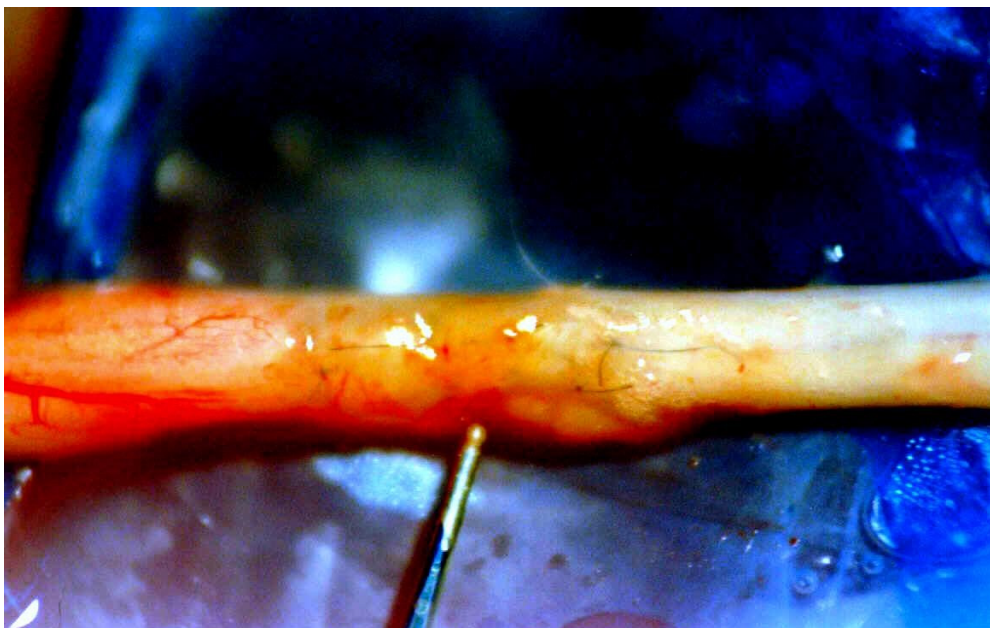
**10g:** Η τεχνική λήψης ανάστροφου επινευρικού κρημνού απ' το περιφερικό κολόβωμα



**10h-1: Αναγεννημένο νεύρο 13 εβδομάδων.**

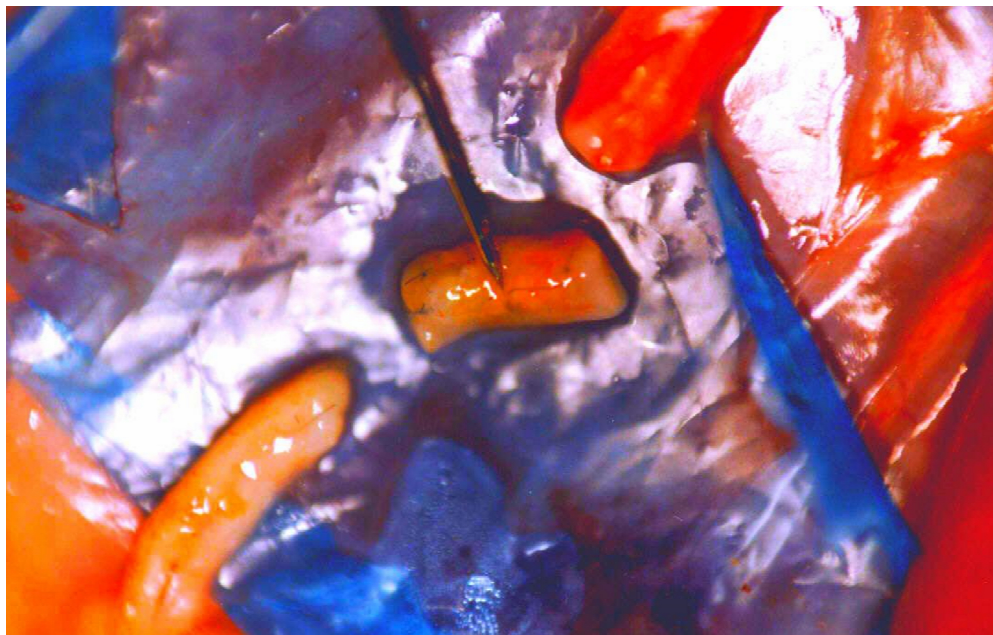


**10h-2: Αναγεννημένο νεύρο 13 εβδομάδων σε μεγέθυνση. Φαίνεται το νέο-επινεύριο.**

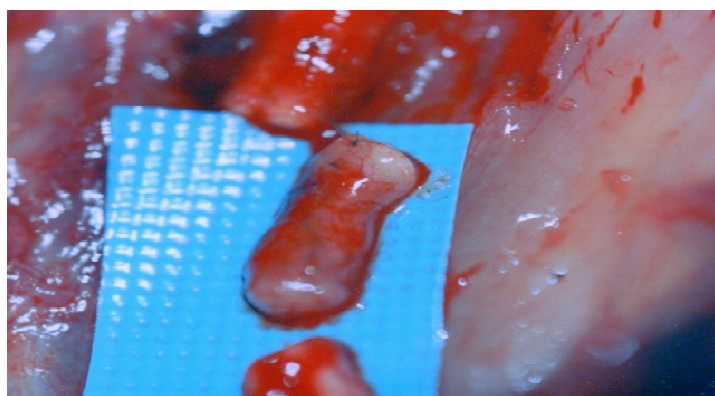




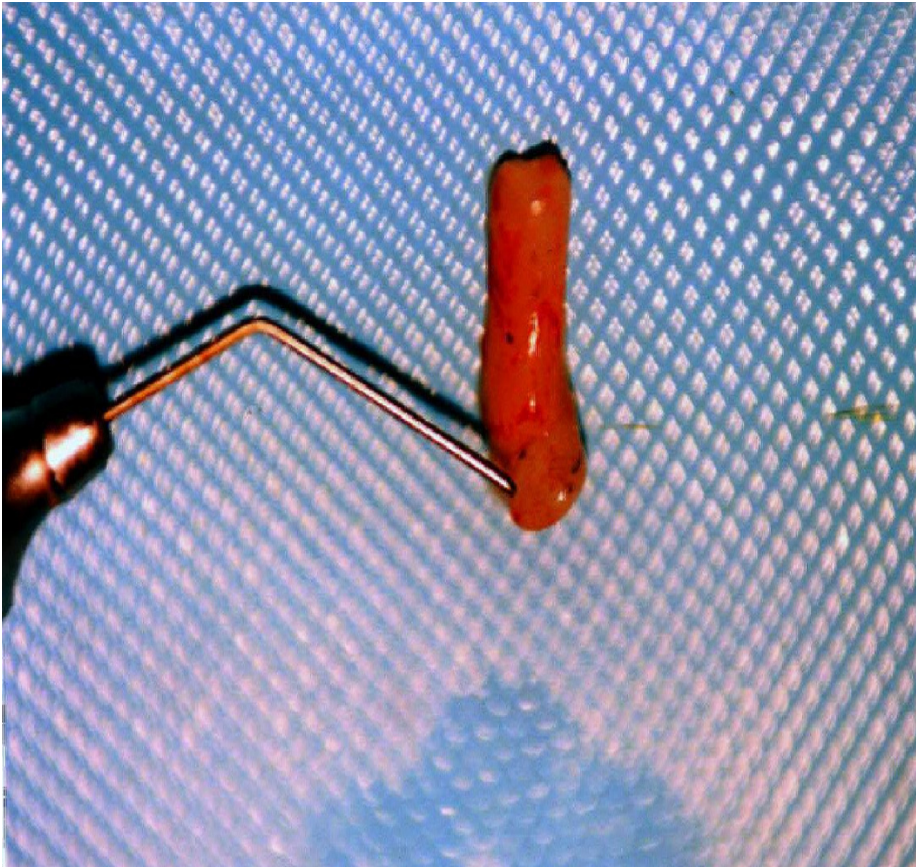
**10i-1:** Αφαιρείται το τεμάχιο 10 mm μετά τη θυσία του ζώου, ενώ η τελευταία ομάδα έχει υποβληθεί προηγουμένως και σε ΗΜΓέλεγχο.



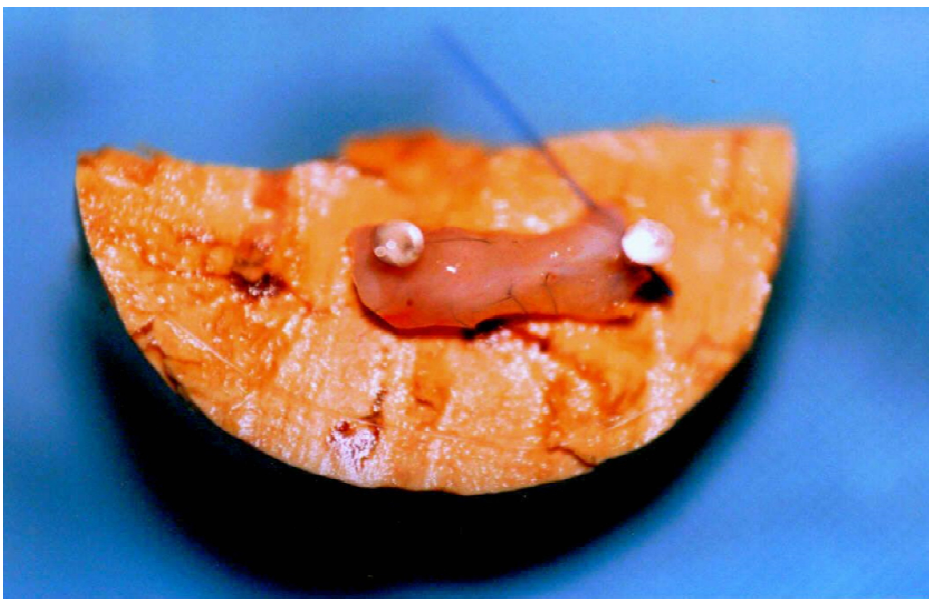
**10i-2:** Η αναγεννημένη νευρική ουσία εντός του επινευρικού αγωγού μήκους 10 mm.



**10k-1: Μετά την αφαίρεση του το αναγεννηθέν τμήμα νεύρου εμβυθίζεται σε διάλυμα 4%Glutaraldehyd**



**10k-2: Το αναγεννηθέν τεμάχιο ετοιμάζεται και σταθεροποιείται για να κοπεί σε τομές ανά 3mm στα 3,6,9 mm και να εξετασθεί μικροσκοπικά ή ανοσοιστολογικά.**







### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ & ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ):**

**Ακολουθεί παράθεση και σύγκριση των αποτελεσμάτων (Μικροσκοπικών, ανοσοιστολογικών και λειτουργικών) των πειραματικών σειρών 1,2 και 3.**

#### **Αποτελέσματα**

Όσον αφορά τη συσταλτικότητα του γαστροκνημίου μυ το εύρος της κινητικής απόκρισης σε mV εκφράζεται ως ο λόγος μεταξύ χειρουργημένης και φυσιολογικής πλευράς (Πίνακες 4a,4b4c,4d). Το εύρος σύσπασης του γαστροκνημίου μυός κυμαίνεται μεταξύ 5,3±1,2mV και 21,8±3,9mV. Το μέσο εύρος της κινητικής απάντησης (μικτά κινητικά δυναμικά, CMAP) του γαστροκνημίου μυός στη χειρουργημένη σε σύγκριση με το αντίπλευρο φυσιολογικό μέλος 13 εβδομάδες μετά το χειρουργείο (εκφρασμένο ως ποσοστό, P-λόγος) ήταν 60.33%±4.25 στην πρώτη ομάδα (Α) (προώθηση επινευρίου) 42.1%±7.33 στην ομάδα Β (άπω ανεστραμμένο επινεύριο), 58.7%±5.66 στην ομάδα C (κεντρικά ανεστραμμένο επινεύριο) και 64.67%±6.41 στην ομάδα D (ομάδα μάρτυρας, νευρικό μόσχευμα). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Α, C και D αλλά μόνο μεταξύ αυτών των ομάδων και της ομάδας Β ( $p > 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα της ιστομορφομετρικής ανάλυσης παρουσιάζονται στους πίνακες 1Α, 1Β, 2Α, 2Β, 3Α, 3Β (σελ.95, 97, 98). Η νευρική αναγέννηση μέσω του επινευρικού αγωγού ολοκληρώθηκε επιτυχώς. Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός νευρώματος ούτε φλεγμονώδης αντίδραση.

Ο μέσος όρος της διαμέτρου των νευραξόνων και ο αριθμός των μυελινοποιημένων νευραξόνων/mm<sup>2</sup> ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με το φυσιολογικά αντίπλευρο ισχιακό νεύρο. Στις ομάδες A,B και C οι παράμετροι ήταν σημαντικά λιγότερο επαρκείς σε σύγκριση με την ομάδα μάρτυρα D, όπου χρησιμοποιήθηκε νευρικό μόσχευμα. Ο αριθμός των μυελινοποιημένων νευραξόνων στην ομάδα C ήταν σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με τις ομάδες A και B ( $4,16 \pm 1,47$  σε σύγκριση με  $6,33 \pm 1,86$  και  $6,16 \pm 1,47$  αντίστοιχα,  $p < 0.05$ ), παρότι δεν ήταν αυτή η περίπτωση όταν υπολογίσθηκε ο μέσος όρος της διαμέτρου των νευραξόνων.

Στην εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διάφορα ποσοτικά ευρήματα ήταν εμφανή. Τρείς εβδομάδες μετά την εγχείρηση η εξέταση των αναγεννημένων νευραξόνων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε την παρουσία ελύτρων μυελίνης με εκτεταμένες περιοχές συνδετικού ιστού μεταξύ των νευραξόνων. Στις επιμήκεις τομές νέοι εμμύελοι άξονες παρατηρούνταν σε όλο το εύρος του αγωγού, παχύτεροι από πριν στο εγγύς τριτημόριο του αγωγού. Στις 6 εβδομάδες τα έλυτρα μυελίνης (**Εικόνα 11a1, 11a2**) φαίνονταν παχύτερα από πριν και υπήρχε μια ξεκάθαρη τάση για μικρο-ινιδοποίηση στις περιοχές μετάπτωσης κατά τις εγκάρσιες τομές η οποία στις 13 εβδομάδες ήταν ακόμα εντονότερη (**Εικόνα 12a**). Μετά 13 εβδομάδες οι νευράξονες παρουσίαζαν πλέον μια νέα δομή που έμοιαζε με το φυσιολογικό νεύρο.

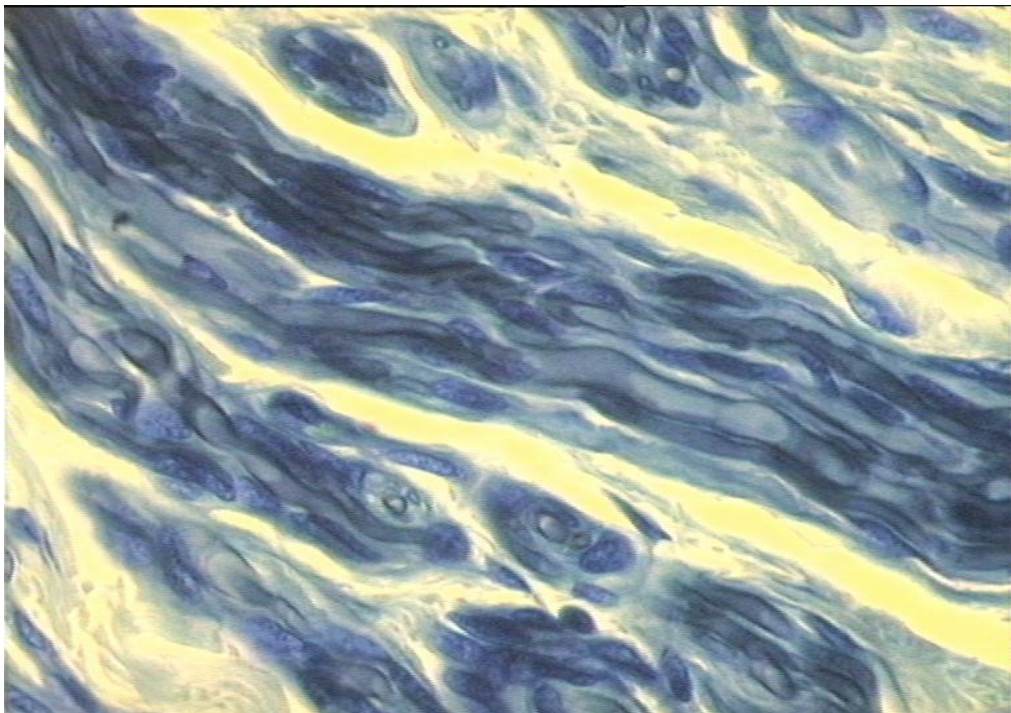
Χρησιμοποιώντας ανοσοιστοχημεία ο χώρος του επινευρικού αγωγού ήταν γεμάτος με ινική και Συνδετικό ιστό σαν μέρος της διεργασίας επανόρθωσης, ενώ η χρώση S100 για τα κύτταρα Schwann ήταν θετική. Οι δεσμίδες Bungner (γραμμώσεις με κύτταρα Schwann) εμφανίστηκαν την τρίτη εβδομάδα κατά μήκος του αγωγού. Η διαφοροποίηση των κυττάρων Schwann προηγήθηκε της ανάπτυξης των νευραξόνων. Τα κεντρικά 2/3 των νεοσχηματιζόμενων δομών έδειξαν χρώση ενδεικτική πρωτεϊνών νευροϊνικής. Τα

κεντρικό 1/3 είχε βαθειά χρώση ενώ το δεύτερο ήταν λιγότερο κεχρωσμένο, παρουσιάζοντας προοδευτική αξονική επέκταση. Στις 6 εβδομάδες ινική και φμπρονεκτίνη εξακολουθούν να είναι παρόντα αλλά η μητρική τους ουσία είναι περιορισμένη. Όλος ο αγωγός είναι κατειλημμένος από κεχρωσμένη πρωτεΐνη neurofilament στις 6 και 13 εβδομάδες. (Εικόνα 13a1,13a2).

Έγιναν επίσης συμπληρωματικές προς το πρωτόκολλο τεχνικές εκτίμησης οπτικής Μικροσκοπίας για ποιοτική εξέταση των φάσεων της αναγέννησης και ελήφθησαν εικόνες, όπως τεχνικές χρώσης με Red Sirius (εικόνα 14a,b,c).

Σε επιμήκεις τομές (25x) φαίνονται τα κύτταρα του Schwann έντονα κεχρωσμένα.

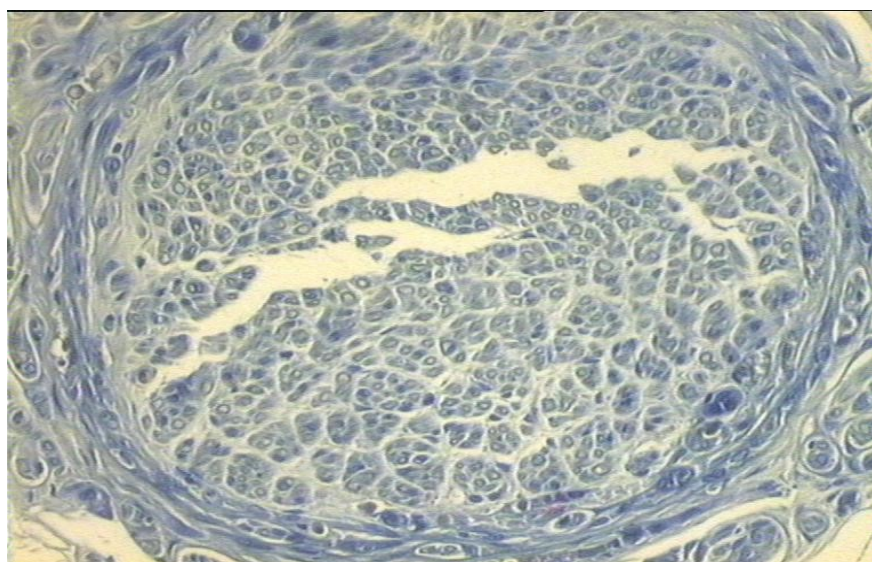
Εικόνα 11a-1. Επιμήκης τομή των εμυέλων ινών στις 6 εβδομάδες. Σταθεροποίηση με οσμικό οξύ και χρώση ελύτρων με toluidine blue (X100).



Εικόνα 11a-2. Επιμήκης τομή των εμυέλων ινών στις 6 εβδομάδες. Σταθεροποίηση με οσμικό οξύ και χρώση ελύτρων με toluidine blue (X400).

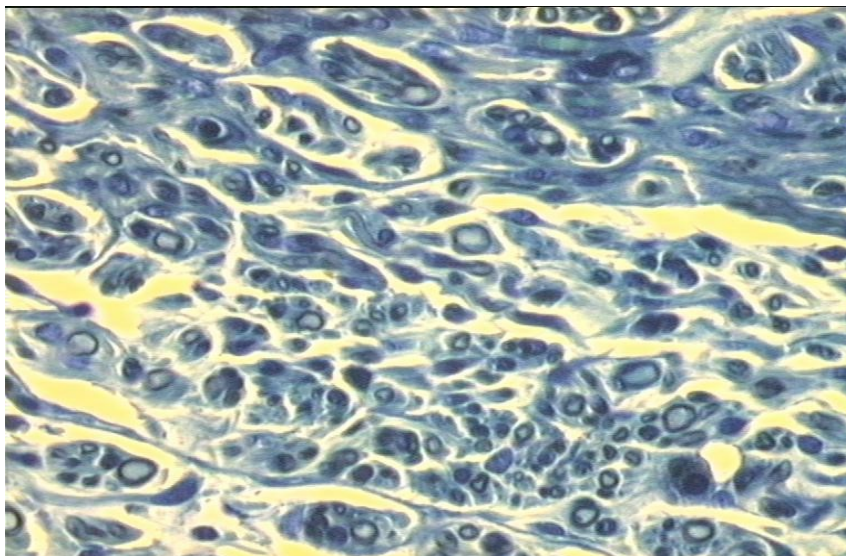


Εικόνα 12a. Εικόνα εγκάρσιας τομής αναγεννημένου νεύρου στα 9 εκ. Στις 13 εβδομάδες. Φαίνονται τα έλυτρα μυελίνης κεχρωσμένα με toluidine blue. Είναι σαφής η τάση για μικροομαδοποίηση των-δεσμίδων των ινών. (X5).

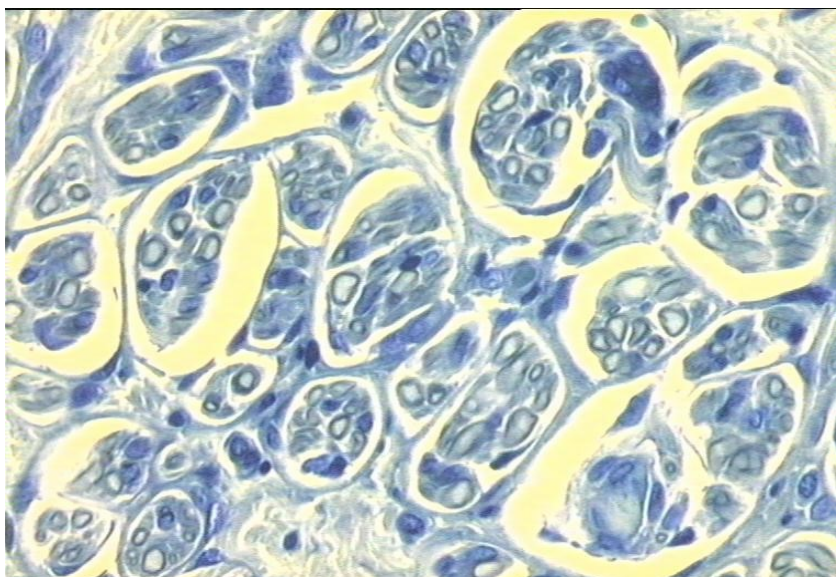




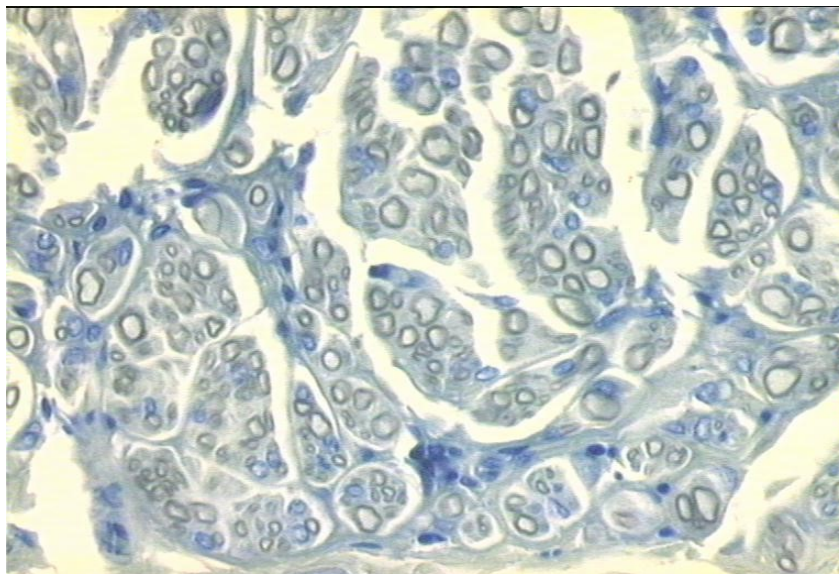
Εικόνα 12b. Κεχρωσμένα έλυτρα μυελίνης με toluidine blue στις 13 εβδομάδες σε εγκάρσια τομή. Διαδικασία μικροομαδοποίησης-δεσμιδοποίησης των ινών. (x10).



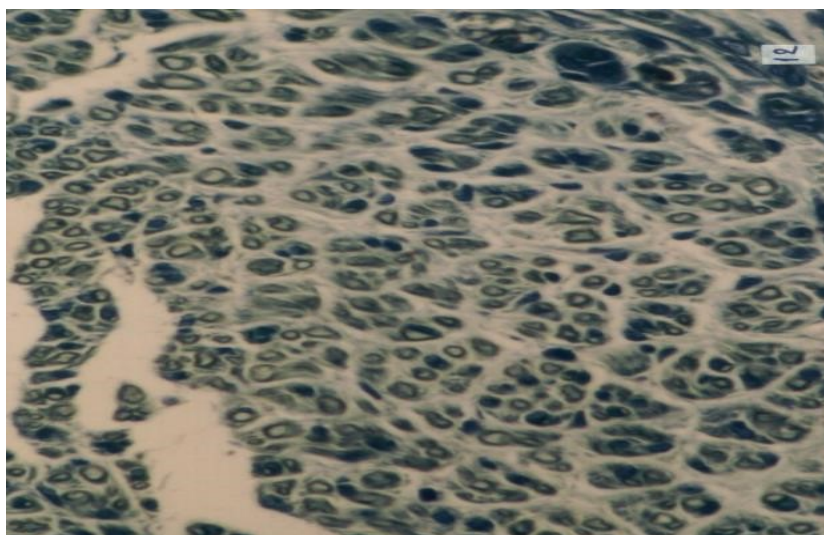
Εικόνα 12c. Εμμέλες ίνες κεχρωσμένες με toluidine blue 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Μικρο-δεσμιδοποίηση των ινών. (x25).



Εικόνα 12d. Εμμέλες ίνες κεχρωσμένες με toluidine blue 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Μικρο-δεσμιδοποίηση των ινών. (x40).

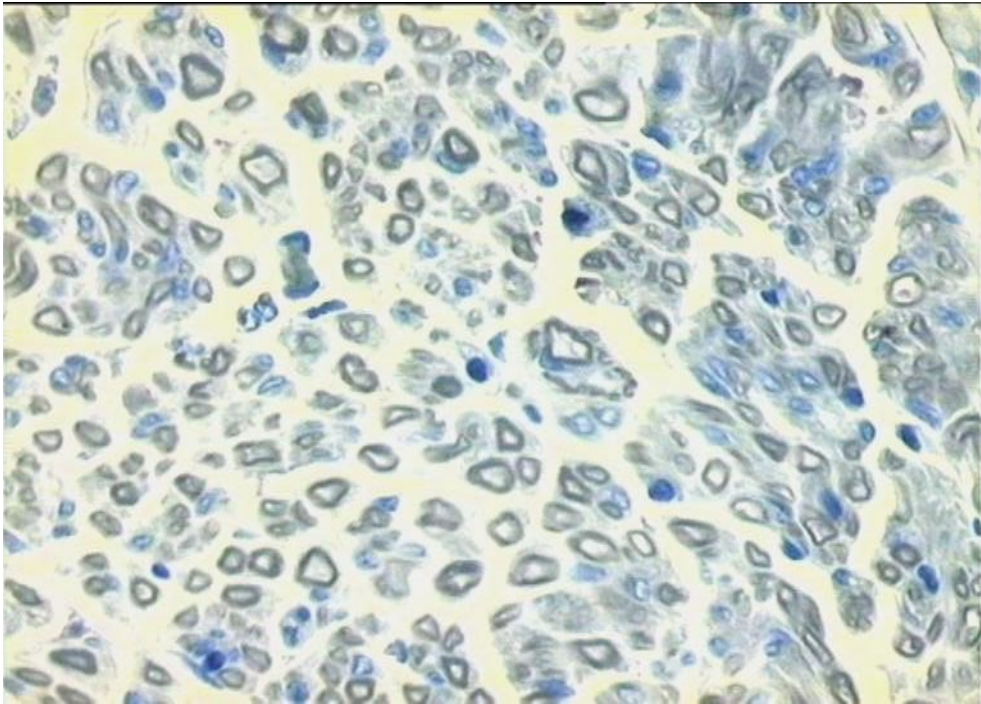


Εικόνες 12e. Εμμέλες ίνες κεχρωσμένες με toluidine blue 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Μικρο-δεσμιδοποίηση των ινών (x100).

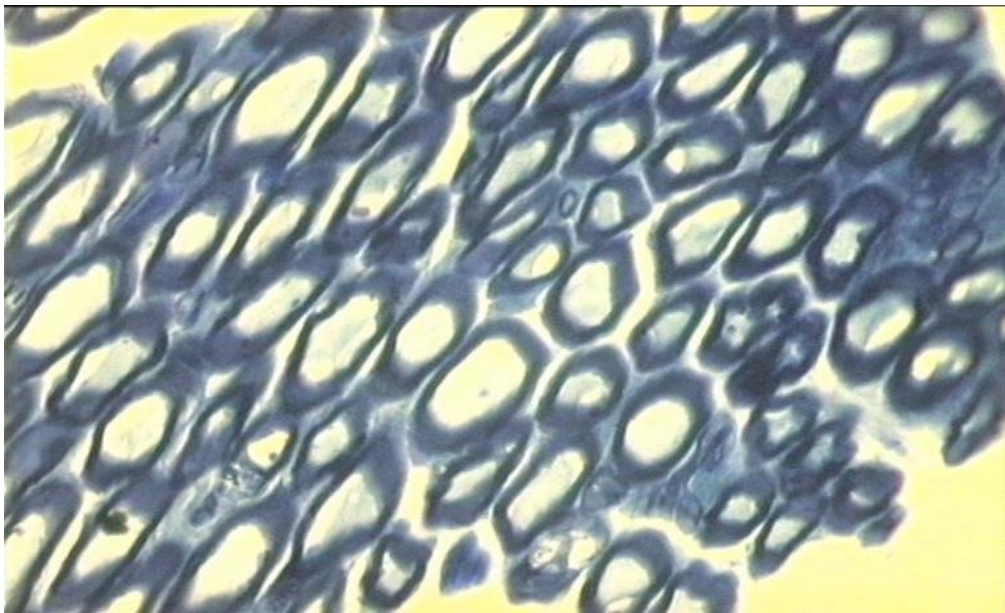




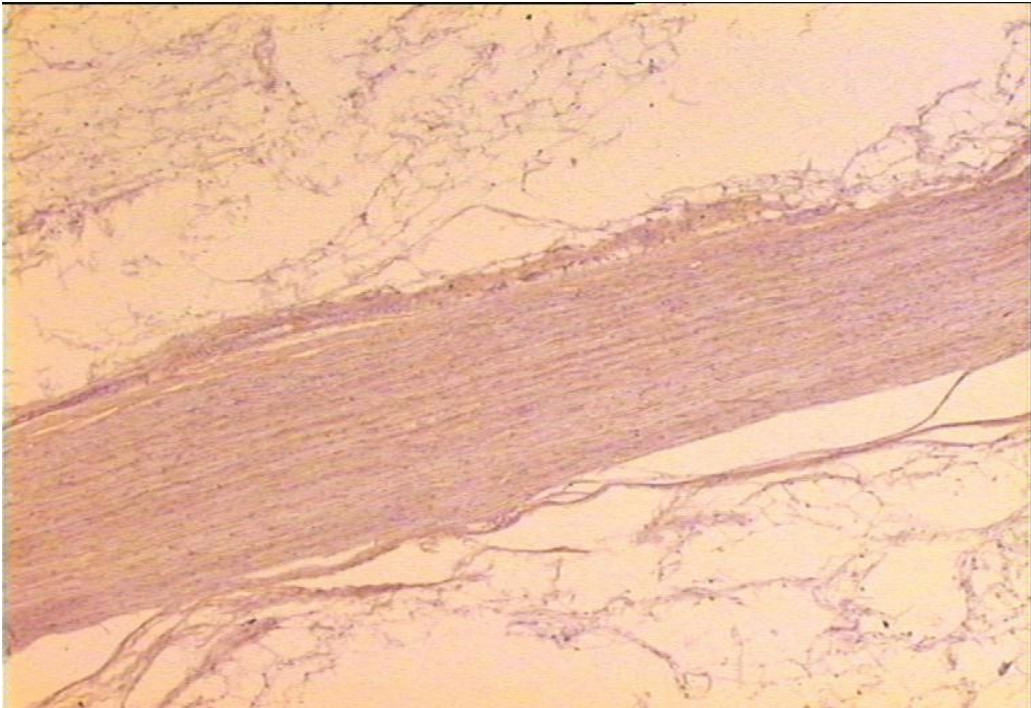
Εικόνα 12f. Εμύελες ίνες κεχρωσμένες με toluidine blue 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Μικρο-δεσμιδοποίηση των ινών (x400).



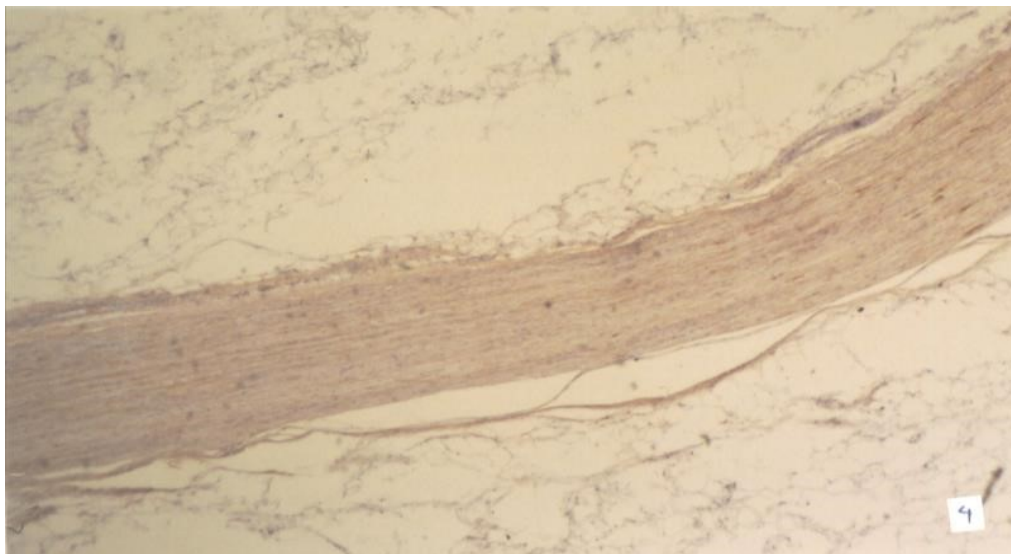
Εικόνα 12g. Σειρά μάρτυρας. Εμύελες ίνες κεχρωσμένες με toluidine blue 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά(x400).



**Εικόνα 13a-1. Επιμήκης τομή. Όλος ο επινευτικός αγωγός ελέγχεται πλήρης κεχρωσμένων νευρονηματίων με neurofilament antibodies (DAKO) στις 13 εβδομάδες (x10).**

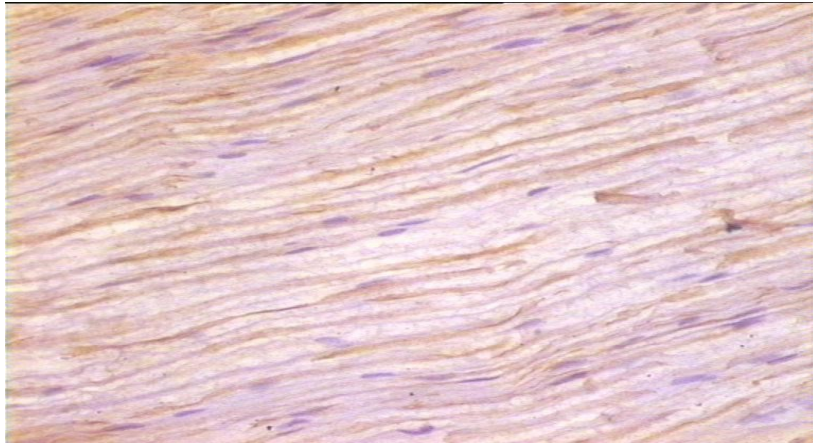


**Εικόνα 13a-2. Επιμήκης τομή. Κεχρωσμένη πρωτεΐνη νευρονηματίων με neurofilament antibodies (DAKO) στις 13 εβδομάδες (x5).**

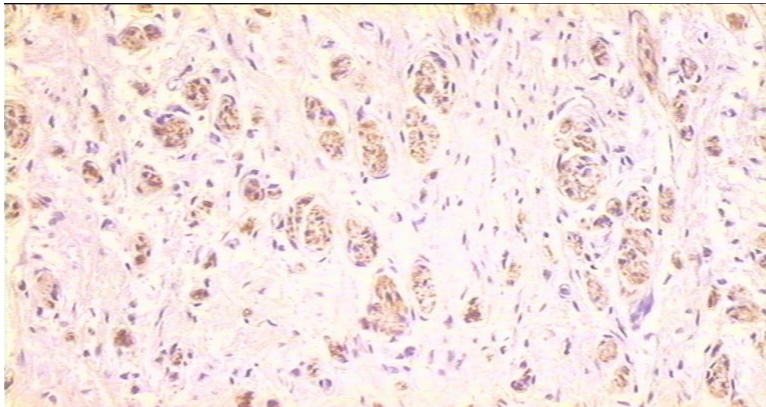




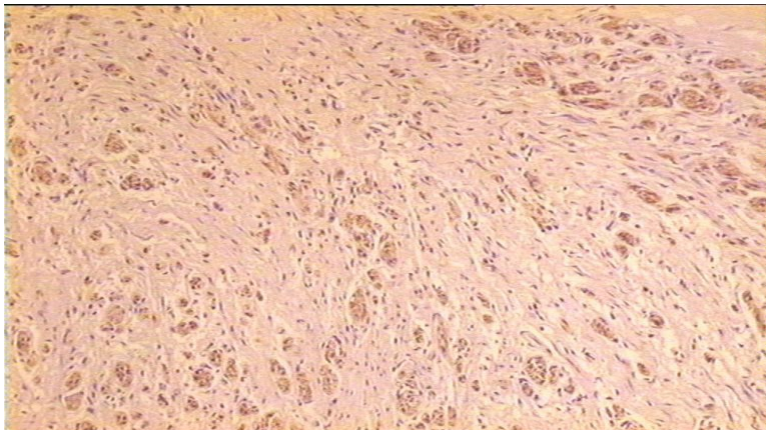
**Εικόνα 13a-3. Επιμήκης τομή. Κεχρωσμένα νευρονημάτια με neurofilament protein (DAKO) στις 13 εβδομάδες (x 25).**



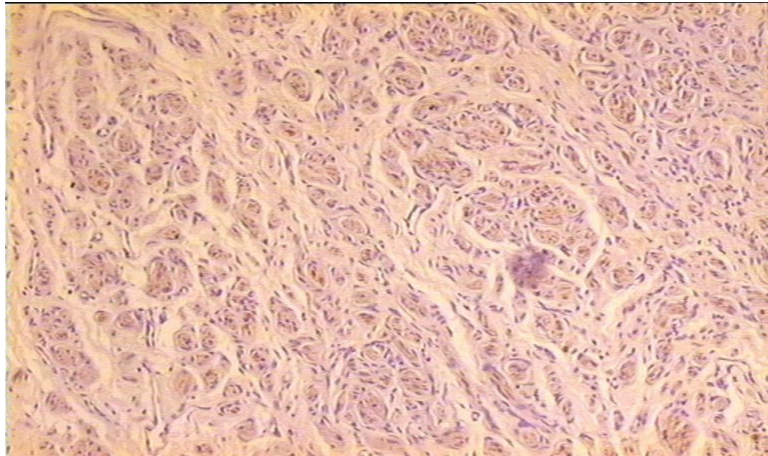
**Εικόνα 13b-1. Εγκάρσια τομή στα 9mm: Κεχρωσμένα νευρονημάτια με αντισώματα για neurofilaments (DAKO) at 3 weeks, (x25).**



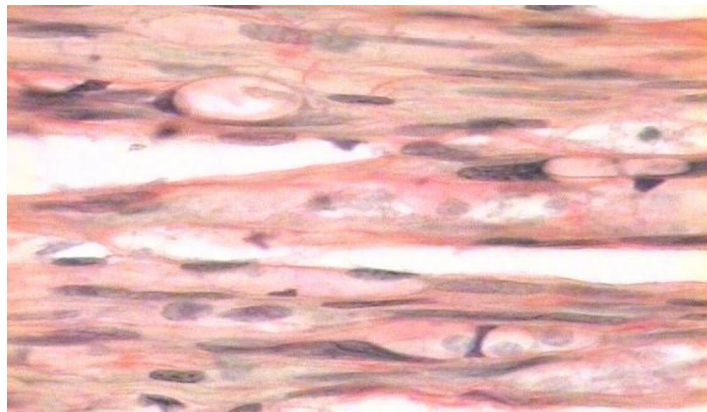
**Εικόνα 13b-2. Εγκάρσια τομή στα 9mm: Κεχρωσμένα νευρονημάτια με αντισώματα για neurofilaments (DAKO) at 3 weeks, (x25).**



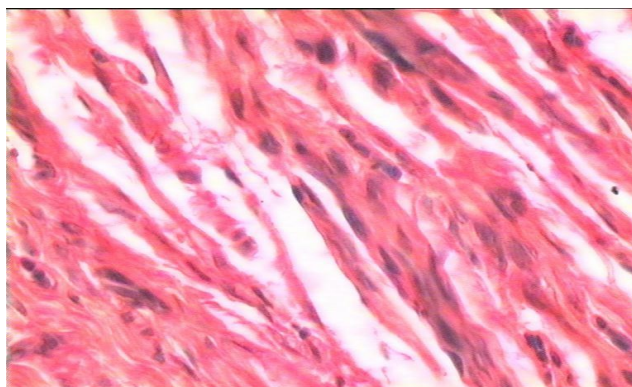
**Εικόνα 13b-3. Εγκάρσια τομή στα 6mm: Κεχρωσμένα νευρονημάτια με αντισώματα για neurofilaments (DAKO) at 3 weeks, (x25).**



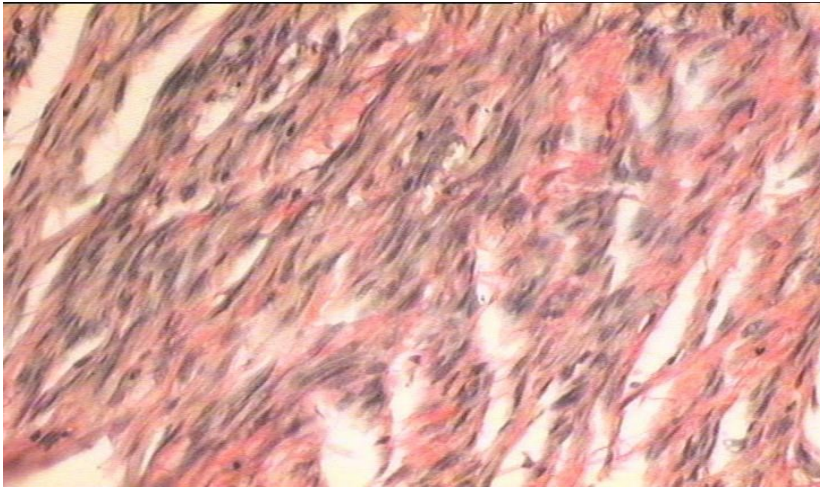
**Εικόνα 14a: Εναλλακτική τεχνική χρώσης με Red Sirius, Επιμήκης τεχνική (25x)  
Κεχρωσμένα κύτταρα Schwann.**



**Εικόνα 14b: Τεχνική χρώση Red Sirius, Τα κύτταρα Schwann έντονα κεχρωσμένα. 6 εβδομάδες, επιμήκεις τομές (10 x)**



**Εικόνα 14c: Τεχνική χρώση Red Sirius, Τα κύτταρα Schwann έντονα κεχρωσμένα. 6 εβδομάδες, επιμήκεις τομές (5 x)**



**ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ – ΜΕΤΡΗΣΗ  
ΑΡΙΘΜΟΥ**

**ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΑΝΑ  $\mu\text{m}^2$  ΚΑΙ ΜΕΣΗΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΕΜΜΥΕΛΟΥ ΑΞΟΝΑ**

**ΕΝΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΠ΄ ΤΗ ΠΡΩΤΗ ΟΜΑΔΑ ΚΟΝΙΚΩΝ ΣΤΟ**

**ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΜΕ ΕΙΔΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:**

Histology Laboratory

Date of  
Analysis: 2/5/2010

Biopsies

**Fibre  
Measurements:**

Number of Fibres:	<b>130</b>	( $\pm$ STD)
Area ( $\mu\text{m}^2$ ):	<b>26,90</b>	10,25
Ext. Diameter ( $\mu\text{m}$ ):	<b>5,53</b>	1,15
Perimeter ( $\mu\text{m}$ ):	<b>19,90</b>	4,23
Roundness:	<b>2,02</b>	0,38
<b>G-Ratio:</b>	<b>0,36</b>	0,17

Transversional Sections

Measurement Area: **14140** ( $\mu\text{m}^2$ )  
Fibres Found in 1  
( $\text{mm}^2$ ): **9**

**Myelin  
Measurements:**

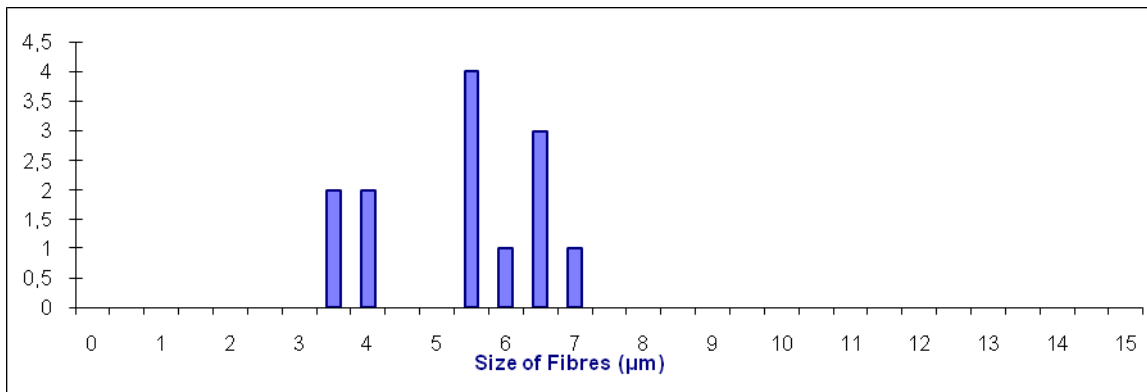
Area ( $\mu\text{m}^2$ ):	<b>15,92</b>	4,74
<b>Average Thickness</b> :	<b>2,14</b>	1,19

Specimen Number

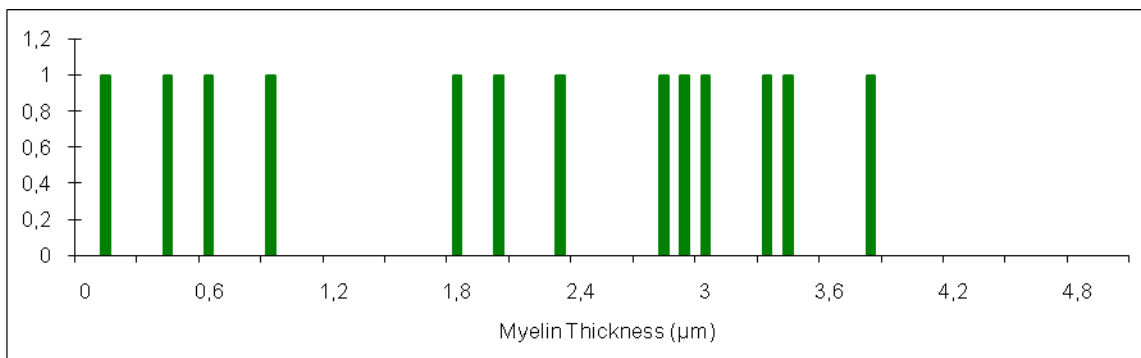
**Axon  
Measurements:**

Area ( $\mu\text{m}^2$ ):	<b>10,97</b>	7,11
Average Diameter ( $\mu\text{m}$ ):	<b>3,39</b>	0,63

### Fibres Size Histogram

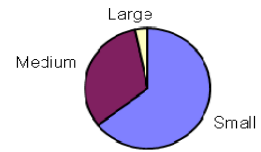


### Myelin Thickness Histogram



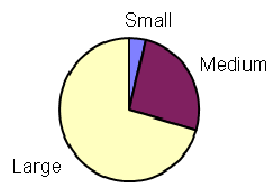


### Fibres Size Classification:



Fibres Division Number Percent

Small	0-6 $\mu\text{m}$	<b>80</b>	<b>61,54%</b>
Medium	6-9 $\mu\text{m}$	<b>40</b>	<b>30,77%</b>
Large	>9 $\mu\text{m}$	<b>4</b>	<b>3,08%</b>



**ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΟΠΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ**

**1, ΟΜΑΔΕΣ ΕΠΙΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΡΗΜΝΩΝ Α,Β,Σ ΚΑΙ ΤΟ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ**

**1.Α. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ**

**NUMBER OF MYELINATED AXONS/mm<sup>2</sup>**

Sample	Normal groupA		Normal groupB		Normal groupC	
1	12	9	11	8	12	5
2	11	8	10	7	10	2
3	13	5	12	6	12	4
4	12	6	14	4	11	6
5	11	4	11	5	10	3
6	10	6	12	7	11	5
<b>Mean</b>	<b><u>11,5</u></b>	<b><u>6,33</u></b>	<b><u>11,66</u></b>	<b><u>6,16</u></b>	<b><u>11</u></b>	<b><u>4,8</u></b>

result group/normal	<b><u>0,55</u></b>	<b><u>0,53</u></b>	<b><u>0,43</u></b>
---------------------	--------------------	--------------------	--------------------

GR/control I=	<b>0, 81(81%)</b>	<b>0, 78(78%)</b>	<b>0, 63(63%)</b>
---------------	-------------------	-------------------	-------------------

**1.B. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΣΗΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΝΕΟ-ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ ΜΕΑΝ  
AXONAL DIAMETER (μm)**

Sample	Normal	groupA	Normal	groupB	Normal	groupC
1	7,4	3,39	5,95	3,81	7,3	3,51
2	6,46	3,34	7,5	3,56	7,1	2,81
3	7,25	3,29	7,25	2,85	6,68	2,66
4	6	3,15	6,98	3,67	6,9	3,7
5	7,1	3,89	7	3,34	5,95	3
6	4,98	3,14	6,8	2,99	7,8	3,1
<b><u>Mean</u></b>	<b><u>6,53</u></b>	<b><u>3,89</u></b>	<b><u>6,9</u></b>	<b><u>3,37</u></b>	<b><u>6,94</u></b>	<b><u>3,13</u></b>

result gr/normal	<b><u>0,59</u></b>	<b><u>0,49</u></b>	<b><u>0,45</u></b>
GR/control I=	<b>0,79(79%)</b>	<b>0,69(69%)</b>	<b>0,63(63%)</b>



## 2. ΟΜΑΔΑ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ (ΣΕΙΡΑ ΜΑΡΤΥΡΑΣ -D)

### 2.A. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ

#### NUMBER OF MYELINATED AXONS/mm<sup>2</sup>

Sample	NORMAL	OPERAT
1	12	10
2	10	9
3	11	6
4	12	6
5	10	7
6	9	6
mean	<b>10,66</b>	<b>7,33</b>

Result oper/normal = **0,68** or **68% of the normal one**

### 2.B. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΣΗΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΝΕΟ-

#### ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ MEAN AXONAL DIAMETER(μm)

Sample	NORMAL	OPERAT
1	8,4	4,6
2	7,36	3,8
3	6,25	4,75
4	7	4,6
5	6,9	6
6	5,5	5,7
mean	<b>6,9</b>	<b>4,9</b>

Result oper/norm = **0,71** or **71% of the normal**

## ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΠΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

### 3α. ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΠΑΡΑΣΤΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗ

1.RESULTS:		<u>NUMBER OF MYELINATED AXONS/mm<sup>2</sup></u>			
CONTROL GROUP=	NERVE GRAFTS=	67,00%	OF THE NORMAL CONTRAL NERVE		
GROUPA(ADVANCEMENT)=		55,00%	OF THE NORMAL NERVE	=	81%OF THE CONTROL VALUE (GRAFTED NERVE)
GROUPB (REVERSED PROX.) =		53%	OF THE NORMAL NERVE	=	78%OF THE CONTROL VALUES
GROUPC (REVERSED DIST) =		43,00%	OF THE NORMAL NERVE	=	63% OF THE CONTROL RESULTS

2.RESULTS:		<u>MEAN AXONAL DIAMETER(μm)</u>			
CONTROL GROUP=	GRAFTS=	71,00%	OF THE NORMEL CONTRAL NERVE		
GROUPA(ADVANCEMENT)=		58,67%	OF THE NORMAL NERVE	=	79%OF THE CONTROL VALUE (GRAFTED NERVE)
GROUPB (REVERSED PROX.) = 58,65%		49,3%	OF THE NORMAL NERVE	=	69%OF THE CONTROL VALUES
GROUPC (REVERSED DIST) =		43,43%	OF THE NORMAL NERVE	=	63% OF THE CONTROL RESULTS

## 3β. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ- t-TEST

Table 1. Quantitative Histomorphometry Results

	Group A		Group B		Group C		Group D	
	Normal	advancement	Normal	reversed distally	reversed proximally	Normal	control group	
Mean axonal diameter (μm) (mean ± SD)	6.53 ± 0.92	3.36 ± 0.27 <sup>a,b</sup>	6.9 ± 0.53	3.37 ± 0.38 <sup>a,b</sup>	3.13 ± 0.4 <sup>a,b</sup>	6.72 ± 0.74	4.53 ± 0.97 <sup>b</sup>	
Number of myelinated axons/mm <sup>2</sup> (mean ± SD)	11.5 ± 1.05	6.33 ± 1.86 <sup>a,b</sup>	11.66 ± 1.36	6.16 ± 1.47 <sup>a,b</sup>	4.16 ± 1.47 <sup>a,b</sup>	11.58 ± 1.16	7.66 ± 1.07 <sup>b</sup>	

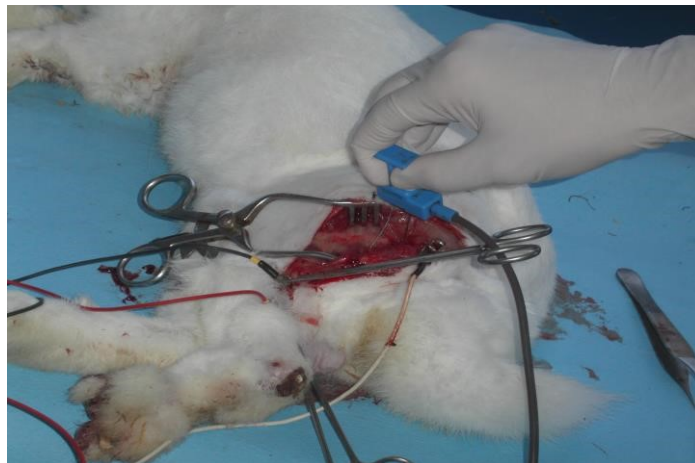
<sup>a</sup>Statistically significant difference compared with the control group D.

<sup>b</sup>Statistically significant difference compared with the normal, contralateral sciatic nerve.

**Εικ 15a.** Η εκτίμηση της μυικής συσταλτικότητας στο αποκαλυμμένο Ισχιακό νεύρο με Grass Stimulator πρό της θυσίας.



**Εικ 15b.** Η τομή που αποκαλύπτει το ισχιακό νεύρο, ενώ έχουν τοποθετηθεί τα ηλεκτρόδια..



**Fig 15c.** Το ειδικό ηλεκτρόδιο για μικρά ζώα που ομοιάζει με παιδιατρικό.



**ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΥΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑΣ(ΗΜΓ) (εικ.15a-c):****Παράμετροι που μετρήθηκαν και αποτελέσματα:**

Μέτρηση της παραμέτρου “LATENCY”(=λανθάνουσα περίοδος μεταξύ ερεθίσματος και αποτελέσματος) και της παραμέτρου AMPLITUDE (=εύρος έντασης) του Ισχιακού νεύρου με λήψη κινητικής απόκρισης του γαστροκνημίου μυός του κονόκλου.

**Θεωρητικά:** Για την ακριβή μέτρηση της λειτουργικότητας ενός κινητικού νεύρου χρησιμοποιούνται 3 ή 4 παράμετροι:

- **distal Latency (Λανθάνουσα παρεμβαλλόμενη περίοδος απόκρισης)**
- **Amplitude (εύρος έντασης κινητικής απόκρισης)**
- **Area of the motor response (περιοχή κινητικής απόκρισης)**
- **Velocity of the de motor conduction (ταχύτης μετάδοσης κινητικού ερεθίσματος)**

**Latency:**

**Latency:** Έτσι ορίζεται ο χρόνος μετάδοσης απ’ την αρχή του ερεθίσματος μέχρι την παραγωγή της αρχικής απάντησης. Μετρώνται σε χιλιοστά δευτερολέπτου (milliseconds).

Γιά την εκτίμηση του Latency πρέπει να εκτιμηθεί απόσταση μεταξύ του σημείου άσκησης του ερεθίσματος και του ενεργού ηλεκτροδίου λήψης τοποθετημένου στη μυϊκή γαστέρα.

Latency ορίζεται ο χρόνος μετάδοσης απ' την απαρχή του ερεθίσματος έως την αρχή της πρώτης καμπύλης της κινητικής απόκρισης (καλούμενης επίσης ως σύνθετου κινητικού δυναμικού ενέργειας) (compound motor action potential, CMAP).

#### **Amplitude (Εύρος έντασης κινητικής απόκρισης)**

Η παράμετρος “Amplitude of motor response” (CMAP) (=Το εύρος της έντασης της κινητικής απόκρισης) μετράται από κορυφή σε κορυφή. Η Amplitude είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό ιών που απαντούν στον ερεθισμό του κινητικού νευρώνα.

Το ερέθισμα που προκαλέσαμε είναι ορθογώνιο ερέθισμα με 1 Hz συχνότητα και με διάρκεια περί τα 200 microsecond.

#### **Area (περιοχή κινητικής απόκρισης)**

Η παράμετρος Area (περιοχή κινητικής απόκρισης) αντιπροσωπεύει το συνδυασμό της “amplitude” και της διάρκειας της κινητικής απάντησης και στην ουσία είναι το άθροισμα του αριθμού των ενεργοποιηθέντων μυϊκών ιών από τον ερεθισμό του ισχιακού νεύρου.

Η μέτρηση της “area” αναπαριστά με ακρίβεια περισσότερο τον αριθμό των ενεργοποιηθέντων μυϊκών ιών απ' το ερεθισθέν νεύρο απ' ότι η παράμετρος amplitude.

**Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα μέτρησης μυϊκής συσταλτικότητας παρατέθηκαν σε πίνακες στις σελίδες 105-108.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΜΥΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑΣ  
ΠΑΡΑΣΤΑΤΙΚΗ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (AMPLITUDE ΣΕ mv)**

GASTROCNEMIUS MUSCLE ISOMETRICAL CONTRACTILITY FORCE MEASUREMENT

CONTROL GROUP			(D)	GROUP A		
Operated	Normal	oper/norm		Operated	Normal	Oper/norm
10,98	12,1	90,74		25,5	30	85
5,1	19,1	26,7		26	33	78,78
5,6	11,4	49,12		18	34	52,94
18,2	20,8	87,5		16	30,6	53,15
11,4	12,4	91,94		29,4	106	27,73
3,7	8,8	42,07		3,8	5,9	64,4
mean		<b><u>64,67</u></b>				<b><u>60,33</u></b>

flap/Control=

60,33/64,67=0,93 or 93% Of normal

GROUP C			GROUP B		
Operated	Normal	Oper/norm	Operated	Normal	Oper/norm
2,9	6,1	47,54	4,9	5,85	83,76
0,44	5,1	8,67	5,8	6,1	95,08
2,4	12,2	19,67	3,8	5,9	64,4
3,25	6,3	51,58	1,4	18,8	7,44
2,3	2,4	95,83	3,3	14,2	23,23
3,4	11,6	29,31	3,9	5	78
		<b><u>42,1</u></b>			<b><u>58,65</u></b>

Flap/contr

**GROUP C=0,65 or  
65% of the normal**

**Group B =0,90 or  
90%of the normal**

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ

**ΗΛΕΚΤΡΟΝΕΥΡΟΓΡΑΦΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΤΟ ΤΕΛΕΥΤΑΙΟ GROUP 6  
ΚΟΝΙΚΛΩΝ ΚΑΘΕ ΣΕΙΡΑΣ ΠΡΟ ΘΥΣΙΑΣ - ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑΣ  
ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ ΔΙ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ ΙΣΧΙΑΚΟΥ Ν.**

**4.A. ΣΕΙΡΑ Α' ΕΠΙΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΡΗΜΝΩΝ(Πίναξ αποτελεσμάτων).**

Number of <i>Rabits</i>	Normal Gastrocnemius			Operated nerve Gastrocnemius		
	Latency msec	Amplitude Mv	perc%=100	Latency msec	Amplitude mV	perc% compar to normal
<b>1</b>	15ms	<b>30</b>		28 msec	25,5mV	85
<b>2</b>	13 ms	<b>33mV</b>		20 msec	26	78,78
<b>3</b>	17 msec	<b>34 Mv</b>		36	18	52,94
<b>4</b>	11	<b>30,1</b>		24,9	16	53,15
<b>5</b>	14,4	<b>106</b>		25	29,4	27,73
<b>6</b>	14	<b>5,9</b>		14	3,8	<b>64,4</b>

363

$$363: 6 = \mathbf{60,33\%}$$

**60,33 % of the normal MUSCLE** or = **93% of the control group aver.value**



**4.Β.ΣΕΙΡΑ Β' ΕΠΙΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΡΗΜΝΩΝ ΑΠ ΤΟ ΕΓΓΥΣ ΚΟΛΟΒΩΜΑ (Πίναξ).**

Number of Rabbits	Normal Gastrocnemius			Gastrocnemius –Operated nerve		
	Latency Msec	Amplitude mV	Perc%=100	Latency msec	Amplitude MV	Perc% compare the to normal
(24)	1,04ms	5,85	100	1,2 msec	4,9mV	83,76
(29)	0,68 ms	6,1 mV	100	1,0 msec	5,8 mV	95,08
(39)	1,4 msec	5,9 Mv	100	1,4	3,8	64,4
( 33)	1,2	10,0	100	1,3	3,6	7,44
( 38)	1,0	14,2	100	1,2	3,3	23,23
(40)	1,3	5,0	100	1,35	3,9	78

351,9

351,9 :6= 58.65%

=58.65% of the normal (contralat.)muscle or 90% of the control group mean value

**4.C. ΣΕΙΡΑ Γ' ΕΠΙΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΡΗΜΝΩΝ (Πίναξ αποτελεσμάτων).**

E.M.G. RESULTS FOR REVERSED EPINEURAL FLAP HARVESTED FROM THE DISTAL PART. 05-02-2002 Gastrocnemius muscle

Number of Rabbits	Normal Gastrocnemius			Operated nerve Gastrocnemius		
	Latency Msec	AmplitudemV	Perc%=100	Latency msec	Amplitude MV	Perc%compar To the normal
8	ms	6,1 mv	100	Msec	2,9mV	47,54
12	ms	5,1mV	100	Msec	0,44mV	8,67
9	msec	12,2mv	100		2,4	19,67
10		6,3	100		3,25	51,58
2		2,4	100		2,3	95,83
6		11,6	100		3,4	29,31

252,6

$$252,6 : 6 = \underline{42,1\%}$$

Gastrocnemius mean amplitude

=the 42,1% of the normal (contralat.) muscle contractility

Or =65% of the control group mean value

**4.D. ΣΕΙΡΑ ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ( Πίναξ αποτελεσμάτων).**

E.M.G. RESULTS FOR NERVE GRAFT INTERPOZITION GROUP(CONTROL GROUP)FOR COMPARISON 25-11-2001

Number of Rabbits	Normal Gastrocnemius			Gastrocnemius – Operated nerve		
	Latency msec	Amplitude mV	Perc%= 100	Latency msec	Amplitude MV	Perc%compared to the normal
1	ms	12,1 mv	100	msec	10,98 mV	90,74
2	ms	19,1 mV	100	msec	5,1 mV	26,7
3	msec	11,4 mv	100		5,6	49,12
4		20,8	100		18,2	87,5
5		12,4	100		11,4	91,94
6		8,8	100		3,7	42,04

388,04: 6 = **64,67%**

**Gastrocnemius muscle Amplitude = 64,67% of the normal (Contralateral) muscle (ΟΡΙΖΕΤΑΙ ΠΡΟΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΩΣ 100% ΟΝΤΑΣ Η ΟΜΑΣ ΜΑΡΤΥΡ)**

**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ «t-test».****Εύρος κινητικής απόκρισης (Amplitude): μέτρηση σε mV (πίνακες σελ. 114-118).**

Το εύρος σύσπασης του γαστροκνημίου μυός κυμαίνεται μεταξύ 5,3±1,2mV και 21,8±3,9mV. Το μέσο εύρος της κινητικής απάντησης (μικτά κινητικά δυναμικά, CMAP) του γαστροκνημίου μυός στη χειρουργημένη σε σύγκριση με το αντίπλευρο φυσιολογικό μέλος 13 εβδομάδες μετά το χειρουργείο (εκφρασμένο ως ποσοστό, P-λόγος) ήταν 60.33%±4.25 στην πρώτη ομάδα (A)(προώθηση επινευρίου απ' το κεντρικό) 42.1%±7.33 στην ομάδα B (απ' το κεντρικό τμήμα προς άπω ανεστραμμένο επινεύριο), 58.7%±5.66 στην ομάδα C (από το άπω τμήμα προς τα κεντρικά ανεστραμμένο επινεύριο) και 64.67%±6.41 στην ομάδα D (ομάδα μάρτυρας, νευρικό μόσχευμα). Σε t-test ανάλυση

Ομάδα A: SD= 17,1

Ομάδα B: SD= 32,5

Ομάδα C: SD= 28,25

Ομάδα D (ομάδα μάρτυρας): SD=26,26

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων A,C και D αλλά μόνο μεταξύ αυτών των ομάδων και της ομάδας B( $p>0,05$ ).

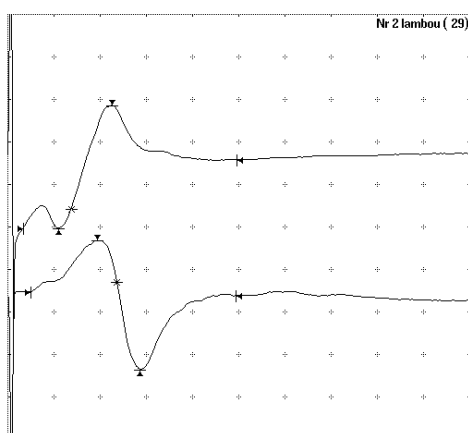
## Παραδείγματα αποτελεσμάτων μετρήσεων

Report model example.

Name: Nr 2 FLAP (28)

Date of birth:                      Category:

Height:                      Weight:                      Sex:



**Sciatic motor distal latency**  
**Gastrocnemian                      Motor NCV**

**07.30.2001**

Sens.:            2mV            HighFi.:            20Hz            LowFi.:            10KHz  
Sweep:           2ms            Trigger:           Internal           Delay:            0

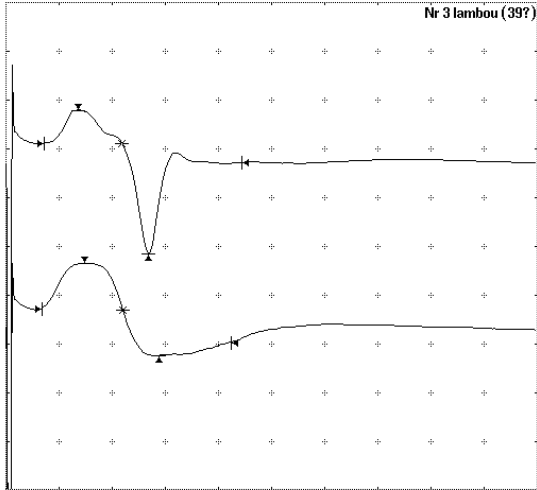
Current            Amplitude:            0.0mA            Frequency:           1.00s            Length:  
100us

	<b>Distal Lat.</b>	<b>Amplitude</b>	<b>Area</b>	<b>Segment</b>	<b>D-Lat</b>	<b>Distance</b>
	<b>Velocity</b>					
Gastrocnemian	(ms)		N-P(mV)		(mVms)	
	(ms)		(mm)		(m/s)	
Operated	<b>0.68</b>		<b>5.8</b>		<b>27.9</b>	
Normal	<b>1.0</b>		<b>6.1</b>		<b>11.7</b>	

Report model example. Name:Nr 3 flap (39).

Date of birth: Category:

Height: Weight: Sex:



**Sciatic motor distal latency** **07.30.2001**  
**Not defined L** **Motor NCV**

Sens.: 2mV HighFi.: 20Hz LowFi.: 10KHz  
 Sweep: 2ms Trigger: Internal Delay: 0

Current 100us Amplitude: 0.0mA Frequency: 1.00s Length:

	<b>Distal Lat.</b>	<b>Amplitude</b>	<b>Area</b>	<b>Segment</b>	<b>D-Lat</b>	<b>Distance</b>
	Velocity					
Gastrocnemian	(ms) (m/s)	N-P(mV)	(mVms)		(ms)	(mm)
<b>Normal</b>	<b>1.4</b>	<b>5.9</b>	<b>8.0</b>			
Operated	1.4	3.8	10.7			Operated-
Normal	-0.20					

**Παραδείγματα αποτελεσμάτων μετρήσεων**

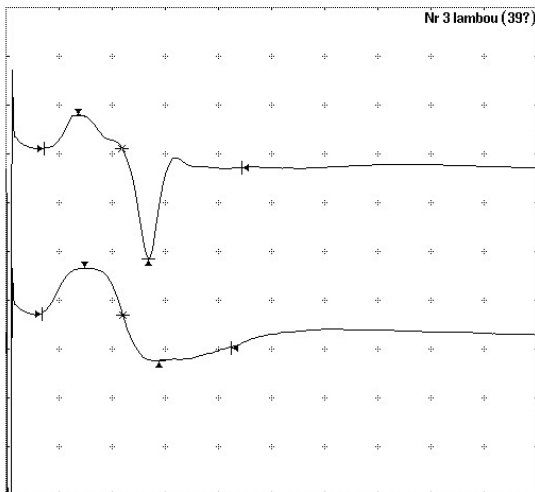
Report model example.

Name: Nr 2 FLAP (28)

Date of birth:

Category:

Height:            Weight:            Sex:



**Sciatic motor distal latency 07.30.2001 Not defined L**

**Motor NCV**

Sens.:            2mV            HighFi.:            20Hz            LowFi.:            10KHz  
 Sweep: 2ms  
 Trigger:            Internal            Delay:            0  
 Current            Amplitude:            0.0mA Frequency: 1.00s Length:  
 100us

**Distal Lat. Amplitude Area**

Segment	D-Lat Distance	Velocity	
Gastrocnemian	(ms)	N-P(mV) (mVms)	(ms)
(mm)	(m/s)		
<b>Normal</b>	<b>1.4</b>	<b>5.9</b>	<b>8.0</b>
<b>Operated</b>	<b>1.4</b>	<b>3.8</b>	<b>10.7</b>

**Operated-Normal 0.20**





#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ: (Συγκρίσεις, Μειονεκτήματα μεθόδου, προοπτικές βελτίωσης και κλινικής εφαρμογή - Σύγκριση με άλλες παρόμοιες μελέτες).**

Την τελευταία εικοσαετία οι αρχές της επιδιόρθωσης νευρικής βλάβης έχουν αποσαφηνιστεί πλέον καταλυτικά, βασισμένες σε μια πληρέστερη κατανόηση της βιολογίας των νεύρων<sup>1-3,18</sup>

Στή παραπάνω πρόδοτης πειραματικής πρακτικής αλλά και στη κλινική εφαρμογή συνετέλεσε η εξέλιξη των χειρουργικών μικροσκοπίων, των εργαλείων αλλά και των νέων τεχνικών νευρορραφών.

Αλλά και αντίστροφα και αυτή καθαυτή η βελτίωση των εργαλείων και των τεχνικών επιδιόρθωσης νευρικών ελλειμμάτων ήταν το αποτέλεσμα καλύτερης κατανόησης της βασικής βιολογίας των περιφερικών νεύρων και σχετίζεται με εκτεταμένες έρευνες των βασικών επιστημών.

Με την πρόοδο στην κατανόηση σε βάθος του πεδίου της κάκωσης και αναγέννησης των περιφερικών νεύρων απέκτησε ενδιαφέρον η χρήση των «αγωγών νευρικής αναγέννησης».

Οι εν λόγω αγωγοί διευκολύνουν την αναγέννηση των νευρικών ινών και αναπαριστούν την τεχνική της καθοδηγούμενης αναγέννησης των ιστών. Ένας τέτοιος αυτόλογος αγωγός είναι και το επινεύριο.

Η ανατομία και ο φυσιολογικός ρόλος του επινευρίου καθώς και η ανησυχία για ενδεχόμενη βλάβη του νεύρου σε περίπτωση παρασκευής του επινευρίου έχουν περιγραφεί στην εισαγωγή<sup>1-3,18</sup>. Η παρασκευή του επινευρίου φαίνεται ότι τελικά δεν παρακωλύει καταλυτικά (μόνιμα) τη νευρική λειτουργία. Η αγγειακή παροχή των περιφερικών

νεύρων αποτελείται από ένα εξωγενές και ένα ενδογενές αγγειακό σύστημα. Εκτός της εξωγενούς αγγείωσης, επιμήκως προσανατολισμένα αγγεία από το εσωτερικό επινεύριο επαναγγειώνουν το νεύρο, ενώ αγγεία από τους περιβάλλοντες ιστούς συμβάλλουν στην αιματική παροχή. Μετά τη παρασκευή και ανασήκωση του επινευρίου από το έσω επινευρικό πλέγμα αναπτύσσονται ταχέως αγγεία τα οποία και φέρονται μεταξύ των νευρικών ινών και εξικνούνται στο εξωτερικό επινεύριο το οποίο επανασηματίζεται.

Το μοντέλο του κονίκλου αναπτύχθηκε ως κατάλληλο και εύχρηστο για την εκτίμηση της νευρικής αναγέννησης μέσω ενός επινευρικού κρημονού αγωγού, ενώ το ισχιακό του νεύρο επιλέχθηκε ως ιστός συγκρίσιμος δομικά και ως μέγεθος περίπου με το μέσο νεύρο του ανθρώπου. Βεβαίως ο ρυθμός αναγέννησης είναι ταχύτερος στο κόνικλο. Σε σύγκριση με το επινεύριο του ισχιακού νεύρου του επίμυος, είναι σαφές ότι το αντίστοιχο μοντέλο του κονίκλου υπερέχει σε ποιότητα και σε δυνατότητα παρασκευής και δημιουργίας του ομώνυμου αγωγού.

Με την δική μας εμπειρία η τεχνική δεν μπορεί να εφαρμοστεί σωστά σε επίμυες ή μικρά ζώα εξαιτίας του λεπτού επινευρίου.

Τρεις παραλλαγές του επινευρικού κρημονού, εγγύς (A,B) ή περιφερικά (C) βασισμένου συγκρίθηκαν με την ομάδα μάρτυρα D όπου χρησιμοποιήθηκε νευρικό μόσχευμα. Η νευρική αναγέννηση εξετάστηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία (ποσοτικά και ποιοτικά), ανοσοϊστοχημεία (ποιοτικά) και ηλεκτρομυογράφημα (ποσοτικά). Αρχικά έγινε σύγκριση των χειρουργηθέντων άκρων με τα αντίστοιχα υγιή ισχιακά και ο λόγος των τιμών τους αποτέλεσε τη τελική τιμή του αποτελέσματος για τις παραπάνω 3 μεθόδους εκτίμησης (μικροσκοπία, ανοσοϊστοχημεία, μυϊκή συσταλτικότητα). Κατόπιν αναπτύχθηκε η σειρά

μάρτυρας όπου εξετάστηκε παρομοίως το μοντέλο παρεμβολής του κλασικού νευρικού αυτομοσχεύματος. Τελικά έγινε σύγκριση της κάθε σειράς με τη σειρά μάρτυρα. Απ' τα μοντέλα που δοκιμάστηκαν, νευρική αναγέννηση συμβαίνει σε όλα τα μοντέλα δια μέσου του επινευρικού κρημνού, αλλά ειδικότερα παρατηρήθηκε στη σειρά όπου αυτός προωθείται ληφθείς από το εγγύς νευρικό κολόβωμα.

Συμπερασματικά λοιπόν, ο επινευρικός κρημνός μπορεί εναλλακτικά να χρησιμοποιηθεί ως αυτογενής - βιολογικός αγωγός για τη γεφύρωση βραχέων νευρικών ελλειμμάτων.

Σε αυτή τη μελέτη ένα βραχύ νευρικό έλλειμμα γεφυρώθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους επινευρικών κρημνών. Τα αποτελέσματα αυτού του τύπου αγωγού ήταν συγκρίσιμα με αυτά που δόθηκαν μετά τη γεφύρωση με ένα τυπικό νευρικό μόσχευμα.

Όταν γεφυρώσαμε ένα νευρικό έλλειμμα με ένα ελεύθερο επινευρικό κρημνό, η επισυμβαίνουσα νευρική αναγέννηση πλησίασε τα αποτελέσματα της ομάδας μάρτυρα, επιτυγχάνοντας 93% της μυϊκής συσταλτικότητας και 81% των παραμέτρων που εκτιμώνται με την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Στην ίδια ομάδα το αναγεννημένο νεύρο έφθανε να αποδίδει το 60.33% των τιμών της δύναμης συσταλτικότητας του φυσιολογικού και 55% των τιμών του φυσιολογικού όσον αφορά τις 2 αναφερθείσες παραμέτρους στην εκτίμηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Μορφολογικά η νευρική αναγέννηση εξελισσόταν με προοδευτική εμφάνιση και ωρίμανση των νευραξόνων. Όταν ο επινευρικός κρημνός παρασκευαζόταν από το περιφερικό κολόβωμα τα αποτελέσματα ήταν κατώτερα σε σύγκριση με τον εγγύτερα παρασκευαζόμενο κρημνό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ελαττωμένο πάχος του ή να αποδίδεται στην επίδραση στην νευρική αναγέννηση με ένα

πιο καθοριστικό μηχανισμό πχ λόγω της καλύτερης κεντρομόλου αιμάτωσης του επινευρίου, η οποία είναι σαφώς ισχυρότερη από την ανάστροφη (φυγόκεντρο), οπότε ο εγγύς βασιζόμενος κρημνός εξ επινευρίου είναι υγιέστερος από άποψη αιμάτωσης. Στον παραπάνω κρημνό η μυϊκή συσταλτικότητα του γαστροκνημίου της πλευράς της χειρουργικής κάκωσης έφθανε το 42.1% της φυσιολογικής συσταλτικότητας του ετερόπλευρου γαστροκνημίου. Χρησιμοποιώντας ένα περιφερικά βασιζόμενο επινευρικό κρημνό (ομάδα C) δεν βελτιώσαμε τα αποτελέσματα της εγχείρησης. Βασιζόμενοι σ αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι προτιμότερο να παρασκευάζουμε ένα εγγύς βασιζόμενο επινευρικό κρημνό.

Οι επινευρικοί κρημνοί που παρασκευάζονται από το εγγύς νευρικό στέλεχος μπορούν λοιπόν να χρησιμοποιηθούν σαν βιολογικοί αγωγοί για τη γεφύρωση βραχέων νευρικών ελλειμμάτων. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η αποφυγή της νοσηρότητας της δότριας περιοχής η οποία συνοδεύει την παρασκευή νευρικών μοσχευμάτων. Δεν υπάρχει επιπρόσθετο κόστος και η κάκωση του νεύρου με τις συνέπειες της από από την παρασκευή του επινευρίου δείχνει να είναι επιδιορθώσιμη.

Σέ συγκεκριμένες κλινικές περιπτώσεις διατομών νεύρων με έλλειμμα μικρότερο των 2,5-3 εκατοστών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη πρακτική χειρουργική επιτυχώς η παραπάνω ή παρόμοιες τεχνικές<sup>22,23</sup>.

Μειονεκτηματα αυτής της τεχνικής σε σύγκριση με τοποθέτηση άλλων πιο «έτοιμων» αγωγών όπως π.χ. ένας αγωγός σιλικόνης, είναι ο παρατεταμένος χειρουργικός χρόνος και η αναγκαιότητα εξειδικευμένων χειρουργικών τεχνικών. Στην εμπειρία μας βέβαια, ο κρημνός μπορεί να παρασκευαστεί σε 20 λεπτά. Όπως προαναφέραμε η τεχνική μας θα

απέβαινε προβληματική εάν εφαρμόζετο σε επίμυες, όμως μειονέκτημα ενδεχομένως μπορεί να παρουσιάσει η τεχνική μας και στο κόνικλο, όταν το ζώο είναι αδύνατο ή γέρικο και το επινεύριο του είναι επίσης λεπτό και εύθραυστο ή δεν αποκολλάται εύκολα από το νεύρο, για τον λόγο αυτό επιλέξαμε τα πειραματόζωα να είναι από 2,5 kg και πάνω.

Η επιλογή του κατάλληλου πειραματικού μοντέλου ζώου είναι κριτική στην πειραματική έρευνα των νεύρων. Η μελέτη μας εφαρμόστηκε αρχικά σε επίμυες, αλλά σχεδόν σε όλα τα ζώα η ιατρογενής κάκωση του νεύρου θεωρήθηκε σημαντική εξαιτίας της ευαίσθητης φύσης του ισχιακού νεύρου του επίμυος και του λεπτού του επινευρίου. Σε αυτό το μοντέλο η επαγωγή χρήσιμης πληροφορίας κρίθηκε αμφίβολη.

Σε μια άλλη μελέτη Τουρκικής επιστημονικής ομάδος <sup>22</sup> ένας επινευρικός αγωγός τοποθετήθηκε σε επίμυες για τη γεφύρωση βραχέων νευρικών ελλειμμάτων. Σε αυτή τη μελέτη ο επινευρικός αγωγός δεν πληρώθηκε με κάποιο υλικό για να προληφθεί η κατάρρευση των τοιχωμάτων. Ο αγωγός οδήγησε σε βελτιωμένα λειτουργικά και μορφολογικά αποτελέσματα σε σύγκριση με φλεβικά αυτόλογα μόσχευματα.<sup>22</sup>

Στη δική μας μελέτη το τυπικό νευρικό μόσχευμα παρέχει τα καλύτερα λειτουργικά αποτελέσματα όσον αφορά την μυϊκή ανταπόκριση και τη νευρική αναγέννηση αλλά τα αποτελέσματα με τους εγγύς παρασκευαζόμενους επινευρικούς κρημνούς είναι συγκρίσιμα με αυτά από ένα τυπικό νευρικό μόσχευμα.

Η τεχνική μας θα μπορούσε να συνοδευτεί με την έγχυση νευροτροφικού παράγοντα NGF <sup>23</sup> στον επινευρικό αγωγό για τη βελτίωση της νευρικής αναγέννησης, ιδέα δημοσιευμένη<sup>23</sup> που εφαρμόστηκε επιτυχώς από μια ομάδα μας (Barmpitsioti A, Konofaos P, Ignatiadis I,

Papalois A, Zoubos AB, Soucacos PN). Εκτός από την ιδέα προσθήκης ενός NGF (Nerve Growth Factor)<sup>14,23</sup> νευροτροφικού παράγοντα που μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα της τεχνικής μας μπορούν επίσης να δοκιμασθούν και άλλες τεχνικές επινευρικών μοντέλων για γεφύρωση νευρικών ελλειμμάτων οι οποίες επίσης μπορούν να ενισχυθούν με τοπική εφαρμογή νευροτροφικών παραγόντων οι οποίοι αυξάνουν την ικανότητα νευρικής αναγέννησης<sup>14,23</sup> (NGF, BDNF<sup>66</sup>, Tacrolimus, Insuline like factor, Bfgf, κλπ). Μειονέκτημα θα μπορούσε να αποτελεί, όπως προαναφέραμε και στις προσπάθειες συνδυασμένης χρήσης ευοδωτικών παραγόντων και δια μέσου άλλων τύπων αγωγών παρότι η χρήση των ευοδωτικών αυξητικών παραγόντων παρουσιάζει μια τεκμηριωμένη ουσιώδη δυναμική για κλινική χρήση των περιφερικών νεύρων (OLSON 1997), οι εν λόγω ουσίες δεν έχουν ακόμα ενταχθεί στη κλινική θεραπευτική της νευρικής επανόρθωσης.

Δεν γνωρίζουμε ακόμα ποιοι παράγοντες, σε τί μορφή και σε τι δόση και για πόσο χρόνο πρέπει να χορηγηθούν και τι παρενέργειες και τι τοξικότητα ή καρκινογενετική δυναμική παρουσιάζουν. Πάντως φαίνεται ότι παρουσιάζουν στρατηγικό ενδιαφέρον στο σχεδιασμό της αντιμετώπισης του τραύματος του περιφερικού νεύρου για το εγγύς μέλλον οι διάφοροι παράγοντες σε διάφορες μορφές, είτε δια συστηματικής χορηγήσεως, είτε δια τοπικών εγχύσεων με ειδική αντλία, πολυμερή, είτε υπό μορφή γέλης ή σε μικροσφαίρες.

Προοπτικές θα μπορούσαν να δώσουν και τα Βλαστοκύτταρα- iPSc (πολυδύναμο βλαστοκυτταρικό μίγμα) αν χορηγηθούν υπό μορφή μικροσφαιριδίων αν χορηγηθούν εντός του αγωγού γεφύρωσης του νευρικού ελλείμματος απ'ότι ανακοινώνεται σε Ιαπωνική μελέτη<sup>58,61</sup>.

Σε μία ακόμη πιο προχωρημένη προσπάθεια για μελέτη πολυδύναμου συνδυασμού αγωγών και άλλων παραγόντων σε κοινή μελέτη σε επίμηκες των πανεπιστημίων Osaka, Kyoto και Nara (Japan)<sup>59</sup> δοκιμάστηκε ο συνδυασμός χρήσης και εφαρμογής 1) αγωγών, 2) νευροτροφικών ουσιών BfgF (basic fibroblast growth factor) και 3) Βλαστοκυτάρων - iPSc (πολυδύναμο βλαστοκυτταρικό μίγμα), ενώ και εδώ η σειρά μάρτυρ περιελάμβανε ομάδα γεφύρωσης με νευρικά κλασσικά μοσχεύματα. Μεταξύ σειρών γεφυρωμένων με αυτομοσχεύματα, απλούς αγωγούς, αγωγούς με πολυδύναμο μικροσφαιρίδια βλαστοκυττάρων, και αγωγούς με βλαστοκύτταρα iPSc και νευροτροφικούς παράγοντες bFGF (basic fibroblast growth factor), την καλύτερη αναγέννηση παρουσίασαν τελικά και πάλι οι γεφυρώσεις με νευρικά αυτομοσχεύματα. Ακολούθησαν με σημαντικές επιδόσεις οι σειρές όπου μέσα στους αγωγούς εφαρμόστηκαν τα βλαστοκύτταρα (μικροσφαιρίδια) συν τη γέλη με τον ευοδωτικό παράγοντα Bfgf<sup>62</sup>.

**Εικόνα 16: Κλινική εφαρμογή, Τραυματικό νευρίνωμα Κερκιδικού νεύρου, από το δημοσιευμένο άρθρο<sup>24</sup>: Posttraumatic neuroma of the radial nerve treated with an autogenous epineurial conduit technique. A case report. Ignatiadis IA et al. Microsurgery; 2009; 29(2):133-5.**

**16a: Χειρουργική Παρασκευή νευρινώματος.**

**16b: Εικόνα ελλείμματος μετά την εκτομή του νευρώματος.**

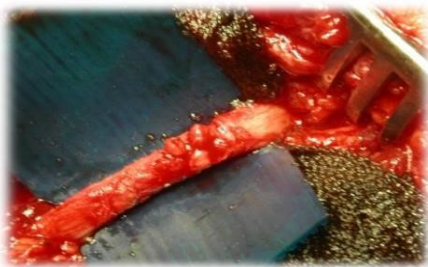
**16c: Κάλυψη του κενού 3cm με επινευρικό σωλήνα.**

**16d: Κλινικό Αποτέλεσμα Πηχεοκαρπική-έκταση 6 μήνες.**

**16e: Κλινικό αποτέλεσμα δάκτυλα-έκταση 5 μήνες.**

**16f: Κλινικό αποτέλεσμα αντίχειρ-έκταση 6 μήνες.**

16a



16b



16c



16d



16e



16f



**Δυνατότητες κλινικής εφαρμογής τεχνικής (εικόνα 16a,b,c,d,e και 17a,b,c,d,e).**

Κλινικό δημοσιευμένο παράδειγμα<sup>24</sup> όπου αναφέρεται η εφαρμογή της τεχνικής μας στη χειρουργική ασθενή στο ύψος του βραχίονα (Εικόνα 16 a.b.c.d.e) με επινευρικό κρημνό και συμπλησίαση στο 1,5 εκατοστό προς γεφύρωση ενός αρχικά 3 εκατοστών προκύψαντος ελλείμματος μετά από χειρουργική εκτομή του νευρινώματος σε συνέχεια, έδειξε επιτυχή αναγέννηση του Κερκιδικού νεύρου και κλινική αποκατάσταση της έκτασης του καρπού εντός τετραμήνου, των δακτύλων εντός πενταμήνου και τελικά του αντίχειρός και συνολικά του χεριού εντός επταμήνου με follow up δέκα επτά μηνών.

Επίσης υπάρχει περιστατικό διατομής Μέσου νεύρου στο άπω αντιβράχιο σε 30χρονο (Εικόνα 17a,b,c,d,) όπου έγινε γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 3 εκατοστών με την τεχνική προωθητικού επινευρικού κρημνού με καλά λειτουργικά αποτελέσματα και εμπειριστατωμένο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο και εκτίμηση-αξιολόγηση με το πρωτόκολλο Rosen-Lundborg που πρόκειται να δημοσιευθεί και δείχνει εντός οκταμήνου καλή κλινικοεργαστηριακή αποκατάσταση του χεριού. Το περιστατικό έχει υποβληθεί προς δημοσίευση σε έγκυρο περιοδικό ενώ συμπληρώθηκε ένα ικανό διάστημα μετεγχειρητικής παρακολούθησης αρκετό για ασφαλή και τελικά συμπεράσματα.

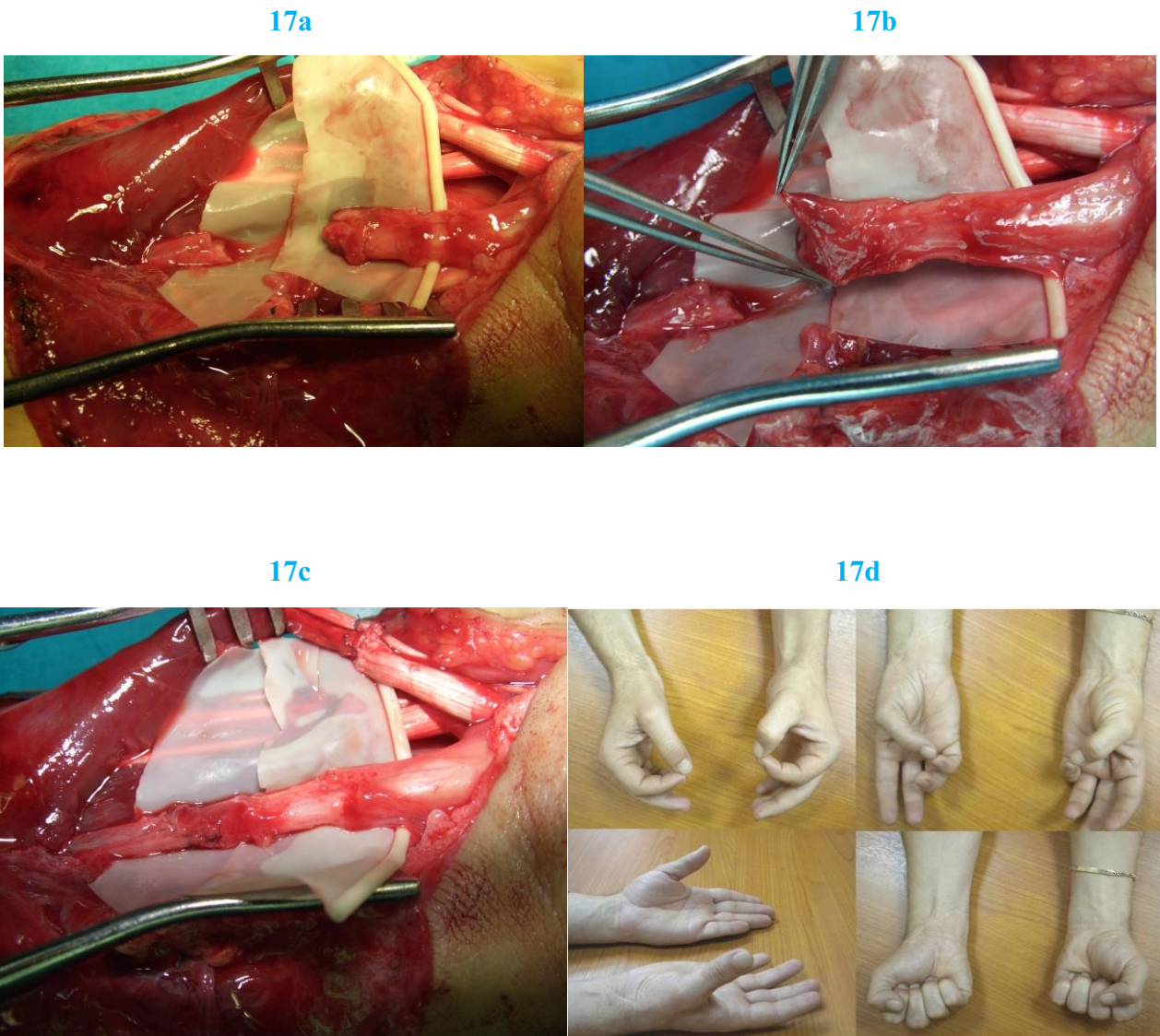
**Εικόνα 17: Διατομή Μέσου νεύρου με έλλειμμα 3 cm, γεφύρωση με επινεύριο.**

**17a Διατμηθέν Νεύρο**

**17b Επινευρικός κρημνός παρασκευασθείς απ' το περιφερικό κολόβωμα**

**17c Προώθηση επινευρικού σωληνωτού κρημνού προς γεφύρωση του κενού**

**17d Κλινικό αποτέλεσμα**



**Σύγκριση αποτελεσμάτων μας με παρόμοιες μελέτες της βιβλιογραφίας<sup>22,57</sup>.**

Σε κλινική μελέτη ερευνητών του Πανεπιστημίου της Κωνσταντινουπόλεως<sup>22</sup> όπου εξετάζονται εντός του ίδιου πειράματος και με το ίδιο πρωτόκολλο η χρήση επινευρίου, φλεβών, αρτηριών και αγωγών σιλικόνης ελήφθησαν συγκρίσιμα αποτελέσματα για τα προαναφερθέντα «υλικά» χωρίς να βρεθεί ότι κάποιο εξ αυτών υπερέχει. Στη προκειμένη περίπτωση μεταξύ ίσης αξίας μεθόδων αντιμετώπισης από πλευράς αναγέννησης, θα αξιολογήσουμε βάσει άλλων κριτηρίων επιλογής προτίμησης που είναι εκείνα της μικρότερης πρόκλησης βλάβης στον οργανισμό και του μικρότερου κόστους υλικού, επομένως σύμφωνα με τα τελευταία 2 κριτήρια προκρίνεται λογικά η μέθοδος του επινευρίου.

Γενικά στις περισσότερες έρευνες όπως και στη δική μας, τελικά όπου συγκρίθηκε με χρήση αμιγών αγωγών (χωρίς προσθήκη παραγόντων ή κυττάρων), το αυτόλογο νευρικό μόσχευμα φαίνεται να υπερέχει από άποψη αποτελεσματικότητας ως προς την δυνατότητα αναγέννησης του νεύρου, ενώ λίγα άρθρα αναφέρουν ότι τα αποτελέσματα τους είναι ισάξια με εκείνα των αγωγών και ελάχιστες έρευνες, κυρίως εκεί όπου συνδυάζεται η χρήση αγωγών με ένα ή δύο νευροτροφικούς παράγοντες επιπλέον (ή και με κύτταρα) υποστηρίζουν ότι είχαν ποιοτικότερα αποτελέσματα από εκείνα των μοσχευμάτων.

Σε ανασκοπική μελέτη του πανεπιστημίου του Rochester<sup>57</sup> όπου έγινε αντιπαραβολή μελετών επί πειραμάτων με αμιγή χρήση τύπων αγωγών (χωρίς την επιπρόσθετη χρήση ευοδωτικών παραγόντων) προκύπτουν τα εξής:

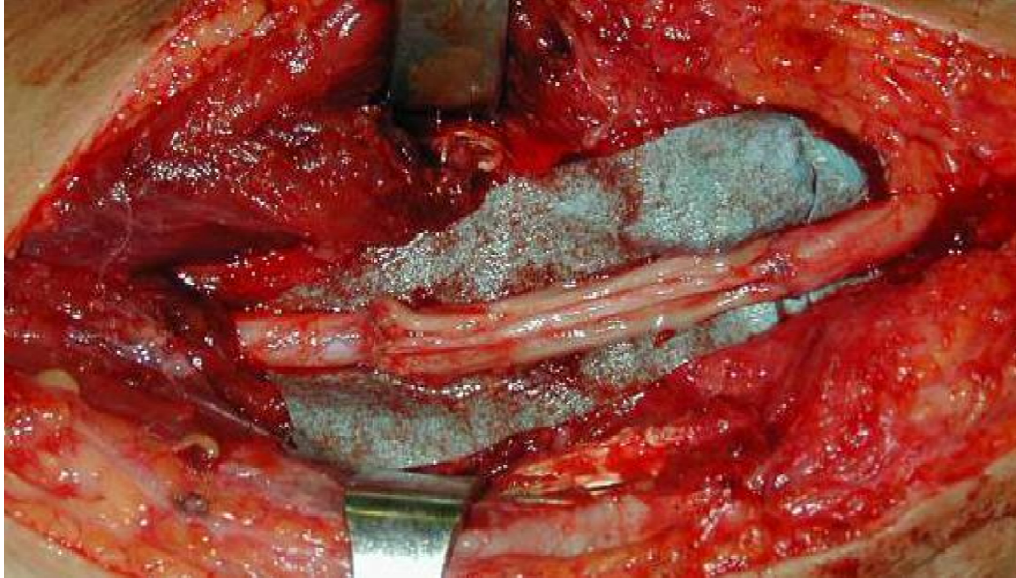
Έρευνες σε βιο-υλικά<sup>1f</sup> ικρίωματα νεύρων διεξάγονται εδώ και πενήντα έτη. Μόνο τρία υλικά: Κολλαγόνο, Πολυγλυκολικό οξύ (βιοαπορροφήσιμο) και Πολυκαπρολακτόνη

(βιοδιασπώμενο) χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πράξη με διάφορες ονομασίες όπως: neurolac, neurotube, neuragen. Κατά την εν λόγω έρευνα έγινε μια συστηματική ανασκόπηση 416 αναφορών κατά τις οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί διάφορα είδη πειραματοζώα για εκτίμηση νευρικής αναγέννησης σε συνθετικούς αγωγούς. Ένα έγκυρο είδος πειραματοζώου πρέπει να παρέχει τη δυνατότητα όσο πιο πιστής γίνεται αναπαραγωγής του φαινομένου της νευρικής αναγέννησης των τραυματιζομένων περιφερικών νεύρων του ανθρωπίνου είδους. Δεν υπάρχει κάποιο ιδανικό ζωικό είδος που να ταιριάζει απόλυτα και σε όλα στη σύγκριση με το ανθρώπινο μοντέλο, όμως κάποια είδη ταιριάζουν επαρκώς ώστε μελετώντας τα να κατανοούμε την αναγεννητική νευροβιολογία, ενώ άλλα είναι καταλληλότερα για τη φάση της εκτίμησης των αποτελεσμάτων.

Η παραπάνω ανασκόπηση<sup>57</sup> ταυτοποιεί πάνω από 70 συνθετικά υλικά που δοκιμάστηκαν σε 8 είδη ζώων, σε 17 διαφορετικά νεύρα. Νευρικά ελλείμματα από 1 έως 90 mm, πάνω από 20 διαφορετικοί τύποι μεθοδολογιών εκτίμησης αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν χωρίς να επιτευχθεί ένα σταντάρισμα μεθόδων μεταξύ των δημοσιεύσεων.

Η ανασκοπική έρευνα τονίζει την επείγουσα ανάγκη για επίτευξη στανταρίσματος μεθοδολογιών εκτίμησης και καθιέρωση συγκεκριμένων ζωικών μοντέλων για τη πειραματική μελέτη της νευρικής επανόρθωσης γενικότερα τραυματισμών στα περιφερικά νεύρα.

**Εικόνα 18:** Το κλασσικό νευρικό αυτομόσχευμα από γαστροκνήμιο νεύρο(Sural). Παραμένει ο πλέον αξιόπιστος και αποτελεσματικός αγωγός για την εξασφάλιση της καλύτερης νευρικής αναγέννησης.





## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας όπως και στις περισσότερες αναφορές σε παρόμοιες μελέτες με τη δική μας και κυρίως στις αναφορές όπου χρησιμοποιήθηκαν και δοκιμάστηκαν αμιγώς διάφοροι αγωγοί (χωρίς την προσθήκη άλλων παραγόντων ή κυττάρων) για τη γεφύρωση βραχέων (αποκλειστικά) νευρικών ελλειμμάτων, φαίνεται ότι:

1. Οι νευρικοί αγωγοί (conduits) ή θάλαμοι (chambers) ή αγωγοί νευρικής καθοδήγησης, είναι δόκιμη ως αποτελεσματική μέθοδος για τη γεφύρωση βραχέων ελλειμμάτων περιφερικών νEURων εναλλακτική στα αυτόλογα νευρικά μοσχεύματα, αποφεύγοντας στη κλινική εφαρμογή να θυσιάσουμε αυτόλογο νEURο.
2. 2a. Παρά τα ισχύοντα στο προηγούμενο συμπέρασμα, στις περισσότερες αναφορές φαίνεται ότι τελικά, σε άμεση σύγκριση της αποτελεσματικότητας μεταξύ αγωγών και αυτολόγου νευρικού μοσχεύματος (όσον αφορά την νευρική αναγέννηση σε ποιότητα και ταχύτητα) η χρήση του αυτολόγου μοσχεύματος παραμένει η πλέον αποτελεσματική.  
  
2b. Σε κάποιες-λίγες αναφορές <sup>61,62,63</sup> συνδυασμένων πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τους αγωγούς, Κύτταρα (Σβανοκύτταρα, βλαστοκύτταρα μυελού, βλαστικά λιποκύτταρα, κλπ) ή αυξητικοί παράγοντες (NGF, Bdnf <sup>66</sup>, Fk-506 <sup>64</sup>, P.R.P κλπ) φαίνεται να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα με εκείνα που λαμβάνονται από τη χρήση νευρικών αυτομοσχευμάτων.  
  
2c. Σε ελάχιστες αναφορές- κυρίως σε «πολυδύναμα» πειράματα <sup>63</sup> όπου χρησιμοποιήθηκαν ως ενισχυτικές στη χρήση αγωγών ευοδωτικές ουσίες αλλά και

κύτταρα φαίνεται να παρουσιάζονται αποτελέσματα σημαντικότερα από εκείνα των σειρών όπου έγινε χρήση μοσχευμάτων όσον αφορά την δυνατότητα αναγέννησης των νεύρων.

3. Τελικά φαίνεται ότι το είδος ή ποιότητα του αγωγού δεν επηρεάζει, παρά μόνο σε μικρό βαθμό (π.χ. βιοδιασπώμενοι-βιοαπορροφούμενοι αγωγοί), την αποτελεσματικότητα των αγωγών στην ευόδωση της περιφερικής νευρικής αναγέννησης<sup>1,9</sup>.
4. Αυτό που φαίνεται να έχει σημασία πειραματικά και κλινικά είναι το μήκος του νευρικού ελλείμματος (gap, defect) που πρέπει να γεφυρωθεί και κυμαίνεται κλινικά στα 2,5 με 3,5 cm ενώ στα πειραματικά μοντέλα (συνήθως επίμυες) είναι περί τα 10 mm. Οι περισσότεροι απτούς βιολογικούς αγωγούς απεδείχθη ότι υποστηρίζουν την νευρική αναγέννηση, όμως προβλήματα παραμένουν όταν επιχειρείται η γεφύρωση μεγαλύτερων ελλειμμάτων. Σε «πολυδύναμα» πειράματα με προσθήκη παραγόντων και κυττάρων<sup>62,63</sup> στους πειραματικούς αγωγούς δοκιμάστηκαν και γεφυρώσεις 12 ή 15 mm με κάποια θετικά αποτελέσματα και σε μεγαλύτερα ελλείμματα..
5. Η χρήση του επινευρικού αγωγού για γεφύρωση βραχέων νευρικών ελλειμμάτων φαίνεται να είναι μια ισότιμη σε αποτελεσματικότητα με τις άλλες μέθοδος και ενδεχομένως προτιμητέα κυρίως λόγω του χαμηλότερου βαθμού νοσηρότητας της δότριας περιοχής (συγκρινόμενο κυρίως με τα νευρικά αυτομοσχεύματα) αλλά και του μηδενικού κόστους σε σύγκριση με τη πολυγλακτίνη, το πολυγλυκολικό οξύ ή και με άλλα υλικά.



6. Σε αναφορά του 2007 όπου ομάδα που συμμετείχε και ο συντάσσων την παρούσα διατριβή και αφού είχαμε δημοσιεύσει το πειραματικό πρωτόκολλο αυτής, πειραματίστηκε με τις ίδιες συνθήκες, είδος, ομάδες και αριθμό ζώων πλην όμως προσετέθη και η συμβολή του καθημερινά με υποδορίως εμφυτευμένες αντλίες χορηγουμένου NGF <sup>23</sup>, φαίνεται να λαμβάνονται λειτουργικά και ιστολογικά αποτελέσματα παραπλήσια με εκείνα που αποδίδει η σειρά μάρτυρας με χρήση αυτολόγων κλασσικών νευρικών μοσχευμάτων.
7. Η προοπτική για κλινική εφαρμογή <sup>24</sup> της κεντρικής ιδέας της διατριβής (χρήσης επινευρίου ως αγωγού νευρικής αναγέννησης) φαίνεται να έχει ανταπόκριση αφού έχουμε ήδη ένα περιστατικό βλάβης κερκιδικού νεύρου δημοσιευμένο σε έγκυρο περιοδικό και ένα ακόμα με βλάβη μέσου νεύρου εκτιμηθέν με αξιόπιστο πρωτόκολλο αξιολόγησης (υποβληθέν προς δημοσίευση) όπου φαίνεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου που εφαρμόστηκε σε νεαρούς ασθενείς με ταχεία και επιτυχή αναγέννηση των τραυματισθέντων κερκιδικού και μέσου νεύρου.

**Εικ.19: Κεντρομόλος μετάδοση πληροφοριών και φυγόκεντρος εκπομπή νευρικών ώσεων και εντολών. Αυτοσχέδια απόδοση λειτουργικού νευρώνα(19Α' 19Β).**



## **6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ<sup>14-20</sup>**

Στή παρούσα μελέτη μελετήθηκε η διαδικασία της αναγέννησης των περιφερικών νεύρων διά μέσου τριών παραλλαγών επινευρικού κρημνού χρησιμοποιώντας 4 ομάδες με συνολικά 114 Λευκούς κονίκλους Νέας Ζηλανδίας. Χρησιμοποιήθηκαν 3 ομάδες μελέτης (A, B, and C) και μία ομάς μάρτυρας (D) όπου: ένα προκληθέν έλλειμμα επί του ισχιακού νεύρου 10 χιλιοστά γεφυρώθηκε είτε με μία από τις 3 παραλλαγές επινευρικού κρημνού (Groups A, B, and C) είτε με ένα νευρικό αυτομόσχευμα (Group D ή μάρτυρας).

Τα ζώα όλων των ομάδων εξετάστηκαν 21, 42, και 91 ημέρες μετεγχειρητικά προς εκτίμηση της νευρικής αναγέννησης χρησιμοποιώντας οπτική μικροσκοπία και ανοσοϊστοχημεία.

Η νευρική αναγέννηση μελετήθηκε σε εγκάρσιες τομές στα 3, 6, and 9 χιλιοστά απόσταση από το κεντρικό κολόβωμα. Η μυϊκή συσταλτικότητα εξετάστηκε λίγο πριν από την ευθανασία στις 91 ημέρες μετεγχειρητικά σε όλες τις ομάδες χρησιμοποιώντας Ηλεκτρομυογραφία (μυοδιεγέρτη Grass). Τα ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ που σχηματίστηκαν από τον συνδυασμό των 4 ομάδων είναι τα εξής:

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1) Γεφύρωση βραχέος ελλείμματος Ισχιακού νεύρου κονίκλου δια προωθητικού επινευρικού κρημνού – σύγκριση με σειρά μάρτυρα.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 2) Γεφύρωση βραχέος ελλείμματος Ισχιακού νεύρου κονίκλου δι' αναστρόφου αγγειουμένου επινευρικού κρημνού ληφθέντος εκ του κεντρικού νευρικού κολοβώματος– σύγκριση με σειρά μάρτυρα.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 3) Γεφύρωση βραχέος νευρικού ελλείμματος Ισχιακού νεύρου κονίκλου δι' αναστρόφου αγγειουμένου επινευρικού κρημονού ληφθέντος εκ του περιφερικού νευρικού κολοβώματος – σύγκριση με σειρά μάρτυρα.

Σέ κάθε πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν 42 ζώα (36 για εφαρμογή τής εν λόγω τεχνικής και 6 της σειράς «Μάρτυρα» όπου η γεφύρωση του νευρικού ελλείμματος στό ισχιακό νεύρο του κονίκλου γίνεται μέ κλασσικό νευρικό μόσχευμα. Η σειρά μάρτυρας προορίζετο για σύγκριση μόνο με τό μισό τελευταίο γκρούπ κάθε σειράς A,B,C, (αποτελούμενο εξ' 6 πειραματοζώων) όπου γίνεται η μέτρηση τής μυικής συσταλτικότητας με μυοδιεγέρτη και κατόπιν θυσίας τους η απόδοση στην οπτική μικροσκοπία για μορφομετρική ανάλυση και σύγκριση ευρημάτων (το άλλο ήμισυ της τελευταίας σειράς=τρίτης θυσίας προορίζετο για να αποδοθεί στην ανοσοιστοχημική μελέτη.

Γιά κάθε σειρά A,B,C των 36 ζώων έγιναν θυσίες στίς 3,6και 13 εβδομάδες μετεγχειρητικά (από 12 ζώα στη κάθε θυσία) και ο αναγεννηθείς ιστός εκτιμήθηκε ποιοτικά ανοσοϊστοχημικά (6 ζώα) και με οπτική μικροσκοπία (6 ζώα) με 3 ζώα να προορίζονται για εγκάρσιες τομές (στα 3,6,9 εκατοστά) (**Εικόνα 7b**) στόν αναγεννημένο νευρικό σωλήνα τους καί 3 για επιμήκεις. Η οπτική μικροσκοπία στα πρώτα 2 group δηλαδή στίς πρώτες 2 θυσίες έχουν χαρακτήρα ποιοτικής εκτίμησης ενώ στην ομάδα των 6 της τελευταίας θυσίας (εκτίμηση ηλεκτρομυογραφική και οπτικής μικροσκοπίας) έχουν και ποσοτική εκτίμηση μορφομετρικά και στατιστικά αναλυμένη και σύγκριση με το αποτέλεσμα της σειράς μάρτυρα. Βεβαίως το αποτέλεσμα που συγκρίνεται και για το τελευταίο group των σειρών A,B,C και για τη σειρά μάρτυρα είναι ο λόγος (κλάσμα) της ευρεθείσης τιμής του χειρουργηθέντος νεύρου πρός το αντίστοιχο φυσιολογικό. Ως τομές

μάρτυρα (control) για ανοσοϊστοχημική και μικροσκοπική εκτίμηση λαμβάνονται τομές εγκάρσιες (στα 3,6,9 εκατοστά) και επιμήκειες από το φυσιολογικό νεύρο. Η τελευταία ομάδα 6 κονίκλων πριν θυσιασθεί και υποβληθεί (στις 13 εβδομάδες) σε μικροσκοπική εκτίμηση εκτιμήθηκε ως προς την ικανότητα μυϊκής σύσπασης με μυοδιεγέρτη και συγκεκριμένα οι παράμετροι “Amplitude”, “Latency” και “Area of motor response”

Η ανοσοϊστοχημεία επιτελεί ποιοτική εκτίμηση, εξυπηρετώντας τη μελέτη των σταδίων της νευροαναγέννησης, ανιχνεύοντας στοχευμένα συγκεκριμένα κύτταρα και ίνες μετά από πρόκληση αντιγονικής αντίδρασης προς αυτά που αποτελούν αντιγόνα, προκαλώντας αντίδραση χρώσης αυτών.

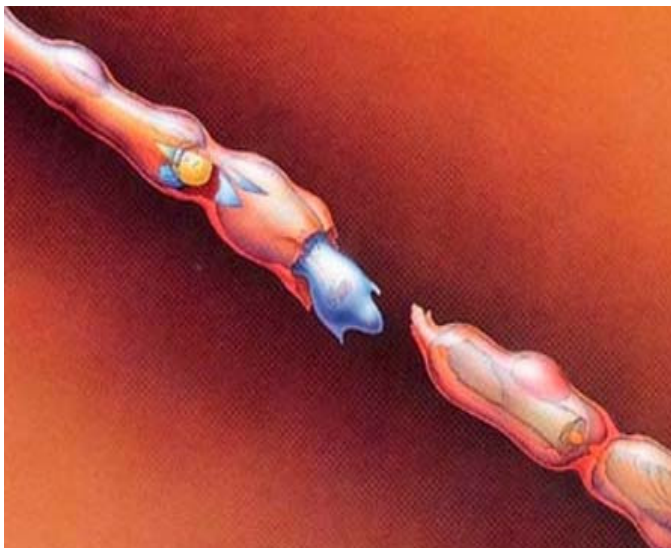
Τελικά η χρήση του επινευρικού αγωγού για γεφύρωση βραχέων νευρικών ελλειμάτων φαίνεται να είναι μια ισότιμη σε αποτελεσματικότητα με τις άλλες μέθοδους αγωγών και ενδεχομένως προτιμητέα κυρίως λόγω του χαμηλότερου βαθμού νοσηρότητας της δότριας περιοχής (συγκρινόμενο κυρίως με τα νευρικά αυτομοσχεύματα) και του μηδενικού κόστους σε σύγκριση με τη πολυγλακτίνη, το πολυγλυκολικό οξύ ή και με άλλα υλικά, αν τη συγκρίνουμε όμως με τη κλασική συμβατική μέθοδο φαίνεται ότι τελικά: σε άμεση σύγκριση της αποτελεσματικότητας μεταξύ της μεθόδου μας όπως και άλλων αγωγών (από αναφορές εργασιών) και του αυτολόγου νευρικού μοσχεύματος (όσον αφορά την νευρική αναγέννηση σε ποιότητα και ταχύτητα) η χρήση του αυτολόγου μοσχεύματος παραμένει η πλέον αποτελεσματική.

Επομένως συμπερασματικά στη δική μας μελέτη το τυπικό νευρικό μόσχευμα παρέχει μεν ανώτερα λειτουργικά αποτελέσματα όσον αφορά την μυϊκή ανταπόκριση και τη νευρική αναγέννηση απ’ τις σειρές μας, αλλά τα αποτελέσματα με τους εγγύς παρασκευαζόμενους

επινευρικούς κρημνούς (Group A) είναι αρκετά παραπλήσια με αυτά από ένα τυπικό νευρικό μόσχευμα φθάνοντας ηλεκτροφυσιολογικά πλέον του 90 % και ιστολογικά του 60% των τιμών του τελευταίου.

**Εικ.20: Βαλλεριανή εκφύλιση, φάσεις του φαινομένου (20A' 20B).**

**Εικόνα σχεδιασμένη από υπολογιστή.**



## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

**Title: DIVERSE TYPES OF EPINEURAL CONDUIT TECHNIQUES FOR BRIDGING SHORT SCIATIC NERVE DEFECTS IN THE RABBIT. A COMPARATIVE STUDY.**

**Background:** Nerve grafting is the most reliable used procedure to bridge a neural defect, but it is associated with donor site morbidity. In experimental surgery the search for an optimal nerve conduit led to the use of biological and artificial materials. The epineurium may serve as conduit for bridging nerve defects. We used 3 types of epineural flaps to bridge a short nerve defect (10mm). Nerve regeneration through an epineural flap conduit was examined

**Introduction:** Nerve grafting is the most effective used procedure to repair a neural gap, but it is associated with donor site morbidity. In several experimental models the search for an optimal nerve conduit led to the use of autogenous and artificial materials. Clinical implementation of conduits has focused on the use of autogenous tissue (veins, arteries, pseudoseaths, nerve grafts) and artificial conduits (polyglactine, silicon).

Conduit materials does not seem to improve significantly the outcome. The major obstacle in the use of conduits is the limitation in the defect size that can be successfully bridged and is limited in humans to 2.5 cm. The epineurium carries the majority of the nerve vessels, i.e. vasa nervorum. Additional vascular supply comes from the intraneurial vascular plexus and from various perforators. There is also another type of reverse vascularization from distal to proximal, involving shorter vessels. The epineurium may

serve as a conduit for bridging of nerve defects. In this study we used 3 variations of an epineural flap to bridge a short nerve defect.

**Materials-Methods:** 126 white New Zealand rabbits, weighing 3.5 kg were used. The animals were allocated to 4 Groups. In the 3 study groups (Groups A, B and C) 36 animals were included, while the rest 18 animals served as control (Group D). In all groups a 10-mm sciatic nerve defect was created and bridged either with 3 variations of an epineural flap (Groups A, B and C) or with a nerve graft (Group D). In all groups the sciatic nerve was exposed under general anaesthesia) The sciatic nerve was exposed under microscope. A 10 mm nerve defect was created using a sharp blade proximal of sciatic nerve bifurcation. An advancement epineural flap harvested from the proximal nerve stump and from the distal nerve stump were employed in Groups A and B respectively. In Group C a specially designed reversed epineurial flap harvested from the proximal stump was employed. In the control Group D the defect was bridged using the excised portion of the sciatic nerve, which was sutured in its original site.

In more detail the surgical technique has as follows. Following exposure of the sciatic nerve and creation of the defect a 10 mm was designed on the epineurium of the proximal stump in group A and a similar flap on the distal stump in group B. 2 mm of the dorsal epineurium containing the main nerve artery was preserved, while the rest of the epineurium was excised, taking care to avoid injury to the underlying nerve fascicles. Additionally, 2 mm of the epineurium located at the rim of the proximal (Group A) or distal (Group B) nerve stump was preserved to facilitate flap suturing. Surgical dissection started in a dorsal longitudinal direction and continued circumferentially to remove the



epineurium. The excised epineurium was then used to bridge the nerve defect. To prevent collapse of the conduit and to facilitate suturing a 2 mm thick silicon tube was inserted temporarily within the conduit and between the two nerve stumps and removed before final closure. The proximal and distal edge of the nerve was secured on the proximal and distal nerve stumps using four 10-0 Ethilon stitches. The longitudinal flap edges were also approximated using 5-7 stitches. The space within the conduit was filled with a blood clot, before completing epineurium suturing. In Group C the epineurium in the proximal nerve stump was not completely excised but its distal attachment was preserved. The epineurial flap was reversed pivoting on its distal attachment and sutured on the distal nerve stump with epineurial sutures. In this case the length of the flap was 12 mm.

In Group D the 10 mm defect was repaired using the previously resected nerve segment, which served as an autologous graft using 4 epineurial stitches at each suture line.

Postoperative Evaluation: The nerve regeneration was studied at various intervals using immunochemistry, light microscopy and measurement of the Gastrocnemius contractility. Twelve animals from Groups A, B and C were sacrificed after 3, 6 and 12 weeks, while all control animals were sacrificed after 12 weeks. The conduit area was exposed and the grafted part was excised. 6 specimens were used for light microscopy examination and 6 specimens for immunochemistry.

After 12 weeks all animals underwent examination of the gastrocnemius contractility in both limbs.

Nerve regeneration was studied in 1  $\mu\text{m}$  transverse sections at 3, 6 and 9 mm from the proximal stump (3 specimens for each group designated S3, S6, S9) and in longitudinal sections stump (3 specimens for each group). The epineurium conduit was resected and immersed in 2.5% glutaraldehyde. After fixation in 1% osmium tetroxide and dehydration in ethanol, the specimens were embedded in Agar 100. The specimens were stained with Toluidine blue and examined by light microscopy. Quantitative morphometry was performed measuring the number of myelinated axons per  $\text{mm}^2$  and the mean axon diameter in every section.

In similarity with the light microscopy 6 specimens from each group were examined using immunochemistry. The harvested conduit was rinsed in ice-cold PBS and embedded in Tissue Tek O.C.T. Three, 3  $\mu\text{m}$  thick transverse and three 10 mm long longitudinal sections were cut on a cryostat. After fixation in 2.5% paraformaldehyde, the sections were exposed to primary antibodies (DAKO) to identify the components of the newly formed nerve, including 68 KD neurofilament protein, fibrinogen, fibrin and fibronectin. The immunocytochemistry and light microscopy findings at 3 and 6 weeks were only qualitatively analyzed.

The isometric contraction force of the Gastrocnemius muscle, which is supplied by the tibial nerve, was measured 13 weeks after the defect bridging in all groups. The animals were anaesthetized and the sciatic nerves and the Gastrocnemius muscles were bilaterally exposed. Electric stimulators were placed proximally and distally to the defect and a recording electrode was placed in the Gastrocnemius muscle 10 mm below the tibial tubercle. A similar procedure was undertaken in the normal limb. Supramaximal electrical

stimuli were delivered proximal to the nerve repair site or the respective intact nerve location by a Grass-SD-9 stimulator at a frequency of 100 Hz for 0.6 ms and the gastrocnemius electrode was recording transmitted evoked potentials. The ratio of the compound muscle action potential between the operated and the normal limb (P ratio) was recorded (1, 2). Following contractility measurement, the nerve specimens were excised and processed for light microscopy and immunochemistry as described above. The quantitative histomorphometric and electromyographic data were statistically compared using ANOVA and the significance level was set at  $p=0.05$ .

Results: Regarding Gastrocnemius contractility the amplitude of the motor response in mV was expressed as the ratio between the operated and the normal side. The amplitude of the gastrocnemius muscle contraction ranged between 5.3-1.2 mV and 21.8-3.9 mV. The gastrocnemius contractility after 13 weeks compared to the contralateral normal leg was 60.3%, 42.1% and 58.7% in groups A, B and C respectively, while in the control group D was 64.1%. The difference between these parameters was statistically not significant ( $p=0.10$ ).

Histomorphometric results: Employing light microscopy the number of myelinated axons was in group A and B 55% and 43% of the normal, contralateral nerve or 81% and 68% of the control group values. In the control group the respective value was 68% of the normal contralateral sciatic nerve. The difference was between groups A, B and D was statistically highly significant ( $p<0.001$ ). The mean axonal diameter was in group A and B 59% and 45% of the normal, contralateral nerve or 78% and 62% of the control group values. In the control group this parameter reached 71% of the normal nerve value. The difference was

between groups A, B and D was statistically highly significant ( $p < 0.001$ ). On microscopy examination several findings were evident. Three weeks after the operation on microscopy examination of the regenerated nerve presence of myelin sheaths was evident throughout the nerve section with areas of connective tissue between the axons. In the longitudinal sections new myelinated axons could be seen throughout the conduit, which appeared thicker at the proximal third of the conduit. At 6 weeks the myelin sheaths were thicker and there was a clear tendency to mini-fasciculation in cross sections. After 13 weeks the axons constituted a structure resembling the normal nerve. Using immunocytochemistry, the epineural conduit was filled with fibrin and fibronectin as part of the healing process, while S100 stain for Schwann cells was positive. Bungers bands (Schwann cells) appeared in the third week along the conduit. Schwann cell proliferation preceded axonal growth. The proximal 2/3 of the new structure showed staining of neurofilament proteins. The proximal third was well stained while the second one was slightly stained (progressive axon advancement). At 6 weeks, fibrin and fibronectin are present. The conduit is occupied by stained neurofilaments at 13 weeks.

**Discussion:** A short nerve defect was bridged using various epineural flaps. The results of these conduits were comparable with those provided by nerve grafting. The principles of nerve injury have been refined based on a well understanding of nerve biology. Harvesting of the epineurium does not hinder nerve function. The epineurium is a connective tissue, which surrounds the fascicles, while carrying the blood supply. From the epineurial plexus vessels arise, running between the nerve fibers. The epineurium defines fascicular groups. To bridge a nerve gap represent a great challenge in surgery. When the nerve defect was

bridged with a free epineurial flap the resultant nerve regeneration approximated the results of the control group, achieving 93% for muscle contractility and 81% for the microscopy assessed parameters. In the same group the regenerated nerve reached 60.33% of the normal values concerning the contractility force and 55% concerning the parameters of the microscopy evaluation. The regeneration proceeded in a fashion with the progressive axonal maturation. When the epineurium flap was harvested from the distal stump the results were inferior compared to the proximally harvested flap, due to its reduced thickness or may be attributed to affecting nerve regeneration in significant way. In the latter flap the contractility of the injured side Gastrocnemius reached 42, 1% of the normal gastrocnemius contractility. Using a distally attached epineurial flap (C) did not improve the results.

**Conclusions:** The typical nerve grafting provides the best results regarding muscle response and neural regeneration. An epineurial flap may alternatively use to bridge short nerve defects and take advantage of the lesser donor site morbidity. The proximally harvested epineurial advancement flap provides comparable results with the nerve graft.

#### **Reports of Clinical applications:**

There is a single clinical published report by our group of researchers where we present the outcome of the first clinical application of a new technique using an epineurial flap to bridge a short nerve defect. A 28-year-old male had suffered a radial nerve laceration at the lower third of the arm, proximal to the brachioradialis branch, 3 weeks before surgery. During surgery, a neuroma-in-continuity was excised preserving the epineurial sleeve. Two longitudinal epineurial flaps were created, one from the proximal and one from the distal

nerve stump and used to bridge a 1-cm-long nerve defect. Each epineurium flap was sutured to the intact epineurium of the other side and additionally to each other. An electromagnetic nerve stimulator was used to enhance the nerve regeneration process. Nerve regeneration was followed up for 17 months with excellent functional results.

### **Future perspectives for improving the technique:**

In experimental systems, NGF can stimulate axonal outgrowth when applied to nerve conduits systemically or locally by an osmotic pump, by an implanted silicon reservoir, or administered in a fibronectine meshwork. Also several other neurotrophic factors may enhance axonal regeneration. BDNF and CNTF, locally applied by the use of osmotic pumps, improved the rate and degree of functional recovery in repaired sciatic nerve of adult rats. Bdnf, supplied to collagen tubes, has been shown to increase the regenerative capacity of the conduit. Research on biomaterial nerve scaffolds has been carried out for 50 years. Only three materials (collagen, polycaprolactone and polyglycolic acid) have progressed to clinical use. Pre-clinical animal models are critical for testing nerve scaffolds prior to implementation in clinical practice. We have conducted a systematic review of 416 reports in which animal models were used for evaluation of nerve regeneration into synthetic conduits. A valid animal model of nerve regeneration requires it to reproduce the specific processes that take place in regeneration after human peripheral nerve injury. No distinct animal species meets all the requirements for an ideal animal model. Certain models are well suited for understanding regenerative neurobiology while others are better for pre-clinical evaluation of efficacy. The review identified that more than 70 synthetic materials were tested in eight species using 17 different nerves. Nerve gaps ranged from 1

to 90 mm. More than 20 types of assessment methodology were used with no standardization of methods between any of the publications. The review emphasizes the urgent need for standardization or rationalization of animal models and evaluation methods for studying nerve repair.





## **8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. Lundborg G. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone; 1988, p 1-3(1a), p 5-8(1b), p 9-14(1c), p 33-36(1d), p133-134(1e), p134-143(1f), p147-149(1g)
2. Mackinnon SE, Dellon AL, Lundborg G, Hudson AR, Hunter DA. A study of neurotrophism in a primate model. J Hand Surg Am. 1986 Nov; 11(6):888-94.
3. Mackinnon SE, Dellon AL, Surgery of the Peripheral Nerves – Thieme, Jan. 1988, ISBN-13: 978-0865772830, ISBN-10: 0865772835
4. Diao E, Vannuyen T, Techniques for primary nerve repair, Hand Clinics 2000; 16:54-65
5. Malizos KN, Dailiana ZH, Anastasiou EA, Soucacos PN. Neuromas and gaps of sensory nerves of the hands: Management using vein conduits. Am J Orthop 1997; 26:481-485.
6. Millesi H. The nerve gap. Hand Clinics 1986; 2:651-663.
7. Varitimidis S, Sotereanos D. Partial nerve injuries in the upper extremity. Hand Clinics 2000; 16:140-149.
8. Suematsu N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. Microsurgery. 1989; 10(1):71-4.
9. Strauch B. Use of nerve conduits in peripheral nerve repair. Hand Clinics 2000; 16: 123-130. Mackinnon SE, Dellon AL. A comparison of nerve regeneration across a sural nerve graft and a vascularised pseudosheath. J Hand Surgery 1988; 13A: 935-942

10. Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S. Spatial temporary progress of peripheral nerve regeneration with a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* 1983; 218: 46-70.
11. Williams LR, Varon S. Modification of fibrin matrix formation situ enhances nerve regeneration in silicone chambers. *J Comp Neurol* 1985; 231: 209-220.
12. Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G. Specificity of muscle reinnervation following repair on the transected sciatic nerve: A comparative study of different repair techniques in the rat. *J Hand Surg* 1992; 17B: 257-261.
13. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004; 24(5):408-415.
14. Zhang F, Blain B, Beck J, Zhang J, Chen Z, Chen ZW, Lineaweaver WC. Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J Reconstr Microsurg*. 2002; 18(4):295-300.
15. Pu LL, Syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Forman DL, Thomson JG. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 104(5):1379-85.
16. Whitworth IH, Dore CJ, Green CJ, Terenghi G. Increased axonal regeneration over long nerve gaps using autologous nerve-muscle sandwich grafts. *Microsurgery*. 1995; 16(12):772-8.

17. Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg.* 1995; 11(1):21-6.
18. Urabe T, Zhao Q, Danielsen N, Lundborg G. Regeneration across a partial defect in rat sciatic nerve encased in a silicon chamber. *Scand J Plast Reconstruct Hand Surg* 1994; 30: 7-15.
19. Chiu DT, Lovelace RE, Yu LT, Wolff M, Stengel S, Middleton L, Janecka IP, Krizek TJ. Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study. *J Reconstr Microsurg.* 1988; 4(4):303-312.
20. Nicoli Aldini N, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R. Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. *Int Orthop.* 2000;24(3):121-12
21. Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler M. Nerve regeneration through an epineural sheath: Its functional aspect compared with a nerve and vein grafts. *Microsurgery* 2001; 21:196-201.
22. Barm pitsioti A<sup>1</sup>, Konofaos P, Ignatiadis I, Papalois A, Zoubos AB, Soucacos PN Nerve growth factor combined with an epineural conduit for bridging a short nerve gap (10 mm). A study in rabbits. *Microsurgery.* 2011 Oct; 31(7):545-50.
23. Ignatiadis IA, Yiannakopoulos CK, Avram AM, Gerostathopoulos NE. Posttraumatic neuroma of the radial nerve treated with an autogenous epineural conduit technique. A case report. *Microsurgery;* 2009; 29(2):133-5.

24. Geuna Stefano, Tos Pierluigi, Battiston Bruno: Essays on Peripheral Nerve Repair and Regeneration, INTERNATIONAL REVIEW OF NEUROBIOLOGY Vol.87, Hardbound 600
25. Pages. Published: August 2009, Academic Press, ISBN 13: 978-0-12-375084-6, 25a, 25b, 25c
26. Millesi Hanno, Schmidhammer Robert (Eds.): How to Improve the Results of Peripheral Nerve
27. Surgery, Series: Acta Neurochirurgica Supplement, Supplement 100, ISBN 978-3-211-72958-8 27. Yan Q1, Yin Y, Li B. Biomed Eng Online..Use new PLGL-RGD-NGF nerve conduits for promoting peripheral nerve regeneration. 2012 Jul 9; 11:36.
28. Ignatiadis IA1, Tsiampa VA, Yiannakopoulos CK, Xeinis SF, Papalois AE, Xenakis TH, Beris AE, Soucacos PN. A new technique of autogenous conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit. Acta Neurochir Suppl. 2007; 100:73-6.
29. Keynes RJ, Hopkins WG, Huang LH, Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane. Brain Res. 1984 Mar 19; 295(2):275-81.
30. Glasby MA, Gschmeissner SE, Huang CL, De Souza BA. Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. J Hand Surg Br. 1986 Oct; 11(3):347-51.

31. Chen LE1, Seaber AV, Urbaniak JR, Murrell GA. Denatured muscle as a nerve conduit: a functional, morphologic, and electrophysiologic evaluation. *J Reconstr Microsurg.* 1994 May; 10(3):137-44.
32. Wang D, Huang X, Fu G, Gu L, Liu X, Wang H, Hu J, Yi J, Niu X, Zhu Q. A simple model of radial nerve injury in the rhesus monkey to evaluate peripheral nerve repair. *Neural Regen Res.* 2014 May 15; 9(10):1041-6.
33. Hess JR1, Brenner MJ, Fox IK, Nichols CM, Myckatyn TM, Hunter DA, Rickman SR, Mackinnon SE. Use of cold-preserved allografts seeded with autologous Schwann cells in the treatment of a long-gap peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jan; 119(1):246-59.
34. Zhu Z1, Zhou X, He B, Dai T, Zheng C, Yang C, Zhu S, Zhu J, Zhu Q, Liu X. Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) Promotes Peripheral Nerve Regeneration and Neovascularization After Acellular Nerve Allografts in a Rat Model. *Cell Mol Neurobiol.* 2014 Oct 16.
35. Mohammadi R1, Saadati A. Influence of insulin-like growth factor I on nerve regeneration using allografts: a sciatic nerve model. *J Craniofac Surg.* 2014 Jul; 25(4):1510-4.
36. Zheng C1, Zhu Q, Liu X, Huang X, He C, Jiang L, Quant D. Improved Peripheral Nerve Regeneration Using Acellular Nerve Allografts Loaded with Platelet-Rich Plasma. *Tissue Eng Part A.* 2014 Sep 29.

37. Squintani G1, Bonetti B, Paolin A, Vici D, Cogliati E, Murer B, Stevanato G. Nerve regeneration across cryopreserved allografts from cadaveric donors: a novel approach for peripheral nerve reconstruction. *J Neurosurg.* 2013 Oct; 119(4):907-13.
38. Elkwood AI, Holland NR, Arbes SM, Rose MI, Kaufman MR, Ashinoff RL, Parikh MA, Patel TR. Nerve allograft transplantation for functional restoration of the upper extremity: case series.
39. *J Spinal Cord Med.* 2011; 34(2):241-7. Isaacs J, Browne T. Overcoming short gaps in peripheral nerve repair: conduits and human acellular nerve allograft. *Hand (N Y).* 2014 Jun; 9(2):131-7
40. Rinker B, Vyas KS. Clinical applications of autografts, conduits, and allografts in repair of nerve defects in the hand: current guidelines. *Clin Plast Surg.* 2014 Jul; 41(3):533-50.
41. Yang XN , Jin YQ, Bi H, Wei W, Cheng J, Liu ZY, Shen Z, Qi ZL, Cao Y. Peripheral nerve repair with epimysium conduit. *Biomaterials.* 2013 Jul; 34(22):5606-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.018. Epub 2013 Apr 24.
42. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA t Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989 Jan; 83(1):129-38.
43. Sarikcioglu L., Demirel B.M., Utuk A., Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat, R E V I E W A R T I C L E,

Folia Morphologica,. Vol.68, No. 1, pp. 1–7, Copyright © 2009 Via Medica, SSN 0015–5659

44. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001 Jul 15;108(1):1-9.
45. Battiston B, Tos P, Conforti LG, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neurorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 100:43-50. Review.
46. Tos P, Battiston B, Nicolino S, Raimondo S, Fornaro M, Lee JM, Chirila L, Geuna S, Perroteau I. Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. *Microsurgery*. 2007; 27(1):48-55.
47. Tos P, Calcagni M, Gigo-Benato D, Boux E, Geuna S, Battiston B. Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: experimental results. *Microsurgery*. 2004;24(6):459-64.
48. Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R, Giacobini-Robecchi MG.
49. Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. *Anat Embryol (Berl)*. 2000 Jun;201(6):475-82.
50. Tos P, Battiston B, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Hill MA, Lanzetta M, Owen ER. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery*. 2000;20(2):65-71

51. Marcoccio I, Vigasio A. Muscle-in-vein nerve guide for secondary reconstruction in digital nerve lesions. *J Hand Surg Am.* 2010 Sep;35(9):1418-26.
52. Snyder CC. Epineurial repair. *Orthop Clin North Am* 1981;12:267–276 Snyder CC, Herzog BG, Johnson EA. Epineurial cuff neurohaphy. *J Bone Joint Surg [Am]*;56:1092. AQ3
53. Ayhan S, Markal N, Siemionow K, Araneo B, Siemionow M. Effect of subepineurial dehydroepiandrosterone treatment on healing of transected nerves repaired with the epineurial sleeve technique. *Microsurgery* 2003;23:49–55.
54. Siemionow M, Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E. Epineurial sleeve neurohaphy: Surgical technique and functional results—A preliminary report. *Ann Plast Surg* 2002;48:281–285.
55. Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Conventional versus epineurial sleeve neurohaphy technique: Functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg* 2002;49:397–403.
56. Ignatiadis IA, Yiannakopoulos CK, Barbitsioti AD, Avram AM, Patralexis HG, Tsolakis CK, Papalois AE, Xenakis TH, Beris AE, Soucacos PN. Diverse types of epineurial conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit. *Microsurgery.* 2007;27(2):98-104.
57. Angius D-Wang H-Spinner RJ et al: A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds, *Biomaterials - Volume 33, Issue 32, November 2012: 8034–8039*



58. Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, Nakamura H.: Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier, Vol 419, Issue 1, 2 March 2012: 130–135
59. Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, Ikada Y, Nakamura H: Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *J Biomed Mater Res Part A* 2013;00A: 000–000.
60. Biazar E and Keshel SHS: A nanofibrous PHBV tube with Schwann cell as artificial nerve graft contributing to Rat sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridge. February 2013, *Cell Commun Adhes* , Vol. 20, No. 1-2, Pages 41-49
61. Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, Garzón I, García-García S, Sáez-Moreno JA, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Campos A, Alaminos M. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration, *J Neural Eng.* 2013 Apr;10(2):026022.
62. Mauro, N., Manfredi, A., Ranucci, E., Procacci, P., Laus, M., Antonioli, D., Mantovani, C., Magnaghi, V. and Ferruti, P., Degradable Poly(amidoamine) Hydrogels as Scaffolds for In Vitro Culturing of Peripheral Nervous System Cells. (2013) *Macromol. Biosci.*, 13: 332–347
63. Quigley AF, Bulluss KJ, Kyrtzlis IL, Gilmore K, Mysore T, Schirmer KS, Kennedy EL, O'Shea M, Truong YB, Edwards SL, Peeters G, Herwig P, Razal JM, Campbell TE, Lowes KN, Higgins MJ, Moulton SE, Murphy MA, Cook MJ,

- Clark GM, Wallace GG, Kapsa RM.: Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve. *J Neural Eng.* 2013 Feb;10(1):016008.
64. Azizi S, Mohammadi R, Amini K, Fallah R. Effects of topically administered FK506 on sciatic nerve regeneration and reinnervation after vein graft repair of short nerve gaps. *Neurosurg Focus.* 2012 May;32(5):E5.
65. Sahenk Z, Seharaseyon J, Mendell JR. CNTF potentiates peripheral nerve regeneration. *Brain Res.* 1994 Aug 29;655(1-2):246-50.
66. English AW, Wilhelm JC, Ward PJ. Exercise, Neurotrophins, and Axon Regeneration in the PNS. *Physiology (Bethesda).* 2014 Nov;29(6):437-445.
67. Chaiyasate K, Schaffner A, Jackson IT, Mittal V. Comparing FK-506 with basic fibroblast growth factor (b-FGF) on the repair of a peripheral nerve defect using an autogenous vein bridge model. *J Invest Surg.* 2009 Nov-Dec;22(6):401-5.
68. Yu W1, Wang J, Yin J. Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neurosci.* 2011 Apr;121(4):176-80.
69. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. Schmidt CE1, Leach JB et al *Annual Reviews in Biomedical Engineering* (2003). 5:293-347
70. Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. Schlosshauer B, Dreesmann L, Schaller HE et al *Neurosurgery.* 2006 Oct;59(4):740-7; discussion 747-8. Review.

71. Incorporation of protein-eluting microspheres into biodegradable nerve guidance channels for controlled release. Goraltchouk A1, Scanga V, Morshead CM et al. *J Control Release*. 2006 Jan 10;110(2):400-7.
  
72. Nerve guidance channels as drug delivery vehicles. Piotrowicz A1, Shoichet MS et al, *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):2018-27.