



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΗ:

Β' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ,

Γ.Ν.Α. ΛΑΪΚΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΝΙΚΗΤΕΑΣ

**«ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΜΦΑΛΙΟ
ΛΩΡΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΤΟΥ
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»**

ΓΟΝΤΙΚΑ ΙΩΑΝΝΑ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ, Msc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΗ:

Β΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ,

Γ.Ν.Α. ΛΑΪΚΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΝΙΚΗΤΕΑΣ

**«ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΜΦΑΛΙΟ
ΛΩΡΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΤΟΥ
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΟΝΤΙΚΑ ΙΩΑΝΝΑ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ, Msc

ΑΘΗΝΑ 2020

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 30/09/2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΟΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Κουράκλης Γρηγόριος:

Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική,
ΓΝΑ Λαϊκό, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

2. Αντωνίου Ευστάθιος (επιβλέπων μέλος):

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμόσχευσης Οργάνων,
Β' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,
Γ.Ν.Α. Λαϊκό.

3. Δημητρούλης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων,
Β' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,
Γ.Ν.Α. Λαϊκό.

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 27/11/2019

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς: 16/12/2019

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Κουράκλης Γρηγόριος:

Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

2. Πολυδώρου Ανδρέας:

Καθηγητής Χειρουργικής, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

3. Μποβιάτσης ευστάθιος:

Καθηγητής Χειρουργικής Β' Νευροχειρουργική & Νευροτραυματιολογική, ΠΓΝ Αττικών Κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

4. Κόντζογλου Κωνσταντίνος:

Καθηγητής Χειρουργικής, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

5. Αντωνίου Ευστάθιος:

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

6. Δημήτρουλης Δημήτριος:

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Οργάνων, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

7. Σαλάκος Χρήστος:

Αναπληρωτής Καθηγητής, Παιδοχειρουργική Κλινική ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Πέτρος Π. Σηφάκης

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: Άριστα

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ο ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἩΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΜΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὍΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΜΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

☩

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

Στην οικογένειά μου και τον σύντροφό μου

Να το μαθαίνεις! Μη σου κακοφανεί!
Ξεκίνα! Πρέπει όλα να τα ξέρεις!
Μάθαινε, άνθρωπε στο άσυλο!
Μάθαινε, άνθρωπε στη φυλακή!
Μάθαινε, γυναίκα στην κουζίνα!
Μάθαινε, εξηντάχρονε!
Ψάξε για σχολείο, άστεγε!
Προμηθέψου γνώση, παγωμένε!
Πεινασμένε, άρπαξε το βιβλίο.
Είναι ένα όπλο!
Μπέρολτ Μπρεχτ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	11
Ευχαριστίες.....	15
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΟΡΩΝ	16
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	17
SUMMARY	19
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	24
1.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	24
1.2 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	24
1.2.1 Περιφερικό Νεύρο.....	25
1.2.2 Νευραξονική Μεταφορά.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	28
2.1 ΝΕΥΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ.....	28
2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ.....	28
2.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ	30
2.4 ΝΕΥΡΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ ΝΕΥΡΑ.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	33
3.1 ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ.....	33
3.2 ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ	34
3.3 ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΝ.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	37
4.1 ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΝΕΥΡΩΝ.....	37
4.2 ΝΕΥΡΙΚΟΙ ΟΔΗΓΟΙ	38

4.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	39
4.3.1 Συνθετικά μη αποικοδομήσιμα πολυμερή.....	39
4.3.2 Αποικοδομήσιμα συνθετικά πολυμερή.	39
4.4 ΦΥΣΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	41
4.4.1 Πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.....	41
4.4.2 Πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	42
4.4.3 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία νευρικού ιστού.	43
4.6 ΝΕΥΡΙΚΑ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΗ ΝΕΥΡΙΚΟ ΙΣΤΟ.....	45
4.6.1 Φλεβικά μοσχεύματα.	45
4.6.2 Αρτηριακά μοσχεύματα.	45
4.5 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΝΕΥΡΙΚΟΥΣ ΟΔΗΓΟΥΣ	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	48
5.1 ΠΛΑΣΜΑ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ (Platelet-Rich Plasma - PRP) ..	48
5.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PRP ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝ.....	49
5.2.1 Στοιχεία από μελέτες σε ζωικά πρότυπα	49
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	53
1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΡΤΗΡΙΩΝ Ο.Λ.....	53
1.2 ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΡΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ	53
1.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΑΡΤΗΡΙΩΝ Ο.Λ.	53
1.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	54
2.4.1 Μονιμοποίηση δειγμάτων.	54
2.4.2 Μικροτόμιση δειγμάτων.	55
2.4.3 Προετοιμασία τομών για χρώση.	55
2.4.4 Ιστολογικές χρώσεις	55

1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ WJ-MSCs.	56
1.5.1. Απομόνωση MSCs από τη Βαρτόνιο Γέλη.	56
1.5.2 Ανακαλλιέργεια MSCs	56
1.5.3 Καταμέτρηση κυττάρων.....	56
1.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.	57
1.6.1 Κυτταροτοξικότητα επαφής.....	57
1.6.2 Μέτρηση λόγου ADP/ATP.	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	59
2.1 ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ.....	59
2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ PRP.....	59
2.3 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.	60
2.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΔΙΣΜΑΤΟΣ.	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	63
3.1 ΛΗΨΗ ΙΣΤΩΝ.	63
3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	63
3.3 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΣΧΥΑΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝ.	64
3.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.	64
3.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ ΜΥΟΣ.....	65
3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	66
4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA.	66
4.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.	66
4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	68
5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	69
5.2 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.	69
5.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΑΔΙΣΜΑΤΟΣ.....	70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	71
6.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	71
6.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΑΞΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ SCHWANN.....	72
6.3 ΛΟΓΟΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΜΥΪΚΗΣ ΜΑΖΑΣ	74
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. Προσωπικά Στοιχεία

Επώνυμο: Γόντικα
Όνομα: Ιωάννα
Ημερομηνία Γέννησης: 23/06/1984
Email: giannagont@gmail.com
Οικογενειακή Κατάσταση: Άγαμη

2. Ακαδημαϊκές Πιστοποιήσεις

- 09/2015-Σήμερα **Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική σχολή Αθηνών**
Υποψήφια διδάκτωρ.
Θέμα διδακτορικής διατριβής: «*Δημιουργία ικρίωματος από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο για την αποκατάσταση δυσλειτουργιών του περιφερικού νευρικού συστήματος*»
- 2012-2014 **Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Ιατρική σχολή Αθηνών**
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:
Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική.
- 2003/2009 **Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας (ΤΕΙ-ΑΘ)**
Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων

***Ο κύκλος σπουδών περιλαμβάνει:** Ανατομία, Φυσιολογία, Βιοστατιστική, Κυτταρική & Μοριακή Βιολογία, Γενική Μικροβιολογία, Βιοχημεία, Μεθοδολογία Εργαστηρίων Πειραματόζων, Ιστοπαθολογία, Διαπίστευση & Συστήματα Ασφάλειας Βιοϊατρικών Εργαστηρίων, Ανοσολογία, Αιματολογία, Αιμοδοσία, Γενετική του Ανθρώπου, Κλινική Χημεία, Εφαρμοσμένη Μοριακή Βιολογία, Μεθοδολογία Έρευνας, κ.α*
- 2002 **2^ο Πειραματικό Ενιαίο Λύκειο Αθηνών**
-

3. Γραπτές Εργασίες

- Διπλωματική εργασία, με τίτλο « *Αποκυτταροποίηση Ομφάλιας αρτηρίας και πιθανή χρήση της ως βιολογικό ικρίωμα*», Στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού διπλώματος 'Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική'.

- Πτυχιακή *Εργασία* «*Αλκοολισμός και επιπτώσεις σε ζωτικά όργανα*» στο πλαίσιο φοίτησης στη τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων.

4. Επαγγελματική Εμπειρία

1/04/2009 έως 30/09/2009

Πρακτική Άσκηση στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

1/10/2009 έως 14/06/2010

Εκπαίδευση στην απομόνωση, καλλιέργεια και κρουοκατάψυξη αρχέγονων αιμοποιητικών και μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων προερχόμενων από τη Βαρτόνιο γέλη του ομφαλίου λώρου, το λιπώδη ιστό και τον μυελό των οστών. Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

15/06/2010 έως 13/04/2018

Τεχνικός εργαστηρίου στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Περιγραφή επαγγέλματος:

Εκπαίδευση και εργασία σε Δωμάτια «Ορθών Εργαστηριακών Πρακτικών» (Good Manufacturing Practices rooms- GMP rooms).

- Επεξεργασία και Κρουοσυντήρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων προερχόμενων από μονάδες ομφαλικού αίματος.
- Καταμέτρηση αιμοποιητικών κυττάρων.
- Τυποποίηση ABO/Rh μονάδων ομφαλικού αίματος.
- Βακτηριακός έλεγχος δειγμάτων.
- Ποιοτικός έλεγχος δειγμάτων μέσω κυτταρομετρία ροής.
- Απομόνωση, καλλιέργεια και κρουοσυντήρηση Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων κυττάρων από τη Βαρτόνιο γέλη, το λιπώδη ιστό και το μυελό των οστών.
- Ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων περιλαμβανομένου της κυτταρικής διαφοροποίησης και κυτταρομετρίας ροής.

Εκπαίδευση και εργασία με βάση τα πρότυπα ποιότητας FACT-NETCORD.

- Συγγραφή τυποποιημένων διαδικασιών λειτουργίας (Standard Operating Procedure).
- Εκτέλεση εσωτερικών και εξωτερικών ποιοτικών ελέγχων που αφορούν τα πρωτόκολλα εργασίας της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλίου Αίματος.

2/5/2018 έως σήμερα

Διορισμός στο Γ.Ν. Βενιζέλειο-ΠΑΓΝΗ και τοποθέτηση ως Τεχνικός εργαστηρίου στη Δημόσια Τράπεζα Ομφαλικών Βλαστοκυττάρων Κρήτης.

5. Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1⁰ Συνέδριο Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής, ανάρτηση πόστερ: “Scaffold creation from human umbilical cord for restoring disorders of the peripheral nervous system”

14th Congress of the Middle East Society for Organ Transplantation poster presentation:

- Human umbilical cord arteries as potential arterial grafts: a proteomic validation of decellularization protocols.
- Investigation of the biomechanical integrity of decellularized rat abdominal aorta.

48th Congress of the European Society for Surgical Research, video presentation: “Allogeneic Aortic Transplantation in Rat Model After Decellularization”

Word Cord Blood Congress and innovative therapies for sickle cell disease, poster presentation: “Proteomic Evaluation Of Decellularisation Protocols In Umbilical Cord Artery”

64⁰ Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, ανάρτηση poster : « Πρωτεομική ανάλυση σε αποκυτταροποιημένες αρτηρίες ομφαλίου λώρου.»

9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας, προφορική ανακοίνωση: «Αποκυτταροποίηση αρτηρίας ομφαλίου λώρου και πιθανή χρήση της ως βιολογικό ικρίωμα»

6. Δημοσιεύσεις σε περιοδικά

Short Term Results of Fibrin Gel Obtained from Cord Blood Units: A Preliminary in Vitro Study.

Mallis, Gontika I, Dimou Z, Panagouli E, Zoidakis J, Makridakis M, Vlahou A, Georgiou E, Gkioka V, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. *Bioengineering (Basel)*. 2019 Aug 2;6(3). pii: E66. doi: 10.3390/bioengineering6030066.

Administration of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet Lysate in Erectile Dysfunction: A Single Center Pilot Study.

Protogerou V, Michalopoulos E, Mallis P, **Gontika I**, Dimou Z, Liakouras C, Stavropoulos-Giokas C, Kostakopoulos N, Chrisofos M, Deliveliotis C. *Bioengineering (Basel)*. 2019 Mar 5;6(1). pii: E21. doi: 10.3390/bioengineering6010021.

Biocompatibility and Immunogenicity of Decellularized Allogeneic Aorta in the Orthotopic Rat Model.

Katsimpoulas M, Morticelli L, **Gontika I**, Kouvakas A, Mallis P, Dipresa D, Böer U, Soudah B, Haverich A, Michalopoulos E, Korossis S *Tissue Eng Part A*. 2019 Mar;25(5-6):399-415. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0037

Decellularized Human Umbilical Artery Used as Nerve Conduit.

Gontika I, Katsimpoulas M, Antoniou E, Kostakis A, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. *Bioengineering (Basel)*. 2018 Nov 21;5(4). pii: E100. doi: 10.3390/bioengineering5040100. PMID: 30469361

Stem cell therapy for erectile dysfunction: Preliminary results from a single-center pilot study in Greece.

Protogerou V, Michalopoulos E, Mallis P, **Gontika I**, C Liakouras C, Stavropoulos-Giokas C, Christofos M, Deliveliotis C. *Hellenic Urology* 2017, 29 (3): 00-00

Investigation of the biomechanical integrity of decellularized rat abdominal aorta.

Katsimpoulas M, Morticelli L, Michalopoulos E, **Gontika I**, Stavropoulos-Giokas C, Kostakis A, Haverich A, Korossis S. *Transplant Proc.* 2015 May;47(4):1228-33. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.11.061

Evaluation of decellularization in umbilical cord artery.

Mallis P, **Gontika I**, Pouligiannopoulos T, Zoidakis J, Vlahou A, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Papassavas A, Stavropoulos-Giokas C. *Transplant Proc.* 2014 Nov;46(9):3232-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.10.027.

Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank.

Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, **Gontika I**, Panagouli E, Koussoulakos SL, Stavropoulos-Giokas C. *Transfusion*. 2014 Dec;54(12):3108-20. doi: 10.1111/trf.12743. Epub 2014 Jun 4.

7. Γλώσσες

Αγγλική (βασική): TOEIC test of English for International communication.
(Score 740 / 900)

8. Γνώσεις Η/Υ

Πιστοποίηση KEY CERT: α) επεξεργασία κειμένου, β) υπολογιστικά φύλλα, γ) υπηρεσίες διαδικτύου.

Εμπειρία χειρισμού: Word, PowerPoint, Excel, Access, Microsoft Outlook, Internet Explorer.

9. Άλλα ενδιαφέροντα

- Αθλητισμός, μέλος αθλητικού συλλόγου πυγμαχίας.
- Υποψήφια εκπαιδευτήρια Βασικής Υποστήριξης Ζωής του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Καρδιοπνευμονικής Αναζωογόνησης.,

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στην Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛΤΟΠΑ) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Διευθύντρια της ΕΛΤΟΠΑ κ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκικόκα, για την προτροπή, τη δυνατότητα και την έμπρακτη υποστήριξη της ώστε να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή στο ερευνητικό εργαστήριο της ΕΛΤΟΠΑ.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμόσχευσης Οργάνων κ. Ευστάθιο Αντωνίου, για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη καθοδήγηση του. Καθώς επίσης τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Κουράκλη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημητρούλη για τη τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Η χειρουργική διαδικασία της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών στην οποία Διευθυντής είναι ο Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Κωστάκης Αλκιβιάδης. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την καθοριστική συμβολή του στην εκτέλεση των χειρουργικών πειραμάτων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κτηνίατρο PhD Κατσιμπούλα Μιχάλη που πραγματοποίησε τη χειρουργική διαδικασία στους επίμυες και ήταν συνεμπνευστής του θέματος της παρούσας διατριβής.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω το συνάδελφό μου στην ΕΛΤΟΠΑ Μιχαλόπουλο Ευστάθιο ο οποίος βοήθησε στην επίβλεψη και το σχεδιασμό των πειραματικών διαδικασιών. Ακόμη τους συναδέλφους μου Χατζησταματίου Φάνη, Μαλλή Παναγιώτη, Δήμου Ζέτα, Παναγούλη Έφη για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση τη παρούσας διατριβής.

Για την ουσιαστική βοήθειά τους στη διαδικασία της Μορφομετρικής Ανάλυσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παγκάκη Σταμάτη και την κ. Κλουκίνα Ισμήνη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τον σύντροφό μου για την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΟΡΩΝ

AOA		Αποκυτταροποιημένη Ομφάλια Αρτηρία
ΚΣΝ	-	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΟΑ	-	Ομφαλική Αρτηρία
ΠΝΣ	-	Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
α- MEM	α-Minimum Essentials Medium	-
ADP	Adenosine diphosphate	Αδενοσινωδιφωσφορικό οξύ
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -1-propanesulfonate hydrate	3 - [(3-χολαμιδοπροπυλ) διμεθυλαμμωνιο] - 1-προπανοσουλφονικό.
Col-I	Collagen I	Κολλαγόνο I
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DMSO	Dimethylsulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αίθυλο διάμινο τετραοϊκό οξύ
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία
FBS	Fetal Bovine Serum	Εμβρυικός Βόειος Ορός
GAGs	Glycosaminoglycans	Γλυκοζαμινογλυκάνες
L-glu	L-glutamine	Γλουταμίνη –L
MHC	Major Histocompatibility Complex	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
MSCs	Multipotent Mesenchymal Stem Cells	Πολυδύναμα Μεσεγχυματικά Στρωματικά Κύτταρα
NaCl	Sodium chloride	Χλωριούχο Νάτριο
PBS	Phosphate Buffer Saline	Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων
PFA	Paraformaldehyde	Παραφορμαλδεύδη
PRP	Platelets Rich Plasma	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
P-S	Penicillin-Streptomycin	Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
ISCT	International Society for Cellular Therapies	Διεθνής Εταιρεία Κυτταρικών Θεραπειών
U.C.	Umbilical Cord	Ομφάλιος Λόρος-Ο.Λ.
WJ	Wharton Jelly	Βαρτόνιος Γέλη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια από της μεγαλύτερες προκλήσεις της χειρουργικής είναι η αποκατάσταση διατμηθέντων περιφερικών νευρών. Παρά τη μεγάλη πρόοδο στη μικροχειρουργική στις περιπτώσεις που υπάρχει κενό μεταξύ των κολοβωμάτων του διατμηθέντος νεύρου, η πλήρης αποκατάσταση παραμένει ζητούμενο. Για την αποκατάσταση τέτοιων βλαβών, είναι απαραίτητη η εφαρμογή νευρικών οδηγών ώστε να γεφυρωθεί το κενό μεταξύ των κολοβωμάτων. Ως νευρικοί οδηγοί έχουν χρησιμοποιηθεί αυτόλογα νευρικά μοσχεύματα, συνθετικά υλικά μη βιοαποικοδομήσιμα ή βιοαποικοδομήσιμα, φυσικά υλικά όπως το κολλαγόνο, η χιτοζάνη και η κερατίνη. Ακόμα ως νευρικοί οδηγοί έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι ιστοί μη νευρικής προέλευσης όπως αγγεία, μύες και ο υποβλεννογόνο του εντέρου.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η επιτυχής αποκυτταροποίηση της ανθρώπινης ομφάλιας αρτηρίας και στη συνέχεια η χρήση της ως νευρικός οδηγός.

Αρχικά αποκυτταροποιήθηκαν $n=25$ ομφάλιες αρτηρίες με τη χρήση υπέρτονων διαλυμάτων και απορροπταντικών. Ακολούθησε η αξιολόγηση της αποκυτταροποίησης με τη χρήση ιστολογικών χρώσεων, ποσοτικοποίηση του DNA που παραμένει μετά την αποκυτταροποίηση και τέλος πραγματοποιήθηκε έλεγχος κυτταροτοξικότητας. Στη συνέχεια οι AOA χρησιμοποιήθηκαν ως νευρικοί οδηγοί σε μοντέλο ισχιακού τραύματος σε επίμυ με έλλειμμα 10 mm. Οι επίμυες καταμεριστήκαν σε τρεις διαφορετικές ομάδες: ομάδα control $n=12$ που ως νευρικός οδηγός χρησιμοποιήθηκε αυτόλογο ισχιακό νεύρο, η ομάδα AOA $n=12$ που χρησιμοποιήθηκαν AOA, και η ομάδα AOA+PRP $n=12$ που χρησιμοποιήθηκαν AOA που στο εσωτερικό τους εγχύθηκε ενεργοποιημένο PRP.

Για την αξιολόγηση της νευρικής αποκατάστασης εφαρμόστηκε η δοκιμασία της ανάλυσης βαδίσματος και ο υπολογισμός του δείκτη λειτουργικότητας του ισχιακού νεύρου. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μορφομετρική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση του ισχιακού νεύρου, καθώς επίσης υπολογίστηκε ο λόγος διατήρησης μυϊκής μάζας.

Το συμπέρασμα της παρούσας διατριβής είναι ότι η AOA μπορεί να υποστηρίξει την επιμήκυνση των αναγεννηθέντων νευρικών ινών σε νευρικό έλλειμμα 10 mm. Ωστόσο υστερεί σε σχέση με τη χρήση αυτόλογου νεύρου ως νευρικός

οδηγός. Αντίθετα όταν η AOA συνδυάστηκε με PRP είχε εξίσου καλά αποτελέσματα με τη χρήση αυτόλογου νεύρου.

.

SUMMARY

One of the biggest challenges in surgery is the restoration of the peripheral nerves. Despite the great advances in microsurgery in cases where there is a gap between the nerve stumps, complete recovery of nerve function has not been achieved. In such lesions, the use of nerve conduit is necessary for bridging the gap between the nerve stumps. A wide variety of biomaterials are being used to promote functional recovery of injured nerves, such as autologous nerve graft, synthetic materials that are non-biodegradable, or biodegradable, natural materials such as collagen, chitosan, and keratin. Furthermore, various tissues of non-neural origin such as vessels, muscles, and intestine submucosa, have been used as nerve conduits.

The aim of this study is to accomplish a successful decellularization of the human umbilical artery (hUA) and then its use as a nervous guide.

Initially, the hUAs were decellularized, with the use of hypertonic solutions and detergents. Subsequently, evaluation of the decellularization performed, with the use of histological stains, DNA quantification and cytotoxicity analysis. Furthermore, a segmental peripheral nerve injury created in 24 Sprague–Dawley rats. The animals were organized into three experimental groups with different forms of repair: autologous nerve graft (n = 12), decellularized hUA (n = 12), decellularized hUA in combination with PRP (n = 12).

For functional recovery evaluation, sciatic faction index and gastrocnemius muscle weight ratio estimated. For the nerve fibre regeneration evaluation, nerve morphometry and immunohistochemistry analysis performed.

According to the results of this study, the hUA can support the proliferation of regenerated nerve fibers in a 10 mm nerve gap. Additionally, the combination of hUA and PRP, have the same results using an autologous nerve graft.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βλάβες του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος (ΠΝΣ) αποτελούν παγκόσμιο κλινικό πρόβλημα, επηρεάζοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και προκαλούν τεράστια κοινωνικό-οικονομική επιβάρυνση, αφού αυτού του είδους τραυματισμοί αφορούν κυρίως άτομα παραγωγικής ηλικίας^{1,2,3}. Ενδεικτικά, μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, πραγματοποιούνται ετησίως περισσότερες από 50,000 χειρουργικές επεμβάσεις για την αποκατάσταση τραυμάτων του ΠΝΣ⁴. Ενώ στην Ευρώπη καταγράφονται πάνω από 300,000 περιστατικά τραυματισμών του ΠΝΣ,⁵ ανά έτος.

Πάρα την πρόοδο που συντελείται στον τομέα της μικροχειρουργικής η πλήρης αποκατάσταση της νευρικής λειτουργίας δεν έχει ακόμα επιτευχθεί⁶. Τα αρνητικά αποτελέσματα προκύπτουν από παράγοντες τόσο εγγενείς όσο και εξωγενείς στο νευρικό σύστημα, όπως ο τύπος και το επίπεδο τραυματισμού του νευρικού ιστού, η ακεραιότητα του περιβάλλοντος ιστού, ο χρόνος που μεσολαβεί από τον τραυματισμό μέχρι τη χειρουργική επέμβαση και οι αλλαγές που συντελούνται στους νευρώνες του νωτιαίου μυελού και στα τελικά όργανα^{7,8,9}.

Εντός ενός κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος το ΠΝΣ έχει την εγγενή δυνατότητα αναγέννησης των νευρικών αξόνων. Η επινευρική συρραφή των κολοβωμάτων που είναι η συνήθης χειρουργική αποκατάσταση σε μη ελλειμματικές διατομές περιφερικού ιστού, μπορεί να οδηγήσει σε αναγκαστική εξώθηση των νευρικών αξόνων και ακατάλληλη σύζευξη των νευρικών δεσμίδων, γεγονός που με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία νευρώματος. Επιπρόσθετα στην περίπτωση που ο τραυματισμός του περιφερικού ιστού δεν επιτρέπει τη συρραφή των δυο κολοβωμάτων λόγω ελλείμματος νευρικού ιστού, η θεραπεία πρώτης εκλογής είναι η μεταμόσχευση αυτόλογου νεύρου¹⁰. Ωστόσο από τα πιο σοβαρά μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν τα εξής: α) οι πηγές νευρικού ιστού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι ιδιαίτερα περιορισμένες και β) η ανάγκη δεύτερης χειρουργικής επέμβασης για τη λήψη του νευρικού μοσχεύματος^{11,12,13}.

Οι παραπάνω περιορισμοί έχουν σαν αποτέλεσμα την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων για την αποκατάσταση βλαβών του ΠΝΣ με τις μεθόδους της αναγεννητικής ιατρικής και της ιστομηχανικής.

Παράλληλα με την εξέλιξη της ιστομηχανικής δημιουργήθηκε ένα πιο εξειδικευμένο πεδίο που ασχολείται αποκλειστικά με τη δημιουργία νευρικών

μοσχευμάτων (Tissue Engineered Nerve Grafts, TENGs)¹⁴. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει τη δημιουργία τρισδιάστατων ικριωμάτων – οδηγών ή αλλιώς νευρικών αγωγών – οδηγών, οι οποίοι γεφυρώνουν το κενό μεταξύ του κεντρικού και περιφερικού διατιμηθέντος νευράξονα ενώ, σε πολλές περιπτώσεις οι αγωγοί-οδηγοί λειτουργούν και ως φορείς κυττάρων ή αυξητικών παραγόντων^{15,16}.

Το 1928 ο Cajal¹⁷ περιέγραψε το φαινόμενο της χημειοταξίας των νεύρων. Αυτή η παρατήρηση έδωσε την αφορμή για τη βαθμιαία ανάπτυξη των νευρικών οδηγών και την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη.

Ο Chiu και οι συνεργάτες του¹⁸, το 1982 πραγματοποίησαν κλινική δοκιμή σε 22 ασθενείς με τραυματισμούς σε περιφερικά νευρά. Σε αυτή την κλινική δοκιμή χρησιμοποιήθηκε ως νευρικός οδηγός μόσχευμα αυτόλογης φλέβας για τη γεφύρωση μικρών ελλειμμάτων (<3 cm) με πολύ καλά αποτελέσματα. Ακόμα, ο Gu και οι συνεργάτες¹⁹ του, δημιούργησαν νευρικό οδηγό από χιτοζάνη σε συνδυασμό με πολύ(γλυκολικό οξύ) (PGA) για τη γεφύρωση ελλείμματος μήκους 30 mm στο δεξιό αντιβράχιο ενός άνδρα 55 χρόνων. Τρία χρόνια μετά την επέμβαση, ο ασθενής έδειξε ικανοποιητική αισθητική, καθώς και λειτουργική ανάκαμψη.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αρχικά αποκυτταροποιήθηκαν ανθρώπινες ομφάλιες αρτηρίες. Ακολούθησαν τόσο ποιοτικοί όσο και ποσοτικοί έλεγχοι ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση γενετικού υλικού και η καλή διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τέλος, στις AOA πραγματοποιήθηκε κυτταροτοξικός έλεγχος. Αφού ολοκληρώθηκαν επιτυχώς οι παραπάνω έλεγχοι οι ομφάλιες αρτηρίες χρησιμοποιήθηκαν ως νευρικοί οδηγοί σε μοντέλο ισχιακού τραύματος σε επίμου με έλλειμμα 10 mm. Αναλυτικότερα δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες ζωικών προτύπων (n=12 η κάθε ομάδα). Συγκεκριμένα, η ομάδα που χρησιμοποιήθηκε η AOA ως νευρικός οδηγός, η ομάδα AOA+PRP που χρησιμοποιήθηκε η AOA σε συνδυασμό με αυτόλογο PRP και τέλος δημιουργήθηκε η ομάδα ελέγχου, όπου ως οδηγός χρησιμοποιήθηκε αυτόλογο ισχιακό νεύρο.

Για την παρασκευή του PRP πραγματοποιήθηκε λήψη 2ml περιφερικού αίματος σε κάθε επίμου. Το αίμα του επίμου συλλέχθηκε σε μπουκαλάκι κενού που περιείχε 3,2 % κιτρικό νάτριο. Με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις επιτεύχθηκε η συμπύκνωση των αιμοπεταλίων και η απομάκρυνση των έμμορφων συστατικών του αίματος.

Πριν τη χειρουργική επέμβαση οι επίμυες εκπαιδεύτηκαν στη βάρδια εντός ενός διαδρόμου από πλεξιγκλάς ώστε να πραγματοποιηθεί η δοκιμασία που ονομάζεται δείκτης λειτουργικότητας ισχιακού νεύρου. Η παραπάνω δοκιμασία εφαρμόστηκε στους επίμυες πριν τη χειρουργική επέμβαση και μετά τη χειρουργική επέμβαση κατά τη 4^η και τη 12^η εβδομάδα. Με αυτή τη δοκιμασία αξιολογείται η κινητική αποκατάσταση των χειρουργημένων άκρων και είναι ενδεικτική για την επανανεύρωση του γαστροκνημίου μυός. Στη συνέχεια οι επίμυες θανατώθηκαν και ακολούθησε ιστολογικός έλεγχος των νευρικών μοσχευμάτων και των γαστροκνήμιων τόσο στο χειρουργημένο οπίσθιο άκρο όσο και στο φυσιολογικό. Αναλυτικότερα οι ιστολογικοί έλεγχοι περιλάμβαναν μορφομετρική αξιολόγηση και ανοσοϊστοχημική ανάλυση των νευρικών μοσχευμάτων. Τέλος υπολογίστηκε ο λόγος διατήρησης της μυϊκής μάζας του γαστροκνημίου. Ο λόγος διατήρησης της μυϊκής μάζας είναι μια άλλη παράμετρος η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες για το βαθμό της επανανεύρωσης που συνδέεται με την έκταση της μυϊκής ατροφίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το νευρικό σύστημα αποτελεί την ακρογωνιαία βάση και το θεμελιώδες μέσο, με το οποίο ο άνθρωπος αποκτά την ικανότητα να προσλαμβάνει, να κωδικοποιεί, να συγκρατεί και να αντιδρά στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, για να πετύχει την προσαρμογή και την επιβίωσή του. Αποτελεί, στην ουσία, το κέντρο που ρυθμίζει και ελέγχει τη λειτουργία όλων των οργάνων του ανθρώπινου σώματος.

Διαιρείται ανατομικά σε δύο τμήματα: το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), που αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό και το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ). Με τη σειρά του, του ΠΝΣ αποτελείται από τα εγκεφαλικά και τα νωτιαία νεύρα, με τα νευρικά τους γάγγλια.

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός είναι τα κύρια κέντρα όπου γίνεται η διαπλοκή, η συσχέτιση και η ολοκλήρωση των νευρικών πληροφοριών και για το λόγο αυτό είναι καλά προφυλαγμένοι. Τόσο ο εγκέφαλος όσο και ο μυελός περικλείουν εσωτερικά και περιβάλλονται εξωτερικά από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και προστατεύονται επιπρόσθετα από τα οστά του κρανίου και της σπονδυλικής στήλης. Στο ΠΝΣ τα εγκεφαλικά και νωτιαία νεύρα, άγουν τις πληροφορίες προς και από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα νεύρα, αν και περιβάλλονται από ινώδη έλυτρα, καθώς πορεύονται στα διάφορα μέρη του σώματος, είναι σχετικά απροστάτευτα και συχνά τραυματίζονται²⁰.

1.2 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.

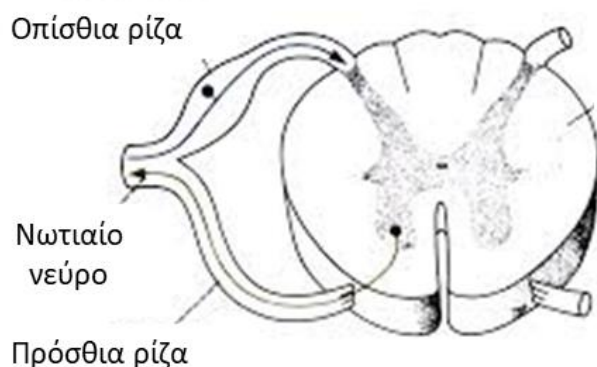
Υπάρχουν 12 ζεύγη εγκεφαλικών νεύρων τα οποία εκπορεύονται από τον εγκέφαλο και εξέρχονται από τα τμήματα του κρανίου και 31 ζεύγη νωτιαίων νεύρων. Τα νωτιαία νεύρα αναδύονται από το νωτιαίο μυελό και εξέρχονται από τα μεσοσπονδύλια τμήματα της σπονδυλικής στήλης. Τα νωτιαία νεύρα παίρνουν το όνομά τους σύμφωνα με τις μοίρες της σπονδυλικής στήλης από όπου εξέρχονται:

- 8 ζεύγη αυχενικών νεύρων
- 12 ζεύγη θωρακικών νεύρων
- 5 ζεύγη οσφυϊκών νεύρων
- 5 ζεύγη ιερών νεύρων

➤ 1 ζεύγος κοκκυγικού νεύρου

Κάθε νωτιαίο νεύρο συνδέεται με τον νωτιαίο μυελό με την πρόσθια (κινητική ρίζα) και την οπίσθια (αισθητική) ρίζα. Οι νευρικές ίνες που εξέρχονται από την πρόσθια ρίζα απάγουν νευρικές ώσεις από το ΚΝΣ και ονομάζονται απαγωγοί ή φυγόκεντρες ίνες. Το απαγωγό σκέλος του ΠΝΣ μπορεί περαιτέρω να διαιρεθεί σε δυο μικρότερα βασικά λειτουργικά συστήματα: το σωματικό (κινητικό) και το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Οι απαγωγές κινητικές οδοί είναι υπεύθυνες για την εκούσια δραστηριότητα, όπως η συστολή των σκελετικών μυών, ενώ το αυτόνομο νευρικό σύστημα δεν υπάγεται στη θέλησή μας και έχει ως λειτουργική του αποστολή τον έλεγχο των καθημερινών αναγκών και απαιτήσεων του σώματος χωρίς τη συνειδητή συμμετοχή του νου^{20,21}. Τέλος οι νευρικές ίνες που εξέρχονται από την οπίσθια ρίζα ονομάζονται αισθητικές ίνες και άγουν πληροφορίες προς το ΚΝΣ, σχετικές με την αφή, τη πίεση, το πόνο, τη θερμοκρασία και τις δονήσεις.

Οι δύο ρίζες του νωτιαίου νεύρου συνενώνεται και σχηματίζουν το νωτιαίο νεύρο, το οποίο αποτελείται και από κινητικές και από αισθητικές ίνες (εικόνα 2)²⁰.

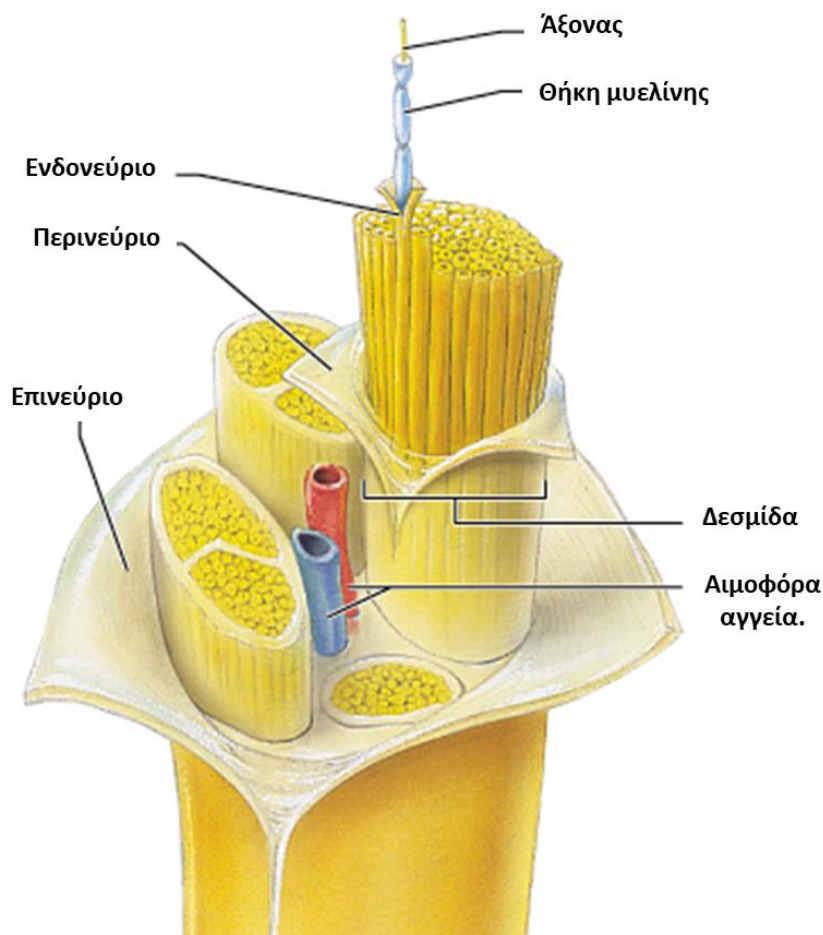


Εικόνα 1. <http://www.eclass.teipel.gr/modules/document/file.php.pdf> Εγκάρσια διατομή νωτιαίου μυελού. Σχηματική απεικόνιση σχηματισμού νωτιαίου νεύρου.

1.2.1 Περιφερικό Νεύρο.

Ένα τυπικό περιφερικό νεύρο αποτελείται από έναν αριθμό νευρικών ινών, οι οποίες μπορεί να είναι κεντρομόλες ή φυγόκεντρες σε σχέση με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Τα περιφερικά νεύρα οργώνονται με τον έξης τρόπο: οι νευρικές ίνες συγκεντρώνονται σε δεσμίδες. Κάθε μεμονωμένη νευρική ίνα, μαζί με τα κύτταρα Schwann που την επενδύουν, περιβάλλεται από ένα λεπτό κάλυμμα χαλαρού αγγειακού στηρικτικού ιστού το ενδονεύριο, ενώ κάθε δεσμίδα νευρικών

ινών περιβάλλεται από μία πυκνή στιβάδα ισχυρού κολλαγόνωδους ιστού, το περινεύριο. Τέλος, το επινεύριο βρίσκεται στα περιφερικά νεύρα τα οποία αποτελούνται από περισσότερες από μια δεσμίδες. Αποτελεί μία επιπλέον στιβάδα χαλαρού κολλαγόνωδους ιστού ο οποίος συνδέει τις δεσμίδες μεταξύ τους (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Copyright 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc. Σχηματική απεικόνιση της ανατομίας του περιφερικού νεύρου.

Οι περιφερικές νευρικές ίνες ταξινομούνται σε τρεις τύπους ανάλογα με το πάχος και τη ταχύτητα αγωγής της διέγερσης.

- **Νευρικές ίνες τύπου Α.** Έχουν διάμετρο 1-20 μm , ταχύτητα αγωγής 5-120 μέτρων το δευτερόλεπτο. Είναι εμμύελες ίνες, οι οποίες ταξινομούνται σε προσαγωγές και απαγωγές.
- **Νευρικές ίνες τύπου Β.** Έχουν διάμετρο 1-3 μm , ταχύτητα αγωγής 3-15 μέτρων το δευτερόλεπτο. Εμμύελες απαγωγοί προγαγγλιακές ίνες του αυτόνομου συστήματος.

- **Νευρικές ίνες τύπου Γ.** Έχουν διάμετρο 0,5-2 μm και ταχύτητα αγωγής 0,5-2 μέτρων το δευτερόλεπτο. Αμύελες ίνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

1.2.2 Νευραξονική Μεταφορά.

Κατά μήκος του νευράξονα λειτουργεί ένα συνεχές σύστημα μεταφοράς δυο κατευθύνσεων, φυγόκεντρος και κεντρομόλος ροή. Με αυτό το σύστημα διακινούνται πολλές ουσίες και οργανίδια όπως νευροδιαβιβαστές μιτοχόνδρια, RNA, πρωτεΐνες κ.α.

Στο κυτταρικό σώμα του νευρώνα συντίθενται τα απαραίτητα στοιχεία για την επιβίωση του νευράξονα, το οποία μεταφέρονται σε αυτόν μέσω της φυγόκεντρης ροής. Αντίθετα με την κεντρομόλο ροή μεταφέρονται πίσω στο κυτταρικό σώμα οργανίδια και πρωτεΐνες ώστε να αποδομηθούν και να ξαναχρησιμοποιηθούν. Ακόμα με τη κεντρομόλο ροή μεταφέρεται και η πληροφορία για την κατάσταση του νευράξονα αλλά και του οργάνου που νευρώνει ^{22,23}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΝΕΥΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

Ο όρος νευρική βλάβη αναφέρεται στη διαταραχή της λειτουργίας του νεύρου που έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μετάδοσης του δυναμικού ενεργείας. Η δυσλειτουργία των περιφερικών νεύρων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της βλάβης του νευρώνα, των κυττάρων Schwann ή του ελύτρου της μυελίνης. Η βλάβη των περιφερικών νεύρων μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς, καθένας από τους οποίους προκαλεί συγκεκριμένου τύπου βλάβη. Ο τραυματισμός των περιφερικών νεύρων είναι σχετικά συχνός. Τα κυριότερα αίτια είναι η διατομή, ο μωλωπισμός, η διάταση και η συμπίεση ενώ σπανιότερο αίτιο είναι το τραύμα από ένεση ²¹.

2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ

Δύο είναι τα συστήματα ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται ευρέως: η ταξινόμηση κατά Seddon και η ταξινόμηση κατά Sunderland. Η ταξινόμηση κατά Seddon κατατάσσει τη νευρική βλάβη σε τρία στάδια: τη νευροπραξία, την αξονότμηση και τη νευρότμηση ²⁴ ενώ ο Sunderland σε πέντε βαθμούς ²⁵.

Ταξινόμηση κατά Seddon:

Νευροπραξία: Αντιστοιχεί σε παροδική αδυναμία αγωγής του ηλεκτρικού ερεθίσματος λόγω απομυελίνωσης χωρίς απώλεια της συνέχειας του νευράξονα. Η αποκατάσταση στην περίπτωση αυτή είναι άριστη και επέρχεται εντός ωρών, ημερών ή λίγων μηνών. Ένα συνηθισμένο παράδειγμα τέτοιου είδους βλάβης είναι η πίεση νεύρου κατά τη διάρκεια του ύπνου.

Αξονότμηση: Ως αξονότμηση χαρακτηρίζεται η λύση της συνέχειας του νευράξονα, με αποτέλεσμα τη δευτερογενή εκφύλιση κατά Waller στο περιφερικό τμήμα. Δηλαδή, εντοπίζεται καταστροφή του νευράξονα κάτω από το επίπεδο διατομής του (σπάνια και πάνω από αυτό), με συνέπεια την κατάργηση των κινητικών, αισθητικών και νευροφυτικών λειτουργιών. Ωστόσο το περινεύριο και τα κύτταρα Schwann παραμένουν μερικώς ή πλήρως ανέπαφα. Η πρόγνωση είναι συνήθως καλή, εφόσον διατηρηθούν σε καλή κατάσταση οι μύες, οι αρθρώσεις και το δέρμα.

Νευρότμηση: Με τον όρο νευρότμηση περιγράφεται το νεύρο εκείνο που έχει υποστεί διατομή τόσο των αξόνων όσο και των ενδονευρικών σωλήνων. Το εγγύς νευρικό άκρο υφίσταται εξοίδηση σε ποικίλο βαθμό και παλίνδρομη εκφύλιση. Στη συνέχεια αναπτύσσεται νεύρωμα (από συνδετικό ιστό και ομάδα περιπλεγμένων εκφυλιζόμενων νευραξόνων) και ακολουθεί βαλεριανή εκφύλιση, ενώ οι ενδονευρικοί σωλήνες συρρικνώνονται. Επιπροσθέτως, παρατηρείται καταστροφή του επινευρίου. Χωρίς χειρουργική επέμβαση η πρόγνωση για αυτόματη αποκατάσταση είναι αρκετά πτωχή.

Ταξινόμηση κατά Sunderland:

Η βλάβη πρώτου βαθμού αντιστοιχεί με τη νευραπραξία κατά την ταξινόμηση του Seddon. Χαρακτηρίζεται από φραγμό της νευρικής αγωγής χωρίς όμως να υπάρχει βλάβη στον νευρικό άξονα και στους γύρω ιστούς.

Στη δευτέρου βαθμού βλάβη υπάρχει διατομή του νευρικού άξονα με τη διατήρηση όμως των γύρω δομών και του ενδονευρίου. Η αποκατάσταση της κινητικής και αισθητικής λειτουργίας αναμένεται να είναι πλήρης.

Στη βλάβη τρίτου βαθμού το περινεύριο και το επινεύριο διατηρούνται ακέραια ωστόσο ο νευράξονας και το ενδονεύριο έχουν διαμηθεί. Η αποκατάσταση εξαρτάται από την ικανότητα των νευρικών αξόνων να φθάσουν στους ενδονευρικούς σωλήνες του περιφερικού νευρικού τμήματος ξεπερνώντας το σημείο της βλάβης.

Στην τέταρτου βαθμού βλάβη μόνο το επινεύριο διατηρεί τη συνέχεια του νευρικού κορμού αφού οι υπόλοιπες υποδομές του νευρικού ιστού έχουν διαμηθεί. Σε νευρικές βλάβες αυτού του βαθμού η αποκατάσταση χωρίς χειρουργική επέμβαση έχει πτωχά αποτελέσματα.

Στην πέμπτου βλάβη βαθμού υπάρχει πλήρης διατομή του νευρικού ιστού. Ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης είναι η χειρουργική αποκατάσταση της συνέχειας του νεύρου.

Ποιο πρόσφατα περιγράφηκε από τον Mackinnon και τους συνεργάτες του η νευρική βλάβη έκτου βαθμού, γνωστή ως «νεύρωμα σε συνέχεια». Σε αυτού του τύπου τη βλάβη συνυπάρχουν, η απώλεια της συνέχειας των νευραξόνων και φραγμός στη νευρική αγωγή ²⁶.

2.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Όπως είναι γνωστό ο νευράξονας ενός νευρικού κυττάρου περιέχει περίπου το 90% του συνολικού όγκου του αξονοπλάσματος. Η διακοπή της συνεχείας του νευράξονα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά, τόσο το περιφερικό τμήμα όσο και το κεντρικό ακόμα και το ίδιο τον νευρώνα. Μετά τη διατομή του νευράξονα και μέσα στις 2 πρώτες ώρες, τα δυο κολοβώματα απομακρύνονται το ένα από το άλλο²⁷ και ενεργοποιείται μια σειρά μηχανισμών με απώτερο σκοπό τη νευρική αναγέννηση.

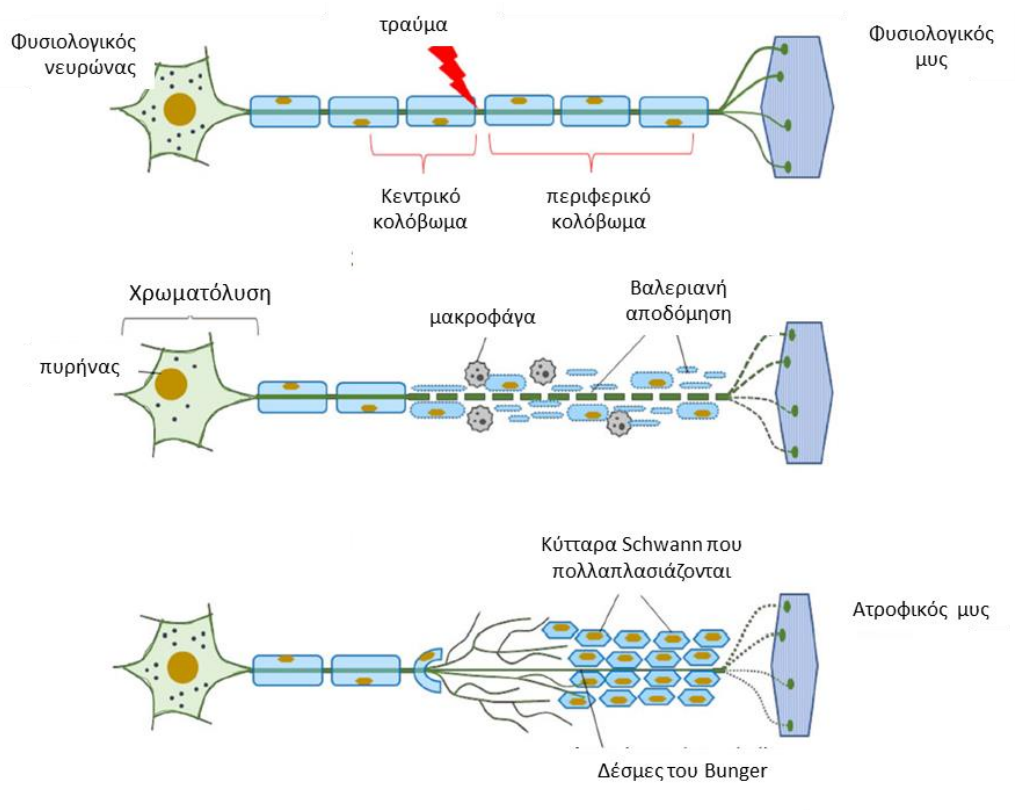
Στο περιφερικό κολόβωμα λίγες ώρες μετά τη διατομή πυροδοτείται μια σειρά γεγονότων που ονομάζονται «βαλεριανή εκφύλιση»²³. Αρχικά παρατηρείται οίδημα του νευράξονα στη συνέχεια η μυέλινη κατακερματίζεται και τέλος φαγοκύτταρα εισβάλλουν στο σημείο της βλάβης^{23,27,28}.

Τα κύτταρα του Schwann αυξάνονται λόγω της μιτωτικής δραστηριότητας και σχηματίζουν τις δέσμες του Büngner. Αυτές οι δέσμες παράγουν τροφικούς παράγοντες για την υποστήριξη της επιβίωσης του νευρώνα και της αναγέννησης του νευράξονα. Επιπρόσθετα οι ταινίες του Büngner λειτουργούν και ως οδηγοί για την πορεία των αναγεννητικών ριζιδίων^{29,30}.

Η διακοπή της συνεχείας του νευρικού άξονα οδηγεί στην απώλεια της παλίνδρομης μεταφοράς τροφικών και υποστηρικτικών παραγόντων προς το κυτταρικό σώμα. Γεγονός που μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στον κυτταρικό θάνατο ορισμένων νευρώνων. Στο κεντρικό κολόβωμα η εκφύλιση των νευραξόνων επεκτείνεται και κεντρικότερα από το σημείο της βλάβης για αρκετούς κόμβους του Ranvier, όπου στη θέση τους μένουν κενοί ενδονευρικοί σωλήνες^{29,30}. Οι νευρώνες προσπαθώντας να ανακτήσουν τον αξονοπλασματικό τους όγκο, από το κεντρικό κολόβωμα κάθε νευράξονα παράγουν έναν αριθμό από τελικά ή πλευρικά ριζίδια που προχωρούν προς την περιφέρεια (εικόνα 3)²⁹.

Αλλαγές συντελούνται και στο κυτταρικό σώμα του νευρώνα. Αναλυτικότερα, παρατηρείται η μετατόπιση του πυρήνα στη περιφέρεια και ταυτόχρονη αύξηση των νευρονηματίων, με αποτέλεσμα το κυτταρικό σώμα να εμφανίζεται αραιοχρωματικό και διογκωμένο με έκκεντρο πυρήνα (χρωματόλυση) (εικόνα 3). Επιπρόσθετα συντελούνται βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές στη σύνθεση των πρωτεϊνών και του RNA με αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνών που είναι

απαραίτητες για τη σύνθεση του νευρικού άξονα και την ελαττωμένη παραγωγή νευροδιαβιβαστών^{27,22}.



Εικόνα 3. Τροποποιημένη εικόνα από το άρθρο “*Peripheral nerve conduits: Technology update*”.³¹. Σχηματική απεικόνιση των αλλαγών που συντελούνται στον νευρικό άξονα μετά από τραυματισμό.

2.4 ΝΕΥΡΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ ΝΕΥΡΑ.

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, οι νευρώνες που επέζησαν από τη νευρική βλάβη ξεκινούν τη διαδικασία της αναγέννησης των νευρικών αξόνων. Η αναγεννητική διαδικασία ξεκινάει με την ανάπτυξη πολλαπλών νευραξόνων-ριζιδίων. Τα ριζίδια εκβάλουν είτε από το πέρας του κολοβώματος είτε από τον πρώτο κόμβο του Ranvier. Ο κάθε νευράξονας μπορεί να αναπτύξει εκτεταμένη διακλάδωση καταλήγοντας να έχει 50 με 100 περιφερικές απολήξεις. Με αυτό τον τρόπο στο πέρας του κάθε νευρικού άξονα δημιουργείται ένας αναπτυξιακός κώνος που είναι υπεύθυνος για τον προσανατολισμό της αξονικής επιμήκυνσης³². Μετά την είσοδο στο περιφερικό κολόβωμα από τους 50 με 100 αναγεννώμενους

νευράξονες, μόνο λίγοι συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Τελικά, όταν επισυμβούν οι τελικές συνάψεις στα όργανα στόχους μόνο ένας νευράξονας θα παραμείνει.

Προϋπόθεση για την αποκατάσταση της λειτουργίας νευρώνα είναι ο κάθε αναγεννώμενος νευρικός άξονας να καταλήξει στο ίδιο τύπου όργανο όπως πριν τη βλάβη. Η ειδικότητα της αναγέννησης των νευραξόνων επιτυγχάνεται μέσω των εξής μηχανισμών³³:

- **Αναγέννηση εξ επαφής.** Οι αναγεννώμενοι νευρικοί άξονες έρχονται σε επαφή με τις δέσμες των Schwann κυττάρων στο περιφερικό κολόβωμα. Εντοπίζοντας τη κατάλληλη μοριακή υπογραφή επιλέγουν σε ποια δέσμη θα επιμηκυνθούν.
- **Νευροτροπισμός.** Στο περιφερικό κολόβωμα παράγονται χημικές ουσίες οι οποίες ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, οδηγούν το νευράξονα στο κατάλληλο όργανο στόχο.
- **Νευροτροφισμός.** Όταν ο νευράξονας εισέλθει στην κατάλληλη δεσμίδα Schwann κυττάρων, υποστηρίζεται η ανάπτυξη του από νευροτροφικούς παράγοντες που μεταφέρονται από το μητρικό νευράξονα. Διαφορετικά ο νευράξονας υποστρέφει.

Παρά τους μηχανισμούς της εγγενούς αναγέννησης του περιφερικού νευρικού συστήματος η τελική λειτουργική αποκατάσταση συχνά δεν είναι ικανοποιητική. Η καθυστέρηση στην επανανεύρωση, ο λανθασμένος προσανατολισμός των αναγεννώμενων νευραξόνων μπορούν να οδηγήσουν σε φαινόμενα με σοβαρές λειτουργικές συνέπειες^{34,23}.

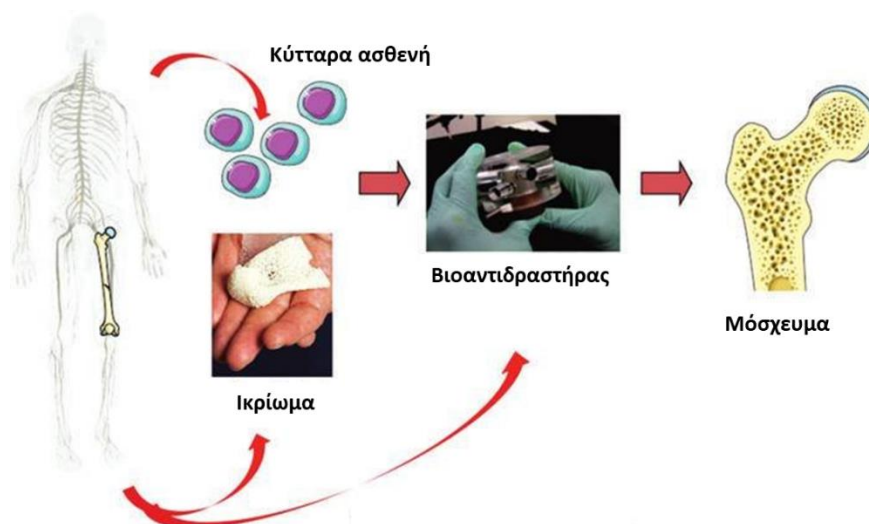
Όπως αναφέρουμε και παραπάνω σε αρκετές περιπτώσεις νευρότμησης όπου δημιουργείται κενό μεταξύ των νευρικών κολοβωμάτων ακόμα και η χειρουργική επέμβαση δεν έχει ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Λύσεις γι' αυτό το πρόβλημα αναζητούνται στον τομέα της ιστομηχανικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ

Η ιστομηχανική συνδυάζει της αρχές της βιολογίας, της μηχανικής και της ιατρικής για τη δημιουργία βιολογικών υποκατάστατων, που αντικαθιστούν ή βελτιώνουν, τη λειτουργία ιστών και οργάνων, που έχουν υποστεί βλάβη είτε λόγω κάποιου τραυματισμού, είτε λόγω κάποιας νόσου³⁵. Επιπρόσθετα, με τις μεθόδους της ιστομηχανικής μπορούν να δημιουργηθούν υψηλής ποιότητας βιολογικά μοντέλα για τη μελέτη της ανταπόκρισης των κυττάρων και των ιστών σε γενετικές μετατροπές, φάρμακα, υποξία και μηχανικά ερεθίσματα³⁶.

Η σοβαρή έλλειψη κατάλληλων ιστών και οργάνων για δωρεά, καθώς και η αύξηση των ασθενών που χρειάζονται μεταμόσχευση, έδωσαν κίνητρο στους ερευνητές να στρέψουν την προσοχή τους στη δημιουργία υποκατάστατων φυσιολογικών ιστών με βάση κυτταρικούς πληθυσμούς. Σε αυτή τη διαδικασία συνδυάζονται κυτταρικοί πληθυσμοί, ετερόλογοι ή αυτόλογοι, η χρήση ικριωμάτων, αυξητικών παραγόντων και βιοαντιδραστήρων³⁷.



Εικόνα 4. Τροποποιημένη εικόνα από το άρθρο “*Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering*”³⁸. Παράδειγμα εφαρμογής της ιστομηχανικής σε ιστική βλάβη οστού. Αυτόλογα κύτταρα του ασθενούς τοποθετούνται σε ικρίωμα, επωάζονται με τη χρήση βιοαντιδραστήρα και στη συνέχεια μεταμοσχεύονται στο όργανο που έχει υποστεί τη βλάβη.

Μέχρι στιγμής, η ιστομηχανική βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην αποκατάσταση δερματικών, οστικών και χόνδρινων βλαβών ενώ επεκτείνεται σε ακόμα πολυπλοκότερες δομές όπως ο νευρικός, μυϊκός και συνδετικός ιστός. Επιπλέον

στοχεύει στη δημιουργία οργάνων όπως παγκρέατος, ήπατος, οισοφάγου και τραχείας¹⁴. Από τα βασικά εργαλεία της ιστομηχανικής είναι τα ικριώματα τα οποία αποτελούν δομικά στοιχεία για τη δημιουργία υποκατάστατων ιστών.

3.2 ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ

Στον ανθρώπινο οργανισμό η εξωκυττάρια ουσία (ΕΚΟ) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και μετανάστευση των κυττάρων. Επίσης προσδίδει στον ιστό τρισδιάστατη δομή και τις μηχανικές του ιδιότητες. Σημαντική είναι λοιπόν η δημιουργία τρισδιάστατων δομών που προσομοιάζουν στις ιδιότητες της ΕΚΟ. Στην ιστομηχανική τέτοιες τρισδιάστατες δομές είναι τα ικριώματα³⁹.

Τα ικριώματα διακρίνονται κυρίως σε δυο μεγάλες κατηγορίες, στα πορώδη προκατασκευασμένα ικριώματα και τον αποκυτταροποιημένο βιολογικό ιστό.

Τα πορώδη προκατασκευασμένα ικριώματα χωρίζονται στα φυσικά προκατασκευασμένα και στα συνθετικά προκατασκευασμένα. Ως πρώτη ύλη για τη δημιουργία φυσικού πορώδους ικριώματος χρησιμοποιούνται πολυμερή που λαμβάνονται από φυσικές πηγές. Ενδεικτικά, ευρύτατα έχουν χρησιμοποιηθεί, το κολλαγόνο, το υαλουρονικό οξύ, η χιτοζάνη και άλλα^{40,41,42,43}. Αυτά τα υλικά έχουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα, προβλέψιμες φυσικές μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες⁴⁴. Ωστόσο, το βασικό μειονέκτημα που παρουσιάζουν αυτά τα υλικά είναι ότι δεν εμφανίζουν τις επιθυμητές μηχανικές ιδιότητες γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους⁴⁵.

Τα συνθετικά πορώδη ικριώματα μπορούν να ταξινομηθούν στα μη-απορροφήσιμα και τα βιοαποικοδομήσιμα. Ένα από τα πλεονεκτήματα των μη-απορροφήσιμων ικριωμάτων είναι η βιολογική τους αδράνεια και η μη ανοσολογική απόκριση του λήπτη⁴⁶. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι το πολυεθυλαίνιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυστυρένιο (PS). Τα βιοαποικοδομήσιμα από την άλλη πλευρά προσφέρουν το πλεονέκτημα της *in vivo* σταδιακής τους αποδόμησης και αντικατάστασης τους από τον νέο αναγεννημένο ιστό. Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και πολυκαπρολακτόνη (PCL) χρησιμοποιούνται ευρέως από την ιστομηχανική, για τη δημιουργία βιοαποικοδομήσιμων ικριωμάτων^{47,48}. Ένα από τα πλεονεκτήματα τους είναι ότι

παρέχουν τη δυνατότητα να τροποποιούνται οι μηχανικές τους ιδιότητες και να καθορίζεται ο ρυθμός με τον οποίο αποικοδομούνται. Επίσης, είναι δυνατό να κατασκευάζονται σε διάφορα σχήματα με την επιθυμητή μορφολογία η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη των ιστών⁴⁹.

Ικρίώματα που προέρχονται από αποκυτταροποιημένη ΕΚΟ έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση πολλών ιστών συμπεριλαμβανομένων καρδιακών βαλβίδων⁵⁰, νεύρων⁵¹, τενόντων⁵², οστών⁵³ και αγγείων⁵⁴. Τα αποκυτταροποιημένα ικρίωματα μπορούν να μεταμοσχευθούν είτε σε ιστό από τον οποίο προέρχονται είτε σε ένα διαφορετικό ιστό. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο αποκυτταροποιημένος υποβλεννογόνο του λεπτού εντέρου, που χρησιμοποιείται για αγγειακό μόσχευμα⁵⁵. Επιπλέον, στην ΕΚΟ διατηρούνται διάφοροι αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να διευκολύνουν την περαιτέρω ανάπτυξη των κυττάρων⁵⁶.

3.3 ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΝ

Η αποκυτταροποίηση είναι η διαδικασία απομάκρυνσης των κυτταρικών πληθυσμών ενός ιστού ή οργάνου διατηρώντας την ΕΚΟ. Βιολογικά ικρίωματα που έχουν προκύψει με τη συγκεκριμένη τεχνική, χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε προ-κλινικές εφαρμογές ζωικών προτύπων^{57,15,58,16}.

Η ΕΚΟ αποτελείται από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες των κυττάρων των ιστών ή των οργάνων. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι διάφοροι τύποι κολλαγόνου, λαμινίνης και φιμπρονεκτίνης. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν δυναμικά με τα κύτταρα, επηρεάζοντας ενεργά την προσκόλληση, μετανάστευση, διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους^{59,60,61}.

Εξειδικευμένες τεχνικές αποκυτταροποίησης έχουν αναπτυχθεί, οι οποίες συνήθως περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό φυσικών, χημικών και ενζυμικών μεθόδων^{62,63}. Με ποιο τρόπο και συνδυασμό θα χρησιμοποιηθούν οι παραπάνω τεχνικές εξαρτάται από τον ιστό που κάθε φορά αποκυτταροποιείται, για παράδειγμα από το πάχος του, το ποσοστό λίπους που περιέχει, την πυκνότητά του και αλλά⁶⁴. Τελικός σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων κυττάρων και πυρηνικών υπολειμμάτων, χωρίς να αλλοιωθούν οι μηχανικές ιδιότητες και η βιοχημική σύνθεση της ΕΚΟ.

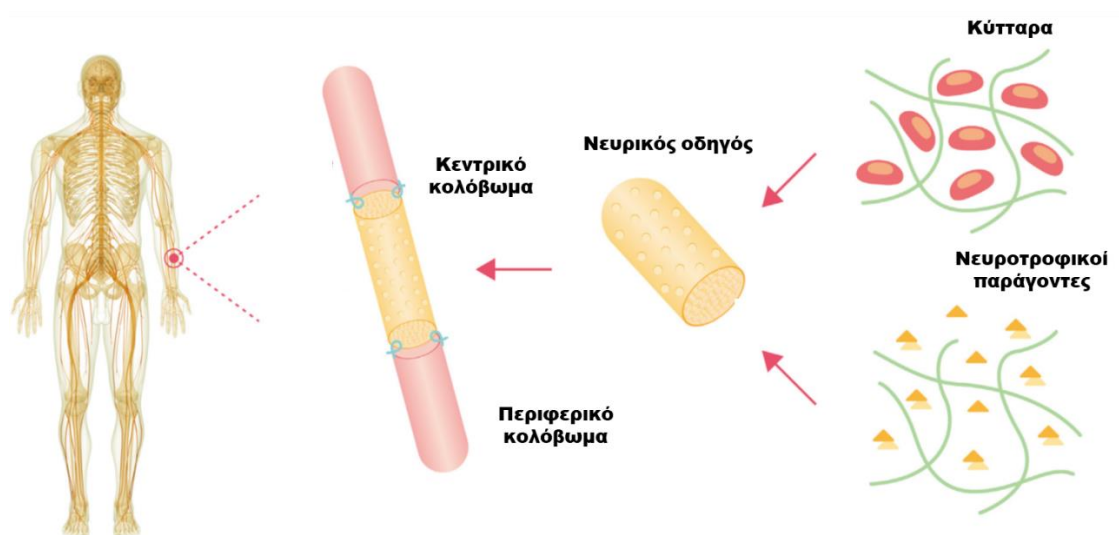
Βέβαια, καμία τεχνική αποκυτταροποίησης δεν επιτυγχάνει πλήρη απομάκρυνση των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό απαιτείται καθορισμός των κυτταρικών υπολειμμάτων μέσω ιστολογικών κυρίως τεχνικών αλλά και καθορισμός του περιεχόμενου DNA στο αποκυτταροποιημένο ικρίωμα. Σύμφωνα με τον Crago και τους συνεργάτες του τα ελάχιστα κριτήρια για την επιτυχή αποκυτταροποίηση ιστών ή οργάνων είναι τα ακόλουθα⁶⁴.

- < 50 ng ds DNA ανά mg ξηρού βάρους ΕΚΟ.
- Μήκος μορίων DNA < 900 βάσεις.
- Έλλειψη πυρηνικών υλικών σε ιστολογικές τομές με χρώση DAPI ή H&E.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΝΕΥΡΩΝ

Παράλληλα με την εξέλιξη της ιστομηχανικής δημιουργήθηκε ένα πιο εξειδικευμένο πεδίο που ασχολείται αποκλειστικά με τη δημιουργία νευρικών μοσχευμάτων (Tissue Engineered Nerve Grafts TENGs)¹⁴. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει τη δημιουργία τρισδιάστατων ικριωμάτων – οδηγών ή αλλιώς νευρικών αγωγών – οδηγών οι οποίοι γεφυρώνουν το κενό μεταξύ του κεντρικού και περιφερικού διατιμηθέντος νευροάξονα ενώ, σε πολλές περιπτώσεις οι αγωγοί-οδηγοί λειτουργούν και ως φορείς κυττάρων ή αυξητικών παραγόντων (εικόνα 5)^{15,16}.



Εικόνα 5. Τροποποιημένη εικόνα από το άρθρο “Scaffolds for peripheral nerve repair and reconstruction”⁶⁵. Σχηματική απεικόνιση εφαρμογής νευρικού οδηγού, εμπλουτισμένου με νευροτροφικούς παράγοντες και κύτταρα σε διατομή περιφερικού νεύρου.

Η δημιουργία τεχνητών νευρικών οδηγών είναι γνωστή με τον αγγλικό όρο «entubulation», επειδή τα άκρα των νεύρων, συμπεριλαμβανομένου του μεταξύ τους κενού περικλείονται εντός του αγωγού. Διάφορα βιολογικά και συνθετικά υλικά έχουν μελετηθεί για την παρασκευή νευρικών αγωγών, ώστε να συνδυάζονται οι παράμετροι (φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί) που απαιτούνται προκειμένου να καθοδηγηθεί η επιμήκυνση και η αναγέννηση των τραυματισμένων ή και διατιμηθέντων νευραξόνων^{66,67}. Για παράδειγμα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για

την παρασκευή νευρικών οδηγών είναι το πολυγλυκολίδιο, το κολλαγόνο αλλά και διάφοροι αποκυτταροποιημένοι ιστοί όπως οι φλέβες, οι μυϊκές ίνες και ο νευρικός ιστός^{68,19,69}. Βασικά κριτήρια επιλογής υλικών για τη δημιουργία νευρικών οδηγών είναι η βιοσυμβατότητα, η βιοαπορροφησιμότητα και οι μηχανικές ιδιότητες του υλικού, οι οποίες θα πρέπει να προσομοιάζουν με εκείνες του νευρικού ιστού^{70,71,72}.

4.2 ΝΕΥΡΙΚΟΙ ΟΔΗΓΟΙ

Η ανάγκη για ελαχιστοποίηση των επιπλοκών της συλλογής αυτόλογου νεύρου, όπως ο σχηματισμός νευρώματος, η δημιουργία ουλής στο δέρμα και έλλειψη αίσθησης στο σημείο από όπου θα γίνει η λήψη του νευρικού μοσχεύματος, οδήγησαν στη δημιουργία των νευρικών οδηγών. Οι επιθυμητές ιδιότητες νευρικών οδηγών είναι⁷³:

- **Διαπερατότητα.** Τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο θα πρέπει να μπορούν να διαχέονται στο σημείο της βλάβης.
- **Ευελιξία.** Για την αποφυγή μηχανικών βλαβών τόσο στον νευρικό ιστό όσο και στον περιβάλλοντα ιστό.
- **Ρυθμός αποικοδόμησης.** Οι υψηλοί ρυθμοί αποδόμησης μπορεί να οδηγήσουν σε διόγκωση και φλεγμονή του νευρικού ιστού, ενώ οι χαμηλοί ρυθμοί μπορεί να προκαλέσουν χρόνια ανοσοποιητική απόκριση.

Μέχρι σήμερα, πολλά συνθετικά και φυσικά υλικά έχουν σχεδιαστεί και κατασκευαστεί για τη δημιουργία νευρικών οδηγών που όλο και σε μεγαλύτερο βαθμό πληρούν τις παραπάνω ιδιότητες.

4.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.

4.3.1 Συνθετικά μη αποικοδομήσιμα πολυμερή.

Η συνθετική μη αποικοδομήσιμη σιλικόνη είναι ένα από τα πρώτα υλικά που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία νευρικών οδηγών. Κλινικές μελέτες που πραγματοποίησε ο Lundborg και οι συνεργάτες του σε ασθενείς με νευρικό έλλειμμα μήκους 3 mm έως 5 mm έδειξαν καλή κινητική και αισθητική ανάκαμψη τρία χρόνια μετά τη χειρουργική επέμβαση^{73,74}. Επιπλέον μια μελέτη 5ετούς παρακολούθησης των ασθενών έδειξε ότι οι νευρικοί οδηγοί από σιλικόνη έχουν καλά μακροπρόθεσμα αποτελέσματα⁷⁵. Δεδομένου ότι η σιλικόνη έχει καλά αποτελέσματα στην αναγέννηση περιφερικών νευρών, έχει χρησιμοποιηθεί και ως πρότυπο για τη μελέτη βιοχημικών σημάτων και μονοπατιών που ενεργοποιούνται κατά τη διαδικασία της νευρικής αποδόμησης και αναγέννησης^{76,77}.

Ένα άλλο συνθετικό μη αποικοδομήσιμο πολυμερές υλικό που έχει χρησιμοποιηθεί στην αναγέννηση περιφερικού νεύρου είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη. Ο Bittner και οι συνεργάτες, καθώς επίσης και άλλες ερευνητικές ομάδες, έχουν χρησιμοποιήσει τη πολυαιθυλενογλυκόλη σε μοντέλο ισχιακού τραύματός σε επίμου. Η αποκατάσταση των νευραξόνων πραγματοποιήθηκε τόσο στην περίπτωση της σύνθλιψης του ισχιακού νεύρου (αξονότμηση), όσο και στην περίπτωση της πλήρους διατομής του (νευρότμηση)^{78,79,80,81}. Ωστόσο η επίδραση της πολυαιθυλενογλυκόλης στη διαδικασία αναγέννησης των περιφερικών νεύρων είναι αμφιλεγόμενη ή τουλάχιστον όχι πλήρως προσδιορισμένη^{82,83}.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση συνθετικών μη αποικοδομήσιμων πολυμερών στην κλινική χρήση έχει αρκετά εγγενή μειονεκτήματα. Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα τους είναι η χρόνια ανοσολογική αντίδραση ενάντιων του ξένου σώματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ανάγκη δεύτερης χειρουργικής επέμβασης για την απομάκρυνση του υλικού⁸⁴.

4.3.2 Αποικοδομήσιμα συνθετικά πολυμερή.

Από τα πιο διαδεδομένα αποικοδομήσιμα πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί και σαν νευρικοί οδηγοί είναι το πολυγλυκολικό οξύ. Χαρακτηριστικό

παράδειγμα είναι το Neurotube™ (Synovis Micro Companies Alliance, Birmingham, AL, ΗΠΑ). Το Neurotube™ είναι νευρικός οδηγός από πολυγλυκολικό οξύ ο οποίος διατίθεται ως τυποποιημένο εμπόρευμα για πειραματική και κλινική χρήση.

Ηλεκτροφυσικές και λειτουργικές εξετάσεις σε ασθενείς που εφαρμόστηκαν νευρικοί οδηγοί από πολυγλυκολικό οξύ, έδειξαν την αποκατάσταση των τραυματισμένων νευρικών αξόνων και την επανανεύρωση των μυών^{85,86}. Ακόμα μοριακές μελέτες έχουν δείξει ότι νήματα πολυγλυκολικού οξέος μπορούν να υποστηρίξουν τη μετανάστευση των Schwann κυττάρων και προωθούν το σχηματισμό των ταινιών του Bungner⁸⁷.

Το πολυγλυκολικό οξύ, όταν είναι συνδεδεμένο, με γαλακτικό οξύ με εστερικούς δεσμούς, αποδίδει ένα προϊόν πολυμερισμού που ονομάζεται πολύ-γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ. Το πολύ-γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ έχει επίσης εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής για κλινική χρήση λόγω των βιοσυμβατών χαρακτηριστικών του. Νευρικοί οδηγοί από αυτό το υλικό προσφέρουν μηχανική υποστήριξη του νευρικού ιστού, εμποδίζουν τη εισβολή κυτταρικών πληθυσμών στο σημείο της νευρικής βλάβης και διευκολύνουν τη νευρική αναγέννηση^{88,89}.

Ένα άλλο παράδειγμα συνθετικού αποικοδομήσιμου πολυμερούς που έχει χρησιμοποιηθεί ως νευρικός οδηγός είναι το συμπολυμερές πολυγαλακτικού οξέος καπρολακτόνης, ως εξωτερικός σωλήνας που στο εσωτερικό του έχει τοποθετηθεί μετουσιωμένος μυϊκός ιστός. Τέτοιου είδους νευρικό οδηγό χρησιμοποίησε ο Mligiliche για τη γεφύρωση 5 cm νευρικού χάσματος σε ισχιακό νεύρο κονίκλου⁹⁰. Επιπρόσθετα, νευρικοί οδηγοί από πολύ L-λακτίδιο, πολύ-γλυκολίδιο σε αναλογία 90:10 και από συμπολυεστέρα (DL-λακτίδιο-επιλόν-καπρολακτόνη), χρησιμοποιήθηκαν για να γεφυρώσουν νευρικό έλλειμμα 10 mm σε ισχιακό νεύρο επίμυ. Και οι δύο τύποι συνθετικών αποικοδομήσιμων πολυμερών διευκόλυναν την κινητική και αισθητική λειτουργική ανάκτηση σε διάστημα 20 εβδομάδων⁹¹.

4.4 ΦΥΣΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

4.4.1 Πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες

Μία ποικιλία πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών, όπως η χιτοζάνη, το αλγινικό, η κερατίνη, η πρωτεΐνη μεταξιού αραβοσίτου και η ινώδης πρωτεΐνη του μεταξιού, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία νευρικών μοσχευμάτων.

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από τη χημική απο-ακετυλίωση της χιτίνης, τον κύριο δομικό πολυσακχαρίτη που απαντάται στα καρκινοειδή και τα οστρακοειδή. Το συγκεκριμένο υλικό έχει πολλές δομικές ομοιότητες με ένα από τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, τις γλυκοζαμινογλυκάνες. Λόγω των μη τοξικών και βιοαποικοδομήσιμων χαρακτηριστικών της, η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα πολλά υποσχόμενο βιολογικό υλικό με πολλές εφαρμογές στην ιατρική^{92,93,94}. Αρχικά οι *in vitro* μελέτες βιοσυμβατότητας έδειξαν ότι η ίνα ή η μεμβράνη της χιτοζάνης υποστήριζαν την επιβίωση και ανάπτυξη των ιπποκαμπικών νευρώνων και των κυττάρων Schwann, ανοίγοντας το δρόμο για τη χρήση της χιτοζάνης σε εφαρμογές της ιστομηχανικής νευρικών ιστών^{95,96}. Μελέτες που χρησιμοποιήθηκε η χιτοζάνη για τη γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 10 mm ή 15 mm έδειξαν αξιοσημείωτη κινητική και αισθητηριακή λειτουργική ανάκαμψη^{97,98}. Επιπρόσθετα η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί για τη γεφύρωση μεγάλου νευρικού ελλείμματος σε μοντέλο διαβητικού επίμου, επιτυγχάνοντας παρόμοια αποτελέσματα στη νευρική αποκατάσταση με αυτό της χρήσης αυτόλογου νευρικού μοσχεύματος^{99,100,101}. Τέλος, νευρικοί οδηγοί χιτοζάνης έχουν εμπλουτιστεί με αυξητικούς παράγοντες, όπως ο νευρικός αυξητικός παράγοντας, με πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα σε ζωικά πρότυπα¹⁰².

Το αλγινικό άλας, που ονομάζεται επίσης αλγινικό οξύ, είναι ένας πολυσακχαρίτης που απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα των καφέ φυκιών. *In vitro*, μελέτες έδειξαν ότι αλγινική υδρογέλη σε συνδυασμό με κύτταρα Schwann επάγουν την ανάπτυξη των νευρικών αξόνων από τα ραχιαία γάγγλια^{103,104}. Ο Sufan W. και οι συνεργάτες του, χρησιμοποίησαν σπόγγους αλγινικού για την αποκατάσταση νευρικού ελλείμματος 50 mm σε ισχιακό νεύρο γάτας. Οκτώ μήνες μετά τη την επέμβαση υπήρξε αποκατάσταση των νωτιαίων αντανεκλαστικών¹⁰⁴. Ακόμα ο συνδυασμός αλγινικής υδρογέλης και φιμπρονεκτίνης έδειξαν ότι μπορούν να υποστηρίξουν την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων¹⁰⁵. Ωστόσο, ένα από τα

βασικά μειονεκτήματα του αλγινικού άλατος είναι η φυσική παρουσία ακαθαρσιών, όπως βαρέα μέταλλα, ενδοτοξίνες, πρωτεΐνες και πολυφαινολικές ενώσεις, που οφείλονται στη θαλάσσια προέλευσή του. Ως εκ τούτου, το αλγινικό πρέπει να καθαριστεί σε μια διαδικασία εκχύλισης πολλαπλών σταδίων σε πολύ υψηλή καθαρότητα προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων ανοσογονικές ή φλεγμονώδεις αποκρίσεις, κατά την εμφύτευση¹⁰⁶.

Η κερατίνη είναι μια ινώδης πρωτεΐνη που βρίσκεται στα μαλλιά και στα νύχια. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η κερατίνη επάγει την προσκόλληση και μετανάστευση των Schwann κυττάρων^{107,108}. Νευρικοί οδηγοί κερατίνης χρησιμοποιήθηκαν για τη γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 4 mm σε κνημιαίο νεύρο επίμυ και σε νευρικά ελλείμματα 10 mm και 15 mm ισχιακού νεύρου επίμυ με ικανοποιητικά αποτελέσματα^{108,109,110}. Επιπλέον, αγωγοί NeuraGen® εμπλουτισμένοι στο εσωτερικό τους με υδρογέλη κερατίνης, μεταμοσχεύθηκαν σε πιθήκους *Macaca fascicularis* για την αποκατάσταση ελλείμματος 10 mm στο μέσο νεύρο¹¹¹.

Επίσης, από τον ιστό της αράχνης μπορεί να απομονωθεί μια ινώδης πρωτεΐνη μεταξιού (Spider silk protein). Η πρωτεΐνη μεταξιού αράχνης έχει εξαιρετική αντοχή στον εφελκυσμό, καλή ελαστικότητα και βραδεία βιοαποδομησιμότητα. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει σε ζωικά πρότυπα νευρικούς οδηγούς από πρωτεΐνη μεταξιού σε συνδυασμό με κυτταρικούς πληθυσμούς ή αλλά φυσικά υλικά^{112,113,114,115}.

4.4.2 Πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

Πολλά κοινώς χρησιμοποιούμενα φυσικά υλικά για τη δημιουργία νευρικών ικριωμάτων είναι συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, π.χ. κολλαγόνο, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη, γλυκοζαμινογλυκάνη και ελαστίνη.

Το κολλαγόνο είναι ένα βασικό διαρθρωτικό βιοπολυμερές που αποτελεί το 30% της μάζας των σπονδυλωτών. Στον ανθρώπινο οργανισμό το κολλαγόνο είναι το κύριο συστατικό των συνδετικών ιστών. Παρέχει δομική υποστήριξη σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένων των οστών, του δέρματος, των τενόντων, του χόνδρου και των νεύρων¹¹⁶. Ικριώματα με βάση το κολλαγόνο έχουν εφαρμοστεί ευρέως στον τομέα της μηχανικής ιστών και της αναγεννητικής ιατρικής. Ο

Archibald και οι συνεργάτες του το 1991 και το 1995 μεταμόσχευσαν νευρικό οδηγό από κολλαγόνο σε έλλειμμα 4 mm 5 mm αντίστοιχα στο μέσο νεύρο πιθήκου *Macaca fascicularis*. Τα αποτελέσματα στη νευρική αποκατάσταση ήταν παρόμοια με αυτά των πιθήκων *Macaca fascicularis* που σαν νευρικός οδηγός χρησιμοποιήθηκε αυτόλογος νευρικός ιστός^{117,118}. Στις μέρες μας νευρικοί οδηγοί από κολλαγόνο χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη και είναι εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα, όπως το NeuraGen®, NeuroWrap™ (Integra Life Sciences Corp., Plainsboro, NJ, Η.Π.Α.)^{119,68,120}.

Μια άλλη πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που έχει χρησιμοποιηθεί στην αναγέννηση περιφερικών νευρών είναι η λαμινίνη. Σε εργαστηριακά πειράματα φάνηκε ότι η λαμινίνη ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των Schwann κυττάρων καθώς επίσης υποστηρίζει την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων^{121,122}. Σε πειράματα με ζωικά πρότυπα έχει χρησιμοποιηθεί για τη γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 8 mm σε ισχιακό νεύρο και ελλείμματος 10 mm σε κνημιαίο νεύρο^{123,124}. Ο Neal και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι πλέγματα από μικροΐνες λαμινίνης ενισχύουν την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων χωρίς τη χρήση νευροτροφικών παραγόντων¹²⁵. Το υαλουρονικό οξύ είναι ένα βιοπολυμερές σύμπλεγμα σακχάρων της οικογένειας των γλυκοζαμινογλυκανών, το οποίο εκτός από τις ιδιότητές του στην επούλωση τραυμάτων^{126,127} χρησιμοποιείται και για τη δημιουργία νευρικών οδηγών^{128,129}. Επιπρόσθετα διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν δημιουργήσει νευρικούς οδηγούς συνδυάζοντας το κολλαγόνο τη φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη και το υαλουρονικό οξύ σε διάφορους συνδυασμούς με ενθαρρυντικά αποτελέσματα^{130,131,132}.

4.4.3 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία νευρικού ιστού.

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του νευρικού ιστού μπορεί να αποτελέσει μια ιδανική εναλλακτική λύση στην ιστομηχανική νευρών, αφού είναι μια τρισδιάστατη δομή παρόμοια με τον νευρικό ιστό. Παρέχει φυσική και μηχανική υποστήριξη για τα κύτταρα και τους νευρικούς άξονες. Επιπλέον παρέχει βιοχημικά σήματα για τη μετανάστευση των Schwann κυττάρων¹³³. Ο τρόπος για να χρησιμοποιηθεί η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία είναι η απομάκρυνση όλου του κυτταρικού πληθυσμού του νευρικού ιστού ώστε να μειωθούν οι επιπλοκές από την ανοσολογική απόκριση. Ο Vasudevan και οι συνεργάτες του, χρησιμοποίησαν αποκυτ-

ταροποιημένο νευρικό ιστό για τη γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 35 mm σε ισχιακό νεύρο επίμυ. Δώδεκα εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, η λειτουργική ανάκτηση των νεύρων και των μυών ήταν συγκρίσιμη με αυτή του αυτόλογου νεύρου¹³⁴. Άλλη ερευνητική ομάδα μεταμόσχευσε αποκυτταροποιημένο περονιαίο νεύρο για να γεφυρώσει έλλειμμα περονιαίου νεύρου 20 mm. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι επιτεύχθηκε η σύνδεση των δυο νευρικών κολωβωμάτων και ενισχύθηκε η αναγέννηση των νευραξόνων. Ωστόσο όταν το πείραμα επαναλήφθηκε σε νευρικό έλλειμμα 40 mm η νευρική αναγέννηση απέτυχε¹³⁵. Η εταιρία AxoGen Inc. (Alachua, FL, USA) έλαβε έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για κλινική χρήση αποκυτταροποιημένου νευρικού ιστού με την εμπορική ονομασία Avance®. Ο Whitlock και οι συνεργάτες του, συνέκριναν το Avance® με άλλο εγκεκριμένο από την FDA εμπορικό προϊόν NeuraGen®, το οποίο είναι νευρικός οδηγός με βάση το κολλαγόνο (βλέπε κεφ. 4.4.2)¹⁰⁶. Η απόδοση του Avance® αξιολογήθηκε σε μοντέλο ισχιακού ελλείμματος μήκους 14 mm και διαπιστώθηκε ότι είναι τόσο καλή όσο το NeuraGen®. Επιπρόσθετα σε σύγκριση με τα αυτόλογα νεύρα δεν παρουσίασαν σχεδόν καμία διαφορά μετά από 12 εβδομάδες. Το 2009, το Avance® αξιολογήθηκε σε κλινικές μελέτες. Νευρικοί οδηγοί, μοσχεύματα μήκους 0,5-30 mm εμφυτεύθηκαν χειρουργικά σε δύο ραχιαία και οκτώ δακτυλικά αισθητήρια νεύρα, πέντε ανδρών και δύο γυναικών. Η κλινική αξιολόγηση μετά από 9 μήνες έδειξε την αισθητική αποκατάσταση των δακτύλων¹³⁶.

4.6 ΝΕΥΡΙΚΑ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΗ ΝΕΥΡΙΚΟ ΙΣΤΟ.

4.6.1 Φλεβικά μοσχεύματα.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει φλεβικά μοσχεύματα σαν νευρικούς οδηγούς. Το 2016 ο Özkan και οι συνεργάτες του, μεταμόσχευσαν μηριαία φλέβα όπου το εσωτερικό της είχε γεμίσει με ετερόλογο στρωματικό αγγειακό κλάσμα (SVF), σε έλλειμμα κνημιαίου νεύρου 8 mm σε αρουραίους¹³⁷. Αν και το πάχος της μυελίνης και η διάμετρος των νευραξόνων δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα αυτόλογα μοσχεύματα, ο αριθμός των νευρικών ινών ήταν αισθητά μικρότερος στην ομάδα του μοσχεύματος φλεβών-SVF. Σε παλιότερη μελέτη, η ερευνητική ομάδα του Fernandes χρησιμοποίησε ως νευρικό οδηγό φλεβικό μόσχευμα που στο εσωτερικό του είχαν εγκατασταθεί μεσεγγυματικά κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών, για την αποκατάσταση ελλείμματος 8 mm ισχιακού νεύρου επίμυος. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ομάδα των επίμυων που χρησιμοποιήθηκε το φλεβικό μόσχευμα ως νευρικός είχε καλύτερη νευρική αποκατάσταση σε σχέση με την ομάδα των επίμυων που χρησιμοποιήθηκαν αυτόλογα νευρικά μοσχεύματα¹³⁸.

Τα πειράματα που συνδυάζουν μοσχεύματα φλεβών με PRP έχουν δείξει περισσότερο υποσχόμενα αποτελέσματα. Μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2014 έδειξε την αποκατάσταση 10 mm νευρικού ελλείμματος σε ισχιακό νεύρο επίμου με τη χρήση ως νευρικού οδηγού τη σφαγίτιδα φλέβα, που στη εσωτερική της κοιλότητα είχε εισαχθεί ετερόλογο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια¹³⁹. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και πιο πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε φλεβικό μόσχευμα σε συνδυασμό με αυτόλογο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια¹⁴⁰.

4.6.2 Αρτηριακά μοσχεύματα.

Ο Firat και οι συνεργάτες του, μεταμόσχευσαν αλλογενείς αρτηρίες σε επίμυες με 10 mm νευρικό χάσμα στο ισχιακό νεύρο. Ενώ παρατηρήθηκε λειτουργική αποκατάσταση, η ομάδα που χρησιμοποιήθηκε αυτόλογο νεύρο είχε καλύτερα αποτελέσματα¹⁴¹. Η ερευνητική ομάδα του Mohammadi πραγματοποίησε πείραμα με δυο ομάδες επίμυων για τη γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 10 mm

στο ισχιακό νεύρο. Στη μια ομάδα χρησιμοποιήθηκε η κοιλιακή αορτή που στο εσωτερικό της πραγματοποιήθηκε έγχυση με αλατούχο διάλυμα και στην άλλη ομάδα κοιλιακή αορτή που είχαν εγκατασταθεί μεσεγγυματικά κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών (BMSCs). Τα αποτελέσματα εμφάνισαν έναν πολύ μεγαλύτερο αριθμό αναγεννημένων νευρικών ινών με αυξημένη διάμετρο στα μοσχεύματα εμπλουτισμένα με BMSCs έναντι αλατούχου¹⁴².

4.5 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΝΕΥΡΙΚΟΥΣ ΟΔΗΓΟΥΣ

Οι ιδιότητες των βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται ως νευρικοί οδηγοί, συμπεριλαμβανομένης της υλικής φύσης τους, τον προσανατολισμό τους και την κατασκευή τους, καθορίζουν θεμελιωδώς τα αποτελέσματα της νευρικής αναγέννησης. Όμως, τα αποτελέσματα ανάκτησης της νευρικής λειτουργίας μπορούν να βελτιωθούν σε μεγάλο βαθμό με την προσθήκη κυτταρικών πληθυσμών και βιοδραστικών μορίων¹⁴³.

Από πειραματικές μελέτες φαίνεται ότι ο συνδυασμός κυτταρικών πληθυσμών όπως κυττάρων του Σβαν, βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών, μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από λιπώδη ιστό, και νευρικών οδηγών, διευκολύνει την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και την επανασύνδεση των οργάνων στόχων^{144,145,146,147,148}.

Ο Σπυριδόπουλος και οι συνεργάτες του μεταμόσχευσαν σε νευρικό έλλειμμα περιφερικού νεύρου χοίρου, νευρικό οδηγό από κολλαγόνο που στο εσωτερικό του είχαν προσκολληθεί βλαστικά κύτταρα οδοντικού πολφού¹⁴⁹. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, επίσης, ενισχύουν την αναγέννηση νεύρων όταν χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία τραυματισμού περιφερικού νεύρου^{150,151}. Επιπρόσθετα, νέες μελέτες έδειξαν ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα επιταχύνουν επίσης την αναγέννηση των τραυματισμένων περιφερικών νεύρων^{152,153}.

Στην ιστομηχανική νεύρων, ο συνδυασμός νευροτροφικών παραγόντων με νευρικούς οδηγούς είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος. Νευροτροφικοί παράγοντες όπως ο νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο (BDNF), η νευροτροφίνη -3 και νευροτροφίνη 4/5, και ο παράγοντας ανάπτυξης νεύρων (NGF) προάγουν τη νευρωνική επιβίωση, διεγείρουν την αξονική επιμήκυνση και

παρέχουν σημαντικά βιοχημικά στοιχεία για τη λειτουργική ανάκτηση τραυματισμένων νεύρων^{154,84}. Παρόλο που η προσθήκη νευροτροφικών παραγόντων παρουσιάζει πλεονεκτήματα, η χρήση τους έχει ορισμένους περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της ακούσιας ενεργοποίησης πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε ανεπιθύμητα βιολογικά αποτελέσματα, π.χ. ανώμαλη βλάστηση που σχετίζεται με τη χρήση του NGF, βραχεία ημιζωή των νευροτροφικών παραγόντων και κακή σταθερότητα^{155,156,157}. Οι περιορισμοί αυτοί μπορούν να ξεπεραστούν αυξάνοντας τις γνώσεις μας για τους νευροτροφικούς και αυξητικούς παράγοντες μειώνοντας έτσι ακούσιες επιπτώσεις. Ομοίως, με τη βελτιστοποίηση της κινητικής απελευθέρωσης των νευροτροφικών παραγόντων (χρησιμοποιώντας νέες τεχνολογίες βιοϋλικών) το μειονέκτημα της περιορισμένης ημιζωής τους μπορεί να ξεπεραστεί.

Ακόμα πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει ενεργοποιημένο PRP σε συνδυασμό με νευρικούς οδηγούς για τη βελτίωση της νευρικής αποκατάστασης. Μεγαλύτερη ανάλυση για το PRP θα γίνει στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 ΠΛΑΣΜΑ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ (Platelet-Rich Plasma - PRP)

Το (PRP) είναι πλάσμα, το οποίο μετά από κατάλληλη επεξεργασία εμφανίζει μεγάλη πυκνότητα αιμοπεταλίων. Πρόκειται για ένα βιολογικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως αυτόλογο είτε ως ετερόλογο. Το PRP προκύπτει μετά από φυγοκέντρηση του ολικού αίματος και όταν αναμιγνύεται με θρομβίνη και χλωριούχο ασβέστιο σχηματίζει μια δομή τύπου γέλης¹⁵⁸. Το προϊόν αυτής της επεξεργασίας δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, έχει ελάχιστα λευκά αιμοσφαίρια, ενώ εμφανίζει περίπου πενταπλάσια πυκνότητα αιμοπεταλίων από το ολικό αίμα.

Μετά τις δημοσιεύσεις των Whitman και Marx, η εφαρμογή του PRP έχει αποκτήσει αυξανόμενη εφαρμογή στον ιατρικό τομέα, ιδιαίτερα στη στοματική και γναθοπροσωπική χειρουργική¹⁵⁹.

Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ένα κοκτέιλ αυξητικών παραγόντων με μιτογόνα και χημειοτακτικά χαρακτηριστικά επάγονται και απελευθερώνεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων (πίνακας 1). Με τη χρήση του PRP μας δίνεται η δυνατότητα αξιοποίησης πολλαπλών παραγόντων που μιμούνται την περίπλοκη λειτουργία της αποκατάστασης των κατεστραμμένων ιστών και βελτιώνουν τις εγγενείς διαδικασίες επούλωσης¹⁶⁰.

Πίνακας 1. Αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια.

Αυξητικοί παράγοντες	Δράση
Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων.	Ισχυρός μιτογόνος παράγοντας των κυττάρων του συνδετικού ιστού. Ενισχύει την παραγωγή κολλαγόνου και άλλων δομικών πρωτεϊνών.
Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας.	Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των κυττάρων.
Αυξητικός παράγοντα μετασχηματισμού.	Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων.
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας	Επάγει την αγγειογένεση.
Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1,2.	Βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού μεταβολισμού.
Αυξητικός παράγων ινοβλαστών	Διέγερση της αγγειογένεσης και του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών για τη δημιουργία ουλώδους ιστού

5.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PRP ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝ

Ένα αυξημένο σύνολο μελετών έχει δείξει ότι η τοπική εφαρμογή PRP, είναι να επιταχύνει την επούλωση των μαλακών ιστών και συμβάλει σημαντικά στην αναγέννηση των οστών^{161,162}.

Γνωστές κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες που βρίσκονται εντός του PRP, (πίνακας 2) όπως ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας, και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF), έχουν χαρακτηριστεί ως κρίσιμοι για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, τη διέγερση της αγγειογένεσης και τον έλεγχο του σχηματισμού ουλών στη διαδικασία αναγέννησης των περιφερικών νευρικών νεύρων.

Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτοί οι αναπτυξιακοί παράγοντες συνεργάζονται και αλληλοεπιδρούν αποτελεσματικά για την επούλωση των τραυμάτων δεν είναι επαρκώς κατανοητός¹⁶³, προκαταρκτικές μελέτες έχουν ήδη αποδείξει θετικά αποτελέσματα από τη χρήση το PRP ως ομάδα αυξητικών παραγόντων.

5.2.1 Στοιχεία από μελέτες σε ζωικά πρότυπα

Τα ζωικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τη μελέτη της επίδρασης του PRP στη διαδικασία της νευρικής αναγέννησης ενδεικτικά είναι τα εξής: προσωπικό νεύρο επίμου¹⁶⁴, ισχιακό νεύρο επίμου^{165,166,167,168}, προσωπικό νεύρο ινδικού χοιριδίου¹⁶⁹, ισχιακό νεύρο κονίκλου¹⁷⁰, επανανεύρωση μοσχεύματος προσθίου χιαστού συνδέσμου σε σκύλο¹⁷¹. Οι παραπάνω μελέτες δείχνουν θετικά αποτελέσματα σε μια σειρά από δοκιμασίες που εφαρμόζονται σε τέτοιου είδους πειράματα, όπως η ταχύτητα αγωγιμότητας του νευρικού ιστού, το πάχος της μυελίνης, η διάμετρος του νευρικού άξονα και η επανανεύρωση με περιόδους παρακολούθησης που κυμαίνονται από δυο έως δώδεκα εβδομάδες μετεγχειρητικά.

Πίνακας 2. Δράση των αυξητικών παραγόντων στο τραυματισμό του ΠΝΣ

Αυξητικός Παράγοντας	Δράση	Μηχανισμός δράσης	Πηγές
Αυξητικός παράγοντα μετασχηματισμού β. (TGF-β)	Διεγείρει την ενδοθηλιακή χημειοταξία και την αγγειογένεση. Ρυθμίζει τις μιτογόνες επιδράσεις άλλων αυξητικών παραγόντων. Διεγείρει την ανάπτυξη των νευριτών και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των SC	Εκκρίνεται από τους τραυματισμένους νευρώνες Ενεργοποιεί τα κύτταρα του Schwann και προσλαμβάνει μακροφάγα στο σημείο του περιφερικού νευρικού κολοβώματος	Unsicker and Strelau ¹⁷² Gordon et al ¹⁷³ Sulaiman and Dreesen ¹⁷⁴
Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων. (PDGF)	Διεγείρει την τροφική δραστηριότητα στους νευρώνες Προκαλεί πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση των SCs και σχηματισμό μυελίνης. Συμμετέχει στην επούλωση πληγών σκληρών και μαλακών ιστών και στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος.	Διεγείρει τη χημειοταξία ουδετερόφιλων και μακροφάγων της τραυματισμένες θέσεις και συμμετέχει στην επανεπιθηλίωση των ιστών και στην αγγειογένεση	Graham et al ¹⁷⁵ Yamazaki et al ¹⁷⁶ Burnouf et al ¹⁷⁷ Hellman et al ¹⁷⁸
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)	Ενισχύει την αγγειογένεση και τη διαπερατότητα των αγγείων. Πρωθεί την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων, τη νευρογένεση και τη νευροπροστασία.	Επάγει το μηχανισμό αγγειογένεσης που ενεργοποιείτε στους τραυματισμένους ιστούς, μέσω της σύνδεσής του με συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτοί οι υποδοχείς είναι: ο VEGFR-1 γνωστός και ως Flt-1 (fms-like tyrosin kinase-1) και ο VEGFR-2 γνωστός και ως KDR/Flk-1 (kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1) και ο συνυποδοχέας νευροπιλίνη 1 (NRP-1).	Mackenzie and Ruhrberg ¹⁷⁹ Hermann and Zechariah ¹⁸⁰
Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1,2. (IGF1,2)	Υποστηρίζει την εμπρόσθια επέκταση των νευρικών ινών. Καταστέλλει την απόπτωση στους κινητικούς, αισθητικούς και συμπαθητικούς νευρώνες. Διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών.	Μέσω της οδού PI3K, προκαλεί τα SCs να συνθέσουν δύο λιπαρά οξέα που ξεκινούν τη διαδικασία μυελίνωσης. Εκκρίνονται στην περιοχή των τραυματισμένων νευρώνων και οι υποδοχείς του εκφράζονται κυρίως στο νευρικό άξονα, τα SC και τα κινητικά νευρικά κύτταρα, προωθώντας την έγκαιρη αποκατάσταση της αίσθησης.	Liang et al ¹⁸¹ Nagata et al ¹⁸²
Αυξητικός παράγων ινοβλαστών (FGF)	Διευκολύνει τη νευροπροστασία και την αναγέννηση των SCs	Μετά από τραυματισμό περιφερικού νεύρου, αυξάνεται ο FGF και η έκφραση του υποδοχέα τυροσίνης κινάσης υψηλής συγγένειας FGFR-3 στους αισθητικούς νευρώνες αλλά και στη θέση αλλοίωσης του νεύρου, προκαλώντας αγγειογένεση και την επιτάχυνση της επούλωσης.	Grothe and Nikkhah ¹⁸³

Αντίθετα, η μελέτη της ομάδας του Piskin A¹⁸⁴, ανέφερε ότι η γέλη αιμοπεταλίων σε συνδυασμό με νευρικό οδηγό κολλαγόνου δεν είχε ευεργετική επίδραση στην αναγέννηση του ισχιακού νεύρου σε διάστημα δώδεκα εβδομάδων, μετά τη μικροχειρουργική επέμβαση. Από τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης θεωρήθηκε ότι οι αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται στο PRP, όπως ο TGF-β και ο bFGF αύξησαν το σχηματισμό κολλαγόνου το οποίο με τη σειρά του είχε αρνητική επίδραση στη διαδικασία της νευρικής αναγέννησης. Ωστόσο, 2 χρόνια αργότερα, η ίδια ομάδα¹⁸⁵ παρατήρησε ότι η γέλη αιμοπεταλίων θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στην αποκατάσταση τραυματισμένων νεύρων. Οι συγγραφείς των μελετών απέδωσαν τις διαφορές στα αποτελέσματά τους, σε μεθοδολογικούς αλλά και σε άγνωστους παράγοντες¹⁸⁵.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΡΤΗΡΙΩΝ Ο.Λ.

Οι αρτηρίες που χρησιμοποιήθηκαν για τα ακόλουθα πειράματα, απομονώθηκαν από τον ομφάλιο λώρο υγείων ατόμων με την πλήρη συγκατάθεση αυτών. Η φύλαξη των ομφαλίων λώρων πραγματοποιήθηκε στους 4°C αμέσως μετά την μεταφορά τους στο εργαστήριο, ενώ το συνολικό χρονικό διάστημα από τον τοκετό μέχρι την απομόνωση των αρτηριών δεν ξεπέρασε τις 48 ώρες. Η απομόνωση των αρτηριών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων. Οι αρτηρίες εν συνεχεία εκπλύθηκαν αρκετές φορές σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x PBS, για την απομάκρυνση τυχών θρόμβων και πηγμάτων.

1.2 ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΡΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ

Το πρωτόκολλο αποκυτταροποίησης βασίζεται στη χημική δράση απορρυπαντικών και περιλαμβάνει τα διαλύματα CHAPS (APPLICHEM, Ηνωμένες Πολιτείες), SDS (Sigma, Albuach, Γερμανία) και θρεπτικό μέσο/FBS (Gibco Life Technology) α-MEM (Gibco Life Technology, Γερμανία). Αρχικά τα τμήματα της ομφάλιας αρτηρίας που απομονώθηκαν τοποθετήθηκαν σε διάλυμα CHAPS με Ph 8 (8 Mm CHAPS, 1 M NaCl, και 25 Mm EDTA σε PBS 1x) σε θερμοκρασία δωματίου για 22 ώρες και ακολούθησε πλύσιμο σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα SDS Ph 8 (1.8 Mm SDS, 1 M NaCl, και 25 Mm EDTA σε PBS 1x) σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και ακολούθησε πλύσιμο με PBS 1x. Τέλος τοποθετήθηκαν σε α-MEM/ 40% FBS σε 37°C για 48 ώρες.

1.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΑΡΤΗΡΙΩΝ Ο.Λ.

Για την ποσοτικοποίηση του DNA δημιουργήθηκαν δυο ομάδες μελέτης, n=20 για κάθε ομάδα μελέτης. Η μια ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς (control) ενώ η δεύτερη ομάδα αποκυτταροποιήθηκε σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο.

Η απομόνωση του DNA από την αρτηρία του Ο.Λ. πραγματοποιήθηκε ως εξής: Αρχικά πραγματοποιήθηκε πολύ καλός τεμαχισμός της αρτηρίας με τη χρήση αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων. Στη συνέχεια τα τμήματα της αρτηρίας μεταφέρθηκαν σε 1,5 ml eppendorf το οποίο περιείχε 1 ml λυτικό διάλυμα 1x και 25 μg/ml πρωτεΐνωση Κ. Τα eppendorf τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα των 55 °C, για 12 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αδρανολοποίηση της πρωτεΐνωσης Κ στους 95 °C για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 500 μl διαλύματος φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία (25:24:1). Μετά από πολύ καλή ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13,2 g για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση της υδατικής φάσης και μεταφορά της σε καθαρό eppendorf , στο οποίο προστέθηκε 1 ml απόλυτης αιθανόλης. Τα δείγματα στη συνέχεια παρέμειναν σε καταψύκτη στους -20 °C για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών επαναλήφθηκε το βήμα της φυγοκέντρησης στα 13,2 g για 5 λεπτά. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη αιθανόλης 70 %, χωρίς διατάραξη του δημιουργηθέντος ιζήματος. Φυγοκέντρηση στα 13,2 g για 5 λεπτά. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκειμένου και εκ νέου φυγοκέντρηση στα 13,2 g για 5 λεπτά για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης 70 %. Στη συνέχεια τα eppendorf παρέμειναν ανοιχτά για 1-2 λεπτά μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη και πραγματοποιήθηκε προσθήκη 50 μl νερού δίχως RNAσες. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε, με φωτομέτρηση στα 280 nm, στο σπεκτροφωτόμετρο NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

1.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.4.1 Μονιμοποίηση δειγμάτων.

Για τη μονιμοποίηση των Α.Ο.Α χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 10% v/v φορμόλης σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Αναλυτικότερα, οι Α.Ο.Α. τοποθετήθηκαν σε πλαστικές κασετίνες έγκλησης. Στη συνέχεια οι κασετίνες τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως όγκου 50 ml όπου προστέθηκε διάλυμα φορμόλης 10%. Τα δείγματα παρέμειναν στη φορμόλη για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Την επόμενη οι κασετίνες απομακρύνθηκαν από το διάλυμα φορμόλης 10%, ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε καθαρό ποτήρι ζέσεως με διάλυμα αλκοόλης 70%.

Τέλος τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ιστοκινέτα (Leica TP 1020). Μετά την ολοκλήρωση της μονιμοποίησης ακολούθησε η έγκληση των ιστών σε παραφίνη.

2.4.2 Μικροτόμιση δειγμάτων.

Η μικροτόμιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε μικροτόμο (Leica PM 2125) στο παθολογοανατόμο εργαστήριο του ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθήνας. Οι τομές των δειγμάτων που λήφθηκαν είχαν πάχος 5 και 10 μ.

2.4.3 Προετοιμασία τομών για χρώση.

Για τη διεξαγωγή των χρώσεων των ιστολογικών παρασκευασμάτων απαιτείται το στάδιο της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης των τομών. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Στάδιο 1- Αποπαραφίνωση: Δυο διαλύματα καθαρής ξυλώλης, από 5 λεπτά σε κάθε διάλυμα.
- Στάδιο 2- Ενυδάτωση: Δυο διαλύματα αλκοολών 100% για 5 λεπτά σε κάθε διάλυμα, 95% για 2 λεπτά, 80% για 1 λεπτό, 50% για 1 λεπτό.
- Στάδιο 3- Έκπλυση: Έκπλυση των δειγμάτων σε τρεχούμενο νερό βρύσης.

Το επόμενο στάδιο ήταν η διεξαγωγή των χρώσεων και αφυδάτωση των δειγμάτων. Η διαδικασία της αφυδάτωσης ποικίλει και έχει να κάνει ανάλογα με τον τύπο της χρώσης που χρησιμοποιείτε κάθε φορά.

2.4.4 Ιστολογικές χρώσεις

Ο ιστολογικός έλεγχος του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης πραγματοποιήθηκε με την εκτέλεση των ακόλουθων χρώσεων (πίνακας 3):

Πίνακας 3.Ιστολογικές χρώσεις

ΧΡΩΣΕΙΣ	ΣΤΟΧΟΣ	ΧΡΩΜΑ
Αιματοξυλίνη-σίνη.	Ηω- Πυρήνες-ECM	Πυρήνες: Μωβ ECM: Ροζ
Massons Trichrome.	Κολλαγόνο εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.	Πυρήνες: Μαύρο Μυϊκές ίνες: Κόκκινο Κολλαγόνο: μπλε.
Elastic Can Gieson.	Ελαστίνη εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.	Ελαστικές ίνες: Μαύρες Πυρήνες: Μπλε Κολλαγόνο: Κόκκινο.
Toluidine Blue.	Γλυκοζαμινογλυκάνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	Πυρήνες: Μωβ. Γλυκ/νες: Μπλε

Η παρασκευή και εφαρμογή των παραπάνω χρώσεων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany).

1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ WJ-MSCs.

1.5.1. Απομόνωση MSCs από τη Βαρτόνιο Γέλη.

Τα MSCs που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα κυτταροτοξικότητας, απομονώθηκαν από τον ομφάλιο λώρο υγρών ατόμων με την πλήρη συγκατάθεση της. Η φύλαξη των ομφάλιων λώρων πραγματοποιήθηκε στους 4°C, ενώ το συνολικό χρονικό διάστημα από το τοκετό μέχρι την απομόνωση των MSCs δεν ξεπέρασε της 24 ώρες. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πλύσιμο των ομφάλιων λώρων με διάλυμα PBS 1x. Με τη χρήση αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων πραγματοποιήθηκε απομόνωση της βαρτονείου γέλης, ακολούθησε τεμαχισμός της σε μικρά κομμάτια και τοποθέτηση της σε πλάκα 6 πηγαδιών. Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού μέσου α -MEM/15% FBS και μεταφορά της στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας της 37°C με 5% CO₂. Όλα τα παραπάνω βήματα πραγματοποιήθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματοειδούς ροής.

1.5.2 Ανακαλλιέργεια MSCs

Η ανακαλλιέργεια των MSCs πραγματοποιήθηκε μόλις τα κύτταρα κάλυψαν το 80% της επιφάνειας των πηγαδιών. Ειδικότερα, απορρίφτηκε το θρεπτικό μέσο και ακολούθησε προσθήκη 1ml διαλύματος PBS 1x ανά πηγάδι. Μετά από 1 λεπτό πραγματοποιήθηκε πλήρης απόρριψη του διαλύματος PBS 1x και κατόπιν προσθήκη 300 μl διαλύματος θρυψίνης – EDTA. Μεταφορά της πλάκας στο κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας της 37°C με 5% CO₂ για 10 λεπτά. Αδρανοποίηση του διαλύματος θρυψίνης- EDTA με 15 ml θρεπτικού μέσου α -MEM/15% FBS και μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας 75 cm². Τέλος, η φλάσκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂. Όλα τα παραπάνω βήματα πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματοειδούς ροής.

1.5.3 Καταμέτρηση κυττάρων.

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στα ακόλουθα πειράματα έγινε με τη χρήση της πλάκας Neubauer. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η αποκόλληση των κυττάρων από τα τρυβλία καλλιέργειας. Στη

συνέχεια 10 μl δείγματος κυττάρων αναμείχθηκαν με 10 μl χρωστικής Trypan blue. Μετά από καλή ανάδευση, 10 μl δείγματος τοποθετήθηκαν στην πλάκα Neubauer. Ακολούθησε τοποθέτηση καλυπτρίδας και επώαση του δείγματος για 3 λεπτά. Ακολούθησε μικροσκοπία και καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ακόλουθου τύπου:

$$\text{Αριθμός Κυττάρων} = \text{M.O.}(\text{Δείγματος}) \times 2 \times V(\text{αρχ.}) 10^4$$

Όπου:

- M.O. (δείγματος): Ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων που προέκυψε από τη μέτρηση των τεσσάρων τετραγώνων της πλάκας Neubauer. Στη μέτρηση δεν λήφθηκαν υπόψη όσα κύτταρα ήταν βαμμένα με την Trypan blue.
- 10⁴: Διαστάσεις της συγκεκριμένης πλάκας Neubauer. [0,1 mm² (ύψος) x 0,1 mm² (πλάτος) x 0,01 mm² (βάθος)]
- 2: Αρχική αραιώση ½ του δείγματος με την Trypan blue.
- V(αρχ.): Ο αρχικός όγκος του δείγματος από τον οποίο λήφθηκε το προς μέτρηση δείγμα.

1.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.

1.6.1 Κυτταροτοξικότητα επαφής.

Για τη συγκεκριμένη διαδικασία αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση αρτηριών ομφαλίου λώρου και στη συνέχεια αποκυτταροποίηση αυτών. Μετά το τέλος της διαδικασίας της αποκυτταροποίησης οι αρτηρίες τεμαχίστηκαν σε τμήματα 0,5 mm x 0,5 mm και τοποθετήθηκαν σε πλάκα 24 πηγαδιών (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium). Για την επανακυτταροποίηση των ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκαν 5.000 WJ – MSCs με θρεπτικό μέσο α MEM – 15% FBS. Η πλάκα τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 37° C και 5% CO₂. Μετά από 10 μέρες πραγματοποιήθηκε μικροσκοπία και λήψη φωτογραφιών. Για αρνητικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με α MEM – 15%

FBS και για θετικό δείγμα αναφοράς WJ – MSCs όπου το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με διάλυμα 1,2 mM SDS.

1.6.2 Μέτρηση λόγου ADP/ATP.

Η μέτρηση του λόγου ADP/APT πραγματοποιήθηκε με το ADP/ATP assay kit της Sigma Aldrich. Αναλυτικότερα μη επεξεργασμένες Ο.Α (n=20) και αποκυτταροποιημένες ομφάλιες αρτηρίες (n=20) υποβλήθηκαν σε ενζυμική πέψη με πρωτεΐνάση K της 56 °C για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Ακολούθησε αδρανποίηση της πρωτεΐνάσης K στους 95°C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα της πέψης, περίπου 3 ml από κάθε είδος ομφάλιας αρτηρίας, προστέθηκαν σε 7 ml θρεπτικού μέσου α-MEM. Στη συνέχεια 1x10³ WJ-MSCs τοποθετήθηκαν σε πλάκα καλλιέργειας 96 πηγαδιών (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium), και αναπτύχθηκαν με τη χρήση των παραπάνω διαλυμάτων.

Μετά από 48 ώρες πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυτταροκαλλιιεργειών και προσθήκη 90 μl από το αντιδραστήριο ATP και επώαση για 1 λεπτό. Ακολούθησε μέτρηση της φωταύγειας (RLU_A). Στη συνέχεια η πλάκα παρέμεινε για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθως προστέθηκαν 5 μl από το αντιδραστήριο ADP. Παραμονή της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και εκ νέου μέτρηση της φωταύγειας (RLU_B). Μετά από 1 λεπτό παραμονής της πλάκας εκ νέου μέτρηση της φωταύγειας (RLU_C). Ως αρνητικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιητε στη ρούτινα του εργαστηρίου για την καλλιέργεια κυτάρων (α MEM +15% FBS) ΟΑ και ως θετικό δείγμα αναφοράς 1.5 mM SDS.

Ο υπολογισμός του λόγου ADP/ATP πραγματοποιήθηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{λόγος ADP/ATP} = \frac{(RLU_C - RLU_B)}{RLU_A}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ.

Χρησιμοποιήθηκαν 36 αρσενικοί επίμυες φυλής Sprague Dawley, βάρους 250-350gr. Κατά τη διάρκεια του πειράματος οι επίμυες διατηρούνταν σε κλωβούς ανά τρεις, με ελεύθερη χορήγηση νερού και τροφής, ελεγχόμενη υγρασία και θερμοκρασία περιβάλλοντος, με 12ωρη εναλλαγή φωτός-σκότους.

Η εκτροφή και διατήρηση των επίμυων πριν και μετά τις χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις ζωικών προτύπων του ΙΙΒΕΑΑ. Τέλος, οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο κέντρο πειραματικής χειρουργικής του ΙΙΒΕΑΑ από τον ίδιο χειρουργό. Για τη διενέργεια των πειραμάτων της επίμυες χορηγήθηκε άδεια από την Κτηνιατρική Διεύθυνση της Νομαρχίας Αθηνών.

2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ PRP

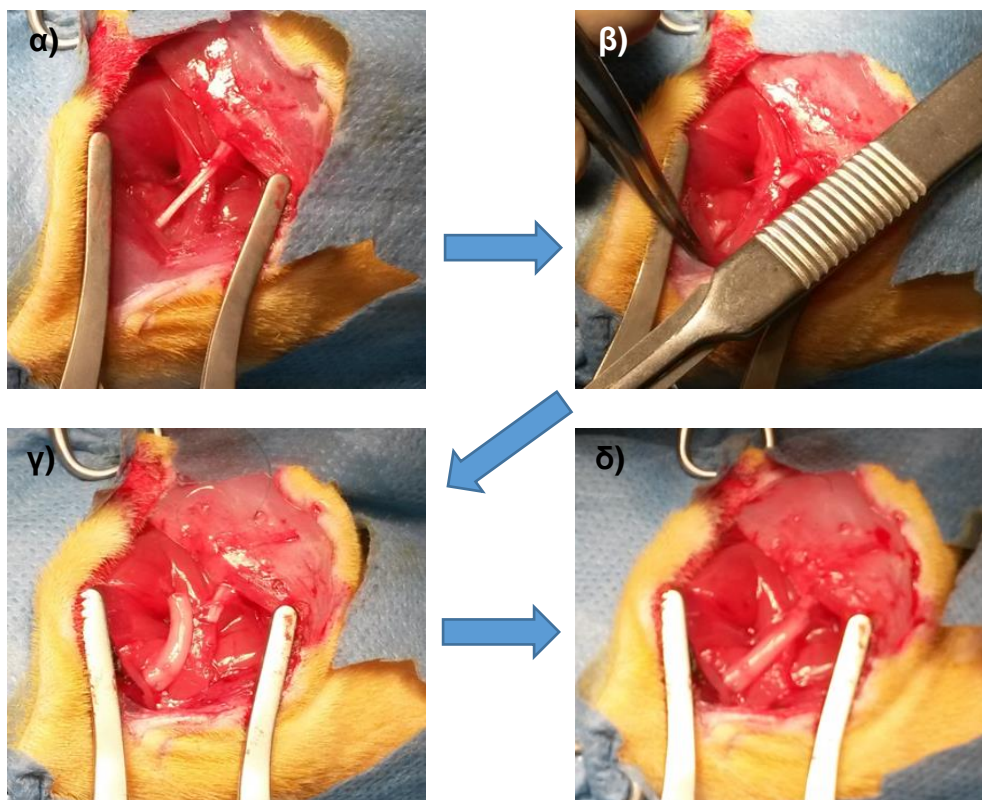
Πριν τη χειρουργική διαδικασία, σε κάθε πειραματόζωο πραγματοποιήθηκε λήψη δυο ml αίματος σε στείρο φιαλίδιο κενού που περιείχε 3,2 % κιτρικό νάτριο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του αίματος στα 160 x g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το αίμα διαχωρίστηκε σε τρεις στιβάδες. Στη κάτω στιβάδα βρίσκονταν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, στη πάνω στιβάδα το πλάσμα και στη μεσαία στιβάδα βρίσκονταν τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια απορρίφθηκαν και το πλάσμα με τα αιμοπετάλια φυγοκεντρήθηκαν για δεύτερη φορά στα 400 x g για 15 λεπτά. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση αναρροφήθηκαν 300 μl PRP από το κάτω μέρος του σωληνάριου. Μερικά λεπτά πριν την έγχυση του, το PRP αναμιγνύονταν με 15 μl χλωριούχου ασβεστίου ώστε να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

2.3 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.

Τα πειραματόζωα κατανεμήθηκαν σε τρεις ομάδες: ομάδα control, όπου ως νευρικός οδηγός χρησιμοποιήθηκε αυτόλογο νεύρο (n=12), ομάδα AOA όπου ως νευρικός οδηγός χρησιμοποιήθηκε AOA (n=12) και ομάδα AOA + PRP στην οποία ως νευρικός οδηγός χρησιμοποιήθηκε AOA που στο εσωτερικό της εγχύθηκε PRP (n=12).

Οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες, με χρήση εργαλείων μικροχειρουργικής. Αρχικά οι επίμυες υποβλήθηκαν σε γενική αναισθησία με ισοφλουράνιο 3% σε 1 λίτρο οξυγόνου, ακολούθησε χειρουργική προετοιμασία του δεξιού οπίσθιου άκρου και του σύστοιχου κενεώνα και ακινητοποίηση της σε αριστερή πλάγια κατάκλιση στο χειρουργικό τραπέζι. Και της δύο ομάδες η πρώτη φάση της επέμβασης ήταν κοινή: επιμήκης τομή στο δεξιό οπίσθιο άκρο στη γλουτιαία χώρα, διήνηση των γλουτιαίων μυών και αποκάλυψη του ισχιακού νεύρου. Ακολούθησε διατομή του νεύρου και απομάκρυνση ενός εκατοστού αυτού. Το σημείο που πραγματοποιήθηκε το κενό ήταν ανάμεσα στην έξοδο του ισχιακού νεύρου από την πύελο και τη διακλάδωση του σε κνημιαίο και περονιαίο. Τέλος η “γεφύρωση” των κολοβωμάτων πραγματοποιήθηκε με διαφορετική μέθοδο, ανάλογα με την ομάδα που άνηκε το πειραματόζωο:

- **Ομάδα control:** Το τμήμα του 1 cm που αποκόπηκε από το ισχιακό νεύρο επανατοποθετήθηκε με αντίστροφο προσανατολισμό με επινευρική συρραφή. Χρησιμοποιήθηκαν ράμματα prolene 8-0.
- **Ομάδα AOA:** Εισαγωγή κεντρικού και περιφερικού κολοβώματος στα δυο άκρα της AOA και σταθεροποίηση της με 2 ραφές σε κάθε άκρο. Το κεντρικό και περιφερικό κολόβωμα εισέρχονταν στην AOA. 2-3 mm ώστε να δημιουργείται μεταξύ των κολοβωμάτων κενό 1 cm (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Α).φυσιολογικό ισχιακό νευρο β) απομάκρυνση τμήματος 1 cm ισχιακού νευρου β) συρραφή ΑΟΑ στο εγγύς κολόβωμα γ) ολοκλήρωση τοποθέτησης της ΑΟΑ ως νευρικός οδηγός.

- **Ομάδα ΑΟΑ+PRP:** Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την ομάδα ΑΟΑ με τη διαφορά ότι μετά τη τοποθέτηση της ΑΟΑ ακολουθούσε έγχυση 300μl PRP με τη χρήση φλεβοκαθετήρα ενσωματωμένο σε σύριγγα του 1ml (εικόνα 2).

Οι αρτηρίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1,5 cm περίπου.



Εικόνα 2. α) ολοκλήρωση τοποθέτησης της ΑΟΑ ως νευρικός οδηγός. β) έγχυση του PRP.

2.4 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΑΔΙΣΜΑΤΟΣ.

Όλα τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία ανάλυσης βαδίσματος ώστε να υπολογιστεί ο δείκτης λειτουργικότητας του ισχιακού νεύρου (sciatic functional index SFI). Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε, προ εγχειρητικά, την 4^η και 12^η εβδομάδα μετά το χειρουργείο¹⁸⁶.

Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας κατασκευάστηκε διάδρομος πλεξιγκλάς διαστάσεων 10X50 cm μαύρου χρώματος κλειστός από τα πλάγια, που κατέληγε σε σκοτεινό κιβώτιο. Στο δάπεδο του διαδρόμου τοποθετούνταν λωρίδες άσπρου χαρτιού και τα ζώα εκπαιδεύονταν στη βάδιση κατά μήκος του διαδρόμου ώστε να καταφέρνουν να βαδίζουν από τη μια άκρη του διαδρόμου μέχρι το σκοτεινό κουτί με σταθερό ρυθμό χωρίς να σταματήσουν. Στη συνέχεια, με ειδική μη τοξική βαφή χρωματίστηκαν τα δύο οπίσθια πέλματα των επίμυων και αφήνονταν να βαδίσουν μέσα στο διάδρομο. Με αυτό τον τρόπο αφήνονταν αποτυπώματα από τα πέλματα των ζώων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές μέχρι να γίνει λήψη καθαρού αποτυπώματος.

Σε κάθε αποτύπωμα μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι: α) το μήκος του πέλματος (PL=print length), β) την απόσταση μεταξύ 1^{ου} και 5^{ου} δακτύλου (TS= total toe spread) και γ) την απόσταση μεταξύ 2^{ου} και 4^{ου} δακτύλου (IT= intermediary toe spread) για τον υπολογισμό του εξής τύπου¹⁸⁷:

$$-38,3 \frac{EPL-NPL}{NPL} + 109,5 \frac{ETS-NTS}{NTS} + 13,3 \frac{EIT-NIT}{NIT} - 8,8,$$

Όπου E (experimental) είναι το χειρουργημένο κάτω άκρο και N (normal) το φυσιολογικό κάτω άκρο. Τιμές κοντά στο 0 αντιστοιχούν στο φυσιολογικό, ενώ η τιμή -100 στη πλήρη απώλεια λειτουργικότητας του ισχιακού νεύρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΛΗΨΗ ΙΣΤΩΝ.

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης βαδίσματος τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν. Με την ίδια χειρουργική προσπέλαση διενεργήθηκε λήψη των εξής ιστών:

- 1 cm ισχιακού νεύρου από υγιές οπίσθιο άκρο κάθε επίμου,
- Το μεσαίο τμήμα μεταξύ των κολοβωμάτων στο χειρουργημένο οπίσθιο άκρο κάθε επίμου. (3 mm της τη περιφέρεια από τη σημείο συρραφής στο κεντρικό κολόβωμα και 3 mm της το κέντρο από το σημείο συρραφής στο περιφερικό κολόβωμα. Ισχιακό μόσχευμα).
- Ο γαστροκνήμιος μυς και από τα δύο οπίσθια άκρα.

Αναλυτικότερα, από κάθε ομάδα πειραματόζωων επιλέχτηκαν με τυχαίο τρόπο $n = 6$ ισχιακά μόσχευμα και μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση 2,5% γλουταραλδεΐδης (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) τα οποία προορίζονταν για τη μορφομετρική ανάλυση. Επιπλέον, τα εναπομείναντα $n = 6$ μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση 10% v/v φορμόλης σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα και προορίζονταν για ανοσοϊστοχημική ανάλυση (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany).

3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.

Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε γλουταραλδεΐδη 2,5% για 24 ώρες, όπου ακολούθησε ξέπλυμα της με διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Στη συνέχεια γίνονταν εμβύθιση κάθε παρασκευάσματος διαδοχικά σε διαλύματα, τετροξειδίου του οσμίου – OsO₄ – 1%, ακετόνη, διαλύματα προ-πυλενικού οξέος σε ακετόνη με διαδοχικά αυξανόμενη συγκέντρωση. Τέλος, έγινε εγκλεισμός σε παχύρρευστο μίγμα ρητίνης EPON-812 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) σε ειδική θήκη-κάψουλα. Οι θήκες τοποθετούνταν στον κλίβανο για 2 ώρες σε 45°C και 48 ώρες σε 60°C, για να στερεοποιηθεί το υλικό. Ακολούθησε λήψη εγκάρσιων ημίλεπτων τομών πάχους 0,5-1,0 μm με υπερμικροτόμο. Τέλος, ακολούθησε χρώση των τομών με κυανού της τολουιδίνης.

3.3 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΣΧΥΑΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝ.

Για τη μορφομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε λήψη 10 φωτογραφιών από τυχαία επιλεγμένα πεδία του ιστού, για κάθε ζώο, σε τελική μεγέθυνση 1000X. Για τη λήψη των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο (*Leica DMLS2*) και έγχρωμη κάμερα υψηλής ανάλυσης (*High-resolution Digital Camera System with 12 Mega pixel Power Leica DC500*).

Στη συνέχεια οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή που διέθετε το λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Fiji-ImageJ. Ακολούθησε ποσοτική εκτίμηση με καταμέτρηση των εμμέλων νευρικών ινών στα ιστολογικά παρασκευάσματα και εκτίμηση της πυκνότητάς τους (νευρικές ίνες/ μm^2). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ημιαυτόματη μέθοδο με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος IMARIS 8. Ο συνεργάτης που πραγματοποίησε τις μετρήσεις δεν γνώριζε σε ποια ομάδα πειραματόζωων ανήκαν τα δείγματα στα οποία πραγματοποιούνταν οι μετρήσεις κάθε φορά.

3.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.

Για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των νευρικών μοσχευμάτων χρησιμοποιήθηκε το Dako Envision Flex kit (Dako, Agilent, Glostrup, Denmark). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των νευροϊνιδίων (Nf-200) για την ανίχνευση των νευρικών αξόνων και έναντι της πρωτεΐνης S-100 ως δείκτη των κυττάρων Schwann.

Αναλυτικότερα, μετά την αποραφινολοποίηση και την ενυδάτωση σε κατιόντες βαθμούς οιοπνευμάτων οι τομές επώασθησαν για 15 λεπτά στους 95°C εντός του διαλύματος *EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High Ph* (Dako) ώστε να ανακτηθούν οι αντιγονικοί επίτοποι. Αφού οι τομές επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με *Peroxidase Blocking Reagent* (DAKO) για 7 λεπτά. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και ακολούθησε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα αντι-Nf200 σε αραιώση 1:80, (Sigma, St. Louis, MO, USA) και αντι-S100 σε αραιώση 1:100, (Sigma, St. Louis, MO, USA). Οι τομές παρέμειναν

στους 4°C για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Ακολούθησαν σύντομα πλυσίματα με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και επώαση για 45 λεπτά με το EnVision FLEX /HRP (Dako - δευτερεύον αντίσωμα). Τέλος, η ανάδειξη της χρωστικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή 3'3 διαμινοβενζιδίνη (DAB).

3.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ ΜΥΟΣ.

Σε όλους τους επίμους αφαιρέθηκε ο γαστροκνήμιος μυς και από τα δυο οπίσθια άκρα και απευθείας οι μυς ζυγίστηκαν. Διαιρώντας το βάρος του μυ από το χειρουργημένο άκρο και το βάρος του μυ στο φυσιολογικό άκρο, υπολογίστηκε ο λόγος διατήρησης μυϊκής μάζας.

Στη συνέχεια το μεσαίο τμήμα από τους μύες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% και τέλος πραγματοποιήθηκε έγκλειση σε παραφίνη.

Με τη χρήση μικροτόμου πραγματοποιήθηκε λήψη εγκάρσιων τομών 5 mm. Ακολούθησε χρώση των τομών τη με αιματοξυλίνη και ηωσίνη ώστε να γίνει ποιοτική εκτίμηση των μυϊκών ινών.

3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

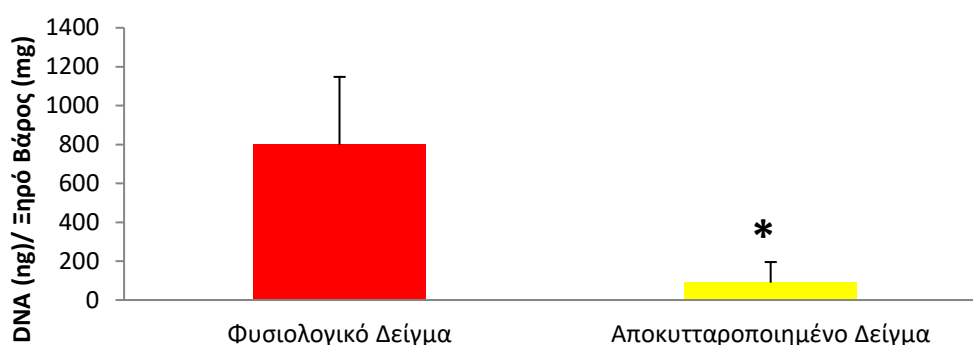
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Graph Pad Prism 6. Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης (\pm SD), ενώ η σημαντικότητα των τιμών καθορίστηκε με τη δοκιμασία Kruskal Wallis, εκτός από τη ποσοτικοποίηση του DNA που καθορίστηκε με Student's t-test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p = 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA.

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του DNA σε $n=20$ Α.Ο.Α και σύγκρισή της με $n=20$ Ο.Α. που δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία ώστε να διαπιστωθεί εάν ήταν επιτυχής η απομάκρυνση του γενετικού υλικού από τους ιστούς.

Με τη χρήση πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης επιτεύχθηκε απομάκρυνση του γενετικού υλικού στα αποκυτταροποιημένα δείγματα κατά 88,8% σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (Διάγραμμα 1).



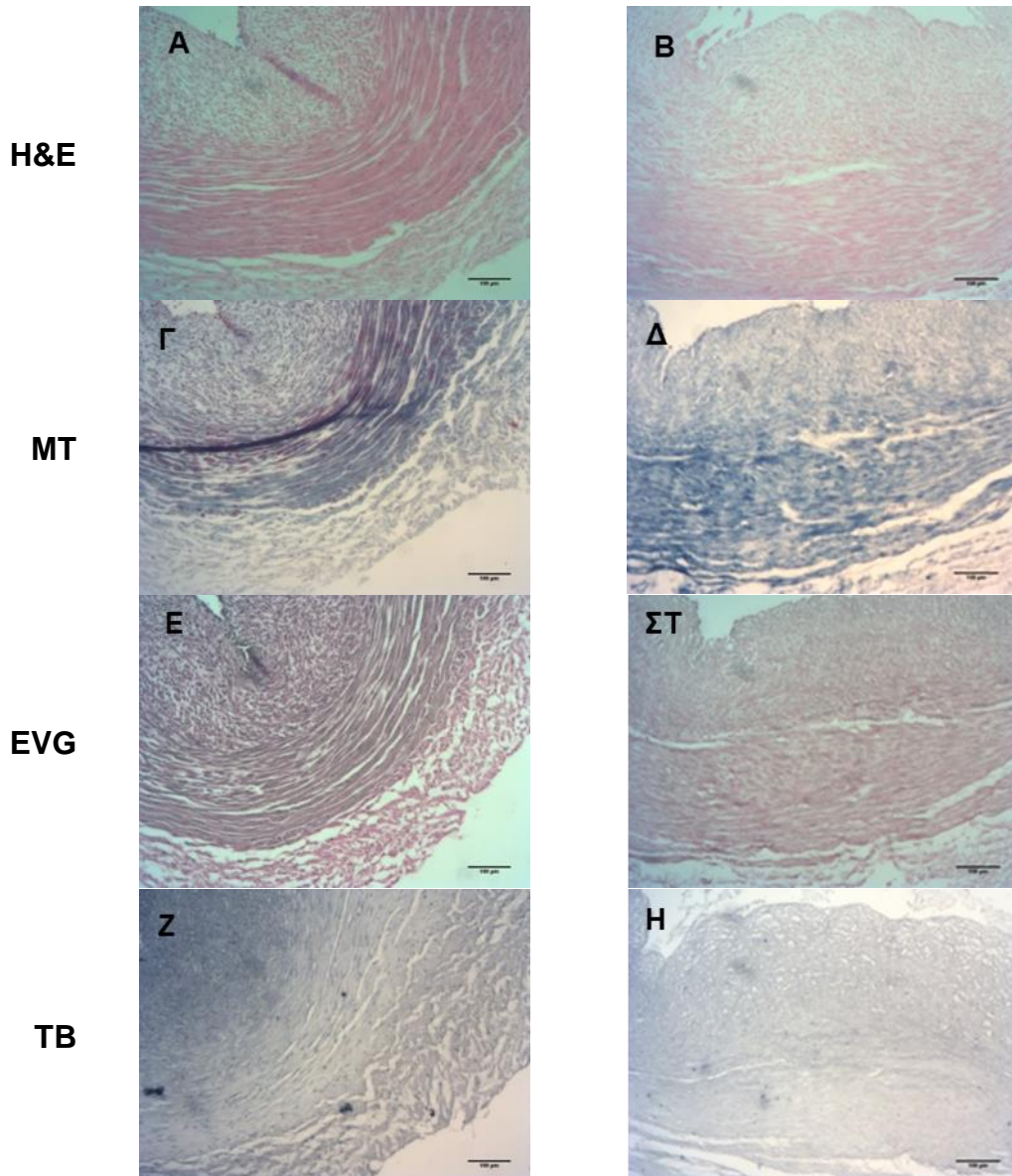
Διάγραμμα 1. Αξιολόγηση του πρωτοκόλλου αποκυτταροποίησης μέσω ποσοτικοποίησης του DNA. * $p<0.05$. Σύγκριση συγκέντρωσης του DNA σε φυσιολογική ομφάλια αρτηρία και σε απόκυτταροποιημένη.

4.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΑΠΟΚΥΤΤΑΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Για να εξακριβωθεί η απομάκρυνση του γενετικού υλικού μετά την αποκυτταροποίηση, πραγματοποιήθηκε η ιστολογική χρώση Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη (H&E). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν οι ιστολογικές χρώσεις Toluidine blue, Elastic Van Gieson, και Masson's Trichrome, για τον έλεγχο της επίδρασης των διαλυμάτων αποκυτταροποίησης στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία των ομφάλιων αρτηριών (Εικόνα 3).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑ Ο .Λ.

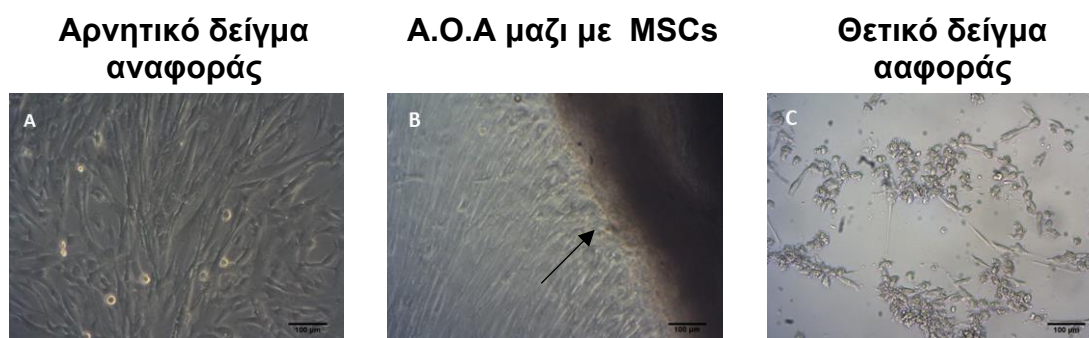
ΑΠΟΚΥΤ. ΑΡΤΗΡΙΑ Ο.Λ.



Εικόνα 3. Φυσιολογική και αποκυτταροποιημένες αρτηρίες με H&E, Masson's Trichrome, Elastic Van Gieson και Toluidine blue. Φυσιολογική αρτηρία με H&E (A), Masson's Trichrome (Γ), Elastic Van Gieson (E) και Toluidine blue (Z). Αποκυτταροποιημένη αρτηρία με H&E (B), Masson's Trichrome (Δ), Elastic Van Gieson (ΣΤ) και Toluidine blue (Η). Μεγέθυνση 10x, scale bar 100 μm.

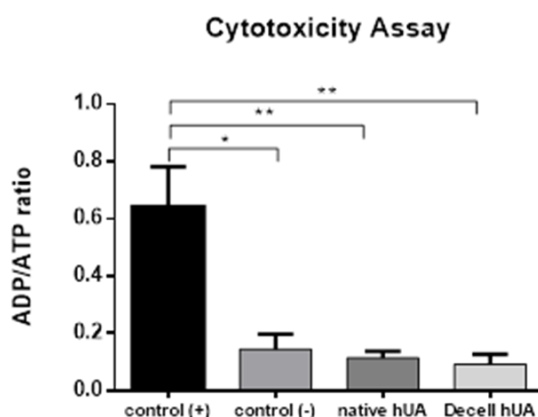
4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της κυτταροτοξικότητας επαφής έδειξαν ότι τα WJ-MSCs επεκτάθηκαν και προσκολλήθηκαν στα αποκυτταροποιημένα ικρίωματα (Εικόνα 4). Επιπλέον, τα κύτταρα διατήρησαν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει τοξική επίδραση στα κύτταρα.



Εικόνα 4. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας επαφής με τη χρήση WJ-MSCs. A) Arνητικό δείγμα αναφοράς B) Αποκυτταροποιημένο ικρίωμα. Γ) WJ-MSCs που επώασθηκαν με SDS. Το μαύρο βέλος υποδεικνύει τα WJ-MSCs που έχουν προσκολληθεί στο αποκυτταροποιημένο ικρίωμα. Αρχική μεγέθυνση 10x μπάρα κλίμακας 100μm.

Ο προσδιορισμός των τιμών του λόγου ADP/ATP επιβεβαίωσε τα παραπάνω ευρήματα. Συγκεκριμένα ο λόγος ADP/ATP είχε παρόμοιες τιμές μεταξύ του υπό μελέτη δείγματος και του αρνητικού δείγματος αναφοράς (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Λόγος ADP/ATP. Μειωμένη τιμή του λόγου ADP/ATP υποδεικνύει ότι τα κύτταρα διατήρησαν την ικανότητα πολλαπλασιασμού της * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

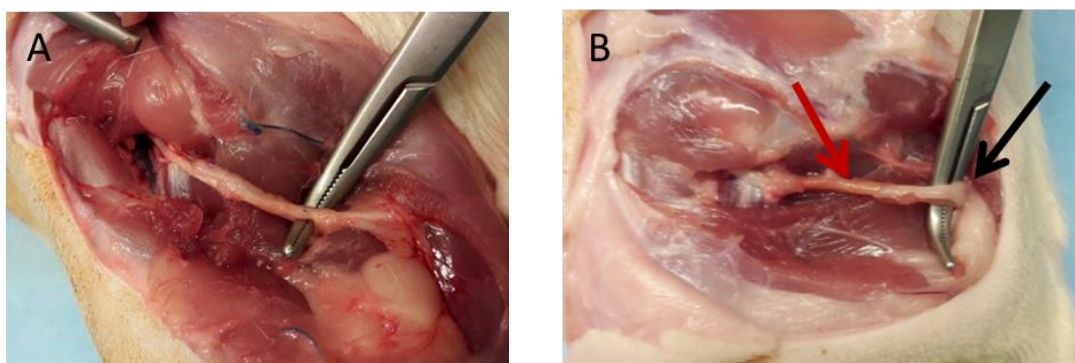
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.

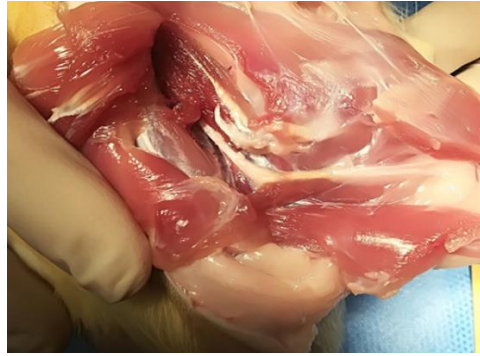
Όλα τα πειραματόζωα επέζησαν μέχρι το τέλος των πειραμάτων, τα οποία διήρκησαν δώδεκα εβδομάδες. Τα πειραματόζωα είχαν υγιή κλινική εικόνα. Δεν παρατηρήθηκαν σημεία αυτοτραυματισμού στο χειρουργημένο άκρο, αλλά σε όλους της επίμυες υπολείπονταν η κινητικότητα. Επιπλέον, και σε τρεις επίμυες της ομάδας Α.Ο.Α διαπιστώθηκε σημαντική ρίκνωση του πέλματος.

5.2 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.

Μετά την ευθανασία των πειραματόζωων ακολούθησε η μακροσκοπική εξέταση των χειρουργημένων ισχιακών νευρών. Παρατηρήθηκε συνέχεια του νευρικού ιστού και στις τρεις ομάδες των ζώων, καθώς δεν εμφάνιζαν στοιχεία φλεγμονής. Στην ομάδα control παρατηρήθηκε κάποιου βαθμού πάχυνση στο σημείο συρραφής και περιορισμένες συμφύσεις με τους γύρω ιστούς (εικόνα 5Α). Παρόμοια εικόνα παρουσίασαν και οι δύο ομάδες, που χρησιμοποιήθηκε ως νευρικός οδηγός η ΑΟΑ. Με εξαίρεση τρία ζώα της ομάδας ΑΟΑ όπου στο σημείο επανανεύρωσης με το περιφερικό κολόβωμα η διάμετρος του ιστού ήταν εμφανώς λεπτότερη (εικόνα 5Β). Γεγονός που συνάδει και με την κλινική εικόνα των ζώων που αναφέρονται παραπάνω.



Εικόνα 5. Μακροσκοπική εξέταση των χειρουργημένων ισχιακών νευρών. Α) Χειρουργημένος νευρικός ιστός ομάδας control. Β) Χειρουργημένος νευρικός ιστός ομάδας ΑΟΑ. Στο κόκκινο βέλος βρίσκονταν η ΑΟΑ και στο μαύρο ο νευρικός ιστός.



Εικόνα 5. Μακροσκοπική εξέταση του χειρουργημένου ισχιακού νεύρου της ομάδας AOA+PRP.

5.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΑΔΙΣΜΑΤΟΣ.

Η ανάλυση βαδίσματος πραγματοποιήθηκε και στις τρεις ομάδες πειραματόζων προ εγχειρητικά και μετά το πέρας 4 και 12 εβδομάδων από τη χειρουργική επέμβαση. Ο SFI σε όλους του επίμυες πριν το χειρουργείο ήταν στα όρια του φυσιολογικού. Ομάδα control: $-10,07 \pm 3,38$, ομάδα AOA: $-8,26 \pm 5,1$, ομάδα AOA+PRP: -8.75 ± 4.28 χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανάλυσης βαδίσματος για κάθε ομάδα σε κάθε χρονική στιγμή φαίνονται στον πίνακα 4. Στις 4 βδομάδες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων ($p > 0.05$) αντίθετα στις 12 εβδομάδες η ομάδα control και η ομάδα AOA+PRP εμφανίζουν σαφώς ποιο βελτιωμένο δείκτη λειτουργικότητας ($-51,35 \pm 7.84$ και $-49,95 \pm 8,25$ αντίστοιχα) από την ομάδα AOA ($-70,56 \pm 15.38$). Τέλος, η ομάδα AOA+PRP εμφάνιζε ελαφρώς ποιο βελτιωμένο SFI από την ομάδα control χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p = 0.9$).

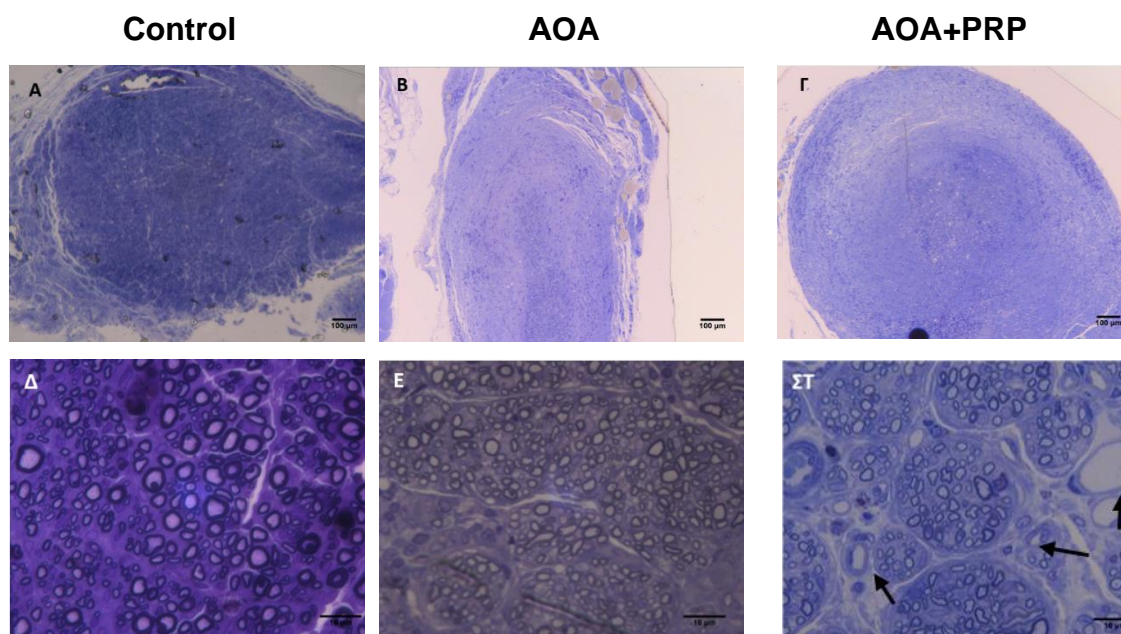
Πίνακας 4. Αποτελέσματα ανάλυσης βαδίσματος SFI \pm SD

	Προ εγχειρητικά	4 βδομάδες	12 βδομάδες
Ομάδα control	$-10,07 \pm 3,38$	$-87,36 \pm 6,27$	$-51,35 \pm 7.84$
Ομάδα AOA	$-8,26 \pm 5,1$	$-80.89 \pm 9,22$	$-70,56 \pm 15.38$
Ομάδα AOA+PRP	-8.75 ± 4.28	$-80,21 \pm 6.59$	$-49,95 \pm 8,25$

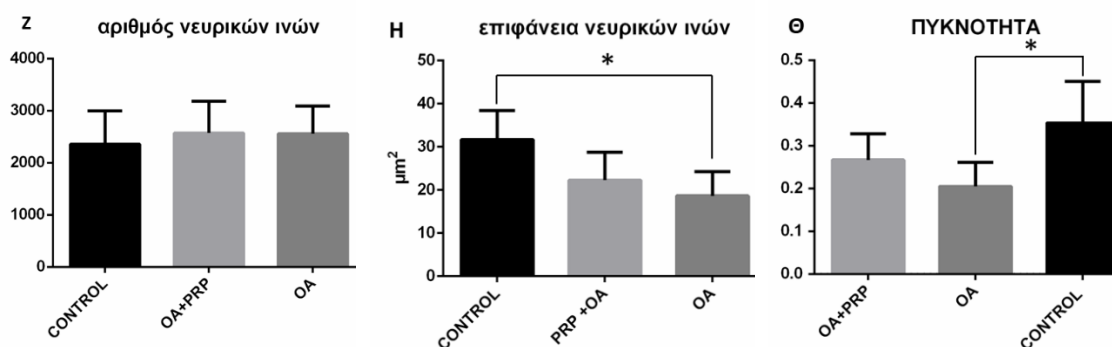
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.

Η μορφομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μεσαίο τμήμα των νευρικών οδηγών. Η λήψη των δειγμάτων έγινε τη 12^η εβδομάδα μετά τη χειρουργική επέμβαση. Αρχικά, παρατηρήθηκε διατήρηση της κυκλότητας του νευρικού ιστού στην ομάδα control και στην ομάδα AOA+PRP, ενώ στην ομάδα AOA παρατηρήθηκε πλάτυνση του νευρικού ιστού (εικόνα 6Α, 6Β, 6Γ αντίστοιχα). Εμμέλες νευρικές ίνες διαφορετικών μεγεθών παρατηρήθηκαν και στις τρεις ομάδες (εικόνα 6Δ, 6Ε, 6ΣΤ). Ο αριθμός των νευρικών ινών δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων ($p = 0.7975$ εικόνα 5Ζ), ωστόσο στις ομάδες AOA και AOA+PRP παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανομοιομορφία όσον αφορά στην επιφάνεια των νευρικών ινών, όπου η ομάδα του AOA είχε σημαντικά μικρότερες νευρικές ίνες σε σχέση με τη control ομάδα ($p=0.023$, εικόνα 6Η). Αυτή η τάση αντανακλάται και στην πυκνότητα των ινών των νεύρων (εικόνα 6Θ). Τέλος, στην ομάδα AOA+PRP παρατηρήθηκε αυξημένη αγγειογένεση (μαύρα βελόνια εικόνα 6ΣΤ) σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες.



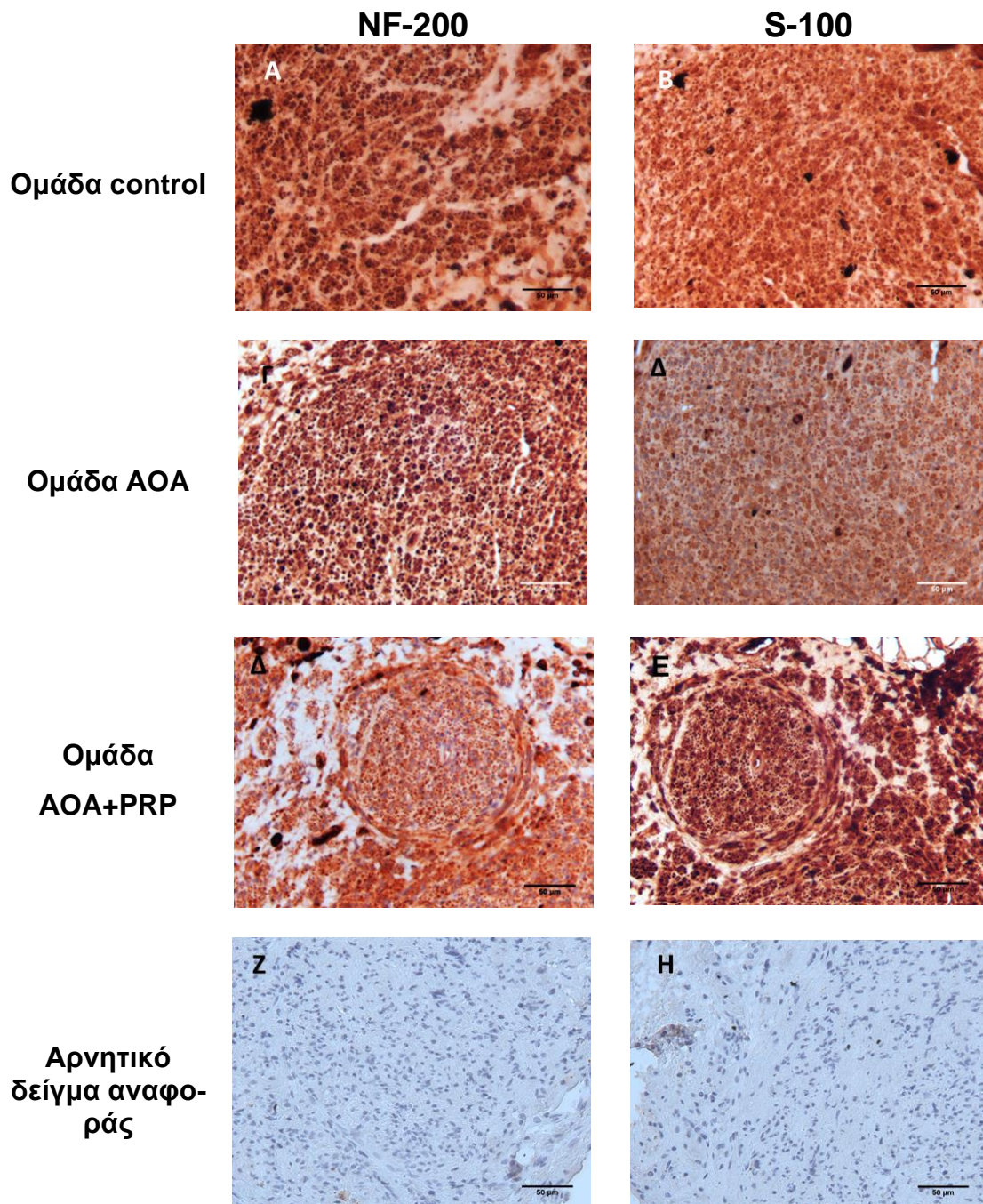
Διαγράμματα μορφομετρικής ανάλυσης.



Εικόνα 6. Μορφομετρική ανάλυση του μεσαίου τμήματος των νευρικών οδηγών. Α,Β,Γ) Εγκάρσιες τομές νευρικού ιστού με χρήση χρώσης κυανό της τολουιδίνης σε μεγέθυνση 10 Χ και μπάρα κλίμακας 100μm. Δ,Ε,ΣΤ) Εγκάρσιες τομές νευρικού ιστού με χρήση χρώσης κυανό της τολουιδίνης σε μεγέθυνση 100Χ και μπάρα κλίμακας 16μm. Ζ) Ο αριθμός νευρικών ινών Η) η επιφάνεια νευρικών ινών Θ) και η πυκνότητα νευρικών ινών αξιολογήθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά όπου * $p < 0,05$.

6.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΑΞΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ SCHWANN.

Εγκάρσιες τομές 5 mm ελήφθησαν από το μεσαίο τμήμα των νευρικών μοσχευμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρώση με αντισώματα έναντι των νευροϊνιδίων των νευραξόνων και της πρωτεΐνης S-100. Η θετική έκφραση των παραπάνω αντισωμάτων σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα (εικόνα 7) υποδεικνύει την ύπαρξη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών άρα και την ικανότητα των νεκρικών αξόνων να επιμηκύνονται διαμέσου του ικριώματος καθώς επίσης ότι ήταν δυνατή η μετανάστευση των Schwann κυττάρων από το κεντρικό κολόβωμα της προς τη περιφέρεια. Ως αρνητικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τομή νευρικού ιστού η οποία δεν επωάσθη με πρωτεύον αντίσωμα.



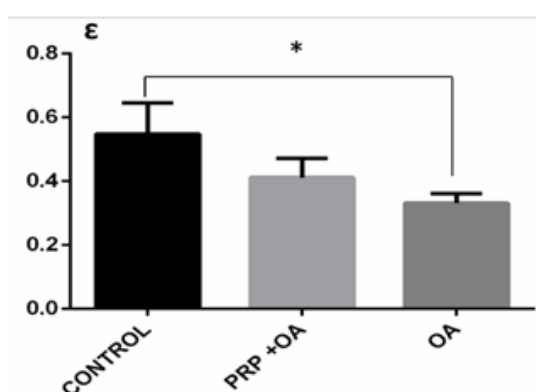
Εικόνα 7. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας. Α,Γ,Δ) Εγκάρσιες τομές της ομάδας control, της ομάδας ΑΟΑ και της ομάδας ΑΟΑ+PRP αντίστοιχα σημασμένες με αντι-NF200. Β,Δ,Ε) Εγκάρσιες τομές της ομάδας control, της ομάδας ΑΟΑ και της ομάδας ΑΟΑ+PRP αντίστοιχα σημασμένες με αντι-S-100. Ζ,Η) Εγκάρσιες τομές χωρίς πρωτεΐν αντισώμα οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό δείγμα αναφοράς.

6.3 ΛΟΓΟΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΜΥΪΚΗΣ ΜΑΖΑΣ

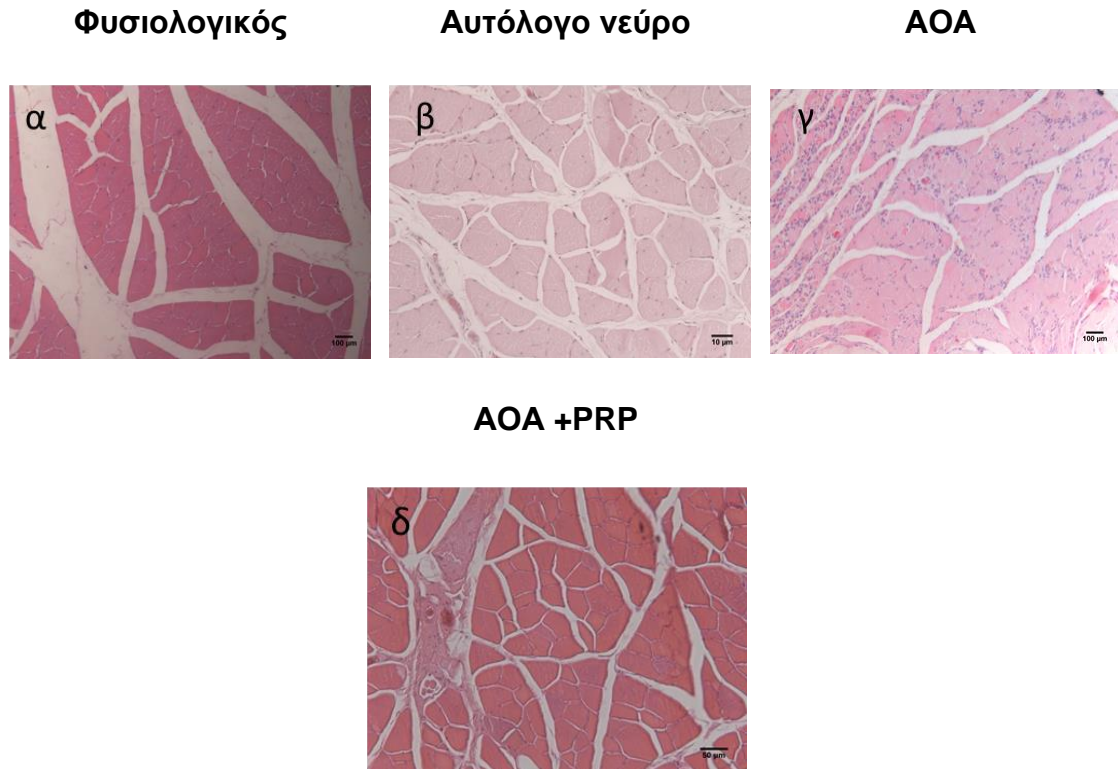
Έντονη ατροφία παρουσίασε ο γαστροκνήμιος μυς σε όλα τα ζώα της ομάδας AOA, ενώ στην ομάδα AOA+PRP και control η ατροφία που παρατηρήθηκε ήταν λιγότερο έντονη. Ο μέσος όρος του λόγου διατήρησης της μάζας του μύος στην ομάδα control ήταν $0,55 \pm 0,10$, στην ομάδα AOA $0,33 \pm 0,3$ και στην ομάδα AOA+PRP $0,51 \pm 0,8$. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ της ομάδας control και της ομάδας AOA ($p < 0.0001$).

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με την ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης που πραγματοποιήθηκε στα ιστολογικά παρασκευάσματα των γαστροκνημίων (εικόνα 8). Στην ομάδα control και στην ομάδα AOA+PRP, οι μυϊκές ίνες είναι αισθητά μεγαλύτερες σε επιφάνεια, σε σχέση με τις μυϊκές ίνες της ομάδας που ως νευρικός οδηγός χρησιμοποιήθηκε η ομφάλια αρτηρία.

Διατήρηση μυϊκής μάζας



Διάγραμμα 3. Στατιστική ανάλυση της διατήρησης της μυϊκής μάζας* $p < 0,05$. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μόνο μεταξύ της ομάδας control και της ομάδας



Εικόνα 8. Μέσω τμήμα γαστροκνημίου με χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη σε αρχική μεγέθυνση 20X. α) φυσιολογικός γαστροκνήμιος, β) γαστροκνήμιος από την control ομάδα γ) γαστροκνήμιος από την ΑΟΑ ομάδα δ) γαστροκνήμιος από την ΑΟΑ+PRP ομάδα,.

Αναλυτικότερα, στην ομάδα control και στην ομάδα ΑΟΑ+PRP οι ίνες εμφανίζονταν πολυγωνικές με υποσαρκειληματική εντόπιση των πυρήνων τους και ελάχιστη ανάπτυξη συνδετικού ιστού μεταξύ τους, ενώ στην ομάδα ΑΟΑ οι μυϊκές ίνες σχημάτιζαν μικρές ομάδες ατροφικών ινών και εκτεταμένη ίνωση. Στην ομάδα αυτή παρατηρήθηκαν περιοχές με εκτεταμένη ατροφία και περιοχές όπου οι μυϊκές ίνες διατηρούσαν σε σημαντικό βαθμό τη φυσιολογική τους ιστολογική εικόνα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι βλάβες του περιφερικού νευρικού συστήματος αποτελούν παγκόσμιο κλινικό πρόβλημα, αφού επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και προκαλούν τεράστια κοινωνικο-οικονομική επιβάρυνση^{19,67,188}. Τραυματισμοί των περιφερικών νεύρων μπορούν να προκληθούν από τροχαία ατυχήματα, κακώσεις από αθλητικές δραστηριότητες, ατυχήματα που συμβαίνουν είτε στο σπίτι είτε στη δουλειά, από μια εκτομή όγκου. Θεραπεία πρώτης εκλογής είναι η μεταμόσχευση αυτόλογου νευρικού ιστού δευτερευούσης σημασίας, από κάποιο άλλο σημείο του σώματος⁷⁰. Ωστόσο σοβαρά μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν: α) οι πηγές νευρικού ιστού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτή τη μέθοδο είναι ιδιαίτερα περιορισμένες και β) η ανάγκη δεύτερης χειρουργικής επέμβασης για τη λήψη του νευρικού μοσχεύματος κ.α⁷¹. Οι παραπάνω περιορισμοί έχουν σαν αποτέλεσμα την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων για την αποκατάσταση βλαβών του ΠΝΣ.

Η αποκυτταροποίηση μοσχευμάτων λόγω της μειωμένης ανοσογονικότητας τους αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδο για την αποκατάσταση ιστικών βλαβών¹⁶. Τέτοιου είδους μοσχεύματα όπως νευρικός ιστός και ο σκελετικός μυς έχουν εφαρμοστεί με ευεργετικά αποτελέσματα στην αναγέννηση περιφερικών νεύρων σε ζωικά πρότυπα^{66,189,190} αλλά και στην κλινική πράξη^{67,68}. Προηγούμενες έρευνες έχουν διερευνήσει την πιθανότητα χρήσης αγγειακών ικτριωμάτων για τη γεφύρωση νευρικών ελλειμμάτων^{191,69}.

Η ιδέα της χρήσης νευρικών οδηγών αγγειακής προέλευσης έχει μελετηθεί από το τέλος του 19^{ου} αιώνα. Ο Bünger OV, το 1891, ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε μικρά τμήματα αρτηρίας ως νευρικούς οδηγούς¹⁹². Παρόλο που σε πειραματικό επίπεδο η αναγέννηση νευρικού ιστού ήταν επιτυχής δεν εφαρμόστηκε στην κλινική πράξη, πιθανόν λόγω έλλειψης του κατάλληλου μοσχεύματος.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης αποκυτταροποιημένης ΟΑ σε συνδυασμό με PRP ως νευρικός οδηγός σε επίμυες.

Το συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο επιλέχτηκε γιατί είναι οικονομικό, ανθεκτικό στις χειρουργικές λοιμώξεις, απαιτεί απλούς χειρισμούς και φροντίδα. Επιπλέον, είναι το περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο διεθνώς για την αποκατάσταση δυσλειτουργιών ισχιακού νεύρου, με αποτέλεσμα την

ανάπτυξη τυποποιημένων και συγκρίσιμων δοκιμών για την αξιολόγηση της νευρικής λειτουργίας. Τέλος, η ανατομία των νεύρων των επίμυων είναι πολύ καλά μελετημένη και σε γενικές γραμμές προσομοιάζει με αυτή του ανθρώπου¹⁹³. Συχνή κριτική στις μελέτες σε επίμυες είναι ότι ο ρυθμός της αναγέννησης των νευρικών ινών είναι ταχύτερος σε σχέση με τα πιο μεγάλα θηλαστικά. Έχει σημασία το γεγονός ότι το έλλειμμα (π.χ. 10 mm) στον επίμυ, όπως και στη παρούσα μελέτη, είναι αναλογικά πολύ μεγαλύτερο από ότι σε άλλα μεγαλύτερα θηλαστικά. Η αναλογία του μήκους του ελλείματος, το συνολικό μήκος και η διάμετρος του νεύρου είναι σημαντικοί παράγοντες¹⁹⁴.

Η ανθρώπινη ΟΑ αποτελείται από μια σύνθετη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Μεταξύ των πρωτεϊνών που την απαρτίζουν είναι το κολλαγόνο η φιμπρονεκτίνη, η λαμινίνη και οι πρωτεογλυκάνες^{195,196}. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες και ειδικότερα η λαμινίνη προάγουν την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων, ενισχύουν την προσκόλληση των νευρικών κυττάρων, επάγουν τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση καθοδηγώντας έτσι τη σωστή κατεύθυνση του νευρικού κώλου^{197,198} που σχηματίζεται κατά την αναγέννηση των περιφερικών νεύρων. Το κολλαγόνο, η φιμπρονεκτίνη και λαμινίνη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη του αισθητήριου νευρικού συστήματος. Γι' αυτό το λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί και σαν υπόστρωμα σε καλλιέργεια με κύτταρα του Schwann για την ενίσχυση της απόκρισης τους¹⁹⁹. Ωστόσο αναμεσα στις γλυκοζαμινογλυκανές που απαρτίζουν την ECM της ανθρώπινης ΟΑ βρίσκεται και η θειική χονδροϊτίνη, η οποία είναι γνωστό ότι παίζει ανασταλτικό ρόλο στην αναγέννηση τόσο του ΚΝΣ όσο και του ΠΝΣ²⁰⁰. Αυτό το μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση πρωτοκόλλων αποκυτταροποίησης που περιέχουν μη ιονικά διαλύματα όπως το SDS που χρησιμοποιείται και στο παρόν πρωτόκολλο^{64,84}. Το SDS καταστρέφει τις συνδέσεις μεταξύ των γλυκοζαμινογλυκανών με την κεντρική πρωτεΐνη της ECM με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή τους από τον ιστό κατά τη διαδικασία της αποκυτταροποίησης.

Αναλυτικότερα, από της ιστολογικές τομές στις οποίες εφαρμόστηκε η χρώση H&E παρατηρήθηκε η απομάκρυνση της πλειοψηφίας των κυτταρικών πληθυσμών. Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από την ποσοτικοποίηση του DNA που πραγματοποιήθηκε σε αποκυτταροποιημένες αρτηρίες, όπου απομακρύνθηκε το 88,8% του γενετικού υλικού. Πιο συγκεκριμένα, σε όλα τα

αποκυτταροποιημένα δείγματα που μετρήθηκαν, η συγκέντρωση του DNA δεν ξεπερνούσε τα 50 ng/μl. Σύμφωνα με την ομάδα του Crapo και των συνεργατών, οι οποίοι θέσανε τα κριτήρια της επιτυχούς αποκυτταροποίησης, στους αποκυτταροποιημένους ιστούς η συγκέντρωση του DNA δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τα 50 ng/μl.

Από τις ιστολογικές χρώσεις Masson's Trichrome, Elastic Van Gieson και Toluidine blue παρατηρήθηκε, ότι μετά την αποκυτταροποίηση της ομφάλιας αρτηρίας, διατηρούνται σε άριστο επίπεδο η αρχιτεκτονική της αρτηρίας, καθώς επίσης οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα ευρήματα των ιστολογικών αναλύσεων έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας της Niklason *et al*^{201,202} όπου αποκυτταροποιήθηκαν με παρόμοιο πρωτόκολλο ομφάλιας αρτηρίες αλλά και πνεύμονες.

Μετά την αποκυτταροποίηση των OA διενεργήθηκαν οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Γι' αυτές τις δοκιμασίες απομονώθηκαν MSCs από τη Βαρτόνιο Γέλη του ομφαλίου λώρου. Επιλέχθησαν τα εν λόγω κύτταρα αρχικά λόγω της δυνατότητας τους να διαφοροποιούνται σε νευρικά κύτταρα²⁰³ και επιπρόσθετα, μελλοντικά πειράματα θα περιλαμβάνουν την επανακυτταροποίηση των AOA και χρήση τους ως νευρικοί οδηγοί σε ζωικά πρότυπα.

Από τη συν-καλλιέργεια των WJ MSCs με τμήματα αποκυτταροποιημένου ιστού φάνηκε ότι ο ιστός διατήρησε τη δυνατότητα προσκόλλησης των κυττάρων στην επιφάνεια του. Επιπλέον, ο προσδιορισμός των τιμών του λόγου ADP/ATP επιβεβαίωσε την ικανότητα πολλαπλασιασμού των εν λόγω κυττάρων.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται μέσα στο PRP προάγουν τη αναγέννηση των περιφερικών νεύρων^{204,205,206,207}. Αν και δεν είναι κλασσικοί νευροτροφικοί παράγοντες, οι επιδράσεις τους στη νευρική αναγέννηση έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF) απελευθερώνεται από απονευρωμένους ιστούς στόχους, όπως το περιφερικό νευρικό κολόβωμα ή από τον απονευρωμένο μυ. Ακόμα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει τις θετικές επιδράσεις της χορήγησης του στο σημείο τραυματισμού του νευρικού ιστού^{208,209}. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) διεγείρει την αξονική ανάπτυξη και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του Ζβάν (Schwann Cells)²¹⁰. Επιπλέον, με τη συνδυασμένη χορήγηση του αυξητικού

παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών II (FGFII) έχει παρατηρηθεί η βελτίωση της νευρικής αναγέννησης²¹¹. Ο Sariguney και οι συνεργάτες του με τη μελέτη που δημοσίευσαν το 2008 παρουσίασαν δεδομένα που αποδεικνυαν ότι η χορήγηση PRP στο σημείο συρραφής διατιμηθέντος νεύρου επιτάχυνε την επαναμυελίνωση του ισχιακού νεύρου επίμυ¹⁶⁹.

Στην παρούσα μελέτη, μετά τη μεταμόσχευση οι AOA είχαν καλό βαθμό αποδόμησης, ο οποίος επέτρεψε τη αναγέννηση του νευρικού ιστού, απέτρεψε τη δημιουργία ουλώδους ιστού μεταξύ των κολοβωμάτων και δεν εμφάνιζε στοιχεία φλεγμονής.

Η αξιολόγηση της κινητικής αποκατάστασης των επίμυων πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του SFI. Δώδεκα εβδομάδες μετά τη χειρουργική αποκατάσταση των ισχιακών νευρών, σε καμία από τις τρεις ομάδες ο SFI δεν επανήλθε στο επίπεδο πριν τη χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, η ομάδα control και η ομάδα AOA+PRP εμφανίζουν σαφώς πιο βελτιωμένο δείκτη λειτουργικότητας (-51,35±7.84 και -49,95±8,25 αντίστοιχα) με την ομάδα AOA+PRP να έχει ελαφρώς πιο βελτιωμένο SFI, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι παρόμοια με τη μελέτη του Yeong Kim και των συνεργατών του¹³⁹ αλλά σε σχέση με τη μελέτη του Rodrigo Guerra Sadongi²¹² ο SFI είναι εμφανώς καλύτερος. Είναι γνωστό από την κλινική αλλά και την πειραματική πρακτική, ότι τα αποτελέσματα μετά από τη χειρουργική αποκατάσταση των νεύρων είναι δύσκολα προβλέψιμα. Ακόμη και σε πειραματικές συνθήκες, με τυποποιημένες βλάβες και τεχνικές αποκατάστασης, υπάρχει μεγάλη διασπορά των αποτελεσμάτων²¹³.

Η μορφομετρική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση επιβεβαίωσαν την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων και τη δυνατότητα μετανάστευσης των Ζβάν κυττάρων. Αναλυτικότερα, θετική έκφραση της πρωτεΐνης NF 200 και της S -100 στην ομάδα AOA και στην ομάδα AOA+PRP αποδεικνύει ότι ο ιστός της AOA μπορεί να υποστηρίξει τη νευρική αναγέννηση. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτική ανάλυση στην ανοσοϊστοχημεία, δηλαδή μελετήθηκε μόνο αν ανιχνεύονται ή όχι οι παραπάνω πρωτεΐνες. Μειονέκτημα της μελέτης είναι ότι δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών ώστε να υπάρχει και άμεση συσχέτιση με την ομάδα control.

Στη μορφομετρική ανάλυση παρατηρήθηκε ο πλήρης μετασχηματισμός της AOA και στις δύο ομάδες επίμυων όπου χρησιμοποιήθηκε ως νευρικός οδηγός (εικόνα 5B, 5Γ), καθώς επίσης και η επιμήκυνση των νευρικών αξόνων μέσα από τον ιστό της AOA (εικόνα 5E, 5ΣΤ). Αναλυτικότερα, ο αριθμός των νευρικών ινών δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων, ωστόσο η επιφάνεια των νευρικών ινών της AOA ομάδας είχε μεγαλύτερη ανομοιομορφία και μικρότερο μέγεθος. Αντίθετα, στην ομάδα AOA-PRP, ενώ παρατηρήθηκαν ανομοιομορφίες στο μέγεθος της επιφάνειας των νευρικών ινών δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τη ομάδα control. Η τάση των παραπάνω ευρημάτων εκφράστηκε και στην πυκνότητα των νευρικών ινών του αναγεννηθέντος ισχιακού νεύρου. Τέλος, στην ομάδα AOA+PRP παρατηρήθηκε έντονη αγγειογένεση σε σχέση με την ομάδα control και την ομάδα AOA. Σύμφωνα με την ομάδα Hyong-Ho το παραπάνω φαινόμενο ενδεχομένως να οφείλεται στην αγγειοποιητίνη 1¹⁶⁹ (πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια του VEGF), η οποία απελευθερώνεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, παρόμοια αποτελέσματα δημοσίευσε και η ομάδα του Ji Yeong Kim που ως νευρικό οδηγό χρησιμοποίησε ανεστραμμένη φλέβα σε συνδυασμό με PRP. Ωστόσο, η ομάδα του Rodrigo Guerra Sadongi που χρησιμοποίησε αγγειακό μόσχευμα σε συνδυασμό με το PRP είχε καλύτερα αποτελέσματα στη μορφομετρική ανάλυση ακόμα και από την ομάδα control (αυτόλογο νεύρο).

Ο λόγος διατήρησης της μυϊκής μάζας είναι μια άλλη παράμετρος η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες για την έκταση της μυϊκής ατροφίας η οποία συνδέεται με το βαθμό επανεύρωσης του μυ²¹⁴. Από προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η διατήρηση της μυϊκής μάζας ελέγχεται από την ισορροπία μεταξύ των οδών πρωτεϊνικής σύνθεσης και πρωτεϊνικής αποδόμησης. Όταν ένας μυς απονευρώνεται ως συνέπεια νευρικού τραυματισμού, η ισορροπία σύνθεσης και αποδόμησης διαταράσσεται και μετατοπίζεται σε τάση αποδόμησης. Αυτό το φαινόμενο έχει σαν αποτέλεσμα το μειωμένο μέγεθος των μυϊκών κυττάρων, την απώλεια μυϊκού βάρους και την υπερπλασία συνδετικού ιστού²¹⁵.

Στην παρούσα μελέτη, στην ομάδα control και στην ομάδα AOA+PRP η σοβαρή αποδόμηση του γαστροκνημίου μυ αποτράπηκε όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της διατήρησης της μυϊκής μάζας και από τα ιστολογικά ευρήματα. Ωστόσο η ομάδα AOA εμφάνισε μεγαλύτερο βαθμό ατροφίας. Στα ιστολογικά

ευρήματα παρατηρήθηκαν τόσο φυσιολογικές όσο και μικρότερες μυϊκές ίνες, αλλά και αυξημένη κυτταρική διήθηση.

Εν κατακλείδι, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι στην ομάδα AOA-PRP οι νευρικές ίνες βρίσκονται σε πιο ώριμο στάδιο της αναγεννητικής διαδικασίας σε σύγκριση με την ομάδα AOA και σε παρόμοιο επίπεδο με την ομάδα control²¹⁵. Παρόμοια μεθοδολογία και αποτελέσματα μπορούν να βρεθούν σε σχετικές έρευνες²¹⁶.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την ευεργετική επίδραση του PRP στην αναγέννηση περιφερικών νευρών^{217,207}. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο το PRP προάγει τη νευρική αναγέννηση δεν έχει πλήρως κατανοηθεί.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η AOA ως νευρικός οδηγός εγχύοντας στο εσωτερικό της PRP. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός των παραπάνω έχει εξίσου καλά αποτελέσματα με τη χρήση αυτόλογου νεύρου για τη γεφύρωση 10mm νευρικών ελλειμμάτων σε ισχιακό νεύρο επίμου. Μελλοντικές μελέτες όσον αφορά το PRP πρέπει να εστιάσουν στις επιδράσεις των αυξητικών παραγόντων του PRP στη νευρική αναγέννηση με σκοπό τον προσδιορισμό της ιδανικής συγκέντρωσης του. Ακόμα και τον τρόπο χορήγησής του. Όσον αφορά τη χρήση της OA ως νευρικό οδηγό, μελλοντικές μελέτες πρέπει να εστιάσουν στην ποσοτικοποίηση της θεικής χονδροϊτίνης που περιέχεται στην ECM πριν και μετά τη διαδικασία της αποκυτταροποίησης και αν αυτή παίζει ανασταλτικό παράγοντα για την αξονική αναγέννηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gutierrez, A. & England, J. D. Peripheral Nerve Injury. in *Neuromuscular Disorders in Clinical Practice* (Springer New York, **2014** p863–869). doi:10.1007/978-1-4614-6567-6_39.
2. Rodrigues MC, Rodrigues AA Jr, Glover LE, *et al.* Peripheral Nerve Repair with Cultured Schwann Cells: Getting Closer to the Clinics. *Sci. World J.* **2012**:413091. doi: 10.1100/2012/413091.
3. Grinsell, D. & Keating, C. P. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Biomed Res. Int.* **2014**:698256. doi: 10.1155/2014/698256.
4. Crouzier T, McClendon T, Tosun Z, *et al.* Inverted human umbilical arteries with tunable wall thicknesses for nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* **2009**:89(3):818-28. doi: 10.1002/jbm.a.32103.
5. Houshyar, S., Bhattacharyya, A. & Shanks, R. Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures. *ACS Chemical Neuroscience.* **2019**:21;10(8):3349-3365. doi: 10.1021/acschemneuro.9b00203.
6. Rochkind S. & Nevo Z. Recovery of Peripheral Nerve with Massive Loss Defect by Tissue Engineered Guiding Regenerative Gel. *Biomed Res Int.* **2014**:327578. doi: 10.1155/2014/327578.
7. He Cq, Zhang LH, Liu XF, *et al.* A 2-year follow-up survey of 523 cases with peripheral nerve injuries caused by the earthquake in Wenchuan, China. *Neural Regen. Res* **2015**:10(2):252-9.
8. Ma CH, Omura T, Cobos EJ, *et al.* Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. *J. Clin. Invest.* **2011**:121(11):4332-47. doi: 10.1172/JCI58675.
9. He B, Zhu Z, Zhu Q, *et al.* Factors predicting sensory and motor recovery after the repair of upper limb peripheral nerve injuries. *Neural Regen. Res.* **2014**:15;9(6):661-72. doi: 10.4103/1673-5374.
10. Paprottka FJ, Wolf P, Harder Y. *et al.* Sensory Recovery Outcome after Digital Nerve Repair in Relation to Different Reconstructive Techniques: Meta-Analysis and Systematic Review. *Plast. Surg. Int.* **2013**:704589. doi: 10.1155/2013/704589.
11. Belkas JS, Shoichet MS. & Midha R. Peripheral nerve regeneration through

- guidance tubs. *Neurol. Res.* **2004**:26(2):151-60.
12. Staniforth P, & Fisher TR. The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting. *Hand.* **1978**:10(2):187-90.
 13. Evans GR. Peripheral nerve injury: A review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec.* **2001**:1;263(4):396-404.
 14. Sun W, Darling A, Starly B, et al. Computer-aided tissue engineering: overview, scope and challenges. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**:39(Pt1):29-47. doi: 10.1042/BA20030108.
 15. Dellgren G, Eriksson M, Brodin LA, et al. The Extended Biocor Stentless Aortic Bioprosthesis: Early Clinical Experience. *Scand. Cardiovasc. J.* **1999**:33(5):259-64. doi: 10.1080/14017439950141498.
 16. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Vorotnikova E. et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol.* **2010**:29(8):690-700. doi: 10.1016/j.matbio.2010.08.007.
 17. Cajal, S. R. y. *Degeneration & regeneration of the nervous system.* (Oxford University Press Humphrey Milford, **1928** p1251-1253).
 18. Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, et al. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery.* **1982**:91(2):226-33.
 19. Phillips JB, Bunting SC, Hall SM, et al. Neural Tissue Engineering: A Self-Organizing Collagen Guidance Conduit. *Tissue Eng.* **2005**:(9-10);1611-7.
 20. Snell, R. S. *Clinical neuroanatomy.* (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, **2010** p 542).
 21. Dvali LT & Myckatyn TM. End-to-Side Nerve Repair: Review of the Literature and Clinical Indications. *Hand Clin.* **2008**:24(4):455-60, vii. doi: 10.1016/j.hcl.2008.04.006.
 22. Thorne C, Chung KC, Gosain A, Guntner GC. & Mehrara, B. J. Plastic Surgery, Repair and grafting of the peripheral nerve. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, **2014** p 630-697).
 23. Gelberman RH. *Structure and function of peripheral nerve.* In: *Operative nerve repair and reconstruction.* (Lippincott, **1991** p 3-18).
 24. Seddon H. *Surgical disorders of the peripheral nerves.* (Churchill Livingstone, **1975** p 336).

25. Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*. (Churchill Livingstone, **1978** p 238).
26. Mackinnon SE. & Dellon AL. *Surgery of the Peripheral Nerve*. (Thieme Medical, **1988** p 638).
27. Wong BJ & Crumley RL. Nerve wound healing. An overview. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **1995**:28(5):881-95.
28. Augustus Waller. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *R. Soc. Publ.* **1850**:140;423–429.
29. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.* **1996**:25(2):101-21.
30. Livesey FJ, O'Brien JA, Li M, *et al.* A Schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. *Nature.* **1997**11;390(6660):614-8.doi: 10.1038/37615.
31. Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, *et al.* Peripheral nerve conduits: Technology update. *Med. Devices Evid. Res.* **2014**:17:405-24. doi: 10.2147/MDER.S59124.
32. Fu SY & Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* **1997**:14(1-2):67-116.
33. Witzel C, Rohde C & Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J. Comp. Neurol.* **2005**:9;485(3):183-90.
34. Wells, J. *Human neuroanatomy, 8th edition. Muscle & Nerve* **1983** (John Wiley & Sons, Ltd,p 462).
35. Langer R, & Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.***1993**:14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529.
36. Atala A. & Lanza RP. *Methods of tissue engineering.* **2001** (Academic Press,p 1285).
37. Vunjak-Novakovic G & Radisic M, *et al.* Cell seeding of polymer scaffolds. *Methods Mol. Biol.* **2004**:238:131-46. doi: 10.1385/1-59259-428-x:131.
38. Ng J, Spiller K, Bernhard J *et al.* Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **2017**:23(5):480-493. doi: .10.1089/ten.TEB.2016.0289.
39. Chan BP & Leong AKW. Scaffolding in tissue engineering: general

- approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* **2008**;4:467-79. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3.
40. Irawan V, Sung TC, Higuchi A, *et al.* Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**;25;15(6):673-697. doi: 10.1007/s13770-018-0135-9.
 41. Vukajlovic D, Parker J, Bretcanu O, *et al.* Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C.* **2019**;96:955-967. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.026.
 42. Setayeshmehr M, Esfandiari E, Rafieinia M. *et al.* Hybrid and composite scaffolds based on extracellular matrices for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2019**;25(3):202-224 doi:10.1089/ten.TEB.2018.0245
 43. Marques CF, Diogo GS, Pina S *et al.* Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**;30(3):32. doi: 10.1007/s10856-019-6234-x.
 44. Glowacki J, & Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* **2008**;89(5):338-44.
 45. Marques AP, Cruz HR, Coutinho OP, *et al.* Effect of starch-based biomaterials on the in vitro proliferation and viability of osteoblast-like cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**;16(9):833-42. doi: 10.1007/s10856-005-3580-7.
 46. Hench LL & Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science.* **2002**;8;295(5557):1014-7. doi: 10.1126/science.1067404.
 47. Tawagi E, Ganesh T, Cheng HM, *et al.* Synthesis of degradable-polar-hydrophobic-ionic co-polymeric microspheres by membrane emulsion photopolymerization: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* **2019**;15;89:279-288. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.014.
 48. Hwang TI, Kim JI, Joshi MK, *et al.* Simultaneous regeneration of calcium lactate and cellulose into PCL nanofiber for biomedical application. *Carbohydr. Polym.* **2019**;15;212:21-29. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.01.085..
 49. Gunatillake PA & Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* **2003**;20;5:1-16; discussion 16. doi:

- 10.22203/ecm.v005a01
50. Desai A, Vafae T, Rooney P, *et al.* In vitro biomechanical and hydrodynamic characterisation of decellularised human pulmonary and aortic roots. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2018**:79:53-63. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.09.019.
 51. Cerqueira SR, Lee YS, Cornelison RC, *et al.* Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury. *Biomaterials.* **2018**:177:176-185. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.05.049.
 52. Xie S, Zhou Y, Tang Y, *et al.* Book-shaped decellularized tendon matrix scaffold combined with bone marrow mesenchymal stem cells-sheets for repair of achilles tendon defect in rabbit. *J. Orthop. Res.* **2019**:37(4):887-897. doi:10.1002/jor.24255.
 53. Abedin E, Lari R, Mahdavi Shahri N, *et al.* Development of a demineralized and decellularized human epiphyseal bone scaffold for tissue engineering: A histological study. *Tissue Cell.* **2018**:55:46-52. doi: 10.1016/j.tice.2018.09.003.
 54. Aldridge A, Desai A, Owston H, *et al.* Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft. *Cell Tissue Bank.* **2018**:19(3):287-300. doi: 10.1007/s10561-017-9673-y.
 55. Ansaloni L, Cambrini P, Catena F. *et al.* Immune Response to Small Intestinal Submucosa (Surgisis) Implant in Humans: Preliminary Observations. *J. Investig. Surg.* **2007**:20(4):237-41. doi:10.1080/08941930701481296.
 56. Porzionato A, Stocco E, Barbon S, *et al.* Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**:8;19(12). pii: E4117. doi:10.3390/ijms19124117.
 57. Chen F, Yoo JJ & Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology.* **1999**:54(3):407-10. doi:10.1016/s0090-4295(99)00179-x.
 58. Harper, C. Permacol: clinical experience with a new biomaterial. *Hosp. Med.* **2001**:62(2):90-5. doi: 10.12968/hosp.2001.62.2.2379.

59. Barkan D, Green JE. & Chambers AF. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur. J. Cancer.* **2010**:46(7):1181-8. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.027.
60. Nelson CM & Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**:22:287-309. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.01305.104315
61. Taylor KR & Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* **2006**:20(1):9-22. doi: 10.1096/fj.05-4682rev.
62. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* **2004**:12(3-4):367-77.
63. Gilbert TW, Sellaro TL & Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* **2006**:27(19):3675-83. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
64. Crapo PM, Gilbert TW & Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* **2011**:32(12):3233-43. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
65. Yi S, Xu L. & Gu X. Scaffolds for peripheral nerve repair and reconstruction. *Exp. Neurol.* **2019**:319:112761. doi:10.1016/j.expneurol.2018.05.016.
66. Keilhoff G, Gohl A, Stang F, *et al.* Peripheral Nerve Tissue Engineering: Autologous Schwann Cells vs. Transdifferentiated Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng.* **2006**:12(6):1451-65. doi: 10.1089/ten.2006.12.1451.
67. Chalfoun CT, Wirth GA & Evans GR. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *J. Cell. Mol. Med.* **2006**:10(2):309-17. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00401.x.
68. Gu X, Ding F & Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* **2014**:35(24):6143-56. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.064.
69. Battiston B, Geuna S, Ferrero M, *et al.* Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery* **2005**:25(4):258-67. doi: 10.1002/micr.20127.

70. Steinhoff G *regenerative medicine - from protocol to patient*. (Springer International Publishing, **2016** p 169-208). doi:10.1007/978-3-319-27610-6
71. Bronzino JD. *The biomedical engineering handbook*. (CRC/Taylor & Francis, **2006** section7, p 1-11).
72. Muheremu A. & Ao Q. Past, Present, and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Biomed Res. Int.* **2015**:237507. doi:10.1155/2015/237507.
73. Lundborg G, Dahlin LB & Danielsen N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. Case report. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. hand Surg.* **1991**:25(1):79-82. doi: 10.3109/02844319109034927.
74. Lundborg G, Rosén B, Abrahamson SO *et al.* Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J. Hand Surg. Br.* **1994**:19(3):273-6. doi: 10.1016/0266-7681(94)90068-x.
75. Lundborg G, Rosén B, Dahlin L *et al.* Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg. Br. Eur.* **2004**:29(2):100-7. doi: 10.1016/j.jhsb.2003.09.018.
76. Mohammadi R, Masoumi-Verki M, Ahsan S *et al.* Improvement of peripheral nerve defects using a silicone conduit filled with hepatocyte growth factor. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **2013**:116(6):673-9. doi:10.1016/j.oooo.2013.07.006.
77. Li S, Wang X, Gu Y *et al.* Let-7 microRNAs Regenerate Peripheral Nerve Regeneration by Targeting Nerve Growth Factor. *Mol. Ther.* **2015**:23(3):423-33. doi: 10.1038/mt.2014.220.
78. Bittner GD, Keating CP, Kane JR *et al.* Rapid, effective, and long-lasting behavioral recovery produced by microsutures, methylene blue, and polyethylene glycol after completely cutting rat sciatic nerves. *J. Neurosci. Res.* **2012**:90(5):967-80. doi: 10.1002/jnr.23023
79. Bittner GD, Mikesch M & Ghergherehchi CL. Polyethylene glycol-fusion retards Wallerian degeneration and rapidly restores behaviors lost after nerve severance. *Neural Regen. Res.* **2016**:11(2):217-9. doi:10.4103/1673-5374.177716.
80. Britt JM, Kane JR, Spaeth CS, *et al.* Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery After

- Sciatic Nerve Crush Injury. *J. Neurophysiol.* **2010**:104(2):695-703. doi: 10.1152/jn.01051.2009.
81. Riley DC, Bittner GD, Mikesch M *et al.* Polyethylene glycol-fused allografts produce rapid behavioral recovery after ablation of sciatic nerve segments. *J. Neurosci. Res.* **2015**:93(4):572-83. doi: 10.1002/jnr.23514.
 82. Bittner GD, Sengelaub DR, Trevino RC *et al.* Robinson and Madison have published no data on whether polyethylene glycol fusion repair prevents reinnervation accuracy in rat peripheral nerve. *J. Neurosci. Res.* **2017**:95(3):863-866. doi: 10.1002/jnr.23849.
 83. Robinson GA & Madison RD. Polyethylene glycol fusion repair prevents reinnervation accuracy in rat peripheral nerve. *J. Neurosci. Res.* **2016**:94(7):636-44. doi: 10.1002/jnr.23734.
 84. Gu X, Ding F, Yang Y *et al.* Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* **2011**:93(2):204-30. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.11.002.
 85. Dellon AL. Polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* **2001**:107(7):1924-5.
 86. Merrell JC, Russell RC & Zook EG. Polyglycolic acid tubing as a conduit for nerve regeneration. *Ann. Plast. Surg.* **1986**:17(1):49-58. doi: 10.1097/00000637-198607000-00010.
 87. Hu W, Gu J, Deng A *et al.* Polyglycolic acid filaments guide Schwann cell migration in vitro and in vivo. *Biotechnol. Lett.* **2008**:30(11):1937-42. doi: 10.1007/s10529-008-9795-1.
 88. Bryan DJ, Tang JB, Doherty SA *et al.* Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. *J. Neural Eng.* **2004**:1(2):91-8. doi: 10.1088/1741-2560/1/2/004.
 89. Chang CJ & Hsu SH. The effect of high outflow permeability in asymmetric poly(dl-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* **2006**:27(7):1035-42. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.003
 90. Mligiliche NL, Tabata Y, Kitada M *et al.* Poly lactic acid-caprolactone copolymer tube with a denatured skeletal muscle segment inside as a guide

- for peripheral nerve regeneration: A morphological and electrophysiological evaluation of the regenerated nerves. *Anat. Sci. Int.* **2003**:78(3):156-61. doi: 10.1046/j.0022-7722.2003.00056.x.
91. Luis AL, Rodrigues JM, Amado S *et al.* PLGA 90/10 and caprolactone biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. *Microsurgery.* **2007**:27(2):125-37. doi: 10.1002/micr.20317.
 92. Alves NM & Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**:43(5):401-14. doi: 10.1016/j.ijbiomac.
 93. Freier T, Montenegro R, Shan Koh H *et al.* Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials.* **2005**:26(22):4624-32. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.040.
 94. Jayakumar R1, Nwe N, Tokura S *et al.* Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**:20;40(3):175-81. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.021.
 95. Yuan Y, Zhang P, Yang Y *et al.* The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials.* **2004**:25(18):4273-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.029.
 96. He Q1, Zhang T, Yang Y *et al.* In vitro biocompatibility of chitosan-based materials to primary culture of hippocampal neurons. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**:20(7):1457-66. doi: 10.1007/s10856-009-3702-8.
 97. Gonzalez-Perez F, Cobianchi S, Geuna S *et al.* Tubulization with chitosan guides for the repair of long gap peripheral nerve injury in the rat. *Microsurgery.* **2015**:35(4):300-8. doi: 10.1002/micr.22362.
 98. Simões MJ, Amado S, Gärtner A, *et al.* Use of chitosan scaffolds for repairing rat sciatic nerve defects. *Ital. J. Anat. Embryol.* **2010**:115(3):190-210.
 99. Stenberg L, Stößel M, Ronchi G. *et al.* Regeneration of long-distance peripheral nerve defects after delayed reconstruction in healthy and diabetic rats is supported by immunomodulatory chitosan nerve guides. *BMC Neurosci.* **2017**:18;18(1):53. doi: 10.1186/s12868-017-0374-z.
 100. Stenberg L, Kodama A, Lindwall-Blom *et al.* Nerve regeneration in chitosan conduits and in autologous nerve grafts in healthy and in type 2 diabetic

- Goto-Kakizaki rats. *Eur. J. Neurosci.* **2016**;(3):463-73. doi: 10.1111/ejn.13068.
101. Meyer C, Stenberg L, Gonzalez-Perez F *et al.* Chitosan-film enhanced chitosan nerve guides for long-distance regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials.* **2016**;76:33-51. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.040.
 102. Wang H, Zhao Q, Zhao W, *et al.* Repairing rat sciatic nerve injury by a nerve-growth-factor-loaded, chitosan-based nerve conduit. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2012**;59(5):388-94. doi: 10.1002/bab.1031.
 103. Novikova L1, Mosahebi A, Wiberg M *et al.* Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**;77(2):242-52. doi: 10.1002/jbm.a.30603.
 104. Sufan W, Suzuki Y, Tanihara M *et al.* Sciatic Nerve Regeneration Through Alginate With Tubulation or Nontubulation Repair in Cat. *J. Neurotrauma.* **2001**;18(3):329-38. doi: 10.1089/08977150151070991.
 105. Mosahebi A, Wiberg M & Terenghi G. G. Addition of Fibronectin to Alginate Matrix Improves Peripheral Nerve Regeneration in Tissue-Engineered Conduits. *Tissue Eng.* **2003**;9(2):209-18. doi:10.1089/107632703764664684
 106. Lee KY & Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym.* **2012**;7(1):106-126. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
 107. Sierpinski P, Garrett J, Ma J, *et al.* The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials.* **2008**;29(1):118-28. doi: 10.1016/j.biomaterials.
 108. Pace LA, Plate JF, Smith TL *et al.* The effect of human hair keratin hydrogel on early cellular response to sciatic nerve injury in a rat model. *Biomaterials.* **2013**;4(24):5907-14. doi: 10.1016/j.biomaterials.
 109. Apel PJ, Garrett JP, Sierpinski P *et al.* Peripheral Nerve Regeneration Using a Keratin-Based Scaffold: Long-Term Functional and Histological Outcomes in a Mouse Model. *J. Hand Surg. Am.* **2008**;33(9):1541-7. doi: 10.1016/j.jhssa.2008.05.034.
 110. Lin YC, Ramadan M, Van Dyke M *et al.* Keratin Gel Filler for Peripheral Nerve Repair in a Rodent Sciatic Nerve Injury Model. *Plast. Reconstr. Surg.* **2012**;129(1):67-78. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182268ae0.

111. Pace LA, Plate JF, Mannava S, *et al.* A human hair keratin hydrogel scaffold enhances median nerve regeneration in nonhuman primates: an electrophysiological and histological study. *Tissue Eng. Part A.* **2012**:33(15):3860-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.008.
112. Tang X, Xue C, Wang Y *et al.* Bridging peripheral nerve defects with a tissue engineered nerve graft composed of an in vitro cultured nerve equivalent and a silk fibroin-based scaffold. *Biomaterials.* **2012**:33(15):3860-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.008.
113. Yang Y, Yuan X, Ding F, *et al.* Repair of rat sciatic nerve gap by a silk fibroin-based scaffold added with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 2011:17(17-18):2231-44. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0633
114. Xu Y, Zhang Z, Chen X *et al.* A Silk Fibroin/Collagen Nerve Scaffold Seeded with a Co-Culture of Schwann Cells and Adipose-Derived Stem Cells for Sciatic Nerve Regeneration. *PLoS One.* **2016**:22;11(1):e0147184. doi: 10.1371/journal.pone.0147184.
115. Yao M, Zhou Y, Xue C *et al.* Repair of Rat Sciatic Nerve Defects by Using Allogeneic Bone Marrow Mononuclear Cells Combined with Chitosan/Silk Fibroin Scaffold. *Cell Transplant.* **2016**:25(5):983-93. doi: 10.3727/096368916X690494.
116. Di Lullo GA1, Sweeney SM, Korkko J *et al.* Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J. Biol. Chem.* **2002**:8;277(6):4223-31. doi: 10.1074/jbc.M110709200
117. Archibald SJ1, Krarup C, Shefner J *et al.* A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: An electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J. Comp. Neurol.* **1991**:22;306(4):685-96. doi: 10.1002/cne.903060410.
118. Archibald SJ1, Shefner J, Krarup C *et al.* Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *J. Neurosci.* **1995**:15(5 Pt 2):4109-23.
119. Meek MF & Coert JH.. US Food and Drug Administration/Conformit Europe-Approved Absorbable Nerve Conduits for Clinical Repair of Peripheral and

- Cranial Nerves. *Ann. Plast. Surg.* **2008**:60(1):110-6. doi: 10.1097/SAP.0b013e31804d441c.
120. Kehoe S, Zhang XF & Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. *Injury.* **2012**:43(5):553-72. doi: 10.1016/j.injury.2010.12.030.
 121. Chen ZL & Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J. Cell Biol.* **2003**:24;163(4):889-99. doi: 10.1083/jcb.200307068.
 122. Yu WM, Yu H & Chen ZL. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol. Neurobiol.* **2007**:35(3):288-97. doi: 10.1007/s12035-007-0026-x.
 123. Kauppila T, Jyväsjärvi E, Huopaniemi T *et al.* A Laminin Graft Replaces Neurorrhaphy in the Restorative Surgery of the Rat Sciatic Nerve. *Exp. Neurol.* **1993**:123(2):181-91. doi: 10.1006/exnr.1993.1151.
 124. Neal RA, Tholpady SS, Foley PL, *et al.* Alignment and composition of laminin-polycaprolactone nanofiber blends enhance peripheral nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2012**:100(2):406-23. doi: 10.1002/jbm.a.33204.
 125. Neal RA, McClugage SG, Link MC, *et al.* Laminin nanofiber meshes that mimic morphological properties and bioactivity of basement membranes. *Tissue Eng. Part C. Methods.* **2009**:15(1):11-21. doi: 10.1089/ten.tec.2007.0366.
 126. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L *et al* Hyaluronic acid and wound healing. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**:18(1):53-60. doi: 10.18433/j3k89d
 127. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev.* **2004**:4(7):528-39. doi: 10.1038/nrc1391.
 128. Suri S, Han LH, Zhang W, *et al.* Solid freeform fabrication of designer scaffolds of hyaluronic acid for nerve tissue engineering. *Biomed. Microdevices.* **2011**:13(6):983-93. doi: 10.1007/s10544-011-9568-9.
 129. Suri S & Schmidt CE. Cell-Laden Hydrogel Constructs of Hyaluronic Acid, Collagen, and Laminin for Neural Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A.* **2010**:16(5):1703-16. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0381.

130. Ding T, Lu WW, Zheng Y, *et al.* Rapid repair of rat sciatic nerve injury using a nanosilver-embedded collagen scaffold coated with laminin and fibronectin. *Regen. Med.* **2011**;6(4):437-47. doi: 10.2217/rme.11.39.
131. Lee JY, Giusti G, Friedrich PF, *et al.* The Effect of Collagen Nerve Conduits Filled with Collagen-Glycosaminoglycan Matrix on Peripheral Motor Nerve Regeneration in a Rat Model. *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* **2012**;21;94(22):2084-91. doi: 10.2106/JBJS.K.00658.
132. Shakhbazau A, Archibald SJ, Shcharbin D *et al.* Aligned collagen–GAG matrix as a 3D substrate for Schwann cell migration and dendrimer-based gene delivery. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**;25(8):1979-89. doi: 10.1007/s10856-014-5224-2.
133. Yi S, Ding F, Gong L & Gu X. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2017;12(3):233-246. doi: 10.2174/1574888X11666160905092513.
134. Vasudevan S, Huang J, Botterman B *et al.* Detergent-free decellularized nerve grafts for long-gap peripheral nerve reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* **2014**;8;2(8):e201. doi: 10.1097/GOX.0000000000000118.
135. Haase SC, Rovak JM, Dennis RG *et al.* Recovery of Muscle Contractile Function Following Nerve Gap Repair with Chemically Acellularized Peripheral Nerve Grafts. *J. Reconstr. Microsurg.* **2003**;19(4):241-8. doi: 10.1055/s-2003-40580
136. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP *et al.* Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve.* **2009**;39(6):787-99. doi: 10.1002/mus.21220.
137. Özkan HS, Karataş Silistreli Ö, Ergür B *et al.* Repairing peripheral nerve defects by vein grafts filled with adipose tissue derived stromal vascular fraction: an experimental study in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* **2016**;22(1):7-11. doi: 10.5505/tjtes.2015.12612.
138. Fernandes M, Valente SG, Fernandes M *et al.* Bone marrow cells are able to increase vessels number during repair of sciatic nerve lesion. *J. Neurosci. Methods.* **2008**;15;170(1):16-24. doi: 10.1016/j.jneumeth.
139. Kim JY, Jeon WJ, Kim DH, *et al.* An inside-out vein graft filled with platelet-rich plasma for repair of a short sciatic nerve defect in rats. *Neural Regen.*

- Res.* **2014**;15;9(14):1351-7. doi: 10.4103/1673-5374.137587.
140. Roque JS, Pomini KT, Buchaim RL *et al.* Inside-out and standard vein grafts associated with platelet-rich plasma (PRP) in sciatic nerve repair. A histomorphometric study. *Acta Cir. Bras.* **2017**;32(8):617-625. doi: 10.1590/s0102-865020170080000003.
 141. Firat C, Geyik Y, Aytakin AH *et al.* Comparison of Nerve, Vessel, and Cartilage Grafts in Promoting Peripheral Nerve Regeneration. *Ann. Plast. Surg.* **2014**;73(1):54-61. doi: 10.1097/SAP.0b013e31829fd2be.
 142. Mohammadi R, Vahabzadeh B & Amini K. Sciatic nerve regeneration induced by transplantation of in vitro bone marrow stromal cells into an inside-out artery graft in rat. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* **2014**;42(7):1389-96. doi: 10.1016/j.jcms.2014.03.031.
 143. Saracino GA, Cigognini D, Silva D *et al.* Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering. *Chem. Soc. Rev.* **2013**;7;42(1):225-62. doi: 10.1039/c2cs35065c.
 144. Costa HJ, Bento RF, Salomone R *et al.* Mesenchymal bone marrow stem cells within polyglycolic acid tube observed in vivo after six weeks enhance facial nerve regeneration. *Brain Res.* **2013**;13;1510:10-21. doi: 10.1016/j.brainres.2013.03.025.
 145. Jiang M, Cheng Q, Su W, *et al.* The Beneficial Effect of Chitooligosaccharides on Cell Behavior and Function of Primary Schwann Cells is Accompanied by Up-Regulation of Adhesion Proteins and Neurotrophins. *Neurochem. Res.* **2014**;39(11):2047-57. doi: 10.1007/s11064-014-1387-y.
 146. Kim DY, Choi YS, Kim SE *et al.* In vivo effects of adipose-derived stem cells in inducing neuronal regeneration in Sprague-Dawley rats undergoing nerve defect bridged with polycaprolactone nanotubes. *J. Korean Med. Sci.* **2014**;29 Suppl 3:S183-92. doi: 10.3346/jkms.2014.29.S3.S183..
 147. Gupta D, Venugopal J, Prabhakaran MP, *et al.* Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009**;5(7):2560-9. doi: 10.1016/j.actbio.2009.01.039.
 148. Gu Y, Li Z, Huang J *et al.* Application of marrow mesenchymal stem cell-

- derived extracellular matrix in peripheral nerve tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**:11(8):2250-2260. doi: 10.1002/term.2123.
149. Spyridopoulos T, Lambropoulou M, Pagonopoulou O *et al.* Regenerated Nerve Defects with a Nerve Conduit Containing Dental Pulp Stem Cells in Pigs: An Immunohistochemical and Electrophysiological Evaluation. *J. Reconstr. Microsurg.* **2015**:31(7):516-26. doi: 10.1055/s-0035-1555751.
 150. Lee DC, Chen JH, Hsu TY, *et al.* Neural stem cells promote nerve regeneration through IL12-induced Schwann cell differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* **2017**:79:1-11. doi: 10.1016/j.mcn.2016.11.007.
 151. Xu L, Zhou S, Feng GY, *et al.* Neural Stem Cells Enhance Nerve Regeneration after Sciatic Nerve Injury in Rats. *Mol. Neurobiol.* **2012**:46(2):265-74. doi: 10.1007/s12035-012-8292-7.
 152. Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, *et al.* 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* **2014**:102(5):1370-8. doi: 10.1002/jbm.a.34816.
 153. Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M *et al.* A tissue-engineered bioabsorbable nerve conduit created by three-dimensional culture of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres. *Biomed. Mater. Eng.* **2011**:21(5-6):333-9. doi: 10.3233/BME-2012-0680.
 154. Boyd JG & Gordon T. Neurotrophic Factors and Their Receptors in Axonal Regeneration and Functional Recovery After Peripheral Nerve Injury. *Mol. Neurobiol.* **2003**:27(3):277-324. doi: 10.1385/MN:27:3:277.
 155. Peleshok J & Saragovi HU. Functional mimetics of neurotrophins and their receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**:34(Pt 4):612-7. doi: 10.1042/BST0340612.
 156. Lietz M, Dreesmann L, Hoss M *et al.* Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials.* **2006**:27(8):1425-36.
 157. Longo, F, Xie Y. & Massa S. Neurotrophin Small Molecule Mimetics: Candidate Therapeutic Agents for Neurological Disorders. *Curr. Med. Chem. Nerv. Syst. Agents* **2005**:5; 29–41.

- doi.org/10.2174/1568015053202769
158. Kuffler DP. Platelet-Rich Plasma Promotes Axon Regeneration, Wound Healing, and Pain Reduction: Fact or Fiction. *Mol. Neurobiol.* **2015**;52(2):990-1014. doi: 10.1007/s12035-015-9251-x.
 159. Whitman DH, Berry RL & Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1997**;55(11):1294-9. doi: 10.1016/s0278-2391(97)90187-7.
 160. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **1998**;5(6):638-46. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90029-4.
 161. Gentile P, Bottini DJ, Spallone D *et al.* Application of Platelet-Rich Plasma in Maxillofacial Surgery. *J. Craniofac. Surg.* **2010**;21(3):900-4. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181d878e9.
 162. Albanese A, Licata ME, Polizzi B *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun. Ageing.* **2013**;13;10(1):23. doi: 10.1186/1742-4933-10-23.
 163. Werner S & Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol. Rev.* **2003**;83(3):835-70. doi: 10.1152/physrev.2003.83.3.835
 164. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P *et al.* Effect of Platelet Rich Plasma and Fibrin Sealant on Facial Nerve Regeneration in a Rat Model. *Laryngoscope.* **2007**;117(1):157-65. doi: 10.1097/01.mlg.0000249726.98801.77.
 165. Elgazzar RF, Mutabagani MA, Abdelaal SE *et al.* Platelet rich plasma may enhance peripheral nerve regeneration after cyanoacrylate reanastomosis: a controlled blind study on rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2008**;37(8):748-55. doi: 10.1016/j.ijom.2008.05.010
 166. Emel E, Ergün SS, Kotan D. *et al.* Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model. *J. Neurosurg.* **2011**;114(2):522-8. doi: 10.3171/2010.9.JNS091928.
 167. Zheng C1, Zhu Q, Liu X *et al.* Improved Peripheral Nerve Regeneration Using Acellular Nerve Allografts Loaded with Platelet-Rich Plasma. *Tissue Eng Part A.* **2014**;20(23-24):3228-40. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0729.

168. Firat C, Aytekin AH, Durak MA, *et al.* Comparison of the effects of PRP and hyaluronic acid in promoting peripheral nerve regeneration An experimental study with vascular conduit model in rats'. *Ann. Ital. Chir.* **2016**:87:362-374.
169. Cho HH, Jang S, Lee SC, *et al.* Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model. *Laryngoscope.* **2010**:120(5):907-13. doi: 10.1002/lary.20860.
170. Ye F, Li H, Qiao G *et al.* Platelet-rich plasma gel in combination with Schwann cells for repair of sciatic nerve injury. *Neural Regen. Res.* **2012**:15;7(29):2286-92. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.29.007.
171. Xie X, Zhao S, Wu H *et al.* Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J. Surg. Res.* **2013**:183(1):214-22. doi: 10.1016/j.jss.2013.01.020.
172. Unsicker K & Strelau J. Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. *Eur. J. Biochem.* **2000**:267(24):6972-5. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01824.x.
173. Gordon T, Sulaiman O & Boyd JG Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2003**:8(4):236-50.
174. Sulaiman W & Dreesen TD. Effect of local application of transforming growth factor- β at the nerve repair site following chronic axotomy and denervation on the expression of regeneration-associated genes. *J. Neurosurg.* **2014**:121(4):859-74. doi: 10.3171/2014.4.JNS131251.
175. Graham S, Leonidou A, Lester M *et al.* Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **2009**:18(11):1633-54. doi: 10.1517/13543780903241607
176. Yamazaki T, Sabit H, Oya T *et al.* Activation of MAP kinases, Akt and PDGF receptors in injured peripheral nerves. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2009**:14(3):165-76. doi: 10.1111/j.1529-8027.2009.00228.x.
177. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM *et al.* Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* **2013**: 27(2):77-

89. doi: 10.1016/j.blre.2013.02.001.
178. Hellman U, Malm L, Ma LP, *et al.* Growth factor PDGF-BB stimulates cultured cardiomyocytes to synthesize the extracellular matrix component hyaluronan. *PLoS One.* **2010**;1;5(12):e14393. doi: 10.1371/journal.pone.0014393
179. Mackenzie F & Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development.* **2012**;139(8):1371-80. doi: 10.1242/dev.072348.
180. Hermann DM & Zechariah A.. Implications of Vascular Endothelial Growth Factor for Postischemic Neurovascular Remodeling. *J. Cereb. Blood Flow.* **2009**;29(10):1620-43. doi: 10.1038/jcbfm.2009.100.
181. Liang G, Cline GW & Macica CM. IGF-1 stimulates de novo fatty acid biosynthesis by Schwann cells during myelination. *Glia.* **2007**;15;55(6):632-41. doi: 10.1002/glia.20496.
182. Nagata K, Itaka K, Baba M *et al.* Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *J. Control. Release.* **2014**;10;183:27-34. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.021.
183. Grothe C1 & Nikkhah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat. Embryol. (Berl).* **2001**;204(3):171-7. doi: 10.1007/s004290100205.
184. Piskin A, Kaplan S, Aktaş A, *et al.* Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: An electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery.* **2009**;29(2):144-53. doi: 10.1002/micr.20599
185. Kaplan S, Pişkin A, Ayyıldız M *et al.* The effect of melatonin and platelet gel on sciatic nerve repair: An electrophysiological and stereological study. *Microsurgery.* **2011**;31(4):306-13. doi: 10.1002/micr.20876.
186. Rafijah G, Bowen AJ, Dolores C, *et al.* The effects of adjuvant fibrin sealant on the surgical repair of segmental nerve defects in an animal model. *J. Hand Surg. Am.* **2013**;38(5):847-55. doi: 10.1016/j.jhsa.2013.01.044
187. Bain JR, Mackinnon SE & Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.* **1989**;83(1):129-38. doi:10.1097/00006534-198901000-024

188. De Coppi P. Regenerative medicine for congenital malformations. *J. Pediatr. Surg.* **2013**;48(2):273-80. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.11.005.
189. Konofaos, P. & Ver Halen, J. Nerve Repair by Means of Tubulization: Past, Present, Future. *J. Reconstr. Microsurg.* **2013**;29(3):149-64. doi: 10.1055/s-0032-1333316.
190. Philips C, Cornelissen M & Carriel V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *J. Neural Eng.* **2018**;15(2):021003. doi: 10.1088/1741-2552/aaa21a.
191. Phillips JB, Bunting SC & Hall SM. Neural Tissue Engineering: A Self-Organizing Collagen Guidance Conduit. *Tissue Eng.* **2005**;11(9-10):1611-7.
192. Otto von Büngner. Über die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. *Beitr Pathol Anat.* **1891**, 312–393.
193. Angius D, Wang H, Spinner RJ *et al.* A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials.* **2012**;33(32):8034-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.056.
194. Robinson PH, van der Lei B, Hoppen HJ, *et al.* Nerve regeneration through a two-ply biodegradable nerve guide in the rat and the influence of ACTH4-9 nerve growth factor. *Microsurgery.* **1991**;12(6):412-9. doi: 10.1002/micr.1920120608.
195. Mallis P, Gontika I, Poulgiannopoulos T *et al.* Evaluation of decellularization in umbilical cord artery. *Transplant. Proc.* **2014**;46(9):3232-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.10.027.
196. Valiyaveetil M, Achur RN, Muthusamy A *et al.* Characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans of extracellular matrices of human umbilical cord blood vessels and Wharton's jelly. *Glycoconj. J.* **2004**;21(6):361-75. doi:10.1023/B:GLYC.0000046276.77147.b2
197. Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD *et al.* Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* **2003**;23(1):66-71. doi: 10.1002/micr.10083.
198. Thanos PK, Okajima S & Terzis JK. Ultrastructure and Cellular Biology of Nerve Regeneration. *J. Reconstr. Microsurg.* **1998**;14(6):423-36. doi:

- 10.1055/s-2007-1000203.
199. Zhu S, Ge J, Wang Y *et al.* A synthetic oxygen carrier-olfactory ensheathing cell composition system for the promotion of sciatic nerve regeneration. *Biomaterials*. **2014**;35(5):1450-61. doi: 10.1016/j.biomaterials. 2013.10.071.
 200. Siebert JR, Conta Steencken A & Osterhout DJ. Chondroitin sulfate proteoglycans in the nervous system: inhibitors to repair. *Biomed Res. Int.* **2014**:845323. doi: 10.1155/2014/845323.
 201. Gui L, Muto A, Chan SA *et al.* Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng. Part A.* **2009**:15(9):2665-76. doi: 10.1089/ten.TEA.2008.0526.
 202. Petersen TH, Calle EA, Zhao L *et al.* Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. **2010**:30;329(5991):538-41. doi: 10.1126/science. 1189345.
 203. Balasubramanian S, Thej C, Venugopal P *et al.* Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol. Int.* **2013**:37(5):507-15. doi: 10.1002/cbin.10056.
 204. Eccleston PA1, Funa K & Heldin CH. Expression of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) and PDGF α - and β -Receptors in the Peripheral Nervous System: An Analysis of Sciatic Nerve and Dorsal Root Ganglia. *Dev. Biol.* **1993**:155(2):459-70. doi: 10.1006/dbio.1993.1044.
 205. Chen YS, Murakami S, Gyo K *et al.* Effects of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)-Neutralizing Antibody and Platelet Factor 4 on Facial Nerve Regeneration. *Exp. Neurol.* **1999**:155(2):274-83. doi: 10.1006/exnr.1998. 6980
 206. Allamargot C, Pouplard-Barthelaix A & Fressinaud C. A single intracerebral microinjection of platelet-derived growth factor (PDGF) accelerates the rate of remyelination in vivo. *Brain Res.* **2001**: 9;918(1-2):28-39.
 207. Ikumi A, Hara Y, Yoshioka T *et al.* Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: An experimental study in the rabbit model. *Microsurgery.* **2018**:38(3):300-309. doi: 10.1002/micr.30263.
 208. Kanje, M., Skottner, A., Sjöberg, J. & Lundborg, G. Insulin-like growth factor

- I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.* **1989**;8;486(2):396-8 doi: 10.1016/0006-8993(89)90531-3.
209. Near SL1, Whalen LR, Miller JA, *et al.* Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**;5;89(24):11716-20. doi: 10.1073/pnas.89.24.11716.
210. Sondell M, Lundborg G & Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* **1999**;1519(14):5731-40.
211. Davis JB & Stroobant P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* **1990**;110(4):1353-60. doi: 10.1083/jcb.110.4.1353.
212. Sabongi RG, De Rizzo LA, Fernandes M *et al.* Nerve Regeneration: Is There an Alternative to Nervous Graft? *J. Reconstr. Microsurg.* **2014**;30(9):607-16. doi: 10.1055/s-0034-1372477.
213. Koller R, Frey M, Liegl C *et al.* [Relations between donor nerve size and degree of neurotization in the nerve transplant--an experimental study]. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* **1993**;25(6):300-7.
214. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* **2001**;23;294(5547):1704-8. doi: 10.1126/science.1065874.
215. Yu W, Zhao W, Zhu C *et al.* Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate. *BMC Neurosci.* **2011**;15;12:68. doi: 10.1186/1471-2202-12-68.
216. Lu MC, Ho CY, Hsu SF *et al.* Effects of Electrical Stimulation at Different Frequencies on Regeneration of Transected Peripheral Nerve. *Neurorehabil Neural Repair.* **2008**;22(4):367-73. doi: 10.1177/1545968307313507.
217. Ikumi A, Hara Y, Okano E *et al.* Intraoperative Local Administration of Platelet-Rich Plasma (PRP) during Neurolysis Surgery for the Treatment of Digital Nerve Crush Injury. *Case Rep. Orthop.* **2018**;p 20;2018:1275713. doi: 10.1155/2018/1275713.

