

Από την Α' Ορθοπαιδική Χειρουργική Κλινική
και το Ορθοπαιδικό Κέντρο Έρευνας και Εκπαίδευσης, «Παναγιώτης Ν.
Σουκάκος», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»
Διευθυντής: Καθηγητής Παναγιώτης Ι. Παπαγγελόπουλος



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Βιοτεχνολογικά Υποβοηθούμενη Αναγέννηση Περιφερικών
Νεύρων με τη Χρήση Βλαστοκυττάρων από Λιπώδη Ιστό και
Νευροαγωγών. Πειραματική Μελέτη σε Επίμυες.**

του

Παναγιώτη Δ. Μεγαλοικονόμου

Ορθοπαιδικού Χειρουργού

Αθήνα, Νοέμβριος 2023

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παρ. 2).

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 21-12-2015

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Επιβλέπων:

Ανδρέας Μαυρογένης

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Μέλη:

Παναγιώτης Παπαγγελόπουλος

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Elizabeth Johnson

Καθηγήτρια Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-02-2016

«Βιοτεχνολογικά υποβοηθούμενη αναγέννηση περιφερικών νεύρων με τη χρήση βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό και νευροαγωγών. Πειραματική μελέτη σε επίμυες.»

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 24-07-2023

Μέλη επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Παναγιώτης Παπαγγελόπουλος

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Elizabeth Johnson

Καθηγήτρια Ανατομίας

Ανδρέας Μαυρογένης

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Ευστάθιος Χρονόπουλος

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Γεώργιος Αγρογιάννης

Αν. Καθηγητής Παθολογοανατομίας

Βασίλειος Κοντογεωργάκος

Αν. Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Δημήτριος Κούλαλης

Επικ. Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-11-2023

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

Είχα την τιμή να ειδικευθώ στην Ορθοπαιδική Χειρουργική και Τραυματολογία στην Α' Ορθοπαιδική Χειρουργική Κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Έλαβα τον τίτλο της Ορθοπαιδικής Ειδικότητας το Σεπτέμβριο του 2018, ενώ το Δεκέμβριο του 2018 έγινα μέλος του Κολεγίου Ελλήνων Ορθοπαιδικών Χειρουργών (ΚΕΟΧ) κατόπιν εξετάσεων.

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

Μετά την ολοκλήρωση της ειδικότητάς μου, μετεκπαιδεύτηκα στη Γερμανία και τον Καναδά. Εξειδικεύτηκα στις Αθλητικές Κακώσεις στην ATOS Clinic στη Χαϊδελβέργη, Βάδη-Βυρτεμβέργη, Γερμανία και στην PanAm Clinic, University of Manitoba, Winnipeg, Canada ως έμμισθος Κλινικός Επιμελητής (Clinical Fellow). Εξειδικεύθηκα επίσης στη Χειρουργική Ισχίου και Γόνατος σε θέση έμμισθου Κλινικού Επιμελητή στο McGill University, Montreal, Quebec, Canada, στο University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada και στο University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

Τακτικό μέλος της European Society for Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy (ESSKA), τακτικό μέλος και μέλος της επιτροπής λοιμώξεων της Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie (SICOT), τακτικό μέλος της European Hip Society (EHS), έκτακτο μέλος (Associate Member) του Canadian Orthopaedic Association (COA), έκτακτο μέλος του American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS), έκτακτο μέλος του Orthopaedics and Traumatology Section, Européenne des Medecins Specialistes (UEMS), πρόεδρος (2021-2022) της Federation of Orthopaedic and Trauma Trainees in

Europe (FORTE), τακτικό μέλος του Κολεγίου Ελλήνων Ορθοπαιδικών Χειρουργών (ΚΕΟΧ) μετά από εξετάσεις, τακτικό μέλος Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ορθοπαιδικής & Τραυματολογίας (ΕΕΧΟΤ).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Έχω συμβάλλει στη δημοσίευση περισσότερων από 70 άρθρων σε έγκριτα διεθνή επιστημονικά περιοδικά και σε περισσότερες από 200 ανακοινώσεις σε συνέδρια.

PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=megaloikonomos+p&sort=date>

ResearchGate: <https://www.researchgate.net/profile/Panayiotis-Megaloikonomos>

ΜΕΛΟΣ ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ

Board of Editors, Journal of Orthopaedic Surgery and Research, BioMed Central, Springer

Associate Editor, BMC Musculoskeletal Disorders, BioMed Central, Springer

Associate Editor, Frontiers in Surgery

ΣΥΜΒΟΥΛΟΣ ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ

Σύμβουλος (Reviewer) της Συντακτικής Επιτροπής των επιστημονικών περιοδικών: Journal of Bone and Joint Surgery (JBJS), JBJS Case Connector, JBJS Reviews, Clinical Orthopaedics and Related Research (CORR), International Orthopaedics, Injury, Orthopedics, Journal of Orthopaedic Surgery and Research (JOSR), EFORT Open Reviews, SICOT-J, European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology (EJOST), Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica, Plos One, Surgical Oncology

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον Καθηγητή Ορθοπαιδικής **Ανδρέα Μαυρογένη** για την ανάθεση αυτής της μελέτη, αλλά και για και την αμέριστη βοήθειά του στο σχεδιασμό και την εκπόνηση της διατριβής.

Ειλικρινείς ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Ορθοπαιδικής **Παναγιώτη Παπαγγελόπουλο** για τις συνεχείς συμβουλές και την αέναη συμπαράσταση, όπως επίσης και στην Καθηγήτρια Ανατομίας **Elizabeth Johnson** για τη σημαντική επιστημονική καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της έρευνας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον αγαπητό συνάδελφο, Ορθοπαιδικό Χειρουργό **Γεώργιο Παναγόπουλο**, για την πολύτιμη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής **Γεώργιο Αγρογιάννη**, στην Ιατρό Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης **Ευανθία Μητσιοκάπα**, στη Μοριακό Βιολόγο **Μυρτώ Μπάμη**, και στη Μοριακό Βιολόγο **Μάντυ Μυλωνάκη**, για τη γενναιόδωρη βοήθειά τους, χωρίς την οποία η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής δε θα ήταν εφικτή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη νοσηλεύτρια του πειραματικού χειρουργείου, **Διονυσία-Ειρήνη Δρογγίτη**, για τη σημαντική βοήθεια και τεχνική υποστήριξη κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

**Βιοτεχνολογικά Υποβοηθούμενη Αναγέννηση Περιφερικών
Νεύρων με τη Χρήση Βλαστοκυττάρων από Λιπώδη Ιστό και
Νευροαγωγών. Πειραματική Μελέτη σε Επίμυες.**

ΚΥΡΙΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ

Παναγιώτης Δ. Μεγαλοικονόμος
Ορθοπαιδικός Χειρουργός

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ανδρέας Φ. Μαυρογένης
Επιβλέπων

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Α' Ορθοπαιδική Χειρουργική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Elizabeth O. Johnson

Καθηγήτρια Ανατομίας

Εργαστήριο Ανατομίας, Ιατρική Σχολή, Ευρωπαϊκό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Παναγιώτης Π. Παπαγγελόπουλος

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Α' Ορθοπαιδική Χειρουργική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΣΥΝΕΡΓΑΤΕΣ

Γεώργιος Ν. Παναγόπουλος

Ορθοπαιδικός Χειρουργός

Ιατρικό Κέντρο Αθηνών

Ευανθία Α. Μητσιοκάπα

Επιμελήτρια Β', Ιατρός Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης,

Τμήμα Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης,

Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών. “Η Σωτηρία”

Γεώργιος Δ. Αγρογιάννης

Αν. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Εθνικό και Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μυρτώ Μπάμη

Μοριακός Βιολόγος

Εργαστήριο Βασικών Επιστημών, Ορθοπαιδικό Κέντρο Έρευνας &

Εκπαίδευσης «Παναγιώτης Ν. Σουκάκος»

Μάντυ Μυλωνάκη

Μοριακός Βιολόγος

Εργαστήριο Βασικών Επιστημών, Ορθοπαιδικό Κέντρο Έρευνας &

Εκπαίδευσης «Παναγιώτης Ν. Σουκάκος»

Διονυσία-Ειρήνη Δρογγίτη

Νοσηλεύτρια - Βοηθός Πειραματικού Χειρουργείου,

Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Οίκος Πειραματοζώων

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής ολοκληρώθηκε η συγγραφή και δημοσίευση τριών επιστημονικών άρθρων σε διεθνή περιοδικά υψηλής απήχησης, καθώς και η συγγραφή συναφούς κεφαλαίου σε βιβλίο διεθνούς εκδοτικού οίκου:

1. **Harvesting, isolation and differentiation of rat adipose-derived stem cells**

Megaloikonomos PD, Panagopoulos GN, Bami M, Igoumenou VG, Dimopoulos L, Milonaki A, Kyriakidou M, Mitsiokapa E, Anastassopoulou J, Mavrogenis AF. *Curr Pharm Biotechnol* 2018;19(1):19-29.

2. **Adipose-Derived Stem Cells and Tacrolimus improve nerve regeneration in a rat sciatic nerve defect model.**

Megaloikonomos PD*, Panagopoulos GN*, Mitsiokapa EA, Bami M, Agrogiannis G, Johnson EO, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ, Mavrogenis AF. *Orthopedics* 2023 Nov-Dec;46(6): e353-e361 (*=equal contribution as first authors)

3. **The present and future for peripheral nerve regeneration.**

Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. *Orthopedics* 2016 Oct 25:1-16.

4. **Current trends and future perspectives for peripheral nerve regeneration.**

Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. In: Duscher D., Shiffman M. (eds) *Regenerative Medicine and Plastic Surgery*. Springer, 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Τα αποτελέσματα της μελέτης έχουν παρουσιαστεί σε επιστημονικά συνέδρια στην Ελλάδα και το εξωτερικό:

1. **Ο ρόλος των βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό και του FK506 στην περιφερική νευρική αναγέννηση. Πιλοτική μελέτη σε πειραματικό μοντέλο νευρικού ελλείμματος σε επίμυες.**

Π.Δ. Μεγαλοικονόμος, Γ.Ν. Παναγόπουλος, Α.Φ. Μαυρογένης, Μ. Μπάμη, Μ. Μυλωνάκη, Γ. Αγρογιάννης, Ε. Μητσιοκάπα, Ε.Ο. Johnson, Π.Ι. Παπαγγελόπουλος, Π.Ν. Σουκάκος, 72ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Χειρουργικής & Τραυματολογίας, 12-15 Οκτωβρίου 2016, Αθήνα.

2. **Ανατομικές περιοχές συλλογής λιπώδους ιστού για καλλιέργεια βλαστοκυττάρων σε επίμυες.**

Π.Δ. Μεγαλοικονόμος, Γ.Ν. Παναγόπουλος, Α.Φ. Μαυρογένης, Μ. Μπάμη, Μ. Μυλωνάκη, Ε. Μητσιοκάπα, Π.Ι. Παπαγγελόπουλος, 72ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Χειρουργικής & Τραυματολογίας, 12-15 Οκτωβρίου 2016, Αθήνα.

3. **The impact of adipose-derived stem cells and FK506 in peripheral nerve regeneration. A pilot study in a rat model.**

Megalioikonomos PD, Panagopoulos GN, Mavrogenis AF, Bami M, Mylonaki M, Agrogiannis GD, Mitsiokapa EA, Johnson EO, Papangelopoulos PJ, Soucacos PN. American Society for Peripheral Nerve (ASPN) Annual Meeting, 13-15 January 2017, Waikoloa, Hawaii, United States.

4. **Η επίδραση των βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό και του FK506 στην περιφερική νευρική αναγέννηση σε πειραματικό μοντέλο νευρικού ελλείμματος σε επίμυες**

Π.Δ. Μεγαλοικονόμος, Γ.Ν. Παναγόπουλος, Α.Φ. Μαυρογένης, Μ. Μπάμη, Μ. Μυλωνάκη, Γ. Αγρογιάννης, Ε. Μητσιοκάπα, Β. Κοντογεωργάκος, Ε. Johnson, Π.Ι. Παπαγγελόπουλος, Π. Ν. Σουκάκος, 23ο Κοινό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού και Άνω Άκρου & της Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής, 2-4 Νοεμβρίου 2017, Αθήνα.

5. **Adipose derived stem cells vs FK506 enhanced peripheral nerve regeneration. Experimental study in a rat model.**

Megaloikonomos PD, Panagopoulos GN, Bami M, Milonaki M, Agrogiannis G, Mitsiokapa E, Mavrogenis AF. 38th Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie (SICOT) World Congress, 30 November-2 December 2017, Cape Town, South Africa.

6. **Harvesting sites of adipose tissue for stem cell culture and tissue engineering in rats.**

Megaloikonomos PD, Panagopoulos GN, Bami M, Milonaki M, Mitsiokapa E, Mavrogenis AF. 38th Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie (SICOT) World Congress, 30 November-2 December 2017, Cape Town, South Africa.

7. **Adipose-derived stem cells vs FK506 enhanced peripheral nerve regeneration. Experimental study in a rat model.**

Megaloikonomos PD, Panagopoulos GN, Mavrogenis AF. American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting, 6-10 March 2018 New Orleans, Louisiana, United States.

8. **The impact of adipose-derived stem cells and FK506 in peripheral nerve regeneration. Experimental Study in a Rat Model**

Megaloikonomos PD, Panagopoulos GN, Mavrogenis AF, Mitsiokapa EA, Bami M, Mylonaki M, Agrogiannis GD, Johnson EO, Papagelopoulos PJ, Soucacos PN.

74ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Χειρουργικής & Τραυματολογίας, 10-13 Οκτωβρίου 2018, Αθήνα

9. **Βιοφασματοσκοπική μελέτη της διαφοροποίησης καρκινικών και υγιών λιπώδων βλαστοκυττάρων.**

Ο. Τάνης, Λ. Δημόπουλος, Β. Μαμαρέλη, Θ. Αντωνιάδου, Π.Δ. Μεγαλοικονόμος, Α.Φ. Μαυρογένης, Ι. Αναστασοπούλου.

11^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», Αθήνα 23-24 Νοεμβρίου 2018.

10. **FK506 versus adipose-derived stem cells in peripheral nerve regeneration.**

Experimental study in a rat model

Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mitsiokapa E, Bami M, Mylonaki M, Agrogiannis G, Mavrogenis AF, Papagelopoulos PJ.

20th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Congress, 5-7 June 2019, Lisbon, Portugal.

ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΚΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

Η παρούσα πειραματική μελέτη σε υγιείς επίμυες ήταν αναγκαία πριν εφαρμοστεί η μέθοδος στον άνθρωπο. Οι επίμυες δεν βασανίσθηκαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Τα ζώα χειρουργήθηκαν χωρίς πόνο, υπό γενική ενδομυϊκή αναισθησία. Η χρησιμοποιούμενη χειρουργική προσπέλαση δεν προκάλεσε βλάβες σε σπλαχνικές ανατομικές δομές ούτε ακρωτηρίασε τα ζώα, ενώ το επισυμβαίνον χειρουργικό τραύμα ήταν μικρό. Οι επεμβάσεις ήταν άσηπτες, έτσι ώστε μετεγχειρητικά δεν χρειάστηκε αντιμικροβιακή αγωγή. Τα ζώα είχαν καθημερινή φροντίδα και επίβλεψη από το έμπειρο προσωπικό του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Με τον τρόπο αυτό, τα ζώα υπέστησαν την ελάχιστη δυνατή επιβάρυνση, ενώ αντίθετα τα οφέλη από την εργασία μπορεί να είναι πολύ σημαντικά. Στο τέλος της εργασίας, όλα τα ζώα θανατώθηκαν με ανώδυνο τρόπο, σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες. Συνεπώς, η παραπάνω μελέτη δεν ήταν δυνατό να υποκατασταθεί από ανάλογη in vitro μελέτη. Οι προαναφερθείσες συνθήκες και προϋποθέσεις βρίσκονται εντός του πνεύματος του υφιστάμενου νομικού πλαισίου που αφορά τον πειραματισμό σε ζώα (Κωστομητσόπουλος, 1993). Η μελέτη αυτή είναι σύμφωνη με τα κριτήρια του Π.Δ. 56/2013 που διέπει την “προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς” και έχει λάβει έγκριση από την αρμόδια Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Αττικής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματόζωα προμηθεύτηκαν από το Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Οι χειρουργικές επεμβάσεις έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής, και η στέγασή τους στον Οίκο Πειραματόζωων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Η επεξεργασία των βλαστοκυττάρων διεξήχθη στο Εργαστήριο Βασικών Επιστημών, Ορθοπαιδικό Κέντρο Έρευνας & Εκπαίδευσης «Παναγιώτης Ν. Σουκάκος». Η μελέτη της ιστοπαθολογίας των δειγμάτων έγινε στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΚΑΝΟΝΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΕ ΖΩΑ

Η άδεια πειραματισμού, φροντίδας και χειρισμών σε ζώα, και η διενέργεια της μελέτης εγκρίθηκαν από τη Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων της Διεύθυνσης Αγροτικής & Κτηνιατρικής Πολιτικής, της Περιφέρειας Αττικής. (ΑΠ: 4961, Αθήνα 20/10/2015, Παράρτημα).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..... | 9 |
| ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ..... | 13 |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 23 |
| Ιστορική Αναδρομή..... | 25 |
| Ανατομία και Φυσιολογία των Περιφερικών Νεύρων..... | 27 |
| Μορφολογία..... | 27 |
| Εσωτερική Τοπογραφία..... | 31 |
| Αγγείωση - Αιματονευρικός Φραγμός..... | 32 |
| Κακώσεις Περιφερικών Νεύρων..... | 35 |
| Είδη και Μηχανισμός Κακώσεων..... | 35 |
| Ταξινόμηση Κακώσεων..... | 36 |
| Βαλλεριανή Εκφύλιση..... | 40 |
| Χειρουργική Θεραπεία Νευρικών Τραυματισμών..... | 43 |
| Χρόνος Θεραπευτικής Προσέγγισης..... | 43 |
| Πρωτογενής Νευρική Συρραφή..... | 44 |
| Αντιμετώπιση Νευρικών Ελλειμμάτων..... | 47 |
| Νευρικοί Αγωγοί..... | 50 |
| Χρήση Βλαστοκυττάρων στη Νευρική Αναγέννηση..... | 56 |
| Μηχανισμός Δράσης..... | 56 |
| Τύποι Βλαστοκυττάρων..... | 59 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 69 |
| Εισαγωγή..... | 71 |
| Σκοπός..... | 73 |
| Υλικό & Μέθοδος..... | 73 |
| Πειραματόζωα..... | 73 |
| Συλλογή και Επεξεργασία Βλαστοκυττάρων..... | 74 |

| | |
|--|-----|
| Αποτελέσματα | 90 |
| Γενικές Παρατηρήσεις | 90 |
| Ανάλυση Βάδισης | 90 |
| Ηλεκτροφυσιολογικός Έλεγχος | 92 |
| Νευροϊστομορφομετρία | 93 |
| Συζήτηση | 96 |
| Συμπεράσματα | 101 |
| Περίληψη | 102 |
| Abstract..... | 104 |
| BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 107 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 135 |
| Κάρτα Παρακολούθησης Πειραματόζωων | 135 |
| Άδεια Κτηνιατρικής Διεύθυνσης | 136 |

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ιστορική Αναδρομή

Η μελέτη των περιφερικών έχει τις ρίζες της στη αρχαιότητα (Naff & Ecklund, 2001). Οι πρώτες περιγραφές περιφερικών νεύρων χρονολογούνται τον τέταρτο αιώνα π.Χ. στα συγγράμματα του Ιπποκράτη (Adams, 1972), ενώ ο διαχωρισμός των νεύρων από τους τένοντες και οι πρώτες αναφορές νευρικής αποκατάστασης συναντώνται στο έργο του Γαληνού το δεύτερο αιώνα μ.Χ (J. K. Terzis, Sun, & Thanos, 1997). Ο Παύλος ο Αιγινήτης περιέγραψε τη νευρική συρραφή, τον έβδομο αιώνα μ.Χ. (Streppel, Heiser, & Stennert, 2000), το έργο του ακολούθησαν οι Πέρσες ιατροί, Rahzes και Avicenna, στο τέλος της πρώτης χιλιετίας (Sunderland, 1981). Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού της δεύτερης χιλιετίας, περισσότερες αναφορές σχετικά με το δυναμικό της νευρικής αναγέννησης διακρίνονται σε έργα επιφανών χειρουργών όπως ο Guglielmo di Saliceto, ο Guido Lanfranchi, ο Guy de Chauliac και ο Leonardo di Bertapaglia (Ladenheim, 1989; J. K. Terzis et al., 1997). Ωστόσο, παρά τις προαναφερθείσες αναφορές, η γέννηση της χειρουργικής των περιφερικών νεύρων χρονολογείται το 16ο αιώνα, όταν ο Gabriele Ferrara περιέγραψε λεπτομερώς την τεχνική συρραφής των νευρικών κολοβωμάτων μετά από την αναγνώρισή τους, την προσεκτική έλξη τους και την αποφυγή πρόκλησης βλάβης σε αυτά (Artico, Cervoni, Nucci, & Giuffre, 1996).

Οι ιδιότητες των περιφερικών νεύρων συνέχισαν να μελετώνται κατά τη διάρκεια του 17ου και 18ου αιώνα, με αξιοσημείωτη τη συμβολή του Cruikshank στη νευρική φυσιολογία (Cruikshank, 1795). Ο 19ος αιώνας όμως, σήμανε την έλευση ραγδαίων επιστημονικών εξελίξεων. Η εξέλιξη της μικροσκοπίας και οι νέες ιστολογικές τεχνικές άρχισαν να αποκρυπτογραφούν ανεξερευνήτα μονοπάτια του νευρικού ιστού. Το ενδιαφέρον για τη μελέτη των περιφερικών νεύρων γίνεται ολοένα και περισσότερο, με εφιαλτήριο τις καινοτόμες παρατηρήσεις του Augustus Waller, το 1850. Ο τελευταίος περιέγραψε για πρώτη φορά την εκφύλιση του νευρικού μυελού και των ελύτρων μυελίνης μετά από τη νευρική διατομή (Stoll, Jander, & Myers, 2002; Waller, 1850). Έκτοτε, οι ερευνητές ξεκίνησαν να μελετούν τη χειρουργική αποκατάσταση των νευρικών τραυματισμών σε συνδυασμό με τους μηχανισμούς

της νευρικής αναγέννησης, όπως για παράδειγμα οι ιδρυτές της μοντέρνας νευροβιολογίας Camillo Golgi που ανακάλυψε τη «μαύρη αντίδραση» και Santiago Ramon y Cajal που μελέτησε την αξονική αναγέννηση (Guillery, 2005).

Την ίδια περίοδο, το 1847, ο Paget ανέφερε πλήρη λειτουργική αποκατάσταση μετά από πρωτογενή συρραφή μέσου νεύρου σε έναν εντεκάχρονο ασθενή (Koopmans, Hasse, & Sinis, 2009). Το 1873, ο Létiénant εξέδωσε το σύγγραμμά του *Traité des Sections Nerveuses* στο οποίο περιγράφει τις τεχνικές συρραφής μετά από πλήρη νευρική διατομή (“*synthèse du nerf*”), ενώ για πρώτη φορά γίνεται αναφορά στην τελικο-τελική νευρική συρραφή (Létiénant, 1873; Papalia, Geuna, D'Alcontres, & Tos, 2007). Η πρώτη περιγραφή νευρικού αυτομοσχεύματος έγινε από τους Philipeaux και Vulpian (Philipeaux & Vulpian, 1859), ενώ τη δουλειά τους συνέχισε ο Albert, ο οποίος πραγματοποίησε και την πρώτη νευρική ανακατασκευή με αλλομόσχευμα (Albert, 1878, 1885). Η πρώτη προσπάθεια γεφύρωσης νευρικού ελλείμματος έγινε από τον Glück, χρησιμοποιώντας έναν οστικό αγωγό, εμπνευσμένος από τον Neuber που χρησιμοποιούσε απορροφήσιμους κυλινδρικούς αγωγούς από ασφαλωμένο οστό για την παροχέτευση τραυμάτων (Glück, 1880; Ijma, Van De Graaf, & Meek, 2008). Αν και ο ίδιος απέτυχε, ο Vanlair κατάφερε λίγο αργότερα την αναγέννηση νευρικών ινών με έναν αγωγό από ασφαλωμένο οστό, μήκους 3 εκατοστών (Vanlair, 1889).

Τον 20ο αιώνα το ενδιαφέρον για την χειρουργική των νεύρων αυξήθηκε. Οι Seddon και Woodhall, δουλεύοντας σε διαφορετικές χώρες, πρότειναν διάφορες νέες για την εποχή μεθόδους νευρικής αποκατάστασης (H. Seddon, 1943; H. J. Seddon, 1943; Woodhall, 1951). Ο Sunderland έκανε σημαντικές παρατηρήσεις στην τοπογραφική ανατομία των νεύρων, ενώ αργότερα ο Millesi με τη βοήθεια μικροεργαλείων έδωσε νέα διάσταση στη μικροχειρουργική τεχνική (Susan E. Mackinnon & Dellon, 1988; Sunderland, 1945). Παρατηρήθηκαν πολλές συνεργασίες από κλινικούς και ερευνητές της βασικής επιστήμης. Ωστόσο, η ιδιότητα των αξόνων να αναγεννώνται μετά το νευρικό τραυματισμό οδήγησε τους ερευνητές περισσότερο

στη μελέτη της βελτιστοποίησης των χειρουργικών τεχνικών παρά στη βελτίωση της ίδιας της νευρικής αναγέννησης (Battiston, Papalia, Tos, & Geuna, 2009).

Τα τελευταία χρόνια όμως, η επιστημονική κοινότητα έχει οδηγηθεί στην πεποίθηση ότι η πρόοδος στον τομέα της νευρικής ανακατασκευής χρειάζεται μια ισχυρότερη βάση στη βιολογία της αναγέννησης (Battiston, Raimondo, et al., 2009; G. Lundborg, 2002).

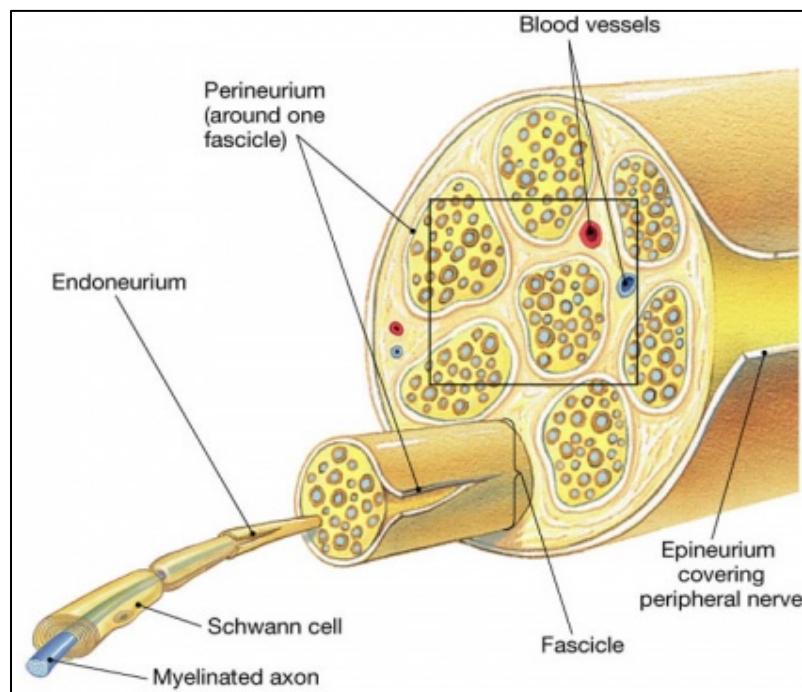
Ανατομία και Φυσιολογία των Περιφερικών Νεύρων

Μορφολογία

Τα περιφερικά νεύρα συνδέουν το κεντρικό νευρικό σύστημα με τα κινητικά και αισθητικά όργανα. Αποτελούνται από νευρικές ίνες, συνδετικό ιστό, λεμφικό σύστημα και αιμοφόρα αγγεία. Η δομή των περιφερικών νεύρων αποσκοπεί στην προστασία, διατήρηση της συνέχειας και διατροφή των βασικών λειτουργικών μονάδων που είναι οι νευρικές ίνες. Η κάθε νευρική ίνα αποτελείται από το (νευρ)άξονα και το έλυτρο μυελίνης, ενώ διατάσσονται σε ομάδες, τις νευρικές δεσμίδες. Ο άξονας αποτελεί μια προσεκβολή του νευρώνα (νευρικού κυττάρου). Το σώμα ενός κινητικού και ενός αυτόνομου νευρώνα βρίσκεται στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού, ενώ ενός αισθητικού νευρώνα στο νωτιαίο γάγγλιο.

Το περίβλημα των περιφερικών νεύρων αποτελείται από έξω προς τα έσω από το επινεύριο, το περινεύριο και το ενδονεύριο (**Εικόνα 1**). Το επινεύριο είναι το εξωτερικό περίβλημα το οποίο διαχωρίζει το νεύρο και το απομονώνει από τους περιβάλλοντες ιστούς. Αποτελεί επίσης τον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό μεταξύ των νευρικών δεσμίδων, κρατώντας τις χαλαρά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Σε εγκάρσια διατομή, το ποσοστό του επινευρίου ενός νεύρου κυμαίνεται από 20% έως 90%. Για παράδειγμα, το ωλένιο νεύρο στον αγκώνα έχει μικρότερο (22%), ενώ το ισχιακό νεύρο στο γλουτό έχει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό επινευρίου (88%). Το ποσοστό του επινευρίου εξαρτάται επίσης από τον αριθμό των νευρικών δεσμίδων. Το περινεύριο είναι το περίβλημα της κάθε νευρικής δεσμίδας, και σχετίζεται με

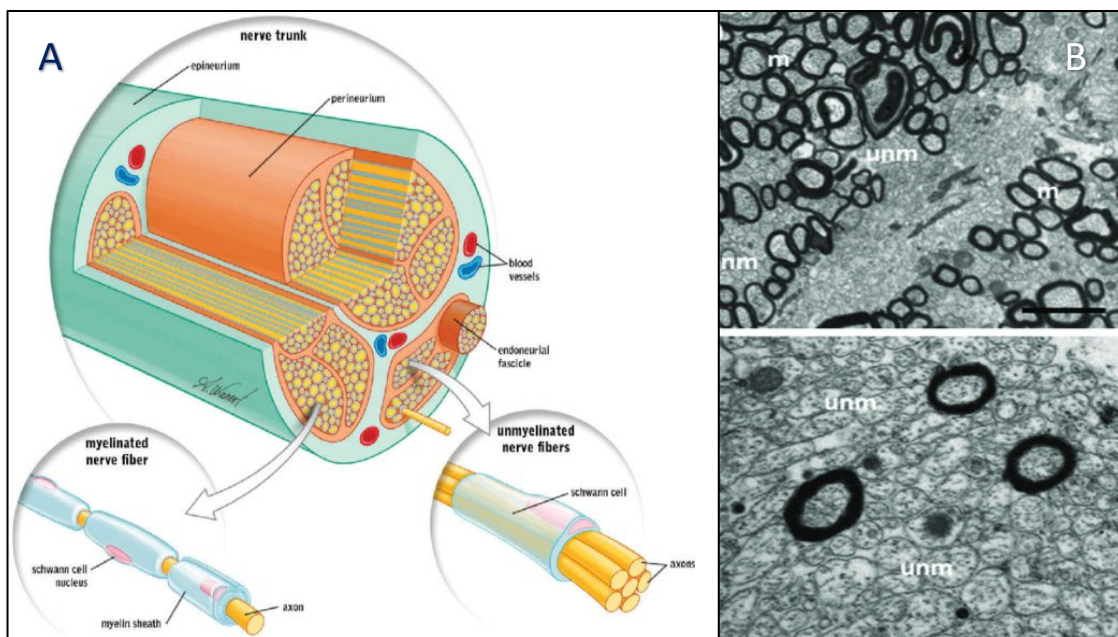
την προστασία, την αντοχή στην επιμήκη διάταση και τη διατήρηση της ενδοδεσμιακής πίεσης, η οποία είναι απαραίτητη για την αξονοπλασματική ροή. Αποτελεί προέκταση της αραχνοειδούς μήνιγγας του κεντρικού νευρικού συστήματος και περιβάλλει τις νευρικές δεσμίδες των νωτιαίων νεύρων και των εγκεφαλικών συζυγιών μέχρι τα κύτταρα-στόχους (Shanthaveerappa & Bourne, 1964). Το ενδονεύριο είναι ο στηρικτικός συνδετικός στός στο εσωτερικό κάθε νευρικής δεσμίδας. Το μεσονεύριο επεκτείνεται από το επινεύριο προς τους γύρω ιστούς (ως αντίστοιχο του μεσεντερίου), θεωρείται ότι επιτρέπει στο νεύρο να ολισθαίνει πάνω στο ιστικό του υπόστρωμα και του παρέχει τμηματική αιματική παροχή (Millesi, 1986).



Εικόνα 1. Οι νευράξονες περιβάλλονται από ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού, το ενδονεύριο, και σχηματίζουν νευρικές δεσμίδες, οι οποίες περιβάλλονται από το περινεύριο. Το επινεύριο περικλείει όλες τις δεσμίδες, σχηματίζοντας το νεύρο.

Οι νευρικές ίνες (κινητικές, αισθητικές και συμπαθητικές) διακρίνονται σε εμμύελες και αμύελες, αναλόγως της παρουσίας ή όχι ελύτρου μυελίνης. Και στους δύο τύπους ινών οι άξονες περιβάλλονται από αλυσίδα κυττάρων Schwann αλλά η σχέση κυττάρου Schwann και άξονα διαφέρει θεμελιωδώς στις δύο κατηγορίες ινών (**Εικόνα 2**). Στις εμμύελες ένας νευράξονας περιβάλλεται από ένα κύτταρο Schwann, η βασική μεμβράνη του οποίου τον

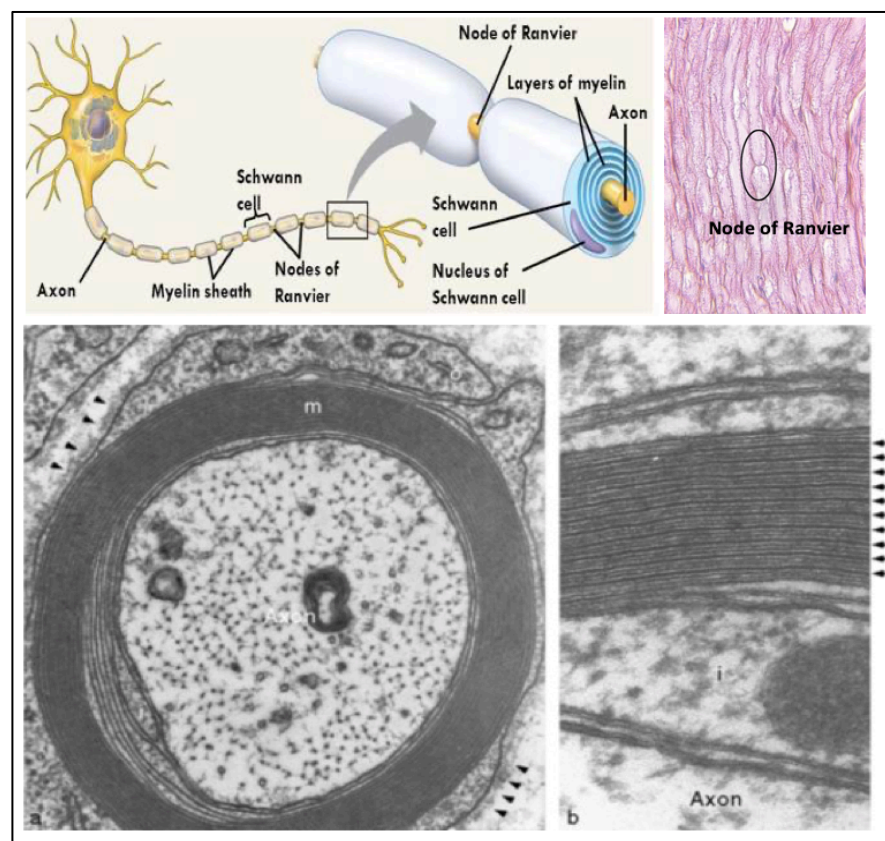
περιβάλλει ελικοειδώς με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλαπλών στρωμάτων από λιπίδια και πρωτεΐνες, το έλυτρο της μυελίνης ίνες (**Εικόνα 3**). Οι κινητικές νευρικές ίνες είναι εμύελες και η διάμετρό τους κυμαίνεται από 2 έως 30 μm . Οι αισθητικές νευρικές ίνες έχουν παρόμοια διάμετρο και περιλαμβάνουν επίσης εμύελες και αμύελες νευρικές ίνες, με τις τελευταίες να υπερτερούν σε αριθμό. Οι συμπαθητικές νευρικές ίνες είναι αμύελες. Τα έλυτρα μυελίνης μπορούν να εκτείνονται για 1 ή 2 mm, ανάλογα με τη διάμετρο του νευράξονα. Η διάμετρος του νευράξονα μπορεί να είναι από 1 μέχρι 20 μm . Συνεπώς, το μήκος ενός ελύτρου μυελίνης μπορεί να είναι 100-1000 φορές μεγαλύτερο από τη διάμετρο του νευράξονα. Στις αμύελες ίνες (διάμετρος άξονα συνήθως $<2 \mu\text{m}$) ένα κύτταρο Schwann περικλείει τμήματα ενός ως 15 αξόνων ταυτόχρονα (Billings-Gagliardi, 1977; Dyck & Thomas, 2005; Landon, 1976).



Εικόνα 2. (A) Σχηματική απεικόνιση και (B) φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμύελων (m) και αμύελων (unm) νευρικών ιών.

Η μυελίνη είναι ένα πλούσιο σε λιπίδια έλυτρο που μονώνει τις νευρικές ίνες και βοηθά στην μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων κατά μήκος του νευράξονα. Δεν είναι συνεχής σε όλο το μήκος του νευράξονα και σχηματίζει περισφιζεις κατά διαστήματα, ή αλλιώς τους κόμβους του Ranvier. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα οι νευράξονες στην περιοχή των

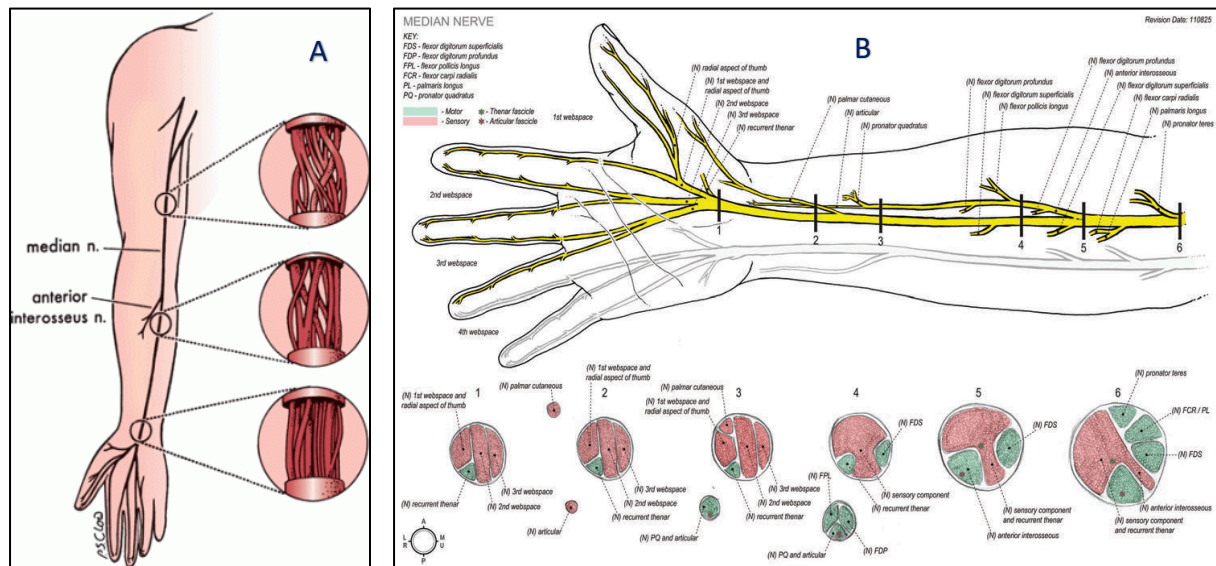
περισφίξεων καλύπτονται από αναδιπλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης γειτονικών κυττάρων Schwann, ενώ στο κεντρικό νευρικό σύστημα παραμένουν ακάλυπτοι. Η παρουσία της μυελίνης μονώνει τον άξονα, αφού εμποδίζει τα ιόντα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη του προς τον περιβάλλοντα χώρο. Με τον τρόπο αυτό δεν παρατηρείται απώλεια ενέργειας, ενώ το νευρικό σήμα μεταδίδεται μεταξύ κόμβων με άλματα. Στην εμύελη ίνα η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση του Na^+ είναι μικρότερη, αφού η είσοδος του Na^+ γίνεται σε μικρές επιφάνειες, σε αντίθεση με την αμύελη ίνα όπου γίνεται σε όλο το μήκος του νευράξονα. Έτσι, η μετάδοση της εκπόλωσης, η αλλιώς η ταχύτητα αγωγής της νευρικής ώσης είναι πολύ μεγαλύτερη (1 έως 91 m/sec) από εκείνη των αμύελων ινών. Όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος της μυελίνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα αγωγής του νεύρου. (Billings-Gagliardi, 1977; Landon, 1976).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της εμύελης ίνας (πάνω αριστερά), επιμήκης ιστολογική διατομή νεύρου στην οποία απεικονίζονται οι κόμβοι του Ranvier (πάνω δεξιά) και εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (κάτω) εγκάρσιας διατομής νευρικής ίνας, που δείχνουν πως τα κύτταρα Schwann επενδύουν με την κυτταρική τους μεμβράνη το αξονικό τμήμα σε πολλαπλά στρώματα (βέλη).

Εσωτερική Τοπογραφία

Ο Sunderland ήταν ο πρώτος που μελέτησε την τοπογραφική ανατομία των περιφερικών νεύρων, παρουσιάζοντας ένα πολύ έντονα διαπλεκόμενο μοντέλο νευρικών δεσμίδων (Sunderland, 1945, 1978, 1981). Αρχικά επικράτησε η πεποίθηση ότι οι κινητικές και αισθητικές ίνες παρέμεναν διάσπαρτες κεντρικά, σχηματίζοντας δαιδαλώδη πλέγματα, μέχρι να οργανωθούν σε αμιγώς κινητικές και αισθητικές ομάδες περιφερικά. Ωστόσο, το μοντέλο του Sunderland αποδείχτηκε ότι αφορούσε μόνο το κεντρικό τμήμα των νεύρων και η προηγούμενη θεώρηση αργότερα καταρρίφθηκε.



Εικόνα 4. (A) Οι δεσμίδες διασταυρώνονται πολύ έντονα κεντρικά και λιγότερο περιφερικά. (B) Εγκάρσιες διατομές του μέσου νεύρου δείχνουν την τοπογραφική θέση της αισθητικής (ροζ) και της κινητικής μοίρας του (πράσινο) σε διάφορα σημεία της πορείας του (Αναπαραγωγή από: *Nerve Surgery*; Susan E. Mackinnon, ed.; New York; Thieme Medical Publishers Inc., 2016).

Η σχέση των δεσμίδων του περιφερικού νεύρου αλλάζει κατά τη διάρκεια της επιμήκους πορείας τους στο άκρο (Εικόνα 4). Εγγύς, επικρατεί μια μονοδεσμιδική αρχιτεκτονική, ενώ οι δεσμίδες διαπλέκονται πολύ έντονα. Περιφερικά είναι έντονη η πολυδεσμιδική μορφολογία των νεύρων, ωστόσο οι δεσμίδες διαπλέκονται αρκετά λιγότερο (Williams & Jabaley, 1986). Η διαπλοκή που συμβαίνει στο κεντρικό τμήμα των νεύρων χωρίζει τις νευρικές ίνες με βάση τη λειτουργία τους, με αποτέλεσμα στο περιφερικό πλέον

τμήμα οι δεσμίδες να περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά αισθητικούς ή κινητικούς νευράξονες (Diao & Vannuyen, 2000). Ο Brushart μελέτησε το μέσο νεύρο σε όλο το μήκος του, καταλήγοντας ότι οι άξονές του διατηρούν μία σαφή τοπογραφική διαρρύθμιση ακόμα και πολύ κεντρικά στο άνω άκρο (Brushart, 1991), αποδεικνύοντας ότι η εσωτερική τοπογραφία των νεύρων είναι σταθερή και σαφής. Η κατανόηση της ανατομικής τοπογραφίας είναι σημαντική για τον χειρουργό προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή λειτουργική αποκατάσταση σε περιπτώσεις επιδιόρθωσης νευρικής βλάβης.

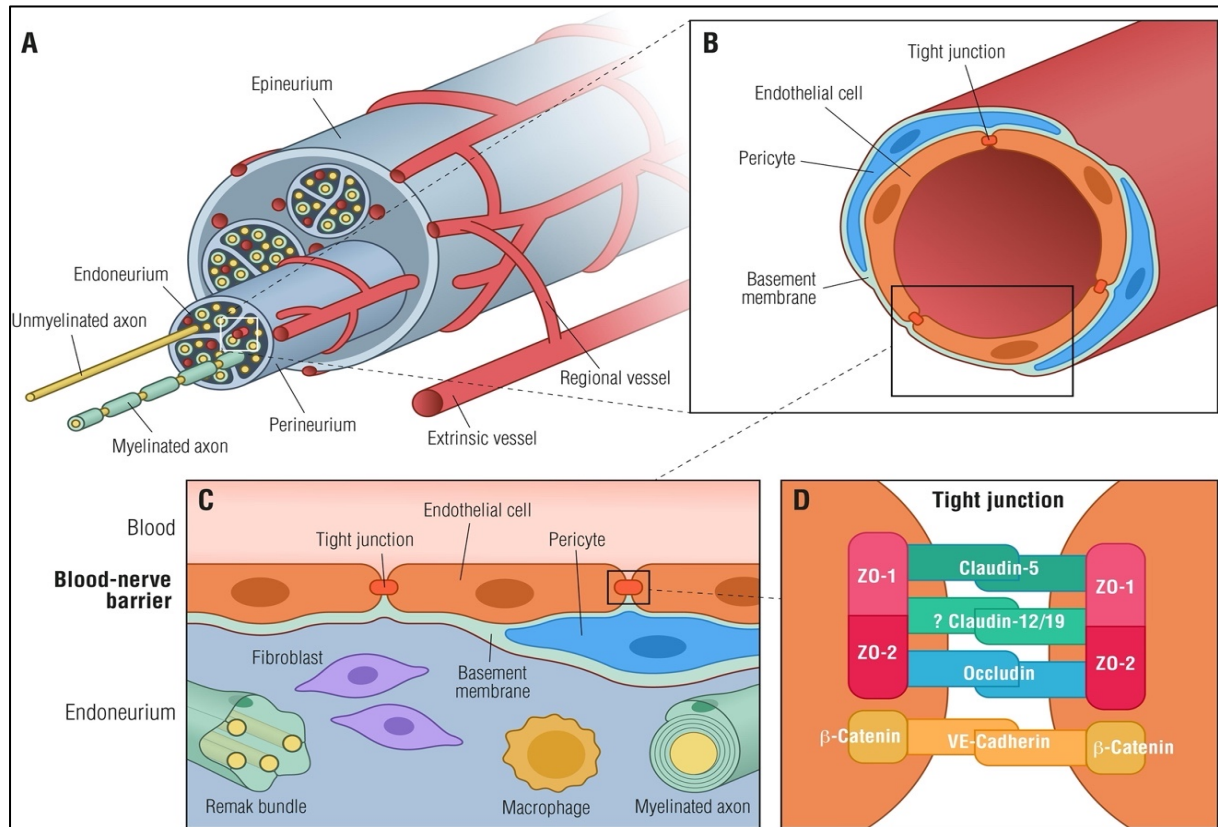
Αγγείωση - Αιματονευρικός Φραγμός

Η λειτουργία των περιφερικών νεύρων απαιτεί πλούσια αιμάτωση η οποία εξασφαλίζεται τόσο από αυτόχθονα, ενδογενή όσο και από εξωγενή αγγεία. Τα ενδογενή αγγεία σχηματίζουν ένα επίμηκες αναστομωτικό πλέγμα στο εξωτερικό και εσωτερικό του επινευρίου και στο περινεύριο. Τα εξωγενή αγγεία καταδύονται διαμέσου του περινευρίου και τμηματικά τροφοδοτούν τα ενδογενή αγγεία μέσω των *vasa nervorum*. Από το πλέγμα αυτό τα αγγεία διαπερνούν το περινεύριο και εισέρχονται στο ενδονεύριο με τη μορφή τριχοειδών, τα οποία περιβάλλονται συχνά από περικύτταρα. Επιπλέον, ένας αριθμός ενδονευρικών αγγείων τροφοδοτεί τους νευράξονες. (G Lundborg, 1968; G. Lundborg & Rydevik, 1973) (Εικόνα 5).

Η διατήρηση της ανατομίας των αγγειακών δομών είναι απαραίτητη κατά την χειρουργική αποκατάσταση των περιφερικών νευρικών βλαβών. Η ενδογενής αγγείωση επιτρέπει την παρασκευή και κινητοποίηση των περιφερικών νεύρων, χωρίς να περιορίζεται σημαντικά η αγγειακή παροχή. Ωστόσο, στη χειρουργική των νεύρων πρέπει να αποφεύγεται ο τραυματισμός των μεγάλων τροφοφόρων αγγείων. Τα εξωγενή αγγεία προέρχονται από περιοστικά, μυοδερματικά και περιτοναϊκά αγγεία ενώ είναι ιδιαίτερα σημαντικά κατά τη χρήση αγγειούμενων νευρικών μοσχευμάτων (Breidenbach & Terzis, 1986).

Ο αιματονευρικός φραγμός διατηρεί την ομοιότητα μεταξύ των νευραξόνων, των κυττάρων Schwann και των λοιπών στοιχείων ενός περιφερικού νεύρου (*milieu intérieur*). Θεωρείται ως

επέκταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο περιφερικό νευρικό σύστημα προστατεύοντας τους νευράξονες από την τοξική επαφή τους με το πλάσμα του περιφερικού αίματος. Σχηματίζεται από τις στενές συνδέσεις (tight junctions) μεταξύ των κυττάρων της εσωτερικής στοιβάδας του περινευρίου και των ενδοθηλιακών κυττάρων του ενδονευρίου (**Εικόνα 5**).



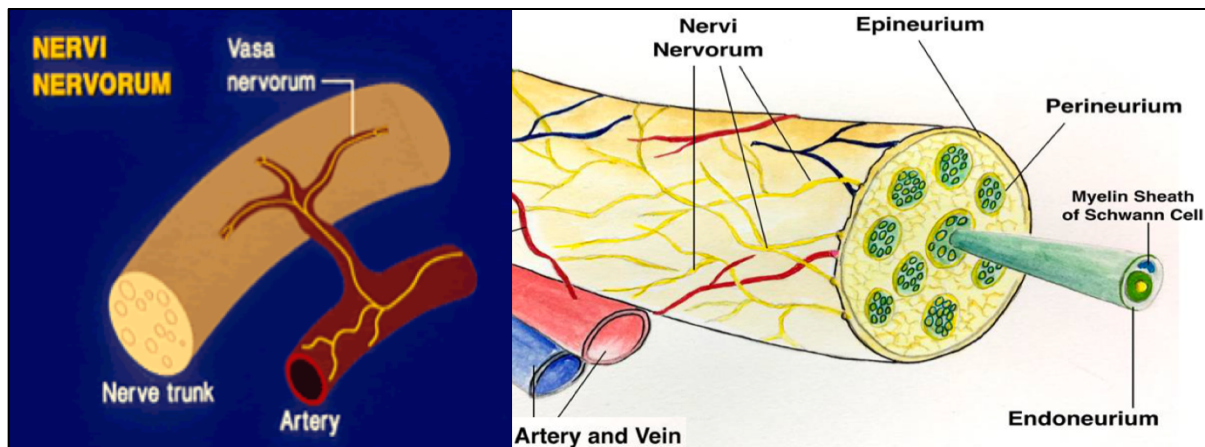
Εικόνα 5. (A) Η αιμάτωση των περιφερικών νευρών επιτυγχάνεται από ενδογενή και εξωγενή τροφοφόρα αγγεία. (B) Ενδονευρικό αγγείο που περιβάλλεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα και βασική μεμβράνη. (C) Κυτταρική δομή του αιματονευρικού φραγμού που σχηματίζεται από στενές συνδέσεις ενδοθηλιακών κυττάρων, περικύτταρα και βασική μεμβράνη. (C, D) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλληλοσυνδέονται με στενές συνδέσεις (tight junctions) σχηματίζοντας ένα περιοριστικό διακυτταρικό φράγμα (Richner et al., 2018).

Οριοθετείται από το περινεύριο, που απομονώνει το ενδονεύριο από τον εξωκυτταρικό χώρο, ενώ τα ενδονευρικά τριχοειδή διατηρούν την ομοιόσταση. Τα αγγεία αυτά έχουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με αυτά του κεντρικού νευρικού συστήματος και προκαλούν φραγμό για διάφορες μακρομοριακές ουσίες. Φυσιολογικά ο φραγμός είναι διαπερατός στα απλά σάκχαρα και εμποδίζει την είσοδο των ουσιών που μπορεί να προκαλέσουν αποκλεισμό των νευρικών συνάψεων. Ο φραγμός μπορεί να υποστεί βλάβη από

ακτινοβολία, φλεγμονώδεις καταστάσεις και μεταβολικές ανωμαλίες με επακόλουθες μεταβολές στην ισορροπία ιόντων, την οσμωτική και ενδονευρική πίεση. Η κατάργησή του μετά από νευρική βλάβη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των ενδονευρικών αγγείων σε υγρά και πρωτεΐνες, οδηγεί σε οίδημα του ενδονευρίου και καθιστά το νεύρο διαπερατό σε διάφορους επιβλαβείς παράγοντες (Landon, 1976; G. Lundborg & Schildt, 1971).

Ιδιαίτερο χειρουργικό ενδιαφέρον έχει η πιθανή βλάβη του φραγμού κατά την διάρκεια παρασκευής ή χειρισμού των περιφερικών νεύρων. Το νεύρο ανταποκρίνεται στη βλάβη με φλεγμονώδη αντίδραση, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και έξοδο πρωτεϊνών στο μεσοκυττάριο χώρο. Τα επινευρικά κύτταρα είναι πολύ ευπαθή, ακόμη και σε μικρής βαρύτητας τραυματισμούς, και αποκρίνονται πολύ γρήγορα με αύξηση της διαπερατότητάς τους και επακόλουθο σχηματισμό οιδήματος. Λόγω της λειτουργίας του περινευρικού φραγμού το οίδημα δεν εισέρχεται στον ενδονευρικό χώρο. Μεγαλύτερης βαρύτητας τραυματισμοί συνεπάγονται αύξηση της διαπερατότητάς των ενδονευρικών τριχοειδών, είτε λόγω άμεσης βλάβης των αγγείων είτε λόγω απελευθέρωσης ισταμίνης και σεροτονίνης από τα μαστοκύτταρα και είσοδο πρωτεϊνών στο ενδονεύριο. Ο αιματονευρικός φραγμός είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός στο μηχανικό τραύμα και την ισχαιμία και με δεδομένη την απουσία λεμφαγγείων στο ενδονεύριο, η παροχέτευση του οιδήματος καθίσταται αδύνατη. Το «σύνδρομο διαμερίσματος» που εγκαθίσταται μέσα στο νεύρο, συνεπάγεται ισχαιμικές αλλοιώσεις των νευρικών ιών και διήθηση του ενδονευρίου από ινοβλάστες που θα προκαλέσουν αργότερα σχηματισμό ουλώδους ιστού (Landon, 1976).

Στο τοίχωμα των αγγείων περιφερικών νεύρων έχουν περιγραφεί νευρικές απολήξεις που ονομάζονται *nervi nervorum* (**Εικόνα 6**). Αποτελούνται από ίνες, κύτταρα και υποδοχείς που μπορούν να φθάνουν μέχρι το επινεύριο, περινεύριο και ενδονεύριο, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδονευρικής κυκλοφορίας (Smoliar, Smoliar, & Belkin, 1999).



Εικόνα 6. (Α) Σχηματική απεικόνιση των nervi nervorum.

Κακώσεις Περιφερικών Νεύρων

Είδη και Μηχανισμός Κακώσεων

Οι βλάβες των περιφερικών νευρών μπορεί να είναι αποτέλεσμα μηχανικών, θερμικών, ισχαιμικών και χημικών παραγόντων.

Οι μηχανικοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο νεύρο είναι η συμπίεση, η διάταση και η διατομή. Μικρή βλάβη προκαλείται συνήθως από τοπικούς παράγοντες πίεσης, οι οποίοι προκαλούν πιεστικές νευροπάθειες, επιδρώντας στην ενδονευρική μικροκυκλοφορία και προκαλώντας ενδονευρικό οίδημα, αναστολή της αγωγής, ισχαιμία και νευρική ίνωση. Η αναστολή αυτή είναι συνήθως παροδική και ταχέως αναστρέψιμη μετά την άρση της πίεσης εκτός από περιπτώσεις χρόνιας πίεσης, που επηρεάζεται η κινητική αγωγιμότητα και εκδηλώνονται δομικές μεταβολές στις νευρικές ίνες και το συνδετικό υπόστρωμα του νεύρου. Ωστόσο, όταν εφαρμόζεται εξωτερική βία στο νεύρο η βλάβη που μπορεί να είναι πολύ πιο σοβαρή. Οι κακώσεις αυτές μπορεί να είναι κλειστές ή ανοικτές. Κλειστές κακώσεις είναι συνήθως αυτές που προκαλούνται από σύνθλιψη ή εξελκυσμό του νεύρου και προκαλούνται μετά από οξεία άμεση συμπίεση (αμβλύ αντικείμενο) η οξεία διάταση του νεύρου (κάκωση βραχιονίου πλέγματος), αντίστοιχα. Οι ανοικτές

κακώσεις προκαλούνται συνήθως από κάποιο αιχμηρό αντικείμενο και μπορεί να αφορούν πλήρη ή μερική διατομή του νεύρου. Οι βαλλιστικές κακώσεις νεύρων είναι μια ξεχωριστή κατηγορία που τείνει να συνδυάζει τη σύνθλιψη και τη διατομή του τραυματισμένου νεύρου (Menorca, Fussell, & Elfar, 2013).

Η ισχαιμία μπορεί επίσης να προκαλέσει σοβαρή βλάβη στα περιφερικά νεύρα (σύνδρομο διαμερίσματος). Χημική βλάβη μπορεί να υποστεί ο νευρικός ιστός από την υπέρχρηση αλκοόλ, ναρκωτικών ή άλλων νευροτοξικών ουσιών. Η δηλητηρίαση από διοξείδιο του άνθρακα και η ακτινοβολία μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στα νεύρα. Ιατρογενείς βλάβες είναι επίσης πιθανές, είτε με άμεση πλήξη του νεύρου κατά τη διάρκεια ενέσιμων ή άλλων χειρουργικών επεμβάσεων, είτε λόγω χορήγησης νευροτοξικών θεραπειών όπως χημειοθεραπευτικά σκευάσματα (Henry, 2014).

Ταξινόμηση Κακώσεων

Οι βλάβες των περιφερικών νεύρων μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τις δομικές και λειτουργικές μεταβολές των νευρικών ινών. Ο Seddon ταξινόμησε πρώτος τους τραυματισμούς των περιφερικών νεύρων σε τρεις διαβαθμίσεις: νευραπραξία, αξονότμηση, και νευρότμηση (H. Seddon, 1943) (**Πίνακας 1**).

Η νευροαπραξία αφορά τοπική άρση της αγωγιμότητας. Η ανατομική συνέχεια των νευραξόνων, η ευερεθιστικότητα των νευρικών δομών καθώς και των μυών περιφερικά της βλάβης διατηρούνται. Η νευροαπραξία αντιστοιχεί σε οξεία τοπική βλάβη της μυελίνης, ή/και ισχαιμία, ενώ η αποκατάσταση της αγωγιμότητας λαμβάνει χώρα σε λίγες ώρες, ημέρες ή κάποιες φορές λίγους μήνες. Σύμφωνα με την αρχική ταξινόμηση του Seddon η νευραπραξία περιλαμβάνει τέλεια κινητική παράλυση ενώ συνήθως εξακολουθεί να υπάρχει λειτουργικότητα αισθητικών και συμπαθητικών νευρώνων. Δεδομένου ότι οι μεγάλες κινητικές νευρικές ίνες είναι γενικά πιο εύαλωτες στην πίεση συγκριτικά με τις λεπτές αισθητικές νευρικές ίνες, ο μηχανισμός αυτός της κάκωσης συνήθως καταλήγει σε έκπτωση

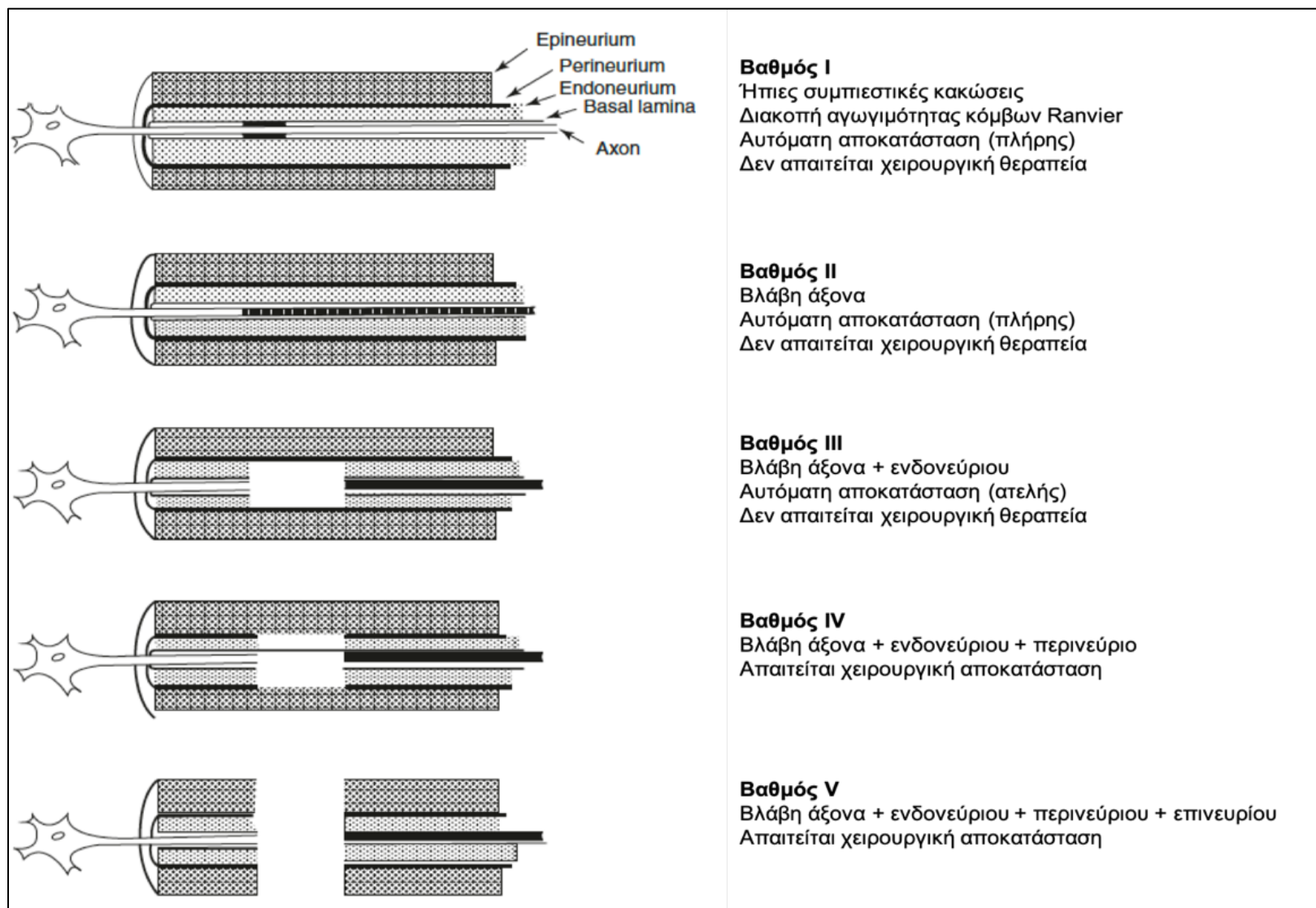
της κινητικής αγωγιμότητας και δεν επηρεάζει την αισθητική αγωγιμότητα του νεύρου. Ένα παράδειγμα αποτελεί το «σύνδρομο του Σαββατόβραδου» το οποίο χαρακτηρίζεται από παράλυση των εκτεινόντων μυών λόγω πίεσης του κερκιδικού νεύρου στο βραχίονα.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση κακώσεων περιφερικών νεύρων

| Βαθμός Νευρικής Βλάβης | | Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά |
|------------------------|-------------------|--|
| Seddon | Sunderland | |
| Νευροαπραξία | I | Τοπική απομυελίνωση/οίδημα του νεύρου |
| Αξονότμηση | II | Απώλεια συνέχειας αξόνων - Ακέραια ενδονευρίο, περινεύριο, επινεύριο |
| | III | Απώλεια συνέχειας αξόνων, ενδονευρίου - Ακέραια περινεύριο, επινεύριο |
| | IV | Απώλεια συνέχειας αξόνων, ενδονευρίου, περινευρίου - Ακέραιο επινεύριο |
| Νευρότμηση | V | Πλήρης διακοπή της συνέχειας του νεύρου |
| | VI (σύνθετη) | Συνύπαρξη βλαβών, διαφορετικών βαθμών (I-V), στο ίδιο τμήμα του νεύρου |

Η αξονότμηση αντιστοιχεί σε απώλεια της ανατομικής συνέχειας των νευραξόνων, αλλά με διατήρηση της δομής και της συνέχειας των ενδονευρικών σωλήνων. Αυτή η βλάβη προκαλείται συνήθως μετά από άσκηση δυνάμεων σύνθλιψης ή ελκυσμού, αρκετά ισχυρών ώστε να προκαλέσουν διακοπή της συνέχειας των νευραξόνων. Συνοδεύονται από Βαλλεριανή εκφύλιση περιφερικά της βλάβης και ο χρόνος που απαιτείται για την αποκατάσταση της λειτουργικότητας αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα που χρειάζεται για την αναγέννηση των αξόνων και την προώθησή τους μέχρι τα κύτταρα-στόχους. Η πρόγνωση σε γενικές γραμμές είναι καλή αφού οι ενδονευρικοί σωλήνες που θα καθοδηγήσουν τους υπό αναγέννηση νευράξονες είναι ακέραιοι.

Η νευρότμηση αφορά τις βλάβες που περιλαμβάνουν διακοπή της συνέχειας του επινευρίου, περινευρίου και των ενδονευρικών σωλήνων. Αυτό το είδος βλάβης συμβαίνει σε πλήρη διατομή του νεύρου ή σε παρεμβολή ουλώδους ιστού, ώστε η αυτόματη αναγέννηση να είναι αδύνατη. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι κακώσεις αυτές αφορούν την πλήρη ή μερική διατομή του νεύρου.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης των βλαβών των περιφερικών νεύρων κατά Sunderland (Julia K Terzis & Smith, 1990).

Ο Sunderland πρότεινε μία περαιτέρω ταξινόμηση με πέντε διαβαθμίσεις νευρικής βλάβης. Παρά το γεγονός ότι η ταξινόμηση Seddon είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο, η ταξινόμηση Sunderland παρέχει καλύτερη περιγραφή της παθοφυσιολογίας της νευρικής βλάβης (Sunderland, 1951) (**Πίνακας 1, Εικόνα 7**). Η πρώτη και η δεύτερου βαθμού νευρική βλάβη αντιστοιχούν στη νευραπραξία και αξονότμηση του Seddon, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι τύποι III, IV και V διακρίνονται μεταξύ τους ανάλογα με τη διατήρηση ή μη των διαφόρων δομικών στοιχείων του νεύρου. Η βλάβη τύπου III αντιστοιχεί σε διακοπή της συνέχειας των νευραξόνων και των ενδονευρικών σωλήνων, ενώ το περινεύριο παραμένει ακέραιο. Αυτές οι βλάβες είναι συνήθως απότοκες συνθλιπτικών ή αποσπαστικών κακώσεων με επακόλουθη περιφερική Βαλλεριανή εκφύλιση και αποδιοργάνωση της εσωτερικής δομής των νευρικών δεσμίδων. Ο προσανατολισμός των υπό αναγέννηση αξόνων είναι δύσκολος, ενώ η αναγεννητική διαδικασία μπορεί να επιπλακεί από ενδονευρική αιμορραγία, οίδημα ή ισχαιμία και να οδηγήσει σε ανάπτυξη ινώδους ιστού. Η βλάβη τύπου IV συνοδεύεται με απώλεια της συνέχειας του περινευρίου, αλλά με διατήρηση του επινευρίου. Στη βλάβη τύπου V υπάρχει πλήρης διακοπή της συνέχειας του νεύρου, όπως στη νευρότμηση κατά Seddon (**Εικόνα 7**). Τέλος, στην ταξινόμηση του Sunderland προστέθηκε μία έκτη κατηγορία (VI) που χαρακτηρίζεται από περισσότερες από μία είδους βλάβες (I έως V) στο ίδιο τμήμα του περιφερικού νεύρου (Farber et al., 2013) (**Πίνακας 1**).

Όσο η συνέχεια των νευραξόνων διατηρείται, η λειτουργική αποκατάσταση είναι πλήρης, μολονότι ο λανθάνων χρόνος μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη παθοφυσιολογική βάση της βλάβης. Οι ήπιες βαρύτητας συμπιεστικές βλάβες συνεπάγονται ένα τοπικό φραγμό αγωγιμότητας (νευραπραξία, Sunderland I). Η συνέχεια των αξόνων διατηρείται και πλήρης λειτουργική αποκατάσταση επέρχεται σύντομα. Σε πιο σοβαρές συμπιεστικές βλάβες, (εξελκυσμού ή σύνθλιψης) η συνέχεια των νευραξόνων διακόπτεται με αποτέλεσμα την εκφύλιση του περιφερικού νευρικού τμήματος. Η συνέχεια όμως των ενδονευρικών σωλήνων παραμένει ακέραιη (αξονότμηση, Sunderland II) και οι αναγεννημένοι άξονες από το εγγύς

τμήμα του νεύρου καθοδηγούνται από αυτούς με αποτέλεσμα η επανανεύρωση των περιφερικών οργάνων-στόχων να επιτυγχάνεται με καλό συνήθως λειτουργικό αποτέλεσμα. Ο χρόνος αποκατάστασης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία του ασθενούς και το επίπεδο της κάκωσης. Η λειτουργικότητα, αποκαθίσταται συνήθως σε μερικούς μήνες. Σε βλάβες τύπου III, η βλάβη περιλαμβάνει και το ενδονεύριο και η ενδογενής καθοδήγηση των αξόνων δεν είναι βέλτιστη, με αποτέλεσμα την ατελή λειτουργική αποκατάσταση. Στις προηγούμενες βλάβες (I, II και III) δεν απαιτείται συνήθως χειρουργική θεραπεία. Σε πιο σοβαρά τραύματα νεύρων, περισσότερα συστατικά του συνδετικού ιστού υφίστανται βλάβη (νευρότμηση, Sunderland IV, V, VI). Οι δομικές κατασκευές οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν τους νευράξονες κατά μήκος της βλάβης έχουν καταστραφεί πλήρως με αποτέλεσμα ο αποπροσανατολισμός των αξόνων στο επίπεδο της βλάβης να είναι αναπόφευκτος. Τυπικά, στις βλάβες αυτές η χειρουργική αποκατάσταση είναι απαραίτητη.

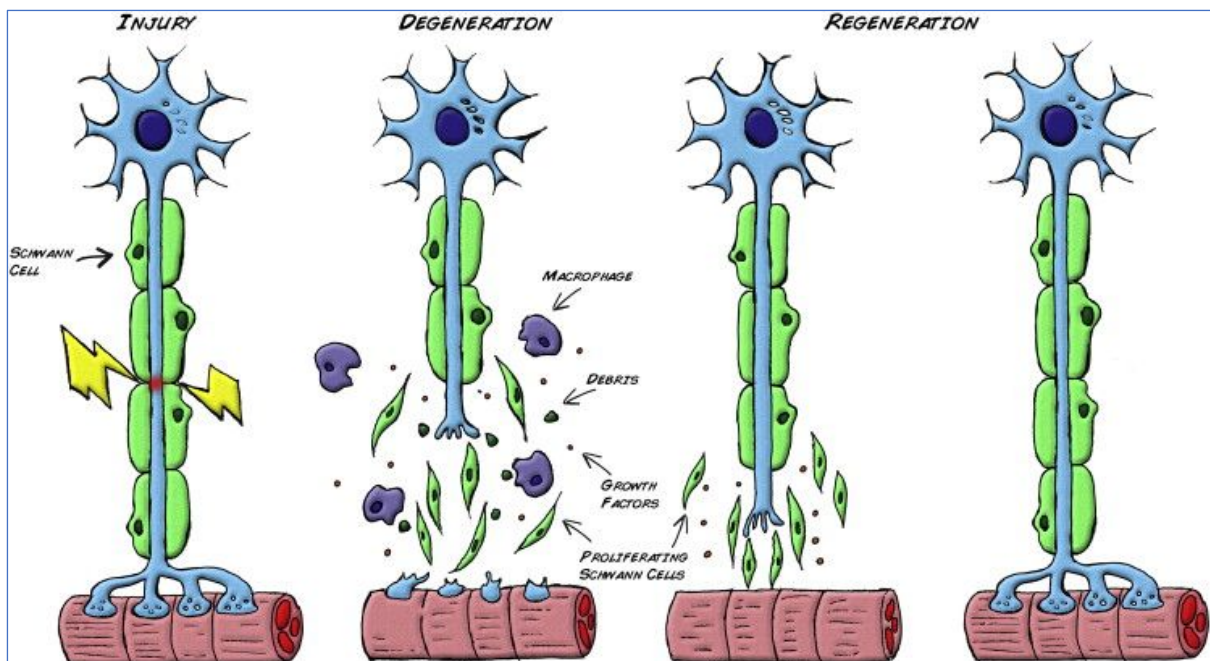
Βαλλεριανή Εκφύλιση

Το φαινόμενο που συνοδεύει τη νευρική βλάβη όπου το τμήμα του νευράξονα που έχει διαχωριστεί από τα κύτταρα του νευρώνα εκφυλίζεται περιφερικά της βλάβης ονομάζεται Βαλλεριανή εκφύλιση (Waller, 1850). Η εκφύλιση αυτή είναι γνωστή ως ορθόδρομη ή ανάδρομη εκφύλιση, ενώ παρόμοια φαινόμενα με εκείνα της Βαλλεριανής εκφύλισης παρατηρούνται και σε πολλές νευροεκφυλιστικές παθήσεις και αρκετές φορές περιγράφονται σαν εκφύλιση Βαλλεριανού τύπου (Coleman & Freeman, 2010).

Η Βαλλεριανή εκφύλιση έλαβε το όνομα της από τον Augustus Volney Waller, ο οποίος πραγματοποίησε πειράματα σε βατράχους. Με τη μελέτη των περιφερικών τμημάτων των νεύρων μετά από διατομή του γλωσσοφαρυγγικού και υπογλωσσίου νεύρου ο Waller παρατήρησε την αποδόμηση της μυελίνης (Waller, 1850).

Το φαινόμενο της Βαλλεριανής εκφύλισης ξεκινά σε 24-36 ώρες μετά τη νευρική βλάβη. Ο αξονικός σκελετός μετά τον τραυματισμό αποσυντίθεται και η αξονική μεμβράνη

διασπάται. Ακολουθεί η αλλοίωση των ελύτρων μυελίνης και η συγκέντρωση μακροφάγων στην περιοχή της βλάβης. Ο κύριος ρόλος των μακροφάγων είναι η απομάκρυνση των προϊόντων εκφύλισης (Coleman et al., 1998). Σε διάστημα 4 ημερών, το περιφερικό τμήμα της νευρικής ίνας αρχίζει να εμφανίζει εκβλαστήσεις (ψευδοπόδια). Οι εκβλαστήσεις αυτές έλκονται από αυξητικούς παράγοντες που εκλύονται από τα κύτταρα Schwann. Αν μια εκβλάστηση φθάσει στο περιφερικό τμήμα του νεύρου, αναπτύσσεται εντός αυτού με ρυθμό περίπου 1 χιλιοστό ημερησίως, προσπαθώντας να προσεγγίσει το όργανο στόχο και να το επανανευρώσει (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Βαλλεριανή εκφύλιση περιφερικού νεύρου. Μετά τον τραυματισμό, τα κύτταρα Schwann διασπούν τη μυελίνη και οι περιφερικοί άξονες εκφυλίζονται. Τα μακροφάγα απομακρύνουν τα υπολείμματα με φαγοκυττάρωση. Έπειτα, οι κεντρικοί νευράξονες σχηματίζουν εκβλαστήσεις χρησιμοποιώντας τα κύτταρα Schwann ως οδηγούς. Μετά την ανανέωση, οι νευράξονες ωριμάζουν και η κυτταρική τους αρχιτεκτονική και λειτουργία αποκαθίστανται.

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των βλαβών των περιφερικών νεύρων είναι το γεγονός ότι συνοδεύονται από άμεση εκφύλιση που χαρακτηρίζεται από το διαχωρισμό του κεντρικού και του περιφερικού τμήματος μέσα σε 30 λεπτά (Kerschensteiner, Schwab, Lichtman, & Misgeld, 2005). Η εκφύλιση συνεχίζεται με το οίδημα που παρατηρείται στο αξονόλημμα και η όλη

διαδικασία στο περιφερικό νευρικό διαρκεί περίπου 24 ώρες. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα το φαινόμενο εξελίσσεται πιο αργά (Vargas & Barres, 2007).

Η αξονική εκφύλιση περιλαμβάνει τη σταδιακή αποδόμηση του κυτταρικού σκελετού του νεύρου και των εσωτερικών οργανιδίων. Οι διαδικασίες αποδόμησης εξαρτώνται από πρωτεάσες που σχετίζονται με αλλαγές στην συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου. Η αξονική εκφύλιση είναι μια ενεργή διαδικασία και όχι παθητική όπως είχε θεωρηθεί στο παρελθόν (Zimmerman & Schlaepfer, 1984). Η διάμετρος των νευρικών ινών παίζει ρόλο στη διαδικασία αποδόμησης. Οι νευράξονες με μεγαλύτερη διάμετρο απαιτούν εκτεταμένο χρονικό διάστημα για την αποδόμηση του κυτταρικού τους σκελετού και συνεπώς μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την εκφύλισή τους.

Μετά την εκφύλιση των αξόνων, λαμβάνει χώρα η αποδόμηση των ελύτρων μυελίνης που συμμετέχει ενεργά στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη μετάδοση των ερεθισμάτων. Η εκκαθάριση της μυελίνης είναι το επόμενο στάδιο στη Βαλλεριανή εκφύλιση. Η απομάκρυνση των προϊόντων καταστροφής της μυελίνης είναι πολύ πιο γρήγορη διαδικασία στο περιφερικό νευρικό σύστημα σε σχέση με το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η διαφορά αυτή παρατηρείται κυρίως λόγω των κυττάρων Schwann. Ένας άλλος λόγος είναι η διαπερατότητα του αιματονευρικού φραγμού. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα η διαπερατότητα αυξάνεται στο περιφερικό κολόβωμα, ενώ στο κεντρικό νευρικό σύστημα η αλλαγή διαπερατότητας περιορίζεται στην περιοχή της βλάβης (Vargas & Barres, 2007). Όσον αφορά τη φαγοκυττάρωση, αυτή πραγματοποιείται κυρίως από μακροφάγα τα οποία έχουν μεταφερθεί στην περιοχή με την αιματική κυκλοφορία (Beuche & Friede, 1984).

Μετά το νευρικό τραυματισμό λαμβάνουν χώρα πληθώρα αντιδράσεων για την επίτευξη της νευρικής αναγέννησης. Τα κύτταρα Schwann πολλαπλασιάζονται και συντάσσονται κατά μήκος της βασικής μεμβράνης, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο τον προσανατολισμό των αναγεννούμενων νευραξόνων και παράλληλα προάγοντας την παραγωγή μυελίνης (Stoll & Muller, 1999).

Χειρουργική Θεραπεία Νευρικών Τραυματισμών

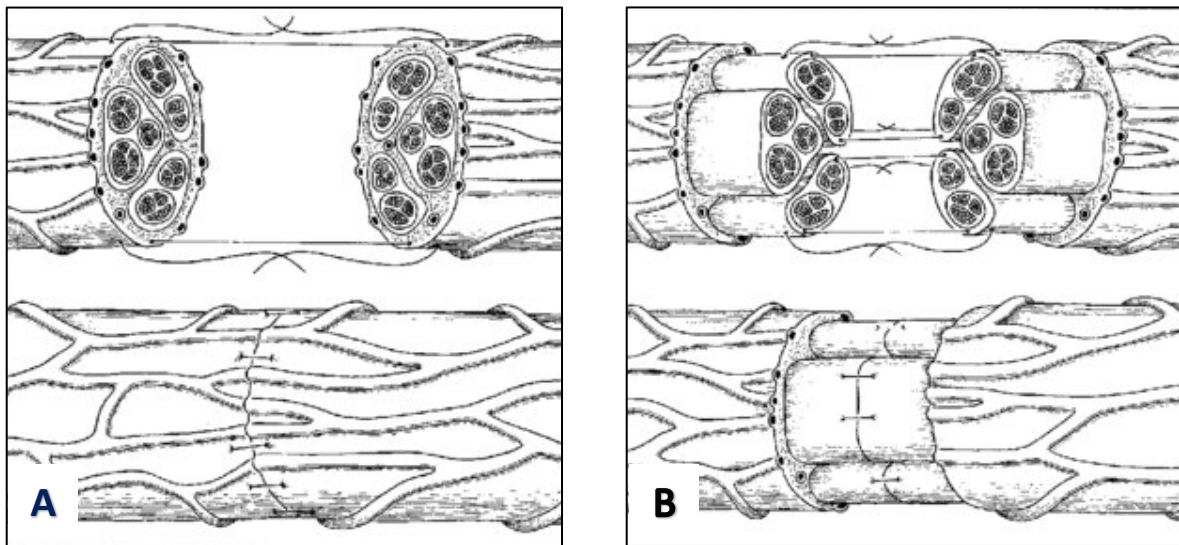
Χρόνος Θεραπευτικής Προσέγγισης

Στο οξύ τραύμα ή στους τραυματισμούς εκείνους που υπάρχει υψηλός δείκτης υποψίας για διατομή νεύρου, πρέπει να διενεργείται άμεση χειρουργική αποκατάσταση. Ωστόσο, ο χρόνος της χειρουργικής θεραπείας εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως της σταθερότητας του ασθενούς, των συνοδών τραυματισμών, των συννοσηροτήτων, το επίπεδο και τον βαθμό του τραυματισμού και φυσικά τα διατιθέμενα χειρουργικά μέσα. Η νευρική συρραφή μπορεί να κατηγοριοποιείται σύμφωνα με το χρόνο εφαρμογής της θεραπείας. Η οξεία πρωτογενής συρραφή λαμβάνει χώρα μέσα στις πρώτες 72 ώρες, ενώ η καθυστερημένη πρωτογενής συρραφή εφαρμόζεται μεταξύ 72 ωρών και 1 εβδομάδας. Η νευρική συρραφή που πραγματοποιείται μετά την εβδομάδα θεωρείται πλέον δευτερογενής (Susan E. Mackinnon, 2015).

Η χειρουργική των νεύρων ιδανικά θα πρέπει να διενεργείται κατά τη διάρκεια της ημέρας, από έναν ξεκούραστο μικροχειρουργό με διαθέσιμα τα απαραίτητα μέσα και εξειδικευμένο νοσηλευτικό προσωπικό. Για τις πρώτες 72 ώρες μετά τον τραυματισμό, εξακολουθεί να είναι εφικτή η διέγερση του περιφερικού κολοβώματος του κινητικού νεύρου, δίνοντας στο χειρουργό τη δυνατότητα βέλτιστης ευθυγράμμισης κατά τη συρραφή. Η άμεση χειρουργική διερεύνηση των νευρικών τραυματισμών μειώνει σημαντικά την πιθανότητα αδυναμίας πρωτογενούς συρραφής λόγω τάσης, όπως επίσης και τον σχηματισμό ουλώδους ιστού. Όταν το περιφερικό κολοβώμα σταματήσει να αντιδρά σε ερεθίσματα, ο χειρουργός μπορεί μόνο να βασιστεί στη γνώση της νευρικής τοπογραφίας για τη χειρουργική αποκατάσταση (Susan E. Mackinnon, 2015).

Στους ασθενείς που έχουν υποστεί νευρικό τραυματισμό λόγω σύνθλιψης, άλλο αμβλύ τραυματισμό, ή ακόμα και σε εκείνους που παρουσιάζουν τραυματισμούς από πυροβόλα όπλα μπορεί να προτιμηθεί η καθυστερημένη χειρουργική θεραπεία, έτσι ώστε να εξεταστεί πρώτα το ενδεχόμενο αυτόματης αποκατάστασης. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες μπορούν να

δώσουν πολύ χρήσιμες πληροφορίες 8 έως 12 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό αφού τα ηλεκτομυογραφικά ευρήματα προηγούνται της κλινικής βελτίωσης και της επαναφοράς της μυϊκής λειτουργίας. Η νευρική αναγέννηση ακολουθεί τον σταθερό ρυθμό του 1 χιλιοστού ημερησίως, με αποτέλεσμα να μπορεί να εκτιμηθεί ο χρόνος επανανεύρωσης σύμφωνα με το επίπεδο του τραυματισμού. Αν η αποκατάσταση του νευρικού ελλείματος δεν αποκατασταθεί σε 3 ή 4 μήνες τότε πρέπει να εξετάζεται η χειρουργική διερεύνηση. Είναι γνωστό ότι εάν οι μύες δεν επανανευρωθούν εντός του έτους, μειώνονται στο ελάχιστο οι πιθανότητες αποκατάστασης της λειτουργίας τους. Ο μυϊκός ιστός είναι ευαίσθητος στο χρόνο αφού αντικαθίσταται από λίπος και παρουσιάζει ίνωση μετά την πάροδο περίπου 12 μηνών. Η λειτουργική αποκατάσταση είναι ανάλογη με τον αριθμό των νευρικών ιών που καταφέρνουν να φτάσουν στην τελική πλάκα, ενώ είναι αντιστρόφως ανάλογη με το χρόνο επανανεύρωσης των μυών (Tung & Mackinnon, 2010).



Εικόνα 8. (Α) Επινευρική και **(Β)** δεσμική τελικο-τελική συρραφή (S. K. Lee & Wolfe, 2000)

Πρωτογενής Νευρική Συρραφή

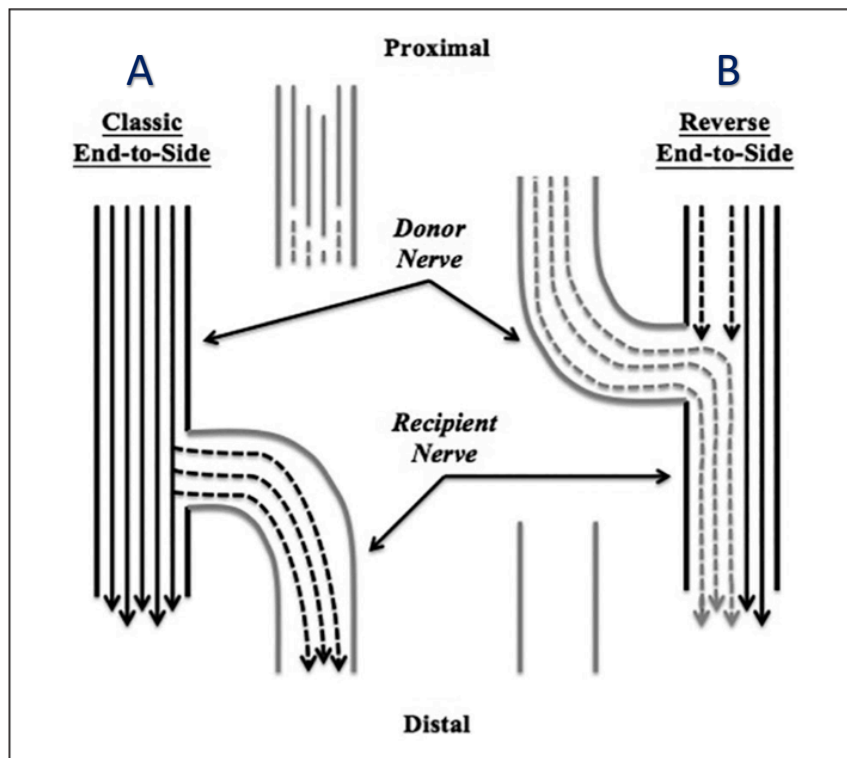
Ο τρόπος της νευρικής συρραφής έχει απασχολήσει εκτενώς τη σχετική βιβλιογραφία. Ιδιαίτερη συζήτηση γίνεται σχετικά με την επινευρική και τη δεσμιδική τελικο-τελική συρραφή (**Εικόνα 8**). Χρησιμοποιώντας ως οδηγό σημείο τη νευρική αρτηρία ή τη γεωμετρία

των νευρικών δεσμίδων (fascicles), ο χειρουργός προσπαθεί να πετύχει τη βέλτιστη ευθυγράμμιση του κεντρικού και του περιφερικό κολοβώματος κατά την αποκατάσταση της νευρικής βλάβης. Η δίχως τάση πρωτογενής συρραφή και η χρήση των λιγότερων δυνατών μικροχειρουργικών ραμμάτων είναι θεμελιώδους σημασίας. Συνήθως προτιμάται η επινευρική συρραφή για τα νεύρα μικρής διαμέτρου, όπως τα δακτυλικά νεύρα. Η δεσμιδική συρραφή ίσως είναι περισσότερο αποτελεσματική σε μεγαλύτερα περιφερικά νεύρα (με μεγάλες δεσμιδικές ομάδες) ιδιαίτερα όταν η αισθητική και η κινητική νευρική τοπογραφία είναι γνωστές, όπως το ωλένιο νεύρο στο επίπεδο του αντιβραχίου ή του χεριού. Τα μειονεκτήματα της δεσμιδικής συρραφής είναι η εκτεταμένη νευρική παρασκευή που απαιτείται και τα πολλαπλά ενδονευρικά ράμματα που οδηγούν σε αυξημένη νευρική ίνωση. Ωστόσο, και οι δύο τεχνικές είναι αποδεκτές εφόσον τα νευρικά κολοβώματα νεαροποιηθούν αποτελεσματικά και δεν αλληλεπικαλύπτονται μετά τη συρραφή (Cabaud, Rodkey, McCarroll, Mutz, & Niebauer, 1976; S. K. Lee & Wolfe, 2000; Zhao, Dahlin, Kanje, & Lundborg, 1992).

Η θεωρία ότι σε μια προσεκτική επινευρική συρραφή, η κακή νευρική ευθυγράμμιση θα διορθωθεί με το φαινόμενο τους νευροτροφισμού έχει επίσης περιγραφεί. Σύμφωνα με αυτή, οι κεντρικές νευρικές ίνες θα αναζητήσουν τις περιφερικές δεσμίδες με το μηχανισμό της «καθοδήγησης επαφής» (Evans, Bain, Mackinnon, Makino, & Hunter, 1991). Έτσι, όταν τα ανατομικά σημεία δεν είναι αναγνωρίσιμα ώστε να εφαρμοστεί σωστή ευθυγράμμιση των κολοβωμάτων, η επινευρική συρραφή πρέπει να προτιμάται. Ωστόσο, όσο αποκτούμε βαθύτερη γνώση της κινητικής και αισθητικής νευρικής τοπογραφίας η διχογνωμία μεταξύ περινευρικής και δεσμιδικής συρραφής χάνει σιγά σιγά έδαφος. Η μικροχειρουργική συρραφή, χωρίς τάση, εκτός του πεδίου του τραυματισμού, που επιτρέπει την άμεση κινητοποίηση αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο της χειρουργικής θεραπείας.

Οι περισσότερες νευρικές αποκαταστάσεις ακολουθούν το μοντέλο της τελικο-τελικής συρραφής, είτε αυτό αφορά την πρωτογενή νευρική συρραφή ή τη χρήση μοσχευμάτων. Η τελικο-πλάγια συρραφή θεωρείται ως μια αμφισβητούμενη τεχνική, ωστόσο χρησιμοποιείται

εκτενώς από αρκετούς συγγραφείς (Isaacs, 2022; Susan E. Mackinnon, 2015; Ray, Kasukurthi, Yee, & Mackinnon, 2010). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τον κλασσικό τρόπο, όπου το τελικό κολόβωμα του δέκτη μεταφέρεται στο πλάι του δότη ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη τεχνική supercharge όπου το τελικό κολόβωμα του δότη μεταφέρεται στο πλάι του δέκτη (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της κλασσικής τελικό-πλάγιας νευρικής συρραφής (**A**) και της ανάστροφης τελικο-πλάγιας συρραφής (**B**) με την τεχνική supercharge (Isaacs, 2022).

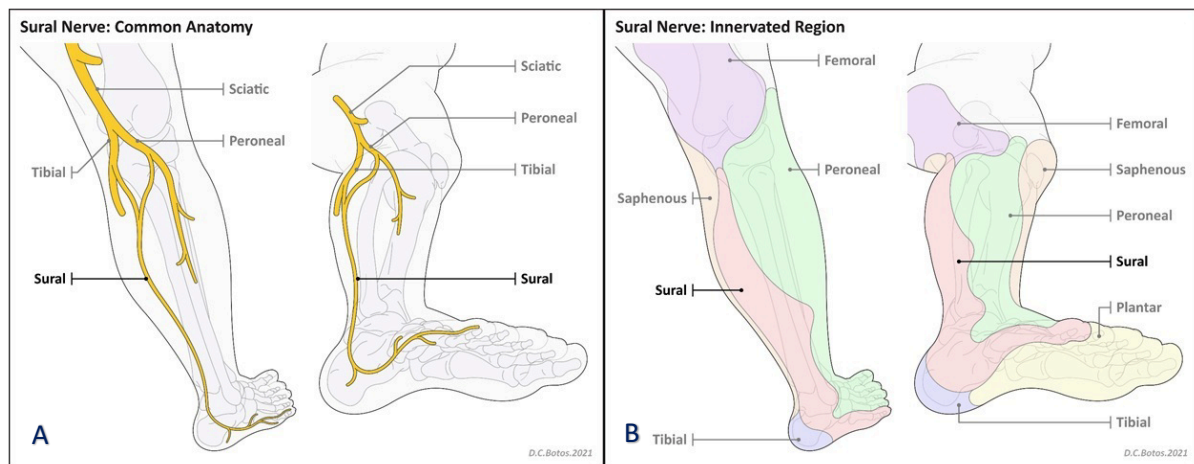
Η ιδανική αποκατάσταση ενός νευρικού τραυματισμού είναι η δίχως τάση πρωτογενής τελικο-τελική συρραφή (Ray & Mackinnon, 2010). Ένα ποσοστό νευρικών ινών χάνει τον προσανατολισμό του σε κάθε σημείο συρραφής, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των νευρικών αξόνων που φτάνουν στην τελική πλάκα όσο αυξάνονται τα σημεία συρραφής (Myckatyn & Mackinnon, 2004). Παρόλα αυτά, αν τα νευρικά κολοβώματα δεν μπορούν να συμπλησιαστούν δίχως τάση, τότε η πρωτογενής συρραφή δεν είναι η θεραπεία εκλογής (Millesi, 1986; Seddon, 1975). Η χρήση μοσχεύματος με δυο σημεία συρραφής προτιμάται σε αυτές τις περιπτώσεις. Ο νευρικός ιστός είναι πολύ ευαίσθητος. Αν αυξηθεί η έλξη που υποβάλλεται ένα φυσιολογικό νεύρο κατά 15%, τότε μειώνεται δραματικά η μικροκυκλοφορία

του (Driscoll, Glasby, & Lawson, 2002). Μερικές φορές η κινητοποίηση και μεταφορά των κολοβωμάτων του τραυματισμένου νεύρου μπορεί να βοηθήσουν την πρωτογενή συρραφή. Αυτό είναι εφικτό ακόμα και σε περιπτώσεις μικρών νευρικών ελλειμμάτων (<5 χιλιοστά) (Millesi, 1986). Η μετακίνησή ολόκληρου του νεύρου μπορεί επίσης να εξασφαλίσει ορισμένο μήκος, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της μετατόπισης του ωλένιου νεύρου από την περιοχή του ωλένιου σωλήνα.

Αντιμετώπιση Νευρικών Ελλειμμάτων

Η αντιμετώπιση των νευρικών ελλειμμάτων μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, ωστόσο η θεραπεία εκλογής είναι η γεφύρωσή τους με νευρικά αυτομοσχεύματα (**Εικόνα 10**). Τα αυτομοσχεύματα δεν προκαλούν ανοσολογική αντίδραση στην περιοχή της μεταμόσχευσης και παρέχουν μια σημαντική πηγή κυττάρων Schwann, βοηθώντας έτσι τη νευρική αναγέννηση (Flores, Lavernia, & Owens, 2000; G. N. Panagopoulos, Megaloikonomos, & Mavrogenis, 2017; G.N. Panagopoulos, Megaloikonomos, & Mavrogenis, 2019; Ray & Mackinnon, 2010). Δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο όριο στο μήκος γεφύρωσης. Κάποιοι συγγραφείς περιγράφουν τη χρήση αυτομοσχευμάτων 20 εκατοστών με ποικίλα αποτελέσματα (Lenoble et al., 1989). Άλλοι υποστηρίζουν ότι αξιόπιστη ανακατασκευή αναμένεται όταν το μόσχευμα είναι ≤ 6 εκατοστά (Susan E. Mackinnon, 2015). Τα μικρά και λεπτά μοσχεύματα φαίνεται να έχουν καλύτερα αποτελέσματα, λόγω της ευκολότερης επαναγγείωσής τους. Γενικά, δεν είναι απαραίτητη η χρήση αγγειούμενων νευρικών μοσχευμάτων όταν η διάμετρος τους είναι μικρή αφού η επαναγγείωση γίνεται αυτόματα (**Πίνακας 2**). Όταν όμως η διάμετρος είναι μεγάλη τα αγγειούμενα μοσχεύματα μπορούν να αποτρέψουν μια πιθανή, κεντρική νέκρωση (Doi et al., 1992; Taylor & Ham, 1976). Το μεγαλύτερο μειονέκτημα των αυτομοσχευμάτων είναι η ανάγκη μιας δεύτερης χειρουργικής επέμβασης που μπορεί να προκαλέσει νοσηρότερα στη δότρια περιοχή μετά τη λήψη ενός λειτουργικού νεύρου. Τα

κινητικά και μεικτά νεύρα προτιμώνται σε σχέση με τα αισθητικά, αφού φαίνεται πως οδηγούν σε καλύτερη αναγέννηση μετά την ανακατασκευή (Brushart, 1988; Moradzadeh et al., 2008).



Εικόνα 10. Απεικόνιση της ανατομίας (A) του γαστροκνημίου νεύρου και της αισθητικής κατανομής του (B) (Jackson et al., 2023), το οποίο παραμένει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αυτομόσχευμα.

Τα νευρικά αλλομοσχεύματα είναι μια άλλη επιλογή μοσχευμάτων, δεδομένου ότι τα διαθέσιμα αυτομοσχεύματα είναι περιορισμένα και όχι πάντα διαθέσιμα. Τα αλλομοσχεύματα δρουν σαν ικριώματα που παρέχουν το υπόστρωμα για τη νευρική αναγέννηση (Kragup, Archibald, & Madison, 2002). Τα μοσχεύματα αυτά είναι ευρέως διαθέσιμα και το πλεονέκτημά τους είναι ότι αποφεύγεται με τη χρήση τους η δεύτερη χειρουργική επέμβαση και η νοσηρότητα της δότριας περιοχής. Ωστόσο η τεχνική έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Για να αποφευχθεί η ανοσολογική αντίδραση, επιτάσσεται η χρήση προσωρινής ανοσοκαταστολής, που εκθέτει τους ασθενείς σε ευκαιριακές λοιμώξεις και νεοπλασματικές εξεργασίες (S. E. Mackinnon, Doolabh, Novak, & Trulock, 2001). Η χορήγηση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων μπορεί να σταματήσει 6 μήνες μετά τη μετάβαση των νευραξόνων περιφερικά του μοσχεύματος. Για το λόγο αυτό τα αλλομοσχεύματα χρησιμοποιούνται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, σε ασθενείς που δεν είναι δυνατή η συρραφή και διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο να καταλήξουν σε σημαντικά λειτουργικά ελλείμματα του πάσχοντος άκρου. Τα αλλομοσχεύματα πρέπει να προέρχονται από συμβατούς δωρητές, σύμφωνα με το σύστημα ABO, και είναι κατά τη μεγάλη πλειοψηφία τους

πτωματικά. Συνήθως, αφορούν νεύρα μικρής διαμέτρου που επιτρέπουν καλύτερη επαναγγείωση. Αποθηκεύονται σε διάλυμα University of Wisconsin (UW solution) με αντιβιοτικά σε 4°C για 7 ημέρες πριν τη χρήση. Ο παράγοντας FK506 φαίνεται ότι μπορεί να επιταχύνει τη νευρική αναγέννηση και τη λειτουργική αποκατάσταση, ωστόσο είναι τοξικός και να παρουσιάζει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες που αποτρέπουν τη μακρόχρονη χρήση του. Οι ασθενείς λαμβάνουν FK506 μερικές ημέρες προεγχειρητικά και έπειτα κανονική ανοσοθεραπεία. Το μεγαλύτερο πρόβλημα των αλλομοσχευμάτων είναι η απόρριψη του μοσχεύματος από τον δέκτη. Είναι δύσκολο να αξιολογήσει κανείς την απόρριψη ενός αλλομοσχεύματος, δεδομένου ότι η λειτουργική αποκατάσταση των νεύρων δεν αναμένεται άμεσα και τα μοσχεύματα είναι καλυμμένα από άλλους ιστούς. Η τοποθέτησή τους στο υποδόριο για να αξιολογείται πιθανή φλεγμονώδης αντίδραση και ερύθημα έχει περιγραφεί ως πιθανή λύση (Feng et al., 2001).

Πίνακας 2. Συχνότερα αυτομοσχεύματα στην κλινική πράξη (G. N. Panagopoulos et al., 2017).

| Donor nerve | Length (cm) | Sensory defect |
|--|---|---|
| Sural nerve | 30-40cm | Dorsal aspect of lower leg & lateral foot |
| Medial antebrachial cutaneous nerve | 10-12cm ^a 8-10cm ^b | Medial forearm |
| Lateral antebrachial cutaneous nerve | 10-12cm | Lateral forearm |
| Superficial sensory branch of the radial nerve | 25 cm | Radial dorsal hand |
| Dorsal cutaneous branch of ulnar nerve | 4-6 cm | Dorsal/ulnar hand |
| Posterior interosseous nerve | 6 cm | No apparent deficit |
| Anterior interosseous nerve | 6 cm | No apparent deficit |
| Lateral femoral cutaneous nerve | 10-20 cm | Anterolateral thigh |
| Saphenous nerve | 40 cm | Medial lower leg & foot, prepatellar skin |
| Posterior cutaneous nerve of the forearm | 2-5 cm | Posterolateral forearm |

^aabove elbow; ^b below elbow

Σε περιπτώσεις μικρών ελλειμμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακυτταρικά αλλομοσχεύματα που μέσω ειδικής επεξεργασίας καθίστανται ανοσολογικά ανενεργά (Whitlock et al., 2009). Η διαδικασία που ακολουθείται συμπεριλαμβάνει πλύση των μοσχευμάτων με ειδικούς παράγοντες ώστε να αφαιρεθεί το κυτταρικό υλικό του δότη, όπως τα Schwann κύτταρα και οι πρωτεογλυκάνες θεικής χονδροϊτίνης, αλλά παράλληλα να

διατηρηθεί το βιολογικό ικρίωμα για την καθοδήγηση των νευραξόνων (Whitlock et al., 2009). Τα μοσχεύματα αυτά αποστειρώνονται με ακτινοβολία-γ πριν μπουν σε κατάψυξη – 80°C. Πριν τη χρήση τους τοποθετούνται για 10 λεπτά σε φυσιολογικό ορό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ξεπαγώσουν και να ενυδατωθούν. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μικρά μόνο ελλείμματα (≤ 3 εκατοστά), αφού δεν έχουν κύτταρα Schwann. Η χρήση τους ενδείκνυται σε μικρής διαμέτρου αισθητικά νεύρα μήκους < 3 εκ. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης σε περιπτώσεις αφαίρεσης νευρωμάτων ή στην αποκατάσταση του ελλείμματος της δότριας περιοχής μετά τη λήψη αυτομοσχευμάτων.

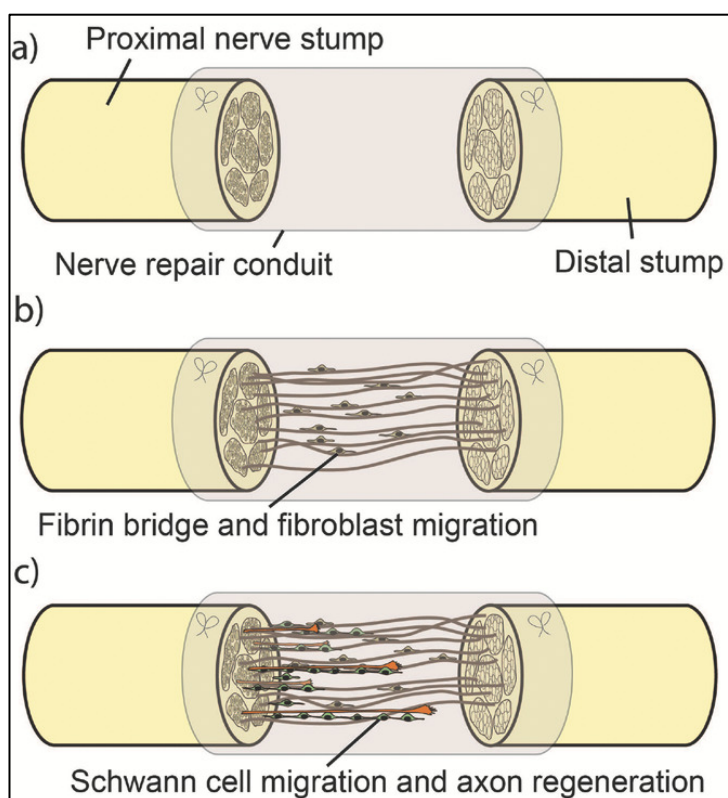
Νευρικοί Αγωγοί

Οι νευρικοί αγωγοί είναι μικροί σωλήνες οι οποίοι μπορούν και αυτοί να γεφυρώσουν το νευρικό έλλειμμα και να οδηγήσουν τους νευράξονες από το κεντρικό στο περιφερικό κολόβωμα μέσα στο κυλινδρικό τους τοίχωμα (**Εικόνα 11**). Αρχικά, αγωγοί βιολογικής προελεύσεως κέντρισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών. Φλεβικά και αρτηριακά τμήμα, οστικά τεμάχια, ή ακόμα και τμήματα λεπτού εντέρου έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή τους. Ένας μεγάλος αριθμός συνθετικών νευρικών αγωγών είναι πλέον διαθέσιμος (**Πίνακας 3**), παρόλο που η χρήση τους είναι περιορισμένη στη σύγχρονη κλινική πράξη. Η βιβλιογραφία υποστηρίζει τη χρήση τους σε ελλείμματα μικρότερα των 3 εκατοστών (Meek & Coert, 2002). Οι νευρικοί αγωγοί πέρα από τη χρήση τους στην κλινική πράξη, είναι σημαντικοί για τη μελέτη των νεύρων, ιδιαίτερα στην ιστική μηχανική (Vijayavenkataraman, Shuo, Fuh, & Lu, 2017). Έχουν μελετηθεί αρκετοί θεραπευτικοί παράγοντες σε πειραματικά μοντέλα νευρικής αναγέννησης σε συνδυασμό με νευρικούς αγωγούς (**Πίνακας 4**). Οι βασικές ιδιότητες που λαμβάνονται υπόψη κατά την κατασκευή τους συμπεριλαμβάνουν τη βιοσυμβατότητα και τη βιοαπορροφησιμότητά τους (Kang, Lee, & Gwak, 2022; Vijayavenkataraman, Lu, & Fuh, 2016; S. Zhang, Vijayavenkataraman, Chong, Fuh, & Lu, 2019; S. Zhang, Vijayavenkataraman, Lu, & Fuh, 2019).

Πίνακας 3: Διαθέσιμοι νευρικοί αγωγοί στην κλινική πράξη (G. N. Panagopoulos et al., 2017)

| Εμπορική Ονομασία | Υλικό Κατασκευής | Δομή | Κατασκευαστής | FDA | Μήκος | Κλινική Εφαρμογή |
|--------------------------|-------------------------|--|--------------------------|-----------------------|--------------|--|
| NeuraGen® | Collagen Type I | Semipermeable, fibrillar collagen structure | Integra Life Sciences Co | June 22, 2001 | 2–3 cm | Digital nerves Lingual and inferior alveolar nerves Brachial plexus birth palsy Median, ulnar, radial, PIN, common digital, SRN |
| NeuroFlex™ | Collagen Type I | Flexible, semipermeable tubular collagen matrix | Collagen Matrix, Inc. | September 21, 2001 | 2.5 cm | |
| NeuroMatrix™ | Collagen Type I | Semipermeable tubular collagen matrix | Collagen Matrix Inc. | September 21, 2001 | 2.5 cm | |
| NeuraWrap™ | Collagen Type I | Longitudinal slit in a tubular wall structure | Integra Life Sciences Co | July 16, 2004 | 2–4 cm | |
| NeuroMend™ | Collagen Type I | Semipermeable collagen wrap that unrolls & self-curles | Collagen Matrix Inc. | July 14, 2006 | 2.5–5 cm | |
| Neurotube® | PGA | Absorbable woven PGA mesh tube | Synovis Micro Companies | March 22, 1999/1995 | 2–4 cm | Spinal accessory nerve, median, ulnar nerves, facial nerves, digital nerves |
| Neurolac™ | PLCL | PLCL tubular structure | Polyganics, BV | October 10, 2003/2005 | 3 cm | Digital nerves |
| Salutunnel™ | PVA | PVA tubular structure | Salumedica LCC | August 5, 2010 | 6.35 cm | |

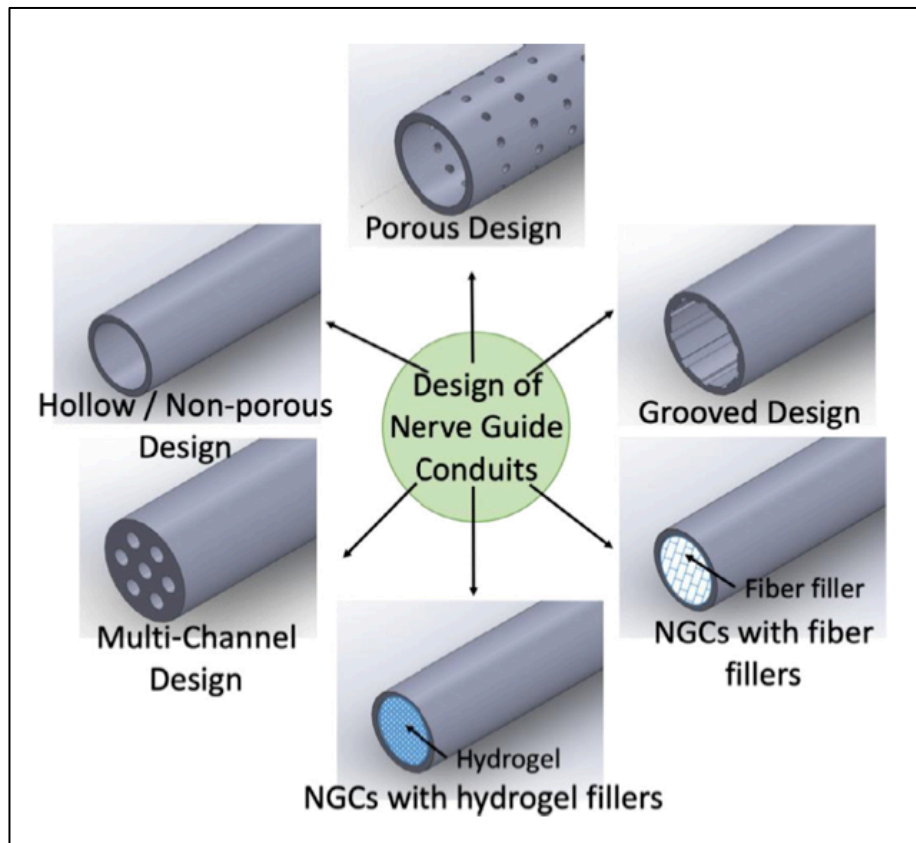
FDA: Food & Drug Administration; PGA: polyglycolic acid; PVA: polyvinyl alcohol; PLCL: poly (ε-caprolactone-co-lactide); PIN: posterior interosseous nerve; SRN: superficial radial nerve.



Εικόνα 11. Σχηματική αναγέννηση ελλείμματος 10 χιλιοστών με τη βοήθεια νευρικού αγωγού. **a)** Ο αγωγός αρχικά γεμίζει με εξωκυττάριο υγρό, **b)** ακολουθεί η ινώδης γεφύρωση των δυο κολοβωμάτων ακολουθεί η εναπόθεση ινοβλαστών, **c)** ενώ τα κύτταρα Schwann σχηματίζουν ταινίες Büngner που λειτουργούν ως οδηγοί για την πορεία των νευραξόνων (Oprych, Whitby, Mikhalovsky, Tomlins, & Adu, 2016).

Τα πιο συχνά υλικά κατασκευής τους αφορούν τα φυσικά ή τα συνθετικά πολυμερή. Τα φυσικά πολυμερή είναι βασισμένα είτε σε πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το ινωδογόνο, είτε σε πολυσακχαρίτες όπως η κυτταρίνη, η χιτίνη και η χιτοζάνη (Mogosanu & Grumezescu, 2014). Τα φυσικά πολυμερή παρέχουν ένα βιομιμητικό, φιλικό προς τα κύτταρα περιβάλλον αλλά έχουν μειωμένες μηχανικές ιδιότητες. Τα συνθετικά πολυμερή είναι κατασκευασμένα υλικά όπως η πολυ-ε-καπρολακτόνη (PCL), το πολυλακτικό οξύ (PLA), το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και το πολυ-λακτικο-κο-γλυκολικό οξύ (PLGA). Τα συνθετικά πολυμερή έχουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες αλλά δεν είναι τόσο φιλικά προς τα κύτταρα.

Ο συνδυασμός των συνθετικών και φυσικών πολυμερών έχει επίσης περιγραφεί, στην προσπάθεια δημιουργίας βιοϋλικών που παρέχουν ταυτόχρονα βιομιμητικό περιβάλλον και κατάλληλη μηχανική στήριξη (Sionkowska, 2011).



Εικόνα 12. Οι βασικότεροι τύποι νευρικών αγωγών αφορούν αγωγούς με αυλό δίχως πόρους, με πόρους στο τοίχωμα, με εσωτερικές αυλακώσεις πολλών καναλιών, με ίνες μέσα στον αυλό, ή με υδρογέλη στον αυλό (Vijayavenkataraman, 2020)

Έχουν περιγραφεί αρκετοί τύποι νευρικών αγωγών, ωστόσο οι σημαντικότεροι αφορούν αγωγούς με αυλό δίχως πόρους, με πόρους στο τοίχωμα, με εσωτερικές αυλακώσεις πολλών καναλιών, με ίνες μέσα στον αυλό, ή με υδρογέλη στον αυλό (**Εικόνα 12**). Οι νευρικοί αγωγοί δίχως πόρους αποτελούν τον πιο απλό τύπο και μπορούν να εύκολα να κατασκευαστούν από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή. Το μειονέκτημα τους είναι ότι έχουν μειωμένη διαπερατότητα με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολα προσβάσιμη η περιοχή της νευρικής αναγέννησης από τους νευροτροφικούς και αυξητικούς παράγοντες (G. Lundborg,

Gelberman, Longo, Powell, & Varon, 1982). Ειδικές μέθοδοι (electrospinning) χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν νευρικοί αγωγοί με μικροπόρους (ή νανοπόρους) έτσι ώστε να ξεπεραστεί αυτό το ζήτημα (Y. T. Kim, Haftel, Kumar, & Bellamkonda, 2008). Οι αγωγοί που έχουν αυλακώσεις στο εσωτερικό του τοιχώματός τους έχουν σκοπό την καλύτερη καθοδήγηση των νευραξόνων. Δεν έχει διαπιστωθεί ωστόσο βελτίωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση τους, ενώ η σύνθετη γεωμετρία τους δυσκολεύει την κατασκευή τους καθιστώντας τους λιγότερο δημοφιλείς (Ni, Tseng, Chen, Hsu, & Chiu, 2013; Rutkowski, Miller, Jeftinija, & Mallapragada, 2004). Οι νευρικοί αγωγοί πολλών καναλιών έχουν επίσης σκοπό την καλύτερη καθοδήγηση των νευραξόνων μέσα στα κανάλια του αυλού του αγωγού (Moore et al., 2006). Ωστόσο επειδή είναι αρκετά δύσκολη και εργώδης η κατασκευή των καναλιών κάποιοι συγγραφείς άρχισαν να χρησιμοποιούν ίνες ή υδρογέλη μέσα στον αυλό των νευροαγωγών προσπαθώντας να βοηθήσουν την αναγέννηση υποστηρίζοντας τους νευράξονες να περάσουν επιτυχώς στο περιφερικό κολόβωμα (Clements et al., 2009; Quigley et al., 2013; Yucel, Kose, & Hasirci, 2010).

Πίνακας 4: Θεραπευτικοί παράγοντες σε νευρικούς αγωγούς για την ενίσχυση της νευρικής αναγέννησης (G. N. Panagopoulos et al., 2017)

| Κατηγορία | Παράγοντας | Νευρικός Αγωγός | Πειραματικό Μοντέλο | Νευρικό Έλλειμμα (χιλιοστά) |
|-----------------------|------------------------------|--|--|-----------------------------|
| Κυτταρικές Θεραπείες | SC (syngeneic) | PLGA | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 20 |
| | SC | AVNC | Κνημιαίο Νεύρο Κονίκλου | 40 |
| | SC (autologous) | Silicone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| | SC (allogeneic) | PLLA | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 12 |
| | SC (lacZ transduced) | PHB | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| | SC (syngeneic) | Collagen | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 20 |
| | EMSCs | Autologous muscle | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 20 |
| | Fibroblast-like MSCs NSCs | Silicone Chitosan-coated PDMS | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 15 10 |
| Δομικοί Παράγοντες | Fibrin gel | Bioabsorbable polymer | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| | Laminin | PGA | Περωνιαίο Νεύρο Σκύλου | 80 |
| | Laminin | Polysulfone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| | Collagen | Silicone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 5 |
| | Fibronectin | PHB | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| | Spider silk fibers | Vein | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 20 |
| | Bioglass 45S5 | Silastic | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 5 |
| | Νευροτροφικοί Παράγοντες | NGF | Silicone or PPE | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου |
| NT-3 | | PHEMA-MMA hydrogel | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| GDNF | | Silicone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 13 |
| aFGF | | PHEMA-MMA hydrogel | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| bFGF | | Heparin/alginate hydrogel | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| CNTF | | Silicone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| VEGF | | Silicone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |
| IGF-1 | | Autologous nerve grafts or acellular ECM | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 20 |
| PDGF | | Silicone | | 8 |
| Συνδυασμός Παραγόντων | | Laminin & NGF | Polysulfone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου |
| | Laminin & NGF | Polysulfone | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 20 |
| | Fibrin, SC & dMSCs | PHB | Ισχιακό Νεύρο Αρουραίου | 10 |

SC: Schwann cells; PLGA: poly (lactic-co-glycolic acid); AVNC: autogenous venous nerve conduit; PLLA: poly (L-lactic acid); PHB: poly-3-hydroxybutyrate; EMSCs: ectomesenchymal stem cells; MSCs: mesenchymal stem cells; NSCs: neural stem cells; PDMS: polydimethylsiloxane; PGA: polyglycolic acid; NGF: nerve growth factor; NT-3: neurotrophin-3; GDNF: glial cell-line derived neurotrophic factor; aFGF: fibroblast growth factor acidic; bFGF: fibroblast growth factor basic; CNTF: ciliary neurotrophic factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IGF-1: insulin-like growth factor 1; PDGF: platelet-derived growth factor; PPE: poly (phosphoester); PHEMA-MMA: poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate); dMSCs: differentiated mesenchymal stem cells.

Χρήση Βλαστοκυττάρων στη Νευρική Αναγέννηση

Μηχανισμός Δράσης

Δεδομένων των προβλημάτων που παρουσιάζουν οι χειρουργικές τεχνικές ανακατασκευής, και των μη ικανοποιητικών κλινικών αποτελεσμάτων σε αρκετές περιπτώσεις, αναζητούνται εναλλακτικές θεραπείες. Η χρήση των αυτομοσχευμάτων δε μπορεί πάντα να καλύψει τις ανάγκες ανακατασκευής λόγω περιορισμένου αριθμού «αναλώσιμων νεύρων». Τα ακυτταρικά αλλομοσχεύματα εφαρμόζονται σε μικρές βλάβες, και οι νευροαγωγοί παρά την αξιοσημείωτη εξέλιξή τους εξακολουθούν να είναι αποτελεσματικοί σε μικρού μήκους ελλείμματα. Οι ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους σε κυτταρικές θεραπείες και αυξητικούς παράγοντες, έχοντας ως σκοπό να ξεπεράσουν τα μειονεκτήματα των χειρουργικών τεχνικών και να βοηθήσουν τα κλινικά αποτελέσματα. Μεταξύ άλλων νευροτροφικών θεραπειών τα βλαστοκύτταρα έχουν κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον της βιβλιογραφίας (Fairbairn, MeppeLink, Ng-Glazier, Randolph, & Winograd, 2015). Ο όρος βλαστοκύτταρα αναφέρεται σε κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να αυτοανανεώνονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν με το κατάλληλο ερέθισμα σε άλλα πιο εξειδικευμένα κυτταρικά είδη. Ωστόσο, οι κυτταρικές θεραπείες, για να μπορούν να έχουν κλινική εφαρμογή πρέπει να αφορούν εύκολα προσβάσιμα κύτταρα, που πολλαπλασιάζονται γρήγορα σε καλλιέργειες και είναι ανθεκτικά στη διαχείρισή τους στο εργαστήριο (Azizi, Stokes, Augelli, DiGirolamo, & Prockop, 1998). Έμφαση δίνεται στον τύπο των κυττάρων, στη διαφοροποίησή τους, στα κυτταρικά ικρίωματα που χρησιμοποιούνται και στη μέθοδο χορήγησής τους (Widgerow et al., 2014).

Ο στόχος των θεραπειών με βλαστοκύτταρα είναι η δημιουργία ενός ευεργετικού για τη νευρική αναγέννηση μικροπεριβάλλοντος, που να διατηρεί την υποστήριξή του για όσο το δυνατό περισσότερο χρονικό διάστημα. Τα βλαστοκύτταρα μπορούν θεωρητικά να αντικαταστήσουν τους χαμένους νευρώνες ή να αυξήσουν τον αριθμό των γλοιακών κυττάρων

υποστήριξης. Η αντικατάσταση των χαμένων νευρώνων έχει αποδειχθεί *in vitro* δημιουργώντας μεγάλες δυνατότητες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αν και δεν έχει αποδειχθεί η σημασία τους στα νωτιαία γάγγλια, τα βλαστοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αναπληρώνουν τους τραυματισμένους νευρώνες καθώς και να ρυθμίζουν το κυτταρικό περιβάλλον των νευρώνων κατά την αναγέννηση. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων Schwann και την υποστήριξη της λειτουργίας τους. Η προσέγγιση αυτή έχει αρκετές δυσκολίες που σχετίζονται με τη φύση των κυττάρων αυτών. Για τις θεραπείες με αυτόλογα κύτταρα Schwann, δεν απαιτείται μόνο θυσία υγιούς νευρικού ιστού αλλά και εκτεταμένη περίοδος καλλιέργειας και διαχείρισης των κυττάρων με αποτέλεσμα την καθυστερημένη χορήγησή τους στον ασθενή. Όμως, η παρατεταμένη απονεύρωση μπορεί να προκαλέσει απόπτωση των κεντρικών κυτταρικών σωμάτων και απώλεια αξονικής υποστήριξης από τα κύτταρα Schwann στο περιφερικό τμήμα του νεύρου. Για το λόγο αυτό, η χρήση καλλιεργημένων στο εργαστήριο κυττάρων Schwann θεωρείται μη πρακτική (S. Y. Fu & Gordon, 1995a, 1995b).

Από την άλλη μεριά, τα εξωγενή βλαστοκύτταρα που διαφοροποιούνται σε φαινότυπο που μοιάζει με εκείνον των κυττάρων Schwann έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στις ταινίες του Büngner και να βοηθούν την αξονική καθοδήγηση και την επαναμυελίνωση. Τα μεταμοσχευμένα κύτταρα ενισχύουν την έκκριση αυξητικού παράγοντα και την παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix). Οι παράγοντες αυτοί είτε απελευθερώνονται άμεσα ή μέσω της παρακρινής σηματοδότησης μετά την επαφή των κυττάρων. Μπορούν να διεγείρουν τα ενδογενή κύτταρα Schwann να αυξήσουν την εκκριτική τους δραστηριότητα, ενώ η αυξημένη επιστράτευση ελεύθερων μακροφάγων στην περιοχή ενισχύσει αυτό το φαινόμενο (Marconi et al., 2012; Ribeiro-Resende et al., 2009). Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (όπως το κολλαγόνο τύπου I, το κολλαγόνο τύπου IV, η φιμπρονεκτίνη και η λαμινίνη) και οι πρωτεΐνες καθοδήγησης των νευριτών (όπως η νετρίνη και η νιντζουρίνη-2) έχουν προαναγεννητική δράση (Lopatina et al., 2011; Salgado, Reis, Sousa, & Gimble, 2010). Άλλα

συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, όπως η πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης, είναι ισχυροί αναστολείς της νευρικής αναγέννησης και η αποικοδόμηση τους από την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνάσης-2 φαίνεται να βοηθούν επίσης την αναγέννηση (Crigler, Robey, Asawachaicharn, Gaupp, & Phinney, 2006; Heine, Conant, Griffin, & Hoke, 2004).

Στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται ότι τα ενδογενή κύτταρα Schwann και τα μεταμοσχευμένα βλαστοκύτταρα παράγουν νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF), νευροτροφικό παράγοντα του εγκεφάλου (BDNF), νευροτροφικό παράγοντα νευρογλοιακής κυτταρικής σειράς (GDNF) και νευροτροφίνης-3 (NT-3) (Kingham, Kolar, Novikova, Novikov, & Wiberg, 2014; G. Liu et al., 2011; Lopatina et al., 2011; Lu, Jones, Snyder, & Tuszynski, 2003; Marconi et al., 2012; Salgado et al., 2010). Αγγειογόνοι παραγόντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF), ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων και η αγγειοποιητίνη-1 μπορεί επίσης να απελευθερωθούν (Kingham et al., 2014). Η έλλειψη οξυγόνου φαίνεται ότι ενισχύει τις αγγειογενετικές και νευροτροφικές ιδιότητες μερικών βλαστοκυττάρων, βελτιώνοντας το σχηματισμό το αιμοφόρων αγγείων και των νευρικών ινών (Lopatina et al., 2011). Αυτό οδήγησε ορισμένους ερευνητές να επιχειρήσουν προετοιμασία και διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων σε υποξικά περιβάλλοντα (Lopatina et al., 2011). Η έκφραση του ανασταλτικού παράγοντα της λευχαιμίας και του αυξητικού παράγοντα ομοιάζοντα στην ινσουλίνη έχει επίσης καταγραφεί (Salgado et al., 2010). Αυτοί οι παράγοντες πιστεύεται ότι βελτιώνουν την επιβίωση των νευρώνων, προάγουν την ανάπτυξη της φλοιονωτιαίας οδού, αυξάνουν την αστρογλοϊώση και ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση (Hawryluk et al., 2012; Salgado et al., 2010). Οι ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των βλαστοκυττάρων που παρατηρούνται πιστεύεται ότι οφείλονται στην έκκριση παραγόντων, όπως ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και αποικιών μακροφάγων (G-CSF, M-CSF), ιντερλευκίνη-6, 7, 8 και 11 (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11) και TNF- α (Salgado et al., 2010). Παρατηρείται καταστολή της ανοσοποιητικής απάντησης, μειώνοντας τη φλεγμονή και την ίνωση μετά τη χειρουργική αποκατάσταση των νεύρων που είναι ιδιαίτερα ευεργετική στα

πλαίσια της αλλομεταμόσχευσης κυττάρων. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η επίδραση των παραπάνω μηχανισμών και τα επίπεδα πρωτεΐνης εξωκυττάριας μήτρας και αυξητικού παράγοντα ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο βλαστοκυττάρων αλλά και τη διαφοροποίησή τους.

Τύποι Βλαστοκυττάρων

Η απομόνωση πολυδύναμων κυτταρικών σειρών στον άνθρωπο έχει περιγραφεί από το 1998 (Thomson et al., 1998). Έκτοτε έχουν συλλεχθεί βλαστοκύτταρα από μια μεγάλη ποικιλία ιστών (Εικόνα 13). Μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το στάδιο της εξέλιξής τους σε εμβρυϊκά και ενήλικα βλαστοκύτταρα (Tohill & Terenghi, 2004) και έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών ως κυτταρικές θεραπείες ενίσχυσης της νευρικής αναγέννηση (Yi et al., 2020) (Πίνακας 5).

Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα μπορούν να προσφέρουν παράγωγα και των τριών εμβρυϊκών βλαστικών στοιβάδων. Αποτελούν μια απεριόριστη πηγή κυττάρων και έχουν ανώτερη δυνατότητα διαφοροποίησης και την ικανότητα μακρόχρονου πολλαπλασιασμού, σε σύγκριση με τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (Barberi, Willis, Soccì, & Studer, 2005). Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα φαίνεται να μεταναστεύουν και να διαφοροποιούνται σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Έχουν σημαντική ικανότητα μυελίνωση *in vivo* (X. Jiang et al., 2009; G. Lee et al., 2007; S. Liu et al., 2000; Rando, 2006; Ziegler, Grigoryan, Yang, Thakor, & Goldstein, 2011). Σε αντίθεση με τα βλαστοκύτταρα ενηλίκων, αυτά τα κύτταρα είναι ομοιογενή, δεν είναι ευαίσθητα στις επιπτώσεις ή νόσους που μπορεί να επιφέρει η ηλικία (Rando, 2006). Ωστόσο, η διαφοροποίηση σε εξειδικευμένες νευρικές κυτταρικές σειρές είναι δύσκολη, δεδομένου ότι τα διαθέσιμα πρωτόκολλα αφορούν περιορισμένο αριθμό σειρών (Reubinoff et al., 2001; H. Zhang et al., 2008). Τα μεγαλύτερα μειονεκτήματά τους όμως αφορούν την ανοσολογική αντίδραση που προκαλούν, την υψηλή πιθανότητα καρκινογένεσης και τους ισχυρούς ηθικούς περιορισμούς.

Πίνακας 5: Τύποι βλαστοκυττάρων ως κυτταρικές θεραπείες σε πειραματικά μοντέλα νευρικής αναγέννησης (G. N. Panagopoulos et al., 2017).

| Πηγή Κυττάρων | Πειραματικό Μοντέλο | Ικρίωμα | Χορήγηση | Διαφοροποίηση | Αποτελέσματα |
|---------------------|---------------------|--------------------------|--|---------------|---|
| Embryonic | Rat sciatic | Culture medium | Epineurium natural conduit | Ναι | Diff. into SC after 3 months |
| | Mouse sciatic | Matrigel | Direct microsphere injection | Όχι | Better SFI, CMAPs & histology |
| | Rat sciatic | PBS | Direct injection into gastrocnemius muscle | Ναι | New NMJs observed in treated muscle; benefit lost after 21 days |
| Fetal | Rat sciatic | Fibrin glue | Direct injection in situ | Όχι | Myelination & motor recovery better if used w/ G-CSF |
| | Rat sciatic | Matrigel | Direct injection in situ | Όχι | Better results when GDNF modified |
| | Rat sciatic | Culture medium | Seeded onto PLC wrap | Ναι | Increased myelin thickness & better functional recovery |
| Neural | Rabbit facial | Collagen sponge | Chitosan conduit | Όχι | NSC+NGF group superior to NGF alone; comparable to autograft |
| | Pig nervis cruralis | Neurosphere | Autologous vein | Όχι | NSC group had superior EMG results |
| Skin | Rat sciatic | Culture medium | Direct injection | Όχι | 12/45 rodents developed neuroblastomas |
| | Mouse sciatic | Culture medium | Injection in situ | Και τα δύο | SKPs induced into SKP-SCs |
| | Rat sciatic | PBS | Collagen conduit | Ναι | SFI and CMAPs better in conduits filled with SDSCs |
| Hair follicle | Mouse sciatic | Culture medium | Injection in situ | Όχι | HFSCs differentiated into SC-like cells; gastrocnemius contraction improved |
| Dental pulp | Rat DRGs in vitro | Culture medium | Collagen gel | Ναι | hDPSCs differentiated to SC-like cells; able to support DRG neurite outgrowth |
| Bone marrow | Rat facial | Matrigel | Silicone conduit | Και τα δύο | Better histological & functional outcomes than controls |
| | Rat sciatic | Fibrin glue | ANA | Όχι | Survival of BMSCs within fibrin glue |
| Adipose | Rat sciatic | Culture medium | Fibrin glue | Ναι | Greater axon & fiber diameter; comparable to autograft |
| | Rat facial | Matrigel | Decellularized allogeneic artery | Ναι | Results inferior to autograft |
| Induced pluripotent | Mouse sciatic | Microsphere into conduit | PLA/PCL conduit | Ναι | Results inferior to autograft |

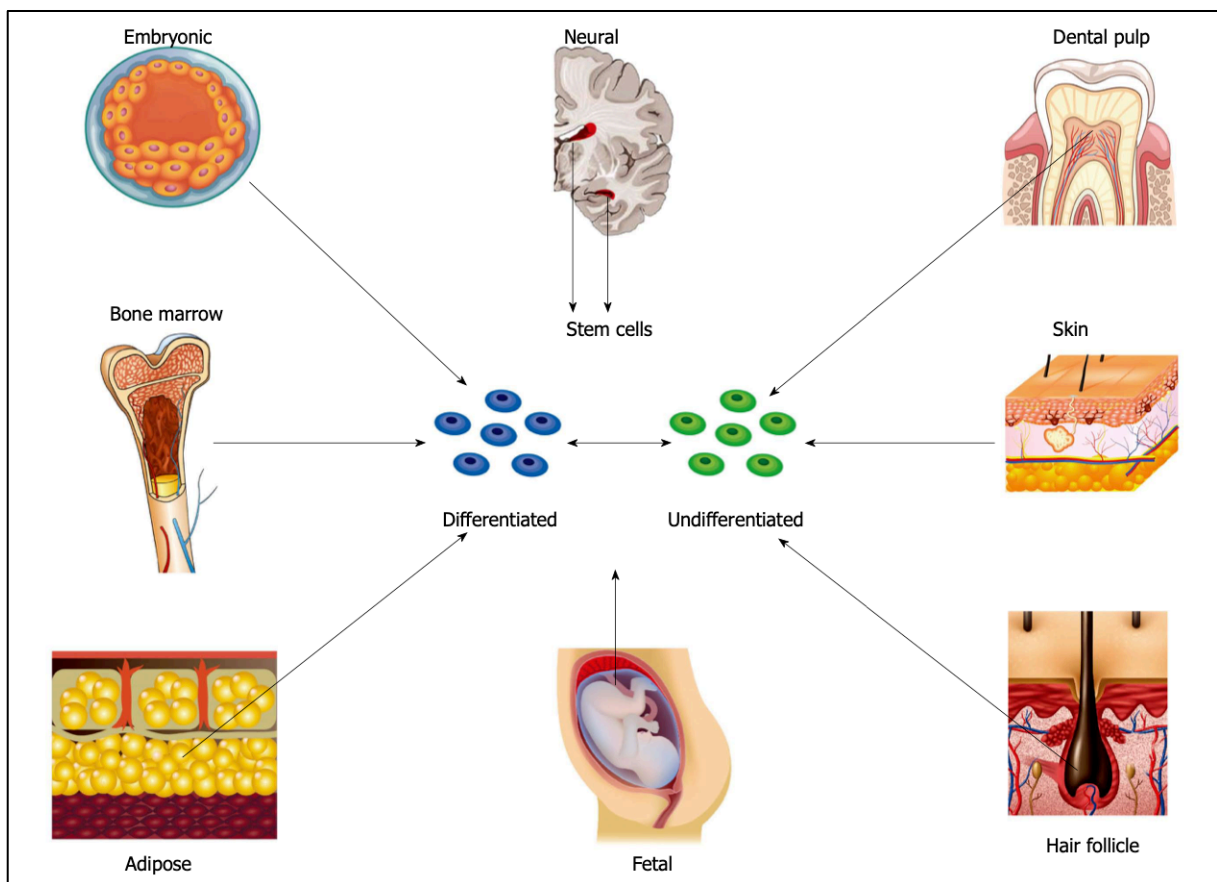
ANA: Acellular nerve allograft; BMSC: Bone marrow derived mesenchymal stem cell; CMAP: Compound muscle action potential; DRG: dorsal root ganglia; EMG: Electromyography; G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor; GDNF: Glial cell derived neurotrophic factor; hDPSC: Human dental pulp stem cell; HFSC: Human fetal derived stem cell; NGF: Nerve growth factor; NMJ: Neuromuscular junction; NSC: Nerve stem cell; PBS: Phosphate buffered saline; PCL: Poly-ε-caprolactone; PLA: Poly-L-lactide; SC: Schwann cells, SDSC: Skin derived stem cell; SFI: Sciatic functional index; SKP: Skin derived precursor.

Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι συλλέγονται κατά το στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης που συχνά προκαλέσει ανεπανόρθωτη βλάβη στο έμβρυο. Οι μελέτες που αναφέρουν την επιτυχή εφαρμογή αυτών των κυττάρων στην περιφερική νευρική αναγέννηση είναι περιορισμένες αντανακλώντας τη δυσκολία κλινικής εφαρμογής τους (Cui et al., 2008).

Τα νευρικά βλαστοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα. Ωστόσο, η νευρογένεση λαμβάνει χώρα σχεδόν αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Σε πολύ περιορισμένες περιπτώσεις συνεχίζεται στους ενήλικες, μόνο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ως απόκριση σε κάποιο τραυματισμό (Paspala, Murthy, Mahaboob, & Habeeb, 2011). Τα νευρικά βλαστοκύτταρα απομονώθηκαν για πρώτη φορά στον εγκέφαλο ενήλικου ποντικού στις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Reynolds, Tetzlaff, & Weiss, 1992; Snyder et al., 1992). Ακολούθησαν μελέτες σε άλλα πειραματόζωα και στον άνθρωπο (Gould et al., 1999; Zhou, Su, Ming, & Song, 2023). Αρκετοί συγγραφείς έχουν αναφέρει θετικά αποτελέσματα μετά την εμφύτευση νευρικών βλαστοκυττάρων στην αναγέννηση των περιφερικών νεύρων (K. Y. Fu, Dai, Chiu, Chen, & Hsu, 2011; Guo & Dong, 2009; Liard et al., 2012; Murakami et al., 2003; H. Zhang et al., 2008). Κάποιοι μάλιστα έδειξαν πως τα αποτελέσματα αυτά δεν περιορίζονται μόνο σε περιπτώσεις οξείας βλάβης (Heine et al., 2004). Σε μια μελέτη, η μεταμόσχευσή αυτού του είδους βλαστοκυττάρων σε νεύρα με χρόνια απονεύρωση είχε σημαντική επίδραση στη μορφολογική και ηλεκτροφυσιολογική αποκατάστασή τους σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα νευρικά βλαστοκύτταρα C17.2 έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα. Ωστόσο, δεν φέρουν πάντα θετικό πρόσημο. Εμφύτευση τέτοιων κυττάρων σε μοντέλα σύνθλιψης, διατομής και μοσχεύματος σε επίμυες, έχουν κατηγορηθεί για ανάπτυξη νευροβλαστώματος (Johnson et al., 2008). Εκτός από αυτή την ανησυχία, οι σημαντικές δυσκολίες που σχετίζονται με τη συλλογή των νευρικών κυττάρων έχουν περιορίσει τη χρήση τους.

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs) είναι πολυδύναμα στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών αλλά και από μια πληθώρα

άλλων πηγών όπως ο εμβρυϊκός ιστός, το δέρμα, τα τριχοθυλάκια, ο οδοντικός πολφός και ο λιπώδης ιστός. Αν και η ισχύς αυτών των κυττάρων θεωρήθηκε αρχικά ότι περιοριζόταν σε ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης, η διαφοροποίησή τους σε μη μεσοδερμικές σειρές είναι πλέον αποδεδειγμένη. Αυτό το χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών τους δίνει την ικανότητα να υποστηρίζουν τη νευρική αναγέννηση. Οι κύριοι υπότυποι των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων περιγράφονται παρακάτω.



Εικόνα 13. Διαφορετικοί τύποι βλαστοκυττάρων. Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα λαμβάνονται από τη μάζα της βλαστοκύστης. Τα νευρικά βλαστοκύτταρα συλλέγονται από την πλάγια κοιλία και τον ιπόκαμπο. Τα κύτταρα από μυελό των οστών συλλέγονται από μακρά οστά. Τα κύτταρα που προέρχονται από λίπος αναζητούνται συνήθως στο υποδόριο. Στο δέρμα συλλέγονται από το χόριο. Ο εμβρυϊκός ιστός παρέχει κύτταρα από αμνιακή μεμβράνη, αμνιακό υγρό, ιστό ομφάλιου λώρου και γέλη του Wharton. Βλαστοκύτταρα οδοντικού πολφού μπορούν να ανευρεθούν στα νεογιλά δόντια (Fairbairn et al., 2015).

Σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά και τα νευρικά βλαστοκύτταρα, εκείνα που προέρχονται από μυελό των οστών (bone marrow stromal stem cells, BMSCs) είναι πιο εύκολα προσβάσιμα και δεν σχετίζονται με ηθικούς περιορισμούς (**Εικόνα 13**). Υπό κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μη μεσοδερματικές σειρές όπως νευρώνες, αστροκύτταρα και κύτταρα που ομοιάζουν με τη Schwann σειρά (Tohill & Terenghi, 2004). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η προσθήκη τους σε νευροαγωγούς ή ακυτταρικά αλλομοσχέματα επιτυγχάνει βελτίωση στα κλινικά αποτελέσματα (Nijhuis, Brzezicki, Klimczak, & Siemionow, 2010; Wakao et al., 2010; Wang et al., 2008). Μερικές μελέτες δείχνουν ότι τα κύτταρα από μυελό των οστών έχουν περιορισμένη δράση, σε σύγκριση με εκείνη των νευρικών βλαστοκυττάρων. Ωστόσο, οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι εξασφαλίζουν τουλάχιστον ισοδύναμο αποτέλεσμα. Μερικές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αποτελέσματα ίσως είναι δόσοεξαρτώμενα (Raheja et al., 2012). Αν και τα βλαστοκύτταρα από μυελό των οστών προσφέρουν καλύτερη κλινική εφαρμογή σε σχέση με τα εμβρυϊκά και νευρικά βλαστοκύτταρα, το κλάσμα κυττάρων που αναμένεται να συλλεχθεί από το μυελό είναι χαμηλό σε σύγκριση με τους άλλους ιστούς. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών είναι επίσης περιορισμένη. Οι ανησυχίες αυτές σε συνδυασμό με την αρκετά επεμβατική τεχνική που απαιτείται για την πρόσβαση στο μυελό των οστών, οδήγησαν στην αναζήτηση ευκολότερα προσπελάσιμων πηγών.

Μία εναλλακτική πηγή MSCs αποτελούν και οι όψιμοι εμβρυϊκοί ιστοί, όπως το αμνιακό υγρό και η αμνιακή μεμβράνη, ο ομφάλιος λώρος και η γέλη του Wharton. Οι ιστοί αυτοί έχουν υποστεί ελάχιστη γενετική βλάβη από γήρανση, το εξωτερικό περιβάλλον ή ασθένειες (Fairbairn, Randolph, & Redmond, 2014). Τα κύτταρα που προκύπτουν δύνανται μετά από πολλαπλασιασμό σε κατάλληλη καλλιέργεια να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα με νευρικό φαινότυπο (Y. S. Fu et al., 2006). Η ηλικία τους σπάνια ξεπερνά τις 42 εβδομάδες. Καθότι ο ιστός αυτός απορρίπτεται μετά τη γέννα, η διαθεσιμότητά είναι δυνητικά άμεση και σε μεγάλη ποσότητα. Τα MSCs από γέλη Wharton δύνανται να διαφοροποιηθούν σε

λειτουργικά κύτταρα που ομοιάζουν τα Schwann. Αυτά είναι ικανά να παράγουν νευροτροφικούς παράγοντες NGF, BDGF, και NT-3 (Peng et al., 2011). Τα βλαστοκύτταρα από αμνιακό ιστό (amniotic tissue derived stem cells, ATDSCs) εκφράζουν χαρακτηριστικά τόσο των μεσεγχυματικών όσο και των νευρικών βλαστοκυττάρων (Tsai et al., 2006), είναι ικανά για νευρική διαφοροποίηση (Tsai, Lee, Chang, & Hwang, 2004) και μελέτες έχουν δείξει ότι ενισχύουν τη νευρική αναγέννηση σε μοντέλα ελλείμματος ισχιακού νεύρου σε επίμυες (Li, Guo, Ahn, Kim, & Kim, 2014; Pan et al., 2007). Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από ομφάλιο λώρο έχουν επίσης παρουσιάσει καλά αποτελέσματα σε μοντέλα νευρικής βλάβης (Matsuse et al., 2010). Ένα πρόβλημα των κυττάρων αυτών είναι η περιορισμένη επιβίωση. Γενετικά τροποποιημένα ATDSCs που παρουσιάζουν υπερπαραγωγή GDNF εμφανίζουν αυξημένη επιβίωση και γρηγορότερη λειτουργική αποκατάσταση της νευρικής βλάβης σε επίμυες (Cheng et al., 2010). Αν και τα κύτταρα αυτά αποτελούν μια καλή εναλλακτική πηγή βλαστοκυττάρων, η χρήση τους δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική δεδομένης της έλλειψης τράπεζας ιστών, αλλά και της δυνητικής ανοσοαντίδρασης.

Τα δερματικά βλαστοκύτταρα (skin-derived precursors, SKPs) βρίσκονται στον υποδόριο ιστό και αποτελούν έναν άμεσα διαθέσιμο πληθυσμό πολυδύναμων βλαστοκυττάρων με μεγάλη ευχέρεια πολλαπλασιασμού σε καλλιέργεια. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πληθώρα ιστών και κυτταρικών τύπων, μεταξύ των οποίων μελανοκύτταρα, χόνδρο, οστό, λείο μυϊκό ιστό, συνδετικό ιστό, ενδοκρινή κύτταρα, νευρώνες και νευρογλοία (Biernaskie, McKenzie, Toma, & Miller, 2006). Μετά από καλλιέργεια υπό την παρουσία neuregulin-1β, τα δερματικά βλαστοκύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν τους ίδιους δείκτες που εκφράζουν τα Schwann κύτταρα (McKenzie, Biernaskie, Toma, Midha, & Miller, 2006). Τόσο διαφοροποιημένα όσο και αδιαφοροποίητα δερματικά βλαστοκύτταρα βρέθηκαν να έχουν θετική επίπτωση στην νευρική αναγέννηση σε μοντέλα νευρικής βλάβης (Khuong et al., 2014; Walsh, Gordon, Addas, Kemp, & Midha, 2010).

Τα βλαστοκύτταρα των τριχοφόρων θυλάκων (hair follicle stem cells, HFSCs) σχετίζονται εμβρυολογικά με τη νευρική ακρολοφία και αποτελούν μία εύκολα προσβάσιμη πηγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (Joannides et al., 2004). Αναπαράγονται εύκολα σε καλλιέργεια, αν και δεν διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πλειάδα κυτταρικών τύπων, όπως λιποκύτταρα, μελανοκύτταρα, λείο μυϊκό ιστό, νευρώνες και νευρογλοία (Yu, Kumar, Kossenkou, Showe, & Xu, 2010). Αδιαφοροποίητα HFSCs σε μοντέλο τρωκτικού με διατομή ή σύνθλιψη ισχιακού και κνημιαίου νεύρου οδήγησαν σε πολύ καλή λειτουργική αποκατάσταση (Amoh et al., 2012). Όταν χρησιμοποιήθηκαν σε ακυτταρικό ξενομόσχευμα είχαν επίσης καλά αποτελέσματα σε μοντέλο ελλείμματος 4 εκ. ισχιακού νεύρου σε επίμυες (H. Lin et al., 2009).

Βλαστοκύτταρα από οδοντικό πολφό (dental pulp stem cells, DPSCs) απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 2000. Διαπιστώθηκε αρχικά ότι τα κύτταρα αυτά δύνανται να διαφοροποιηθούν σε οδοντοβλάστες (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000). Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι μπορούν να συμπεριφερθούν σαν MSCs και υπό κατάλληλες συνθήκες δύνανται να εκφράσουν νευρικούς δείκτες, να παράγουν νευροτροφικούς παράγοντες, να προσφέρουν αξονική καθοδήγηση και να διαφοροποιηθούν σε ενεργούς λειτουργικά νευρώνες (Askari, Yaghoobi, Shamsara, & Esmacili-Mahani, 2015). Μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε Schwann κύτταρα in vitro (Martens et al., 2014). DPSCs από επίμυες παρείχαν επιτυχώς αξονική στήριξη κατόπιν ημιδιατομής νωτιαίου μυελού (Nosrat, Widenfalk, Olson, & Nosrat, 2001). Η συλλογή τους μπορεί να γίνει εύκολα από νεογιλά δόντια, μετά την αποβολή τους, αλλά απαιτεί την επιμελή και μακροχρόνια φύλαξή τους (Sugimura-Wakayama et al., 2015).

Δεδομένων των περιορισμών που παρουσιάζουν οι διάφοροι τύποι βλαστοκυττάρων, πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να εφαρμόσουν την τεχνητή επαγωγή βλαστοκυττάρων από σωματικά κύτταρα. Το 2006, οι Takahashi et al. περιέγραψαν ένα πρωτόκολλο σχηματισμού επαγωγίμων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων (induced pluripotent stem cells, iPSCs) σε

σωματικά κύτταρα ποντικού, μέσω της έκτοπης έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (Takahashi & Yamana, 2006). Ελαιώρημα τέτοιων κυττάρων σε βιοδιασπώμενο νευρικό ικρίωμα σε μοντέλο περιφερικής νευρικής βλάβης οδήγησε σε σημαντική επιτάχυνση της νευρικής αναγέννησης και επαναμυελίνωσης (Uemura et al., 2014). Η χρήση τους ωστόσο γεννά ορισμένα ερωτηματικά, όπως το ενδεχόμενο επιγενετικής μνήμης, χρωμοσωμικές ανωμαλίες και καρκινογένεση (Ben-David & Benvenisty, 2011).

Σήμερα, ίσως η πιο πολλά υποσχόμενη πηγή βλαστοκυττάρων είναι ο λιπώδης ιστός (Qin et al., 2023). Τα βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό συλλέγονται εύκολα με κοινές διαδικασίες όπως η λιποαναρρόφηση. Ο λιπώδης ιστός παρουσιάζει μεγαλύτερο κλάσμα κυττάρων με βελτιωμένη δυνατότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε σύγκριση με εκείνα του μυελού των οστών (Muschler, Nitto, Boehm, & Easley, 2001; Strem et al., 2005). Η ηλικία του δότη και η τοποθεσία συλλογής των κυττάρων αυτών δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τις θεραπευτικές τους ιδιότητες (Sowa, Imura, Numajiri, Nishino, & Fushiki, 2012). Πολλοί νευρικοί δείκτες εκφράζονται από διαφοροποιημένα βλαστοκύτταρα λιπώδους ιστού (Kingham et al., 2007; Lopatina et al., 2011; Xu et al., 2008) (Xu et al., 2008). Η έκφραση της μυελινικής πρωτεΐνης μηδέν, της περιφερικής μυελινικής πρωτεΐνης-22 και της βασικής μυελινικής πρωτεΐνης υποδηλώνουν την ικανότητά τους να προάγουν τη μυελίνωση των νευραξόνων (Mantovani et al., 2010). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα αυτά είναι τουλάχιστον ισοδύναμα με τα αυτόλογα νευρικά κύτταρα (Mohammadi, Azizi, & Amini, 2013; Sun, Zhou, Mi, & Qiu, 2011). Μελέτες που συγκρίνουν άμεσα την απόδοση των βλαστοκυττάρων λιπώδους ιστού και μυελού των οστών δε βρήκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο (Erba et al., 2010; Mohammadi et al., 2012), ωστόσο η χαμηλή νοσηρότητα κατά τη συλλογή, η ευρεία διαθεσιμότητα και τα ανώτερα χαρακτηριστικά των βλαστοκυττάρων του λιπώδους ιστού τα έχουν καθιερώσει ως προτιμώμενη επιλογή κυττάρων στις προκλινικές μελέτες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Οι τραυματισμοί των περιφερικών νεύρων επιφυλάσσουν σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία και την ποιότητα ζωής των ασθενών, ενώ συνοδεύονται από σοβαρές οικονομικές συνέπειες. Είναι γνωστό ότι οι νευρικές ίνες στο περιφερικό νευρικό σύστημα, οι οποίες μεταδίδουν αισθητικές και κινητικές πληροφορίες μεταξύ του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και του υπόλοιπου σώματος, αναγεννώνται πιο εύκολα από τις νευρικές ίνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Ide, 1996). Η χειρουργική αποκατάσταση δεν μπορεί να εξασφαλίσει την πλήρη αποκατάσταση της λειτουργίας των περιφερικών νεύρων. Οι παραδοσιακές χειρουργικές μέθοδοι όπως περιεγράφηκε παραπάνω περιλαμβάνουν την πρωτογενή συρραφή του εγγύς και περιφερικού νευρικού κολοβώματος και τη μεταμόσχευση νευρικών αυτομοσχευμάτων με τη χρήση λειτουργικών αισθητικών νεύρων του ασθενούς (S. K. Lee & Wolfe, 2000). Οι παραδοσιακές αυτές μέθοδοι δυστυχώς δεν είναι ιδανικές. Η πρωτογενής συρραφή μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις που είναι δυνατή η αποκατάσταση των κολοβωμάτων χωρίς τάση, ενώ η χρήση αυτομοσχευμάτων, που αποτελεί την αμέσως επόμενη χειρουργική θεραπεία εκλογής, μπορεί να προκαλέσει νοσηρότητα στη δότρια περιοχή, αισθητικό έλλειμα ή ακόμα και σχηματισμό νευρώματος (Grinsell & Keating, 2014).

Για τους παραπάνω λόγους, νευρικοί αγωγοί από βιολογικά, συνθετικά υλικά ή κανονικούς ιστούς έχουν διερευνηθεί ως εναλλακτικές λύσεις σε περιπτώσεις διατομής περιφερικών νεύρων (Muheremu & Ao, 2015). Επιπλέον, οι νευρικοί αγωγοί σε συνδυασμό με αυξητικούς παράγοντες ή κυτταρικές θεραπείες φαίνεται να εξασφαλίζουν καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα από τους απλούς αγωγούς γεφύρωσης του ελλείμματος (Carriell, Garzón, Campos, Cornelissen, & Alaminos, 2017; Daly, Yao, Zeugolis, Windebank, & Pandit, 2012; Gu, Ding, Yang, & Liu, 2011; Y. C. Lin & Marra, 2012).

Η προσθήκη βλαστοκυττάρων στους νευρικούς αγωγούς αυξάνει την αποτελεσματικότητα των τεχνιτών αυτών μοσχευμάτων, ενισχύοντας τη διαδικασία της

νευρικής αναγέννησης. Αρκετά είδη βλαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, των νευρικών βλαστοκυττάρων, των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών, εκείνων του λιπώδους ιστού ή εκείνων του δέρματος έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό στη σχετική βιβλιογραφία (Yi et al., 2020). Τα αυτόλογα βλαστοκύτταρα (Autologous Stem Cells, ASC) από λιπώδη κύτταρα, αφορούν ένα τύπο πρόδρομων κυττάρων που λαμβάνεται από τον ίδιο τον ασθενή και υποβάλλονται εν συνεχεία σε επεξεργασία (di Summa et al., 2010). Ο λιπώδης ιστός όπως προαναφέρθηκε είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή βλαστοκυττάρων αφού είναι πολύ εύκολα προσβάσιμος, και τα κύτταρα που περιέχει είναι πολυδύναμα χωρίς ανοσογόνες ιδιότητες (Klein et al., 2016; Mizuno, 2009). Τα βλαστοκύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν προς ένα φαινότυπο που μοιάζει με τα κύτταρα Schwann, στα πλαίσια υποβοήθησης της νευρικής αναγέννησης. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η διαφοροποίηση μπορεί να είναι χρονοβόρα, με αμφισβητούμενα αποτελέσματα μερικές φορές όταν απαιτείται επείγουσα νευρική αποκατάσταση (L. Jiang et al., 2008).

Πρόσφατες αναφορές σχετικά με τη χρήση μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, αφού πέρα από την εύκολη πρόσβαση και τα πολυδύναμα χαρακτηριστικά τους δεν απαιτείται η διαφοροποίησή τους στο εργαστήριο. Ο μηχανισμός δράσης των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων στη νευρική αναγέννηση δεν είναι απόλυτα κατανοητός και χρήζει περαιτέρω μελέτης (R. Zhang & Rosen, 2018). Ωστόσο, η διαδικασία λήψης και διαχείρισης των κυττάρων αυτών είναι καλά τεκμηριωμένη τόσο σε πειράματα σε ζώα όσο και σε κλινικές εφαρμογές (Megaloiikonomos et al., 2018; Zhou et al., 2016). Στη μελέτη αυτή αξιολογήσαμε τη δράση των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό και τη συμβολή βιοαπορροφήσιμων νευροαγωγών στην περιφερική νευρική αναγέννηση.

Σκοπός

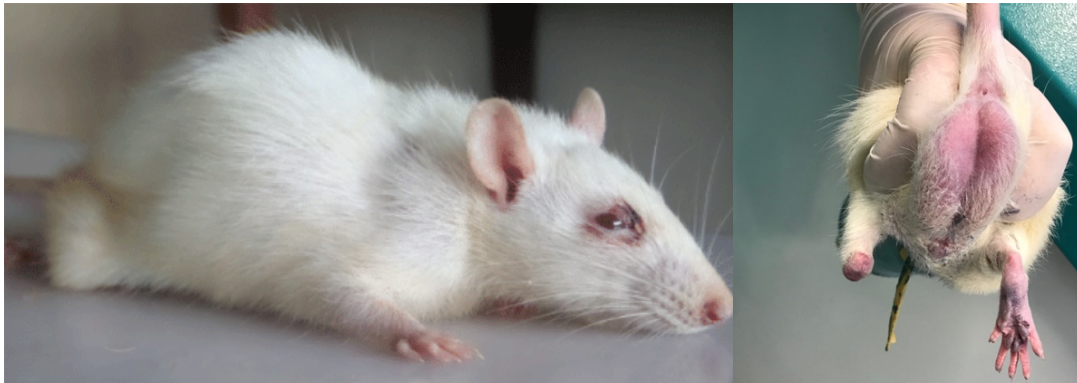
Η παρούσα πειραματική μελέτη είχε ως στόχο τη δημιουργία ενός πειραματικού μοντέλου περιφερικής νευρικής βλάβης σε επίμυες, και την τοπική εφαρμογή βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό (adipose-derived stem cells, ADSCs) μέσα σε νευρικούς αγωγούς κατασκευασμένους από γέλη ινικής. Σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση του ρόλου των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό και των νευροαγωγών στην περιφερική νευρική αναγέννηση.

Υλικό & Μέθοδος

Πειραματόζωα

Ένα ιδανικό μεταφραστικό ζωικό μοντέλο πρέπει να αναπαράγει τις συγκεκριμένες διεργασίες που συναντάμε στον άνθρωπο. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο στη μελέτη της αποκατάστασης περιφερικών νεύρων είναι οι επίμυες, παρόλο που υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση άλλων ειδών. Η πρωτογενής συρραφή είναι η θεραπεία εκλογής για την αποκατάσταση των τραυματισμών των περιφερικών νεύρων, ωστόσο όπως προαναφέρθηκε δεν είναι πάντα εφικτή με αποτέλεσμα οι τεχνικές που κάνουν χρήση μοσχευμάτων και βιοϋλικών να αναπτύσσονται ραγδαία. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα σε αυτόν τον τομέα έτσι ώστε να βρεθούν θεραπείες που να βελτιώνουν τα αποτελέσματα στην κλινική πράξη. Οι θεραπείες αυτές μπορούν να εφαρμοστούν επιτυχώς σε πειραματικό επίπεδο σε μοντέλα επιμύων (Vela et al., 2020). Για τους σκοπούς της μελέτης μας χρησιμοποιήθηκαν επίμυες Wistar. Το συγκεκριμένο είδος (**Εικόνα 14**) αναπτύχθηκε αρχικά στο Ινστιτούτο Wistar το 1906 για ερευνητικούς σκοπούς στη βιολογία και την ιατρική. Είναι το πρώτο πειραματόζωο που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπος οργανισμός την εποχή που οι ερευνητές διέθεταν μόνο οικιακούς μυΐνες (*Mus musculus domesticus*). Περισσότερα από τα μισά από

όλα τα είδη εργαστηρίου προέρχονται από την αρχική αποικία Wistar του Henry Herbert Donaldson, του Milton J. Greenman και της Helen Dean King (Clause, 1993).



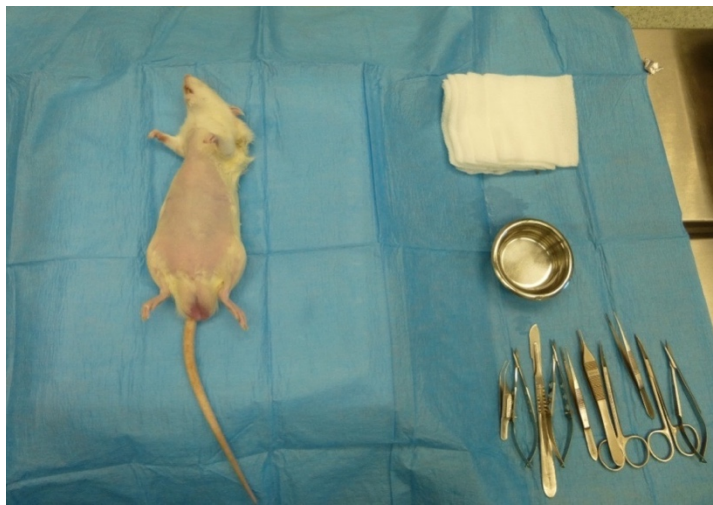
Εικόνα 14. Επίμυς Wistar που παρουσιάζει αυτοτομή στο αριστερό πίσω πόδι.

Οι Wistar είναι σήμερα από τους πιο δημοφιλείς επίμυες που χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή έρευνα. Χαρακτηρίζονται από το μεγάλο κεφάλι, τα μακριά αυτιά και το μήκος της ουράς τους που είναι πάντα μικρότερο από το μήκος του σώματός τους. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε αυτό το μοντέλο επειδή αναπτύσσεται γρήγορα και παρουσιάζει μικρότερη τάση προς αυτοακρωτηριασμό (ή αλλιώς αυτοτομή) των τραυματισμένων μελών (**Εικόνα 14**), σε σχέση με τους επίμυες Sprague-Dawley που επίσης χρησιμοποιούνται στη μελέτη των περιφερικών νεύρων (Panerai, Sacerdote, Brini, Bianchi, & Mantegazza, 1987).

Συλλογή και Επεξεργασία Βλαστοκυττάρων

Τα πειράματα της μελέτης πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Χρήσης Ζώων για Πειραματικούς Επιστημονικούς Σκοπούς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αττικών, επί της οδού Ρίμινι 1 - Χαϊδάρη, με κωδικό καταχώρησης EL 25 BIO 114, κατόπιν της θετικής γνωμοδότησης της Επιτροπής Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Αττικής (Αριθμ. Πρωτ.: 4961). Κατά την αρχική φάση του πειράματος, έγινε

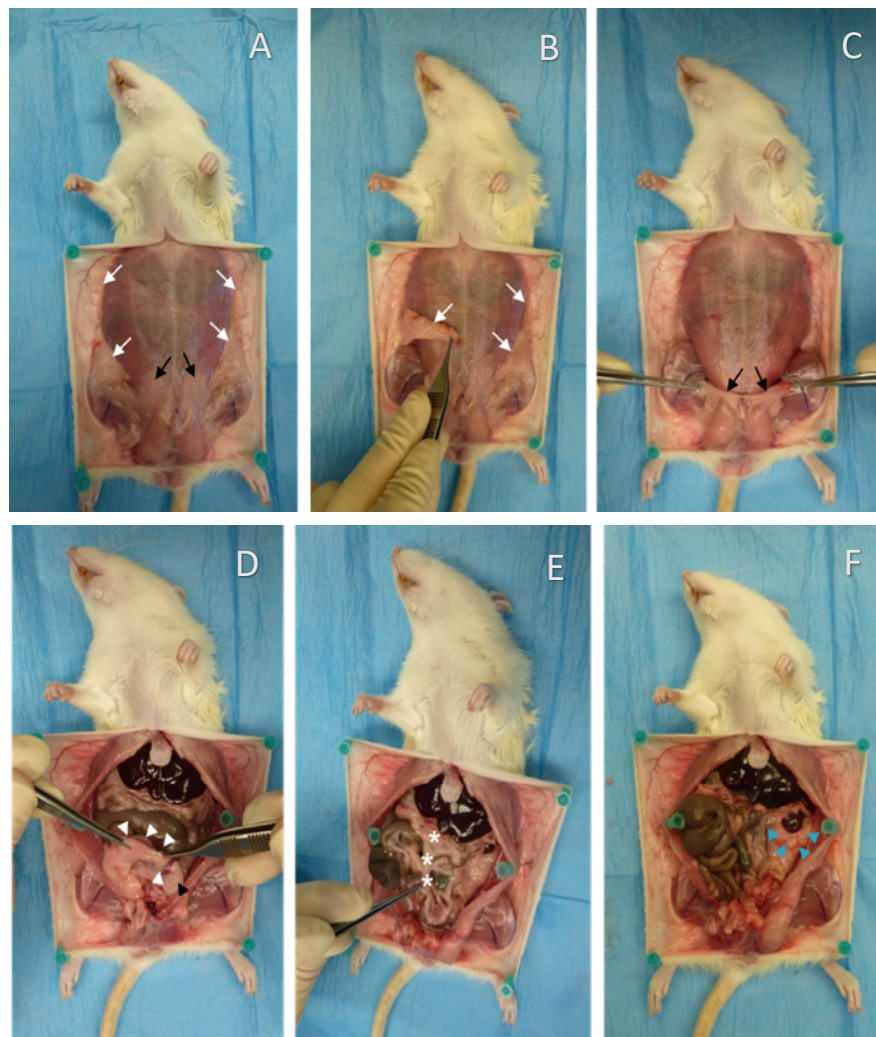
προμήθεια 5 επίμυων Wistar, ηλικίας 3 μηνών και έπειτα, 40 επίμυων Wistar, ηλικίας 6-9 εβδομάδων (Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ).



Εικόνα 15. Επίμυς Wistar τοποθετημένος σε ύπτια θέση πριν από τη συλλογή λιπώδους ιστού για την καλλιέργεια βλαστοκυττάρων στο εργαστήριο. Έχει προηγηθεί ευθανασία και προετοιμασία του δέρματος του πειραματόζωου.

Κατά την πρώτη φάση της μελέτης, θυσιάστηκαν 5 επίμυες ηλικίας 3 μηνών που αποτέλεσαν τους δότες του λιπώδους ιστού (**Εικόνα 15**). Αμέσως μετά την ευθανασία τους, τα ζώα τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση με την ουρά τους προς τον ερευνητή και τα μέλη τους σε απαγωγή. Αρχικά, εξασφαλίστηκε η χειρουργική προετοιμασία του δέρματος των ζώων. Ιώδιο ή χλωρεξιδίνη χρησιμοποιήθηκαν για αντισηψία. Έπειτα, διενεργήθηκε μια μέση τομή με νυστέρι κατά μήκος της κοιλιακής χώρας. Το δέρμα του πειραματόζωου ανασπάστηκε και με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, ο λιπώδης ιστός του υποδορίου και της βουβωνικής χώρας παρασκευάστηκε και συλλέχθηκε σχολαστικά. Στη συνέχεια, έγινε επιμήκης τομή στη λευκή γραμμή και είσοδος στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Εκεί συλλέχθηκε ο επιδιδυμικός, ο μεσεντερικός και ο περινεφρικός λιπώδης ιστός. Η συλλογή των παρασκευασμάτων έγινε πολύ προσεκτικά ώστε να μην τραυματιστούν οι παρακείμενοι ιστοί, καθώς αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα τη μόλυνση των δειγμάτων (**Εικόνα 16**). Η μέση ποσότητα λιπώδους ιστού που παρασκευάστηκε από το υποδόριο ήταν $2,3 \pm 1,6$ γραμμάρια, ενώ η μέση ποσότητα λίπους που

παρασκευάστηκε από τις βουβωνικές περιοχές ήταν $1,4 \pm 0,8$ γραμμάρια. Στο μεσεντέριο ελήφθησαν $0,9 \pm 0,4$ γραμμάρια λιπώδους ιστού, στην περινεφρική χώρα $1,9 \pm 0,9$ γραμμάρια, ενώ στην περιοχή των επιδιδυμίδων $0,5 \pm 0,2$ γραμμάρια. Τα βλαστοκύτταρα που απέδωσε ο λιπώδης ιστός ήταν 400.000 - 600.000 κύτταρα/γραμμάριο. Περισσότερα βλαστοκύτταρα απέδωσε το υποδόριο λίπος και εκείνο της βουβωνικής χώρας ενώ λιγότερα το μεσεντέριο λίπος (Πίνακας 2, Εικόνα 17).



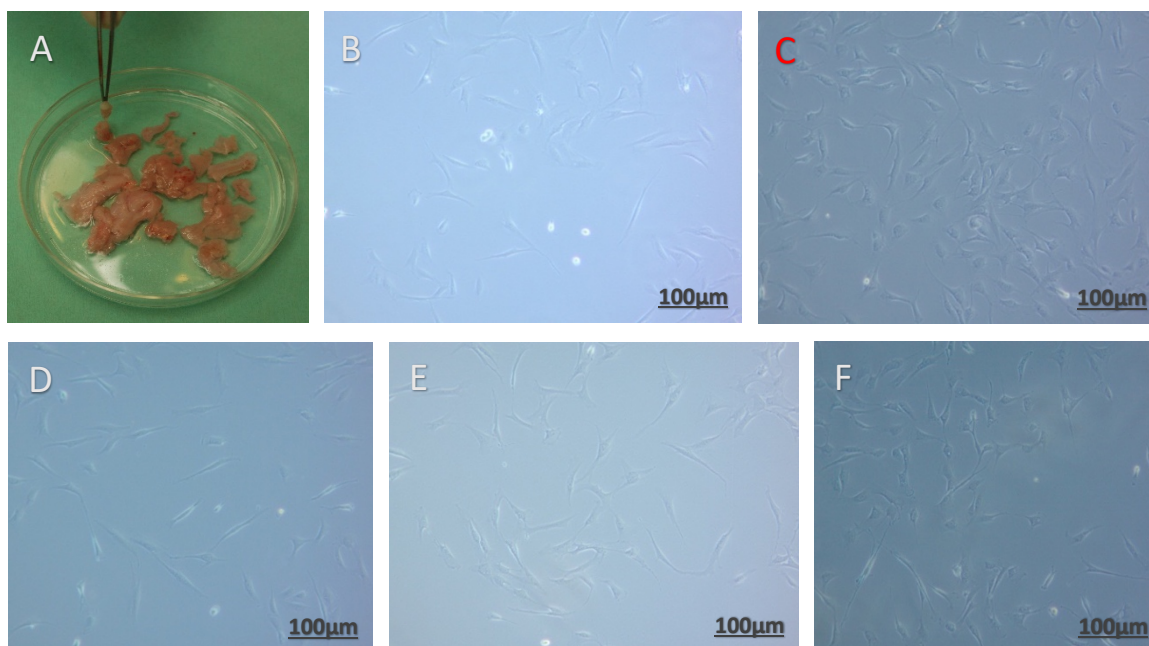
Εικόνα 16. Συλλογή λιπώδους ιστού. (A,B) Τα λευκά βέλη δείχνουν τον λιπώδη ιστό που συλλέχθηκε από το υποδόριο λίπος. (C) Τα μαύρα βέλη δείχνουν το λίπος των βουβωνικών περιοχών. (D) Τα λευκά τρίγωνα δείχνουν το λίπος στις επιδιδυμίδας (μαύρο τρίγωνο). (E) Οι λευκοί αστερίσκοι δείχνουν το μεσεντέριο λίπος. (F) Τα γαλάζια τρίγωνα δείχνουν το περινεφρικό λίπος.

Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τα βλαστοκύτταρα από το βουβωνικό λίπος των επιμύων λόγω της αφθονίας των κυττάρων στην περιοχή αυτή. Η απομόνωση και η καλλιέργειά τους έγινε όπως έχουμε περιγράψει σε προηγούμενη μελέτη (Megaloiikonomos et al., 2018). Η απομόνωση των βλαστοκυττάρων ξεκίνησε μέσα σε 20 λεπτά από την ευθανασία. Ο ιστός υπεβλήθη σε ενζυμική πέψη για 60 λεπτά στους 37° C χρησιμοποιώντας 0,1% κολλαγενάση τύπου I. Το διάλυμα πέρασε από ένα φίλτρο 70-μm για να απομακρυνθεί ο μη διασπασμένος ιστός, και αρνητικοποιήθηκε με Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) με 20% εμβρυϊκό βόειο ορού (fetal bovine serum, FBS) και φυγοκεντρήθηκε σε 2000 rpm για 5 λεπτά. Το προϊόν της διαδικασίας αυτής επεξεργάστηκε περαιτέρω με ένα διάλυμα που εξασφάλισε

Πίνακας 2. Περιοχές συλλογής λιπώδους ιστού και κύτταρα που απομονώθηκαν ανά γραμμάριο ιστού.

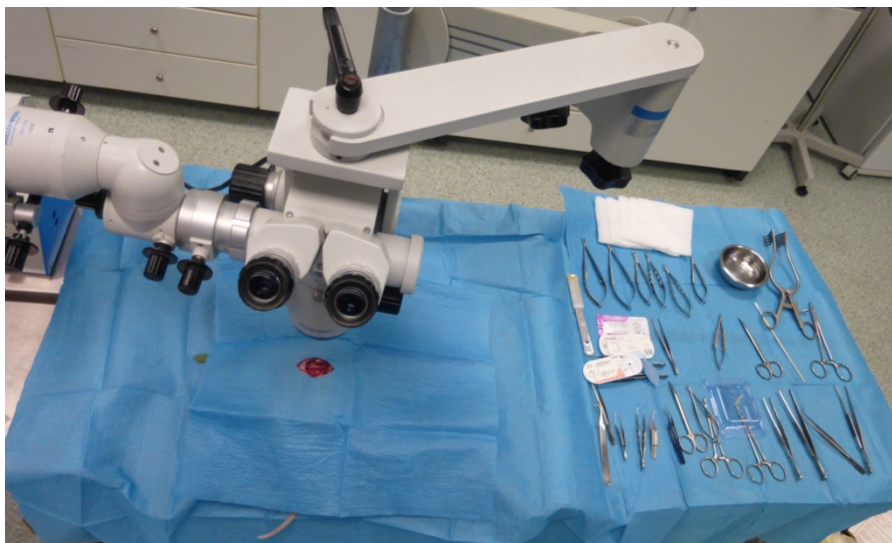
| Περιοχές Συλλογής | Επίμυες | Συλλεχθείς Λιπώδης Ιστός | SD (±) | ADSCs yield |
|-------------------------|---------|--------------------------|--------|------------------------------|
| Υποδόριο | 5 | 2,3 gr | 1,6 | 6 x 10 ⁵ cells/gr |
| Βουβωνική χώρα | 5 | 1,4 gr | 0,8 | 6 x 10 ⁵ cells/gr |
| Επιδιδυμίδα | 5 | 0,5 gr | 0,2 | 5 x 10 ⁵ cells/gr |
| Μεσεντέριο | 5 | 0,9 gr | 0,4 | 4 x 10 ⁵ cells/gr |
| Περινεφρική χώρα | 5 | 1,9 gr | 0,9 | 5 x 10 ⁵ cells/gr |

τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Πέρασε από φίλτρο κυττάρων (100 μm) και φυγοκεντρήθηκε σε 2000 rpm για άλλα 5 λεπτά. Το τελικό προϊόν υπέστη αραίωση με PBS, μέσω νέου φίλτρου κυττάρων (70 μm) και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για άλλα 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αιώρημα αναρροφήθηκε, ενώ το κυτταρικό ίζημα τοποθετήθηκε σε DMEM με 15% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικό-αντιμυκητιακό διάλυμα. Σαράντα οκτώ ώρες μετά την τοποθέτηση στο πλακάκι, το μέσο ανανεώθηκε.

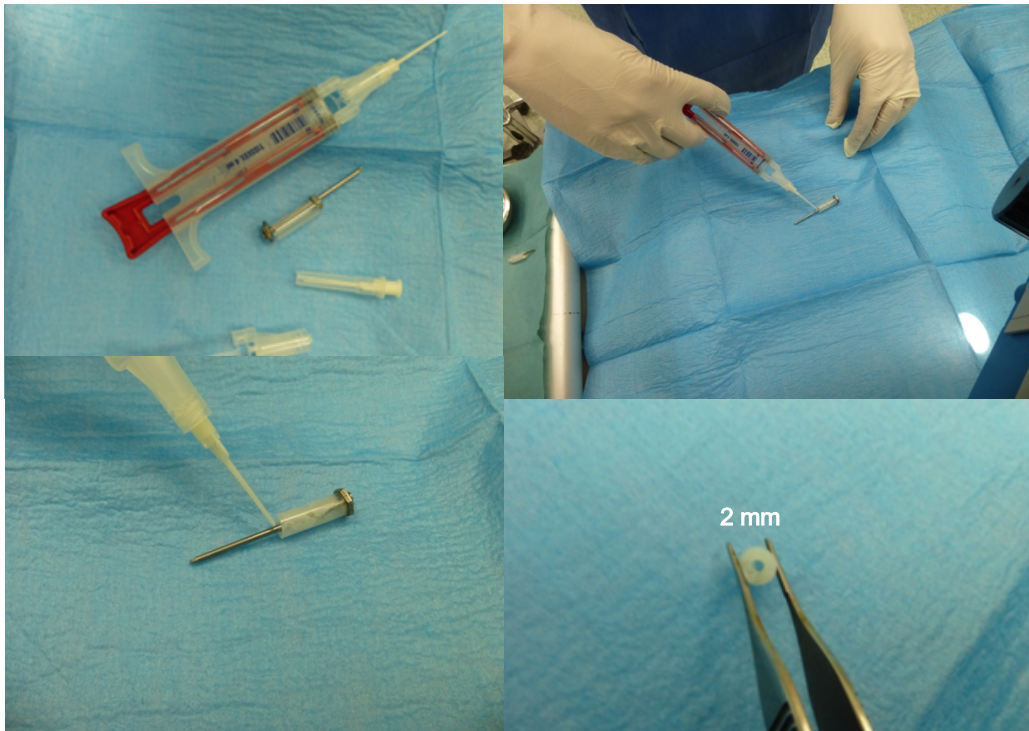


Εικόνα 17. (A) Ο λιπώδης ιστός τοποθετήθηκε σε πλακάκια και η απομόνωση των βλαστοκυττάρων έγινε μέσα σε 20 λεπτά από τη θυσία των πειραματόζωων. Οι παραπάνω ιστολογικές εικόνες παρουσιάζουν τα βλαστοκύτταρα 5 ημέρες μετά την απομόνωσή τους, (B) Βλαστοκύτταρα από τον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό, (C) από τον βουβωνικό λιπώδη ιστό, (D) από το μεσεντέριο, (E) από τον λιπώδη ιστό της περινεφρικής χώρας, (F) από το υποδόριο λίπος.

Τα πρωτογενή κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες. Στη συνέχεια πλύθηκαν με PBS, προστέθηκε διάλυμα 0,25% τρυψίνης/EDTA και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm. Το προϊόν αυτής της διαδικασίας τοποθετήθηκε σε θερμό διάλυμα DMEM με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/ διάλυμα στρεπτομυκίνης και τοποθετήθηκε σε πλακάκια πριν μπει σε κρυοσυντήρηση για να χρησιμοποιηθεί σε δεύτερο χρόνο ως θεραπεία στην πειραματική ομάδα. Μια με δύο ώρες πριν από την μεταμόσχευση των κυττάρων στην πειραματική ομάδα τα κύτταρα ανακτήθηκαν. Κάθε κυτταρική θεραπεία αφορούσε εναπόθεση 1×10^6 κύτταρα σε 50μL DMEM, που εγχύθηκε με τη βοήθεια μικροπιπέτας στους νευροαγωγούς της πειραματικής ομάδας ADSC.



Εικόνα 18. Οι συλλογή των κυττάρων αλλά και όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις στα πειραματόζωα έγιναν με τη βοήθεια μικροχειρουργικών εργαλείων και μικροσκοπίου.



Εικόνα 19. Παρασκευή νευροαγωγών μήκους 14 mm και αυλό διαμέτρου 2 mm με γέλη ινικής (Tisseel®, Baxter).

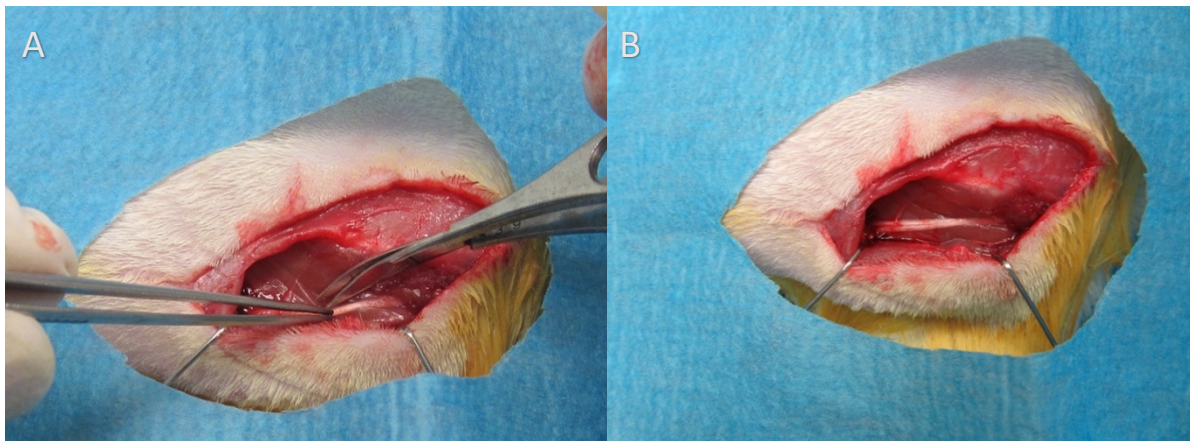


Εικόνα 20. Νευροαγωγοί από γέλη ινικής έτοιμοι προς χρήση.

Ομάδες Μελέτης και Χειρουργικές Επεμβάσεις

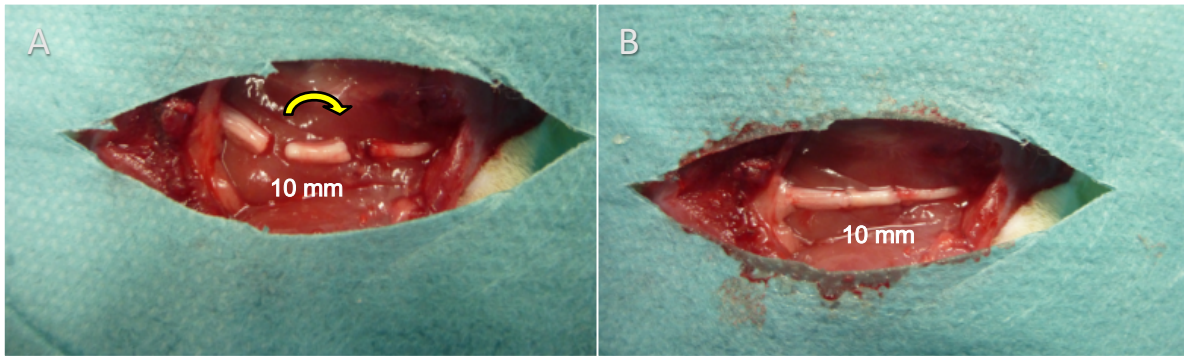
Μετά τη συλλογή των βλαστοκυττάρων, οι υπόλοιποι 40 επίμυες κατανεμήθηκαν ισότιμα σε τέσσερις πειραματικές ομάδες (10 επίμυες σε κάθε ομάδα). Οι τρεις πρώτες ομάδες αποτέλεσαν τις ομάδες ελέγχου (Ομάδα SHAM, Ομάδα AUTO, Ομάδα NSL), ενώ η τέταρτη αποτέλεσε την πειραματική ομάδα (Ομάδα ADSC). Η προεγχειρητική προετοιμασία ήταν ίδια

και στις 4 ομάδες. Η προνάρκωση και η μυοχάλαση των πειραματοζώων επετεύχθησαν με ξυλαζίνη (3mg/kg), ενώ για τη νάρκωση και την αναλγησία χορηγήθηκαν ενδομυϊκά κεταμίνη (70mg/kg) και παρακεταμόλη αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης διενεργήθηκε προσπέλαση και εν συνεχεία παρασκευή του αριστερού ισχιακού νεύρου σε όλους τους επίμυες. Όλες οι επεμβάσεις έγιναν με τη βοήθεια μικροχειρουργικών εργαλείων και χειρουργικού μικροσκοπίου (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 21. (A) Παρασκευή του ισχιακού νεύρου στην ομάδα ελέγχου SHAM. (B) Δεν έγινε άλλη παρέμβαση μετά την παρασκευή του νεύρου.

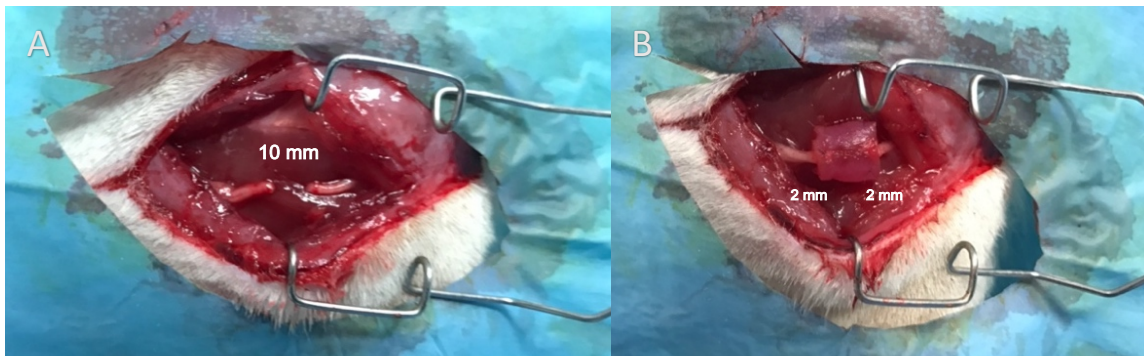
Στην πρώτη ομάδα ελέγχου (Ομάδα SHAM) μετά την παρασκευή του ισχιακού νεύρου, δε διενεργήθηκε κάποια παρέμβαση και ακολούθησε άμεσα σύγκλειση του τραύματος κατά στρώματα (**Εικόνα 21**). Στη δεύτερη ομάδα ελέγχου (Ομάδα AUTO), οι επίμυες υπέστησαν πλήρη διατομή του ισχιακού νεύρου σε δύο σημεία αυτού, έτσι ώστε να αφαιρεθεί νευρικό μόσχευμα 10 mm (**Εικόνα 22**). Το νευρικό μόσχευμα επανατοποθετήθηκε στο νευρικό έλλειμμα με αντίθετη φορά, έτσι ώστε να προσομοιάζει την εφαρμογή νευρικού αυτομοσχεύματος. Η συρραφή των νευρικών κολοβωμάτων επετεύχθη με τη βοήθεια 2 ή 3 μεμονωμένων επινευρικών συρραφών (9/0 Prolene®, Ethicon).



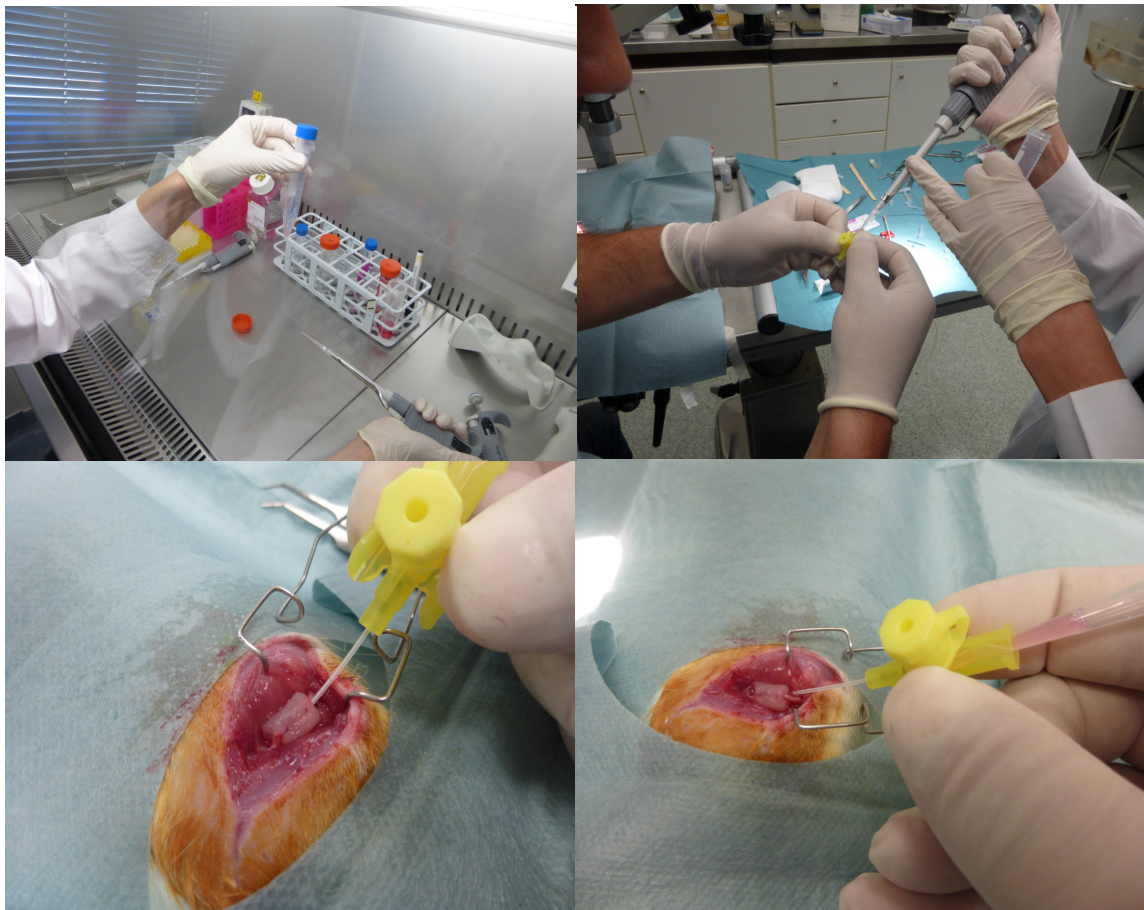
Εικόνα 22. (A) Στην ομάδα ελέγχου AUTO, οι επίμυες υπέστησαν πλήρη διατομή του ισχιακού νεύρου σε δύο σημεία, έτσι ώστε να αφαιρεθεί νευρικό μόσχευμα 10 mm. (B) Το νευρικό αυτό τμήμα επανατοποθετήθηκε με αντίθετη φορά ως νευρικό αυτομόσχευμα.

Στην τρίτη ομάδα ελέγχου (Ομάδα NSL) και στην ομάδα πειραματισμού (Ομάδα ADSC), οι επίμυες υπέστησαν πλήρη διατομή του ισχιακού νεύρου και πρόκληση νευρικού ελλείμματος 10 mm. Το νευρικό έλλειμμα γεφυρώθηκε με αυτοσχέδιο νευρικό αγωγό κατασκευασμένο από γέλη ινικής (fibrin glue, Tisseel[®], Baxter, GR) (di Summa et al., 2010). Για τη διαμόρφωση του νευρικού αγωγού, το προϊόν τοποθετήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο εκμαγείο από σιλικόνη γύρω από ένα μεταλλικό πύρο και υπεβλήθη σε ήπια πίεση μέχρι να στερεοποιηθεί (**Εικόνα 19**). Με τον τρόπο αυτό, διαμορφώθηκαν ομοιογενείς αγωγοί μήκους 14 mm, με πάχος τοιχώματος 1 mm και αυλό διαμέτρου 2 mm (**Εικόνα 20**). Το κεντρικό και περιφερικό κολόβωμα των ισχιακών νεύρων τοποθετήθηκαν 2 mm εντός του αυλού του νευροαγωγού και συγκρατήθηκαν με τη βοήθεια 2 ραμμάτων στο επινεύριο (9/0 Prolene[®], Ethicon). Στην ομάδα SLN εντός του νευροαγωγού τοποθετήθηκε φυσιολογικός ορός (**Εικόνα 23**). Στην ομάδα ADSC εντός του νευροαγωγού τοποθετήθηκαν 2×10^6 αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό με τη χρήση μικροπιπέτας (**Εικόνα 24**).

Τέλος, σε όλες τις ομάδες ακολούθησε σύγκλειση κατά στρώματα του χειρουργικού τραύματος με ανεξάρτητα απορροφήσιμα ράμματα (4/0 Vicryl[®], Ethicon) και του δέρματος με μεταλλικά clips (Appose[™] ULC Skin Stapler, Covidien).



Εικόνα 23. (Α) Στην ομάδα ελέγχου SLN διενεργήθηκε πλήρη διατομή και πρόκληση νευρικού ελλείμματος 10 mm. (Β) Το κεντρικό και περιφερικό κολόβωμα σταθεροποιήθηκαν 2 mm εντός του αυλού του νευροαγωγού και συγκρατήθηκαν με τη βοήθεια 2 επινευρικών ραμμάτων. Έπειτα, στον αγωγό τοποθετήθηκε φυσιολογικός ορός.



Εικόνα 24. Στην πειραματική ομάδα ADSC, δημιουργήθηκε νευρικό έλλεμμα 10 mm το οποίο γεφυρώθηκε με νευροαγωγό γέλης ινικής. Έπειτα, στον αγωγό τοποθετήθηκαν 2×10^6 αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό.

Κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο, υπήρξε στενή παρακολούθηση, προκειμένου να εντοπιστεί άμεσα τυχόν διαταραχή της ευζωίας των πειραματόζωων. Τα πειραματόζωα είχαν καθημερινή φροντίδα και επίβλεψη ανά 24 ώρες από το έμπειρο προσωπικό του Ερευνητικού Κέντρου. Σε όλα τα πειραματόζωα παρήχθη στέγαση, τροφή, νερό και φροντίδα, σε κλουβιά κατάλληλου εμβαδού και ύψους, διεθνών προδιαγραφών, σε χώρο κλιματιζόμενου σταβλισμού. Οι εγκαταστάσεις υφίσταντο καθημερινά έλεγχο και καθαρισμό. Υπήρχε άμεσα διαθέσιμος υπεύθυνος κτηνίατρος για την παρακολούθηση της υγείας των επίμυων. Τα πειραματόζωα υπέστησαν με τον τρόπο αυτό την ελάχιστη δυνατή επιβάρυνση. Στο τέλος του μετεγχειρητικού διαστήματος της νευρικής αναγέννησης, που σύμφωνα με το παρόν πρωτόκολλο ορίστηκε στις 12 εβδομάδες, όλα τα ζώα θανατώθηκαν με ανώδυνο τρόπο με αιθέρα σε εισπνοή, σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες.

Ανάλυση βάδισης

Προεγχειρητικά, στις 4, 8 και 12 εβδομάδες μετά το πειραματικό χειρουργείο, αξιολογήθηκε η λειτουργική αποκατάσταση των επίμυων με ανάλυση βάδισης και υπολογισμό του ισχιακού λειτουργικού δείκτη (sciatic functional index, SFI). Κατά τη δοκιμασία αυτή οι επίμυες κλήθηκαν να διασχίσουν ένα στενό διάδρομο (42 x 8,2 εκατοστά) που καταλήγει σε ένα σκοτεινό κλωβό. Τα κάτω άκρα τους εμβαπτίστηκαν σε ουδέτερη χρωστική και τα αποτυπώματα των πελμάτων τους αποτυπώθηκαν σε ειδικό απορροφητικό χαρτί που κάλυπτε το δάπεδο του διαδρόμου (**Εικόνα 25**). Μετά από 2-3 δοκιμές προσαρμογής, οι επίμυες είχαν σταθερή κατεύθυνση κατά μήκος του διαδρόμου προς τον τελικό κλωβό. Τα αποτυπώματα αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια 3 διαφορετικών παραμέτρων: (1) απόσταση από τη πτέρνα μέχρι το 3^ο δάκτυλο (print length, PL), (2) απόσταση από το 1^ο μέχρι το 5^ο δάκτυλο (toe spread, TS), και (3) απόσταση από το 2^ο μέχρι το 4^ο δάκτυλο (intermediary toe spread, ITS) (**Εικόνα 26**). Όλες οι μετρήσεις έγιναν στην πειραματική (experimental, E) αλλά και στη φυσιολογική

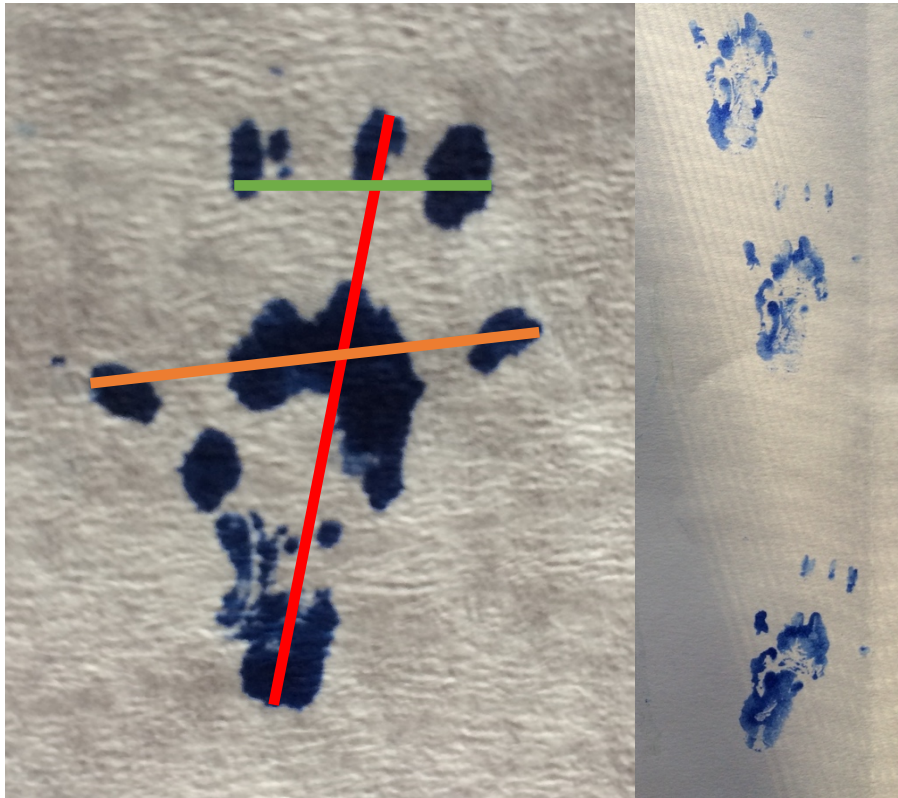
πλευρά (normal, N). Στη συνέχεια, ο SFI θα υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση των Bain et al. (Bain, Mackinnon, & Hunter, 1989) ως εξής:

$$SFI = -38.3 \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \frac{EITS - NITS}{NITS} - 8.8$$



Εικόνα 25. Μετά τη σήμανση των πελμάτων τους με μελάνη, οι επίμυες διέσχισαν ένα στενό διάδρομο (42 x 8,2 εκατοστά). Τα αποτυπώματα της βάδισής τους αξιολογήθηκαν με υπολογισμό του ισχιακού λειτουργικού δείκτη (sciatic functional index, SFI).

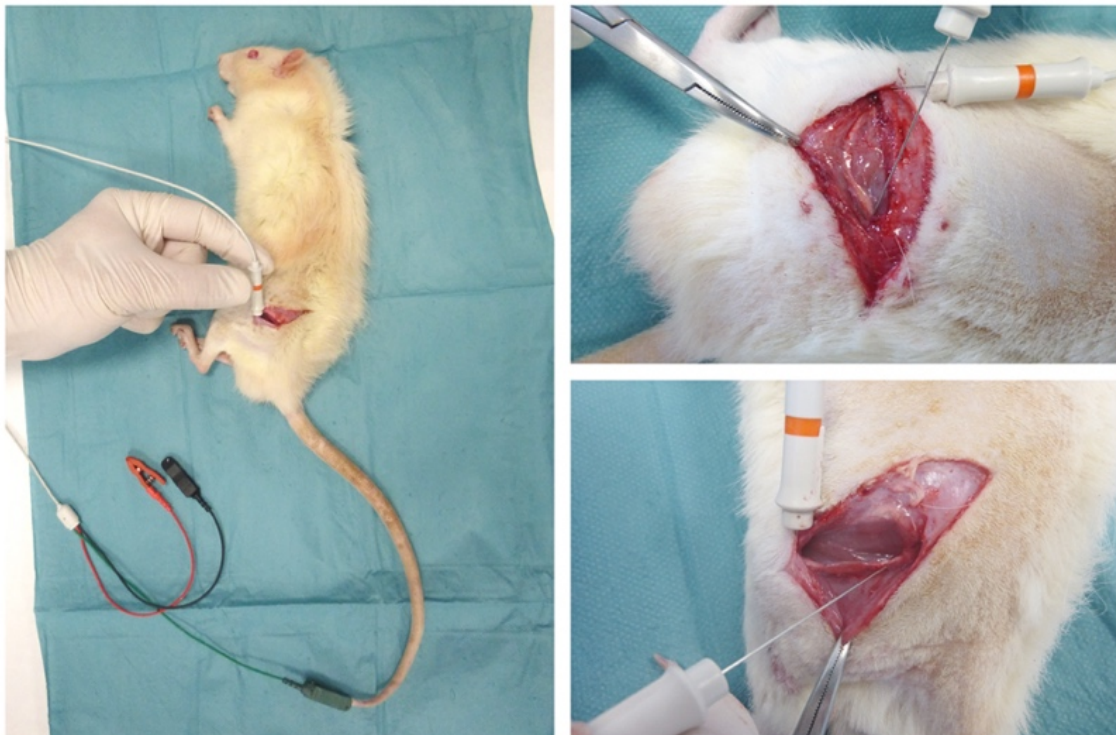
Ο SFI είναι 0 στα φυσιολογικά ζώα και -100 μετά από πλήρη διατομή του ισχιακού νεύρου. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν στα πειραματόζωα και των 4 ομάδων, προκειμένου να προκύψουν οι σχετικές μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις, ενώ στο τέλος του πειράματος υποβλήθηκαν σε συγκριτική στατιστική ανάλυση.



Εικόνα 26. Με κόκκινο απεικονίζεται η απόσταση από την πτέρνα μέχρι το 3^ο δάκτυλο (print length, PL), με πορτοκαλί η απόσταση από το 1^ο μέχρι το 5^ο δάκτυλο (toe spread, TS), και με πράσινο η απόσταση από το 2^ο μέχρι το 4^ο δάκτυλο (intermediary toe spread, ITS).

Ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος

Ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος της νευρικής αναγέννησης πραγματοποιήθηκε μέσω της διενέργειας ηλεκτρομυογραφήματος, 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά, πριν τη θανάτωση των πειραματόζων, με τη χρήση του ηλεκτρομυογράφου Dantec Keypoint Focus® (Natus Medical Inc.) του Ορθοπαιδικού Κέντρου Έρευνας και Εκπαίδευσης. Κατά τη διάρκεια του νευροφυσιολογικού ελέγχου (Εικόνα 27), οι επίμυες υποβλήθηκαν σε καταστολή υπό γενική αναισθησία (70 mg/kg ketamine + 3 mg/kg xylazine). Ο ερεθισμός αλλά και η καταγραφή των προκλητών δυναμικών έγιναν με τη χρήση βελονοειδών ηλεκτροδίων. Λεπτά ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν στους μύς του οπίσθιου άκρου των επίμυων τόσο στην πειραματική όσο και

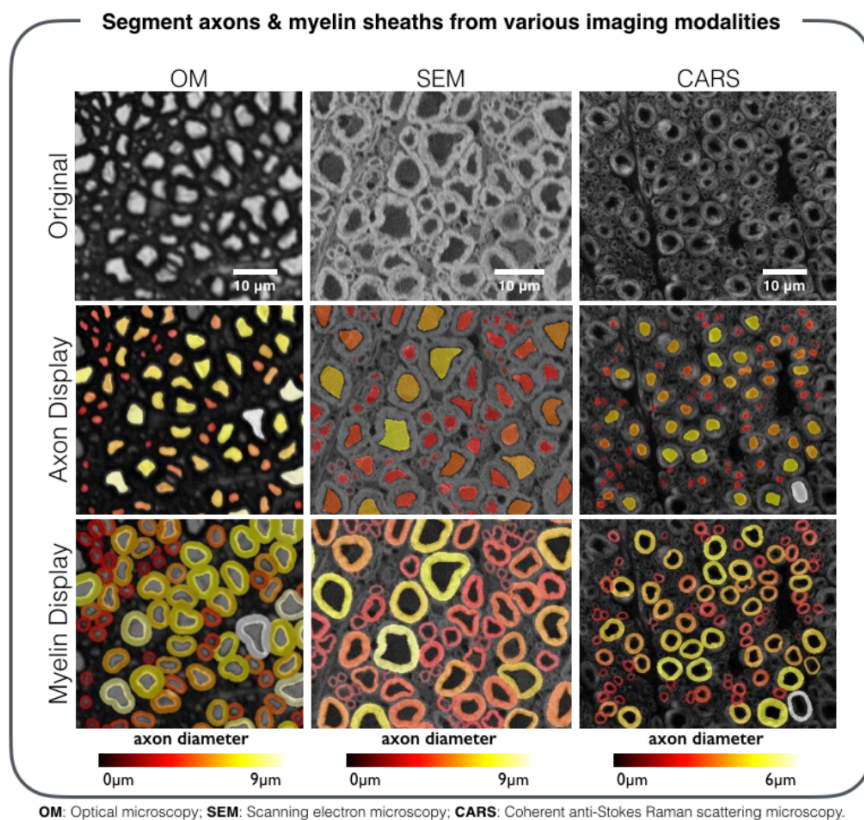


Εικόνα 27. Ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά, πριν από τη θυσία των πειραματόζων και τη συλλογή του νευρικού ιστού για μορφολογική ανάλυση.

την υγιή πλευρά. Με ξεχωριστό ηλεκτρόδιο προκλήθηκε διέγερση του χειρουργημένου και έπειτα του φυσιολογικού ισχιακού νεύρου. Ο λανθάνων χρόνος και το εύρος των δυναμικών ενέργειας των μυϊκών μονάδων (compound muscle action potentials, CMAPs) καταγράφηκαν προκειμένου στη συνέχεια τα αποτελέσματα όλων των ομάδων να συγκριθούν. Το CMAP amplitude μετρήθηκε σε millivolts και το CMAP latency σε milliseconds. Τα δύο ισχιακά νεύρα κάθε πειραματόζωου διεγέρθηκαν με ερέθισμα στο ύψος της ισχιακής εντομής. Η καταγραφή των προκλητών δυναμικών έγινε από την έσω μοίρα του γαστροκνημίου μυός. Η γείωση του μηχανήματος τοποθετήθηκε στη βάση της ουράς του κάθε ζώου. Η συχνότητα του ηλεκτρικού παλμού που χρησιμοποιήθηκε ανερχόταν σε ένα κύκλο ανά δευτερόλεπτο (1 Hz) και η διάρκεια του ερεθισμού σε 0.2 m/s. Τέλος, καταγράφηκε ο λόγος των αποτελεσμάτων του πάσχοντος προς το φυσιολογικό ισχιακό νεύρο (CMAP recovery index) για κάθε πειραματόζωο και στις 4 ομάδες της μελέτης.

Νευροϊστομορφομετρία

Μετά τη θανάτωση των πειραματόζωων έγινε η λήψη του παρασκευάσματος του αριστερού ισχιακού νεύρου που περιείχε μέρος του κεντρικού και περιφερικού νευρικού κολοβώματος καθώς και το ικρίωμα ινικής. Κατόπιν, τα φρέσκα παρασκευάσματα εστάλησαν στο παθολογοανατομικό εργαστήριο προκειμένου να ληφθούν ημίλεπτες εγκάρσιες τομές από το περιφερικό κολόβωμα. Οι τομές χρωματίστηκαν στη συνέχεια με διάλυμα 1% κυανού της τολουιδίνης/1% βόρακα και αξιολογήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο. Τα ιστολογικά παρασκευάσματα υποβλήθηκαν σε ψηφιακή φωτογράφιση με το σύστημα Nikon DS-Fi1 L2 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) και οι φωτογραφίες μεταφέρθηκαν για αξιολόγηση στο λογισμικό επεξεργασίας εικόνας ImageJ (Zarei et al., 2016) και στο AxonGen (Zaimi et al., 2016). Με το AxonGen ο αριθμός και η διάμετρος των νευρικών ινών καταγράφηκαν σε πολλαπλά οπτικά πεδία για περαιτέρω σύγκριση μεταξύ των πειραματικών ομάδων (**Εικόνα 28**).



Εικόνα 28. Ανάλυση ιστολογικών εικόνων με το πρόγραμμα AxoGen. Το πρόγραμμα είναι ελεύθερα διαθέσιμο στο διαδίκτυο (<https://github.com/neuropoly/axonseg>).

Στατιστική Ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Prism 9.0 (GraphPad). Όλα τα δεδομένα περιγράφονται ως μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις (SD). Οι τιμές του SFI αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας two-way analysis of variance με Tukey's multiple-comparison test για ανάλυση post hoc μεταξύ των ομάδων για την κάθε χρονική στιγμή. Τα δεδομένα από τις άλλες μεταβλητές αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας one-way analysis of variance με Tukey's test. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ορίστηκαν εκείνες με $P < 0,05$.

Αποτελέσματα

Γενικές Παρατηρήσεις

Η χειρουργική επέμβαση ήταν καλά ανεκτή από όλους τους επίμυες, και όλοι είχαν άμεση και ικανοποιητική ανάνηψη. Η μετεγχειρητική τους πορεία έδειξε ότι επανήλθαν σύντομα στις κανονικές δραστηριότητες. Δεν παρουσίασαν απώλεια βάρους, σημεία φλεγμονής τραύματος ή κάποια ασθένεια, υποδεικνύοντας ότι διατηρούσαν καλή υγεία καθ' όλη την περίοδο της μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Και τα δύο πόδια από όλους τους επίμυες επιθεωρήθηκαν για πιθανό τραυματισμό ή αυτοακρωτηριασμό (αυτοτομή) πριν από την ανάλυση βάδισης σε κάθε ένα από τα προκαθορισμένα χρονικά σημεία. Σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκε αυτοτομή ή άλλη χειρουργική επιπλοκή.

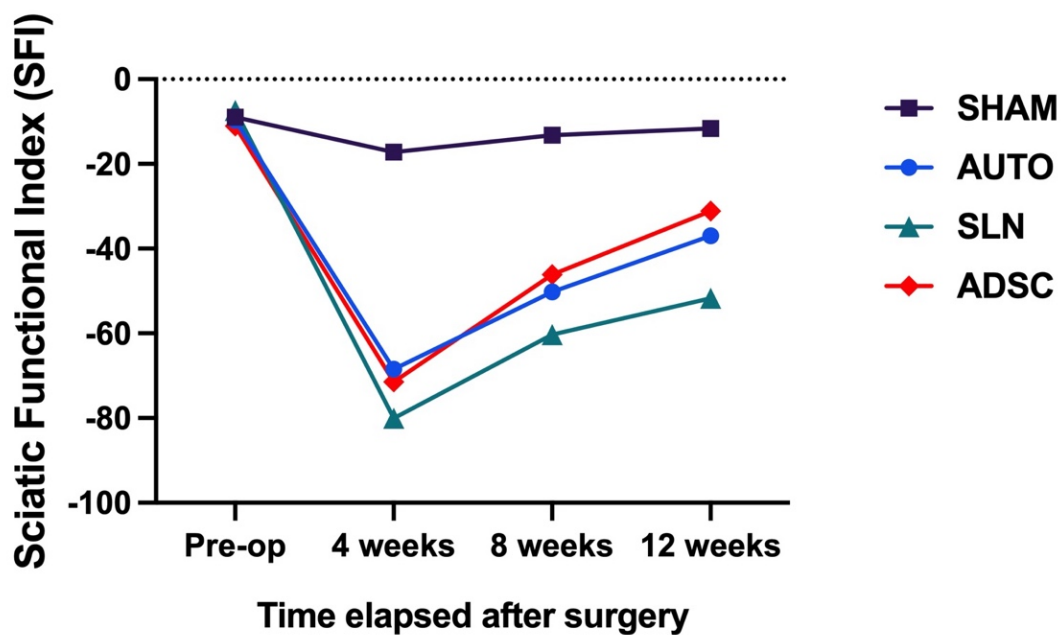
Ανάλυση Βάδισης

Όλοι οι επίμυες κατάφεραν να στηρίξουν το βάρος τους στα πίσω πόδια και να ολοκληρώσουν τη δοκιμασία της ανάλυσης βάδισης. Μπορέσαμε να καταγράψουμε σε όλους ίχνη για καθένα από τα τρία εξεταζόμενα χρονικά σημεία. Οι προεγχειρητικές τιμές αναφοράς δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων (**Πίνακας 6**). Η ομάδα SHAM όπως ήταν αναμενόμενο δεν είχε σημαντική διακύμανση στις μετρήσεις SFI στις διάφορες χρονικές περιόδους. Οι άλλες τρεις ομάδες έδειξαν στατιστικά σημαντική λειτουργική αποκατάσταση με συνεχή βελτίωση των τιμών SFI με την πάροδο του χρόνου ($P < 0,05$). Στις 4 εβδομάδες, η ομάδα AUTO και η ομάδα ADSC εμφάνισαν βελτιωμένη λειτουργική αποκατάσταση σε σύγκριση με την ομάδα SLN [$-68,5$ και $-71,4$ vs $-80,1$ ($P < 0,05$)]. Ομοίως, στην ομάδα ADSC και σε εκείνη με τα αυτομοσχέυματα διατηρήθηκε αρκετά πιο βελτιωμένο επίπεδο λειτουργικότητας σε σύγκριση με την ομάδα SLN στις 8 εβδομάδες [$-46,1$ και $-50,2$ vs $-60,3$ ($P < 0,05$)] και κατά την ολοκλήρωση της μελέτης στις 12 εβδομάδες [$-31,2$ και $-37,0$ vs $-51,7$ ($P < 0,05$)]. Ωστόσο, δεν καταγράψαμε στατιστικά

σημαντική διαφορά μεταξύ των ADSC και AUTO σε καμία χρονική στιγμή ($P > 0,05$) (Πίνακας 6, Εικόνα 29).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ανάλυσης βάρδισης προεγχειρητικά, στις 4, 8, και 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά.

| | Προεγχειρητικά | 4 Εβδομάδες | 8 Εβδομάδες | 12 Εβδομάδες | P Value |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|
| SHAM | -9,0 (\pm 0,4) | -17,2 (\pm 5,1) | -13,2 (\pm 7,4) | -11,7 (\pm 10,8) | $P > 0,05$ |
| SLN | -7,3 (\pm 1,5) | -80,1 (\pm 2,1) | -60,3 (\pm 3,5) | -57,7 (\pm 4,6) | $P < 0,05$ |
| AUTO | -9,7 (\pm 5,2) | -68,5 (\pm 2,6) | -50,2 (\pm 2,5) | -37,0 (\pm 5,2) | $P < 0,05$ |
| ADSC | -11,1 (\pm 1,3) | -71,4 (\pm 5,8) | -46,1 (\pm 6,3) | -31,2 (\pm 5,0) | $P < 0,05$ |



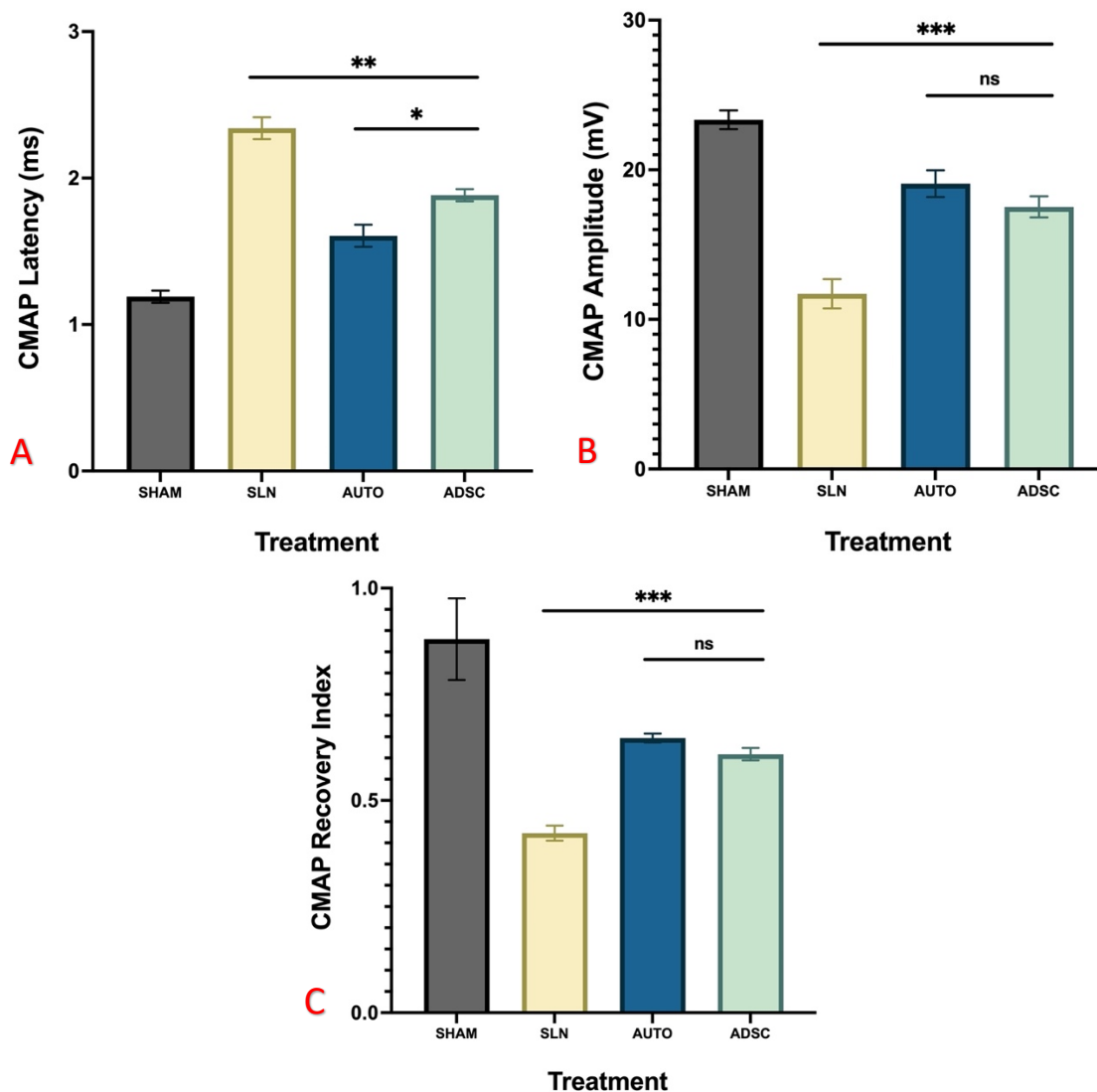
Εικόνα 29. Το γράφημα δείχνει τις τιμές του SFI προεγχειρητικά, στις 4, 8, και 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά για καθεμιά από τις 4 ομάδες της μελέτης.

Ηλεκτροφυσιολογικός Έλεγχος

Λειτουργική επανανεύρωση παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες. Στις 12 εβδομάδες, το CMAP ήταν μετρήσιμο σε όλους τους επίμυες. Οι μορφολογία των δυναμικών ενεργείας των ομάδων νευρικής αναγέννησης (SLN, AUTO, και ADSC) ήταν παρόμοια με εκείνη της ομάδας SHAM. Ωστόσο, χαμηλότερο CMAP amplitude και μεγαλύτερη CMAP latency τεκμηριώθηκαν στις ομάδες νευρικής διατομής και νευρικής αναγέννησης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου SHAM. Οι τιμές των CMAP latency και CMAP amplitude βρέθηκαν να είναι υψηλότερες στις ομάδες ADSC και AUTO σε σύγκριση με την ομάδα SLN [(1,88 m/s, 1,61 m/s vs 2,34 m/s ($P < 0,05$) και 17,52 mV, 19,07 mV vs 11,71 mV ($P < 0,05$)]. Το CMAP Latency της ομάδας ADSC ήταν ανώτερο από εκείνο της ομάδας AUTO στις 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά, ωστόσο το CMAP amplitude ήταν παρόμοιο και στις δύο ομάδες στο τέλος του πειράματος. Το CMAP index βελτιώθηκε περισσότερο στις ομάδες ADSC και AUTO σε σύγκριση με την ομάδα SLN [(0,61 και 0,65 vs 0,42 ($P < 0,05$)). Ωστόσο, δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ADSC και στην ομάδα AUTO στο συγκεκριμένο δείκτη ($P > 0,05$) (Πίνακας 7, Εικόνα 30).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα ηλεκτροφυσιολογικού ελέγχου 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά.

| | SHAM | SLN | AUTO | ADSC | P Value |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------|
| CMAP Latency (ms \pm SD) | 1,19 (\pm 0,13) | 2,34 (\pm 0,24) | 1,61 (\pm 0,24) | 1,88 (\pm 0,13) | $P < 0,05$ |
| CMAP Amplitude (mV \pm SD) | 23,34 (\pm 1,98) | 11,71 (\pm 3,10) | 19,07 (\pm 2,83) | 17,52 (\pm 2,24) | $P < 0,05$ |
| CMAP Index | 0,88 (\pm 0,30) | 0,42 (\pm 0,06) | 0,65 (\pm 0,03) | 0,61 (\pm 0,05) | $P < 0,05$ |

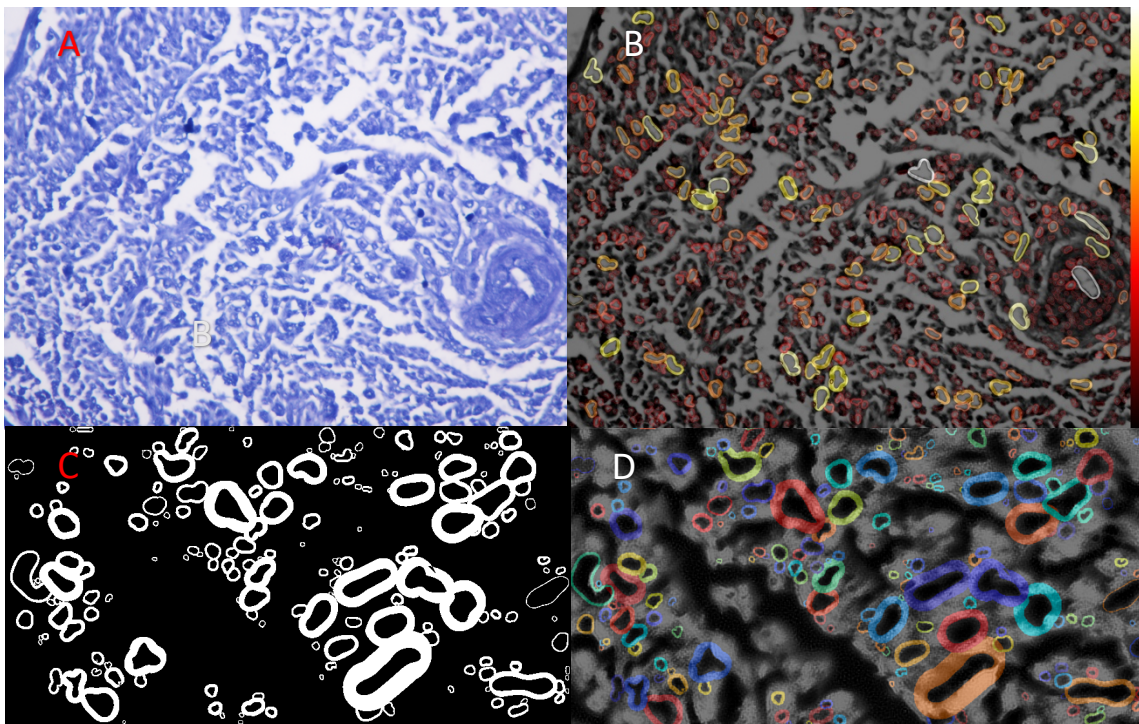


Εικόνα 30. Ηλεκτοφυσιολογικός έλεγχος στις 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά για καθεμιά από τις 4 ομάδες της μελέτης. **A.** Compound-evoked muscle action potential (CMAP) latency. **B.** CMAP amplitude. **C.** CMAP recovery index (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Νευροϊστομορφομετρία

Μετά το νευροφυσιολογικό έλεγχο το ισχιακό νεύρο παρασκευάστηκε και εξαιρέθηκε χειρουργικά από όλους τους επίμυες. Οι νευρικοί αγωγοί στις 2 αντίστοιχες ομάδες εμφάνισαν σημαντική βιοαπορρόφηση μακροσκοπικά 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήσαμε φλεγμονώδη αντίδραση ή σχηματισμό νευρώματος. Στις περιφερικές εγκάρσιες νευρικές τομές, οι νευρικές ίνες είχαν αρκετά πιο ομοιογενή κατανομή

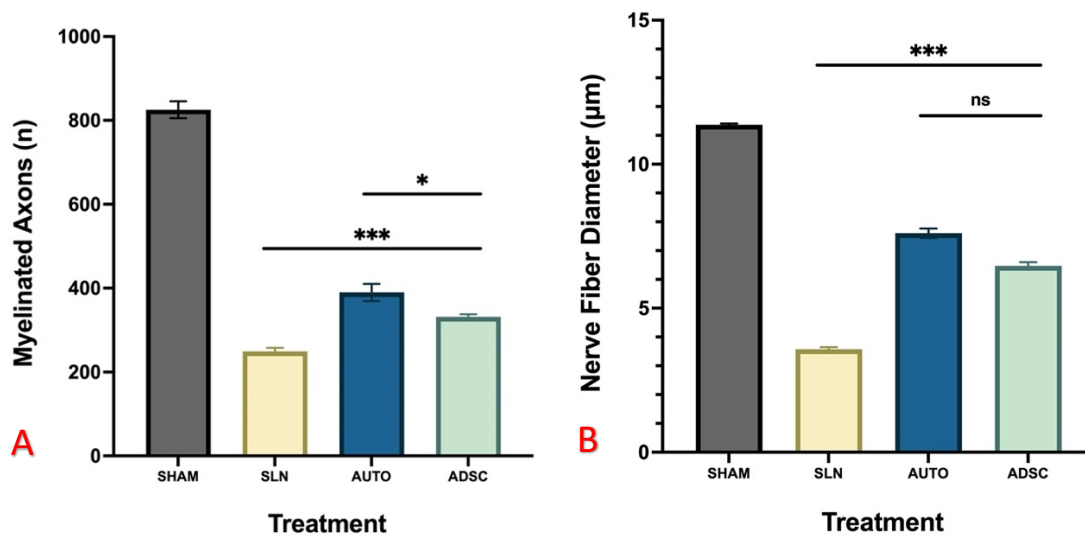
στις ομάδες ADSC και AUTO σε σύγκριση με την ομάδα SLN. Στην τελευταία ομάδα παρατηρήθηκε ακανόνιστη κατανομή νευρικών ιών, ενώ κενό διάστημα μεταξύ των αξόνων ήταν εμφανές σε αρκετές περιπτώσεις. Ο αριθμός των νευρικών ιών περιφερικά της τομής ήταν αυξημένος στις ομάδες ADSC και AUTO, σε σύγκριση με την ομάδα SLN [331,1 και 389,9 vs 249,2 ($P < 0,001$)]. Η ομάδα AUTO είχε όμως περισσότερους άξονες με στατιστικά σημαντική διαφορά και από τις άλλες δυο ομάδες ($P < 0,05$). Η ομάδα ADSC είχε επίσης μεγαλύτερο αριθμό αναγεννημένων αξόνων σε σχέση με την SLN ομάδα στις 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Ομοίως, οι νευρικές ίνες στην ομάδα ADSC και AUTO είχαν μεγαλύτερη διάμετρο σε σύγκριση με αυτές της ομάδας SLN [6,5 μm και 7,6 μm vs 36 μm ($P < 0,001$)] την ίδια χρονική στιγμή. Ωστόσο, οι ομάδες ADSC και AUTO είχαν παρόμοια διάμετρο νευρικών ιών μεταξύ τους (Πίνακας 8, Εικόνα 31, Εικόνα 32).



Εικόνα 31. (A) Εγκάρσια διατομή νεύρου με χρώση κυανού της τολουιδίνης. (B) Ανάλυση εικόνας με το πρόγραμμα AxonGen. (C, D) Επεξεργασία εικόνας σε περιορισμένο οπτικό πεδίο.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ιστομορφομετρικής αξιολόγησης 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά.

| | SHAM | SLN | AUTO | ADSC | P Value |
|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| Άξονες (n± SD) | 825,6 (± 64,2) | 249,2 (± 27,1) | 389,9 (± 64,2) | 331,1 (± 21,2) | P < 0,001 |
| Διάμετρος Ινών (μm ± SD) | 11,4 (± 0,1) | 3,6 (± 0,2) | 7,6 (± 0,5) | 6,5 (± 0,4) | P < 0,001 |



Εικόνα 32. Ιστομορφομετρική αξιολόγηση 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά για τις 4 ομάδες της μελέτης. **A.** Αριθμός αναγεννημένων νευραξόνων με μυελίνη. **B.** Διάμετρος νευρικών ινών (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

Συζήτηση

Τα βλαστοκύτταρα που προέρχονται από λιπώδη ιστό αντιπροσωπεύουν ίσως την πιο πρακτική πηγή κυττάρων για τη διενέργεια προκλινικών μελετών ενώ ταυτόχρονα συνιστούν την πιο ρεαλιστική μέθοδο κυτταρικών θεραπειών στα πλαίσια της κλινικής εφαρμογής. Εναλλακτικές πηγές βλαστοκυττάρων όπως ο εμβρυϊκός ιστός, τα τριχοθυλάκια ή ο οδοντικός πολφός έχουν μεγάλες δυνατότητες αλλά προς το παρόν αντιμετωπίζουν περιορισμούς λόγω της μικρής παροχής και των ειδικών απαιτήσεων καλλιέργειας. Η ευκολότερη συλλογή, το μεγαλύτερο κλάσμα βλαστοκυττάρων του λιπώδους ιστού και η μεγάλη δυνατότητα διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού έχουν κάνει τα βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό περισσότερο ελκυστικά από αυτά που προέρχονται από μυελό των οστών ή άλλες πηγές.

Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήθηκε ο ρόλος της τοπικής εφαρμογής μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό στην αναγέννηση των περιφερικών νεύρων. Η κυτταρική αυτή θεραπεία, σε συνδυασμό με νευρικούς αγωγούς παρασκευασμένους από γέλη ινικής, φαίνεται πως συνέβαλε στη βελτίωση της λειτουργικότητας της αντίστοιχης ομάδας, όπως αναδείχθηκε από τα αποτελέσματα της ανάλυσης βάδισης (SFI) και του ηλεκτροφυσιολογικού ελέγχου (EMG). Αντίστοιχα, οι ιστολογικές αλλαγές (αριθμός ινών με μυελίνη και διάμετρός τους) βρέθηκαν βελτιωμένες στην ομάδα των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων και σε εκείνη των αυτομοσχευμάτων. Με τα βλαστοκύτταρα φαίνεται να βελτιώνεται η νευρική αναγέννηση, έτσι όπως προέκυψε από τις περισσότερες παραμέτρους που μελετήσαμε σε αυτό το μοντέλο επίμυων.

Σε κάποιες από τις μεταβλητές αξιολόγησης παρατηρήσαμε λίγο καλύτερα αποτελέσματα στην ομάδα των βλαστοκυττάρων (CMPA latency), ενώ σε άλλες λίγο καλύτερα αποτελέσματα στην ομάδα των αυτομοσχευμάτων (αριθμός αξόνων). Ωστόσο, σε σύγκριση με τη θεραπεία με απλούς νευροαγωγούς, οι προηγούμενες δύο θεραπείες ήταν πολύ πιο αποτελεσματικές, όπως φαίνεται από όλες τις μεταβλητές που μελετήσαμε.

Αναγνωρίζουμε μερικούς περιορισμούς της μελέτης. Αρχικά, δε συγκρίναμε το κλινικό αποτέλεσμα διαφοροποιημένων με αυτό των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων. Πιθανά η διαφοροποίηση των κυττάρων να επηρέαζε την έκβαση. Επίσης, επιλέξαμε βλαστοκύτταρα από μόνο μια περιοχή λιπώδους ιστού. Η επιλογή μας έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των κυττάρων στις περιοχές που εξετάσαμε. Τα κύτταρα των λοιπών περιοχών συλλογής λιπώδους ιστού ενδέχεται να έχουν την ικανότητα να προάγουν εξίσου η ακόμα και περισσότερο τη νευρική αναγέννηση. Δεν έγινε σήμανση των βλαστοκυττάρων, που θα μπορούσε να μας δώσει επιπλέον πληροφορίες για τη δράση τους κατά τη διάρκεια της νευρικής αναγέννησης. Τέλος, η θεραπεία με βλαστοκύτταρα έγινε αποκλειστικά κατά τη χειρουργική αποκατάσταση με την έγχυσή τους στον αυλό του νευροαγωγού με τη βοήθεια ειδικής μικροπιπέτας. Επιλέξαμε την εφάπαξ χορήγηση διότι προσεγγίζει τις ανάγκες και δυνατότητες της κλινικής πράξης, ωστόσο η συνεχής χορήγηση με κάποιο ειδικό μέσο (πχ αντλία) ίσως επηρέαζε το αποτέλεσμα. Τα ερωτήματα αυτά παραμένουν ανοιχτά προς μελλοντικές μελέτες.

Το SFI θεωρείται ένα αξιόπιστο εργαλείο αξιολόγησης της νευρικής λειτουργίας σε μοντέλο επίμυων (Byun & Ahn, 2021). Χρησιμοποιήσαμε το δείκτη έτσι όπως τον περιέγραψαν ο Bain et al (Bain et al., 1989), αρχικά σε φυσιολογική βάδιση και έπειτα από τη διατομή του ισχιακού νεύρου σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Βρήκαμε στατιστικά σημαντική βελτίωση σε όλες τις ομάδες που έγινε νευρική διατομή του ισχιακού νεύρου με την πάροδο του χρόνου. Από τις ομάδες αυτές τα καλύτερα κλινικά αποτελέσματα παρουσίασαν η ομάδα μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων και η ομάδα των αυτομοσχευμάτων. Η ομάδα που αντιμετωπίστηκε μόνο με νευρικούς αγωγούς παρουσίασε τα πιο φτωχά αποτελέσματα. Αν και ο SFI είναι σημαντικός δείκτης αξιολόγησης της αναγέννησης των περιφερικών νεύρων, πρέπει να γνωρίζουμε και να αποφεύγουμε τους πιθανούς εγγενείς περιορισμούς του (J. H. Kim, Choi, Park, & Ahn, 2022; Varejão, Meek, Ferreira, Patrício, & Cabrita, 2001). Ωστόσο, η ηλεκτροφυσιολογική εξέταση και η ιστολογική αξιολόγηση της μελέτης υποστηρίζουν περαιτέρω την υπεροχή των λειτουργικών αποτελεσμάτων των βλαστοκυττάρων και των

αυτομοσχευμάτων. Δεν πρέπει όμως να ξεχνάμε ότι αν επιτυγχάνεται παρόμοιο αποτέλεσμα από τις δυο τελευταίες τεχνικές το αυτομόσχευμα στην κλινική πράξη προκύπτει από ένα λειτουργικό νεύρο που η θυσία του ίσως να μπορούσε να αποφευχθεί. Σε καθεμιά από τις ομάδες νευρικής διατομής και αναγέννησης προκλήθηκαν δυναμικά CMAP. Αντίστοιχα, τα ADSC και τα αυτομοσχεύματα παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα. Το CMAP amplitude μπορεί να αξιολογήσει τον αριθμό των αξόνων που αναγεννώνται και ανανευρώνουν τους περιφερικού μυϊκούς στόχους, ενώ η διάμετρος των νευρικών ινών συσχετίζεται με την ταχύτητα της νευρικής αγωγιμότητα (Zhuang et al., 2016). Τα ευρήματά μας είναι σε απόλυτη συμφωνία με αυτή τη θεωρία. Τα αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα από τον λιπώδη ιστό παρουσίασαν βελτιωμένη νευρική αναγέννηση, δεδομένου του μεγαλύτερου αριθμού νευρικών ίνες και της ώριμης μορφολογίας τους. Παρόλο που ο αριθμός των αξόνων ήταν υψηλότερος στα αυτομοσχεύματα, δεν θεωρούμε ότι αυτό το εύρημα σημαίνει ότι τα βλαστοκύτταρα μειονεκτούν. Άλλωστε, παρόλο που ο αριθμός τους ήταν μικρότερος, είχαν μεγαλύτερη διάμετρο και κατ' επέκταση καλύτερη ποιοτικά αναγεννητική ικανότητα έναντι των αυτομοσχευμάτων.

Η οργάνωση των νευρικών ινών και οι νευροτροφικοί παράγοντες παίζουν ουσιαστικό ρόλο στο περιβάλλον της νευρικής αναγέννησης. Σε αυτό το περιβάλλον η τοπική εναπόθεση κυττάρων έχει προσελκύσει αρκετή προσοχή. Τα κύτταρα Schwann μπορεί ίσως να βελτιώσουν το τελικό αποτέλεσμα απομακρύνοντας τα υπολείμματα του τραυματισμού, εκκρίνοντας τροφικούς παράγοντες, και οδηγώντας τους αναγεννημένους άξονες. Ωστόσο, αυτά τα κύτταρα είναι λιγότερο ελκυστικά για τη θεραπεία των νευρικών βλαβών επειδή έχουν δυσκολίες στη συλλογή και καλλιέργειά τους. Τα βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό φαίνονται να υπόσχονται περισσότερα, δεδομένου ότι είναι πολυδύναμα και έχουν αυτοαναγεννητικές ιδιότητες (L. Jiang, Mee, Zhou, & Jia, 2022; G. Lundborg & Kanje, 1996; R. Zhang & Rosen, 2018).

Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτής της μελέτης, τα ευεργετικά αποτελέσματα των βλαστοκυττάρων στην αναγέννηση των νεύρων υποστηρίζονται και σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία (Dar et al., 2023; Dezawa, Takahashi, Esaki, Takano, & Sawada, 2001; di Summa et al., 2010; Gonzalez-Cubero et al., 2022; Karakol, Kapi, Karaoz, Tunik, & Bozkurt, 2022; Kayhan Kustepe et al., 2022; Kingham et al., 2007; Wakao et al., 2010; Yalcin, Bora, Erdogan, Cakir, & Erbas, 2023). Τα κύτταρα αυτά μπορούν να μεταμοσχευθούν αδιαφοροποίητα ή μετά από μια περίοδο *in vitro* διαφοροποίησης σε κύτταρα που ομοιάζουν τα Schwann (Dezawa et al., 2001; Tohill, Mantovani, Wiberg, & Terenghi, 2004; Watanabe, Sasaki, Matsumine, Yamato, & Okano, 2017). Τα θεωρητικά οφέλη της διαφοροποίησης περιλαμβάνουν την ανώτερη *in vivo* βιωσιμότητα και την υπεροχή έκκρισης νευροτροφικών παραγόντων και κατ' επέκταση μυελινοτικής ικανότητας (Tomita et al., 2013; Walsh et al., 2012). Κάποιοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι μόνο τα διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να έχουν ευεργετικές ιδιότητες στη νευρική αποκατάσταση ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι και οι δύο τύποι κυττάρων βοηθούν την αναγέννηση με παρόμοια αποτελέσματα (Saffari, Saffari, Vyas, Mardini, & Shin, 2022; Watanabe et al., 2017). Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι τα αδιαφοροποίητα κύτταρα μπορεί να υποστούν *in vivo* διαφοροποίηση ως απόκριση σε τοπικά ερεθίσματα (Hu, Zhu, Liu, Xu, & Zhu, 2007; Tohill et al., 2004; Wang et al., 2008), ενώ άλλες δεν το επιβεβαιώνουν (Costa et al., 2013; Erba et al., 2010; Santiago, Clavijo-Alvarez, Brayfield, Rubin, & Marra, 2009). Υπάρχουν επίσης αναφορές ότι η μεταμόσχευση μη διαφοροποιημένων κυττάρων ενέχει τον κίνδυνο *in vivo* διαφοροποίησης προς άλλες σειρές (μη νευρικές), μετά την απόκριση σε ερεθίσματα άλλων κυρίαρχων κυττάρων της περιοχής. Κάποιοι ερευνητές ισχυρίζονται ότι η *in vitro* διαφοροποίηση επιφέρει μια περιττή καθυστέρηση περιορίζοντας πολύ την κλινική εφαρμογή. Σε μια μελέτη υποστηρίζεται μάλιστα ότι η διαδικασία διαφοροποίησης μείωσε στην πραγματικότητα την έκκριση των νευροτροφικών παραγόντων (Hong et al., 2011). Έχουν περιγραφεί επίσης δυσκολίες στη διατήρηση της *in vivo* διαφοροποίησης με κάποιους συγγραφείς να υποστηρίζουν ότι τα

κύτταρα τείνουν να επανέλθουν στον αρχικό τους φαινότυπο μετά την επεξεργασία τους (Keilhoff, Goihl, Langnäse, Fansa, & Wolf, 2006). Σε γενικές γραμμές, ένας μικρός αριθμός ερευνητών έχει συγκρίνει ευθέως τα διαφοροποιημένα με τα μη διαφοροποιημένα βλαστοκύτταρα στη νευρική αναγέννηση. Μερικοί από αυτούς έδειξαν μικρό πλεονέκτημα των διαφοροποιημένων κυττάρων (Shimizu et al., 2007; Tohill et al., 2004), άλλοι μικρό πλεονέκτημα των αδιαφοροποίητων (Salomone et al., 2013) και άλλοι καμία σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Erba et al., 2010; Orbay, Uysal, Hyakusoku, & Mizuno, 2012). Αν και τα διαφοροποιημένα βλαστοκύτταρα αποδίδουν αρκετά καλά αποτελέσματα, δε φαίνεται να έχουν ξεκάθαρη υπεροχή. Η μακρά διαδικασία διαφοροποίησής τους δεν τα κάνει εύχρηστα και σε κάποιες περιπτώσεις ίσως να προκαλεί και ανησυχία (Faroni, Smith, Lu, & Reid, 2016; Kingham et al., 2007; R. Zhang & Rosen, 2018).

Ο μηχανισμός δράσης των βλαστοκυττάρων στη νευρική αναγέννηση εξακολουθεί να είναι υπό συζήτηση. Επικρατούν δυο θεωρίες. Η μια θέλει τα κύτταρα αυτά να διαφοροποιούνται προς κύτταρα Schwann και να προάγουν την νευρική αναγέννηση, ενώ η άλλη υποστηρίζει ότι η τροφικές ιδιότητες των κυττάρων αυτών είναι το κλειδί της επιτυχίας, και όχι η διαφοροποίησή τους. Όταν επηρεάζονται από διάφορα γειτνιάζοντα ερεθίσματα, τα βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό μπορούν να ενισχύσουν την έκκριση αυξητικών παραγόντων (Saffari et al., 2022). Οι παρακρινικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα βλαστοκύτταρα ενεργοποιούνται υπό στρεσογόνες συνθήκες. Αυτό ονομάζεται «παρακρινής υπόθεση» των βλαστοκυττάρων (Saffari et al., 2022; Tompkins et al., 2018). Ο Glial-derived neurotrophic factor (GDNF), ο brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ο insulin-like growth factor-I (IGF-I), νευρικός αυξητικός παράγοντας (nerve growth factor, NGF) και η αγγειοποιητίνη 1 (Ang-1) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες της διαδικασίας αυτής (Salgado et al., 2010). Τα βλαστοκύτταρα έχουν επίσης τη δυνατότητα να αναστέλλουν το θάνατο των νευρικών κυττάρων και τη μυϊκή ατροφία μετά από νευρικό τραυματισμό (R. Zhang & Rosen, 2018). Η αντιαποπτωτική ιδιότητα τους μπορεί να προκληθεί μέσω της απελευθέρωσης των

BDNF, NGF και GDNF, ενώ επάγεται η νευροπροστατευτική τους δράση μέσω της έκκρισης IGF-1 και BDNF (Reid et al., 2011). Τέλος, μια από τις ανοσοτροποποιητικές τους ιδιότητες προάγεται από τους ρυθμιστές των T κυττάρων και τη μείωση της ιντερλευκίνης-10 (IL-10). Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται να επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον της νευρικής αναγέννησης (R. Zhang & Rosen, 2018).

Το ερώτημα αν τα κύτταρα πρέπει να διαφοροποιούνται ή όχι πριν τη χορήγησή τους στα πλαίσια της θεραπείας του νευρικού τραυματισμού παραμένει ανοιχτό ως πεδίο περεταίρω έρευνας. Στη μελέτη αυτή δε συγκρίναμε την επίδραση των διαφοροποιημένων και των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων. Ωστόσο, η ευεργετική επίδραση των τελευταίων στην αναγέννηση των περιφερικών νεύρων μας κάνει να πιστεύουμε πως μέχρι να προκύψουν σαφή στοιχεία ότι η διαφοροποίηση είναι ανώτερη, η χρήση αδιαφοροποίητων κυττάρων είναι πιο ρεαλιστική και κλινικά μεταφράσιμη επιλογή (G. N. Panagopoulos et al., 2023). Η βελτιστοποίηση του αποτελέσματος ίσως εξαρτάται σε κάποιο βαθμό και από την μέθοδο χορήγησης που επίσης χρήζει περεταίρω μελέτης.

Συμπεράσματα

Σε αυτή τη μελέτη η χρήση νευρικών αγωγών γεφύρωσης περιφερικών νεύρων με έλλειμμα 10 εκατοστών είχε ως αποτέλεσμα την επιτυχή νευρική αναγέννηση. Η λειτουργικότητα και τα μορφολογικά αποτελέσματα ήταν ανώτερα όταν το έλλειμμα αντιμετωπίστηκε με αυτομοσχεύματα η με αγωγούς και αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα. Δε φάνηκε ιδιαίτερη διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο τελευταίων θεραπευτικών στρατηγικών, κάνοντας τα βλαστοκύτταρα περισσότερο ελκυστικά δεδομένου ότι έχουν μειωμένη νοσηρότητα κατά τη συλλογή τους. Η αξιολόγηση των διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων λιπώδους ιστού, τα διαφορετικά σημεία συλλογής κυττάρων, και η σήμανσή τους για παρακολούθηση της νευρικής αναγέννησης θα πρέπει να εξεταστούν περεταίρω σε μελλοντικές μελέτες.

Περίληψη

Εισαγωγή

Αυτή η μελέτη αξιολόγησε την επίδραση των αδιαφοροποίητων βλαστοκυττάρων από λιπώδη ιστό (ADSCs) στην περιφερική νευρική αναγέννηση. Συγκρίθηκε το κλινικό αποτέλεσμα που προέκυψε μετά τη χρήση αδιαφοροποίητων ADSCs σε συνδυασμό με νευροαγωγούς με εκείνο των νευρικών αυτομοσχευμάτων και εκείνο των απλών νευροαγωγών, σε πειραματικό μοντέλο πλήρους διατομής του ισχιακού νεύρου σε επίμυες.

Υλικό & Μέθοδοι

Σαράντα επίμυες Wistar κατανεμήθηκαν εξίσου σε τέσσερις ομάδες. Στην ομάδα ελέγχου (SHAM) το ισχιακό νεύρο παρασκευάστηκε χωρίς να γίνει άλλη παρέμβαση. Στην ομάδα απλών νευροαγωγών (SLN) δημιουργήθηκε ένα νευρικό έλλειμμα 10 χιλ. το οποίο γεφυρώθηκε με αγωγό γέλης ινικής που περιείχε φυσιολογικό ορό. Στην ομάδα των αυτομοσχευμάτων (AUTO) το έλλειμμα του νεύρου δημιουργήθηκε με την αφαίρεση τμήματος 10 χιλ. του ισχιακού νεύρου το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως ανάστροφο νευρικό μόσχευμα. Στην ομάδα ADSC, αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα λιπώδους ιστού τοποθετήθηκαν μέσα στον αυλό του νευροαγωγού μετά τη γεφύρωση του ελλείμματος. Η νευρική αναγέννηση αξιολογήθηκε με ανάλυση βάδισης, ηλεκτρομυογραφία και νευροϊστομορφομετρία.

Αποτελέσματα

Τα κλινικά και μικροσκοπικά ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι νευρική αναγέννηση επιτεύχθηκε σε όλες τις ομάδες 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Η ανάλυση βάδισης έδειξε καλύτερη λειτουργική αποκατάσταση στις ομάδες AUTO και ADSC, αλλά δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ τους. Η ανάκτηση της λειτουργίας του πάσχοντος μέλους επιτεύχθηκε επίσης στην

ομάδα SLN αλλά με όχι τόσο ικανοποιητικό αποτέλεσμα ($P < 0,05$). Η ηλεκτρομυογραφία έδειξε ανώτερη αναγέννηση των νευρών στις ομάδες AUTO και ADSC σε σύγκριση με την ομάδα SLN ($P < 0,05$), χωρίς ουσιαστική διαφορά μεταξύ των δύο πρώτων ομάδων. Ομοίως, η ιστολογική εξέταση έδειξε ανώτερα αποτελέσματα στις ομάδων AUTO και ADSC, χωρίς ουσιαστική διαφορά μεταξύ τους, αλλά πολύ καλύτερη απόδοση από την ομάδα SLN ($P < 0,001$). Δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές σε καμία ομάδα της μελέτης.

Συμπέρασμα

Επιτυχής περιφερική νευρική αναγέννηση μπορεί να επιτευχθεί με τη γεφύρωση νευρικού ελλείμματος 10 χιλ με νευροαγωγούς. Ανώτερη νευρική αναγέννηση αναμένεται όταν στους αγωγούς προστεθούν αδιαφοροποίητα βλαστοκύτταρα λιπώδους ιστού. Ομοίως καλά αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν μετά τη γεφύρωση του ελλείμματος με νευρικά αυτομοσχεύματα.

Abstract

Introduction

This study assessed the impact of undifferentiated adipose-derived stem cells (ADSCs) in peripheral nerve regeneration. The clinical outcome of undifferentiated ADSCs combined with nerve conduits was compared with the one of nerve autografts and this of simple conduits in the context of peripheral nerve regeneration in an experimental model of sciatic nerve complete transection in rats.

Materials & Methods

Forty Wistar rats were equally distributed in four groups. In the SHAM surgery group, the sciatic nerve was dissected but no further intervention was done. In the simple conduit group (SLN), a 10-mm nerve gap was created and subsequently bridged with a fibrin glue conduit that was filled with normal saline. In the autograft group, nerve defect was produce removing 10 mm of the sciatic nerve, which was then used as a reverse autograft. In the ADSC group, the conduit was filled with undifferentiated ADSCs after defect bridging. Nerve regeneration was assessed by means of walking track analysis, electromyography, and neurohistomorphometry.

Results

The clinical and microscopical outcome of this study showed that nerve regeneration was achieved in all groups at 12 weeks postoperatively. Walking track analysis confirmed functional recovery in the AUTO and ADSC groups, but there was no difference between them. Recovery in function was also achieved in the SLN group, but with inferior outcome ($P<0.05$). Electromyography demonstrated superior nerve regeneration in the AUTO and ADSC groups as compared with the SLN group ($P<0.05$), with no substantial difference between the two former groups. Similarly, histologic examination showed similar superior results in the AUTO

and ADSC groups, which both outperformed the SLN group ($P < 0.001$). No complications were observed in any of the study groups.

Conclusion

Successful peripheral nerve regeneration can be accomplished after bridging a 10-mm nerve defect with nerve conduits. Superior nerve regeneration is expected when the conduits are loaded with undifferentiated ADSCs. Similar outcomes can be achieved by bridging the defect with nerve autographs.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, F. (1972). *The genuine works of Hippocrates*. Huntington, N.Y.: R.E. Krieger Pub. Co.
- Albert, E. (1878). *Verhandlung des Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Vereins in Innsbruck*, 9, 97-121.
- Albert, E. (1885). Einige operationem an nerven. *Wien Med*, 26, 1222.
- Amoh, Y., Aki, R., Hamada, Y., Niiyama, S., Eshima, K., Kawahara, K., Katsuoka, K. (2012). Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol*, 39(1), 33-38. doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01413.x
- Artico, M., Cervoni, L., Nucci, F., & Giuffre, R. (1996). Birthday of peripheral nervous system surgery: the contribution of Gabriele Ferrara (1543-1627). *Neurosurgery*, 39(2), 380-382; discussion 382-383. doi:10.1097/00006123-199608000-00030
- Askari, N., Yaghoobi, M. M., Shamsara, M., & Esmaeili-Mahani, S. (2015). Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neuroscience*, 305, 197-208. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.088
- Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C., & Prockop, D. J. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3908-3913. doi:10.1073/pnas.95.7.3908
- Bain, J. R., Mackinnon, S. E., & Hunter, D. A. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83(1), 129-138. doi:10.1097/00006534-198901000-00024

- Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D., & Studer, L. (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med*, 2(6), e161. doi:10.1371/journal.pmed.0020161
- Battiston, B., Papalia, I., Tos, P., & Geuna, S. (2009). Peripheral nerve repair and regeneration research: a historical note. *Int Rev Neurobiol*, 87, 1-7. doi:10.1016/S0074-7742(09)87001-3
- Battiston, B., Raimondo, S., Tos, P., Gaidano, V., Audisio, C., Scevola, A., Geuna, S. (2009). Tissue engineering of peripheral nerves. *Int Rev Neurobiol*, 87, 227-249. doi:10.1016/S0074-7742(09)87011-6
- Biernaskie, J. A., McKenzie, I. A., Toma, J. G., & Miller, F. D. (2006). Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc*, 1(6), 2803-2812. doi:10.1038/nprot.2006.422
- Billings-Gagliardi, S. (1977). Mode of locomotion of Schwann cells migrating in vivo. *Am J Anat*, 150(1), 73-87. doi:10.1002/aja.1001500106
- Breidenbach, W. C., & Terzis, J. K. (1986). The blood supply of vascularized nerve grafts. *J Reconstr Microsurg*, 3(1), 43-58. doi:10.1055/s-2007-1007038
- Brushart, T. M. (1988). Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci*, 8(3), 1026-1031. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-03-01026.1988
- Brushart, T. M. (1991). Central course of digital axons within the median nerve of *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol*, 311(2), 197-209. doi:10.1002/cne.903110203
- Byun, S. H., & Ahn, K. M. (2021). Functional and electron-microscopic changes after differential traction injury in the sciatic nerve of a rat. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 43(1), 12. doi:10.1186/s40902-021-00297-4
- Cabaud, H. E., Rodkey, W. G., McCarroll, H. R., Jr., Mutz, S. B., & Niebauer, J. J. (1976). Epineurial and perineurial fascicular nerve repairs: a critical comparison. *J Hand Surg Am*, 1(2), 131-137. doi:10.1016/s0363-5023(76)80006-8

- Carriel, V., Garzón, I., Campos, A., Cornelissen, M., & Alaminos, M. (2017). Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med*, *11*(2), 553-563. doi:10.1002/term.1949
- Cheng, F. C., Tai, M. H., Sheu, M. L., Chen, C. J., Yang, D. Y., Su, H. L., Pan, H. C. (2010). Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg*, *112*(4), 868-879. doi:10.3171/2009.8.JNS09850
- Clause, B. T. (1993). The Wistar rat as a right choice: Establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *Journal of the History of Biology*, *26*(2), 329-349. doi:10.1007/BF01061973
- Clements, I. P., Kim, Y. T., English, A. W., Lu, X., Chung, A., & Bellamkonda, R. V. (2009). Thin-film enhanced nerve guidance channels for peripheral nerve repair. *Biomaterials*, *30*(23-24), 3834-3846. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.022
- Coleman, M. P., Conforti, L., Buckmaster, E. A., Tarlton, A., Ewing, R. M., Brown, M. C., Perry, V. H. (1998). An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, *95*(17), 9985-9990. doi:10.1073/pnas.95.17.9985
- Coleman, M. P., & Freeman, M. R. (2010). Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. *Annu Rev Neurosci*, *33*, 245-267. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153248
- Costa, H. J., Bento, R. F., Salomone, R., Azzi-Nogueira, D., Zanatta, D. B., Paulino Costa, M., Haddad, L. A. (2013). Mesenchymal bone marrow stem cells within polyglycolic acid tube observed in vivo after six weeks enhance facial nerve regeneration. *Brain Res*, *1510*, 10-21. doi:10.1016/j.brainres.2013.03.025
- Crigler, L., Robey, R. C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D., & Phinney, D. G. (2006). Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules

- and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol*, 198(1), 54-64.
doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.029
- Cruikshank, W. (1795). Experiments on the nerves, particular on their reproduction; and on the spinal marrow of living animals. *Philos Trans R Soc London*, 85, 177–189.
- Cui, L., Jiang, J., Wei, L., Zhou, X., Fraser, J. L., Snider, B. J., & Yu, S. P. (2008). Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells*, 26(5), 1356-1365.
doi:10.1634/stemcells.2007-0333
- Daly, W., Yao, L., Zeugolis, D., Windebank, A., & Pandit, A. (2012). A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface*, 9(67), 202-221. doi:10.1098/rsif.2011.0438
- Dar, E. R., Gugjoo, M. B., Farooq, F., Nazir, T., Shah, S. A., Ahmad, S. M., Makhdoomi, D. M. (2023). Mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue for repairing acute sciatic nerve injury in a rabbit model. *Tissue Cell*, 84, 102162.
doi:10.1016/j.tice.2023.102162
- Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M., & Sawada, H. (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci*, 14(11), 1771-1776. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01814.x
- di Summa, P. G., Kingham, P. J., Raffoul, W., Wiberg, M., Terenghi, G., & Kalbermatten, D. F. (2010). Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63(9), 1544-1552. doi:10.1016/j.bjps.2009.09.012
- Diao, E., & Vannuyen, T. (2000). Techniques for primary nerve repair. *Hand Clin*, 16(1), 53-66

- Doi, K., Tamaru, K., Sakai, K., Kuwata, N., Kurafuji, Y., & Kawai, S. (1992). A comparison of vascularized and conventional sural nerve grafts. *J Hand Surg Am*, *17*(4), 670-676. doi:10.1016/0363-5023(92)90315-g
- Driscoll, P. J., Glasby, M. A., & Lawson, G. M. (2002). An in vivo study of peripheral nerves in continuity: biomechanical and physiological responses to elongation. *J Orthop Res*, *20*(2), 370-375. doi:10.1016/S0736-0266(01)00104-8
- Dyck, P. J., & Thomas, P. K. (2005). *Peripheral neuropathy* (4th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Erba, P., Mantovani, C., Kalbermatten, D. F., Pierer, G., Terenghi, G., & Kingham, P. J. (2010). Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *63*(12), e811-817. doi:10.1016/j.bjps.2010.08.013
- Evans, P. J., Bain, J. R., Mackinnon, S. E., Makino, A. P., & Hunter, D. A. (1991). Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res*, *559*(2), 315-321. doi:10.1016/0006-8993(91)90018-q
- Fairbairn, N. G., Meppelink, A. M., Ng-Glazier, J., Randolph, M. A., & Winograd, J. M. (2015). Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells*, *7*(1), 11-26. doi:10.4252/wjsc.v7.i1.11
- Fairbairn, N. G., Randolph, M. A., & Redmond, R. W. (2014). The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *67*(5), 662-675. doi:10.1016/j.bjps.2014.01.031
- Farber, S. J., Saheb-Al-Zamani, M., Zieske, L., Laurido-Soto, O., Bery, A., Hunter, D., Mackinnon, S. E. (2013). Peripheral nerve injury after local anesthetic injection. *Anesth Analg*, *117*(3), 731-739. doi:10.1213/ANE.0b013e3182a00767

- Faroni, A., Smith, R. J., Lu, L., & Reid, A. J. (2016). Human Schwann-like cells derived from adipose-derived mesenchymal stem cells rapidly de-differentiate in the absence of stimulating medium. *Eur J Neurosci*, *43*(3), 417-430. doi:10.1111/ejn.13055
- Feng, F. Y., Ogden, M. A., Myckatyn, T. M., Grand, A. G., Jensen, J. N., Hunter, D. A., & Mackinnon, S. E. (2001). FK506 rescues peripheral nerve allografts in acute rejection. *J Neurotrauma*, *18*(2), 217-229. doi:10.1089/08977150150502631
- Flores, A. J., Lavernia, C. J., & Owens, P. W. (2000). Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, *29*(3), 167-173
- Fu, K. Y., Dai, L. G., Chiu, I. M., Chen, J. R., & Hsu, S. H. (2011). Sciatic nerve regeneration by microporous nerve conduits seeded with glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor gene transfected neural stem cells. *Artif Organs*, *35*(4), 363-372. doi:10.1111/j.1525-1594.2010.01105.x
- Fu, S. Y., & Gordon, T. (1995a). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J Neurosci*, *15*(5 Pt 2), 3876-3885. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-05-03876.1995
- Fu, S. Y., & Gordon, T. (1995b). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J Neurosci*, *15*(5 Pt 2), 3886-3895. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-05-03886.1995
- Fu, Y. S., Cheng, Y. C., Lin, M. Y., Cheng, H., Chu, P. M., Chou, S. C., Sung, M. S. (2006). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*, *24*(1), 115-124. doi:10.1634/stemcells.2005-0053
- Glück, T. (1880). Ueber neuroplastik auf dem wege der transplantation. *Arch Klin Chir*, *25*(6), 6.
- Gonzalez-Cubero, E., Gonzalez-Fernandez, M. L., Rodriguez-Diaz, M., Palomo-Irigoyen, M., Woodhoo, A., & Villar-Suarez, V. (2022). Application of adipose-derived

- mesenchymal stem cells in an in vivo model of peripheral nerve damage. *Front Cell Neurosci*, 16, 992221. doi:10.3389/fncel.2022.992221
- Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G., & Fuchs, E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9), 5263-5267. doi:10.1073/pnas.96.9.5263
- Grinsell, D., & Keating, C. P. (2014). Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int*, 2014, 698256. doi:10.1155/2014/698256
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13625-13630. doi:10.1073/pnas.240309797
- Gu, X., Ding, F., Yang, Y., & Liu, J. (2011). Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog Neurobiol*, 93(2), 204-230. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.11.002
- Guillery, R. W. (2005). Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1458), 1281-1307. doi:10.1098/rstb.2003.1459
- Guo, B. F., & Dong, M. M. (2009). Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 140(2), 159-164. doi:10.1016/j.otohns.2008.10.039
- Hawryluk, G. W., Mothe, A., Wang, J., Wang, S., Tator, C., & Fehlings, M. G. (2012). An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev*, 21(12), 2222-2238. doi:10.1089/scd.2011.0596

- Heine, W., Conant, K., Griffin, J. W., & Hoke, A. (2004). Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Exp Neurol*, *189*(2), 231-240. doi:10.1016/j.expneurol.2004.06.014
- Henry, J. L. (2014). Mechanisms of Peripheral Nerve Injury—What to Treat, When to Treat. *Peripheral Neuropathy*, *1*.
- Hong, S. Q., Zhang, H. T., You, J., Zhang, M. Y., Cai, Y. Q., Jiang, X. D., & Xu, R. X. (2011). Comparison of transdifferentiated and untransdifferentiated human umbilical mesenchymal stem cells in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Res*, *36*(12), 2391-2400. doi:10.1007/s11064-011-0567-2
- Hu, J., Zhu, Q. T., Liu, X. L., Xu, Y. B., & Zhu, J. K. (2007). Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol*, *204*(2), 658-666. doi:10.1016/j.expneurol.2006.11.018
- Ide, C. (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*, *25*(2), 101-121. doi:10.1016/0168-0102(96)01042-5
- Ijpma, F. F., Van De Graaf, R. C., & Meek, M. F. (2008). The early history of tubulation in nerve repair. *J Hand Surg Eur Vol*, *33*(5), 581-586. doi:10.1177/1753193408091349
- Isaacs, J. (2022). Reverse End-to-Side (Supercharging) Nerve Transfer: Conceptualization, Validation, and Translation. *Hand (NY)*, *17*(6), 1017-1023. doi:10.1177/1558944720988076
- Jackson, L. J., Serhal, M., Omar, I. M., Garg, A., Michalek, J., & Serhal, A. (2023). Sural nerve: imaging anatomy and pathology. *Br J Radiol*, *96*(1141), 20220336. doi:10.1259/bjr.20220336
- Jiang, L., Mee, T., Zhou, X., & Jia, X. (2022). Augmenting Peripheral Nerve Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*, *18*(2), 544-558. doi:10.1007/s12015-021-10236-5

- Jiang, L., Zhu, J. K., Liu, X. L., Xiang, P., Hu, J., & Yu, W. H. (2008). Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Neuroreport*, *19*(10), 1015-1019. doi:10.1097/WNR.0b013e3283040efc
- Jiang, X., Gwyne, Y., McKeown, S. J., Bronner-Fraser, M., Lutzko, C., & Lawlor, E. R. (2009). Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, *18*(7), 1059-1070. doi:10.1089/scd.2008.0362
- Joannides, A., Gaughwin, P., Schwiening, C., Majed, H., Sterling, J., Compston, A., & Chandran, S. (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet*, *364*(9429), 172-178. doi:10.1016/S0140-6736(04)16630-0
- Johnson, T. S., O'Neill, A. C., Motarjem, P. M., Nazzal, J., Randolph, M., & Winograd, J. M. (2008). Tumor formation following murine neural precursor cell transplantation in a rat peripheral nerve injury model. *J Reconstr Microsurg*, *24*(8), 545-550. doi:10.1055/s-0028-1088228
- Kang, N. U., Lee, S. J., & Gwak, S. J. (2022). Fabrication Techniques of Nerve Guidance Conduits for Nerve Regeneration. *Yonsei Med J*, *63*(2), 114-123. doi:10.3349/ymj.2022.63.2.114
- Karakol, P., Kapi, E., Karaoz, E., Tunik, S., & Bozkurt, M. (2022). Comparison of the Effects of Intratubal Injection of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Sciatic Nerve Transection: An Experimental Study. *Ann Plast Surg*, *88*(4), 460-466. doi:10.1097/SAP.0000000000003040
- Kayhan Kustepe, E., Altunkaynak, B. Z., Alkan, I., Kivrak, E. G., Yildiran, A., & Geuna, S. (2022). Potential Effects of Stem Cells Derived from the Peripheral Nerve and Adipose Tissue after the Nerve Crush Injury in Control and Obese Rats. *J Invest Surg*, *35*(5), 1021-1033. doi:10.1080/08941939.2021.1991530

- Keilhoff, G., Gohl, A., Langnase, K., Fansa, H., & Wolf, G. (2006). Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol*, 85(1), 11-24. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.021
- Kerschensteiner, M., Schwab, M. E., Lichtman, J. W., & Misgeld, T. (2005). In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med*, 11(5), 572-577. doi:10.1038/nm1229
- Khuong, H. T., Kumar, R., Senjaya, F., Grochmal, J., Ivanovic, A., Shakhbazau, A., Midha, R. (2014). Skin derived precursor Schwann cells improve behavioral recovery for acute and delayed nerve repair. *Exp Neurol*, 254, 168-179. doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.002
- Kim, J. H., Choi, Y. J., Park, H. I., & Ahn, K. M. (2022). The effect of FK506 (tacrolimus) loaded with collagen membrane and fibrin glue on promotion of nerve regeneration in a rat sciatic nerve traction injury model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 44(1), 14. doi:10.1186/s40902-022-00339-5
- Kim, Y. T., Haftel, V. K., Kumar, S., & Bellamkonda, R. V. (2008). The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials*, 29(21), 3117-3127. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.042
- Kingham, P. J., Kalbermatten, D. F., Mahay, D., Armstrong, S. J., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2007). Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*, 207(2), 267-274. doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.029
- Kingham, P. J., Kolar, M. K., Novikova, L. N., Novikov, L. N., & Wiberg, M. (2014). Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*, 23(7), 741-754. doi:10.1089/scd.2013.0396
- Klein, S. M., Vykoukal, J., Li, D. P., Pan, H. L., Zeitler, K., Alt, E., Prantl, L. (2016). Peripheral Motor and Sensory Nerve Conduction following Transplantation of Undifferentiated

- Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells in a Biodegradable U.S. Food and Drug Administration-Approved Nerve Conduit. *Plast Reconstr Surg*, 138(1), 132-139. doi:10.1097/prs.0000000000002291
- Koopmans, G., Hasse, B., & Sinis, N. (2009). The role of collagen in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol*, 87, 363-379. doi:10.1016/S0074-7742(09)87019-0
- Krarup, C., Archibald, S. J., & Madison, R. D. (2002). Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol*, 51(1), 69-81. doi:10.1002/ana.10054
- Ladenheim, J. C. (1989). *Leonard of Bertapaglia: On Nerve Injuries and Skull Fractures*: Futura Publishing Company.
- Landon, D. N. (1976). *The Peripheral nerve*. London New York Wiley & Sons,: Chapman and Hall.
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 25(12), 1468-1475. doi:10.1038/nbt1365
- Lee, S. K., & Wolfe, S. W. (2000). Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*, 8(4), 243-252. doi:10.5435/00124635-200007000-00005
- Lenoble, E., Sokolow, C., Ebelin, M., Rigot, J., Dabos, N., Lemerle, J. P., & Vilain, R. (1989). [Results of the primary repair of 28 isolated median nerve injuries in the wrist]. *Ann Chir Main*, 8(4), 347-351. doi:10.1016/s0753-9053(89)80034-1
- Létiévant, J. J. É. (1873). *Traité des sections nerveuses: physiologie pathologique, indications, procédés opératoires*: Baillière.
- Li, Y., Guo, L., Ahn, H. S., Kim, M. H., & Kim, S. W. (2014). Amniotic mesenchymal stem cells display neurovascular tropism and aid in the recovery of injured peripheral nerves. *J Cell Mol Med*, 18(6), 1028-1034. doi:10.1111/jcmm.12249

- Liard, O., Segura, S., Sagui, E., Nau, A., Pascual, A., Cambon, M., Moyse, E. (2012). Adult-brain-derived neural stem cells grafting into a vein bridge increases postlesional recovery and regeneration in a peripheral nerve of adult pig. *Stem Cells Int*, 2012, 128732. doi:10.1155/2012/128732
- Lin, H., Liu, F., Zhang, C., Zhang, Z., Guo, J., Ren, C., & Kong, Z. (2009). Pluripotent hair follicle neural crest stem-cell-derived neurons and schwann cells functionally repair sciatic nerves in rats. *Mol Neurobiol*, 40(3), 216-223. doi:10.1007/s12035-009-8082-z
- Lin, Y. C., & Marra, K. G. (2012). Injectable systems and implantable conduits for peripheral nerve repair. *Biomed Mater*, 7(2), 024102. doi:10.1088/1748-6041/7/2/024102
- Liu, G., Cheng, Y., Guo, S., Feng, Y., Li, Q., Jia, H., Tong, X. (2011). Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int J Mol Med*, 28(4), 565-572. doi:10.3892/ijmm.2011.725
- Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakraborty, S., Holekamp, T. F., & McDonald, J. W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), 6126-6131. doi:10.1073/pnas.97.11.6126
- Lopatina, T., Kalinina, N., Karagyaur, M., Stambolsky, D., Rubina, K., Revischin, A., Tkachuk, V. (2011). Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One*, 6(3), e17899. doi:10.1371/journal.pone.0017899
- Lu, P., Jones, L. L., Snyder, E. Y., & Tuszynski, M. H. (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 181(2), 115-129. doi:10.1016/s0014-4886(03)00037-2
- Lundborg, G. (1968). Microvascular structure and function of peripheral nerves. Vital microscopic studies of the tibial nerve in the rabbit. *Adv. Microcirc*, 1, 66-88.

- Lundborg, G. (2002). Enhancing posttraumatic nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst*, 7(3), 139-140. doi:10.1046/j.1529-8027.2002.02019.x
- Lundborg, G., Gelberman, R. H., Longo, F. M., Powell, H. C., & Varon, S. (1982). In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. *J Neuropathol Exp Neurol*, 41(4), 412-422. doi:10.1097/00005072-198207000-00004
- Lundborg, G., & Kanje, M. (1996). Bioartificial nerve grafts. A prototype. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 30(2), 105-110. doi:10.3109/02844319609056391
- Lundborg, G., & Rydevik, B. (1973). Effects of stretching the tibial nerve of the rabbit. A preliminary study of the intraneural circulation and the barrier function of the perineurium. *J Bone Joint Surg Br*, 55(2), 390-401
- Lundborg, G., & Schildt, B. (1971). Microvascular permeability in irradiated rabbits. *Acta Radiol Ther Phys Biol*, 10(3), 311-320. doi:10.3109/02841867109130795
- Mackinnon, S. E. (2015). *Nerve surgery*
- Mackinnon, S. E., & Dellon, A. L. (1988). *Surgery of the peripheral nerve*. New York Stuttgart; New York: Thieme Medical Publishers;G. Thieme Verlag.
- Mackinnon, S. E., Doolabh, V. B., Novak, C. B., & Trulock, E. P. (2001). Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*, 107(6), 1419-1429. doi:10.1097/00006534-200105000-00016
- Mantovani, C., Mahay, D., Kingham, M., Terenghi, G., Shawcross, S. G., & Wiberg, M. (2010). Bone marrow- and adipose-derived stem cells show expression of myelin mRNAs and proteins. *Regen Med*, 5(3), 403-410. doi:10.2217/rme.10.15
- Marconi, S., Castiglione, G., Turano, E., Bissolotti, G., Angiari, S., Farinazzo, A., Bonetti, B. (2012). Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*, 18(11-12), 1264-1272. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0491

- Martens, W., Sanen, K., Georgiou, M., Struys, T., Bronckaers, A., Ameloot, M., Lambrichts, I. (2014). Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *FASEB J*, 28(4), 1634-1643. doi:10.1096/fj.13-243980
- Matsuse, D., Kitada, M., Kohama, M., Nishikawa, K., Makinoshima, H., Wakao, S., Dezawa, M. (2010). Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69(9), 973-985. doi:10.1097/NEN.0b013e3181eff6dc
- McKenzie, I. A., Biernaskie, J., Toma, J. G., Midha, R., & Miller, F. D. (2006). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci*, 26(24), 6651-6660. doi:10.1523/JNEUROSCI.1007-06.2006
- Meek, M. F., & Coert, J. H. (2002). Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg*, 18(2), 97-109. doi:10.1055/s-2002-19889
- Megaloikonos, P.D., Panagopoulos, G.N., Bami, M., Igoumenou, V. G., Dimopoulos, L., Milonaki, A., Kyriakidou, M., Mitsiokapa, E., Anastassopouou, J., Mavrogenis, A.F. (2018). Harvesting, Isolation and Differentiation of Rat Adipose-Derived Stem Cells. *Curr Pharm Biotechnol*, 19(1), 19-29. doi:10.2174/1389201019666180418101323
- Menorca, R. M., Fussell, T. S., & Elfar, J. C. (2013). Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*, 29(3), 317-330. doi:10.1016/j.hcl.2013.04.002
- Millesi, H. (1986). The nerve gap. Theory and clinical practice. *Hand Clin*, 2(4), 651-663
- Mizuno, H. (2009). Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*, 76(2), 56-66. doi:10.1272/jnms.76.56

- Mogosanu, G. D., & Grumezescu, A. M. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm*, 463(2), 127-136. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.12.015
- Mohammadi, R., Azizi, S., & Amini, K. (2013). Effects of undifferentiated cultured omental adipose-derived stem cells on peripheral nerve regeneration. *J Surg Res*, 180(2), e91-97. doi:10.1016/j.jss.2012.04.011
- Mohammadi, R., Azizi, S., Delirezh, N., Hobbenaghi, R., Amini, K., & Malekhetabi, P. (2012). The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41(5), 650-656. doi:10.1016/j.ijom.2011.10.028
- Moore, M. J., Friedman, J. A., Lewellyn, E. B., Mantila, S. M., Krych, A. J., Ameenuddin, S., Yaszemski, M. J. (2006). Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials*, 27(3), 419-429. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.045
- Moradzadeh, A., Borschel, G. H., Luciano, J. P., Whitlock, E. L., Hayashi, A., Hunter, D. A., & Mackinnon, S. E. (2008). The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol*, 212(2), 370-376. doi:10.1016/j.expneurol.2008.04.012
- Muheremu, A., & Ao, Q. (2015). Past, Present, and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Biomed Res Int*, 2015, 237507. doi:10.1155/2015/237507
- Murakami, T., Fujimoto, Y., Yasunaga, Y., Ishida, O., Tanaka, N., Ikuta, Y., & Ochi, M. (2003). Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*, 974(1-2), 17-24. doi:10.1016/s0006-8993(03)02539-3
- Muschler, G. F., Nitto, H., Boehm, C. A., & Easley, K. A. (2001). Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*, 19(1), 117-125. doi:10.1016/S0736-0266(00)00010-3
- Myckatyn, T. M., & Mackinnon, S. E. (2004). A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res*, 26(2), 124-138. doi:10.1179/016164104225013743

- Naff, N. J., & Ecklund, J. M. (2001). History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurg Clin N Am*, 12(1), 197-209
- Ni, H. C., Tseng, T. C., Chen, J. R., Hsu, S. H., & Chiu, I. M. (2013). Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap. *Biofabrication*, 5(3), 035010. doi:10.1088/1758-5082/5/3/035010
- Nijhuis, T. H., Brzezicki, G., Klimczak, A., & Siemionow, M. (2010). Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery*, 30(8), 639-645. doi:10.1002/micr.20818
- Nosrat, I. V., Widenfalk, J., Olson, L., & Nosrat, C. A. (2001). Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*, 238(1), 120-132. doi:10.1006/dbio.2001.0400
- Oprych, K. M., Whitby, R. L., Mikhalovsky, S. V., Tomlins, P., & Adu, J. (2016). Repairing Peripheral Nerves: Is there a Role for Carbon Nanotubes? *Adv Healthc Mater*, 5(11), 1253-1271. doi:10.1002/adhm.201500864
- Orbay, H., Uysal, A. C., Hyakusoku, H., & Mizuno, H. (2012). Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 65(5), 657-664. doi:10.1016/j.bjps.2011.11.035
- Pan, H. C., Cheng, F. C., Chen, C. J., Lai, S. Z., Lee, C. W., Yang, D. Y., Ho, S. P. (2007). Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci*, 14(11), 1089-1098. doi:10.1016/j.jocn.2006.08.008
- Panagopoulos, G. N., Megaloikonomos, P. D., & Mavrogenis, A. F. (2017). The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics*, 40(1), e141-e156. doi:10.3928/01477447-20161019-01

- Panagopoulos, G. N., Megaloikonomos, P. D., & Mavrogenis, A. F. (2019). Current Trends and Future Perspectives for Peripheral Nerve Regeneration. In D. Duscher & M. A. Shiffman (Eds.), *Regenerative Medicine and Plastic Surgery: Skin and Soft Tissue, Bone, Cartilage, Muscle, Tendon and Nerves* (pp. 411-423). Cham: Springer International Publishing.
- Panagopoulos, G.N., Megaloikonomos, P.D., Mitsiokapa, E.A., Bami, M., Agrogiannis, G., Johnson, E.O., Soucacos, P.N., Papagelopoulos, P.J., Mavrogenis, A.F. (2023). Adipose-Derived Stem Cells and Tacrolimus Improve Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Defect Model. *Orthopedics*, 46(6), e353-e361. doi:10.3928/01477447-20230407-01
- Panerai, A. E., Sacerdote, P., Brini, A., Bianchi, M., & Mantegazza, P. (1987). Autotomy and central nervous system neuropeptides after section of the sciatic nerve in rats of different strains. *Pharmacol Biochem Behav*, 28(3), 385-388. doi:10.1016/0091-3057(87)90458-8
- Papalia, I., Geuna, S., D'Alcontres, F. S., & Tos, P. (2007). Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*, 27(1), 56-61. doi:10.1002/micr.20303
- Paspala, S. A., Murthy, T. V., Mahaboob, V. S., & Habeeb, M. A. (2011). Pluripotent stem cells - a review of the current status in neural regeneration. *Neurol India*, 59(4), 558-565. doi:10.4103/0028-3886.84338
- Peng, J., Wang, Y., Zhang, L., Zhao, B., Zhao, Z., Chen, J., Lu, S. (2011). Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Res Bull*, 84(3), 235-243. doi:10.1016/j.brainresbull.2010.12.013
- Philipeaux, J.-M., & Vulpian, A. (1859). *Note sur des expériences démontrant que des nerfs séparés des centres nerveux peuvent, après s' être altérés complètement, se régénérer tout en demeurant isolés de ces centres, et recouvrer leurs propriétés physiologiques.*

- Qin, Y., Ge, G., Yang, P., Wang, L., Qiao, Y., Pan, G., . . . Geng, D. (2023). An Update on Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Where Challenge Meets Opportunity. *Adv Sci (Weinh)*, *10*(20), e2207334. doi:10.1002/advs.202207334
- Quigley, A. F., Bulluss, K. J., Kyratzis, I. L., Gilmore, K., Mysore, T., Schirmer, K. S., Kapsa, R. M. (2013). Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve. *J Neural Eng*, *10*(1), 016008. doi:10.1088/1741-2560/10/1/016008
- Raheja, A., Suri, V., Suri, A., Sarkar, C., Srivastava, A., Mohanty, S., Pandey, R. M. (2012). Dose-dependent facilitation of peripheral nerve regeneration by bone marrow-derived mononuclear cells: a randomized controlled study: laboratory investigation. *J Neurosurg*, *117*(6), 1170-1181. doi:10.3171/2012.8.JNS111446
- Rando, T. A. (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, *441*(7097), 1080-1086. doi:10.1038/nature04958
- Ray, W. Z., Kasukurthi, R., Yee, A., & Mackinnon, S. E. (2010). Functional recovery following an end to side neurorrhaphy of the accessory nerve to the suprascapular nerve: case report. *Hand (N Y)*, *5*(3), 313-317. doi:10.1007/s11552-009-9242-3
- Ray, W. Z., & Mackinnon, S. E. (2010). Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol*, *223*(1), 77-85. doi:10.1016/j.expneurol.2009.03.031
- Reid, A. J., Sun, M., Wiberg, M., Downes, S., Terenghi, G., & Kingham, P. J. (2011). Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience*, *199*, 515-522. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.09.064
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., & Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *19*(12), 1134-1140. doi:10.1038/nbt1201-1134

- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., & Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, *12*(11), 4565-4574. doi:10.1523/JNEUROSCI.12-11-04565.1992
- Ribeiro-Resende, V. T., Pimentel-Coelho, P. M., Mesentier-Louro, L. A., Mendez, R. M., Mello-Silva, J. P., Cabral-da-Silva, M. C., Mendez-Otero, R. (2009). Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increases peripheral nerve regeneration by acting on both neuronal and glial cell populations. *Neuroscience*, *159*(2), 540-549. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.12.059
- Richner, M., Ferreira, N., Dudele, A., Jensen, T. S., Vaegter, C. B., & Goncalves, N. P. (2018). Functional and Structural Changes of the Blood-Nerve-Barrier in Diabetic Neuropathy. *Front Neurosci*, *12*, 1038. doi:10.3389/fnins.2018.01038
- Rutkowski, G. E., Miller, C. A., Jeftinija, S., & Mallapragada, S. K. (2004). Synergistic effects of micropatterned biodegradable conduits and Schwann cells on sciatic nerve regeneration. *J Neural Eng*, *1*(3), 151-157. doi:10.1088/1741-2560/1/3/004
- Saffari, T. M., Saffari, S., Vyas, K. S., Mardini, S., & Shin, A. Y. (2022). Role of adipose tissue grafting and adipose-derived stem cells in peripheral nerve surgery. *Neural Regen Res*, *17*(10), 2179-2184. doi:10.4103/1673-5374.336870
- Salgado, A. J., Reis, R. L., Sousa, N. J., & Gimble, J. M. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, *5*(2), 103-110. doi:10.2174/157488810791268564
- Salomone, R., Bento, R. F., Costa, H. J., Azzi-Nogueira, D., Ovando, P. C., Da-Silva, C. F., Haddad, L. A. (2013). Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle Nerve*, *48*(3), 423-429. doi:10.1002/mus.23768
- Santiago, L. Y., Clavijo-Alvarez, J., Brayfield, C., Rubin, J. P., & Marra, K. G. (2009). Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair. *Cell Transplant*, *18*(2), 145-158. doi:10.3727/096368909788341289

- Seddon, H. (1943). Three types of nerve injury. *Brain*, 4(66), 237-288.
- Seddon, H. (1975). *Surgical disorders of the peripheral nerves* (2d ed.). Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone.
- Seddon, H. J. (1943). Peripheral Nerve Injuries. *Glasgow Med J*, 139(3), 61-75
- Shanthaveerappa, T. R., & Bourne, G. H. (1964). The perineural epithelium of sympathetic nerves and ganglia and its relation to the pia arachnoid of the central nervous system and perineural epithelium of the peripheral nervous system. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 61, 742-753. doi:10.1007/bf00342622
- Shimizu, S., Kitada, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Wakao, S., & Dezawa, M. (2007). Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(4), 915-920. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.212
- Smoliar, E., Smoliar, A., & Belkin, V. S. (1999). Innervation of human trigeminal nerve blood vessels. *Cells Tissues Organs*, 165(1), 40-44.
- Snyder, E. Y., Deitcher, D. L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweg, E. A., & Cepko, C. L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*, 68(1), 33-51. doi:10.1016/0092-8674(92)90204-p
- Sowa, Y., Imura, T., Numajiri, T., Nishino, K., & Fushiki, S. (2012). Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev*, 21(11), 1852-1862. doi:10.1089/scd.2011.0403
- Stoll, G., Jander, S., & Myers, R. R. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst*, 7(1), 13-27. doi:10.1046/j.1529-8027.2002.02002.x
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 54(3), 132-141. doi:10.2302/kjm.54.132

- Streppel, M., Heiser, T., & Stennert, E. (2000). [Historical development of facial nerve surgery with special reference to hypoglossal-facial nerve anastomosis]. *HNO*, 48(11), 801-808. doi:10.1007/s001060050665
- Sugimura-Wakayama, Y., Katagiri, W., Osugi, M., Kawai, T., Ogata, K., Sakaguchi, K., & Hibi, H. (2015). Peripheral Nerve Regeneration by Secretomes of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Stem Cells Dev*, 24(22), 2687-2699. doi:10.1089/scd.2015.0104
- Sun, F., Zhou, K., Mi, W. J., & Qiu, J. H. (2011). Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neurosci Lett*, 499(2), 104-108. doi:10.1016/j.neulet.2011.05.043
- Sunderland, S. (1945). The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain*, 68, 243-299. doi:10.1093/brain/68.4.243
- Sunderland, S. (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 74(4), 491-516. doi:10.1093/brain/74.4.491
- Sunderland, S. (1978). *Nerves and nerve injuries* (2d ed.). Edinburgh;New York: Churchill Livingstone; distributed by Longman.
- Sunderland, S. (1981). The anatomic foundation of peripheral nerve repair techniques. *Orthop Clin North Am*, 12(2), 245-266
- Taylor, G. I., & Ham, F. J. (1976). The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg*, 57(4), 413-426
- Terzis, J. K., & Smith, K. L. (1990). *The peripheral nerve: structure, function, and reconstruction*: Raven Pr.
- Terzis, J. K., Sun, D. D., & Thanos, P. K. (1997). Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. *J Reconstr Microsurg*, 13(3), 215-225. doi:10.1055/s-2007-1006407

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Tohill, M., Mantovani, C., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2004). Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*, *362*(3), 200-203. doi:10.1016/j.neulet.2004.03.077
- Tohill, M., & Terenghi, G. (2004). Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*, *40*(Pt 1), 17-24. doi:10.1042/BA20030173
- Tomita, K., Madura, T., Sakai, Y., Yano, K., Terenghi, G., & Hosokawa, K. (2013). Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience*, *236*, 55-65. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.066
- Tompkins, B. A., Balkan, W., Winkler, J., Gyöngyösi, M., Goliash, G., Fernández-Avilés, F., & Hare, J. M. (2018). Preclinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Circ Res*, *122*(7), 1006-1020. doi:10.1161/circresaha.117.312486
- Tsai, M. S., Hwang, S. M., Tsai, Y. L., Cheng, F. C., Lee, J. L., & Chang, Y. J. (2006). Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod*, *74*(3), 545-551. doi:10.1095/biolreprod.105.046029
- Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., & Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, *19*(6), 1450-1456. doi:10.1093/humrep/deh279
- Tung, T. H., & Mackinnon, S. E. (2010). Nerve transfers: indications, techniques, and outcomes. *J Hand Surg Am*, *35*(2), 332-341. doi:10.1016/j.jhsa.2009.12.002
- Vanlair, C. (1889). *De la régénération des nerfs périphériques par le procédé de la suture tubulaire*: Lamertin.

- Varejão, A. S., Meek, M. F., Ferreira, A. J., Patrício, J. A., & Cabrita, A. M. (2001). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*, *108*(1), 1-9. doi:10.1016/s0165-0270(01)00378-8
- Vargas, M. E., & Barres, B. A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci*, *30*, 153-179. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094354
- Vela, F. J., Martínez-Chacón, G., Ballestín, A., Campos, J. L., Sánchez-Margallo, F. M., & Abellán, E. (2020). Animal models used to study direct peripheral nerve repair: a systematic review. *Neural Regen Res*, *15*(3), 491-502. doi:10.4103/1673-5374.266068
- Vijayavenkataraman, S. (2020). Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater*, *106*, 54-69. doi:10.1016/j.actbio.2020.02.003
- Vijayavenkataraman, S., Lu, W. F., & Fuh, J. Y. (2016). 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication*, *8*(3), 032001. doi:10.1088/1758-5090/8/3/032001
- Vijayavenkataraman, S., Shuo, Z., Fuh, J. Y. H., & Lu, W. F. (2017). Design of Three-Dimensional Scaffolds with Tunable Matrix Stiffness for Directing Stem Cell Lineage Specification: An In Silico Study. *Bioengineering (Basel)*, *4*(3). doi:10.3390/bioengineering4030066
- Wakao, S., Hayashi, T., Kitada, M., Kohama, M., Matsue, D., Teramoto, N., Dezawa, M. (2010). Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, *223*(2), 537-547. doi:10.1016/j.expneurol.2010.01.022
- Waller, A. (1850). 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 fibers. *Philos Trans R Soc Lond*, *140*, 423–429.

- Walsh, S. K., Gordon, T., Addas, B. M., Kemp, S. W., & Midha, R. (2010). Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. *Exp Neurol*, 223(1), 221-228. doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.025
- Walsh, S. K., Kumar, R., Grochmal, J. K., Kemp, S. W., Forden, J., & Midha, R. (2012). Fate of stem cell transplants in peripheral nerves. *Stem Cell Res*, 8(2), 226-238. doi:10.1016/j.scr.2011.11.004
- Wang, D., Liu, X. L., Zhu, J. K., Jiang, L., Hu, J., Zhang, Y., Yi, J. H. (2008). Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain Res*, 1188, 44-53. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.098
- Watanabe, Y., Sasaki, R., Matsumine, H., Yamato, M., & Okano, T. (2017). Undifferentiated and differentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect. *J Tissue Eng Regen Med*, 11(2), 362-374. doi:10.1002/term.1919
- Whitlock, E. L., Tuffaha, S. H., Luciano, J. P., Yan, Y., Hunter, D. A., Magill, C. K., Borschel, G. H. (2009). Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve*, 39(6), 787-799. doi:10.1002/mus.21220
- Widgerow, A. D., Salibian, A. A., Kohan, E., Sartiniferreira, T., Afzel, H., Tham, T., & Evans, G. R. (2014). "Strategic sequences" in adipose-derived stem cell nerve regeneration. *Microsurgery*, 34(4), 324-330. doi:10.1002/micr.22219
- Williams, H. B., & Jabaley, M. E. (1986). The importance of internal anatomy of the peripheral nerves to nerve repair in the forearm and hand. *Hand Clin*, 2(4), 689-707
- Woodhall, B. (1951). The surgical repair of acute peripheral nerve injury. *Surg Clin North Am*, 1369-1390. doi:10.1016/s0039-6109(16)33440-5
- Xu, Y., Liu, L., Li, Y., Zhou, C., Xiong, F., Liu, Z., Zhang, C. (2008). Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro. *Brain Res*, 1239, 49-55. doi:10.1016/j.brainres.2008.08.088

- Yalcin, M. B., Bora, E. S., Erdogan, M. A., Cakir, A., & Erbas, O. (2023). The Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Peripheral Nerve Damage in a Rodent Model. *J Clin Med*, *12*(19). doi:10.3390/jcm12196411
- Yi, S., Zhang, Y., Gu, X., Huang, L., Zhang, K., Qian, T., & Gu, X. (2020). Application of stem cells in peripheral nerve regeneration. *Burns Trauma*, *8*, tkaa002. doi:10.1093/burnst/tkaa002
- Yu, H., Kumar, S. M., Kossenkov, A. V., Showe, L., & Xu, X. (2010). Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *J Invest Dermatol*, *130*(5), 1227-1236. doi:10.1038/jid.2009.322
- Yucel, D., Kose, G. T., & Hasirci, V. (2010). Polyester based nerve guidance conduit design. *Biomaterials*, *31*(7), 1596-1603. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.013
- Zaimi, A., Duval, T., Gasecka, A., Cote, D., Stikov, N., & Cohen-Adad, J. (2016). AxonSeg: Open Source Software for Axon and Myelin Segmentation and Morphometric Analysis. *Front Neuroinform*, *10*, 37. doi:10.3389/fninf.2016.00037
- Zarei, K., Scheetz, T. E., Christopher, M., Miller, K., Hedberg-Buenz, A., Tandon, A., Abramoff, M. D. (2016). Automated Axon Counting in Rodent Optic Nerve Sections with AxonJ. *Sci Rep*, *6*, 26559. doi:10.1038/srep26559
- Zhang, H., Wei, Y. T., Tsang, K. S., Sun, C. R., Li, J., Huang, H., An, Y. H. (2008). Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *J Transl Med*, *6*, 67. doi:10.1186/1479-5876-6-67
- Zhang, R., & Rosen, J. M. (2018). The role of undifferentiated adipose-derived stem cells in peripheral nerve repair. *Neural Regen Res*, *13*(5), 757-763. doi:10.4103/1673-5374.232457
- Zhang, S., Vijayavenkataraman, S., Chong, G. L., Fuh, J. Y. H., & Lu, W. F. (2019). Computational Design and Optimization of Nerve Guidance Conduits for Improved

- Mechanical Properties and Permeability. *J Biomech Eng*, 141(5). doi:10.1115/1.4043036
- Zhang, S., Vijayavenkataraman, S., Lu, W. F., & Fuh, J. Y. H. (2019). A review on the use of computational methods to characterize, design, and optimize tissue engineering scaffolds, with a potential in 3D printing fabrication. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 107(5), 1329-1351. doi:10.1002/jbm.b.34226
- Zhao, Q., Dahlin, L. B., Kanje, M., & Lundborg, G. (1992). Specificity of muscle reinnervation following repair of the transected sciatic nerve. A comparative study of different repair techniques in the rat. *J Hand Surg Br*, 17(3), 257-261. doi:10.1016/0266-7681(92)90110-n
- Zhou, Y., Su, Y., Ming, G. L., & Song, H. (2023). Special properties of adult neurogenesis in the human hippocampus: Implications for its clinical applications. *Clin Transl Med*, 13(2), e1196. doi:10.1002/ctm2.1196
- Zhou, Y., Wang, J., Li, H., Liang, X., Bae, J., Huang, X., & Li, Q. (2016). Efficacy and Safety of Cell-Assisted Lipotransfer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plast Reconstr Surg*, 137(1), 44e-57e. doi:10.1097/prs.0000000000001981
- Zhuang, H., Bu, S., Hua, L., Darabi, M. A., Cao, X., & Xing, M. (2016). Gelatin-methacrylamide gel loaded with microspheres to deliver GDNF in bilayer collagen conduit promoting sciatic nerve growth. *Int J Nanomedicine*, 11, 1383-1394. doi:10.2147/ijn.S96324
- Ziegler, L., Grigoryan, S., Yang, I. H., Thakor, N. V., & Goldstein, R. S. (2011). Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem Cell Rev Rep*, 7(2), 394-403. doi:10.1007/s12015-010-9198-2

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Κάρτα Παρακολούθησης Πειραματόζωων

- ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟΥ.....
- ΦΥΛΛΟ.....
- ΒΑΡΟΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ.....
- ΒΑΡΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΘΥΣΙΑ.....
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ.....
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ.....
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟΥ.....
- ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ.....
- ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ.....
- ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ.....
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΘΥΣΙΑΣ.....
- ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....
- ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ.....

Άδεια Κτηνιατρικής Διεύθυνσης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ &
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ: ΚΑΦΕ
ΣΥΓΓΡΟΥ 80-88, 117 41 Αθήνα
ΠΑΗΡΟΦΟΡΕΙΣ: Π. Ανδριόπουλος
Τηλέφωνο: 213 2065 751
Fax: 213 2065 020
e-mail: pandriopoulos@patt.gov.gr

Αθήνα, 20-10-2015

Αριθμ. Πρωτ.: 4961

ΘΕΜΑ: «Χορήγηση άδειας πρωτοκόλλου διαδικασιών σε ζώα»

Α Π Ο Φ Α Σ Η

Έχοντας υπ' όψη:

Α) Τις διατάξεις:

1. Του Ν.3852/2010 «Νέα Αρχιτεκτονική της Αυτοδιοίκησης και της Αποκεντρωμένης Διοίκησης- Πρόγραμμα Καλλικράτης» (ΦΕΚ 87/τ.Α'/7-6-2010)
2. Του Π.Δ. 145/2010 «Οργανισμός της Περιφέρειας Αττικής» (ΦΕΚ 238/τ.Α'/27-12-2010)
3. Της Υ.Α.44403/4-11-11(ΦΕΚ 2494Β) περί Έγκρισης τροποποίησης του Οργανισμού Εσωτερικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Αττικής
4. Της με αριθμ. πρωτ. οικ.130082/01-12-2011 Απόφασης του Περιφερειάρχη Αττικής περί τοποθέτησης Προστατέον στην Δ/νση Αγροτικής & Κτηνιατρικής Πολιτικής
5. Του Ν. 1197/81 «Περί προστασίας ζώων» και συγκεκριμένα το άρθρο 4.
6. Του Ν. 2015/92 «Περί Κυρώσεως της Ευρωπαϊκής Σύμβασης για την Προστασία των σπονδυλιτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς».
7. Του Π.Δ. 56/2013 Προσαρμογή της Ελληνικής νομοθεσίας στην Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010(276/33/20.10.2010) «σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς»

Β) Την με αριθμ. πρωτ. 4961/16-10-2015 αίτηση του **κοινοπολιτικού Μεγαλοοικονόμου (ιατρού – ειδικευμένου ορθοπαιδικής)** για πραγματοποίηση Πρωτοκόλλου διαδικασιών σε ζώα (επίμυες) με τον τίτλο: «Αναγέννηση περιφερικών νευρών με τη χρήση βλαστοκυττάρων από λιπόδη ιστό και νευροαγωγών – Πειραματική μελέτη σε επίμυες», που θα διεξαχθεί στη ΜΟΝΑΔΑ ΧΡΗΣΗΣ ΖΩΩΝ ΓΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΤΤΙΚΟΝ», επί της οδού Ρίμνι 1-Χαϊδάρι, με κωδικό καταχώρησης **ΕΛ 25 ΒΙΟ 014**.

Γ) Την θετική γνωμάτευση της Επιτροπής Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων.

Α Π Ο Φ Α Σ Ι Ζ Ο Υ Μ Ε

Χορηγούμε άδεια για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου Πρωτοκόλλου διαδικασιών σε ζώα από τον **κοινοπολιτικό Μεγαλοοικονόμο (ιατρό-ειδ. ορθοπαιδικής)** ως **Υπεύθυνο του Πρωτοκόλλου** και ως **Υπεύθυνο Εκτέλεσης/Υλοποίησης του Πρωτοκόλλου** και τον **κοινοπολιτικό Λάμπρο Σαμπράκο** (υπεύθυνο κτηνίατρο της εγκατάστασης) ως **Υπεύθυνο Συμμόρφωσης προς την αδειοδότηση του Πρωτοκόλλου**, καθόσον τηρούνται οι προϋποθέσεις της σχετικής, για την Προστασία των ζώων, νομοθεσίας. **Λοιποί συμμετέχοντες και Υπεύθυνοι για την συνολική υλοποίηση του Πρωτοκόλλου** θα είναι: ο **κος Ανδρέας**

Μαυρογένης (ιατρός-ορθοπαιδικός), η **κα Μυρτώ Μπάμη** (μοριακή βιολόγος), η **κα Ευανθία Μητσοκάπα** (φυσίατρος) και η **κα Διονυσία-Ειρήνη Δρογγίτη** (νοσηλεύτρια χειρουργείου).

Η άδεια αυτή ισχύει για **τρία χρόνια** από την ημερομηνία εκδόσεώς της.

Οποιαδήποτε μεταβολή, που αφορά τους υπευθύνους του πρωτοκόλλου, όπως αυτοί αναφέρονται παραπάνω, θα πρέπει να δηλώνονται στην υπηρεσία μας.

Δεν απαιτείται αναδρομική αξιολόγηση του Πρωτοκόλλου.

Οι χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ή και λοιπές ουσίες για την διεξαγωγή του πρωτοκόλλου υπόκεινται, όσον αφορά την εισαγωγή και εν γένει κυκλοφορία τους, στις σχετικές κείμενες διατάξεις.



Ο Προϊστάμενος της Δ/νσης

Γεώργιος Τίτης

ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ:

1. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων

Γεν. Δ/νση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής

Δ/νση Προστασίας των Ζώων, Φαρμάκων και Κτηνιατρικών Εφαρμογών

Αχαρνών 2, Τ.Κ.10176 Αθήνα

2. Δ/νση Αγρ. Οικονομίας & Κτηνιατρικής

Περιφερειακής Ενότητας Δυτικού Τομέα Αθηνών

Ιερά Οδός 294, Τ.Κ.12243 Ατγάλεω

3. Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων της ΜΟΝΑΔΑΣ ΧΡΗΣΗΣ ΖΩΩΝ ΓΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Ρίμνι 1, Τ.Κ.12464 Χαϊδάρι

4. α) κοινοπολιτικό Μεγαλοοικονόμο

β) κοινοπολιτικό Λάμπρο Σαμπράκο

γ) κοινοπολιτικό Ανδρέα Μαυρογένη

δ) κα Μυρτώ Μπάμη

ε) κα Ευανθία Μητσοκάπα

στ) κα Διονυσία Δρογγίτη

δια της ΜΟΝΑΔΑΣ ΧΡΗΣΗΣ ΖΩΩΝ ΓΙΑ ΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Ρίμνι 1, Τ.Κ.12464 Χαϊδάρι

