Charakterystyka epineurium oraz ocena odpowiedzi immunologicznej po jego zastosowaniu jako bariery ochronnej zapobiegającej powstawaniu nerwiaków w obwodowym układzie nerwowym

mgr Katarzyna Futoma

Streszczenie

Obwodowy układ nerwowy, w odróżnieniu od ośrodkowego układu nerwowego wykazuje znaczne zdolności do regeneracji, dzięki czemu odbudowa niewielkich uszkodzeń w obrębie nerwów obwodowych jest możliwa i zazwyczaj kończy się przywróceniem funkcji czuciowo-ruchowych w obszarze, który unerwiają. Przerwanie ciągłości nerwów obwodowych zapoczątkowuje kaskadę licznych procesów prowadzących do regeneracji uszkodzonych nerwów. W pierwszych minutach po uszkodzeniu, komórki Shwanna oraz okoliczne tkanki uwalniają liczne cytokiny prozapalne powodujące napływ komórek układu odpornościowego, głównie makrofagów, które wśród wielu funkcji związanych z odpowiedzią na bodźce, wpływają na wydzielanie różnego rodzaju czynników neurotroficznych pobudzających wzrost aksonów. Niestety, w przypadku kiedy osiągnięcie dystalnego końca nerwu przez rosnące z proksymalnego końca aksony jest niemożliwe, ze względu na zbyt duży ubytek nerwu lub brak dystalnego końca, dochodzi do formowania się chaotycznych mas, złożonych z regenerujących się aksonów i tkanki łącznej. Powstałe patologiczne struktury zwane nerwiakami, są uważane za jedną z głównych przyczyn bólu neuropatycznego znacznie ograniczającego jakość życia pacjentów, u których doszło do przerwania ciągłości nerwu np. na skutek rozległych procedur chirurgicznych czy amputacji kończyn.

Istnieje wiele sposobów walki z nerwiakami, jednak żaden z obecnie stosowanych nie jest wystarczająco skuteczny. Do metod wybieranych w pierwszej kolejności w leczeniu bólu neuropatycznego różnego pochodzenia należy farmakoterapia, której główną wadą są uciążliwe skutki uboczne podczas długotrwałego stosowania i nierzadko brak pożądanej skuteczności. W przypadku stwierdzenia obecności nerwiaka stosuje się chirurgiczne usunięcie, jednak pozostawienie niezabezpieczonego zakończenia nerwowego wciąż stanowi ryzyko rozwoju kolejnego nerwiaka. Ze względu na trudności w leczeniu nerwiaków dobrym podejściem wydaje się być stosowanie odpowiednich czynności podjętych jeszcze w czasie zabiegu amputacji, zabezpieczających uszkodzone zakończenie nerwowe przed działaniem czynników

proregeneracyjnych znajdujących się w mikrośrodowisku uszkodzonego nerwu. W tym celu zabezpiecza się wolne zakończenie nerwowe przy użyciu okolicznych tkanek, takich jak naczynia krwionośne czy mięśnie. Mimo obiecujących efektów, głównym ograniczeniem tych metod jest limitowana dostępność potrzebnej do izolacji tkanki, co znacznie zawęża grupę pacjentów, u których można stosować powyższe rozwiązanie. Z pomocą przychodzą przeszczepy różnego pochodzenia tkanek miękkich oraz materiałów syntetycznych, których skuteczność potwierdzają liczne doniesienia literaturowe. W przypadku tkanek miękkich problemem jest konieczność dobierania dawcy zgodne z układem zgodności tkankowej lub stosowanie przeszczepów autologicznych. Natomiast materiały syntetyczne pomimo swojej nieograniczonej dostępności są mało przepuszczalne dla naczyń krwionośnych i komórek oraz jako materiał obcy dla organizmu mogą indukować odpowiedź układu odpornościowego.

„Złotym środkiem" dla uniknięcia powyższych problemów byłoby zastosowanie materiału biologicznego, nietoksycznego, cechującego się brakiem immunogenności. Takie wymagania może spełniać epineurium, będące najbardziej zewnętrzną warstwą tkanki łącznej zabezpieczającą pęczki nerwowe w obwodowym układzie nerwowym. Ponieważ głównym materiałem budulcowym epineurium jest kolagen I i III typu, materiał ten zastosowany na przerwane zakończenie nerwowe w postaci osłonki może stanowić skuteczną barierę chroniącą nerw przed działaniem otaczających czynników neurotroficznych i tym samym zapobiegać rozwojowi nerwiaków w obwodowym układzie nerwowym. Dotychczasowe doniesienia dokumentują dobrze zbadaną budowę anatomiczną i histologiczną epineurium, jednak badania dotyczące jego właściwości immunologicznych, angiogennych i neurogennych, które mogą stanowić istotne źródło informacji z punktu widzenia transplantologii, są niewystarczające.

W odpowiedzi na powyższe wymagania pierwszym celem niniejszej pracy była charakterystyka biologiczna epineurium oraz opracowanie optymalnego źródła pozyskania epineurium poprzez porównanie właściwości immunologicznych, neurogennych oraz angiogennych epineurium ludzkich nerwów obwodowych pobranych od zmarłych dawców narządów z epineurium pochodzącym z nerwów pozyskanych z kończyn amputowanych na skutek skrajnej choroby niedokrwiennej. W oparciu o uzyskane wyniki badań pierwszego etapu, w kolejnym etapie skupiono się na zbadaniu efektywności epineurium zastosowanego w postaci osłonki na przerwane zakończenie nerwu kulszowego u szczura, w hamowaniu rozwoju nerwiaka pourazowego w przeszczepie izogenicznym (szczurze epineurium) oraz ksenogenicznym (ludzkie epineurium). Ponadto, oceniono odpowiedź układu odpornościowego po zastosowaniu epineurium poprzez zbadanie obecności stanu zapalnego

w obszarze poddanym zabiegowi, a także zbadano wpływ czynników immunologicznych i neurotroficznych na powstawanie nerwiaka i bólu neuropatycznego poprzez porównanie wyników badań po przeszczepie ksenogenicznego epineurium u szczurów z aktywnym układem odpornościowym z wynikami obserwacji u szczurów atymicznych, czyli pozbawionych funkcji grasicy.

Na podstawie wyników uzyskanych w pierwszym etapie badań stwierdzono, że epineurium pozyskiwane z nerwu kulszowego dawców narządów wykazuje zredukowaną liczbę limfocytów T, zmniejszoną ekspresję antygenów HLA klasy II na infiltrujących komórkach oraz większą gęstość naczyń w porównaniu do epineurium pobranego z nerwów z amputowanych kończyn. Zmniejszona immunogenność oraz zwiększone właściwości proangiogenne epineurium pobranego od dawców narządów świadczą o możliwości jego potencjalnego wykorzystania w zapobieganiu rozwoju nerwiaka u biorców. Epineurium izolowane z nerwu biodrowo-pachwinowego pobranego od dawców narządów zostało wykorzystane w kolejnym etapie pracy do badań na szczurzym modelu eksperymentalnym.

Eksperyment przeprowadzony w drugim etapie badań nie wykazał obecności nerwiaka w żadnej z badanych grup, gdzie zastosowano osłonkę epineuralną na przerwane zakończenie nerwowe, co świadczy o skuteczności epineurium w hamowaniu rozwoju nerwiaka. W grupie kontrolnej z uszkodzonym nerwem kulszowym, bez zastosowania osłonki epineuralnej, obserwowano cechy rozwoju nerwiaka, co potwierdziły zarówno testy behawioralne, jak i badania histopatologiczne. U zwierząt, gdzie zastosowano epineurium w układzie izogenicznym i ksenogenicznym stwierdzono stan zapalny w operowanym obszarze, jednak pomimo jego obecności, nie zaobserwowano cech charakterystycznych dla powstania nerwiaka. Utrzymujący się stan zapalny u zwierząt z funkcjonalną grasicą i przeszczepionym epineurium indukuje i podtrzymuje ból neuropatyczny, upośledzający funkcje motoryczne i czuciowe operowanej kończyny, jednak w mniejszym stopniu niż nerwiak powstały na niezabezpieczonym zakończeniu nerwowym. Powyższe obserwacje wskazują na słabe właściwości immunogenne epineurium izolowanego z nerwów obwodowych, wynikające prawdopodobnie z obecności w tym materiale elementów komórkowych (tj. naczyń krwionośnych, makrofagów, fibroblastów, mastocytów, pojedynczych limfocytów) indukujących odpowiedź układu odpornościowego szczura. Jednak ta cecha biologiczna nie wpływa na skuteczność epineurium zastosowanego w postaci osłonki na uszkodzony nerw w hamowaniu rozwoju nerwiaka, co zostało potwierdzone wynikami badań w grupie atymicznych szczurów, u których dzięki wyciszeniu funkcji układu odpornościowego,

w momencie zakończenia obserwacji, reakcje na bodźce chemiczne, fizyczne i termiczne były porównywalne do kończyny zdrowej.