

## BIOMATERIAŁY W LECZENIU POURAZOWYCH UBYTKÓW NERWÓW OBWODOWYCH – PRZEGLĄD METOD I MATERIAŁÓW

DARIUSZ SZAREK\*\*, WŁODZIMIERZ JARMUNDOWICZ\*,  
ANETA FRĄCZEK\*\*\*, STANISŁAW BŁAŻEWICZ\*\*\*

\*KATEDRA I KLINIKA NEUROCHIRURGII AKADEMII MEDYCZNEJ,  
UL. TRAUUGUTTA 166, WROCŁAW

\*\*ZAKŁAD CHOROÓB UKŁADU NERWOWEGO,  
AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU,  
UL. TRAUUGUTTA 116, WROCŁAW

\*\*\*AGH - AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW  
E-MAIL: DARIUSZSZAREK@WP.PL

### Streszczenie

*Niniejsza praca stanowi przegląd literaturowy metod, sposobów, a także materiałów stosowanych oraz będących sferze badań do konstrukcji protez do regeneracji obwodowego układu nerwowego. Zawiera również opis anatomicznych i fizjologicznych procesów przebiegających podczas regeneracji nerwów, a także zestawienie ich własności biomechanicznych.*

**Słowa kluczowe:** regeneracja nerwów, technika operacyjna, biomateriały

[Inżynieria Biomateriałów, 56-57,(2006),40-53]

### Wstęp

Urazowe uszkodzenia nerwów obwodowych są poważnym problemem zarówno z punktu widzenia klinicznego jak i społecznego. Stosowane obecnie metody leczenia, w tym operacyjnego, pozwalają na uzyskanie względnie dobrych, lecz zwykle nie do końca zadowalających wyników leczenia. Leczenie jest żmudne i często obciążone koniecznością pobrania innego zdrowego nerwu skórnoego dla naprawy uszkodzenia. Urazowe uszkodzenia obwodowego układu nerwowego są przyczyną dużej ilości interwencji chirurgicznych.

W 1995 roku w Stanach Zjednoczonych przeprowadzono ponad 50,000 operacji z powodu urazowych uszkodzeń nerwów obwodowych [1]. Liczba zabiegów wykonywanych w kilku ośrodkach w Polsce wynosi ponad 100 rocznie w każdym z nich [2]. Urazy z reguły dotyczą osób w dwóch grupach wiekowych: młodzież do 15 lat oraz osób w wieku 30-50 lat [3]. Prowadzi to do znacznej absencji chorobowej a niekiedy stanowi przyczynę poważnego kalectwa.

Jedną z głównych trudności w operacyjnym leczeniu urazowych uszkodzeń nerwów obwodowych jest wykonanie zespolenia przerwane nerwu w przypadkach z dużym ubytkiem pomiędzy przeciętymi końcami [3,4]. Trójwymiarowe materiały używane obecnie jako skafoldy dla regeneracji tkanek mogą zastąpić obecnie stosowaną w takich przypadkach klasyczną metodę, jaką jest zespolenia kikutów nerwu z zastosowaniem allograftów lub autograftów pobranych nerwów skórnych [5]. Metoda klasyczna jest związana z szeregiem ograniczeń takich jak dostępność i długość pobranego nerwu celem przeszczepienia, odnerwienie pola skórnoego zaopatrywanego przez pobrany nerw, drugie miejsce operacyjne, ryzyko infekcji w miejscu po-

## BIOMATERIALS IN THE TREATMENT OF PERIPHERAL NERVE INJURIES – AN OVERVIEW OF METHODS AND MATERIALS

DARIUSZ SZAREK\*\*, WŁODZIMIERZ JARMUNDOWICZ\*,  
ANETA FRĄCZEK\*\*\*, STANISŁAW BŁAŻEWICZ\*\*\*

\*MEDICAL UNIVERSITY OF WROCLAW,  
DEPARTMENT OF NEUROSURGERY,  
UL. TRAUUGUTTA 166, WROCLAW

\*\*MEDICAL UNIVERSITY OF WROCLAW,  
INSTITUTE OF NERVOUS SYSTEM DISEASE,  
UL. TRAUUGUTTA 116, WROCLAW

\*\*\*AGH-UST, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 CRACOW  
E-MAIL: DARIUSZSZAREK@WP.PL

### Abstract

*The work presents the state of the art in the area of methods and materials used in peripheral nerve treatment. Anatomical and physiological aspects of peripheral nerves their biomechanical properties and their treatment are presented.*

**Keywords:** nerve regeneration, operation procedure, biomaterials

[Engineering of Biomaterials, 56-57,(2006),40-53]

### Introduction

Peripheral nerve injuries are serious clinical and social problems. Current applied treatment methods, including operative, ones give relatively good, however not fully satisfying effects. Treatment is long lasting and often harvesting of healthy cutaneous nerve is necessary. Traumatic peripheral nervous system injuries are the reason of great number of surgical interventions. In 1995, there were more than 50,000 peripheral nerve repair procedures performed in USA [1]. Number of surgical procedures performed in several centers in Poland is over 100 a year in every one of them [2]. Patients are typically in two age groups: young people till the age of 15 and middle-aged between 30 and 50 [3]. It causes significant disease absence and even may lead to serious disability.

One of the major problems in surgical treatment of the peripheral nerve injuries is ends coaptation in the case of large loss of nerve tissue [3,4]. Three dimensional materials in the form of scaffolds for tissue regeneration may replace currently applied classical technique, namely nerve coaptation with the use of cutaneous nerve allo and autografts [5]. There are many disadvantages of classic method such as limited availability and length of donor nerve tissue, skin denervation in area related to harvested nerve, second operative location, and risk of infection in the region of nerve harvesting [6]. Several types of materials have been proposed as peripheral nerve substitutes, for example: synthetic materials such as silicon, polylactic acid and polyglycolic acid, natural polymers such as chitosan, alginates, collagen, laminin, fibronectin, and others [7].

### Anatomical and physiological aspects of peripheral nerve regeneration

Peripheral nerve consists of bunches of nerve fibers con

brania nerwu [6]. Szereg materiałów może mieć potencjalne zastosowanie dla uzupełnienia ubytków nerwów, np.: materiały syntetyczne takie jak silikon, poliglikolid, polilaktyd, naturalne polimery jak chitozan, alginiany, kolagen, laminina oraz fibronektyna i inne [7].

## Anatomiczne i fizjologiczne aspekty regeneracji nerwów obwodowych

Nerw obwodowy zbudowany jest z grup włókien nerwowych połączonych warstwami osłonek łącznotkankowych. Włókno nerwowe tworzy wypustka komórki nerwowej pokryta osłonką mielinową wytworzoną przez specjalne komórki zwane komórkami Schwanna.

Nerwy, ze względu na charakter przewodzonych bodźców nerwowych, dzielą się na ruchowe - przewodzące impulsy odśrodkowe i czuciowe - przewodzące impulsy dośrodkowe z receptorów czuciowych. Ponadto w obrębie nerwów przebiegają włókna układu autonomicznego. Większość nerwów ma charakter mieszany, przewodzą włókna nerwowe wszystkich typów.

Komórki nerwowe, których wypustki tworzą nerwy obwodowe, leżą w obrębie rogów przednich rdzenia kręgowego oraz w zwojach międzykręgowych. Wytwarzane przez nie włókna nerwowe po opuszczeniu kanału kręgowego grupują się tworząc nerwy rdzeniowe.

W początkowym przebiegu nerwy te z reguły łączą się tworząc spłoty, w obrębie których dochodzi do wymiany włókien nerwowych pomiędzy poszczególnymi pniami nerwowymi. Ze spłotów wychodzą nerwy, które unerwiają właściwe dla nich mięśnie, skórę, ścięgna, stawy. Nerwy obwodowe mają kształt walca, przebiegają często wspólnie z naczyniami krwionośnymi.

Włókna nerwowe grupują się tworząc pęczki. Pęczki pokryte są osłonką łącznotkankową - perineurium. Przeszłość pomiędzy poszczególnymi włóknami wypełniona jest luźną tkanką - endoneurium. Pęczki stanowią wewnętrzną makroskopową architekturę nerwu, przebiegają spiralnie i w sposób sfałdowany. Taki układ pozwala na swobodne wydłużenie się nerwu w czasie jego rozciągania [8]. W obrębie jednego nerwu przebiega z reguły kilka pęczków. Pokryte są one wspólną osłonką - epineurium, z którą są luźno związane. Stanowi ona zewnętrzną osłonę nerwu. Pośredniczy ona między wewnętrznymi strukturami nerwu, a środowiskiem zewnętrznym, chroni jego wnętrze przed urazami mechanicznymi, przewodzi większą część naprężeń podczas naciągania nerwu [8].

Dla prawidłowego funkcjonowania nerwu konieczna jest ciągłość anatomiczna włókien nerwowych oraz sprawne połączenie synaptyczne włókna nerwowe z jego efektozem. Wyróżniane są trzy główne stopnie uszkodzenia nerwu:

- Neurapraxis - przejściowe zablokowanie funkcji nerwu spowodowane np. jego uciśnięciem i niedokrwiem
- Aksonotmesis - przerwanie włókien nerwowych bez uszkodzenia osłonek łącznotkankowych
- Neurotmesis - całkowite przecięcie nerwu.

W stopniu pierwszym i drugim regeneracja zachodzi spontanicznie z dobrym rokowaniem dla wyników leczenia. W stopniu trzecim niemożliwa jest spontaniczna regeneracja, dla uzyskania powrotu funkcji nerwu konieczna jest interwencja chirurgiczna i zespolenie przeciętych kikutów nerwu.

Regeneracja nerwu różni się zasadniczo od procesów gojenia się charakterystycznych dla wszystkich innych tkanek. Dla przywrócenia funkcji nerwu konieczna jest regeneracja ("odrośnięcie") włókna nerwowe od miejsca uszkodzenia aż do efektora i odbudowanie z nim połączenia synaptycznego.

41

ected by connective tissue-sheets. Nerve fiber is created by nerve cell process covered with myelin sheet produced by special cells called Schwann cells.

Nerves, depending on the type of conducted nerve impulses, are divided into motional - conducting anterograde impulses, sensational - conducting retrograde impulses from sensory receptors. A nerve also consists of fibers of autonomic system. Most of the nerves are mixed, they consist of nerve fibers of all types.

Nerve cells creating processes for peripheral nerves fibers are located in the front horns of spinal cord or in intervertebral ganglions. Nerve fibers after leaving vertebral canal group and create spinal nerves. Proximal parts of nerves connect and build the structures called nervous plexus, where fibers exchange between particular nerves takes place. Nerves leaving these structures innervate characteristic muscles, skin, tendons and joints. Peripheral nerves are cylinder in shape, they often run together with blood vessels.

Nerve fibers group into structures called fascicles. Fascicles are covered with connective tissue sheath - perineurium. Space between the fibers is filled with loose connective tissue - endoneurium. Fascicles are internal macroscopic nerve architecture with spiral and fold molding. Such a shape enables the nerve elongation during its stretching [8]. In one nerve there are usually few fascicles. They are covered with common sheath - epineurium, loosely connected with. It is an external nerve cover. It mediates between internal nerve structures and external environment, protects nerve internal structures from mechanical injury and conducts biggest part of tension during nerve tightening [8].

Normal nerve functioning requires anatomic integrity of nerve fibers and functioning synaptic connection of nerve fiber with its effector. There are three main types of nerve injuries:

- Neurapraxis - transient block of nerve function inflicted by for example pressure and nerve blood flow dysfunction
- Aksonotmesis - nerve fibers disruption without damage of connective tissue sheaths
- Neurotmesis - complete nerve cut

At the first and the second stage of injury nerve regeneration occurs spontaneously with good treatment prognosis. At the third stage of injury spontaneous regeneration is impossible, surgical intervention and nerve end coaptation is necessary for nerve function restoration.

Nerve regeneration greatly differs from healing processes characteristic for all other tissues. For nerve function restoration nerve fibers regeneration ("regrowth in") is necessary from injury site to effector and rebuild of synaptic connection.

Nerve regeneration process runs in few phases. During the first phase multiple pathophysiologic events occur described as Wallerian degeneration. This process is connected with myelin sheaths and nerve fibers break up that greatly depends on cells called macrophages. These cells besides phagocytic properties play an important role in supporting nerve fibers reconstruction process, called regeneration. They produce multiple substances called cytokines. Cytokines, for example REG 1, stimulate Schwann cells proliferation and also production of neurotrophic substances such like NGF (Nerve Growth Factor). These substances with retrograde axonal transport reach cell body and stimulate expression of genes responsible for protein production for axonal regeneration. Schwann cells build characteristic bands or tubes of Büngner, within of which regrowing axons growths in. [9,10].

Without anatomic nerve fiber reconstruction from injury

Proces regeneracji nerwu przebiega w kilku fazach. W pierwszej fazie dochodzi do szeregu zjawisk patofizjologicznych określanych jako degeneracja Wallera. U podstawy tych zjawisk leży rozpad osłonek mielinowych oraz wypustek nerwowych, w których istotną rolę odgrywają komórki zwane makrofagami. Komórki te oprócz właściwości żernych odgrywają również ważną rolę we wspomaganiu procesu odbudowy włókien nerwowych, który określamy regeneracją. Wytwarzają one szereg substancji zwanych cytokinami. Cytokiny, np. cytokina REG 1, stymulują komórki Schwanna do proliferacji, jak również do produkcji substancji neurotroficznych takich jak NGF (Nerve Growth Factor). Substancje te drogą wstecznego transportu aksonalnego docierają do ciała komórkowego i pobudzają ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję białek koniecznych dla regeneracji aksonu. W tym czasie komórki Schwanna wytwarzają charakterystyczne pasma lub rurki Büngnera, w które wrastają odrastające aksony. Proces regeneracji kończy się momentem wytworzenia połączeń synaptycznych oraz osłonek mielinowych wokół odrastających aksonów [9,10].

Bez anatomicznego odbudowania włókna nerwowego od miejsca urazowego przecięcia do narządu docelowego, wytworzenia z nim funkcjonalnej synapsy i odbudowania osłonki mielinowej niemożliwy jest powrót funkcji nerwu. Stosowane metody leczenia, zarówno klasyczne jak i eksperymentalne dążą do wykorzystania powyższego procesu celem uzyskania jak najskuteczniejszego wyniku regeneracji nerwu. Zespala się kikuty nerwu koniec do końca, co stwarza warunki by odrastające włókna nerwowe z kikutu proksymalnego mogły wrosnąć w kikut dystalny. W przypadkach urazów, w których dochodzi do ubytku nerwu konieczne jest wypełnienie ubytku przeszczepami nerwów. W ostatnich latach próbuje się wykorzystywać w tym celu inne materiały pochodzenia sztucznego.

### Własności biomechaniczne nerwów obwodowych

Nerwy obwodowe zbudowane są z włókien nerwowych oraz osłonek nerwowych zbudowanych z tkanki łącznej o różnych właściwościach mechanicznych. Ze względu na rozmieszczenie tkanki łącznej oraz cylindrycznej konfiguracji włókien nerwowych, nerwy obwodowe posiadają własności anizotropowe. W przypadku nerwów trudno jest oszacować ich odpowiedź na działanie sił zewnętrznych ze względu na ich skomplikowaną budowę. Głównym elementem składowym nerwów obwodowych odpowiedzialnym za ich elastyczność oraz wytrzymałość na rozciąganie jest epineurium [11]. Warstwy epineurium nie ulegają przerwaniu w jednym, konkretnym punkcie na powierzchni nerwów, ale wzdłuż nerwu na pewnym jego odcinku. Dlatego też uszkodzenie nerwów obwodowych na skutek rozciągania nie jest zjawiskiem zlokalizowanym [12]. Materiały, które znajdują zastosowanie w regeneracji nerwów obwodowych muszą charakteryzować się dostateczną wytrzymałością na rozciąganie oraz odpornością na obciążenia dynamiczne tak, aby zdolne były przeciwdziałać siłom działającym w środowisku "in vivo". Badania nad własnościami mechanicznymi są niezbędnym krokiem w dalszym rozwoju materiałów stosowanych dla regeneracji nerwów obwodowych [7]. Właściwości mechaniczne takie jak naprężenie i odkształcenie graniczne, wydłużenie graniczne, moduł Younga, praca zniszczenia są niezbędnymi do dokonania charakterystyki materiałów przeznaczonych na implanty.

Dla nerwów piszczelowych królika wytrzymałość na rozciąganie oraz odkształcenie graniczne wynosi odpowiednio  $11,7 \pm 0,7 \text{ MPa}$  i  $38,5 \pm 2,0\%$ . Osiągnięcie "górnego granicy

to target organ, synaptic connection reconstruction and reconstruction of myelin sheath nerve function restoration is impossible. Actually applied treatment methods, classical and experimental utilize this process to achieve an optimal nerve regeneration effect. Nerve stumps reconnection creates conditions for regrowing axons from the proximal stump to growth into the distal stump. In cases of great nerve tissue loss reconstruction with nerve autografts is necessary. Recently, for this purpose synthetic materials are being explored.

### Biomechanical properties of peripheral nerves

A peripheral nerve consists of nerve fibers and connective tissue of different mechanical properties. Because of the arrangement of connective tissue and the tubular configuration of nerve fibers, the nerves are anisotropic and almost transversely isotropic. It is difficult to estimate the response of nerves to external forces due to their small size and complicated architecture. The main peripheral nerve component responsible for the elasticity and tensile strength of an intact nerve is epineurium [11]. The epineurial sheath does not rupture at one given point in the nerve, but rather along the nerve over some distance. Therefore, stretch injuries to peripheral nerve may not be localized phenomenon [12]. The materials used for supporting peripheral nerve regeneration have to have sufficient tensile strength and mechanical toughness to withstand in vivo mechanical forces. Investigation of tensile properties is a requisite step in the further development of peripheral nerve substitutes [7]. The mechanical parameters like ultimate stress and strain, ultimate elongation, Young's modulus, work to failure, viscoelastic behavior are necessary to evaluate such characteristics of any material designed for implantation in patients.

For rabbit tibial nerve, the tensile strength and ultimate strain are found to be  $11,7 \pm 0,7 \text{ MPa}$  and  $38,5 \pm 2,0\%$ , respectively. The strain at the "elastic limit" ranged from 8% to 20%, and the maximal strain at failure was approximately 30%. These ranges of variation were thought to be due to the nonhomogenous structure of nerve trunks, which consist of a complex variety of elements with different strength and elasticity [12]. The rabbit tibial nerve has an ultimate elongation of  $16,3 \pm 0,7 \text{ mm}$  and ultimate load of  $9,52 \pm 0,47 \text{ N}$ . For human ulnar nerves the ultimate load is reported to be 65 to 155 N human median nerve 73 to 220N [12,13].

Peripheral nerves exhibit highly nonlinear stress-strain behavior. The nerve may stretch up to 15% strain under minimal stress of internal structures.

These mechanical properties of peripheral nerve are determined by special internal nerve architecture that enables an optimal tensile stress load. Inside epineurium fascicles run freely and are loosely connected with it. They run in a spiral, wavy way along to longitudinal nerve axis. Thus, there is an excess of length of fascicles in relation to epineurium. During nerve stretching tensile stress is transferred by epineurium and fascicles straightening. Further stretching may cause epi, perineurium and nerve fibers disruption [8,12]. These data are similar to in vivo observations of intraneural blood flow in the rabbit tibial nerve. During gradual stretching venular blood flow significantly decreases when nerve is stretched to 8% beyond in vivo length. Complete intraneural ischemia was induced at 15% beyond in vivo length [1,11,12].

The estimated mean Young's modulus of the rabbit sciatic nerves in the transverse direction was  $66,9 \pm 8,0 \text{ kPa}$ , and the longitudinal direction was  $580 \pm 150 \text{ kPa}$  [7,11]. The

elastyczności" nerwów ma miejsce przy odkształceniu od 8% do 20%, a maksymalne odkształcenie do zniszczenia oszacowane zostało na około 30%. Rozbieżności w wartościach odkształcenia mogą być spowodowane brakiem homogeniczności w strukturze pnia nerwu, który zawiera złożone składniki charakteryzujące się odmienną elastycznością oraz wytrzymałością [12]. Dla nerwów piszczelowych królika wydłużenie graniczne wynosi  $16,3 \pm 0,7$  mm, a obciążenie graniczne  $9,52 \pm 0,47$  N. Dla ludzkich nerwów łokciowych obciążenie graniczne jest oszacowane pomiędzy 65 N, a 155 N, a dla nerwów pośrodkowych od 73 do 220 N [12, 13].

Nerwy obwodowe wykazują silną nieliniarną charakterystykę naprężenie-odkształcenie. Nerw może być rozciągany do 15% wartości odkształcenia przy minimalnym naprężeniu struktur wewnętrznych.

Powyższe właściwości mechaniczne nerwu są determinowane specjalną budową wewnętrzną nerwu, która zapewnia najoptymalniejsze przenoszenie naprężeń. W obrębie epineurium pęczki są ułożone swobodnie i luźno z nim związane. Ich przebieg jest pofalowany w stosunku do osi długiej nerwu. Daje to nadmiar długości pęczków w stosunku do długości epineurium. Podczas rozciągania nerwu dochodzi do powstawania naprężeń, które w większości są przenoszone na epineurium i prostowania pęczków. Dalsze rozciąganie może spowodować przerwanie osłonek epi i perineurium oraz rozerwanie włókien nerwowych [8, 12]. Wyniki tych badań potwierdzają obserwacje in vivo przepływu krwi w naczyniach nerwu. Ukrwienie nerwu królika znacząco spada przy zwiększeniu przyżyciowym długości o 8%. Kompletnie zatrzymanie krążenia w nerwie następuje przy rozciągnięciu powyżej 15% [1, 11, 12].

Oszacowana wartość modułu Younga dla nerwów kulszowych królika w kierunku poprzecznym wynosi  $66,9 \pm 8,0$  kPa, natomiast w kierunku podłużnym  $580 \pm 150$  kPa [7, 11]. Znajomość parametrów mechanicznych nerwów obwodowych jest konieczna z punktu widzenia ochrony pęczków nerwów, a także zachowania ich prawidłowej funkcji fizjologicznych. Tkanka łączna spełnia również bardzo ważną funkcję w utrzymaniu odpowiedniego środowiska w obrębie śródnierwia poprzez utrzymanie bariery dyfuzji dla różnorodnych makrocząstek. Zmiany w parametrach dyfuzji oraz uszkodzenia struktury powstałe na skutek naprężeń rozciągających, mogą powodować długotrwałe, a nawet stałe, upośledzenie funkcji nerwu [12].

## Metody leczenia

W przypadku przecięcia nerwu konieczna jest interwencja chirurgiczna celem odtworzenia anatomicznej łączności między kikutami przerwanego nerwu. Stosowaną obecnie metodą z wyboru jest zespolenie operacyjne nerwu koniec do końca.

Zespolenie nerwu pod napięciem znacząco pogarsza wynik regeneracji, dlatego w urazach przebiegających z ubytkiem nerwu konieczne jest jego uzupełnienie [9, 14]. Autoprzeszczepy nerwów są obecnie najbardziej powszechną procedurą operacyjną stosowaną przy naprawie ubytku nerwów. Mostowanie defektu nerwu za pomocą autogenicznego nerwu dawcy ma szereg stron ujemnych, takich jak dodatkowe miejsce operacyjne, pobranie zdrowego nerwu, którego rezultatem są zaburzenia czucia, ryzyko powstania bolesnego nerwiaka [9, 14, 15, 16, 17].

Dlatego dąży się do lepszego poznania procesów sterujących regeneracją nerwów oraz znalezienia materiałów alternatywnych dla przeszczepów autogenicznych.

mechanical properties of peripheral nerve are important for protection of nerve fascicles and the integrity of their physiological functions. Connective tissue of nerves has an important function in maintaining specific environment of the endoneural space by acting as a diffusion barrier against several macromolecular substances. Changes in its diffusion properties or structural damage caused by stretching may lead to chronic or even permanent impairment of nerve function [12].

## Treatment procedures

In the cases of nerve transection surgical intervention for anatomical nerve stumps coaptation is needed. Actually, a method of the first choice is end to end coaptation with few stitches binding epineurium.

Tension after nerve coaptation greatly deteriorates regeneration effect, therefore nerve injuries with nerve tissue loss require tissue defect supplementation. [9, 14]. Nerve autografting is the most common surgical procedure currently used for repair of nerve injuries with nerve tissue loss defects. Bridging the defect with an autologous donor nerve is associated with several disadvantages, including an extra incision for harvesting of a healthy sensory nerve ultimately resulting in a sensory dysfunctions, risk of painful neurinoma formation [9, 14, 15, 16, 17].

For these reasons processes regulating nerve regeneration and alternative to the autologous nerve grafts artificial materials are still being investigated.

## Requirements for artificial nerve guides implants

Ideal implant for nerve substitute should have the following characteristics:

1. biocompatibility;
2. bioresorbability;
3. potential for stimulating nerve regeneration;
4. material with an ability for incorporation of nerve growth factors;
5. should have an appropriate mechanical properties described by Young's module;
6. easy for intraoperative handling;
7. inexpensive [18, 19].

## Regeneration process in nerve tube implant

One of the main research directions in peripheral nerve regeneration are experiments with membranes creating isolated environment for regenerating nerve tissue. Classic model of nerve tissue loss regeneration relates to empty tube-shape implants. The tube implant connects nerve ends and creates between them isolated environment for free tissue reconstruction.

Regeneration process in empty tube implant occurs in several subsequent stages. Within the first hours after implantation implant's lumen fills-in with acellular fluid originating from nerve stumps inserted in tube. It is rich in neurotrophic and nerve regeneration stimulating agents. In the next stage, fluid is exchanged with loose, acellular extracellular matrix formed mainly by fibrin. After 7 days the fibrin is longitudinally organized lengthwise long implant's axis creating bridge between the nerve stumps, with hour-glass-shape with the narrowest part located closer to distal nerve stump. Nerve bridge diameter is much thinner than tube [20]. Longitudinal fiber organization is regularly disorganized by arch-like bending of fibers creating in transversal section the characteristic arches with bases directed to the implants center [21].

## 44 Wymagania stawiane przed sztucznymi implantami nerwowymi

Idealny implant, który może być użyty do uzupełnienia ubytków nerwów obwodowych powinien charakteryzować się następującymi własnościami:

1. biogodność;
2. bioresorbowalność;
3. stymulacja regeneracji nerwu
4. zdolny do generowania grup funkcyjnych na swojej powierzchni, pozwalających na inkorporację czynników modyfikujących regenerację włókien nerwowych
5. o zbliżonych do nerwów obwodowych właściwościach mechanicznych określanych przez moduł Younga;
6. poręczność chirurgiczna;
7. tani; [18,19]

### Procesy regeneracji zachodzące w implancie

Głównym nurtem badań prowadzonych w celu zastąpienia przeszczepów z nerwów obwodowych materiałem sztucznym są projekty związane z budową membran tworzących odizolowane środowisko dla regenerującej tkanki nerwu. Modelowym przykładem pozwalającym na poznanie sekwencji zdarzeń mających miejsce podczas regeneracji/rekonstrukcji przez organizm ubytku nerwu są badania z zastosowaniem pustych implantów w kształcie rurki. Łączy ona kikut nerwu zapewniając pomiędzy nimi odizolowane środowisko, w którym możliwa jest swobodna odbudowa tkanki.

Procesy regeneracji nerwu zachodzące w pustym wszczepie na bazie rurki przebiegają w kilku następujących po sobie etapach. W ciągu kilku godzin po implantacji światło implantu wypełnia się płynem będącym przesączem z kikutów nerwu. Jest on bogaty w czynniki neurotroficzne i stymulujące regenerację nerwów. W następnym etapie płyn wewnątrz implantu wypełnienia się luźną, bezkomórkową macierzą pozakomórkową zbudowaną głównie z fibryny. Do 7 doby po zabiegu włókien organizuje się linijnie wzdłuż osi długiej implantu tworząc wewnątrz rurki pomost łączący kikut nerwu. Jego kształt przypomina rozciągniętą klepsydę z przesuniętym najwęższym punktem w kierunku kikuta dystalnego. Średnica pomostu jest z reguły cieńsza od średnicy rurki. W obrębie macierzy widoczne są pojedyncze erytrocyty, których ilość spada ku środkowi implantu [20]. Układ linijny wzdłuż osi długiej rurki jest regularnie zaburzony przez łukowate ugięcie się włókien tworząc na przekroju poprzecznym charakterystyczne łuki podstawą skierowane do środka implantu [21]

Na tak przygotowane środowisko wrastają komórki, początkowo są to elementy pozanerwowe. Jako pierwsze, około 4-7 dnia, pojawiają się fibroblasto-podobne komórki wywodzące się z unerwia. Zwykle pokrywają one najpierw zewnętrzną ścianę regeneratu, a następnie wypełniają także światło rurki. Za nimi postępują komórki Schwanna w formie łańcuchów oraz kolejno naczynia. W czasie formowania się bezkomórkowej macierzy wewnątrz implantu dochodzi do wzbudzenia i namnażania się komórek Schwanna w kikutach nerwu, w większym stopniu w kikucie dystalnym niż proksymalnym. Począwszy od około 4-7 doby zaczynają one migrować w światło implantu, najpierw od strony kikuta dystalnego [20,21,22]. Układają się linijnie, wzdłuż osi określonej przez układ włókien fibryny. Proces odbudowy komórkowej zachodzi najszybciej wzdłuż ścian, a następnie postępuje koncentrycznie do środka implantu. Od strony proksymalnej w światło implantu wrastają aksony, które pojawiają się pod koniec pierwszego tygodnia [20]. Towarzyszą im komórki Schwanna z kikuta proksymalnego budujące osłonkę w miarę wydłużania się aksonu. Ko-

Matrix is then colonized by cells, initially by extra neural elements extraneural. Between 4 and 7 day, fibroblast-like cells originating from perineurium appear. These cells typically first cover internal wall of the implant, followed by colonization at lumen. Fibroblasts are followed by Schwann cells forming bunds of Bungers and successively blood vessels. During acellular matrix formation Schwann cells in nerve stumps arouse and start to proliferate, more effective in distal than in proximal stump. Since 4-7 day Schwann cells start to migrate into tube lumen, beginning from distal stump [20,21,22]. They arrange longitudinally along an axis created by fibrin fibers arrangement. The most effective cellular reconstruction proceeds along the tube walls and subsequently concentrically to the implant centre. Axons growth into the implant, from proximal side, begins from the end of first week [20]. It is accompanied by Schwann cells from proximal stump that are creating axons myelin sheath as it elongates. During axon regeneration Schwann cells in the front or behind of growth cone are found. However, it is known, that Schwann cells are capable to colonize implant independently of contact with axon [20,22,23]. Regeneration process greatly enhances from 9 day after tube implantation [21]. After connection of proximal and distal regeneration parts (for implants 10 mm long it takes about 16-17 day, while for 25 mm long 21 day) digit-like processes take place with transiently disorganizing local longitudinal orientation [15,21]. After 7 days axons penetrate distal part of implant and elongate using support provided by Schwann cells originating from distal stump. The distal stump is reached after 21-28 days [20,21,24]. Growth of axons in distal part of implant is now oriented by longitudinal Schwann cell orientation. Direct contact of distal Schwann cells with axon stops their proliferation. If distal and proximal aspects of regeneration process are not connected, Schwann cells from distal stump and axons from proximal stump, after short migration (about 4-5 mm), usually stop to migrate. Schwann cells create cup-like structures covering distal stump [10,15,21,25,26]. Myelination process between 14 - 36 day and advances from proximal to distal stump [20,22]. Simultaneously extracellular matrix created by fibroblasts matures providing mechanical support for growing tissue. Excessive connective tissue or even cicatrice formation takes place in areas related to foreign body such as silicon or fibers of non-absorbable treads. Connective tissue greatly disturbs orientation of fibrin filaments and hampers cells and axons migration [21]. In late phases of regeneration number of counted axons in distal stump is greater than in proximal one. It is explained by the fact that the growth cones produce few independently regenerating processes that extend into the distal stump. This process increases chances of successful regeneration for particular single axon [21,22]. During the second week blood vessels start to grow into the implant, both from proximal and both distal stump. Vessels follow the front of migrating cells and axons. By the end of third week the vessels from stumps meet in the central regeneration zone nourishing about 10 mm tissue section [20,21]. Elimination of blood flow from nerve stumps makes impossible nerve tissue regeneration [23,27].

Regenerated nerve fibers are thinner; both axons and myelin sheaths [10,15,20,21,22,25,26,28]. During tissue maturation number of axons decreases while diameter of myelin sheaths increases [22,29,30]. Some implants, like silicone, show tendency to stimulate parietal connective tissue creation. This tissue tightens and narrows the nerve space inducing degenerative processes in regenerated nerve tissue. Nerve fibers are damaged showing morphological tissue image comparable with multiple crush injury [22]. This process greatly differs from aging process of re-

mórki Schwanna w trakcie postępowania regeneracji aksonu są stwierdzane przed lub za stożkiem wzrostowym, przy czym wiadomo, że komórki Schwanna mają zdolność kolonizować powstający regenerat niezależnie od kontaktu z aksonami [20,22,23]. Proces regeneracji tkanki nerwu ulega wyraźnemu przyspieszeniu od 9 doby po zabiegu [21]. Po zetknięciu się czoła obu tych procesów (przy implantacji długości 10 mm następuje to około 16-17 dnia, przy długości 25 mm około 21 dnia) dochodzi do ich palczastego nachodzenia się i przejściowego zaburzenia osiowej orientacji w miejscu przejścia [15,21]. Po około 7 dniach aksony przechodzą do dystalnej części regeneratu i wykorzystując podporę komórek Schwanna pochodzących z kikuta dystalnego, osiągając około 21-28 dnia kikut dystalny [20,21,24]. Ich wzrost następuje teraz według kierunku określonego przez układ tych komórek (przypomina to wrastanie w kanały Büngera). Powoduje to zatrzymanie namnażania się komórek Schwanna pochodzących z kikuta dystalnego. Jeżeli nie dochodzi do połączenia się obu procesów komórki Schwanna w kikucie obwodowym, aksony w kikucie proksymalnym, po przejściu pewnego odcinka (około 4-5 mm) przestają migrować. Komórki Schwanna tworzą strukturę na kształt "czapeczki", która pokrywa kikut dystalny [10,15,21,25,26]. Początek mielinizacji postępujący od kikuta proksymalnego w kierunku dystalnym obserwuje się między 14-36 dniem [20,22]. Jednocześnie dojrzewa substancja pozakomórkowa budowana przez fibroblasty dając mechaniczną podporę powstającej tkance. Nadmierne powstawanie tkanki łącznej, a nawet bliznowacenie ma miejsce w okolicach pokrywających powierzchnię ciała obcego, np. jakim jest silikon lub włókna użytych szwów niewchłanialnych. Tkanka łączna w istotny sposób zaburza w tych rejonach orientację włókien fibryny oraz utrudnia migrację komórek i aksonów [21]. W późniejszych fazach regeneracji w kikucie dystalnym stwierdza się zdecydowanie większą ilość aksonów niż jest obecna w kikucie proksymalnym. Jest to związane z wytwarzaniem przez stożki wzrostowe kilku niezależnie wzrastających włókien, które regenerują poprzez kikut dystalny. Zwiększa to szanse powodzenia regeneracji pojedynczego aksonu [21,22]. W okresie drugiego tygodnia zaczynają w implant wzrastać naczynia krwionośne, początkowo od proksymalnego kikuta, następnie od dystalnego. Postępują one za czołową strefą migracji komórek aksonów. Pod koniec trzeciego tygodnia naczynia spotykają się w środkowej strefie regeneratu unaczyniając 10 mm odcinek tkanki [20,21]. Odcięcie ukrwienia pochodzącego od kikutów nerwów praktycznie uniemożliwia regenerację [23,27].

Zregenerowane włókna nerwowe są cieńsze, zarówno aksony jak i osłonki mielinowe [10,15,20,21,22,25,26,28] Z czasem dochodzi do zmniejszania się ilości aksonów oraz pogrubiania się osłonek mielinowych [22,29,30]. Pewną specyfiką implantów silikonowych jest tendencja do powstawania włóknienia przyściennego. Prowadzi to do zaciśnięcia nerwu i wzbudzenia procesów degeneracyjnych w powstałej tkance nerwu. Niszczą one włókna nerwowe dając obraz morfologiczny tkanki porównywalny z wielokrotnym urazem zmiążdżeniowym [22]. Znacząco różnią się on od procesów starzenia się zregenerowanego nerwu czy dojrzewania powstałych włókien nerwowych i resorpcji niepożrebnych powstałych gałęzi pojedynczego aksonu [29,30].

Formowanie macierzy pozakomórkowej, a następnie tkanki regeneratu jest zależne od średnicy i długości zastosowanej rurki i ubytku [27].

generated nerve or from maturation of regenerated nerve fibers and resorption of collateral needles branches of single completely regenerated axon [29,30].

Extracellular matrix formation and subsequent tissue regeneration depend on diameter and length of implanted tube and nerve tissue defect [27].

### Membranes and fibers with potential application for peripheral nerve regeneration

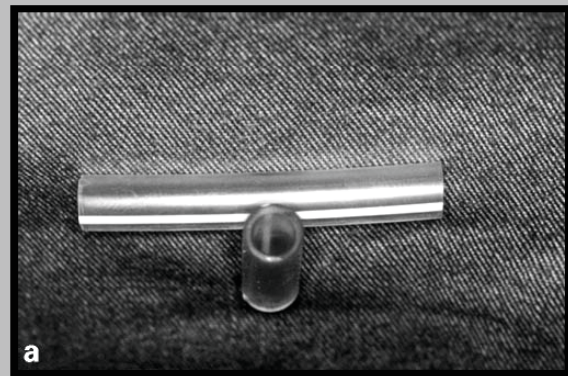
#### *Polymers membranes*

Both biostable as well as biodegradable polymers are used as the carrier materials for regeneration of peripheral nerve. Most popular stable polymer materials are epoxy resins, polytetrafluoroethylene, polyimide and first of all silicone rubber. These polymers are biocompatible, electrically insulating and stable. To improve biocompatibility of polymer-based implants their bulk and surface properties can be modified in wide range [18].

Classic example of artificial implant used in surgery for many years are silicone tubes. Investigations of this material provided several important informations about nerve regeneration process [31,32]. Silicone tubes provide an "extrinsic" closed space within of which a spontaneously formed fibrin matrix allows for ingrowth of axons and non-neuronal cells [33]. One of silicone implants drawback is mismatching mechanical properties to those of tissue. Moreover, silicone material strongly stimulates fibrous tissue formation, and by consuming tube space limits or even inhibits regeneration, migration of axons from proximal to distal stump [34].

Actually biodegradable materials are being examined, in order to eliminate necessity of second operation for nerve guide removal after nerve regeneration is completed [35].

Several biodegradable synthetic materials, in the form of simple hollow conduits, have been shown to support nerve regeneration. Biodegradable polymers used as membranes or channel to regeneration of peripheral nerve are poly-lactide acid (PLLA), poly-glycolic acid, copolymer poly-lactide-co-glycolic acid (PGLA), chitosan, collagen and poly-3-hydroxybutyrate (PHB).



**RYS. 1. Rurka silikonowa.**  
**FIG. 1. Silicone tube.**

Polyesters, such as polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA), poly-lactide-ε-caprolactone and PLGA have been used extensively due to their availability, processability and low inflammatory response [36]. A suitable material should be biocompatible, probably bioresorbable, beneficial to nerve regeneration and maturation, resistant to scar invasion, and clinically applicable. PLLA, and polyglycolid acid (PGA) offer several advantages including their biode-

*Membrany polimerowe*

Polimery, zarówno stabilne jak i biodegradowalne, są najbardziej obiecującymi materiałami do produkcji implantów dla regeneracji nerwów obwodowych. Najbardziej popularnymi polimerami niebiodegradowalnymi są żywice epoksydowe, politetrafluoroetylen, poliimidy, a przede wszystkim silikon. Wymienione polimery są biogodne, trwałe, a pod względem elektrycznym są izolatorami. Większość właściwości polimerów może być w pewnym stopniu modyfikowana, także powierzchnia polimerów może ulegać modyfikacji w celu poprawienia jej biogodności [18].

Klasycznym obecnie przykładem sztucznego implantu są rurki sylikonowe stosowane od wielu lat w chirurgii. Badania z ich użyciem dostarczyły wielu danych o procesach regeneracji zachodzących w nerwach obwodowych [31,32]. Rurki silikonowe stanowią zamknięte środowisko, wewnątrz którego następuje samoistne formowanie się macierzy fibryny. Pozwala ona na wzrost aksonów, naczyń włosowatych i migrację komórek podporowych [33]. Wadą implantów silikonowych jest niedopasowanie ich własności mechanicznych z własnościami mechanicznymi tkanek, z którymi implant jest połączony, a także fakt, że jest to materiał niebiodegradowalny. Ponadto materiał sylikonowy silnie stymuluje powstawanie tkanki włóknistej, która przerastając światło rurki ogranicza bądź wręcz uniemożliwia regenerację, przerastanie włókien nerwowych z części proksymalnej do części dystalnej ubytku [34].

Obecnie dąży się do zastosowania degradowalnych materiałów, aby uniknąć potrzeby ponownej operacji w celu usunięcia "nerve guide", gdy całkowita regeneracja nerwu dobiegnie końca [35].

Wiele biodegradowalnych materiałów syntetycznych w formie prostych, wdrażonych wewnątrz kanałów jest wykorzystywanych jako podpory dla regeneracji nerwów. Polimery bioresorbowalne stosowane do regeneracji nerwów występujące w formie membran bądź kanałów to: polilaktyd (PLA), poliglikolid, kopolimer poli-l-laktydu z poliglikolidem (PGLA), chitozan, kolagen, poli-3-hydroksybutyren (PHB).

Poliestry takie jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), poli-ε-kaprolakton i kopolimer laktydu z glikolidem (PLGA) są stosowane w szerokim zakresie ponieważ są łatwo dostępne, proste w obróbce i wywołują niewielki odczyn zapalny [36]. Odpowiedni materiał powinien być biogodny, ulegać bioresorpcji, podtrzymywać regenerację nerwów i ich kształtowanie, a dodatkowo być poręczny chirurgicznie. Polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA) wykazują sporo pozytywnych cech takich jak: biodegradowalność, biogodność oraz porowatą strukturę odpowiednią dla tworzenia się naczyń krwionośnych [1,37]

Kwas glikolowy jest łatwo dostępnym, biogodnym materiałem o dobrych właściwościach mechanicznych. Ulega biodegradacji nie wytwarzając toksycznych produktów. Implant zbudowany z rurki poliglikolidowej wypełnionej kolagenem został zastosowany z powodzeniem dla uzupełnienia 15 mm ubytku nerwu strzałkowego u psa [38]. Podobny implant składający się z rurki poliglikolidowej pokrytej kolagenem i wypełnionej włóknami kolagenowymi pokrytymi lamininą zastosowano dla uzupełnienia ubytku 80 mm nerwu strzałkowego również u psa.

Implant mtaki zawiera większość znanych czynników wspomagających regenerację nerwu (osłonę rurki, podporę macierzy komórkowej, sekwencje sygnałowe błony podstawnej dla komórek Schwanna - laminina). Zastosowanie takiego implantu pozwoliło uzyskać powrót siły mięśniowej

gradability, porous structure for vascularization and consistency in design requirements [1,37].

Polyglycolic acid is easy available, biocompatible material with good mechanical properties. It biodegrades without any toxic products. Implant in the form of tube made of polyglycolid tube filled with collagen sponge was used successfully for bridging 15 mm peroneal nerve gap in dog [38]. Similar implant, polyglycolid acid tube coated with collagen and filled with laminin coated collagen fibers, was used for bridging 80 mm gap in dog's peroneal nerve. Such implant contains most of known factors stimulating nerve tissue regeneration (tube wall protection, extracellular matrix support, Schwann cell base membrane signal sequences - laminin). This implant application allowed for dog's muscle strength restoration adequate for normal walk without weight support on that limb. During 12 months of observation number of axons counted in regenerated tissue decreased (degeneration of lateral processes of axon's that successfully ended regeneration creating synaptic connection), an increase of myelin sheaths diameter, increase of amplitude and decrease of signal latency in regenerated tissue [39].

PGA implants were used in researches on humans. 43 digital nerves were connected. Final effect measured in two point discrimination test was as follows: 43% results were very good (S4 score British Medical Research Council) and 43% good (S3+ score BMRC). Treatment outcome was statistically better comparing to classic methods. Difference was greater for short gaps (4 mm and less) than for long (8-30 mm) [40]. In another study good results were indicated also for long gaps with 3 cm length [24].

The most promising material for reconstruction of peripheral nerve was poly-3-hydroxybutyrate (PHB). PHB is a natural biological polymer, manufactured as bioresorbable sheets, which can be formed into tubes [41]. PHB is an energy storage product of bacterias, occurring within the cell cytoplasm as granules. It is available in the form of bioabsorbable sheets, which are non-antigenic, easy to handle and have good tensile strength. PHB undergoes hydrolytic degradation and is completely absorbed within 24-30 months [42].

Chitosan is one of the most popular polysaccharides found in nature [43]. Natural polysaccharide usually contributes to cellular adhesion and inhibition of scar formation. Chitosan membranes and fibers have excellent neuroglial cell affinity. Such material may repair certain distant nerve injury, causing little or no immune reaction of the body [44]. Chitosan is very hydrophilic allowing for its expansion in contact with water. However, its porous forms are attempted to be used as the constructs at artificial extracellular matrix suitable for the growth of neural cells. The molecular structure of chitosan is similar to that of glycosaminoglycan, which resides in the basal membrane and extracellular matrix. It make it reacts with extracellular adhesive molecular, such as laminin, fibronectin and collagen IV, which promote cells to adhere, migrate and differentiate [44,45].

Collagen belongs to the most often used materials for nerve guide preparation due to its biocompatibility and desirable tensile strength [46]. Collagen is the main protein of connective tissue in animals and the most abundant protein in mammals, making up about 1/4 of the total proteins. Over 3 year observation, with proved usefulness of collagen implants for peripheral nerve gaps bridging [47,48]. Studies of regeneration processes in silicone and collagen tubes revealed their similarity. Important factor is stimulation of regeneration in prefilled tubes. Tubes are filled with collagen type I, mixture of type I and IV or collagen bonded with chondroitin sulphate [26]. Collagen implant durability

u psa umożliwiającą zwierzęciu normalny chód. W czasie 12 miesięcznej obserwacji stwierdzono zmniejszenie się liczby aksonów w regeneracji (degeneracja bocznych wypustek aksonów, które wytworzyły połączenia) powiększenie się średnicy osłonek mielinowych, spadek latencji przewodzenia sygnałów przez zregenerowany nerw [39].

Implanty na bazie PGA zostały zastosowane w badaniach na ludziach. W jednym z badań wykonano zespolenie 46 nerwów palcowych uzyskując w badaniu czucia dwupunktowego po 43 % wyników bardzo dobrych (S4 według British Medical Research Council) i dobrych (S3+ według BMRC). Wynik leczenia był statystycznie lepszy w porównaniu do metod klasycznych. Różnica była bardziej widoczna dla bardzo krótkich ubytków (do 4 mm) niż dłuższych (8-30mm) [40]. Kolejne badania wykazały dobre wyniki leczenia dla ubytków o długości 3 cm [24].

Bardzo obiecującym materiałem dla regeneracji nerwów obwodowych jest poli-3-hydroksybutyren (PHB). PHB jest naturalnym polimerem, produkowanym jako bioresorbowlane warstwy, które mogą być następnie przetwarzane w postaci rurek [41]. PHB w postaci granułów występuje w sposób naturalny w cytoplazmie komórki bakterii jako substancja magazynująca energię. PHB jest dostępny jako bioresorbowlane warstwy, o niskiej antygenowości, jest poręczny i cechuje się dobrą wytrzymałością na rozciąganie, PHB ulega degradacji hydrolytycznej i jest całkowicie usuwany w ciągu 24-30 miesięcy [42].

Chitozan jest jednym z najczęściej występujących w naturze polisacharydów o ładunku dodatnim (chitozan jest w całości bądź częściowo otrzymywany przez deacetylację chityny) [43]. Naturalne polimery wykazują wysokie zdolności adhezji komórek oraz inhibicji powstawania blizny. Membrany oraz włókna chitozane wykazują doskonałe powinowactwo do komórek neurogleju, dzięki czemu materiał ten może być z powodzeniem wykorzystany do rekonstrukcji uszkodzonych nerwów. W niewielkim stopniu lub nawet wcale wywołuje reakcje immunologiczną organizmu [44]. Chitozan jest bardzo hydrofilny, co powoduje, że wchłania duże ilości wody, jest wysoko porowatym materiałem, przez co może być wykorzystany do konstrukcji sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiedniej dla wzrostu komórek nerwowych. Struktura molekularna chitozanu jest podobna do glikozaminoglikanów, które znajdują się w błonie podstawowej oraz w macierzy zewnątrzkomórkowej. Sprawia to, że chitozan w łatwy sposób oddziałuje z zewnątrzkomórkowymi cząstkami adhezyjnymi takimi jak laminina, fibronektyna oraz kolagen typu IV, które pobudzają komórki do adhezji, migracji oraz różnicowania się [44,45].

Kolagen jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów do produkcji "nerve guide" z powodu jego biozgodności oraz pożądanej wytrzymałości na rozciąganie [46]. Kolagen jest głównym białkiem tkanki łącznej zwierząt oraz najczęstszym białkiem występującym u ssaków, stanowiącym około 1 wszystkich białek. Ponad 3 letnia obserwacja na naczelnych potwierdziła przydatność kolagenowych pomostów do uzupełniania ubytków nerwów obwodowych [47,48]. Kolejne badania wskazują na identyczność procesów regeneracyjnych na bazie kolagenu i rurek sylikonowych. Ważnym aspektem jest stymulacja regeneracji w przypadku wypełnienia rurek. Stosuje się macierze zarówno z czystego kolagenu typu pierwszego, jak i mieszanin typu I i IV oraz kolagenu połączonego z siarczanem chondroityny [26]. Dla podniesienia wytrzymałości implantu kolagenowego stosuje się obróbkę przy użyciu ultrafioletu, ogrzewania lub poddanie wpływowi aldehydu glutarowego. Kolagen poddany obróbce termicznej ulega wchłonięciu po 6 tygodniach, jest dobrze unaczyniony, powstająca na jego bazie tkanka nerwowa jest podzielona w pseudopęczki z dużą ilością gęstej tkanki bliznowatej. Materiał poddany obróbce

is modified using UV, heat treatment or glutar aldehyd. Heat treated collagen is fully absorbed after 6 weeks, well vascularised, nerve tissue is divided in pseudofascicles with large quantity of dense cicatrice tissue. UV treated material is poorly vascularised, nerve tissue matures and after 12 weeks is comparable to autograft (number of myelinated axons, muscle evoked potentials) [49]. Glutaraldehyd creates strongly hydrophobic and cytotoxic surface that greatly inhibits regeneration process [49,50]. Except of physical features of implant such, as pore network, pore diameter, three-dimensional canals localization, implant preparation technique is also important, and may greatly change its regenerative properties [49].

Previous studies have shown that collagen tubes cannot be used to bridge nerve defects greater than 15mm, since a long collagen tube can break and its lumen could collapse due to movement. Sometimes a collagen tube with a length of 20mm and an inner diameter of 1mm was coated with polymer, for examples poly(l-lactide-co-glycolic acid) (PLGA) to enhance its structural integrity and elasticity. The polymer layer performs two roles: reinforces collagen membrane and prevents collapse due to movement. On the other, hand, it creates a highly porous structure, which is important determinants for nutrient transport into the conduit. The collagen layer also prevents surrounding tissue from invading the tubes [51,52,53].

The polymers conduits are very often filled with fibers materials like poly(l-lactide-co-glycolide) (PLGA) fibers, poly-l-lactide acid (PLLA), alginian filaments and hydrogels, collagen filaments, carbon filaments, bioglass fibers, chitosan fibers or material with properties of hydrogel [44,54].

Collagen fibers can be used as scaffolds for axonal elongation. Collagen is a major component of the extracellular matrix and is known to promote cellular proliferation and tissue healing. It has also been reported that the biological properties of collagen make it a superior choice for the use in conjunction with nerve tubes as a promoter of peripheral nerve regeneration [37,55]. Nerve scaffold made of the collagen filaments can be length from 20 to 30mm and 20µm in diameter [56].

Bioglass fibers are not only biocompatible and bioresorbable, what are the fundamental requirements of successful devices, but also amenable to bioengineering. Such fibers have the potential for the use in the most challenging clinical cases, where there are long inter-stump gaps to be bridged. Bioglass fibers can be used to deliver growth factors and/or adherent cells within the lumen of a nerve conduit. Bioglass fibers used as scaffolds for axonal regeneration consist of SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaO and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and, their dimensions are 0,5cm long and 25µm diameter. Scientists from United Kingdom have applied bioresorbable bioglass fibers as a scaffolds for axonal regeneration. 0,5cm fragment at the sciatic nerves of adult rats was reconstructed. The axonal regrowth was qualitatively and quantitatively indistinguishable from that seen using an autograft [57].

Alginian based hydrogels are well recognized materials both in experimental studies as well as in clinical applications [58]. It is natural polymer extracted from sea algae, composed by turn of mannose and glucuronic acid. Ca ions addition to water alginate solution cause ionic bonds creation between polymer chains. This process turns the solution into hydrogel, and its solidity can be controlled by concentration of Ca ions [59]. Lack of specific cell bonding sections makes alginate chains ideal ground for construction of extracellular matrices. In order to facilitate material cell colonization, alginate chains are modified with cell's binding signal sequences. The most common sequence is RGD [59,60,61]. Alginates can be easily sterilized or modified chemically in order to change their properties [59]. 10 mm



UV jest słabo unaczyniony, jednak wstająca wąż tkanka nerwowa szybko dojrzewa osiągając po 12 tygodniach postać podobną do autoprzeszczepu [49]. Glutaraldehyd powoduje powstanie powierzchni o silnej hydrofobowości oraz cytotoksyczności, co znacznie upośledza procesy regeneracyjne wewnątrz takiego implantu [49, 50]. Oprócz właściwości fizycznych implantu takich jak sieć porów, ich średnica, ułożenia przestrzenne kanałów ważną jest technika przygotowania implantu, która może znacznie wpłynąć na jego właściwości [49].

Wcześniejsze badania wykazały, że rurki kolagenowe nie mogą być zastosowane do uzupełniania ubytku nerwu większego niż 15 mm, ponieważ mogą ulegać złamaniu, bądź zapadaniu w wyniku przemieszczeń. W celu poprawienia elastyczności i odporności struktury na zniszczenie, rurki kolagenowe są pokrywane polimerem takim jak kopolimer polilaktydu [z poliglikolidem]. Powłoka polimerowa spełnia dwie funkcje: po pierwsze wzmacnia jej ścianę oraz zapobiega jej zapadaniu w trakcie ruchu, po drugie tworzy wysokoporowatą strukturę, która jest bardzo ważna dla transportu substancji odżywczych do wnętrza implantu. Powłoki polimerowe na powierzchni rurek kolagenowych zabezpieczają także przed wtargnięciem tkanki zewnętrznej do wnętrza rurki [51,52,53]. Złącza polimerowe bardzo często są wypełniane materiałami włóknistymi takimi jak włókna z kopolimeru poli-l-d-laktydu z poliglikolidem (dl-PLGA), włókna z poli-l-laktydu (PLLA), włókna alginianowe, kolagenowe, węglowe, włókna z bioszkieł, włókna chitozanowe a także materiałem wypełniającym może być hydrożel [44, 54].

Włókna kolagenowe mogą być używane jako podłoża dla wzrastających włókien nerwowych. Dzięki odpowiednim własnościom biologicznym, włókna kolagenowe są używane jako elementy wypełniające polimerowe implanty nerwów, ułatwiające ich regenerację [37,55]. Podłoża dla regeneracji nerwów wykonane z włókien kolagenowych mogą mieć długość od 20 do 30mm i średnicę 20  $\mu\text{m}$  [56].

Włókna z bioszkieł są biogodne i bioresorbowalne, a także mają możliwość potencjalnego zastosowanie w wielu stanowiących wyzwanie dziedzinach, na przykład do mostowania długich przerw między kikutami. Mogą być zastosowane jako elementy do transportowania czynników wzrostu oraz/lub jako podpora dla wzrostu komórek nerwowych. Włókna z bioszkieł stosowane jako podłoża dla regeneracji aksonów zawierają  $\text{SiO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  i  $\text{P}_2\text{O}_5$ , przy wymiarach 0,5cm długości oraz 25 $\mu\text{m}$  średnicy. Naukowcy z Wielkiej Brytanii zastosowali włókna z bioszkieł jako podłoża dla regeneracji aksonów dla 0,5cm ubytku nerwu kulszowego dorosłego szczura - różnica pomiędzy parametrami odbudowanego aksonu, po zastosowaniu włókien z bioszkieł, a autoprzeszczepu była praktycznie niedostrzeżalna [57].

Hydrożele skonstruowane na bazie alginianów są dobrze poznanymi materiałami stosowanymi zarówno w badaniach doświadczalnych jak i mającymi uznane zastosowanie w medycynie[58]. Jest to naturalny polimer izolowany z alg morskich, zbudowany z położonych na przemian jednostek kwasu manuronowego i gulturonowego. Dodatek jonów Ca do roztworu wodnego alginianów powoduje powstawanie wiązań jonowych pomiędzy łańcuchami polimeru, co prowadzi do przechodzenia roztworu w postać hydrożelu. Stopień upostaciowienia może być regulowany stężeniem dodanych jonów Ca [59]. Ze względu na brak specyficznych miejsc łączenia z komórkami w łańcuchach polimeru alginiany są idealnym podłożem do konstrukcji sztucznych macierzy pozakomórkowych [59,60,61]. Alginiany poddają się prostym procesom sterylizacji, są łatwe w modyfikacji chemicznej celem zmiany właściwości [59]. Zastosowano gąbki alginianowe jako pomosty dla regene-

alginate sponge implanted as a bridge for nerve regeneration is absorber in 4 weeks. During that time axons manage to pass the gap. Characteristic is fact, that ingrowth of tissue into the implant starts with axons followed by Schwann cells. Schwann cells produce fully valuable myelin sheath. Simultaneously with proximal regeneration into the implant Schwann cells migrate from distal stump and create tuberoles for approaching axonal growth cones. After connection of these processes axons start to ingrowth into distal part of regeneration and elongate using Schwann cell tubes. This process proceeds off-centre, firsts taking place in parietal, and secondly in central part of implant. This aspect of regeneration is dependent on gel degradation preceded from external part of implant, gradually creating looser, easier penetrable environment for regenerating tissue. It points to fact that, at lest for alginate, more important factor controlling implant colonization are degradation processes than that of pore diameter. Morphological analysis of the regenerated tissue revealed of regenerated axon. The amount of such axons the presence corresponded to the half of the number at uninjured part of nerve, and electrophysiological analysis proved existence at functional connections [30]. Axonal elongation and creation of functional connections with target organ is possible for unmodified 50 mm alginate implants [62].

#### *Neurotrophic substances in artificial nerve implants*

For improvement of neuroregeneration promoting properties polymers tubes prior implantation are filled with several neurotrophic factors, which can promote early peripheral nerve regeneration. The most commonly used neurite-promoting factors include collagen gel, laminin and fibronectin [63,64] and the most extensively studied neurotrophic factor, nerve growth factor (NGF) [65]. The effect of NGF grafted onto membranes indicates that the procedure used in immobilization of NGF onto polymers membrane may be beneficial for adhesion of Schwann cells on the membranes. The immobilization NGF on polymer membrane is following: polymer membranes were soaked in chemical solution, for examples in 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) solution and then transferred to NGF solution. In this process NGF reacts with bonds existed on the surface of polymer membranes [66].

Extracellular matrix fibers like laminin, fibronectin and collagen play important role in every tissue regeneration process [32]. Laminin is mainly produced by Schwann cells and widely dispersed in the peripheral nervous system. Fibronectin can be found in plasma, fibrous tissue, and basement membrane. Fibroblasts and Schwann cells also produce significant amounts of fibronectin. Laminin, fibronectin and collagen are major constituent of all extracellular matrices. Prefilling of nerve tube implants with these fibers can greatly enhance nerve regeneration processes in implant.

In order to improve peripheral nerve regeneration polymers conduits are incorporating with allogenic Schwann cells (SCs). The SCs are harvested, cultured to obtain confluent monolayers and injected into the biopolymers conduits [1]. Schwann cells play a crucial role in regeneration of peripheral nerves due to their neurotrophic influence, mechanic support and providing protection with myelin sheet. Schwann cells produce and accumulate trophic factors for regenerating axons and thus are essential for axonal regeneration, particularly for long gaps [44,67,68]. Schwann cells produce basal lamina components, such as collagen IV, which provide the extracellular matrix for attachment of the regenerating axons [1,69,70,71]. Precolonization of the implant with these cells shortens the time of regeneration by elimination of the fibrin bridge and it's cellular colonization period. Allo,

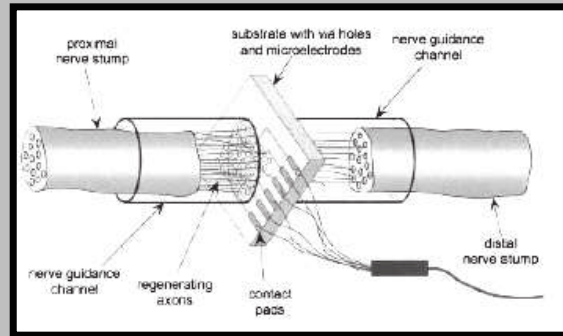
racji ubytku nerwu o długości 10mm i zaobserwowano ich całkowite wchłonięcie w ciągu 4 tygodni przy jednoczesnej regeneracji aksonów. Charakterystyczny jest fakt, że wrastanie tkanki w implant zaczyna się od aksonów, za którymi podążają komórki Schwanna. Wytwarzają one w pełni wartościowe osłonki mielinowe. Jednocześnie od bieguna dystalnego w obręb implantu napływają komórki Schwanna tworząc tor dla zbliżających się stożków regenerujących aksonów włókien nerwowych. Po zetknięciu się tych dwóch procesów dochodzi do przejścia aksonów z proksymalnego pola wzrostowego w dystalne i dalszy wzrost na bazie utworzonego przez komórki Schwanna podłoża. Procesy te zachodzą ekscentrycznie zajmując najpierw obrzeże implantu a następnie coraz bardziej centralne części. Jest to związane z procesami degradacji żel, który postępuje stopniowo od zewnątrz do wewnątrz, tworząc środowisko łatwiej penetrowane przez regenerującą tkankę. Wskazuje to, że przynajmniej w przypadku alginianów, ważniejszym czynnikiem kontrolującym kolonizację implantu przez tkankę są procesy jej degradacji niż wielkość porów. Badania morfologiczne wykazują obecność zregenerowanych aksonów w ilości odpowiadających połowie ilości obecnych po stronie zdrowej, a badania elektrofizjologiczne wykazują wytworzenie funkcjonalnych połączeń [30]. Według badań możliwe jest uzyskanie przechodzenia aksonów przez niewzbogacone implanty alginianowe o długości 50mm z wytworzeniem funkcjonalnych połączeń [62].

#### Możliwości wykorzystania substancji neurotroficznych w sztucznych implantach nerwowych

Dla zwiększenia właściwości neuroregeneracyjnych rurki polimerowe stosowane jest wzbogacanie ich przed implantacją różnorodnymi czynnikami neurotroficznymi, dla pobudzenia wczesnych faz regeneracji nerwów obwodowych. Najczęściej stosowanymi czynnikami neurotroficznymi są żel kolagenowy, laminina, fibronektyna [63,64], oraz najlepiej poznany czynnik stymulujący neuroregenerację - czynnik wzrostu nerwu (NGF - nerve growth factor) [65]. Imobilizacja czynnika NGF we wnętrzu membrany polimerowej może wspomagać adhezję komórek Schwanna. Proces imobilizacji NGF do wnętrza membrany odbywa się następująco: membrana polimerowa najpierw zanurzona zostaje w roztworze chemicznym np. 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC), a następnie przeniesiona do roztworu NGF. W wyniku tego procesu NGF reaguje z wiązaniami znajdującymi się na powierzchni membrany polimerowej [66].

W procesie regeneracji wszystkich tkanek istotny udział mają włókna macierzy pozakomórkowej: laminina, fibronektyna oraz kolagen [32]. Laminina jest głównie produkowana przez komórki Schwanna, występuje w dużej ilości w całym obwodowym układzie nerwowym. Fibronektyna jest obecna w plazmie, tkance włóknistej oraz błonie podstawnej. W znacznej ilości produkowana jest przez fibroblasty oraz komórki Schwanna. Wypełnienie tymi materiałami implantowanych tub pozwala na znaczną modyfikację i przyspieszenie procesów regeneracji zachodzących w implancie.

W celu przyspieszenia regeneracji nerwów obwodowych stosuje się wzbogacanie implantów komórkami Schwanna (SCs) pochodzenia allogenicznego. Komórki Schwanna są hodowane w celu uzyskania konfluentnej monowarstwy, a następnie wstrzykiwane do wnętrza implantu polimerowego [1]. SC pełnią decydującą rolę w regeneracji nerwów z uwagi ich neurotropowe i neurotroficzne właściwości. Stanowią podporę mechaniczną dla regenerujących aksonów, wytwarzają oraz akumulują czynniki odżywcze dla regenerujących się aksonów, co jest szczególnie ważne przy dużych ubytkach nerwu [44,67,68]. Komórki Schwanna produkują także składowe blaszki podstawnej, takie jak kola-



RYS. 2. Schemat elektrody dla regeneracji nerwów. [74].

FIG. 2. Electrode scheme for nerves regeneration.

kseno i autogenic cells are used, pre or not predegenerated. The best effects are found with autogenic, preinduced cells [72,73].

### Microelectrodes for nerve regeneration

Interesting investigation areas pertain to composite implants used for stimulating nerve regeneration, passive extracellular matrix support and active electrical stimulation of nerve regeneration. These systems consist of microelectrodes placed on a sieve-shaped plate containing long, narrow holes, round in shape. The microelectrodes are situated close to the holes or constitute a part of the hole wall [74]. The electrode array of via holes is adapted into the expected path of the regenerating fibers in a fashion that the nerve fibers are allowed to regenerate through the perforations of the device. In order to assure the mechanical stability of all system, the electrodes are placed between polymer channel connecting proximal nerve stump with distal one.

The advantage of this approach is that the electrodes are in near contact with the nerve fibers, thus allowing for both accurate recording and efficient stimulation. The disadvantage of this method is that the nerve has to be cut in order to regenerate through the implanted device. The success of the whole operation can be assessed only several weeks after implantation, when the axons have been regenerated through the device. Sometimes, there is a possibility that nerve fibers may be damaged by the mechanical load imposed by the electrode or by the force within the via holes, especially over long term implantation [74,75].

Various techniques and materials have been used to fabricate the needed sieve electrodes. Some early electrodes were realized by embedding 25mm-diameter hollow gold cylinders into porous Teflon. Other was realized by mechanically drilling 100mm-diameter holes into epoxy modules and then embedding 77mm-diameter Teflon-coated silver wires into the holes [76]. The material very often used in the construction of regenerative electrodes is silicon. The silicon electrodes with dimensions and number of via holes compatible with the characteristics of peripheral nerves were used in axonal regeneration nerves of rat, and frog [19,21]. However, such silicon interfaces cause frequent signs of axonopathy, and constitute a physical barrier that limits the elongation of regenerating axons depending on the size of the via holes [75,76]. Recently the silicon electrodes are replaced by polyimide-based electrodes. Polyimide allows to make a higher number of holes than silicon dice of the same total area and to be micromachined in a variety of designs suitable for implantation in different nerve models.

gen typu IV czy laminina, które ułatwiają kontakt regenerujących włókien nerwowych z macierzą zewnątrzkomórkową [1,69,70,71]. Wzbogacenie implantu tymi komórkami skraca okres regeneracji o czas potrzebny na uformowanie pomostu fibrynowego i skolonizowanie go przez nadpelzające komórki Schwanna. Najkorzystniejsze wyniki daje zastosowanie autogennych wzbudzonych komórek Schwanna [72,73].

### Mikroelektrody w regeneracji nerwów

Jednym z ciekawych podejść badawczo-eksperymentalnych są badania z użyciem kompozytowych implantów wykorzystujących stymulującą regenerację włókien nerwowych właściwości biernego podparcia tkanki i czynnej stymulacji elektrycznej. Układy te zbudowane są z mikroelektrod umieszczonych na płytce w kształcie sita zawierającej długie, wąskie, okrągłe otwory. Mikroelektrody usytuowane są na brzegu otworów bądź są częścią ścianek otworów [74]. Elektrody umieszczane są w taki sposób w ubytku nerwu, aby regenerujące się włókna nerwowe mogły przedostać się przez znajdujące się w niej otwory.

W celu zapewnienia mechanicznej stabilności całego układu, elektrody usytuowane są pomiędzy polimerowymi kanałami łączącymi kikut proksymalny nerwu z kikutem dystalnym.

Zaletą tego typu rozwiązania jest fakt, że urządzenie znajduje się w bliskiej odległości od włókien nerwowych, co pozwala na skuteczną ich stymulację. Powodzenie operacji może zostać ocenione w przeciągu kilku tygodni po implantacji, kiedy włókno nerwowe zdoła zregenerować poprzez urządzenie. Czasami włókna nerwowe mogą ulec uszkodzeniom w wyniku naprężeń mechanicznych pochodzących od elektrody bądź przez siły działające wewnątrz otworów powstałe w wyniku ich zarastania, zwłaszcza przy długim okresie implantacji [74,75].

Różnorodne techniki oraz materiały były stosowane przy konstruowaniu elektrod. Początkowo wykonywane były poprzez zatopienie złotych, pustych wewnątrz cylindrów o średnicy 25µm w porowatym teflonie. Innym sposobem jest mechaniczne wiercenie dziur o średnicy 100µm w elemencie epoksydowym, a następnie umieszczenie wewnątrz nich srebrnych drutów pokrytych teflonem [76]. Materiałem używanym najczęściej do konstrukcji elektrod do regeneracji nerwów jest krzem. Elektrody krzemowe o odpowiednich wymiarach i ilości otworów stosowane były do regeneracji aksonów nerwów u szczura oraz żaby [19,21].

Jednakże, krzem powoduje często objawy aksonopatii i stanowi fizyczną barierę ograniczającą wydłużanie regenerujących się aksonów [75,76]. Obecnie elektrody krzemowe zastępowane są elektrodami na bazie poliimidów. W przypadku poliimidów istnieje możliwość wytworzenia większej ilości otworów dla tej samej powierzchni całkowitej w porównaniu z płytką krzemową, a także istnieje możliwość stworzenia odpowiedniego modelu nerwu dopasowanego do miejsca implantacji. Elektrody na bazie poliimidu są biokompatybilne i stabilne zarówno w warunkach "in vivo" jak i podczas prób mechanicznych [79].

### Nanomateriały w regeneracji nerwów

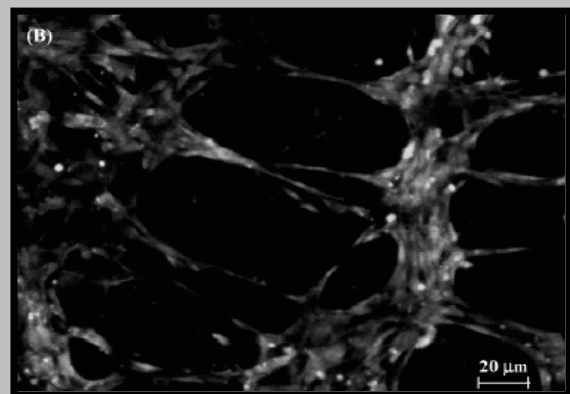
Obiecujące wyniki zastosowania nanorurek węglowych w badaniach na komórkach ośrodkowego układu nerwowego pozwalają na potencjalne ich zastosowanie w regeneracji obwodowego układu nerwowego. Odkryto, bardzo interesujące oddziaływanie pomiędzy neuronami, a materiałami w skali nano, w wyniku którego następuje osłabienie tworzenia się tkanki bliznowatej rdzenia kręgowego.

Polyimide-based electrodes have been shown to be biocompatible and stable over several months of in vivo implantation and testing [79].

### Nanomaterials for nerve regeneration

Good results of research using carbon nanostructures in central nervous system nerve cells cultures indicate their potential for the treatment peripheral nervous system. Promising interactions are found between neurons and nanoscale materials with potential minimalization of astrocytic spinal cord scar tissue formation. Carbon nanofibers are particularly attractive for the use in neural biomaterials not only due to these special properties, but also due to their high conductivity. Further investigation of carbon nanofiber materials is required to verify their properties as potential neural biomaterials [80,81,82].

Carbon nanotubes (CNT) are strong, flexible and conduct electrical current. Moreover, their biocompatibility and stability in living organism have already been proved [80]. They can be functionalized with different biomolecules like neuron growth factors and adhesion agents. These properties are useful in the formation of neuron hybrids. Such capabilities of carbon nanotubes make them potentially suitable candidates to form scaffolds to guide neurite outgrowth. Zhang et al., demonstrated the capability of functionalized patterned vertical carbon nanotube arrays as support platforms for guiding neurite growth and forming synoptically communicative network. The study indicated that neurons "in vitro" conditions created communicative synaptic bridge between two nanotube patterns with a distance of separation of 20µm [83]. Telford et al., have cultured nerve cells from the brain's hippocampus region on substrates coated with network of carbon nanotubes, and found a large increase in neural signal transfer between cells. The data provided information on the supportive devices for bridging and integrating functional neuronal network "in vitro". [84]. The results will impact on new tissue engineering strategies, where functional reconnection among neurons or the improvement in neural signal transfer is the main target. There is strong demand for deeper study on the properties of such materials and their physiological interactions with neurons in culture. This will provide the base for more exhaustive evaluation on animal models.



**RYS. 3. Mikrofotografia przedstawiająca komunikujące się między sobą sieci synaptyczne na podłożu z nanorurek węglowych [83].**

**FIG. 3. Microphotograph of carbon nanotubes support for forming synoptically communicative network [83].**

Nanowłókna węglowe są atrakcyjnym biomateriałem stosowanym jako implanty nerwów nie tylko z powodu szczególnych właściwości mechanicznych czy chemicznych, ale także z powodu ich wysokiej przewodności właściwej. Dalsze badania nad nanowłóknami węglowymi są konieczne, aby zweryfikować ich potencjalne zastosowanie jako biomateriałów dla regeneracji nerwów [80,81,82].

Nanorurki węglowe (CNT) są materiałem trwałym, giętkim, przewodzącym prąd elektryczny, biogodnym oraz nie biodegradowalnym [80]. Mogą być sfunkcjonalizowane różnorodnymi biomolekułami takimi jak czynniki wzrostu neuronów. Takie własności nanorurek węglowych czynią z nich potencjalnego kandydata do konstrukcji podłoża dla kierowanego wzrostu aksonów. Zhang i współ. z uniwersytetu z Kaliforni zademonstrowali możliwości zastosowania modelu (układu) z pionowo ułożonych nanorurek węglowych jako podporę dla kierowanego wzrostu aksonów, a także dla tworzenia sieci połączeń synaptycznych. W badaniach "in vitro" zaobserwowano, że neurony tworzą mostki synaptyczne pomiędzy dwoma nanorurkowymi układami (wzorcami) oddalonymi od siebie o około 20µm [83].

Telford i współpracownicy opisują szereg doświadczeń z zastosowaniem komórek nerwowych pobranych z mózgu na specjalnym podłożu pokrytym ścieżkami z nanorurek węglowych. Stwierdzono znaczny przyrost wartości impulsów nerwowych wędrujących pomiędzy komórkami nerwowymi [84].

Uzyskane wyniki mogą zostać wykorzystane przy tworzeniu nowych strategii badań w inżynierii tkankowej mających na celu przywrócenie połączeń pomiędzy uszkodzonymi komórkami nerwowymi bądź polepszenie przekazywania sygnałów nerwowych. Niezbędne jest jednak poszerzenie aktualnej wiedzy na temat tego rodzaju materiałów oraz ich oddziaływania z komórkami nerwowymi w hodowlach "in vitro", przed zastosowaniem dla regeneracji układu nerwowego zwierząt i ludzi.

## Zakończenie

Obecny stan wiedzy nad regeneracją obwodowego układu nerwowego pozwala na uzyskanie pozytywnych wyników regeneracji nerwu przy użyciu sztucznych implantów. Część wykorzystywanych materiałów dzięki wynikom regeneracji porównywalnym z przeszczepami z nerwów skórnymi znajduje już zastosowanie w leczeniu ludzi. Mimo to konieczne są dalsze badania weryfikujące dotychczasowy stan wiedzy oraz pozwalające na poprawienie uzyskiwanych obecnie wyników leczenia.

## Conclusion

Present state of knowledge on regeneration processes of peripheral nervous tissue allows for achieving good regeneration results with artificial implants. Some materials tested on animal models are now verified in the treatment of digital nerve injuries in humans. Consecutive investigations are however demanded for further development of knowledge relevant to nervous tissue regeneration.

## Piśmiennictwo

## Reference

- [1] G.R.D. Evans, K. Brandt, S. Katz, P. Chauvin, L. Otto, M. Bogle, B. Wang, R.K. Meszlenyi, L. Lu, A.G. Mikos, Ch.W. Patrick Jr "Bioactive poly(l-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration" *Biomaterials* 23 (2002) 841-848.
- [2] Pielka S., Rutowski R., Bogdan K., Pytłasiński M., Wiącek R. "Uszkodzenia nerwów kończyny górnej u 1739 chorych w materiale Kliniki Chirurgii Urazowej i Chirurgii Ręki AM we Wrocławiu" III Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Chirurgii Ręki Białystok 2003.
- [3] B.R. Rutowski, S. Pielka, J. Gosk, D. Szarek, W. Urbański "Ocena wyników operacji mikrochirurgicznych w uszkodzeniach nerwów kończyny górnej." *Krzysztof; Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 6, 1199-1209.
- [4] J. Braga-Silva "The Use of Silicone Tubing in the Late Repair of The Median and Ulnar Nerves in the Forearm" *Journal of Hand Surgery (British and European Volume)* 24B (1999) 6 703-706
- [5] J. Haftek, H. Kasprzak, A. Radek, W. Jarmundowicz, J. Józwiak "Przeszczepy nerwowe w rekonstrukcji uszkodzonych pni nerwowych" *Neurologia Neurochirurgia Polska*, 1983, 17, 2, 253-258.
- [6] Yuan Y., Zhang P., Yang Y., Wang X., Gu X. "The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro" *Biomaterials* 25 (2004) 4273-4278.
- [7] Borschel G.H., Kia K.F., Kuzon W.M., Dennis R.G. "Mechanical Properties of Acellular Peripheral Nerve" *Journal of Surgical Research* 114 (2003) 133-139.
- [8] Haftek J. "Stretch injury of peripheral nerves." *J. Bon. J. Surg*; 1970; 52-B, 2, 354.
- [9] M. Mumenthaler, H. Schliack "Uszkodzenia nerwów obwodowych"; PZWL 1998; str 128; 142-143
- [10] S. Hall "Nerve repair: a neurobiologist's view"; *The Journal Of Hand Surgery*; vol 26b; No2; april 2001; 129-136
- [11] Ming-Shaung J., Chou-Ching K. L., Jia-Lin F., Rung-Jian Ch. "Transverse elasticity and blood perfusion of sciatic nerves under in situ circular compression" *Journal of Biomechanics* 39 (2006) 97-102.
- [12] Kwan K.M., Woo S.L-Y. "Biomechanical properties of peripheral nerve".
- [13] Sunderland S. "Nerves and nerve injuries, ed.2. Edinburgh: Churchill - Livingstone, 1978.
- [14] T. M. Mykатыn, S.E. Mackinnon "Surgical Techniques of Nerve Grafting (Standard/Vascularized/Allograft)"; *OperTech Orthop* 14:171-178; 2004
- [15] R. H. Gebelman; J.B. Lippincott "Operative nerve repair and reconstruction." Company, Philadelphia; 1991.
- [16] M.F. Meek "Artificial Nerve Guides - assessment of nerve function", *Proefschrift*, 2000.
- [17] E.O. Johnson, A.B. Zoubos, P.N. Soucacos "Regeneration and repair of peripheral nerves" *Injury* 36S (2005) 24-29.
- [18] Heiduscha P., Thanos S. "Implantable bioelectronic interfaces for lost nerve functions" *Progress in Neurobiology* 55 (1998) 55-461.
- [19] G. Verrecka, I. Chunb, Y. Lib, R. Katariab, Q. Zhangb, J. Rosenblattb, A. Decortea, K. Heymansa, J. Adriaensena, M. Bruininga, M. Van Remoorterea, H. Borghysa, T. Meerta, J. Peetersa, M. E. Brewster "Preparation and physicochemical characterization of biodegradable nerve guides containing the nerve growth agent sabeluzole" *Biomaterials* 26 (2005) 1307-1315.
- [20] L. R. Williams, F.M. Longo, H.C. Powell, G. Lundborg, S. Varon, "Spatial-Temporal Progress of Peripheral Nerve Regeneration Within a Silicone Chamber: Parameters for a Bioassay." *The Journal of Comparative Neurology*, 218: 460-470 (1983).

- [21] Ch.R. Noback, J. Husby, J.M. Girado, C. Andrew, L. Bassett, J.B. Campbell "Neural regeneration across long gaps in mammalian peripheral nerves: Early morphological findings.", *Anat Rec* 131 (1958) 633-647.
- [22] J.M. L. Beau, M.H. Ellisman, H.C. Powell "Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes." , *Journal of Neurocytology* 17, 161-172 (1988).
- [23] R.D. Madison, S.J. Archibald "Point Sources of Schwann Cells Result in Growth into a nerve Entubulation Repair Site in the Absence of Axons: Effects of Freeze-Thawing.", *Experimental Neurology*, 128, 266-275 (1994).
- [24] M. Cuadros-Romero, A. Trueva "Nerve Regeneration Using Polyglycolic Acid As Alternative To Grafting". *The Journal Of Hand Surgery Vol 28b Supplement* 1.
- [25] X. Navarro, E. Verdú, F.J. Rodriguez, D. Ceballo "Artificial nerve graft for the repair of peripheral nerve injuries." s; *Neurol Sci* (2001) 22: S7-S13.
- [26] L.J. Chamberlain, I.V. Yannas, A. Arrizabalaga, H.-P. Hsu, T.V. Norregaard, M. Spector "Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: Myofibroblasts and the cellular response.", *Biomaterials* 19(1999) 1393-1403.
- [27] Q. Zhao, L.B. Dahlin, M. Kanje, G. Lundborg "Repair of the transected rat sciatic nerve: Matrix formation within implanted silicone tubes.", *Restorative Neurology and Neuroscience*, 5 (1993) 197-204.
- [28] J.A. Bertelli, A.R. S. Dos Santos, Joao B. Calixto, J.C. Mira, M.F. Ghizoni "Long interpositional nerve graft consistently induces incomplete motor nad sensory recovery in the rat. An experimental model to test nerve repair.", *Journal of neuroscience methods* 134 (2004) 75-80.
- [29] A.I. Gravvanis, A. Ladvas, A.E. Papalois, D.A. Tsoutsos, P.N. Pnyotou, D.C.-C. Chuang, I. Franceschini, M. Dubois-Dalq, R. Matsas "Collagen tube lined with genetically modified Schwann cells with increased motility: A new promising bioartificial nerve graft"; *Eur Surg* (2005) 37/4: 204-212.
- [30] T. Hashimoto, Y. Suzuki, M. Kitada, K. Kataoka, S. Wu, K. Suzuki, K. Endo, Y. Nishimura, C. Ide "Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons."; *Exp Brain Re* (2002) 146: 256-368.
- [31] I.V. Yannas, B.J. Hill "Selecion of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model"; *Biomaterials* 25(2004); 1593-1600.
- [32] Yueh-Sheng Che, Ching-Liang Hsieh, Chin-Chuan Tsai, Ter-Hsin Chen, Wen-Chiang Cheng, Cheng-Li Hu, Chun-Hsu Yao "Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin" *Biomaterials* 21 (2000) 1541-1547.
- [33] G. Lundborg, L. Dahlin, D. Dohi, M. Kanje, N. Terada "A New Type of "Bioartificial" Nerve Graft for Bridging Extended Defects in Nerves" *Journal of Hand Surgery (British and European Volume, 1997)* 22B: 3:299-303.
- [34] Chen-Jung C., Shan-Hui H. "The Effects Of Low-Intensity Ultrasound On Peripheral Nerve Regeneration In Poly(DI-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Conduits Seeded With Schwann Cells" *Ultrasound In Med. & Biol.* 8 (2004) 1078-1084.
- [35] Y. Katayama, R. Montenegro, T. Freier, R. Midha, J.S. Belkas, M.S. Shoichet "Coil-reinforced hydrogel tubes promote nerve regeneration equivalent to that of nerve autografts" *Biomaterials* 27 (2006) 505-518.
- [36] C. Sundbacka, T. Hadlockb, M. Cheneyb, J. Vacantia "Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process" *Biomaterials* 24 (2003) 819-830
- [37] Nakamura T., Inada Y., Fukuda S., Yoshitani M., Nakada A., Itoi S., Kanemaru S., Endo K., Shimizu Y. "Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube" *Brain Research* 1027 (2004) 18-29.
- [38] T. Nakamura, Y. Inada, S. Fukuda, M. Yoshitani, A. Nakada, S. Itoi, S. Kanemaru, K. Endo, Y. Shimizu "Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube, *Brain Research* 1027 (2004) 18-29.
- [39] K. Matsumoto, K. Ohnishi, T. Kiyotani, T. Sekine, H. Ueda, T. Nakamura, Ka. Endo, Y. Shimizu "Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves."; *Brain Reserch* 868 (2000) 315-328.
- [40] R.A. Weber, W.C. Breidenbach, R.E. Brown, M.E. Jabaley, D.P. Mass "A Randomized Prospective Study of Polyglycolic Acid Conduits for Digital Nerve Reconstruction in Humans.", *Plast. Reconstr. Surg.* 106: 1036, 2000).
- [41] R. C. Young, M. Wiberg, G. Terenghi "Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves" *British Journal of Plastic Surgery* 55 (2002) 235-240.
- [42] A. Hazari, M. Wiberg, G. Johansson-Rudén, C. Green, G. Terenghi "A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair" *British Journal of Plastic Surgery* 52 (1999) 653-657.
- [43] Kurita K. "Chemistry and application of chitin and chitosan as fiber and film formers" *Polym. Degrad. Stabil.* 70 (1998) 7-12.
- [44] Yuan Y., Zhang P., Yang Y., Wang X., Gu X. "The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro" *Biomaterials* 25 (2004) 4273-4278.
- [45] Suzuki T., Mizushima Y. "Characterization of silica-chitosan complex adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane" *J. Ferment Bioeng.* 1997;84(2):128.
- [46] M. R.Ahmed, S. Vairamuthu, Md. Shafiqzama, S. H. Bashad, R. Jayakumar "Microwave irradiated collagen tubes as a better matrix for peripheral nerve regeneration" *Brain Research* 1046 (2005) 55 - 67.
- [47] Ch. Krarup, S.J. Archibald, R.D. Madison. "Factors That Influence Peripheral nerve Regeneration: An Elektrophysiological Study of the Monkey Median Nerve." *Ann. Neurol* 2002; 51: 69-81
- [48] S.J. Archibald, J. Shefner, C. Krarup, R.D. Madison "Monkey Median Nerve Repair by Nerve Graft or Collagen Nerve Guide Tube.", *The Journal of Neuroscience*, may 1995, 15(5):4109-4123
- [49] S. Itoh, K. Takakuda, S. Kawabata, Y. Aso, K. Kasai, H. Itoh, K. Shinomiya, "Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair" *Biomaterials* 23(2002) 4475-4481
- [50] S. Yoshii, M. Oka, M. Shima, A. Tanigochi, M. Akagi "30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments."; *Brian Reserch* 949 (2002) 202-208
- [51] D.Y. Lee, B.H. Choi, Jh Park, Sj Zhu, By Kim, Jy. Huh, Sh. Lee, Jh. Jung, Sh. Kim "Nerve Regeneration With The Use Of A Poly(L-Lactide-Co-Glycolic Acid)-Coated Collagen Tube Filled With Collagen Gel" *Journal Of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2006) 34, 50-56.
- [52] Kiyotani T., Teramachi M., Takimoto Y., Nakamura T., Shimizu Y., Endo K. "Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tubes: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves" *Brain Research* 740 (1996) 66-74.
- [53] Archibald S.J., Krarup C., Shefner J., Li S., Madison R.D. "A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: An electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and non-human primates", *J. Comp. Neurol.* 306 (1991) 685-696.
- [54] N. B., Chauhan, H.M. Figlewicz, T.Khan "Carbon filaments direct the growth of postlesional plastic axons after spinal cord injury" *PfII: S0736-5748(1999)00003-9.*
- [55] G. Keilhoff, F. Stang, G. Wolf, H. Fansa, Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction, *Biomaterials* 24 (2003) 2779- 2787.
- [56] S. Yoshii , M. Oka , M. Shima , A. Taniguchi , M. Akagi "30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments" *Brain Research* 949 (2002) 202-208
- [57] Bunting S., L. Di Silvio, Deb S., Hall S. "Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration" *Jurnal of Hand Surgery* 3(2005)242-247.
- [58] B. Balakrishnana, M. Mohantyb, P.R. Umashankarc, A. Jayakrishnana "Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin.", *Biomaterials* 26 (2005) 6335-6342.
- [59] J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials."; *Biomaterials* 20 (1999) 45-53.

- [60] M. Martins-Green "The dynamics of cell-ecm interactions, with implications for tissue engineering" Department of Biology, University of California, Riverside, Ca 92521.
- [61] E. Ruoslahti "RGD and other recognition sequences for integrins", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996, 12: 697-715.
- [62] Y. Suzukia, M. Taniharab, K. Ohnishic, K. Suzukia, K. Endod, Y. Nishimuraa "Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel nerve guide composed of freeze-dried alginate gel"; *Neuroscience Letters* 259 (1999) 75-78.
- [63] Labrador RO, Buti R, Navarro X "Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair" *Exp Neurol* 149: 243-252, 1998.
- [64] I. H. Whitworth, R. A. Brown, C. J. Dore, P. Anand, C. J. Green, G. Terenghi "Nerve Growth Factor Enhances Nerve Regeneration Through Fibronectin Grafts" *Journal of Hand Surgery (British and European Volume, 1996) 21B.* 4:514-522.
- [65] Hollowell JP, Villadiego A, Rich KM. "Sciatic nerve regeneration across gaps within silicone chambers: long-term effects of NGF and consideration of axonal branching" *Exp Neurol* 1990;110: 45-51.
- [66] Pei-Ru Chena, Ming-Hong Chena, Jui-Sheng Sunc, Mei-Hsiu Chend, Chien-Chen Tsaie, Feng-Huei Linf "Biocompatibility of NGF-grafted GTG membranes for peripheral nerve repair using cultured Schwann cells" *Biomaterials* 25 (2004) 5667-5673.
- [67] Hurtado A., Moon L.D.F., Maquet V., Blits B., Jerome R., Oudega M. "Poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord" *Biomaterials* 27(2006)430-442.
- [68] Ide C. "Peripheral nerve regeneration" *Neurosci Res* 1996;25: 101-21.
- [69] Gulati AK, Rai DR, Ali AM. Influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts. *Brain Res* 1995;705:118-24.
- [70] E. O. Johnson, A. B. Zoubos, P. N. Soucacos "Regeneration and repair of peripheral nerves" *Injury* 36S (2005) S24-S29.
- [71] Campbell YZ, Anderson PN, Martini R, Schachner M, Lieberman AR. Molecular basis of interactions between regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts I. Neural cell adhesion molecules. *J Comput Neurol* 1995; 361:193-209.
- [72] C. Ide, K. Tohyama, K. Tajima, K. Endoch, K. Sano, M. Tamura, A. Mizoguchi, M. Kitada, T. Morihara, M. Shirasu "Long Acellular Nerve Transplants for Allogeneic Grafting and the Effects of basic Fibroblast Growth Factor on the Growth of Regenerating Axons in Dogs: A Preliminary Report."; *Experimental Neurology* 154, 99-112 (1998).
- [73] A.K. Gulati, D.R. Rai, A. M. Ali "The influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts."; *Brain Research* 705 (1995) 118-124.
- [74] Heiduschka P., Thanos S. "Implantable bioelectronic interfaces for lost nerve function" *Progress in Neurobiology* 55 (1998) 433-461.
- [75] Lago N., Ceballos D., Rodriguez F.J, Stieglitz T., Navarro "Long term assessment of axonal regeneration through polyimide regenerative electrodes to interface the peripheral nerve" *Biomaterials* 26 (2005) 2021-2031.
- [76] Akin T., Najafi K., Smoke R.H., Bradley R.M. "A micromachined silicon sieve electrode for nerve regeneration applications" *Transactions of Biomedical Engineering* 41 (1994)
- [77] Navarro X, Calvet S, Butli M, Gomez N, Cabruja E, Garrido P, Villa R, Valderrama E. Peripheral nerve regeneration through microelectrode arrays based on silicon technology. *Restor Neurol Neurosci* 1996;9:151-60.
- [78] Zhao Q, Drott J, Laurell T, Wallman L, Lindstrom K, Bjursten LM, Lundborg G, Montelius L, Danielsen N. "Rat sciatic nerve regeneration through a micromachined silicon chip" *Biomaterials* 18 (1997) 75-80.
- [79] Navarro X, Calvet S, Rodriguez FJ, Stieglitz T, Blau C, Butli M, Valderrama E, Meyer JU. "Stimulation and recording from regenerated peripheral nerves through polyimide sieve electrodes" *J Peripher Nerv System* 2 (1998) 91-101.
- [80] X. Zhang, S. Prasad, S. Niyogi, A. Morgan, M. Ozkan, C. S. Ozkan "Guided neurite growth on patterned carbon nanotubes" *Sensors and Actuators B* 106 (2005) 843-850
- [81] M. Tatagiba, C. Brosamle, M.E. Schwab, Regeneration of injured axons in the adult mammalian central nervous system, *Neurosurgery* 40 (3) (1997) 541.
- [82] J.L. McKenzie, M.C. Waid, R. Shi, T.J. Webster "Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials" *Biomaterials* 25 (2004) 1309-1317
- [83] Roche Stephan "Carbon nanotubes: exceptional mechanical and electronic properties", *Chim. Sci. Mat*, 2000, 25, pp.529-532.
- [84] Telford M. "Carbon nanotubes boost neural signaling" *Research News* 2005.