

Received: 15.12.2017
Accepted: 03.07.2018
Published: 31.10.2018

Nerwiaki pourazowe przyczyną poamputacyjnego bólu neuropatycznego: epidemiologia, mechanizmy i czynniki zaangażowane w powstawanie bólu*

Traumatic neuroma caused the post-amputation neuropathic pain: epidemiology, mechanisms and factors involved in pain generation

Katarzyna Futoma, Aleksandra Klimczak

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Przerwanie ciągłości nerwów obwodowych, na skutek rozległego uszkodzenia lub amputacji kończyn spowodowanej urazem lub zaawansowaną chorobą niedokrwienną kończyn dolnych, prowadzi do poważnych komplikacji i zaburzeń w regeneracji tkanek. Istotnym problemem obniżającym jakość życia pacjentów, u których przeprowadzono zabieg amputacji, jest przewlekły ból neuropatyczny, określany jako ból poamputacyjny (PAP, post-amputation pain). Za jedną z głównych przyczyn PAP uznaje się nerwiaki pourazowe, które powstają w wyniku nadmiernej regeneracji aksonów tworząc chaotyczne struktury złożone z regenerujących aksonów i tkanki łącznej.

Proces regeneracji nerwów obwodowych rozpoczyna się zwyrodnieniem Wallera, które powoduje degenerację zniszczonych aksonów w dystalnym zakończeniu przerwanego nerwu, a następnie inicjuje proces naprawczy. W procesie regeneracji nerwów są zaangażowane komórki Schwanna, które ułatwiają napływ komórek układu odpornościowego (głównie makrofagów, neutrofilów i limfocytów T) i aktywację stanu zapalnego, koniecznego do usunięcia zniszczonych tkanek i komórek. Jednak podstawowe znaczenie ma koordynacja procesu wytwarzania cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz aktywność czynników neurotroficznych. W czasie regeneracji nerwów obwodowych, w mikrośrodowisku uszkodzonego nerwu zwiększa się aktywność czynników neurotroficznych: czynnika wzrostu nerwów (NGF), czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF), czynnika pochodzenia glistowego (GDNF) oraz rzęskowego czynnika neurotroficznego (CNTF) - białek promujących przetrwanie i regenerację aksonów. Obecność czynników neurotroficznych sprzyja regeneracji aksonów od zakończenia proksymalnego w kierunku dystalnym i ostateczną reinerwację tkanki. W przypadku amputacji kończyny, brak dystalnego kikuta nerwu uniemożliwia prawidłową regenerację aksonów, a nadmierna aktywność czynników neurotroficznych w miejscu uszkodzenia doprowadza do niekontrolowanego rozrostu aksonów i formowania nerwiaka. Ponadto, zwiększona aktywność NGF nasila ekspresję białka związanego z genem kalcytoniny (CGRP), który jest jednym z czynników biorących udział w genezie bólu neuropatycznego. Zabezpieczenie proksymalnego końca uszkodzonego nerwu przed sygnałami proregeneracyjnymi dociera-

*Praca powstała we współpracy z Wrocławskim Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” – BioMed (POIG.01.01.02-02-003/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

jęcymi z mikrośrodowiska uszkodzonego nerwu może zapobiec nadmiernemu rozrostowi aksonów i tworzeniu nerwiaka pourazowego.

Słowa kluczowe: nerwiaki pourazowe • ból neuropatyczny • zwyrodnienie Wallera • czynniki neurotroficzne

Summary

Loss of the integrity of the peripheral nerves as a result of the traumatic injury or due to lower limb amputations in case of advanced ischemic disease is leading to serious complications and impaired tissue regeneration. Patients who experience amputation procedure do not only suffer from physical limitations and psychological problems, but also from chronic neuropathic pain, referred to as post-amputation pain (PAP), which significantly decrease their quality of life. One of the main reasons of PAP is post-traumatic neuromas, which are formed chaotic structures consisting of regenerative axons and connective tissue, as a result of excessive regeneration of axons. The process of peripheral nerve regeneration starts with Wallerian degeneration and its main role is to degenerate damaged axons in the distal end of the injured nerve and initiate repair processes. In the process of nerves regeneration are involved Schwann cells, which attract immunocompetent cells (mainly macrophages, neutrophils and T lymphocytes) and activate inflammation process, necessary to remove damaged tissues and cells. However, the coordination of the production of pro- and anti-inflammatory cytokines and the activity of neurotrophic factors is of key importance. During regeneration of peripheral nerves, in the microenvironment of the damaged tissues increase the activity of neurotrophic factors including: nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), and ciliary neurotrophic factor (CNTF) - proteins promoting survival and regeneration of axons. The activity of neurotrophic factors supports axonal regeneration from the proximal part into the distal direction and the final re-innervation of the tissue. In the case of amputation of the limb, the lack of distal stump of the nerve disturbs proper regeneration of axons, and excessive activity of neurotrophic factors at the site of injury leads to uncontrolled axonal proliferation and neuroma formation. In addition, the increased activity of NGF enhances the expression of the protein associated with the calcitonin gene related protein (CGRP), which is one of the factors involved in the genesis of neuropathic pain. The protection of the proximal end of the damaged nerve from the regenerative signals coming from the microenvironment of damaged nerve can prevent excessive growth of axons and may inhibit the post-traumatic neuroma formation.

Keywords: neuroma • neuropathic pain • Wallerian degeneration • neurotrophic factors

GICID: 01.3001.0012.7099
DOI: 10.5604/01.3001.0012.7099
Word count: 9318
Tables: –
Figures: 3
References: 115

Adres autorki: dr hab. prof. nadzw. Aleksandra Klimczak, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: klimczak@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **BDNF** – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (brain-derived neurotrophic factor); **CCL2/MCP-1** – białko chemotaktyczne dla monocytów, chemokina prozapalna (monocyte chemoattractant protein-1); **CCL3/MIP-1** – białko zapalne makrofagów (macrophage inflammatory protein-1); **CGRP** – peptyd związany z genem kalcytoniny (calcitonin gene-related peptide); **CNTF** – rzęskowy czynnik neurotroficzny (ciliary neurotrophic factor); **CNS** – ośrodkowy układ nerwowy (central nervous system); **DAMPs** – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (damage-associated molecular patterns); **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **GABA** – kwas γ-aminomasłowy (γ-aminobutyric acid); **GDNF** – neurotroficzny czynnik pochodzenia glijowego (glial-derived neurotrophic factor); **HLA** – ludzkie antygeny zgodności tkankowej (human leukocyte antigens); **HSP27** – białko szoku

termicznego (heat-shock protein-27); **IFN- γ** – interferon gamma (interferon-gamma); **IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (insulin-like growth factor); **IL-1, -4, -6, -10** – interleukiny -1, -4, -6, -10 (interleukins); **LIF** – białaczkowy czynnik hamujący (leukemia inhibitory factor); **LPC** – lizofosfatydylocholina (lysophosphatidylcholine); **M** – podstawowe białko mieliny (myelin basic protein); **MAG** – glikoproteina związana z mielina (myelin associated glycoprotein); **MBP** – podstawowe białko mieliny (myelin basic protein); **mRNA** – informacyjny kwas rybonukleinowy (messenger ribonucleotide acid); **NGF** – czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor); **NT** – neurotrofina (neurotrophin); **NTFs** – czynniki neurotroficzne (neurotrophic factors); **PAP** – ból poamputacyjny (postamputation pain); **PLA₂** – fosfolipaza A₂ (phospholipases A₂); **PLP** – bóle fantomowe (phantom limb pain); **PNS** – obwodowy układ nerwowy (peripheral nervous system); **PSs** – doznania fantomowe (phantom sensations); **RLP** – bóle w pozostałym kikucie (residual limb pain); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **Th₁** – limfocyty T pomocnicze typu 1 (T helper lymphocytes type 1); **Th₂** – limfocyty T pomocnicze typu 2 (T helper lymphocytes type 2); **TLR** – receptory Toll-podobne (toll-like receptors); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor); **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor receptor); **VPF** – czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń krwionośnych (vascular permeability factor).

EPIDEMIOLOGIA POAMPUTACYJNEGO BÓLU NEUROPATYCZNEGO

Według doniesień Polskiego Towarzystwa Chirurgii Naczyniowej liczba amputacji kończyn dolnych w Polsce rośnie i w 2015 r. osiągnęła alarmujący stan 15 tysięcy. Dla porównania w Stanach Zjednoczonych rocznie wykonuje się 30 000-40 000 takich zabiegów. Już w 2005 r. oszacowano, że prawie 1,6 mln Amerykanów żyje bez kończyny, a spodziewana liczba takich osób w 2050 r. może osiągnąć 3,2 mln [113]. Jak ostrzega Polskie Towarzystwo Chirurgii Naczyniowej, amputacje kończyn od lat są w zdecydowanej większości następstwem zaawansowanej choroby niedokrwiennej kończyn dolnych. Dane te pokrywają się z doniesieniami ze Stanów Zjednoczonych, według których aż 82% amputacji było spowodowanych patologią układu krążenia, natomiast zdecydowanie mniejszy udział mają amputacje wykonywane z powodu odniesionych urazów – 16,4%, nowotworów – 0,9% oraz wad wrodzonych – 0,8% [21].

Poważnym problemem obniżającym jakość życia pacjentów są ograniczenia fizyczne i psychologiczne związane z codziennym funkcjonowaniem w sytuacji braku jednej z kończyn, jednak jednym z najpoważniejszych utrudnień, z którym boryka się 80-90% pacjentów po amputacji jest przewlekły ból neuropatyczny, określanany jako ból poamputacyjny (PAP – postamputation pain) [36, 79]. Zwalczanie PAP jest jednym z największych wyzwania dla lekarzy, ponieważ w zdecydowanej większości przypadków jest niezwykle trudne i może znacznie obniżyć jakość życia pacjentów przez wiele lat. O skali problemu świadczą dane statystyczne, według których szacuje się, że w USA na przewlekły ból wywołany uszkodzeniami obwodowego układu nerwowego cierpi 20 mln ludzi, a roczne koszty związane z jego leczeniem sięgają 600 miliardów dolarów [49].

Utrata kończyny może prowadzić do wystąpienia bezbolesnych lub bolesnych zmian neurologicznych, które klasyfikuje się następująco [70]:

- Bóle fantomowe (PLP – phantom limb pain) – bolesne lub nieprzyjemne doznania obejmujące całą lub część amputowanej kończyny.
- Bóle w pozostałym kikucie (RLP – residual limb pain/stump pain) – różnego rodzaju doznania bólowe obejmujące kikut pozostały po amputowanej kończynie.
- Doznania fantomowe (PSs – phantom sensations) – niebolesne odczucia/doznania pochodzące z amputowanej kończyny.

Według badań przeprowadzonych przez Ephraim i wsp. około 95% pacjentów, którym amputowano kończynę, doświadcza przynajmniej jednej z wymienionych dolegliwości [25]. W 60-80% przypadków są to doznania bólowe, które z upływem lat mogą się zmniejszać lub nie ustępować wcale, co zdarza się prawie u co drugiej osoby [70]. Problem bólów fantomowych może być niedoszacowany, ponieważ pacjenci nierzadko nie są w stanie rozróżnić i przyporządkować odczuwanych doznań do odpowiedniej kategorii.

Zgodnie z dotychczasowymi doniesieniami za pojawienie się PAP po amputacji kończyn odpowiada wiele mechanizmów. Część z nich, mimo wieloletnich badań, wciąż jeszcze nie została dokładnie scharakteryzowana. Dowiedzono, że prawidłowa identyfikacja patomechanizmu odpowiedzialnego za dolegliwości pacjentów ma większy wpływ na powodzenie leczenia niż znajomość przyczyny amputacji [106]. Za jedną z głównych przyczyn bólu neuropatycznego podaje się rozwój nerwiaków pourazowych na pozostawionych po amputacji wolnych zakończeniach nerwowych. Nawet u około 32% chorych po amputacji stwierdza się obecność patologicznych struktur odpowiadających budowie histologicznej nerwiaka [76].

KLASYFIKACJA USZKODZEŃ NERWÓW OBWODOWYCH

Obwodowy układ nerwowy (PNS – peripheral nervous system) w przeciwieństwie do ośrodkowego układu nerwowego (CNS – central nervous system) jest zdolny do regeneracji, dzięki czemu niewielkie uszkodzenia nerwów obwodowych zazwyczaj kończą się przywróceniem funkcji czuciowo-ruchowych w obszarze, który unerwiają. Na proces regeneracji nerwów obwodowych składa się wiele powiązanych ze sobą mechanizmów, z których nie wszystkie zostały dobrze poznane i opisane.

Uszkodzenia nerwów obwodowych można podzielić w zależności od obszaru obejmującego elementy strukturalne tkanki nerwowej. Pierwszą taką klasyfikację wprowadził Seddon w 1942 r. i wyróżnił 3 rodzaje uszkodzeń nerwów obwodowych [83]:

- Neurapraxia – ogniskowe uszkodzenia osłonki mielinowej bez przerywania ciągłości aksonów oraz tkanki łącznej;
- Axonotmesis – przerwanie ciągłości aksonów bez naruszenia tkanki łącznej, możliwa regeneracja;
- Neurotmesis – przerwanie ciągłości całego nerwu, sukces regeneracji zależy od wielkości powstałego uszkodzenia i zazwyczaj wymaga interwencji chirurgicznej.

W 1951 r. Sunderland rozszerzył powyższą klasyfikację do 5-stopniowej skali, w której stopień I i V odpowiada uszkodzeniom typu neurapraxia oraz neurotmesis (odpowiednio), natomiast w przypadku uszkodzeń typu axonotmesis wyróżnił 3 stopnie: stopień II dotyczy uszkodzeń aksonów bez naruszenia tkanki łącznej; stopień III odnosi się do sytuacji, w których uszkodzeniu uległo także endoneurium, natomiast w stopniu IV uszkodzenia obejmują także epineurium [95]. Wraz z rozwojem wiedzy dotyczącej uszkodzeń nerwów obwodowych naukowcy podejmowali próby dodatkowego rozbudowania lub stworzenia nowej klasyfikacji, jednak żadna z nowych propozycji nie spotkała się z powszechną akceptacją.

W uszkodzeniach typu neurotmesis istnieje największe ryzyko rozwoju nerwiaka pourazowego, ze względu na największą trudność w odzyskaniu połączenia między proksymalnym a dystalnym końcem przerwanego nerwu. W chwili zerwania ciągłości nerwów obwodowych rozpoczyna się kaskada procesów mających na celu usunięcie zniszczonych komórek i tkanek, by następnie mógł się rozpocząć etap regeneracji. Całość mechanizmów zachodzących w dystalnym zakończeniu przerwanego nerwu przygotowujących tkanki do regeneracji określana jest mianem zwyrodnienia Wallera, na cześć odkrywcy Augustusa Wallera, który w 1850 r. jako pierwszy opisał zmiany tego typu u żab po przecięciu nerwu podjęzykowego i językowo-gardłowego [101]. Pomyślny przebieg zwyrodnienia Wallera umożliwia rozpoczęcie regeneracji i ostateczną reinerwację obszaru związanego z uszkodzonym nerwem. Powodzenie procesu

regeneracji przez odzyskanie utraconego połączenia zależy od odległości między końcem proksymalnym a dystalnym i jest tym mniejsza im dłuższy jest ubytek nerwu. Ponadto, zaburzenia w którymkolwiek z etapów regeneracji nerwów obwodowych mogą prowadzić do rozwoju nerwiaków pourazowych, będących główną przyczyną uciążliwego bólu neuropatycznego.

MECHANIZMY POWSTAWANIA NERWIAKÓW POURAZOWYCH

Zwyrodnienie Wallera

Wszelkie uszkodzenia nerwów obwodowych z powodu zmiążdżenia, niedokrwienia czy przerwania ciągłości nerwu uruchamiają następujące po sobie liczne mechanizmy prowadzące do naprawy uszkodzonego nerwu i odzyskania utraconego połączenia nerwowego. Procesy te można podzielić na trzy główne etapy:

- zwyrodnienie Wallera w dystalnym kikucie nerwu (ryc. 1),
- regenerację aksonów z części proksymalnej w kierunku dystalnym (ryc. 2),
- ostateczną reinerwację tkanki, z którą skorelowany był zniszczony nerw (ryc. 3).

Dla prawidłowego przebiegu całego procesu regeneracji najważniejsza jest kolejność etapów, wszelkie zaburzenia w pierwszym etapie będą znacznie utrudniały bądź uniemożliwiały rozpoczęcie drugiego etapu, bez którego niemożliwe będzie odzyskanie funkcji uszkodzonego nerwu. Zwyrodnienie Wallera rozpoczyna się w pierwszych godzinach od ustania działania czynników uszkadzających nerw obwodowy i jego głównym zadaniem jest degeneracja zniszczonych aksonów oraz ich osłonek mielinowych w dystalnym zakończeniu przerwanego nerwu, spowodowanie napływu komórek układu immunologicznego i ostateczne oczyszczenie uszkodzonego obszaru, aby mógł się rozpocząć proces wzrostu aksonów. Cechy charakterystyczne dla zwyrodnienia Wallera są także opisywane w kilku chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie zanikowe boczne, choroba Alzheimera czy Parkinsona, jednak mimo wielu podobieństw ogólny mechanizm jest różny, dlatego stosowanie tej samej terminologii w tych przypadkach jest błędem [15, 81].

W wyniku przecięcia, przerwania, ucisku czy zmiążdżenia nerwu obwodowego dochodzi do uszkodzenia zarówno komórek nerwowych, jak i otaczających tkanek. Już w pierwszych minutach od uszkodzenia błony komórkowej aksonów napływają jony wapnia z macierzy zewnątrzkomórkowej do wnętrza aksonu i następuje aktywacja procesu przypominającego apoptozę, który ma za zadanie pozbyć się wadliwego aksonu (ryc.1). W ciągu następnych 48 godzin w wyniku rozpadu komórek powstają fragmenty z ekspresją endogennych sygnałów stanowiących wzorce molekularne związane z uszkodzeniem tzw. DAMPs (damage-associated molecular patterns) [77]. Obecność DAMPs jest konieczna do zainicjowania odpowiedzi makrofaagów.

Jak dowodzą badania Browna zaburzenia na tym etapie znacznie opóźniają napływ makrofagów oraz oczyszczanie tkanki poprzez fagocytozę rozpadłych komórek i tkanek, niezbędną do rozpoczęcia procesu regeneracji [9]. Jednocześnie z powodu obniżenia ekspresji genów dla dwóch podstawowych białek budujących mielinę: białka P₀ oraz MBP (myelinbasic protein) dochodzi do zahamowania syntezy mieliny, co również na tym etapie przyczynia się do wstrzymania procesu regeneracji. Według doniesień Dieu i wsp., dotyczących ekspresji genów w czasie uszkodzenia nerwów obwodowych, w dystalnym kikucie przerwanego nerwu zwiększa się ekspresja mRNA neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF – brain-derived neurotrophic factor) oraz neurotroficznego czynnika pochodzenia glejowego (GDNF – glial-derived neurotrophic factor), natomiast obniżeniu ulega ekspresja neurotrofiny 3 (NT3 – neurotrophin 3) oraz rzęskowego czynnika neurotroficznego (CNTF – ciliary neurotrophic factor). Jeśli nie dojdzie do procesu regeneracji, zmiany te mogą się utrzymywać nawet do 6 miesięcy po uszkodzeniu [20].

Komórki Schwanna, które w warunkach fizjologicznych zabezpieczają aksony, są w stałym kontakcie z otaczającymi tkankami, dzięki czemu odpowiadają za wychwytywanie zmian wpływających na homeostazę obwodowego układu nerwowego i otaczających tkanek. Komórki te głównie reagują na wspomniane zmiany w stężeniu jonów wapnia, zmieniając swój fenotyp z komórek mielinizujących na komórki niemielinizujące, czyli niedojrzałe. Ich zadaniem jest zainicjowanie procesów naprawczych, np. przez zwiększenie przepuszczalności bariery krew-nerw, aby ułatwić napływ komórek immunokompetentnych i aktywację stanu zapalnego [77]. Ponadto komórki Schwanna mają zdolność prezentacji antygenów poprzez układ zgodności tkankowej klasy I (HLA I), podobnie jak pozostałe komórki jądrzaste organizmu. Dodatkowa zdolność do prezentacji antygenów, w sprzyjających warunkach, poprzez układ zgodności tkankowej klasy II (HLA II), a także obecność kilku receptorów z grupy „Toll-like receptors”: TLR-2/-3/-4 czyni z nich komórki immunokompetentne. Receptory TLR są aktywowane głównie przez patogeny, które wnikają do organizmu, jednak w przypadku uszkodzenia tkanek mogą ulegać aktywacji w odpowiedzi na powstające DAMPs [4, 96]. W wyniku kontaktu tych molekuł z receptorami TLR w komórkach Schwanna wzrasta ekspresja genów prozapalnych, czego skutkiem jest wydzielanie do otaczającego mikrośrodowiska cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α oraz IL-1 [51]. Obecność cytokin prozapalnych i MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów) ma wpływ zwrotny na komórki Schwanna stymulując je do ekspresji wewnątrzwydzielniczej oraz sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (PLA₂), która odpowiada za hydrolizę fosfolipidów będących jednym z ważniejszych składników budulcowych osłonek mielinowych, wpływając tym samym na ich degradację. W następstwie tego procesu dochodzi do uwolnienia lizofosfatydylocholiny (LPC) mającej właściwości mielinolityczne. PLA₂ z LPC mają

duży udział w procesie degradacji osłonek mielinowych w pierwszych godzinach od uszkodzenia nerwu. LPC działa również chemotaktycznie w stosunku do makrofagów, a przez działanie zwiększające przepuszczalność bariery krew-nerw ułatwia napływ tych komórek do miejsca uszkodzenia [71].

W warunkach fizjologicznych w obwodowym układzie nerwowym można znaleźć rezydujące makrofagi, fibroblasty, komórki Schwanna oraz komórki satelitarne, tzw. amficyty. W tym stanie liczba komórek Schwanna 10-krotnie przewyższa liczbę makrofagów, dlatego też komórki te odgrywają główną rolę w chwili uszkodzenia nerwów obwodowych [66]. Dzięki aktywacji opisanych wyżej mechanizmów komórki Schwanna jako pierwsze wydzielają do mikrośrodowiska wiele cytokin i chemokin o charakterze prozapalnym: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α i immunomodulującym IL-10, TGF- β [62, 90]. Pod wpływem tych czynników do miejsca uszkodzenia migrują makrofagi rezydujące w okolicznych tkankach, a 2-3 dnia od chwili uszkodzenia nerwu komórki te zaczynają napływać także z krążenia, osiągając maksymalną liczbę między 7 a 14 dniem od uszkodzenia [62, 66, 75]. Obecność makrofagów w dystalnym kikucie przerwanego nerwu jest niezbędna w procesie oczyszczania uszkodzonego obszaru, zapoczątkowanym przez komórki Schwanna. Kiedy dochodzi do kontaktu makrofagów z uszkodzonymi aksonami, uruchomiony zostaje proces fagocytozy fragmentów pozostałych po rozpadłych aksonach i ich osłonce mielinowej. Rozpadła mielina uwalnia wiele czynników, m.in. MAG (myelin associated glycoprotein – glikoproteina związana z mieliną), które działają jako inhibitory wzrostu nerwów, dlatego usunięcie rozpadłej mieliny jest niezbędne do rozpoczęcia procesu regeneracji [28, 68]. Istotna jest obserwacja, że po aksonotomii makrofagi nie tylko kumulują się w dystalnej części przerwanego nerwu, ale ich nacieki wykryto także w zwojach nerwów czuciowych oraz sympatycznych nerwu rdzeniowego [82].

Rozpoczęte w pierwszych godzinach od uszkodzenia wytwarzanie cytokin prozapalnych TNF- α , IL-1, IL-6 przez komórki Schwanna oraz napływające makrofagi przyczyniają się do skutecznego oczyszczania zniszczonych tkanek, przygotowując tym samym nerw do regeneracji i mielinizacji rosnących aksonów [7, 86]. Jednocześnie, aby zapewnić stabilność całego procesu, są uwalniane także czynniki przeciwzapalne, takie jak IL-10 również wytwarzane przez makrofagi [90]. Dzięki obecności tej cytokiny kontrolowany jest zarówno napływ makrofagów, jak i ich końcowa eliminacja z uszkodzonej tkanki. Ponadto, IL-10 redukuje ekspresję cytokin prozapalnych i jest niezbędna do transformacji makrofagów prozapalnych (M1) w makrofagi przeciwzapalne (M2), które biorą udział w procesie naprawy uszkodzonych tkanek [90]. Oprócz makrofagów i komórek Schwanna za oczyszczanie fragmentów rozpadłych komórek są odpowiedzialne także neutrofile. Fizjologicznie w nerwach obwodowych znajduje się ich niewielka liczba, jednak w wyniku uszkodzenia ich pula gwałtownie wzrasta w ciągu pierwszej doby w wyniku migracji z naczyń

krwionośnych [74]. Spośród komórek układu immunologicznego jako ostatnie na miejsce docierają limfocyty T. Ich głównym zadaniem jest modulowanie odpowiedzi zapalnej, zarówno humoralnej jak i komórkowej, przez wytwarzanie cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych. Limfocyty T pomocnicze typu 1 (Th1) uwalniają prozapalne TNF- α , IFN- γ , natomiast limfocyty T pomocnicze typu 2 (Th2) wydzielają przeciwzapalną IL-4 oraz IL-10 [30].

Pojawienie się stanu zapalnego w miejscu, w którym doszło do uszkodzenia nerwów obwodowych jest konieczne, aby usunąć zniszczone tkanki oraz komórki i rozpocząć proces regeneracji [64]. Jednak podstawowe znaczenie ma koordynacja procesu wytwarzania cytokin pro- i przeciwzapalnych, a także aktywność czynników neurotroficznych. Stała kontrola i zachowanie równowagi w aktywności cytokin i czynników troficznych odpowiednio do aktualnych potrzeb mikrośrodowiska uszkodzonego nerwu obwodowego warunkuje prawidłową regenerację aksonów.

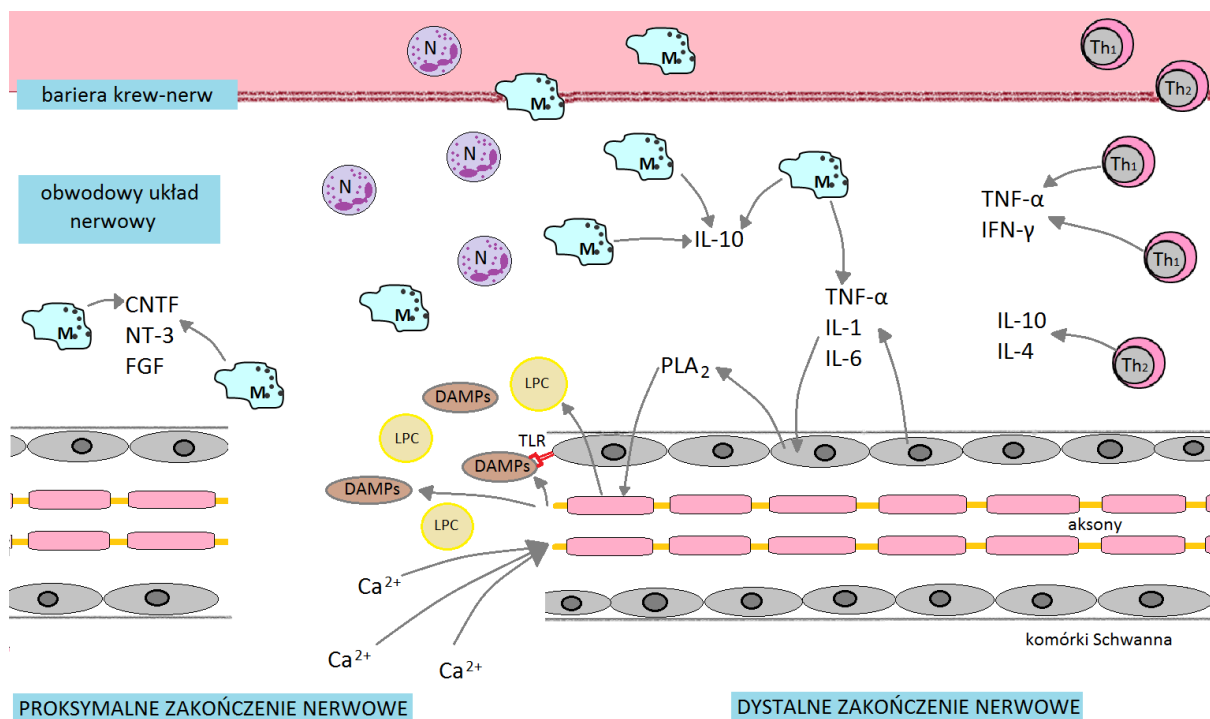
CZYNNIKI TROFICZNE ZAANGAŻOWANE W REGENERACJĘ NERWÓW

Czynniki neurotroficzne (NTFs – neurotrophic factors) są polipeptydami wytwarzanymi zarówno przez układ

nerwowy, jak i komórki nienależące do układu nerwowego, a ich stałe wydzielanie warunkuje prawidłowe funkcjonowanie CNS oraz PNS [38]. Do głównych przedstawicieli należą:

- neurotrofiny klasyczne (NT) (np. NT-3, NT-4/5, czynnik wzrostu nerwów – NGF - nerve growth factor, czy czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego – BDNF – brain derived neurotrophic factor),
- cytokiny neuropoetyczne (m.in. rzęskowy czynnik neurotroficzny – CNTF – ciliary neurotrophic factor),
- glejowe czynniki neurotroficzne (np. GDNF – glial-derived neurotrophic factor),
- insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1 – insulin-like growth factor),
- czynnik wzrostu naskórka (EGF – epidermal growth factor).

W wielu doniesieniach udokumentowano znaczenie czynników neurotroficznych w rozwoju układu nerwowego oraz regeneracji wynikającej z uszkodzenia nerwów. W warunkach fizjologicznych komórki niebędące komórkami nerwowymi wydzielają stale niewielkie ilości czynników troficznych, które są potrzebne do utrzymania homeostazy w obwodowym układzie nerwowym. Komórki Schwanna również wykazują stałą ekspresję



Ryc. 1. Zwyródnienie Wallera zachodzi w dystalnym kikutcie przeciętego nerwu. Jony wapnia (Ca²⁺) znajdujące się w macierzy pozakomórkowej indukują uwalnianie z uszkodzonych komórek czynników, które są wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem (DAMPs) oraz lizofosfatydylocholiną (LPC). Częsteczki te wraz z uwalnianymi przez komórki Schwanna czynnikami prozapalnymi (TNF- α , IL-1, -6) działają chemotaktycznie na komórki układu odpornościowego: makrofagi (M), neutrofile (N) oraz limfocyty T (Th1, Th2). Zadaniem tych komórek jest oczyszczenie uszkodzonego obszaru z rozpadłych komórek i tkanek, utrzymywanie równowagi całego procesu przez autokontrolę wytwarzania cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1, -6, IFN- γ) i przeciwzapalnych (IL-10, -4) oraz zainicjowanie wzrostu aksonów przez wydzielanie czynników neurotroficznych (CNTF, NT-3, FGF)

czynników neurotroficznymi promujących przeżycie oraz utrzymanie funkcji neuronów. W wyniku uszkodzenia wzrasta ekspresja NTFs, mająca wspomagać regenerację uszkodzonego nerwu i ostatecznie odzyskać przerwane połączenie nerwowe. Aktywność neurotrofin klasycznych jest związana z aktywacją białka receptorowego p75^{NTR} należącego do nadrodziny receptorów TNF wiążącego wszystkie neurotrofyny, jak i z aktywnością swoistych receptorów Trk należących do nadrodziny receptorów kinazy tyrozynowej [43]. NGF specyficznie aktywuje receptor TrkA, TrkB jest receptorem BDNF i NT-4, natomiast TrkC przekazuje sygnał aktywowany przez NT-3. Aktywacja receptora p75^{NTR} wiąże się z uruchomieniem sygnałów proapoptotycznych, natomiast aktywacja receptorów z rodziny Trk sprzyja przeżyciu komórek [38, 43].

Poniżej przedstawiono i opisano rolę wybranych NTFs w regeneracji obwodowego układu nerwowego (NGF, BDNF, CNTF, GDNF) oraz czynników, które nie należą do tej rodziny (VEGF, laminina), ale pełnią znaczącą rolę w procesie regeneracji nerwów obwodowych.

Czynnik wzrostu nerwów – NGF (nerve growth factor)

Pierwszym i najszerzej zbadanym neuropeptydem należącym do rodziny neurotrofin jest NGF. Początkowo uważano, że NGF bierze udział jedynie w rozwoju nerwów obwodowych, jednak późniejsze doniesienia potwierdziły znaczenie tej neurotrofiny także w ośrodkowym układzie nerwowym [47]. Obecnie wiadomo, że NGF pełni ważną funkcję w promowaniu przetrwania neuronów, w rozwoju, funkcjonowaniu oraz plastyczności wielu neuronów czuciowych i współczulnych obwodowego układu nerwowego, a także w regulacji różnicowania komórek Schwanna oraz remielinizacji aksonów [38]. W warunkach fizjologicznych komórki Schwanna wykazują słabą ekspresję tego białka, która zdecydowanie wzrasta w następstwie uszkodzenia nerwów. Badania *in vivo*, przeprowadzone na modelu szczurzym, dokumentują zdolność NGF do wspomagania regeneracji aksonów oraz jego korzystny wpływ na poprawę parametrów elektrofizjologicznych oraz histomorfologicznych po uszkodzeniu nerwów [13]. Oprócz NGF uwalnianego przez uszkodzone aksony, makrofagi, które napłynęły z krwi, wydzielają do środowiska IL-1 β , która stymuluje komórki Schwanna i fibroblasty do wytwarzania tego czynnika zwiększając tym samym jeszcze bardziej jego aktywność w miejscu uszkodzenia [55]. Dzięki proro regeneracyjnym właściwościom NGF budzi zainteresowanie naukowców, którzy próbują znaleźć zastosowanie NGF w uszkodzeniach nerwów zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym. Okazuje się jednak, że NGF w postaci roztworu podany w miejsce uszkodzenia jest wrażliwy na enzymy proteolityczne i szybko ulega degradacji [98], ponadto, jak dowodzą badania eksperymentalne na modelu szczurzym, jego działanie jest ograniczone do neuronów czuciowych i nie ma wpływu na mechano- i nocyoreceptory

[19], a podanie do układu krążenia może powodować hiperalgezę [52]. Trwają jednak badania nad tworzeniem trwalszych i niewywołujących niepożądanych skutków pochodnych NGF oraz nad zastosowaniem łączonych terapii z innymi czynnikami neurotroficznymi [13], co w przyszłości mogłoby znaleźć zastosowanie w leczeniu osób z chorobami neurodegeneracyjnymi.

Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego -BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

Wyizolowany po raz pierwszy w 1982 r. z mózgu świni, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego jest – oprócz NGF – najdokładniej zbadaną neurotrofiną. Jego głównym zadaniem jest wspieranie przeżycia neuronów zwojów korzeni grzbietowych w rdzeniu kręgowym [6]. Działanie BDNF, które obejmuje także obwodowy układ nerwowy, nie ogranicza się jedynie do dojrzałych neuronów, ale wpływa także na rozwój neuronów i synaps [1, 38]. Ekspresja mRNA dla BDNF w obwodowym układzie nerwowym wzrasta w chwili uszkodzenia, zarówno w motoneuronach, jak i w komórkach Schwanna znajdujących się w dystalnym kikucie przeciętego nerwu, jednak utrzymuje się jedynie przez kilka pierwszych dni od ustania działania czynnika uszkadzającego [34]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że uszkodzenie nerwów obwodowych indukuje ekspresję BDNF w miejscu uszkodzenia, który sprzyja regeneracji uszkodzonych neuronów [31]. Podanie BDNF pochodzenia egzogenego ma natomiast zmienny wpływ na regenerację uszkodzonych nerwów i jest zależne od dawki, która może działać hamująco lub sprzyjać regeneracji [8, 59]. Znaczenie BDNF w promowaniu wzrostu nerwów obwodowych potwierdzili Wilhelm i wsp. [104]. Według prezentowanych przez nich wyników podanie BDNF pochodzenia egzogenego do miejsca uszkodzenia nerwów obwodowych u myszy zwiększa regenerację aksonów w porównaniu do myszy, u których nie zastosowano BDNF. Ponadto, w tych samych badaniach wykazano, że zahamowanie ekspresji BDNF w dystalnym kikucie przeciętego nerwu nie wpływa na liczbę regenerujących aksonów w jego proksymalnym odcinku. Natomiast badania eksperymentalne na modelu szczurzym wykazały, że podanie przeciwciała anti-BDNF do miejsca uszkodzenia nerwu hamuje proliferację tkanki łącznej i włókien kolagenowych w miejscu urazu, ale nie tłumi regeneracji uszkodzonych aksonów, czego skutkiem jest hamowanie tworzenia się nerwiaka [100].

Zdolność do indukcji regeneracji nerwów obwodowych stanowi o potencjalnym zastosowaniu BDNF we wspomaganie leczenia uszkodzeń obwodowego układu nerwowego. Badania eksperymentalne potwierdziły, że zastosowanie skojarzonej terapii polegającej na jednoczesnym podaniu dwóch czynników neurotroficznymi, BDNF oraz CNTF, zwiększa efektywność przywrócenia funkcji uszkodzonego nerwu kulszowego w szczurzym modelu eksperymentalnym, w porównaniu do zastosowania powyższych neurotrofin w monoterapii [53]. Podobnie, korzystniejszy wynik regeneracyjny uzyskano

stosując kolagenową tubę zawierającą BDNF jako pomost w odzyskaniu połączenia przeciętego nerwu kulszowego u szczura [99].

W zależności od miejsca i rozległości uszkodzenia układu nerwowego BDNF pełni odmienną rolę. Wspomaga wzrost neuronów, przeżycie i neurogenezę, może inicjować procesy kompensacyjne, które łagodzą szkodliwe skutki urazu, choroby lub stresu, a także jest zaangażowany w kilka wywołanych urazem procesów nieprzestawawczych, w tym ból, o podłożu zapalnym lub neuropatycznym, co przedstawił Smith [92].

Rzęskowy czynnik neurotroficzny – CNTF (ciliary neurotrophic factor)

Rzęskowy czynnik neurotroficzny jest neuroaktywną cytokiną, białkiem promującym przetrwanie i regenerację neuronów przez działanie na komórki układu nerwowego. Początkowo sądzono, że odgrywa znaczącą rolę w czasie rozwoju obwodowego układu nerwowego, jednak późniejsze badania wskazują na jego istotny wpływ na różnicowanie i regenerację komórek układu nerwowego w następstwie uszkodzeń dojrzałych komórek - w tym neuronów czuciowych, współczulnych i ruchowych [84]. W przeciwieństwie do większości neurotrofin CNTF nie jest wydzielany na zewnątrz komórki, tylko jest umiejscowiony wewnątrz w cytoplazmie astrocytów i mielinizujących komórek Schwanna [84]. Mielinizujące komórki Schwanna nerwów obwodowych w warunkach fizjologicznych stale wykazują wysoką ekspresję zarówno białka CNTF, jak i jego mRNA. Dane literaturowe potwierdzają wpływ zwyrodnienia Wallera oraz demielinizacji aksonów na obniżenie ekspresji mRNA CNTF [78], która natomiast wzrasta w czasie regeneracji [91]. CNTF uwalniany z powodu uszkodzenia wiąże się ze swoistym receptorem CNTFR α umiejscowionym głównie na neuronach i działa parakrynnie przez promowanie przeżycia komórek i wzrost aksonów [37]. Pełni ważną rolę w reinerwacji motoneuronów przez wspomaganie wzrostu ich aksonów. Udowodniono, że ogólnoustrojowe podanie CNTF wpływa korzystnie na sieć nerwową w mięśniach oraz ułatwia unerwienie włókien mięśniowych [87]. Podanie rekombinowanego CNTF promuje regenerację aksonów i pączkowanie aksonów motorycznych [22]. CNTF jest też głównym czynnikiem zwiększającym przetrwanie nerwów w chorobach demielinizujących OUN [56].

Ważną jest obserwacja, że mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) pozyskane ze szczurzego płynu owodniowego mogą wydzielać CNTF oraz NT-3, a ich podanie miejscowe wspomaga regenerację nerwu kulszowego po jego uszkodzeniu [73]. CNTF działa synergicznie z NGF oraz GDNF i jak dowodzą badania na modelu szczurzym jednoczesne podanie tych trzech neurotrofin zdecydowanie zwiększa przeżycie i wzrost nerwów motorycznych oraz czuciowych w obwodowym układzie nerwowym [13]. Świadczy to o różnym działaniu poszczególnych czynników neurotroficznych i ich

komplementarności względem siebie w procesie regeneracji nerwów obwodowych.

Należy podkreślić, że zarówno MSC jak i komórki progenitorowe liniowo negatywne (CD34+, CD133+), pochodzące z tkanek dorosłego organizmu człowieka (krew pępowinowa, szpik kostny) również wytwarzają czynniki neurotroficzne i wykazują ekspresję ich receptorów [72], zatem właściwości biologiczne tych komórek sprawiają, że mogą mieć zastosowanie również w regeneracji nerwów obwodowych.

Glejewy czynnik neurotroficzny – GDNF (glial-derived neurotrophic factor)

Glejewy czynnik neurotroficzny jest polipeptydem zbudowanym ze 134 aminokwasów, należącym do rodziny ligandów GDNF, który po raz pierwszy odkryto w 1991 r. [12]. GDNF jest jednym z pierwszych czynników, które są uwalniane na skutek uszkodzenia neuronów. Zwiększona ekspresja tej neurotrofiny jest związana z aktywacją receptorów nukleotydowych mielinizujących i niemielinizujących komórek Schwanna, powodująca aktywację białka kinazy D, a przez to zwiększonej transkrypcji GDNF [108]. Od czasu odkrycia GDNF przeprowadzono liczne eksperymenty nad mechanizmami odpowiadającymi za zwiększoną bądź zmniejszoną ekspresję tego czynnika w układzie nerwowym. Badania *in vitro* dowodzą, że egzogenny GDNF inicjuje zależną od dawki zmianę fenotypu dojrzałych komórek Schwanna w kierunku młodszych form, wspierających regenerację nerwów. Podobne zjawisko występuje w uszkodzeniach nerwów obwodowych i zachodzącym w jego wyniku zwyrodnieniu Wallera. Komórki Schwanna nerwów czuciowych i ruchowych są zdolne do wytwarzania niewielkich ilości GDNF, niewystarczających do indukcji różnicowania, jednak dopiero wzrost poziomu tego czynnika do wartości przekraczających fizjologiczne wartości, stymuluje komórki Schwanna do promowania regeneracji nerwów obwodowych [41]. Liczne doniesienia omawiają znaczący wpływ niedoboru GDNF na zmniejszenie potencjału regeneracyjnego uszkodzonych nerwów obwodowych. W badaniu *in vitro*, w którym za pośrednictwem kinazowych inhibitorów zablokowano ścieżkę sygnałową GDNF, wykazano zmniejszony potencjał proliferacyjny komórek Schwanna nerwów czuciowych oraz ruchowych [41]. Ponadto, wyniki przedstawione przez Höke i wsp. sugerują, że defekt regeneracji przewlekle uszkodzonych nerwów obwodowych wynika z braku zdolności komórek Schwanna do utrzymywania wystarczającego poziomu czynników troficznych, w tym GDNF [35].

Ze względu na udowodniony istotny wpływ GDNF na regenerację nerwów, w literaturze naukowej pojawiają się wyniki udanych prób wykorzystania tego czynnika w uszkodzeniach nerwów obwodowych. Wood i wsp. prezentują korzystny wpływ GDNF podanego w miejscu uszkodzenia nerwów na szczurzym modelu eksperymentalnym. Aplikacja GDNF z użyciem mikrosfer rozpuszczonych w żelu fibrynowym przyczyniła się do

wzrostu średnicy regenerujących włókien nerwowych oraz zwiększenia grubości osłonki mielinowej [105].

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego – VEGF (vascular endothelial growth factor)

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego jest białkiem występującym głównie w naczyniach krwionośnych, chociaż może być uwalniany także przez komórki innego typu, np. przez makrofagi. Wśród licznych cytokin pełni najważniejszą rolę w tworzeniu naczyń krwionośnych w procesie rozwoju zarodka oraz w angiogenezie, jest znany także jako czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń krwionośnych – VPF (vascular permeability factor). W przeciwieństwie do innych czynników mających właściwości angiogenne, VEGF działa jedynie na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. Brak nawet pojedynczego allelu VEGF powoduje śmierć zarodka, co świadczy o jego ważnej roli w rozwoju układu krwionośnego [26]. Ponadto wykazano, że VEGF jest ważnym czynnikiem o działaniu neurotroficznym, który wspiera przeżycie motoneuronów, stymuluje neurogenezę i wzrost aksonów oraz komórek glejowych, a także promuje tworzenie nowych naczyń i proliferację komórek Schwanna [67]. W hodowli komórek pozyskanych ze zwójów korzeni grzbietowych, dodanie VEGF do medium hodowlanego stymuluje wzrost aksonów oraz wspiera przeżycie neuronów i komórek satelitowych, podczas gdy zablokowanie receptora VEGF-VEGFR-2 hamuje wzrost komórek nerwowych, mimo obecności VEGF w medium hodowlanym [93]. Natomiast ekspresja VEGF oraz jego receptorów VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (Flk-1) rośnie w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego w odpowiedzi na uszkodzenie nerwu kulszowego, co może świadczyć o jego udziale w procesie regeneracji [39]. Niezależnie od rodzaju tkanki, która ulega regeneracji warunkiem prawidłowego przebiegu tego procesu jest stałe zaopatrzenie w tlen oraz składniki odżywcze, które docierają do tkanek z naczyń krwionośnych. Stąd w przypadku uszkodzeń obwodowego układu nerwowego podwójna funkcja VEGF niesie dodatkowe korzyści i wzmacnia znaczenie tego czynnika w regeneracji nerwów obwodowych.

Lamininy

Lamininy są dużą rodziną glikoprotein zbudowanych z różnych połączeń trzech rodzajów łańcuchów: α , β oraz γ . W zależności od składu występują różne izoformy laminin, które pełnią w organizmie rozmaite funkcje i mają znaczący udział w procesach, takich jak różnicowanie, proliferacja, adhezja czy migracja [32]. Niektóre z izoform lamininy są niezwykle ważne dla prawidłowego procesu regeneracji nerwów. W obwodowym układzie nerwowym występują głównie dwie izoformy: $\alpha 2$ i $\alpha 4$ wytwarzane przez komórki Schwanna [102]. Lamininy są główną składową błon podstawnych wielu tkanek [24], a obecność lamininy w perineurium pozwala na utrzymanie bariery między wnętrzem pęczków nerwowych a środowiskiem zewnętrznym oraz

nadaje kierunek aksonom, co jest szczególnie istotne w procesie regeneracji nerwów obwodowych. Natomiast laminina budująca ścianę naczyń krwionośnych wpływa na elastyczność naczyń oraz wspiera angiogenezę [2, 33, 111].

Laminina z komórkami Schwanna bierze udział w tworzeniu pasm Büngnera w dystalnej części przerwanego nerwu, które są celem rosnących aksonów. Ponadto w trzecim dniu od uszkodzenia nerwów obwodowych obserwuje się wzrost ekspresji lamininy w proksymalnej części przerwanego nerwu, który normalizuje się dopiero po upływie około 42 dni [102]. Dzięki biomechanicznym właściwościom tworzy rusztowanie i nadaje kierunek rosnącym aksonom, dlatego znalazła również zastosowanie jako czynnik wspomagający regenerację i odzyskiwanie połączenia większych ubytków nerwów w obwodowym układzie nerwowym [50]. Tę właściwość lamininy potwierdziły badania własne, prowadzone we współpracy z zespołem w Cleveland Clinic, w których dzięki wykorzystaniu epineuralnych osłonek, wypełnionych mezenchymalnymi komórkami macierzystymi szpiku, dołączenia części proksymalnej i dystalnej przerwanego nerwu kulszowego szczura, wykazano zwiększoną ekspresję lamininy związaną z poprawą procesu regeneracji uszkodzonego nerwu [88].

REGENERACJA USZKODZONYCH NERWÓW A ROZWÓJ NERWIAKÓW POURAZOWYCH

Zdolność aksonów do regeneracji w obwodowym układzie nerwowym jest uwarunkowana wieloma czynnikami. Środowisko zewnętrzne, czyli kondycja otaczających tkanek musi sprzyjać wzrostowi aksonów, ponadto ważną rolę odgrywają komórki nienależące do układu nerwowego, a także biologiczna zdolność neuronów do regeneracji [18]. W chwili uszkodzenia aksonów dochodzi do nagłego wygenerowania wysokiego potencjału czynnościowego oraz przerwania transportu sygnałów wzdłuż aksonu w obu kierunkach, co przyczynia się do uruchomienia odpowiedzi ze strony całego neuronu [80]. Do sygnałów informujących ciało komórki neuronu o przerwaniu ciągłości aksonu należy spadek transportu endogennego czynnika wzrostu nerwów NGF. Przerwanie ciągłości aksonów naraża aksolemmę na bezpośredni kontakt z macierzą zewnątrzkomórkową, w której znajdują się liczne czynniki wydzielane głównie przez makrofagi i komórki Schwanna. Wśród tych czynników znajdują się m.in. CNTF, NT3 czy czynnik wzrostu fibroblastów – FGF, które również indukują swoistą odpowiedź neuronu (ryc. 2) [44].

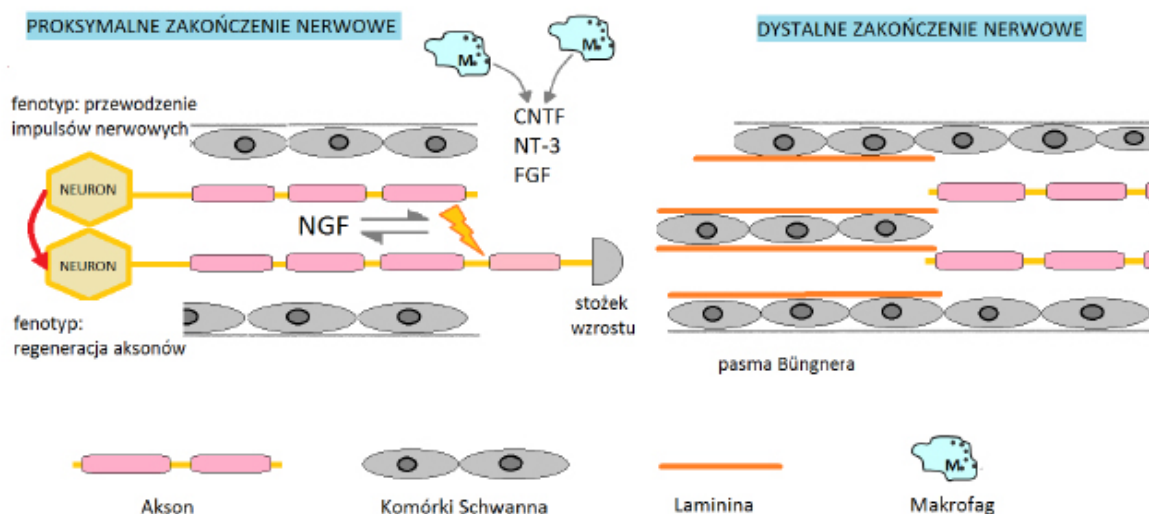
Opisane wyżej sygnały są jednymi z wielu, wysyłanymi do ciała komórki neuronu, dzięki temu wzrasta ekspresja genów i białek mających na celu zmianę fenotypu neuronu z wspierającego transmisję sygnałów nerwowych na fenotyp wspierający regenerację aksonów [114]. Niektóre z genów są związane ze zwiększonym wytwarzaniem czynników troficznymi, takich jak: BDNF, FGF-2, NGF, mogących działać zarówno autokrynnie,

jak i parakrywnie [42, 58]. Zwraca uwagę obserwacja, że nadmierne wytwarzanie NGF w miejscu uszkodzenia nerwów nie indukuje rozwoju nerwiaka, ale wpływa na zwiększenie wydzielania BDNF po uszkodzeniu nerwów w obwodowym układzie nerwowym. BDNF zwiększa ryzyko rozwoju nerwiaka przez wspomaganie wzrostu włókien nerwowych. Inaktywacja BDNF po podaniu swoistego przeciwciała zmniejsza rozwój nerwiaka i ból neuropatyczny [54, 100]. Zwiększonej ekspresji ulegają również białka odgrywające znaczącą rolę we wzroście nerwów, takie jak GAP-43, tubulina czy aktyna oraz endogenne czynniki neuroprotekcyjne, np. białko szoku termicznego HSP27 (heat-shock protein-27) [29]. Podobne zmiany dotyczą ekspresji receptorów czynników neurotroficznych [80]. Mimo że zwiększenie ekspresji genów czynników neurotroficznych w odcinku proksymalnym zachodzi jednocześnie ze zwyrodnieniem Wallera występującym w odcinku dystalnym, proces regeneracji może się rozpocząć dopiero po zakończeniu procesu zwyrodnienia Wallera.

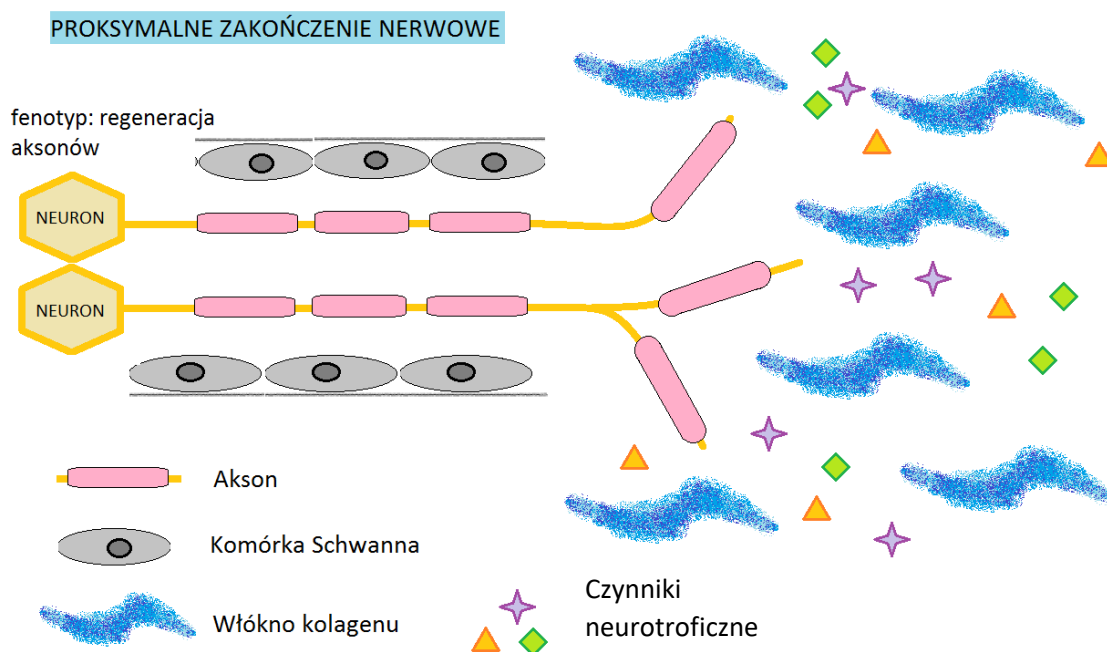
Jednocześnie, w miejscu uszkodzenia pojawiają się makrofagi, które w odpowiedzi na lokalne środowisko ulegają polaryzacji zmieniając swój fenotyp na przeciwzapalny (M2). Jak donosi Chen i wsp., makrofagi o fenotypie M2 odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy w regeneracji nerwów obwodowych dominują nad makrofagami o fenotypie prozapalnym M1 [14]. Jest to dowodem na to, że oprócz oczyszczania okolicznych tkanek, ich inną ważną funkcją jest promowanie regeneracji aksonów.

Regeneracja przerwanego nerwu rozpoczyna się transformacją proksymalnego zakończenia nerwu w bardzo ruchliwy „stożek wzrostu”, który jest wrażliwy na warunki panujące w otaczającym środowisku i wytycza kierunek nowo rosnącym aksonom (ryc. 2). Odzyskanie utraconego połączenia nerwowego jest możliwe dzięki procesom zachodzącym we wcześniej oczyszczonym i przygotowanym dystalnym zakończeniu nerwu. Komórki Schwanna znajdujące się w tym odcinku, pozbawione sygnałów docierających z ośrodkowego układu nerwowego, zaczynają proliferować tworząc razem z lamininą osłonki endoneurialne zwane pasmami Büngnera (bands of Büngner), nadające kierunek wzrostu aksonom [103]. Jednak to, czy aksony wiedzione przez stożek wzrostu dotrą do celu i odtworzą utracone połączenie zależy przede wszystkim od czynników znajdujących się w otaczającym mikrośrodowisku oraz od wielkości powstałego uszkodzenia. Badania dowodzą, że stożek wzrostu wykazuje różne reakcje, takie jak przyspieszenie, zmniejszenie migracji, wstrzymanie, wycofanie, a nawet rozwidlenie w zależności od kondycji otaczających tkanek i sygnałów docierających z zewnątrz [103].

Na powodzenie regeneracji nerwów obwodowych znaczący wpływ ma także odległość miejsca uszkodzenia aksonu od ciała neuronu – bliższe uszkodzenia mogą zainicjować zaprogramowaną śmierć neuronu, dlatego im większy jest dystans między uszkodzeniem nerwów obwodowych a ośrodkowym układem nerwowym, tym większa szansa na skuteczną regenerację. Ponadto



Ryc. 2. Regeneracja nerwów w obwodowym układzie nerwowym po zakończeniu procesu zwyrodnienia Wallera. Zatrzymanie transportu endogennego NGF wzdłuż aksonów oraz działanie czynników neurotroficznych (CNTF, NT-3, FGF) znajdujących się w mikrośrodowisku zmienia fenotyp neuronów na promujący regenerację aksonów. W części proksymalnej przeciętego nerwu powstaje stożek wzrostu nadający kierunek rosnącym aksonom. Jednocześnie w części dystalnej komórki Schwanna z lamininą tworzą pasma Büngnera będące celem stożka wzrostu



Ryc. 3. Formowanie się nerwiaka w obwodowym układzie nerwowym po przerwaniu ciągłości nerwów. Czynniki neurotroficzne rozproszone w mikrośrodowisku uszkodzonego nerwu powodują chaotyczny rozrost aksonów oraz tkanki łącznej (kolagenu)

regeneracja uszkodzeń nerwów obwodowych charakteryzujących się zachowaniem ciągłości endoneurium (stopień II według skali Sunderlanda) częściej kończy się odzyskaniem połączenia nerwowego, co wskazuje jak ważny udział w prawidłowym wzroście nerwów ma integralność tkanki łącznej. Uszkodzenia nerwów obwodowych odpowiadające stopniom III i IV, w których dochodzi do naruszenia struktur łącznotkankowych, stwarzają utrudnione warunki dla prawidłowego formowania się pasm Büngnera oraz zwiększają ryzyko tworzenia się blizn zaburzających migrację stożka wzrostu [63]. Jeśli osiągnięcie dystalnego końca nerwu jest niemożliwe, stożek prowadzący aksony może zawracać w stronę proksymalnego zakończenia nerwu, co w większości przypadków powoduje rozwój nerwiaka [63]. Aksony pobudzone do regeneracji przez znajdujące się w mikrośrodowisku czynniki neurotroficzne, pozbawione jednocześnie celu jakim jest dystalne zakończenie nerwu, zaczynają „ślepo” wrastać w otaczające tkanki, głównie tkankę łączną, tworząc chaotyczne struktury złożone z regenerujących aksonów i tkanki łącznej, nazywane nerwiakami, które generują dokuczliwy i trudny do leczenia ból neuropatyczny (ryc. 3) [2]. Ponadto regenerujące się aksony, które nie mogą dotrzeć do dystalnej części nerwu zaczynają akumulować na swojej powierzchni kanały sodowe, co jest jedną z przyczyn bólu neuropatycznego. Dowiedziono, że czynniki uwalniane z dystalnego zakończenia nerwowego w wyniku zwyrodnienia Wallera mają znaczący wpływ na powstawanie nerwiaków, w związku z tym izolacja proksymalnego zakończenia od otaczającego mikrośrodowiska będzie wpływać hamująco na rozwój nerwiaków [89].

GENEZA BÓLU NEUROPATYCZNEGO

Badania nad mechanizmami powstawania bólu neuropatycznego, pozwoliły ustalić, że w następstwie uszkodzenia nerwów obwodowych dochodzi do licznych zmian morfologicznych, fizjologicznych oraz chemicznych zarówno w obwodowym, jak i ośrodkowym układzie nerwowym [70]. Jednym z przykładów mechanizmów mających znaczący udział w genezie bólu neuropatycznego jest rozwój nerwiaków pourazowych w miejscu uszkodzenia nerwów obwodowych. Na skutek amputacji dochodzi do miejscowego zniszczenia aksonów, co inicjuje stan zapalny oraz niekontrolowaną regenerację prowadzącą do rozwoju nerwiaka. Czuciowe włókna nerwowe budujące nerwiaka wykazują ekstopową aktywność, zwiększoną wrażliwość na bodźce mechaniczne oraz chemiczną wrażliwość na działanie katecholamin. Ponadto, zwiększa się wrażliwość napięciowa kanałów sodowych przy jednoczesnym obniżeniu wrażliwości kanałów potasowych. Tworzą się nowe, dysfunkcjonalne połączenia między aksonami. Gromadzą się także cząsteczki, takie jak ankiryne G [46] oraz kontaktyne [85], które zwiększają aktywność kanałów jonowych w błonie aksonów. Wszystkie te mechanizmy powodują wzrost częstości spontanicznych impulsów docierających do rdzenia kręgowego. W wyniku nadmiernego pobudzenia w rdzeniu kręgowym pojawiają się patologiczne zmiany, takie jak nadmierne uwalnianie neuroprzekazników glutaminianu czy norepinefryny, które wpływają na pobudliwość rogów grzbietowych [27]. Wzmoczone pobudzenie ośrodkowego układu nerwowego zwiększa aktywność receptora NMDA (N-methyl-D-aspartate).

Zastosowanie antagonistów tego receptora likwiduje wiele objawów związanych z nadmiernym pobudzeniem ośrodkowego układu nerwowego [107]. Wykazano również korelację między nasileniem reorganizacji kory czuciowej, a występowaniem bólów fantomowych (PLP). Nie wiadomo jednak czy zaistniałe zmiany jedynie współistnieją z PLP, czy są jego skutkiem [27]. Pierwotne aferentne włókna nocycyptywne odpowiadające za odbiór bodźców uszkodzających tkanki w obwodowym układzie nerwowym kończą się jako wolne zakończenia nerwów tzw. nocyreceptory, które unerwiają tkanki organizmu. Uszkodzenie tkanek powoduje uwolnienie licznych czynników prozapalnych i białek sygnałowych, do których należą: tachykininy, bradykininy, prostaglandyny, serotonina, histamina, a także substancja P oraz CGRP (calcitonin gene-related peptide). Ich obecność aktywuje nocyreceptory i generuje potencjał aktywacyjny lub wpływa na zwiększenie ich wrażliwości na bodźce, co klinicznie objawia się hiperalgezą, czyli zwiększoną wrażliwością na bodźce bólowe oraz alłodynią - reakcją bólową na bodźce, które w warunkach fizjologicznych takiej reakcji nie wywołują. Ponadto aktywacja wolnych zakończeń nerwowych przyczynia się do zwiększonego uwalniania CGRP oraz substancji P przez aksony, a to zwiększa uwalnianie cytokin prozapalnych [40]. Jak już wspomniano, stan zapalny pojawiający się w miejscu uszkodzenia nerwu ma zasadnicze znaczenie dla rozpoczęcia procesu regeneracji, jednak jest jedną z głównych przyczyn rozwoju bólu neuropatycznego. Zahamowanie odpowiedzi zapalnej w pierwszej fazie po uszkodzeniu nerwu w celu zredukowania bólu neuropatycznego może doprowadzić do zmniejszenia lub zahamowania regeneracji aksonów [3, 11]. Dowiedziono bowiem, że zablokowanie lokalnej syntezy CGRP przez aksony oraz zablokowanie receptora tego białka na komórkach Schwanna zaburza rekretację komórek Schwanna i regenerację nerwu [97].

Białko związane z genem kalcytoniny CGRP jest jednym z powszechnie znanych czynników biorących udział w genezie bólu neuropatycznego, a jego ekspresję nasila m.in. NGF [10, 38]. CGRP jest neuropeptydem występującym w dwóch izoformach: α i β . Jego obecność stwierdza się zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Ekspresję CGRP oraz receptora tego białka obserwuje się w somatosensorycznych i autonomicznych włóknach obwodowego układu nerwowego, na naczyniach wieńcowych, w układzie pokarmowym oraz neuronach nocycyptywnych [40]. Odgrywa on znaczącą rolę w przekazywaniu impulsów bólowych przez modulację funkcji neuroprzekaźników. Ponadto ma właściwości wazodylatacyjne, co może mieć znaczenie w stanach zapalnych pochodzenia neurogenego. Białko to z powodu uszkodzenia nerwów obwodowych gromadzi się w neuronach tworzących nerwiaki i jest następnie uwalniane w zwiększonych ilościach [115]. Nadaktywność CGRP jest związana nie tylko z formującym się nerwiakiem, ale także z naciekającymi makrofażami, co dodatkowo zwiększa transmisję bólu [57]. W czasie uszkodzenia nerwów obwodowych jego poziom

wzrasta zarówno w miejscu uszkodzenia, jak i w rogach tylnych rdzenia kręgowego, gdzie również pełni znaczącą rolę w patomechanizmie bólu neuropatycznego [40].

Ból neuropatyczny jest wynikiem konkurencyjnego działania mechanizmów pobudzających oraz hamujących. Uszkodzenie nerwów obwodowych może doprowadzić do wzmożonej wrażliwości, ale także wpływa na wyciszenie mechanizmów hamujących przekazywanie nerwowe, co powoduje nagromadzenie się czynników wywołujących ból. Badania na zwierzętach dowodzą, że uszkodzenie nerwów obwodowych obniża ekspresję neuroprzekaźnika GABA w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego, pełniącego funkcję inhibitora w ośrodkowym układzie nerwowym [65]. Nieustanne pobudzanie układu nerwowego sygnałami bólowymi zmienia fizjologię komórek obwodowego układu nerwowego, rdzenia kręgowego oraz mózgu. Utrzymujący się stan nadmiernego pobudzenia ośrodkowego układu nerwowego jest określany w języku angielskim jako „central sensitization”, co można przetłumaczyć jako „nadwrażliwość ośrodkowa”. „Nadwrażliwość ośrodkowa” powoduje zmiany w komórkach na poziomie transkrypcji genów i może się utrzymywać bardzo długo. Występowanie przewlekłego bólu neuropatycznego częściowo można wyjaśnić „nadwrażliwością ośrodkową”, ponieważ przewlekły ból pochodzenia obwodowego jest dalej utrwalany przez mechanizmy ośrodkowe. Powyższe informacje sugerują, że wczesne zahamowanie pobudliwości nerwów przez zmniejszenie stymulacji bólowej może ograniczyć niekorzystne zmiany w układzie somatosensorycznym i złagodzić ból [17].

METODY LECZENIA I ZAPOBIEGANIA TWORZENIU SIĘ NERWIAKÓW W FAZIE BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH

Dynamiczny rozwój badań i odkrywanie innych mechanizmów wpływających na genezę bólu neuropatycznego, przybliżyła klinicystów do opracowania nowych metod, które skutecznie ograniczą rozwój nerwiaków i związanych z nimi dolegliwości bólowych. Istnieje wiele różnych chirurgicznych i farmakologicznych sposobów zwalczania nerwiaków [5, 54, 110], jednak nadal żadna z obecnie stosowanych metod nie jest wystarczająco skuteczna, aby mogła się stać złotym standardem w postępowaniu klinicznym. Ze względu na problemy w walce z bólem neuropatycznym wywołanym przez nerwiaki, należałoby się skupić na sposobach zapobiegania ich rozwojowi. Takie działanie pozwoliłoby znacznie zmniejszyć ryzyko pojawienia się bólu neuropatycznego i wynikające z jego leczenia komplikacje. Niewystarczająca skuteczność obecnie stosowanych metod leczenia i zapobiegania rozwojowi nerwiaków zmusza lekarzy i naukowców do poszukiwania nowych sposobów, które mogłyby się stać standardem w rutynowym postępowaniu. Są doniesienia o stosowaniu leków działających na poziomie komórkowym, takich jak inhibitory czynników prozapalnych, tj. TNF [16] lub inhibitory czynników neurotroficznych np. inhibitor NGF

[48]. W badaniach klinicznych udowodniono, że celowana reinerwacja mięśni (targeted muscle reinnervation) zmniejsza dolegliwości związane z bólem neuropatycznym u pacjentów, u których rozwinął się nerwiak [94].

Największą jednak uwagę poświęca się poszukiwaniom odpowiedniego sposobu, który umożliwiłby zabezpieczenie przerwanej zakończenia nerwowego przed docierającymi z zewnątrz sygnałami indukującymi regenerację. Jedne z pierwszych badań prezentujących owe podejście wykazały, że zabezpieczenie kikuta nerwu epineuralną osłonką sklejoną na końcu za pomocą histoakrylu zwiększa skuteczność hamowania rozwoju nerwiaka [61]. Od tego czasu są prowadzone liczne badania eksperymentalne, w których bada się efektywność zastosowania na zakończeniach uszkodzonych nerwów obwodowych zarówno materiałów biologicznych jak i biomateriałów syntetycznych. Marcol i wsp. przedstawili wyniki badań na modelu szczurzym, w których po zabezpieczeniu przerwanej zakończenia nerwowego żelem mikrokrystalicznego chitosanu, obserwowano zahamowanie rozwoju nerwiaka oraz bólu neuropatycznego [60]. W prezentowanych niedawno badaniach z wykorzystaniem kanałów nanowłóknistych również osiągnięto zadowalające wyniki [109].

Mimo zalet osłonki wykonane z biomateriałów mają pewne ograniczenia: są nieprzepuszczalne dla rosnących naczyń krwionośnych, a niedokrwienie jest jedną z przyczyn bólu neuropatycznego. Ponadto, osłonki te są wykonane z materiału obcego dla organizmu i jego zastosowanie może wywołać odpowiedź układu immunologicznego, co również przyczynia się do zwiększenia odczuć bólowych u pacjentów. Zdecydowanie bardziej obiecujące wydaje się zastosowanie osłonek z materiału pochodzenia naturalnego. Już 20 lat temu tureccy badacze udowodnili, że u pacjentów, u których przerwane zakończenie nerwowe zabezpieczono osłonką wykonaną

z epineurium, obserwowano znaczne zmniejszenie dolegliwości bólowych [23, 112]. Mimo tak obiecujących wyników metody te nie są powszechnie stosowane w klinice. Nadal trwają badania nad wykorzystaniem epineurium w leczeniu uszkodzeń obwodowego układu nerwowego, czego przykładem są badania eksperymentalne polegające na wykorzystaniu osłonki epineuralnej wypełnionej komórkami macierzystymi, łączącej przerwane końce nerwu i nadającej kierunek rosnącym aksonom [88]. Warte uwagi są badania, w których wykazano, że autologicznie przeszczepione epineurium wypełnione komórkami macierzystymi pozyskanymi ze szpiku skuteczniej wspomaga regenerację przerwanej nerwu w porównaniu do takiej samej „tubki” wykonanej z naczyń krwionośnych [69]. Badania własne dotyczące biologii epineurium ludzkich nerwów obwodowych dokumentują, że epineurium ma niewielkie właściwości immunogenne (obniżona ekspresja antygenów HLA klasy I, brak ekspresji antygenów HLA klasy II, obecność komórek układu odpornościowego na poziomie fizjologicznym) i zachowany potencjał proangiogeny (obecność naczyń z ekspresją VEGF, CD31 i lamininy) [45]. Zastosowanie epineurium w postaci „opatrunku” na proksymalny kikut uszkodzonego nerwu kulszowego znacznie ograniczyło niekontrolowany rozrost tkanki łącznej i nerwowej, a tym samym zahamowany został proces tworzenia nerwiaka (wyniki własne nieopublikowane). Obserwacje te dowodzą, że ograniczenie wpływu czynników neurotroficznymi napływających z otaczającego mikrośrodowiska osłabia proces regeneracji aksonów i sprzyja wyciszeniu aktywności układu odpornościowego, a tym samym ogranicza stan zapalny. Uzyskane wyniki wskazują, że epineurium ma odpowiednie cechy biologiczne, które czynią je użytecznym materiałem w leczeniu uszkodzeń obwodowego układu nerwowego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., DeChiara T.M., Russell M., Thadani A., Squinto S.P., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M.: A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, 1995; 374: 450-453
- [2] Allodi I., Udina E., Navarro X.: Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol.*, 2012; 98: 16-37
- [3] Austin P.J., Moalem-Taylor G.: The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J. Neuroimmunol.*, 2010; 229: 26-50
- [4] Baetas-da-Cruz W., Alves L., Pessolani M.C., Barbosa H.S., Regnier-Vigouroux A., Corte-Real S., Cavalcante L.A.: Schwann cells express the macrophage mannose receptor and MHC class II. Do they have a role in antigen presentation? *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 2009; 14: 84-92
- [5] Balcin H., Erba P., Wettstein r., Schaefer D.J., Pierer G., Kalbermatten D.F.: A comparative study of two methods of surgical treatment for painful neuroma. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2009; 91: 803-808
- [6] Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H.: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.*, 1982; 1: 549-553
- [7] Bastien D., Lacroix S.: Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp. Neurol.* 2014; 258: 62-77
- [8] Boyd J.G., Gordon T.: A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.*, 2002; 15: 613-626
- [9] Brown M.C., Lunn E.R., Perry V.H.: Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons. *J. Neurobiol.*, 1992; 23: 521-536
- [10] Cady r.J., Glenn J.R., Smith K.M., Durham P.L.: Calcitonin gene-related peptide promotes cellular changes in trigeminal neurons and glia implicated in peripheral and central sensitization. *Mol. Pain.*, 2011; 7: 94
- [11] Cámara-Lemarro C.R., Guzmán-de la Garza F.J., Fernández-Garza N.E.: Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve

- degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation*, 2010; 17: 314-324
- [12] Chao C.C., Chiang C.H., Ma Y.L., Lee E.H.: Molecular mechanism of the neurotrophic effect of GDNF on DA neurons: role of protein kinase CK2. *Neurobiol. Aging*, 2006; 27: 105-118
- [13] Chen J., Chu Y.F., Chen J.M., Li B.C.: Synergistic effects of NGF, CNTF and GDNF on functional recovery following sciatic nerve injury in rats. *Adv. Med. Sci.*, 2010; 55: 32-42
- [14] Chen P., Piao X., Bonaldo P.: Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.*, 2015; 130: 605-618
- [15] Coleman M.P., Perry V.H.: Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.*, 2002; 25: 532-537
- [16] Dahl E., Cohen S.P.: Perineural injection of etanercept as a treatment for postamputation pain. *Clin. J. Pain*, 2008; 24: 172-175
- [17] Davis G., Curtin C.M.: Management of pain in complex nerve injuries. *Hand Clin.*, 2016; 32: 257-262
- [18] DeFrancesco-Lisowitz A., Lindborg J.A., Niemi J.P., Zigmond R.E.: The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Neuroscience*, 2015; 302: 174-203
- [19] Diamond J., Foerster A., Holmes M., Coughlin M.: Sensory nerves in adult rats regenerate and restore sensory function to the skin independently of endogenous NGF. *J. Neurosci.*, 1992; 12: 1467-1476
- [20] Dieu T., Johnstone B.R., Newgreen D.F.: Genes and nerves. *J. Reconstr. Microsurg.*, 2005; 21: 179-186
- [21] Dillingham T.R., Pezzin L.E., MacKenzie E.J.: Limb amputation and limb deficiency: epidemiology and recent trends in the United States. *South. Med. J.*, 2002; 95: 875-883
- [22] Dubový P.: Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann. Anat.*, 2011; 193: 267-275
- [23] Durak N., Yüksel F., Kisaoglu E.: Effectiveness of epineural barriers as a flap and free graft in reducing neuroma formation in the rat following sciatic-nerve severance. *Eur. J. Plastic Surgery*, 1995; 18: 272-275
- [24] Durbeej M.: Laminins. *Cell Tissue Res.*, 2010; 339: 259-268
- [25] Ephraim P.L., Wegener S.T., MacKenzie E.J., Dillingham T.R., Pezzin L.E.: Phantom pain, residual limb pain, and back pain in amputees: results of a national survey. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 2005; 86: 1910-1919
- [26] Ferrara N., Davis-Smyth T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 1997; 18: 4-25
- [27] Flor H., Nikolajsen L., Staehelin Jensen T.: Phantom limb pain: a case of maladaptive CNS plasticity? *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006; 7: 873-881
- [28] Fry E.J., Ho C., David S.: A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron*, 2007; 53: 649-662
- [29] Fu S.Y., Gordon T.: The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.*, 1997; 14: 67-116
- [30] Gaudet A.D., Popovich P.G., Ramer M.S.: Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation*, 2011; 8: 110
- [31] Geremia N.M., Pettersson L.M., Hasmatali J.C., Hryciw T., Danielsen N., Schreyer D.J., Verge V.M.: Endogenous BDNF regulates induction of intrinsic neuronal growth programs in injured sensory neurons. *Exp. Neurol.*, 2010; 223: 128-142
- [32] Golbert D.C., Linhares-Lacerda L., Almeida L.G., Correa-de-Santana E., de Oliveira A.R., Mundstein A.S., Savino W., de Vasconcelos A.T.: Laminin database: a tool to retrieve high-throughput and curated data for studies on laminins. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: D320-D323
- [33] Gonzalez-Perez F., Udina E., Navarro X.: Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. *Int. Rev. Neurobiol.*, 2013; 108: 257-275
- [34] Gordon T.: The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg. Focus*, 2009; 26: E3
- [35] Höke A., Gordon T., Zochodne D.W., Sulaiman O.A.: A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp. Neurol.*, 2002; 173: 77-85
- [36] Hsu E., Cohen S.P.: Postamputation pain: epidemiology, mechanisms, and treatment. *J. Pain Res.*, 2013; 6: 121-136
- [37] Hu Y., Leaver S.G., Plant G.W., Hendriks W.T., Niclou S.P., Verhaagen J., Harvey A.R., Cui Q.: Lentiviral-mediated transfer of CNTF to schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol. Ther.*, 2005; 11: 906-915
- [38] Huang E.J., Reichardt L.F.: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2001; 24: 677-736
- [39] Islamov R.R., Chintalgattu V., Pak E.S., Katwa L.C., Murashov A.K.: Induction of VEGF and its Flt-1 receptor after sciatic nerve crush injury. *Neuroreport*, 2004; 15: 2117-2121
- [40] Iyengar S., Ossipov M.H., Johnson K.W.: The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain*, 2017; 158: 543-559
- [41] Jesuraj N.J., Marquardt L.M., Kwasa J.A., Sakiyama-Elbert S.E.: Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes increased phenotypic marker expression in femoral sensory and motor-derived Schwann cell cultures. *Exp. Neurol.*, 2014; 257: 10-18
- [42] Kashiba H., Senba E.: Up- and down-regulation of BDNF mRNA in distinct subgroups of rat sensory neurons after axotomy. *Neuroreport*, 1999; 10: 3561-3565
- [43] Keefe K.M., Sheikh I.S., Smith G.M.: Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18: E548
- [44] Kirsch M., Terheggen U., Hofmann H.D.: Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2003; 24: 130-138
- [45] Klimczak A., Siemionow M., Futoma K., Jundzill A., Patrzalek D.: Assessment of immunologic, proangiogenic and neurogenic properties of human peripheral nerve epineurium for potential clinical application. *Histol. Histopathol.*, 2017; 32: 1197-1205
- [46] Kretschmer T., Nguyen D.H., Beuerman R.W., Happel L.T., England J.D., Tiel R.L., Kline D.G.: Painful neuromas: a potential role for a structural transmembrane protein, ankyrin G. *J. Neurosurg.*, 2002; 97: 1424-1431
- [47] Kromer L.F.: Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science*, 1987; 235: 214-216
- [48] Kryger G.S., Kryger Z., Zhang F., Shelton D.L., Lineaweaver W.C., Buncke H.J.: Nerve growth factor inhibition prevents traumatic neuroma formation in the rat. *J. Hand. Surg. Am.*, 2001; 26: 635-644
- [49] Kuffler D.P.: Coping with phantom limb pain. *Mol. Neurobiol.*, 2018; 55: 70-84
- [50] Labrador R.O., Buti M., Navarro X.: Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp. Neurol.*, 1998; 149: 243-252
- [51] Lee H., Jo E.K., Choi S.Y., Oh S.B., Park K., Kim J.S., Lee S.J.: Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 350: 742-747

- [52] Lewin G.R., Rueff A., Mendell L.M.: Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.*, 1994; 6: 1903-1912
- [53] Lewin S.L., Utley D.S., Cheng E.T., Verity A.N., Terris D.J.: Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope*, 1997; 107: 992-999
- [54] Lewin-Kowalik J., Marcol W., Kotulska K., Mander A., Klimczak A.: Prevention and management of painful neuroma. *Neurol. Med. Chir.*, 2006; 46: 62-67
- [55] Lindholm D., Heumann r., Meyer M., Thoenen H.: Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*, 1987; 330: 658-659
- [56] Linker r.A., Mäurer M., Gaupp S., Martini r., Holtmann B., Giess r., Rieckmann P., Lassmann H., Toyka K.V., Sendtner M., Gold r.: CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat. Med.*, 2002; 8: 620-624
- [57] Ma W., Quirion r.: Increased calcitonin gene-related peptide in neuroma and invading macrophages is involved in the up-regulation of interleukin-6 and thermal hyperalgesia in a rat model of mono-neuropathy. *J. Neurochem.*, 2006; 98: 180-192
- [58] Madiari F., Hussain S.R., Goettl V.M., Burry r.W., Stephens r.L.Jr., Hackshaw K.V.: Upregulation of FGF-2 in reactive spinal cord astrocytes following unilateral lumbar spinal nerve ligation. *Exp. Brain Res.*, 2003; 148: 366-376
- [59] Marcol W., Kotulska K., Larysz-Brysz M., Kowalik J.L.: BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurg. Rev.*, 2007; 30: 235-243
- [60] Marcol W., Larysz-Brysz M., Kucharska M., Niekraszewicz A., Slusarczyk W., Kotulska K., Wlasczuk P., Wlasczuk A., Jedrejowska-Szypulka H., Lewin-Kowalik J.: Reduction of post-traumatic neuroma and epineural scar formation in rat sciatic nerve by application of microcrystalline chitosan. *Microsurgery*, 2011; 31: 642-649
- [61] Martini A., Fromm B.: A new operation for the prevention and treatment of amputation neuromas. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 1989; 71: 379-382
- [62] Martini r., Fischer S., Lopez-Vales r., David S.: Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia*, 2008; 56: 1566-1577
- [63] Menorca r.M., Fussell T.S., Elfar J.C.: Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.*, 2013; 29: 317-330
- [64] Mietto B.S., Mostacada K., Martinez A.M.: Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. *Mediat. Inflamm.*, 2015; 2015: 251204
- [65] Moore K.A., Kohno T., Karchewski L.A., Scholz J., Baba H., Woolf C.J.: Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 6724-6731
- [66] Mueller M., Leonhard C., Wacker K., Ringelstein E.B., Okabe M., Hickey W.F., Kiefer r.: Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab. Invest.*, 2003; 83: 175-185
- [67] Mukhamedshina Y.O., Galizieva Z.E., Arkhipova S.S., Galieva L.R., Garanina E.E., Shulman A.A., Yafarova G.G., Chelyshev Y.A., Shamutdinova N.V., Rizvanov A.A.: Electrophysiological, morphological, and ultrastructural features of the injured spinal cord tissue after transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells genetically modified with the VEGF and GDNF genes. *Neural Plast.*, 2017; 2017: 9857918
- [68] Mukhopadhyay G., Doherty P., Walsh F.S., Crocker P.R., Filbin M.T.: A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, 1994; 13: 757-767
- [69] Nijhuis T.H., Bodar C.W., van Neck J.W., Walbeehm E.T., Siemionow M., Madajka M., Cwykiel J., Blok J.H., Hovius S.E.: Natural conduits for bridging a 15-mm nerve defect: comparison of the vein supported by muscle and bone marrow stromal cells with a nerve autograft. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 2013; 66: 251-259
- [70] Nikolajsen L.: Postamputation pain: studies on mechanisms. *Dan. Med. J.*, 2012; 59: B4527
- [71] Ousman S.S., David S.: Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia*, 2000; 30: 92-104
- [72] Paczkowska E., Piecyk K., Luczkowska K., Kotowski M., Roginska D., Pius-Sadowska E., Oronowicz K., Ostrowski M., Machalinski B.: Expression of neurotrophins and their receptors in human CD34+ bone marrow cells. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2016; 67: 151-159
- [73] Pan H.C., Cheng F.C., Chen C.J., Lai S.Z., Lee C.W., Yang D.Y., Chang M.H., Ho S.P.: Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J. Clin. Neurosci.*, 2007; 14: 1089-1098
- [74] Perkins N.M., Tracey D.J.: Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience*, 2000; 101: 745-757
- [75] Perrin F.E., Lacroix S., Aviles-Trigueros M., David S.: Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α and interleukin-1 β in Wallerian degeneration. *Brain*, 2005; 128: 854-866
- [76] Pet M.A., Ko J.H., Friedly J.L., Mourad P.D., Smith D.G.: Does targeted nerve implantation reduce neuroma pain in amputees? *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2014; 472: 2991-3001
- [77] Pineau I., Lacroix S.: Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia*, 2009; 57: 351-361
- [78] Rabinovsky E.D., Smith G.M., Browder D.P., Shine H.D., McManaman J.L.: Peripheral nerve injury down-regulates CNTF expression in adult rat sciatic nerves. *J. Neurosci. Res.*, 1992; 31: 188-192
- [79] Reiber G.E., McFarland L.V., Hubbard S., Maynard C., Blough D.K., Gambel J.M., Smith D.G.: Servicemembers and veterans with major traumatic limb loss from Vietnam war and OIF/OEF conflicts: survey methods, participants, and summary findings. *J. Rehabil. Res. Dev.*, 2010; 47: 275-297
- [80] Rishal I., Fainzilber M.: Retrograde signaling in axonal regeneration. *Exp. Neurol.*, 2010; 223: 5-10
- [81] Rotshenker S.: Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J. Neuroinflammation*, 2011; 8: 109
- [82] Schreiber r.C., Shadiack A.M., Bennett T.A., Sedwick C.E., Zigmond r.E.: Changes in the macrophage population of the rat superior cervical ganglion after postganglionic nerve injury. *J. Neurobiol.*, 1995; 27: 141-153
- [83] Seddon H.J.: A classification of nerve injuries. *Br. Med. J.*, 1942; 2: 237-239
- [84] Sendtner M., Carrol P., Holtmann B., Hughes r.A., Thoenen H.: Ciliary neurotrophic factor. *J. Neurobiol.*, 1994; 25: 1436-1453
- [85] Shah B.S., Rush A.M., Liu S., Tyrrell L., Black J.A., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G.: Contactin associates with sodium channel Nav1.3 in native tissues and increases channel density at the cell surface. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 7387-7399
- [86] Shamash S., Reichert F., Rotshenker S.: The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J. Neurosci.*, 2002; 22: 3052-3060
- [87] Siegel S.G., Patton B., English A.W.: Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Exp. Neurol.*, 2000; 166: 205-212
- [88] Siemionow M., Duggan W., Brzezicki G., Klimczak A., Grykien C., Gatherwright J., Nair D.: Peripheral nerve defect repair with epineural tubes supported with bone marrow stromal cells: a preliminary report. *Ann. Plast. Surg.*, 2011; 67: 73-84

- [89] Sinis N., Haerle M., Becker S.T., Schulte-Eversum C., Vonthein r., Rösner H., Schaller H.E.: Neuroma formation in a rat median nerve model: influence of distal stump and muscular coating. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2007; 119: 960-966
- [90] Siqueira Mietto B., Kroner A., Girolami E.I., Santos-Nogueira E., Zhang J., David S.: Role of IL-10 in resolution of inflammation and functional recovery after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.*, 2015; 35: 16431-16442
- [91] Smith G.M., Rabinovsky E.D., McManaman J.L., Shine H.D.: Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. *Exp. Neurol.*, 1993; 121: 239-247
- [92] Smith P.A.: BDNF: no gain without pain? *Neuroscience*, 2014; 283: 107-123
- [93] Sondell M., Sundler F., Kanje M.: Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 4243-4254
- [94] Souza J.M., Cheesborough J.E., Ko J.H., Cho M.S., Kuiken T.A., Dumanian G.A.: Targeted muscle reinnervation: a novel approach to postamputation neuroma pain. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2014; 472: 2984-2990
- [95] Sunderland S.: A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 1951; 74: 491-516
- [96] Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2015; 109: 14.12.1-10
- [97] Toth C.C., Willis D., Twiss J.L., Walsh S., Martinez J.A., Liu W.Q., Midha r., Zochodne D.W.: Locally synthesized calcitonin gene-related peptide has a critical role in peripheral nerve regeneration. *J. Neurophthal. Exp. Neurol.*, 2009; 68: 326-337
- [98] Tria M.A., Fusco M., Vantini G., Mariot r.: Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp. Neurol.*, 1994; 127: 178-183
- [99] Utley D.S., Lewin S.L., Cheng E.T., Verity A.N., Sierra D., Terris D.J.: Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1996; 122: 407-413
- [100] Valverde Guevara Y.M., Yoshikawa H., Saito I., Maeda T., Seo K.: Effect of local application of an antibody against brain-derived neurotrophic factor on neuroma formation after transection of the inferior alveolar nerve in the rat. *Neuroreport*, 2014; 25: 1069-1074
- [101] Waller A.: Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. r. Soc. London*, 1850; 140: 423-429
- [102] Wallquist W., Patarroyo M., Thams S., Carlstedt T., Stark B., Cullheim S., Hammarberg H.: Laminin chains in rat and human peripheral nerve: distribution and regulation during development and after axonal injury. *J. Comp. Neurol.*, 2002; 454: 284-293
- [103] Wen Z., Zheng J.Q.: Directional guidance of nerve growth cones. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2006; 16: 52-58
- [104] Wilhelm J.C., Xu M., Cucoranu D., Chmielewski S., Holmes T., Lau K.S., Bassell G.J., English A.W.: Cooperative roles of BDNF expression in neurons and Schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. *J. Neurosci.*, 2012; 32: 5002-5009
- [105] Wood M.D., Gordon T., Kim H., Szykaruk M., Phua P., Lafontaine C., Kemp S.W., Shoichet M.S., Borschel G.H.: Fibrin gels containing GDNF microspheres increase axonal regeneration after delayed peripheral nerve repair. *Regen. Med.*, 2013; 8: 27-37
- [106] Woolf C.J., American College of Physicians, American Physiological Society: Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.*, 2004; 140: 441-451
- [107] Woolf C.J., Salter M.W.: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 2000; 288: 1765-1769
- [108] Xu P., Rosen K.M., Hedstrom K., Rey O., Guha S., Hart C., Corfas G.: Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia*, 2013; 61: 1029-1040
- [109] Yan H., Zhang F., Wang C., Xia Z., Mo X., Fan C.: The role of an aligned nanofiber conduit in the management of painful neuromas in rat sciatic nerves. *Ann. Plast. Surg.*, 2015; 74: 454-461
- [110] Yao C., Zhou X., Zhao B., Sun C., Poonit K., Yan H.: Treatments of traumatic neuropathic pain: a systematic review. *Oncotarget*, 2017; 8: 57670-57679
- [111] Yousif L.F., Di Russo J., Sorokin L.: Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh. Migr.*, 2013; 7: 101-110
- [112] Yüksel F., Kişlaoğlu E., Durak N., Uçar C., Karacaoğlu E.: Prevention of painful neuromas by epineural ligatures, flaps and grafts. *Br. J. Plast. Surg.*, 1997; 50: 182-185
- [113] Ziegler-Graham K., MacKenzie E.J., Ephraim P.L., Trivison T.G., Brookmeyer r.: Estimating the prevalence of limb loss in the United States: 2005 to 2050. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 2008; 89: 422-429
- [114] Zigmond r.E.: LIF, NGF, and the cell body response to axotomy. *Neuroscientist*, 1997; 3: 176-185
- [115] Zochodne D.W., Allison J.A., Ho W., Ho L.T., Hargreaves K., Sharkey K.A.: Evidence for CGRP accumulation and activity in experimental neuromas. *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: H584-H590

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.