

Perifere zenuwreconstructie met autologe venen, collagene- en siliconenrubbertubuli

Een experimenteel onderzoek bij konijnen

Promotie van G.C.M. Heyke

Samenvatting

Op 26 maart 2002 promoveerde Mw. Drs. G.C.M. Heyke aan de Universiteit van Amsterdam op haar promotieonderzoek getiteld 'Peripheral nerve reconstruction with autologous vein, collagen and silicon rubber tubes. An experimental study in rabbits' onder begeleiding van de promotor Prof. Dr. T.M. van Gulik en copromotor Prof. Dr. P.J. Klopper. Hieronder worden de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven.

(Tijdschr Neurol Neurochir 2003;104(3):194-196)

Inleiding

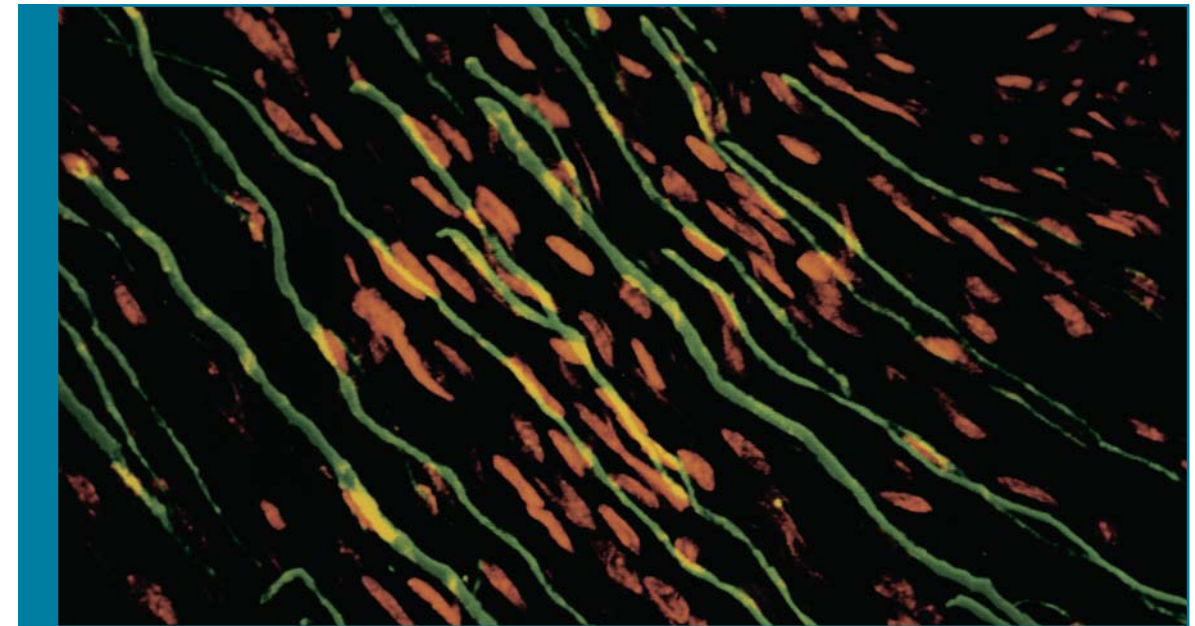
Een van de belangrijkste problemen bij het chirurgisch behandelen van zenuwletsels met een defect is hoe het hiaat te overbruggen. De meest gebruikelijke methode voor het overbruggen van het defect is met behulp van een autologe huidzenuw, met als groot nadeel dat elders verlies van functie ontstaat of een traumatisch neuroma optreedt. Door vele onderzoekers werden de mogelijkheden bestudeerd om het defect te overbruggen door middel van buisjes, vervaardigd uit diverse materialen zoals onder andere siliconenrubber (polydimethyl siloxane). Siliconenrubbertubuli hebben een klinische toepassing bij zenuwreconstructies. Een nadeel van de behandelingsmethode is, dat het materiaal vaak verwijderd moet worden als gevolg van mechanische beschadiging aan weefsels. Een meer recente ontwikkeling is de toepassing van biologisch afbreekbare tubuli. Bij veel experimenteel onderzoek naar de toepasbaarheid van dit type tubuli werden tijdrovende en niet-gestandaardiseerde morfometrische methoden toegepast. De gunstige resultaten, die waren behaald bij de bescherming van darmnaden en de reconstructie van pezen, met een nieuw ontwikkeld, biologisch afbreekbaar materiaal, het 'processed porcine collagen' (PPC), vormden de aanleiding tot de experimentele toepassing van dit materiaal bij de tubulatie van perifere zenuwletsels, met en zonder defect, in het onderhavige onderzoek. De

resultaten ervan werden vergeleken met de resultaten van experimenten met autologe venen en siliconen-tubuli en de, indien toepasbaar 'end to end' zenuwnaad.

Methoden

Om de resultaten van de diverse experimenten snel en betrouwbaar te kunnen analyseren werd een nieuwe morfometrische analysemethode ontwikkeld. Om de bruikbaarheid van deze methode te testen werden 12 volwassen vrouwelijke konijnen gebruikt. Bij 9 dieren werd de nervus saphenus doorsneden en epineuraal gehecht. De nervi sapheni van 3 konijnen werden gebruikt als controlezenuwen. Respectievelijk 3, 6 en 12 maanden na de operatie werden de zenuwen uitgenomen en gefixeerd in Kryofix en ingebed in Histowax. Van het ingebedde materiaal werden 6 µm coupes gesneden. De coupes werden immunohistochemisch gekleurd met NF90 gelabeld met fluoresceïne isothiocyanaat (FITC), met 'Sirius Red' als tegenkleuring. De kwantificering van de zenuwvezels gebeurde aan de hand van transversale coupes, waarbij gebruik werd gemaakt van een confocale laserscanningmicroscop (CLSM). De digitale gegevens werden geanalyseerd door gebruikmaking van een Optimas softwareprogramma (5.2). De berekeningen werden uitgevoerd door toepassing van het Excel-programma. De belangrijkste gegevens, die gebruikt werden voor de morfometrische analyse waren het totale aantal axonen per zenuw, de gemiddelde diameter van de axonen en het percentage totale axonoppervlak versus het totale fasciculusoppervlak. Alle berekeningen werden statistisch geëvalueerd. De nieuwe methode voor morfologische analyse bleek bijzonder geschikt om de resultaten van de verschillende experimenten met zenuwreconstructies, waarbij 3 typen tubuli, te weten autologe venen, PPC- en siliconenrubbertubuli, werden getest, snel en betrouwbaar te kunnen vergelijken.

Bij het onderzoek naar de toepasbaarheid van een autologe vene bij experimentele zenuwreconstructie werd bij 20 konijnen de nervus saphenus doorsneden en weer gehecht. Bij 10 konijnen werd een veneuze tubulus rond de gehechte zenuwnaad aangebracht



Figuur 1. Longitudinale doorsnede van een zenuw gereconstrueerd met een PPC-hulsje na 6 maanden. Zichtbaar zijn de uitgroeiende axonen, zoals ze tussen de fibroblasten en de Schwann-cellen liggen. Slechts de kernen van beide celtypen zijn gekleurd. Kleuring met NF90 gelabeld met fluoresceïne isothiocyanaat (FITC). Beeldvorming door middel van confocale laserscanningmicroscopie (CLSM), vergroting 400x.

(serie 1), bij 10 andere konijnen werd een veneuze tubulus gehecht over een hiaat van 3 mm tussen de stompen van de zenuw (serie 2) en 10 contralaterale nervi sapheni werden gereconstrueerd door middel van conventionele 'end-to-end' hechtingen (serie 3). Bij alle operaties werd epineuraal gehecht. Het herstel na 3 maanden werd bestudeerd aan de hand van morfometrische analyse van coupes.

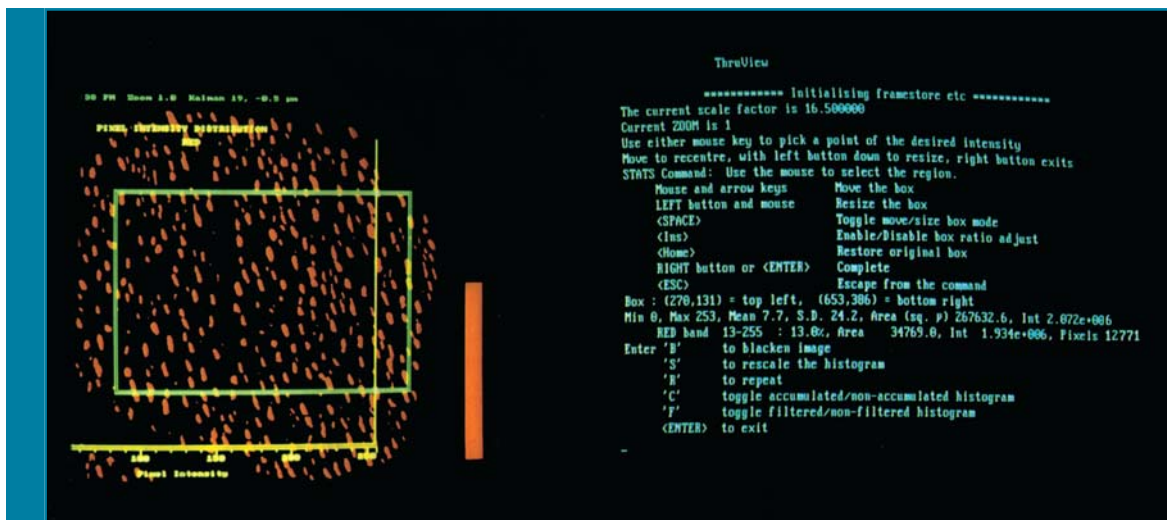
Bij de experimenten met PPC werden de nervi sapheni van 27 konijnen gereconstrueerd. In serie 1 (n=12) en serie 2 (n=12) werden PPC-tubuli over een 'end-to-end' zenuwhechting, respectievelijk zonder en met een hiaat van 10 mm getrokken. Bij serie 3 werden de contralaterale nervi sapheni van de dieren uit serie 1 doorsneden en de stompen conventioneel gehecht (serie 3, n=12). In alle gevallen werd epineuraal gehecht. Drie andere contralaterale nervi sapheni werden gebruikt als controlemateriaal. Het herstel werd bestudeerd na 3, 6 en 12 maanden aan de hand van coupes zoals eerder beschreven.

Bij de experimenten met siliconenrubbertubuli, werden nervi sapheni van 27 konijnen gereconstrueerd. Bij serie 1 (n=12) en serie 2 (n=12) werd respectievelijk een tubulus van siliconenrubber over een 'end-to-end' zenuwnaad, met of zonder 10 mm hiaat, getrokken. Bij serie 3 (n=12) werden de contralaterale nervi sapheni van de dieren uit serie 1 conventioneel gehecht. In alle gevallen waren

de hechtingen epineuraal. Drie andere collaterale nervi sapheni dienden als controlemateriaal. Het herstel werd bestudeerd na 3, 6 en 12 maanden aan de hand van coupes, die werden bewerkt en geanalyseerd volgens de beschreven methoden.

Resultaten

De resultaten van de experimenten met autologe venen toonden aan dat, in tegenstelling tot de conventionele 'end-to-end' hechting, het bedekken van een zenuwnaad met een veneuze tubulus het herstel van de zenuw niet bevorderde, maar leidde tot de vorming van veel bindweefsel en de regeneratie van axonen juist afremde. Bij de experimenten waarbij de mate van herstel van zenuwreconstructies met behulp van PPC-tubuli werd vergeleken met zenuwreconstructies, die epineuraal waren gehecht volgens de conventionele 'end-to-end' methode, toonden de resultaten aan dat gedurende de periode van herstel in de distale zenuwstomp het gemiddelde aantal axonen bij de PPC-experimenten met een hiaat significant hoger was, dan bij de PPC-experimenten zonder hiaat. Na 12 maanden was het gemiddelde aantal axonen bij alle experimenten significant lager dan dit gemiddelde bij de niet-geopereerde zenuw. De gemiddelde axondiameter bij alle experimenten was in de distale zenuwstomp niet-significant verschillend ten opzichte van de niet-geopereerde zenuw. In de distale zenuwstomp



Figuur 2. *Transversale doorsnede van een gereconstrueerde zenuw, 10 mm distaal van de distale zenuwstomp. De afbeelding toont de registratie en analyse van de gekleurde axonen door middel van een Optimas softwareprogramma. Kleuring met NF90 gelabeld met fluoresceïne isothiocyanaat (FITC). Beeldvorming door middel van de confocale laserscanningmicroscopie (CLSM).*

was bij PPC-experimenten met een 10 mm hiaat de ratio totaal axonoppervlak versus totaal fasciculusoppervlak significant hoger dan deze ratio bij de experimenten met PPC zonder hiaat. Na 12 maanden bleek het percentage uitgroeïende axonen bij de PPC-experimenten zonder hiaat niet significant te verschillen ten opzichte van dit percentage bij de experimenten met conventionele hechtingen (100%). Het percentage uitgroeïende axonen bij de experimenten met PPC en een hiaat was significant hoger dan bij de andere experimenten en de niet-geopereerde zenuw. De resultaten van de experimenten met siliconenrubber toonden aan dat 12 maanden na de operaties het aantal ingroeïende axonen significant lager was dan bij de experimenten, waarbij de zenuw conventioneel was gehecht. De gemiddelde diameters van de axonen in het distale einde van de zenuw bij de experimenten met een siliconenrubbertubulus verschilden echter niet-significant van de experimenten met conventionele hechting. De ratio van het totale oppervlak van de axonen versus het totale oppervlak van de fasciculus bleek in de distale zenuwstompen bij experimenten met siliconenrubber significant kleiner te zijn dan deze ratio bij de experimenten, waarin conventioneel hechten was toegepast. Het percentage uitgroeïende axonen vanuit de proximale tot in de distale zenuwstomp bedroeg 57% in de experimenten met siliconenrubber zonder hiaat in de zenuw. Dit is significant hoger dan bij de experimenten met siliconenrubber en een hiaat in de zenuw van 10 mm. Het percentage uitgroeïende axonen was echter bij de experimenten,

waarin conventioneel werd gehecht, veel hoger (99%) dan bij de beide experimenten met siliconenrubber. Het toepassen van tubuli van siliconenrubber bleek de axonregeneratie niet te verbeteren.

Conclusie en aanbevelingen

Aan de hand van de resultaten kon worden vastgesteld dat PPC een waardevol materiaal is om het, in combinatie met neurotrofe stoffen, nader te onderzoeken voor klinische toepassing bij zenuwreconstructies. Het gebruik van siliconenrubbertubuli bij zenuwreconstructies moet op basis van de resultaten van dit onderzoek worden afgeraden.

Correspondentie-adres auteur:

Mw. Dr. G.C.M. Heyke, verzekerings-geneeskundige

Vijfpoetveld 31
1105 AZ Koog aan de Zaan
Tel: 075-6313192
Fax: 075-6148100
E-mail: g.heyke@planet.nl

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.