

lek. Adriana M. Paskal

**Zastosowanie glikolu polietylenowego w leczeniu
uszkodzeń nerwów obwodowych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauk medycznych**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Paweł Krzysztof Włodarski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Piotr Pietruski

Centrum Badań Przedklinicznych, Zakład Metodologii Badań Naukowych

Wydział Lekarski



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

Paweł Włodarski

Adriana M. Paskal

Streszczenie w języku polskim

Uszkodzenia nerwów obwodowych stanowią poważny problem kliniczny dla pacjentów, lekarzy i fizjoterapeutów. Utrata funkcji motoryczno-sensorycznych znacząco pogarsza jakość życia. Niezależnie od przyczyny uszkodzenia, jeśli dojdzie do przzerwania ciągłości aksonów komórek nerwowych, rozpoczyna się proces degeneracji z następującą regeneracją, której szybkość i dokładność warunkuje odległe wyniki leczenia. Szybka diagnostyka i leczenie nie gwarantują pełnego powrotu funkcji nerwu, pozostawiając często trwałe deficyty neurologiczne.

Glikol polietylenowy (PEG, Polyethylene glycol) należy do grupy fuzogenów – substancji o właściwościach mediujących fuzję błon komórkowych. Przerwana w wyniku urazu aksolema (błona komórkowa otaczająca akson) ulega samoistnemu zasklepieniu, a zlokalizowane dystalnie fragmenty komórek degenerują. Potencjalne zastosowanie PEG w leczeniu uszkodzeń nerwów obwodowych polega na umożliwieniu fuzji aksolemy rozdzielonych urazem części aksonów i w konsekwencji - uniknięciu degeneracji Wallera.

Terapia PEG jako uzupełnienie leczenia chirurgicznego uszkodzeń nerwów obwodowych kwestionuje dogmat, nieuchronności degeneracji Wallera. Dotychczas nie porównano efektywności terapii PEG z inną interwencją o udowodnionym działaniu proneuroregeneracyjnym. Brak tych danych nie pozwalał na jednoznaczne zaszeregowanie PEG spośród interwencji lub substancji o takim działaniu jak, np. FK-506 (takrolimus) wykorzystywany w licznych modelach badawczych.

Celem rozprawy jest ocena zastosowania glikolu polietylenowego w leczeniu uszkodzeń nerwów obwodowych. Cel pracy zrealizowano poprzez cykl publikacji:

- Przegląd systematyczny opublikowanych badań z wykorzystaniem glikolu polietylenowego w leczeniu uszkodzeń nerwów obwodowych *in vivo*.
- Porównanie terapii glikolem polietylenowym z lub bez FK-506 na neuroregenerację w modelu szczurzym przecięcia i pierwotnego zespolenia nerwu kulszowego.

Pierwszą pracę z cyklu stanowi przegląd systematyczny - „*Polyethylene Glycol: The Future of Posttraumatic Nerve Repair? Systemic Review*”. Zawarto w nim systematyczną analizę artykułów opisujących badania *in vivo* z zastosowaniem glikolu polietylenowego w leczeniu uszkodzeń nerwów obwodowych. W oparciu o wytyczne PRISMA przeszukano bazy danych PubMed i ScienceDirect. Wyszukano źródła pierwotne zawierające słowa kluczowe:

“Polyethylene glycol” OR “PEG” AND “nerve” AND “injury”. Kryteria włączenia spełniały badania *in vivo* opisujące wykorzystanie PEG w leczeniu uszkodzeń nerwów obwodowych. Finalnie do analizy włączono 16 badań na modelach zwierzęcych oraz 1 badanie kliniczne. Badania porównano pod kątem zmiennych takich jak: rodzaj uszkodzenia nerwu (*crush/cut injury*), metody ewaluacji wyników (badania elektrofizjologiczne, behawioralne, analiza histologiczna) oraz efektywność terapii PEG wobec grupy kontrolnej.

W większości doświadczeń wykorzystano szczurzy model uszkodzenia nerwu kulszowego. Stosowane protokoły śródoperacyjnej podaży PEG różniły się składem roztworów i czasem przepłukiwań. W 14 doświadczeniach przeprowadzono badania elektrofizjologiczne w celu potwierdzenia skuteczności fuzji PEG. Badania behawioralne funkcji motorycznej nerwu stanowią najbardziej istotną klinicznie ocenę neuroregeneracji. W większości analizowanych badań, w których przeprowadzono testy motoryczne, zwierzęta w grupach leczonych PEG miały korzystniejsze wyniki niż grupy kontrolne w obserwacji krótkoterminowej. W grupach badanych poddanych terapii PEG, liczba oraz średnice aksonów w części nerwu dystalnej od miejsca uszkodzenia były istotnie większe niż w grupach kontrolnych. Próby modyfikacji protokołu PEG dodatkiem substancji o potencjale proneuroregeneracyjnym okazały się nieskuteczne, za wyjątkiem dodania roztworu błękitu metylenowego. Wyniki badań na modelach zwierzęcych są obiecujące. Niemniej, niektóre kwestie (maksymalny czas opóźnienia we wdrożeniu skutecznej terapii PEG, specyficzność fuzji PEG) wymagają dalszych badań przed implementacją protokołu PEG do praktyki klinicznej.

Druga praca w cyklu stanowiącym rozprawę doktorską, jest zatytułowana: „*Neuroregenerative effects of polyethylene glycol and FK-506 in a rat model for sciatic nerve injury*”, przedstawia wyniki badania eksperymentalnego. Celem doświadczenia było określenie wpływu terapii glikolem polietylenowym i FK-506 na neuroregenerację w modelu szczurzym przecięcia i pierwotnego zespolenia nerwu kulszowego.

W badaniu wykorzystano 28 szczurów szczepu Sprague - Dawley podzielonych na 4 grupy (A – gr. kontrolna, B - PEG, C - FK-506, D – PEG + FK-506), u których jednostronnie przecięto i zespolono chirurgicznie nerw kulszowy z zastosowaniem różnych procedur okołoperacyjnych. W grupach B i D zespolony nerw poddano śródoperacyjnej irygacji roztworem PEG. Zwierzęta z grup C i D otrzymały dootrzewnowe iniekcje FK-506 przez 3 dni przed operacją (dzień -3, -2, -1). Grupa A – kontrolna, nie otrzymała żadnej z porównywanych substancji. Prowadzono ocenę kliniczną efektów interwencji w wielu punktach czasowych:

badania funkcji motorycznej – analiza chodu w oparciu o indeks funkcjonalny nerwu kulszowego (SFI, Sciatic Functional Index) oraz badania funkcji sensorycznej – testem reakcji na klucie skóry (Skin Prick Test). Zwierzęta uśmiercono po 12 tygodniach od operacji, fragmenty nerwów dystalnie od miejsca zespolenia pobrano celem analizy histomorfometrycznej.

Wykazano istotny efekt śródoperacyjnego podania glikolu polietylenowego w szybkim przywróceniu funkcji motorycznych po operacji. Grupy otrzymujące terapię PEG (B i D) uzyskały korzystniejsze wyniki badań funkcji motorycznych (SFI). W ostatnim pomiarze wszystkie grupy badane miały wyższy wynik Skin Prick Test niż grupa kontrolna ($p > 0.05$). Ocena histologiczna ujawniła najmniejszy udział tkanki nerwowej w preparatach z grupy A (kontrolnej). We wszystkich grupach poddanych leczeniu (B, C, D) średnia powierzchnia przekroju aksonów była większa niż w grupie kontrolnej (A), $p < 0.001$. Analiza Form factor – „współczynnika kształtu”, określającego okrągłość przekroju aksonu, wykazała, iż nerwy z grupy B (leczone wyłącznie PEG) były najbardziej okrągłe ze wszystkich badanych grup, $p < 0.001$. Efekt ten był mniej nasilony, gdy terapię PEG połączono z leczeniem FK-506 w grupie D. Grupa D (PEG + FK-506) uzyskała najkorzystniejsze parametry włókien nerwowych: średnią powierzchnię aksonu ($p < 0.001$) oraz liczbę aksonów ($p > 0.05$).

Terapia PEG + FK-506 jest skuteczniejsza w porównaniu z zastosowaniem terapii pojedynczą substancją. Wyniki tych badań wskazują, iż PEG jest obiecującą substancją o właściwościach proneuroregeneracyjnych.

Podsumowując, przedstawiony w rozprawie doktorskiej cykl artykułów stanowi oryginalną analizę zastosowania glikolu polietylenowego w leczeniu uszkodzeń nerwów obwodowych. Przedstawione wyniki przyczynią się do lepszego planowania kolejnych badań, przybliżając translację zastosowania PEG w badaniach klinicznych. Potwierdzeniem istotności wyników jest opublikowanie ich w specjalistycznych, międzynarodowych, recenzowanych czasopismach: *International Journal of Molecular Sciences* i *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* o łącznej wartości *Impact Factor* 6.4.