

**UNIWERSYTET MEDYCZNY  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU  
WYDZIAŁ LEKARSKI I**

**lek. Grzegorz Brzezicki**

**Wpływ pooperacyjnej blizny nadoponowej  
na korzenie nerwów rdzeniowych  
w odcinku lędźwiowym kręgosłupa  
- badania na modelu doświadczalnym**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor: dr hab. med. Roman Jankowski**

Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii  
Uniwersytetu Medycznego im K. Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik: prof. zw. dr hab. med. Stanisław Nowak

**Poznań 2011**

## **Podziękowania:**

*Dziękuję prof. Marii Siemionow za umożliwienie mi wykonania barwień immunohistochemicznych w Laboratorium Mikrochirurgicznym Clevelenad Clinic.*

*Podziękowania dla dr Aleksandry Klimczak za pomoc w doborze i rozwinięciu technik immunohistochemicznych dla tej pracy oraz okazaną pomoc przy barwieniu i ocenie preparatów.*

*Prof. Juliuszowi Huberowi za wykonanie i pomoc w interpretacji wyników somatosensorycznych potencjałów wywołanych.*

*Prof. Januszowi Szymasiowi za wykonanie preparatów histologicznych oraz ich opracowanie komputerowe.*

*Dr Tomaszowi Blokowi za pomoc w procedurach operacyjnych.*

*Szczególne podziękowania Promotorowi tej pracy dr hab. Romanowi Jankowskiemu bez którego ogromnego zaangażowania, pomocy i motywacji ta praca nigdy by nie powstała.*



# SPIS TREŚCI

1. Wstęp.....	4
1.1 Wprowadzenie.....	4
1.2 Patogeneza blizny łącznotkankowej .....	6
1.3 Etiopatogeneza i czynniki ryzyka rozwoju blizny nadoponowej .....	7
1.4 Potencjalny udział osteopontyny w patogenezie blizny i nawrotowego bólu.....	8
1.5 Zapobieganie pooperacyjnej bliznie nadoponowej.....	8
1.5.1 Metody barierowe.....	9
1.5.1.1 Wolne przeszczepy / transfery tkanki tłuszczowej.....	10
1.5.1.2 ADCON-L .....	11
1.5.1.3 Oxiplex/SP Gel .....	12
1.5.2 Kontrola procesu zapalnego i powstawania blizny .....	12
1.6 Metody prewencji użyte w tym badaniu doświadczalnym .....	13
1.6.1 Quercetyna.....	13
1.6.2 TachoComb .....	16
2. Założenia i cele pracy .....	19
3. Materiał i metodyka.....	20
3.1 Materiał doświadczalny .....	20
3.2 Grupy doświadczalne zwierząt i przeprowadzone eksperymenty .....	21
3.3 Procedury operacyjne.....	22
3.4 Metody badawcze .....	25
3.4.1 Ocena stanu ogólnego i funkcji nerwowej kończyn tylnych.....	25
3.4.1.1 Ocena kliniczna .....	25
3.4.1.2 Somatosensoryczne potencjały wywołane .....	26
3.4.2 Zabezpieczenie tkanek do dalszych badań.....	29
3.4.3 Tomografia komputerowa .....	29
3.4.4 Ocena histologiczna i histomorfometryczna .....	29
3.4.5 Analiza immunohistochemiczna .....	31
3.5 Metody statystyczne.....	32

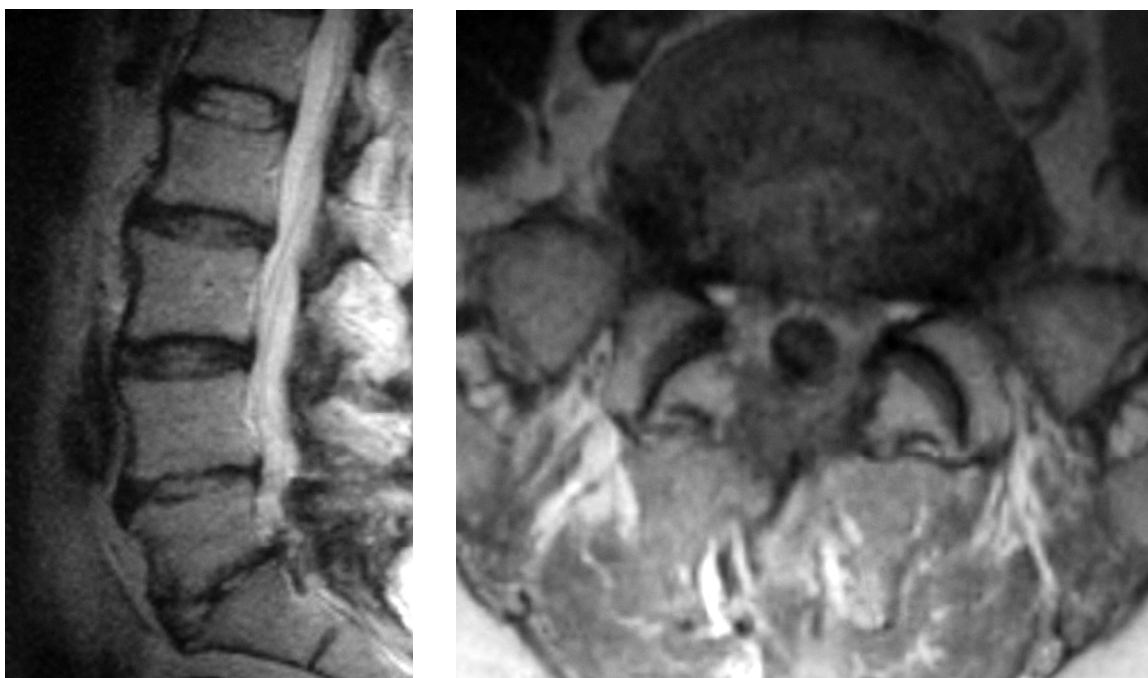
4. Wyniki .....	33
4.1 Obserwacja kliniczna .....	33
4.2 Somatosensoryczne potencjały wywołane.....	33
4.2.1 Eksperyment pierwszy .....	34
4.2.2 Eksperyment drugi .....	34
4.2.3 Eksperyment trzeci .....	36
4.3 Tomografia komputerowa.....	36
4.4 Ocena histologiczna i histomorfometryczna.....	37
4.4.1 Eksperyment pierwszy .....	37
4.4.2 Eksperyment drugi .....	38
4.4.3 Eksperyment trzeci .....	41
4.5 Ocena immunohistochemiczna .....	42
4.5.1 Eksperyment pierwszy .....	42
4.5.2 Eksperyment drugi .....	45
4.5.3 Eksperyment trzeci .....	48
5. Omówienie .....	49
6. Wnioski .....	59
7. Streszczenie .....	61
8. Streszczenie w języku angielskim .....	63
9. Piśmiennictwo .....	65
10. Spis tabel i rycin .....	78

# 1. Wstęp

## 1.1 Wprowadzenie

Dane statystyczne wykazują, że każdego roku wykonywanych jest około miliona operacji kręgosłupa lędźwiowo-krzyżowego, 185 tysięcy w Stanach Zjednoczonych, z czego trzy czwarte jest związanych z dekompresją korzeni nerwowych lub ogona końskiego (1-4). Discektomia lędźwiowa jest jedną z najczęściej wykonywanych interwencji chirurgicznych w tym odcinku kręgosłupa (5). Wielu autorów publikuje dobre lub bardzo dobre wyniki tych operacji, natomiast w randomizowanych badaniach dobre wyniki uzyskiwane są w 70 do 86% przypadków (6-9). Wczesne niepowodzenia operacyjne, pod postacią uporczywego lub nawracającego bólu, dotyczą około 20% pacjentów operowanych z powodu dyskopatii lędźwiowej lub poddanych laminiektomii z innych wskazań. Późne niepowodzenia obserwowane przez niektórych autorów sięgają 40% chorych (10). W Stanach Zjednoczonych, od 25 do 50 tysięcy pacjentów rocznie, z tego powodu, doświadcza przewlekłego bólu i niepełnosprawności z nim związanej (11). W badaniu Atlas i wsp. (12, 13) 19% pacjentów było operowanych ponownie co najmniej raz w ciągu 5 lat. Tylko 65% pacjentów odzyskuje pełną sprawność, a 61% wraca do poprzedniej pracy po operacji kręgosłupa (6). Powstawanie pooperacyjnej blizny okołooponowej jest naturalną odpowiedzią organizmu na operację. Jednakże w 3-5%, a według niektórych nawet w 60% przypadków, blizna uznawana jest za przyczynę uporczywego i nawrotowego bólu po operacjach kręgosłupa. Dolegliwości te określane są jako FBSS (failed back surgery syndrome) (1, 14-16). Obecność tkanek bliznowatych znacznie utrudnia reoperację oraz zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań, takich jak: uszkodzenia opony twardej, uszkodzenia korzenia nerwowego i krwawienia śródoperacyjnego (17-19). Pośród czynników odpowiedzialnych za niepowodzenia pooperacyjne wymienia się: nawrotową przepuklinę jądra miazdzystego krążka międzykręgowego, pooperacyjne zmiany degeneracyjne, zapalenie pajęczynówki, złą selekcję pacjentów, wybranie nieodpowiedniej techniki operacyjnej oraz tworzenie się blizny okołooponowej (ryc. 1) (10, 20).

Bezpośredni związek obecności blizny z nawrotowym bólem jest kontrowersyjny i szeroko dyskutowany. North i wsp. (21) stwierdzili, że dobre wyniki w pięcioletniej obserwacji po reoperacji z powodu FBSS korelowały z brakiem obecności blizny okołooponowej. Znacznie gorsze wyniki leczenia odnotowano u pacjentów, którzy wymagali usunięcia blizny nadoponowej podczas reoperacji. Hurme i wsp. (22) w pięcio-



A

B

**Rycina 1.** Badanie MR w czasie T2 w przekrojach strzałkowym (A) i poprzecznym (B) ukazuje rozległą bliznę nadoponową otaczającą worek oponowy u 59-letniej pacjentki w rok po laminectomii na poziomie L5.

letnim okresie obserwacji 40 pacjentów ze złym wynikiem leczenia po operacji przepukliny jądra miazdżystego w badaniach rezonansu magnetycznego (MR) stwierdzili znaczną bliznę w kanale kręgowym. Jednakże najbardziej miarodajne dowody na istnienie związku pomiędzy pooperacyjną blizną nadoponową, a nawrotem bólu pochodzą z wielośrodkowego badania przeprowadzonego w grupie 197 chorych w 1996 r. (14). Autorzy stwierdzili 3,2-krotnie zwiększone ryzyko wystąpienia nawrotu bólu u pacjentów z nasilonym bliznowaceniem w kanale kręgowym stwierdzonym na podstawie badań MR odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa po upływie 6 miesięcy od operacji przepukliny jądra miazdżystego w porównaniu do pacjentów z obecnością mniejszej objętości tkanek bliznowatych. Jednakże w badaniu obejmujących grupę 128 chorych Roonberg i wsp. (23) nie zaobserwowali związku pomiędzy nawrotowym bólem a obecnością blizny w kanale kręgowym w ciągu dwóch lat po operacji. Dodatkowo stwierdzono, że w 49% przypadków blizna, obserwowana w MR, zmniejsza się w okresie obserwacji od 6 miesięcy do dwóch lat. W obu badaniach zastosowano nieco inną metodologię oceny badań MR stąd prawdopodobnie różnice w częstości występowania nasilonego bliznowacenia: 42% przypadków w badaniu Ross'a i wsp. (14) i 6% przypadków w badaniu Ronnberg i wsp. (23). Nygaard i wsp. (24) nie zaobserwowali

wpływu obecności blizny na nawrót bólu u pacjentów w czasie roku po operacji mikrodiscektomii. Wnioski przedstawione na podstawie innych badań klinicznych (25-27) wskazują, że badanie MR ma małą wartość diagnostyczną u pacjentów z nawrotowym bólem korzeniowym po discektomii.

Podsumowując wydaje się, że sama obecność i wielkość blizny w kanale kręgowym nie ma decydującego wpływu na wynik leczenia. Natomiast prawdopodobnym istotnym elementem jest oddziaływanie tworzącej się blizny, komórek nacieku zapalnego, cytokin na elementy nerwowe kanału kręgowego. Jou i wsp. (28) dowiedli, w badaniach doświadczalnych na szczurach, negatywny efekt tworzącej się blizny okołoponowej po laminiektomii na wyniki badań somatosensorycznych potencjałów wywołanych (SSEP). Podobne wyniki obserwowane były wcześniej w warunkach klinicznych przy użyciu elektromiografii mięśni przykręgosłupowych (29-31). Jednakże, o ile znany jest wpływ przepukliny jądra miazdżystego na powstawanie bólu - wpływ uwalnianego czynnika martwicy guza (TNF-alfa, Tumor Necrosis Factor) na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych (32-35), to dokładny mechanizm powstawania bólu w przypadku powstającej blizny okołoponowej nie został poznany. Tworząca się blizna może pociągać lub unieruchamiać korzeń nerwowy w otworze międzykręgowym, powodując zaburzenia krążenia krwi i przewodzenia impulsów nerwowych w korzeniu nerwowym przyczyniając się do powstawania bólu (36, 37). Jednocześnie tkanka włóknista, otaczająca korzeń nerwowy, zwiększa jego podatność na uszkodzenia w przypadku nawrotowej przepukliny jądra miazdżystego lub stenozy kanału kręgowego (37). Wyżej opisana teoria, unieruchomienia korzenia nerwowego jest analogiczna do procesów opisywanych w patologii nerwów obwodowych – między innymi nawrotowego zespołu cieśni nadgarstka (38-40). Mniej znany jest bezpośredni wpływ cytokin związanych z zapaleniem i powstawaniem blizny na struktury nerwowe kanału kręgowego, między innymi na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych (41, 42). Obecnie nie istnieje żadna skuteczna terapia blizny okołoponowej (2). Leczenie operacyjne polegające na wycięciu blizny często daje złe wyniki i powoduje dalsze bliznowacenie (3, 21, 43-46).

## **1.2 Patogeneza blizny łącznotkankowej**

Proces gojenia rany można podzielić na trzy nakładające się etapy (47). W pierwszej fazie, trwającej od jednego do trzech dni dochodzi do migracji leukocytów w miejsce uszkodzenia tkanki. W ciągu pierwszych 24 godzin do rany migrują neutrofile jako pierwsze komórki zapalne (48). Ich pierwotną rolą jest oczyszczanie rany z martwych komórek i obcego materiału. Po dwóch do czterech dniach neutrofile są stopniowo zastępowane przez

makrofagii, które są dominującym typem komórek w ranie aż do momentu migracji i proliferacji fibroblastów. Makrofagi pełnią podobną funkcję jak neutrofile, jednakże są również głównym źródłem cytokin takich jak transformujący czynnik wzrostu (TGF-beta, Tumor Growth Factor-beta), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, Platelet-derived growth factor) i czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, Fibroblastic Growth Factor). TGF-beta działając na receptor typu I reguluje syntezę i wydzielanie składników matriks zewnątrzkomórkowego. Receptor typu II reguluje proliferację komórek, natomiast receptor typu III hamuje proliferację fibroblastów. FGF jest odpowiedzialne za indukcję angiogenezy w miejscu uszkodzenia tkanki. Inne cytokiny i czynniki wzrostu stymulują podziały i migrację komórek zapalnych (PDGF, TNF-alfa, Il-1) oraz działają prozapalnie (TNF-alfa i Il-1) (49-53). W drugim etapie gojenia się rany trwającym od 2 do 6 dni następuje intensywna produkcja matriks zewnątrzkomórkowego bogatego w kolagen III, fibronektynę i glikozaminoglikany. Pod koniec tego etapu fibroblasty stopniowo zaczynają produkcję kolagenu I zamiast kolagenu III co prowadzi do powstania ostatecznej dojrzałej blizny zbudowanej głównie z kolagenu I, kwasu hialuronowego oraz proteoglikanów w miejscu tkanki ziarnistej. Podczas ostatniej fazy dochodzi do obkurczenia rany poprzez działanie miofibroblastów (54).

### **1.3 Etiopatogeneza i czynniki ryzyka rozwoju blizny nadoponowej**

Blizna nadoponowa powstaje po operacji wtedy, kiedy tłuszcz z przestrzeni nadoponowej zostaje usunięty i zastąpiony krwiakiem, który ulega stopniowo resorpcji i wypełnieniu ziarniną ulegającą przekształceniu w zbitą tkankę włóknistą (55). Geneza blizny okołoponowej jest tematem dyskusji. Key i Ford w 1948 roku (19) zaproponowali, że pooperacyjne zmiany bliznowate wywodzą się z uszkodzonego podczas operacji pierścienia włóknistego krążka międzykręgowego. Jednakże obecnie najbardziej akceptowana jest teoria, według której pooperacyjna blizna wywodzi się raczej z tkanek umiejscowionych grzbietowo w stosunku do miejsca laminektomii (56, 57). LaRocca i McNabb w swojej klasycznej pracy (56) opisują tkankę włóknistą pokrywającą oponeń twardą penetrującą do kanału kręgowego i nazywają ją „postlaminectomy membrane”. Jednocześnie uważają, iż źródłem fibroblastów odpowiedzialnych za powstawanie blizny jest głęboka warstwa mięśni przykręgosłupowych. Poza tym tkanka łączna może wywodzić się z części włóknistej okostnej (57, 58). Czynnikiem ryzyka mogą być mikrofragmenty gazy, tamponów chirurgicznych użytych podczas operacji, wywołujące reakcję wokół ciała obcego, a w rezultacie nasilenie bliznowacenia. Hoyland i wsp. (59) znaleźli fragmenty włókien organicznych w tkance bliznowatej u 62% pacjentów

operowanych z powodu nawrotowego bólu korzeniowego. Dyskutowany jest także związek ogólnoustrojowego defektu fibrynolizy u pacjentów z niepowodzeniami po operacjach kręgosłupa (60-62). Bezer i wsp. (63) udowodnili, w swoim modelu doświadczalnym niestabilności kręgosłupa istnienie związku pomiędzy zaburzeniami krążenia krwi w przestrzeni nadoponowej obserwowanymi jako poszerzenie naczyń żylnych i nasilenie powstawania blizny współistniejącej z przewlekłą niestabilnością kręgosłupa. Wnioskują, że w świetle tego badania, zastosowanie stabilizacji kręgosłupa u pacjentów reoperowanych z powodu nawracającego bólu może polepszyć osiągnięte wyniki i zapobiec tworzeniu się nowej blizny (63).

#### **1.4 Potencjalny udział osteopontyny w patogenezie blizny i nawrotowego bólu**

Osteopontyna (OPN, Osteopontin) jest cytokiną o charakterze proteiny adhezyjnej, zaangażowaną w szerokie spektrum procesów fizjologicznych i patologicznych związanych z zapaleniem, odpowiedzią immunologiczną, nowotworzeniem, gojeniem się ran i włóknieniem (64-67). Zwiększoną ekspresję OPN stwierdzono w komórkach ziarniny zapalnej a także udowodniono jej udział w patologii włóknienia narządów między innymi płuc, wątroby oraz nerek (68-71). Jednocześnie zaobserwowano fizjologiczną ekspresję OPN przez komórki nerwowe ośrodkowego układu nerwowego oraz komórki zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych (72-75). Zwiększona ekspresja OPN odgrywa decydującą rolę w odpowiedzi komórkowej podczas niedokrwienia lub toksycznego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (76-78). Udowodniono, że OPN promuje przeżycie komórek nerwowych oraz zachowanie żywotności istoty białej po udarze niedokrwiennym mózgu (79) i urazie rdzenia kręgowego (80) oraz potęguje remielinizację po uszkodzeniu nerwów obwodowych (81). Rola OPN zarówno w procesach związanych ze stanem zapalnym, gojeniem ran, w włóknieniu oraz w procesach patologicznych dotyczących ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego może stanowić o unikalnym znaczeniu tej cytokiny w patogenezie pooperacyjnej blizny nadoponowej i nawrotowego bólu (41).

#### **1.5 Zapobieganie pooperacyjnej bliznie nadoponowej**

Mimo nie do końca wyjaśnionego udziału pooperacyjnej blizny w kanale kręgowym na nawrót bólu korzeniowego, istnieje pogląd, iż zapobieganie nasilonemu bliznowaceniowi w przestrzeni nadoponowej ma decydujący wpływ na poziom trudności (nasilone krwawienie, długi czas operacji) oraz ilość powikłań w przypadku reoperacji.

Uważa się, że podstawą zapobiegania bliznowacenia w kanale kręgowym powinna być właściwa technika chirurgiczna ograniczająca do minimum uszkodzenia tkanek oraz dokładna hemostaza (82). Następnie brane są pod uwagę dwie kategorie działań prewencyjnych, wyróżnionych ze względu na mechanizm działania:

1. Wytworzenie bariery pomiędzy odsłoniętym workiem oponowym i korzeniami nerwowymi, a mięśniami przykręgosłupowymi realizowane poprzez zastosowanie błon i żeli pochodzenia naturalnego lub sztucznego;
2. Bezpośredni wpływ na tworzącą się bliznę - hamowanie stanu zapalnego oraz włóknienia z zastosowaniem środków farmakologicznych (podawanych miejscowo i ogólnie) lub użycia miejscowej radioterapii (tab. I).

Większość środków z obu grup znalazła zastosowanie jedynie w badaniach eksperymentalnych z różnym skutkiem, zaledwie kilka jest stosowanych w praktyce klinicznej.

**Tabela I.** Przegląd metod prewencji powstawania blizny nadoponowej. Jedynie niektóre metody barierowe były testowane klinicznie (oznaczone \*) z czego Adcon-L przeszedł najbardziej szczegółowe badania. Kontrola procesu powstawania blizny może być miejscowa (m), realizowana poprzez podanie miejscowe farmaceutyku lub poprzez teleradioterapię, lub stosowana ogólnie (o)

<b>Metody barierowe (transfery tkanek, membrany, żele, pianki)</b>	<b>Kontrola procesu powstawania blizny (środki farmakologiczne, teleradioterapia)</b>
transfery tkanki tłuszczowej *	NLPZ (ketoprofen, indometacyna) (o)
powięź karkowa	sterydy (metylprednizolon) (o)
transfery / przeszczepy kości	5 - fluorouracyl (m)
błona owodniowa	mitomycyna C (m)
kwas hialuronidowy	cyklosporyna A (m)
pianka żelatynowa*	pimekrolimus (m)
siatka wikrylowa	aprotynina (m)
Silastic	interferon gamma (m)
Dacron	przeciwciała anty ICAM-1 i anty CD18 (m)
Seprafilin	bioflawonoidy (kurkumina, quercetyna) (o)
Oxiplex/SP Gel *	teleradioterapia (700 - 900 cGy) (m)
GoreTex (Preclude*, PEO/PBT)	
Adcon-L *	
DuraGen	
TachoComb	

### 1.5.1 Metody barierowe

Zaletami metody barierowej jest jednorazowa aplikacja, potencjalnie brak ogólnoustrojowych efektów oraz brak efektów niepożądanych typowych dla leków np.: niesterydowych leków przeciwzapalnych, sterydów, które były brane pod uwagę jako potencjalne terapie zapobiegające bliznie. Błony pochodzenia biologicznego pobierane



bezpośrednio od operowanego pacjenta: tkanka tłuszczowa, powięź, przedłużają czas operacji oraz wiążą się z powikłaniami związanymi z samym pobraniem. Zastosowanie materiału pochodzenia odzwierzęcego niesie za sobą ryzyko transmisji białek prionowych. W przypadku preparatów barierowych pochodzenia sztucznego ważnym zagadnieniem pozostaje kwestia biokompatybilności i zmieniających się właściwości materiału wraz z biegiem czasu (degradacja, włóknienie). Pomimo znacznej ilości preparatów testowanych na przestrzeni lat zaledwie kilka zostało zastosowanych w praktyce klinicznej. Przegląd preparatów stosowanych w badaniach doświadczalnych, zostanie przeprowadzony w dyskusji w odniesieniu do wyników uzyskanych w naszym badaniu.

### **1.5.1.1 Wolne przeszczepy/transfery tkanki tłuszczowej**

Obecnie jedynie szeroko stosowaną metodą w praktyce klinicznej jest użycie wolnego przeszczepu tłuszczu pobranego z tkanki podskórnej pacjenta do pokrycia odsłoniętej opony twardej (83). Jej główną zaletą jest łatwość zastosowania, dostępność, biokompatybilność oraz długa żywotność w kanale kręgowym (8, 84-88). Badania przeprowadzone wcześniej opisują wyższość tej metody nad innymi metodami barierowymi szczególnie w długiej obserwacji (84-86, 88-91). Nowsze badania kliniczne i doświadczalne wątpią w skuteczność takiego postępowania (92-96). Mimo że wolne transfery tkanki tłuszczowej są zwyczajowo najpopularniejszą metodą zapobiegania powstawania blizny od około 40 lat (8), ich użycie wiąże się z problemami takimi jak: stan zapalny (97) i aseptyczną martwicą przeniesionej tkanki (98).

Niedostateczne pokrycie worka oponowego szczególnie po rozległych laminektomiach oraz migracji wszczepionej tkanki mogącej powodować zespół ogona końskiego lub ucisk na pojedyncze korzenie nerwowe (92, 99-101). Wydaje się, że szczególne znaczenie przy zastosowaniu tej metody ma grubość oraz jakość wszczepianej tkanki tłuszczowej. Dotychczas nie określono wytycznych dotyczących odpowiedniej wielkości przeszczepu. Natomiast wiadomo, że objętość przeniesionego tłuszczu zmaleje do około 30-50% pierwotnej wielkości z powodu procesów degeneracyjnych i włóknienia. Na tej podstawie niektórzy autorzy sugerują grubość 5 mm i cieńszą jako odpowiednią (97, 99, 101, 102). Jednakże da Costa i wsp (103), zanotowali obecność zrostów z oponą i pogrubienia opony twardej u 50% psów po zastosowaniu wolnych transferów tkanki tłuszczowej o takiej grubości. Inni zalecają użycie fragmentów tkanki tłuszczowej o grubości od 1 do 1,5 cm, która zapewni odpowiednie pokrycie opony i zapobiegnie bliznowaceniowi nawet mimo malejącej z czasem objętości. Wielkość przeszczepu

tłuszczowego zależy także od wielkości laminektomii. Pobrana tkanka tłuszczowa, mniejsza niż ubytek kostny, nie będzie spełniała swojej roli. Jednocześnie zastosowanie dużej objętości tłuszczu zwiększa ryzyko ucisku na worek oponowy poprzez nacisk mięśni przykręgosłupowych lub wytworzenie się krwiaka pod przeszczepem (99). Problemem może być niewystarczająca ilość podskórnej tkanki tłuszczowej u szczególnie szczupłych pacjentów z rozległymi wielopoziomowymi laminektomiami (83).

#### **1.5.1.2 ADCON-L**

ADCON-L (Gliatech Inc., Cleveland, Ohio, Stany Zjednoczone) jest wchłanianym żelem składającym się z polimerów węglowodanowych stosowanym jako bariera oddzielająca oponę twardą od blizny nadoponowej. Polimer ten, skutecznie hamuje migrację fibroblastów podczas gojenia się rany a następnie ulega całkowitej biodegradacji w ciągu 4 tygodni od aplikacji (104). Przewagą preparatu w postaci żelu nad membraną/błoną jest dokładne dopasowanie materiału do ubytku kostnego co zapobiega przenikaniu fibroblastów do przestrzeni nadoponowej (91, 105, 106). Po serii badań doświadczalnych i przedklinicznych preparat został dopuszczony do sprzedaży zarówno w Europie jak i w Stanach Zjednoczonych (14, 107-110). W wielośrodkowym badaniu na 298 pacjentach poddanych discektomii, pacjenci którzy otrzymali ADCON-L mieli mniej tkanki bliznowatej w przestrzeni nadoponowej w badaniu rezonansu magnetycznego po 6 miesiącach oraz statystycznie mniejsze dolegliwości bólowe, niż pacjenci którzy nie mieli zastosowanej prewencji blizny (110). Jednakże w kolejnych badaniach, z okresem obserwacji wydłużonym do dwóch lat, nie zaobserwowano żadnego pozytywnego wpływu zastosowania tego preparatu (23, 111, 112). Inni autorzy stwierdzili wzrost częstości powikłań związanych z wyciekami płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów po zastosowaniu ADCON'u - L, co podważyło wiarę w bezpieczeństwo preparatu (113, 114), mimo, że w badaniu doświadczalnym dowiedziono, iż ADCON-L nie upośledza w znaczący sposób procesu gojenia się opony twardej po uszkodzeniu (115). Dodatkowo w 3,3% przypadków stwierdzono ogólnoustrojową reakcję na preparat - tachykardię, spadki ciśnienia tętniczego krwi, co tłumaczono absorpcją preparatu z miejsca podania powodującą depresyjne oddziaływanie na mięsień sercowy i poszerzenie naczyń krwionośnych. Produkt został wycofany z rynku amerykańskiego, jednakże jest ciągle dostępny na terenie Unii Europejskiej.

### **1.5.1.3 Oxiplex/SP Gel**

Oxiplex/SP Gel (FzioMed, Inc., San Luis Obispo, CA, Stany Zjednoczone) jest preparatem o charakterze żelu zawierającym tlenek polietylenu i pochodną karboksymetylocelulozy, który wcześniej był testowany w chirurgii jamy brzusznej (116). W badaniach doświadczalnych na zwierzęcym modelu laminiektomii wykazał on dobrą biokompatybilność i właściwości antyadhezyjne (117, 118). W pilotażowym badaniu klinicznym obejmującym grupę 18 pacjentów Kim i wsp. (119) zaobserwowali statystycznie lepsze wyniki kliniczne u pacjentów po discektomii z zastosowaniem Oxiplex/SP Gel w porównaniu do pacjentów bez podania żelu. Jednocześnie autorzy nie zauważyli znaczących różnic w ilości tkanki bliznowatej w kanale kręgowym. Preparat bardzo ściśle przylegał do korzeni nerwowych i wypełniał przestrzeń nadoponową. Niezbędne jest wielośrodkowe badanie kliniczne w celu ostatecznej oceny skuteczności tej metody.

### **1.5.2 Kontrola procesu zapalnego i powstawania blizny**

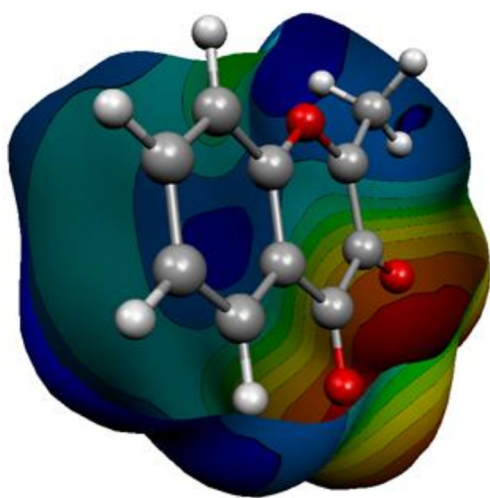
Mimo, że wiele różnych środków farmakologicznych było testowanych na przestrzeni lat w badaniach doświadczalnych, szczególnie z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (120-122) oraz steroidów (89, 121), żaden z nich nie znalazł się na etapie badań klinicznych. Zastosowanie terapii ogólnoustrojowej w zapobieganiu bliznie jest alternatywą dla metody barierowej ze względu na łatwość zastosowania, brak dodatkowych etapów operacji, brak problemu biokompatybilności i biodegradacji. Z drugiej strony efekty uboczne zastosowania tych środków: steroidy - upośledzone gojenie rany (89), zakażenia, efekty ogólnoustrojowe hamują rozwój tych metod. Alternatywą może być podanie miejscowe farmaceutyku. Na etapie doświadczalnym testowano mitomycynę-C, cyklosporynę, fluorouracyl (123), rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (124), urokinazę (125), interferon-gamma (126). W większości przypadków zaobserwowano pewne działanie prewencyjne, jednakże nieznaną profil bezpieczeństwa tych leków przy zastosowaniu miejscowym w bezpośredniej bliskości worka oponowego i korzeni nerwowych wymaga dalszych badań przed zastosowaniem klinicznym. Kontrowersyjne, ze względu na możliwe wystąpienie powikłań, koszty, skomplikowane postępowanie, wydaje się zastosowanie kliniczne teleradioterapii dla hamowania bliznowacania po laminiektomii mimo udowodnionej doświadczalnie skuteczności tej metody (127-129).

## 1.6 Metody prewencji użyte w tym badaniu doświadczalnym

W tej pracy zdecydowałem się przetestować dwie różne techniki zapobiegania powstawania przerostowej blizny nadoponowej, po jednej w każdej poprzednio opisanej kategorii: hamowanie procesu zapalnego i tworzenia się tkanki łącznej bliznowatej - terapia quercetyną (miejscowo i ogólnie), działanie barierowe oddzielające tworzącą się bliznę od odsłoniętej opony twardej - zastosowanie TachoCombu. TachoComb poza główną funkcją osłaniania worka oponowego może także zapobiegać tworzeniu się blizny na drodze hamowania powstawania krwiaka w ranie operacyjnej.

### 1.6.1 Quercetyna

Quercetyna jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych flawonoidów roślinnych w ludzkiej diecie (ryc. 2) (130-132). Najbogatszymi źródłami tego flawonoidu są cebule, jabłka oraz czerwone wino (133). Quercetyna została także zidentyfikowana jako składnik roślin o potencjalnym działaniu terapeutycznym, takich jak ginkgo biloba (132). Średnie jej spożycie oceniane jest na 4 do 68 mg na dzień (131, 134). Quercetyna posiada szerokie spektrum aktywności biologicznej, włączając działanie przeciwwirusowe i przeciwzapalne, także w reumatoidalnym zapaleniu stawów (135); hamuje proliferację komórek i agregację płytek krwi, modyfikuje syntezę eikozanoidów, chroni LDL przed utlenianiem oraz powoduje relaksację mięśni gładkich układu krążenia (136, 137).



A

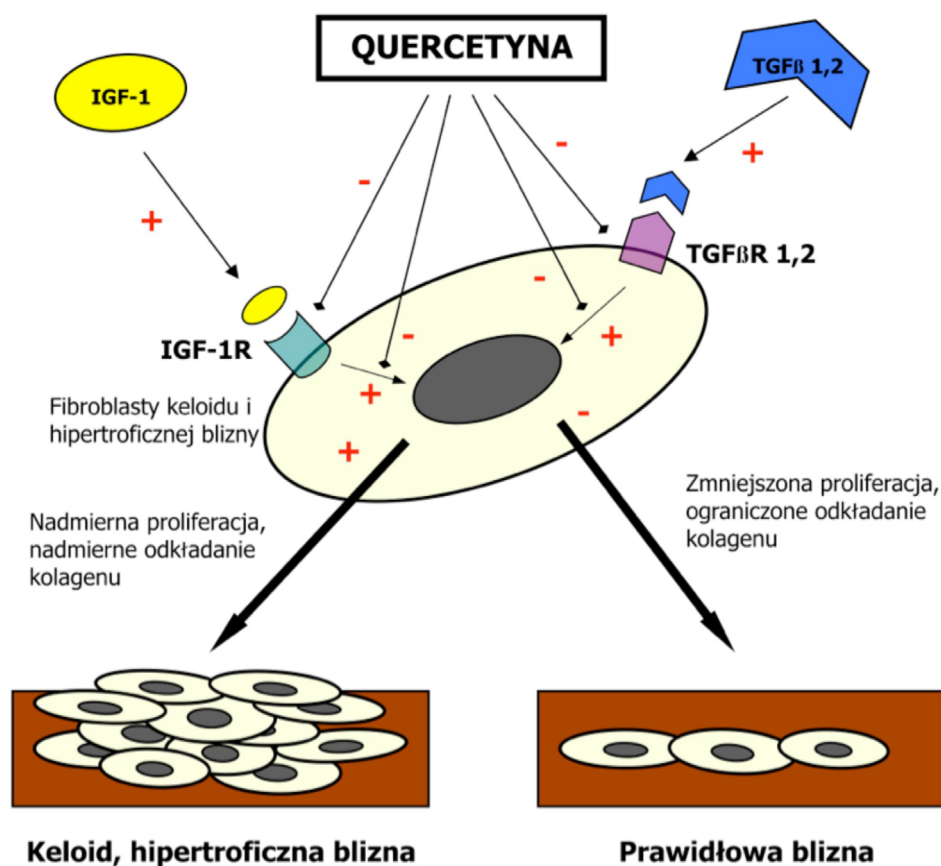


B

**Rycina 2.** Trójwymiarowy model struktury cząsteczki quercetyny (A). Makroskopowy wygląd komercyjnie dostępnej quercetyny w postaci proszku o ponad 95% czystości (B).

Quercetyna dodatkowo posiada własności cytostatyczne powodując zatrzymanie cyklu komórkowego in-vitro w hodowlach komórkowych raka sutka, jajnika, żołądka oraz ludzkiej białaczki T-komórkowej. Quercetyna również indukuje apoptozę poprzez szlak białek szoku termicznego (HSP, Heat Shock Protein) (138) oraz powoduje supresję mutanta genu p53 (132). Trwają prace nad liposomalną oraz pegylowaną quercetyną nadającą się do podania dożylnego w terapii nowotworów (139). Intensywnie badano zastosowanie quercetyny w zapobieganiu zwłóknieniu narządów, szczególnie nerek oraz wątroby. Hu i wsp. (140) dowiedli na modelu doświadczalnym hodowli fibroblastów wyizolowanych z nerek szczura, że quercetyna ma własności zapobiegające włóknieniu zależne od dawki przy jednocześnie niskiej cytotoksyczności. Podobne wyniki publikowali inni autorzy (141, 142) uzyskane w zwierzęcych modelach nefropatii toksycznej oraz zaporowej. Poza własnościami nefroprotekcijnymi quercetyna posiada także własności hepatoprotekcyjne. W modelu przewlekłego uszkodzenia wątroby zapobiega progresji marskości (143) oraz dodatkowo, wykazuje właściwości antyoksydacyjne, poprawiając funkcję narządu po toksycznym uszkodzeniu wątroby czterochlorkiem węgla (144).

Dla celów zapobiegania przerostowi blizny nadoponowej, szczególnie istotne są badania nad zastosowaniem quercetyny w leczeniu keloidów. Główną rolę w powstawaniu keloidów odgrywa nadmierna proliferacja fibroblastów w miejscu gojenia się rany oraz nadmierna produkcja kolagenu, do 20 razy większa od fizjologicznej obserwowanej w skórze (145-147). Zwiększona aktywność fibroblastów jest indukowana poprzez nadmierną produkcję TGF-beta podczas procesu gojenia się rany (74, 148-153). Quercetyna blokuje tę produkcję poprzez bezpośrednie działanie na receptory dla TGF-beta oraz na wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału z receptorów dla TGF-beta (białka z rodziny Smad) (ryc. 3) (154). Dodatkowo quercetyna hamuje produkcję kolagenu poprzez inhibicję kluczowych białek związanych z transdukcją sygnału insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1, Insulin-Like Growth Factor) (146, 147). Jednocześnie dochodzi do inhibicji produkcji składnika matriks zewnątrzkomórkowego - fibronektyny (146, 147). Cho i wsp. (155) wykazali również, że zastosowanie quercetyny powoduje wzrost ekspresji metaloproteinazy-1 (MMP-1) w hodowli ludzkich fibroblastów. MMP-1 jest kolagenazą biorącą udział w dynamicznej przebudowie tkanki łącznej, mającą istotne działanie zapobiegające bliznie przerostowej. Efektem działania quercetyny na fibroblasty wywodzące się z keloidu, jest ich zmniejszona proliferacja oraz produkcja kolagenu i matriks zewnątrzkomórkowego, w konsekwencji powstaje tkanka łączna o strukturze zbliżonej do fizjologicznej (146, 147, 154). Wiens i wsp. (54) zastosowali quercetynę w zapobieganiu bliznie okołoponowej.



**Rycina 3.** Schemat mechanizmu działania quercetyny w prewencji hipertroficznej blizny. Quercetyna działa poprzez blokowanie wpływu TGF-beta oraz IGF-1 na fibroblasty zarówno zewnątrzkomórkowo poprzez blokowanie receptorów oraz na drodze hamowania transdukcji sygnałów. Quercetyna powoduje zmniejszenie produkcji kolagenu oraz proliferacji fibroblastów.

w badaniach doświadczalnych u szczurów. Jednakże cytowana praca bardziej skupia się na aspektach technicznych oceny blizny okołoponowej - nowa metoda oceny tkanki łącznej z zastosowaniem mikrospektroskopii - natomiast brak jest pełnej oceny mikroskopowej jak i funkcjonalnej zastosowanej terapii.

Inną szeroko badaną właściwością quercetyny, przemawiającą za jej potencjalnym zastosowaniem w zapobieganiu negatywnym następstwom blizny okołoponowej, jest działanie neuroprotektoryjne. W różnych modelach in-vitro stanu zapalnego w kulturach neuronów, astrocytów i mikrogleju wykazano istotne działanie antyoksydacyjne poprzez bezpośredni wpływ na wewnątrzmitochondrialny łańcuch oddechowy oraz inhibicję produkcji wolnych rodników tlenowych w odpowiedzi na stan zapalny. Bureau i wsp. (156), potwierdzili właściwości antyapoptotyczne quercetyny w układzie nerwowym obserwując zmniejszoną ekspresję cytokin o działaniu proapoptotycznym: Il-1 oraz TNF-alfa przez

komórki mikrogleju w odpowiedzi na stan zapalny wywołany podaniem lipopolisacharydu (LPS). Quercetyna także zmniejsza ekspresję kwaśnego białka włóknikowego (GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein) i produkcję wolnych rodników tlenowych przez aktywowanie Il-1beta astrocytów (157). Działanie neuroprotekcyjne quercetyny może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych związanych ze stanem zapalnym i apoptozą, między innymi: choroby Parkinsona (156). Dodatkowo bioflawonoidy charakteryzują się szerokim oknem terapeutycznym zapewniającym bezpieczeństwo (158) oraz dobrą penetrację bariery krew-mózg (159). Powstawanie blizny okołoponowej jest nierozdzielnie związane ze stanem zapalnym podczas gojenia się rany pooperacyjnej. Quercetyna może potencjalnie działać protekcyjnie na elementy nerwowe kanału kręgowego (na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych, korzenie ogona końskiego) narażone na wpływ cytokin uwalnianych w procesie zapalnym w przestrzeni nadoponowej.

### 1.6.2 TachoComb

TachoComb (Nycomed, Zurich, Szwajcaria) jest wchłanialnym opatrunkiem hemostatycznym składającym się z pianki kolagenowej i kleju tkankowego (ryc. 4).



A



B

**Rycina 4.** Preparat TachoComb w oryginalnym opakowaniu zapewniającym sterylność (A). TachoComb jest preparatem złożonym z pianki fibrynowej pokrytej klejem fibrynowym. Powierzchnia pokryta klejem jest oznaczona kolorem żółtym w celu ułatwienia jego stosowania (B).

TachoComb zawiera fibrynogen i trombinę w postaci suchej z dodatkiem aprotyniny bydlecej (inhibitor plazminy) na powierzchni gąbki kolagenowej (koński kolagen typu I) (materiały Nycomed). Zastosowana gąbka kolagenowa posiada strukturę plastra miodu, która zapewnia odpowiednie zakotwiczenie czynników krzepnięcia, dobre przyleganie materiału oraz bardzo dobre właściwości uszczelniające. W kontakcie z płynami fizjologicznymi, np. krwią, limfą lub roztworem soli fizjologicznej, składniki powłoki rozpuszczają się i częściowo wnikają w powierzchnię rany. Następnie zachodzi reakcja między fibrynogenem i trombiną, która inicjuje ostatnią fazę fizjologicznego krzepnięcia krwi. Fibrynogen przekształcany jest w monomery fibryny, które ulegają samoistnej polimeryzacji do skrzepu fibrynowego, który powoduje ściśle przyleganie gąbki kolagenowej do powierzchni rany. Fibryna jest następnie wiązana krzyżowo przez endogenny czynnik XIII, tworząc mocną, stabilną mechanicznie sieć o dobrych własnościach adhezyjnych. Analiza histologiczna dwa tygodnie po zastosowanie preparatu wykazała tkankę ziarnistą bogatą w fibroblasty, limfocyty, neutrofile oraz komórki olbrzymie reprezentujące reakcję na ciało obce. Po kolejnych dwóch tygodniach ilość komórek zapalnych znacznie spadła, a tkanka wykazywała znacznie wyższy stopień organizacji (160, 161). W badaniach na zwierzętach TachoComb wykazuje postępujący rozkład biologiczny (162). Skrzep fibrynowy jest metabolizowany w taki sam sposób, jak fibryna endogenna, poprzez fibrylizę i fagocytozę. Gąbka kolagenowa jest rozkładana przez ziarninę resorpcyjną. Po około dwunastu tygodniach od podania, w modelu doświadczalnym naprawy ubytku opłucnej stwierdzono całkowitą resorpcję preparatu (162).

TachoComb i jego następca TachoSil (wszystkie składniki preparatu pochodzenia ludzkiego) są szeroko stosowane w praktyce klinicznej. Funkcja hemostatyczna jest szczególnie użyteczna w chirurgii narządów mięsaszowych (wątroba, nerka, śledziona), gdzie uzyskanie hemostazy przy użyciu innych metod jest trudne i czasochłonne (163-166). W operacjach z zakresu chirurgii sercowo-naczyniowej TachoComb znalazł zastosowanie przy uszczelnianiu tkanek, hamowaniu krwawień i wzmacnianiu szwów (167-170). Preparat jest także skuteczny w hamowaniu krwawienia oraz zapobieganiu przeciekom powietrza po resekcjach mięszu płuc (171-176). W neurochirurgii materiał ten jest przede wszystkim używany jako dodatkowe uszczelnienie zamknięcia opony twardej lub jako główna metoda rekonstrukcji ubytków opony twardej (177, 178). TachoComb / TachoSil znalazł również zastosowanie w hamowaniu krwawienia w chirurgii podstawy czaszki (179, 180).



W poprzednich badaniach, będących także częścią tej pracy, udowodniliśmy prewencyjny wpływ zastosowania TachoCombu po laminiektomii lędźwiowej na tworzenie się blizny okołoponowej oraz pozytywny efekt jego zastosowaniu na wyniki funkcjonalne potwierdzone w badaniach elektrofizjologicznych – somatosensorycznych potencjałów wywołanych (SSEP, Somatosensory Evoked Potentials) (181). Podobne wyniki w badaniach mikroskopowych, zmniejszenie natężenia włóknienia w przestrzeni nadoponowej uzyskali Lee i wsp (182) w badaniach doświadczalnych przeprowadzonych również na szczurach. Obecna praca poszerzy ocenę stopnia prewencji blizny o zbadanie wpływu zastosowanej terapii na elementy nerwowe kanału kręgowego, w tym neurony zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych.

## 2. Założenia i cele pracy

Powstawanie blizny nadoponowej, po operacjach kręgosłupa, w odcinku lędźwiowo-krzyżowym jest przyczyną niepowodzeń pooperacyjnych przejawiających się pod postacią nawrotowego bólu zwanego FBSS (*failed back surgery syndrome*). Patomechanizm powstawania blizny nie jest poznany, co jest inspiracją do dalszych badań i weryfikacji teorii, między innymi, wpływu blizny na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych. Jednocześnie duża ilość powikłań po reoperacjach, spowodowana obecnością blizny w kanale kręgowym, ukierunkowuje badania mające za zadanie opracowanie metod zapobiegania tworzeniu się blizny. Celami pracy są:

1. Opracowanie nowego modelu doświadczalnego powstawania pooperacyjnej blizny nadoponowej, ze szczególnym uwzględnieniem oceny funkcjonalnej oraz wpływu blizny na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych, w oparciu o istniejące modele doświadczalne.
2. Ocena powstawania blizny nadoponowej i jej wpływu na neurony ze zwojami czuciowymi korzeni nerwów rdzeniowych w ustanowionym modelu doświadczalnym z zastosowaniem badań funkcjonalnych - somatosensorycznych potencjałów wywołanych i badań strukturalnych: histomorfometrycznych, histologicznych i immunohistochemicznych z oznaczeniem ekspresji osteopontyny w bliźnie i zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych.
3. Analiza skuteczności zastosowanych terapii prewencyjnych: quercetyny – podawanej miejscowo i ogólnie, oraz TachoCombu w odniesieniu do grupy kontrolnej w oparciu o wyżej wymienione metody.

### 3. Materiał i metodyka

Eksperyment doświadczalny obejmujący procedury operacyjne, obserwację, ocenę neurologiczną zwierząt i zabezpieczenie materiału tkankowego do badań histologicznych został przeprowadzony w pracowni badań doświadczalnych na zwierzętach w Katedrze i Zakładzie Toksykologii UM w Poznaniu. Zgodę na przeprowadzenie eksperymentu wyraziła Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (uchwała nr 41/2006, z dnia 11 września 2006 r.).

W Pracowni Patomorfologii Neurochirurgicznej Katedry Patomorfologii Klinicznej UM w Poznaniu zabezpieczono uzyskany materiał badawczy w kostkach parafinowych, przygotowano preparaty histologiczne barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną (H+E). Do wizualizacji sporządzonych preparatów histologicznych użyto metody prezentacji cyfrowej preparatów histologicznych.

Badania immunohistochemiczne uzyskanych próbek przeprowadzono w laboratorium Mikrochirurgicznym Departamentu Chirurgii Plastycznej i Rekonstrukcyjnej Cleveland Clinic, Ohio, USA.

#### 3.1 Materiał doświadczalny

Zwierzęcy model powstawania blizny nadoponowej w kanale kręgowym po laminiektomii opracowano dla potrzeb badawczych. Badania zostały przeprowadzone na kręgosłupie lędźwiowym u 60 szczurów, samców, rasy Wistar (ryc. 5). Waga ciała



A



B

*Rycina 5. Samiec szczura rasy Wistar - waga 500 mg (A). Szczur po znieczuleniu, usunięciu sierści oraz odkażeniu pola operacyjnego ułożony na stoliku operacyjnym (B).*

szczura wynosiła od 450 do 500 gramów, a wiek 6 miesięcy. Przez cały okres eksperymentu zwierzęta były traktowane zgodnie z zasadami hodowli i użycia zwierząt laboratoryjnych (183). Każde zwierzę zajmowało oddzielną klatkę w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą oraz stałym dobowym cyklem oświetlenia (dzień/noc) i otrzymywało wodę i karmę *ad libitum*. Zwierzęta były poddane uśpieniu po zakończeniu okresu obserwacyjnego zgodnie z obowiązującymi zasadami i rekomendacjami (184).

### 3.2 Grupy doświadczalne zwierząt i przeprowadzone eksperymenty

Badanie obejmowało 60 szczurów podzielonych na 6 grup doświadczalnych (n=10). Wszystkie zabiegi operacyjne przeprowadzono na poziomie piątego kręgu lędźwiowego (L5). Badanie doświadczalne podzielono na 3 osobne eksperymenty:

**Eksperyment pierwszy** obejmował grupę 1 (G1) i grupę 2 (G2). Badania zostały wykonane w celu potwierdzenia skuteczności zastosowanego modelu doświadczalnego w wywoływaniu odczynu bliznowatego w przestrzeni nadoponowej po zabiegu laminektomii. Na podstawie badań elektrofizjologicznych i histologicznych oceniono wpływ powstającej blizny na elementy nerwowe kanału kręgowego.

**Eksperyment drugi** obejmował grupy 2 (G2), 3 (G3), 4 (G4) i grupę piątą (G5). Celem doświadczenia była ocena skuteczności zastosowania quercetyny miejscowo i enteralnie w prewencji blizny w porównaniu do grupy kontrolnej (G2).

**Eksperyment trzeci** dotyczył grup 2 (G2) i szóstej (G6) i oceniał skuteczność zastosowania TachoCombu w prewencji blizny w porównaniu do grupy kontrolnej (G2).

Zakres operacji w poszczególnych grupach:

**grupa 1 (G1)** – nacięcie skóry, oddzielenie mięśni przykręgosłupowych od wyrostków kolczystych i łuków kręgowych, bez wykonania laminektomii (*sham surgery*) kontrola procedury mikrochirurgicznej otwarcia kanału kręgowego;

**grupa 2 (G2)** – wykonanie laminektomii, odsłonięcie opony twardej. W tej grupie nie zastosowano prewencji blizny (*grupa kontrolna*). Doświadczenie miało na celu ocenę

kontroli powstawania blizny w zastosowanym modelu doświadczalnym oraz określenie punktu odniesienia przydatności zastosowanej terapii przeciwdziałającej bliznie w kolejnych grupach doświadczalnych;

**grupa 3 (G3)** - po wykonaniu laminektomii opona twarda została pokryta pianką fibrynogenową (Spongostan). Doświadczenie miało na celu ocenę zastosowania pianki fibrynogenowej jako „nośnika” dla quercetyny, która była podawana miejscowo w grupie 4;

**grupa 4 (G4)** - po wykonaniu laminektomii oponę twardą pokrywano pianką fibrynogenową nasączoną quercetyną;

**grupa 5 (G5)** - wykonywano tylko laminektomię, a quercetyna była podawana codziennie enteralnie przez okres czterech tygodni;

**grupa 6 (G6)** – po wykonaniu laminektomii, w celu prewencji powstawania blizny nadoponowej, opona twarda była pokryta wchłanianym preparatem hemostatycznym (TachoComb).

Po upływie 6 tygodni od operacji zwierzęta poddane zostały uśpieniu, a pobrany segment kręgosłupa lędźwiowego był badany radiologicznie i histologicznie, z uściśleniem oceny mikroskopowej metodami immunohistochemicznymi.

### **3.3 Procedury operacyjne**

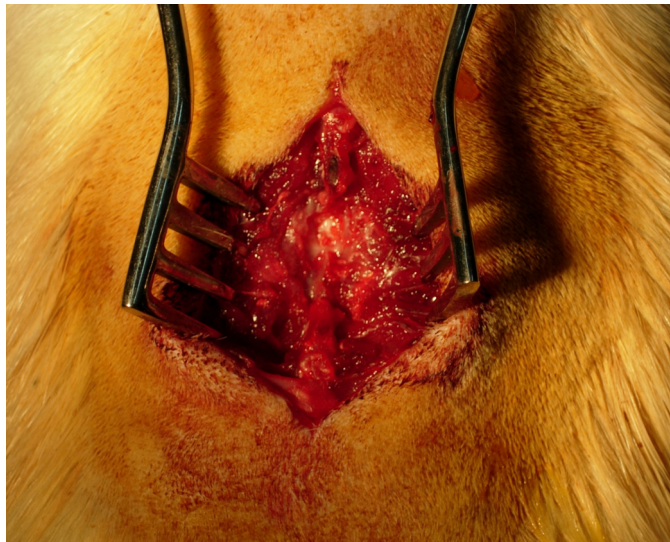
Zwierzęta, dwanaście godzin przed znieczuleniem ogólnym, nie otrzymywały pokarmu i przebywały w oddzielnych klatkach. Wszystkie procedury operacyjne zostały wykonane z zachowaniem zasad aseptyki i użyciem mikroskopu operacyjnego (OPMI Carl Zeiss, powiększenia 8x i 16x, Carl Zeiss, Goettingen, Niemcy). Znieczulenie ogólne uzyskiwano przy pomocy domięśniowej iniekcji mieszanki Ketaminy - 35 mg/kg m.c. (Vetoquinol Biowet, Gorzów Wlkp., Polska) oraz Xylazyny - 15 mg/kg m.c. (Biowet, Puławy, Polska). Głębokie znieczulenie (całkowite zniesienie reakcji na bodźce bólowe, zachowany własny wydolny oddech i wydolne krążenie krwi) obserwowano po 10 do 15 minutach od podaniu leków. Przed podaniem leków anestetycznych zwierzęta otrzymywały jednorazową dawkę antybiotyku Cefazolin w dawce 60 mg/kg m.c. (Bioton, Warszawa, Polska).

W kolejnym etapie doświadczenia układano szczura na brzuchu na stoliku operacyjnym. Po usunięciu owłosienia skóry grzbietu w okolicy lędźwiowej kręgosłupa przeprowadzano dezynfekcję skóry preparatem Codan. Poziom cięcia skórne zaplanowany został na podstawie stałych punktów anatomicznych wyznaczonych położeniem kości biodrowych miednicy. Zabieg polegał na nacięciu skóry, a następnie powięzi grzbietu w linii środkowej nad wyrostkami kolczystymi od L4 do L6. Mięśnie przykręgosłupowe oddzielano podokostnowo od wyrostków kolczystych i łuków kręgow. Punktem orientacyjnym w identyfikacji miejsca otwarcia kanału kręgowego była kość krzyżowa. Przy pomocy nożyczek usuwano wyrostek kolczysty kręgu L5 oraz więzadła nadkolcowe i międzykolcowe L4-L5 i L5-L6. W grupie 1 (G1) na tym etapie rana operacyjna została wypłukana 0,9% roztworem soli fizjologicznej i zamknięta według tych samych procedur, jak w grupach od 2 do 6 opisanych poniżej. W pozostałych grupach doświadczalnych przy pomocy wiertarki z diamentowym wiertłem o średnicy 1 mm (ryc. 6) wykonywano laminektomię na tym samym poziomie o rozmiarach 5 mm długości i 3 mm szerokości.

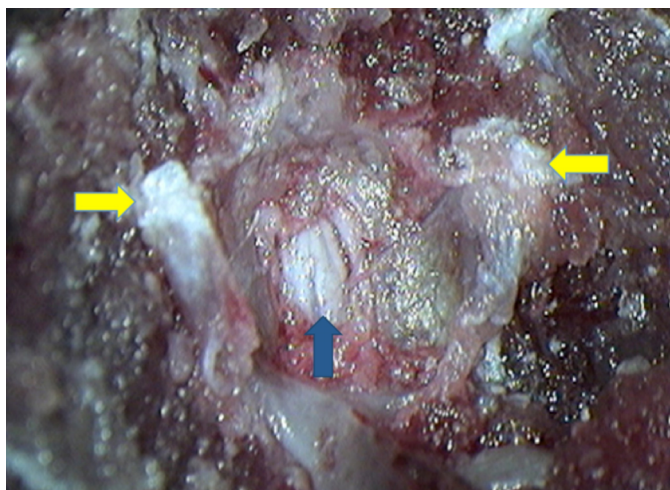


**Rycina 6.** Wiertarka wysokoobrotowa z wiertłem o średnicy 1 mm używana do wykonywania laminektomii lędźwiowej.

Po otwarciu kanału kręgowego, z dużą ostrożnością, przy pomocy mikronożyczek usuwano więzadło żółte oraz tkankę tłuszczową w celu uzyskania odsłoniętej, czystej, nieuszkodzonej opony twardej (ryc. 7). Hemostazę uzyskano za pomocą delikatnego ucisku bawełnianym wacikiem oraz poprzez zastosowanie wosku w przypadku krwawienia z kości. Następnie rana operacyjna została wypłukana 0,9% roztworem soli fizjologicznej. Po potwierdzeniu zachowania ciągłości worka oponowego, braku płynotoku płynu mózgowo-rdzeniowego, w grupach od 2 do 6 wykonano następujące procedury:



A



B

*Rycina 7. Makroskopowy obraz laminektomii na poziomie L5 (A). Obraz z mikroskopu operacyjnego (powiększenie 16x) ukazuje wykonaną laminektomię na poziomie L5 z widocznym nienaruszonym workiem oponowym (niebieska strzałka). Stawy międzykręgowe zostały zachowane obustronnie (żółte strzałki). Oba obrazy - szczur nr 3 z grupy G2 (B).*

**grupa 2** - rana została zamknięta warstwowo (brak prewencji blizny);

**grupa 3** - na oponę w miejscu laminektomii został umieszczony fragment pianki fibrynowej – spongostanu o wymiarach 5 x 3 mm;

**grupa 4** - bezpośrednio przed implantacją spongostanu o wymiarach 5 x 3 mm został spongostan nasączony w 2 ml roztworu zawierającego 400 mg quercetyny, a następnie umieszczony na oponie;



**grupa 5** – po wykonaniu laminektomii rana została zamknięta warstwowo, po wybudzeniu zwierzę otrzymało dawkę quercetyny 32 mg/kg/dzień w roztworze 0,9% NaCl poprzez sondę żołądkową (16G, 76 mm długości), terapię kontynuowano codziennie w tej samej dawce przez 4 tygodnie;

**grupa 6** - na oponę został przyklejony fragment preparatu TachoComb o wymiarach 5 x 3 mm.

Po ponownej kontroli hemostazy ranę operacyjną zamykano warstwowo. Na powieź i szwy podskórne używano nici Dexon 3-0. Na skórę zakładano szew ciągły (Amifil 3-0). Po założeniu szwów skóra była ponownie odkażana preparatem Codan. Następnie zwierzęta były przenoszone do oddzielnych klatek i obserwowane wnikliwie do momentu wybudzenia. W klatkach znajdowała się woda oraz pokarm w ilości wystarczającej dla danego ciężaru szczura.

### **3.4 Metody badawcze**

Analiza grup badawczych obejmowała badanie kliniczne zwierząt doświadczalnych w trakcie okresu obserwacji, ocenę elektrofizjologiczną w dniu uśpienia, badanie tomografii komputerowej wyciętego segmentu kręgosłupa lędźwiowego, a następnie dokonano oceny histologicznej, morfometrycznej oraz immunohistochemicznej na podstawie odpowiednio przygotowanych preparatów histologicznych.

#### **3.4.1 Ocena stanu ogólnego i funkcji nerwowej kończyn tylnych szczura**

W trakcie okresu obserwacyjnego, trwającego 6 tygodni, każde zwierzę poddane zostało szczegółowemu badaniu klinicznemu, przez pierwszy tydzień, dzień po dniu a następnie raz w tygodniu. Dodatkowo w ostatnim dniu obserwacji, przed uśpieniem zwierzęta zostały poddane obiektywnej ocenie neurologicznej za pomocą somatosensorycznych potencjałów wywołanych (SSEP).

##### **3.4.1.1 Ocena kliniczna**

U każdego zwierzęcia obserwowano stan ogólny (waga ciała, stan nawodnienia - metodą obserwacji fałdu skórniego), poprawność gojenia się rany pooperacyjnej (wykładniki zakażenia, płynotoku płynu mózgowo-rdzeniowego z rany operacyjnej) oraz oznaki obecności bólu (autotomia, apatia, „skulona” pozycja ciała). Stan neurologiczny każdego szczura oceniano po wypuszczeniu zwierzęcia z klatki na płaską powierzchnię i obserwacji sprawności ruchowej kończyn tylnych podczas ruchu. Dodatkowo badanie



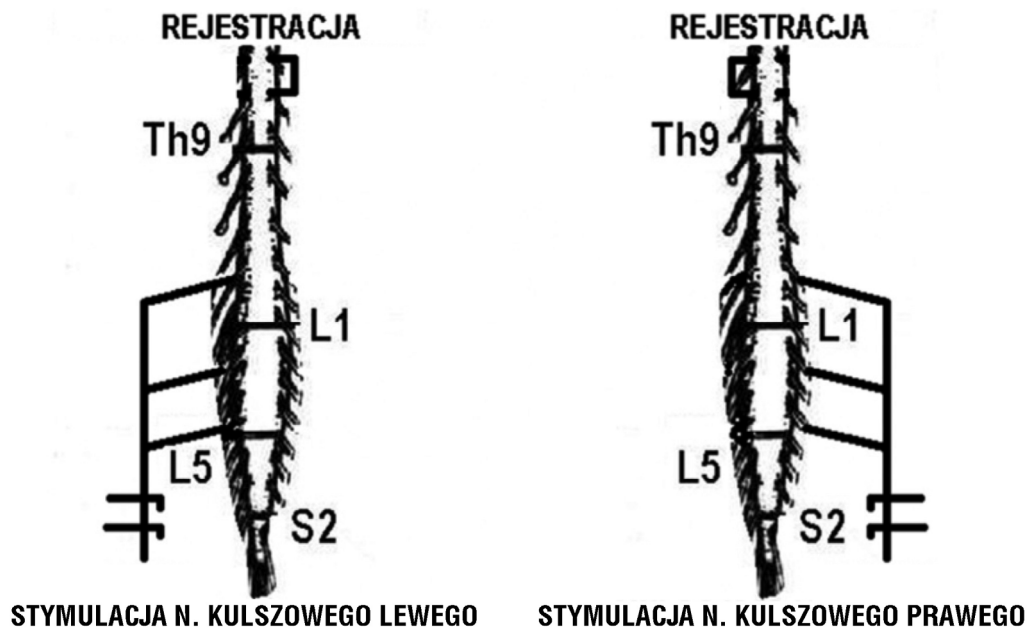
było nagrywane na taśmie VHS w celu dokładniejszej oceny przy odtwarzaniu nagrania w zwolnionym tempie. Jako kontrolę wykorzystano zapisy ruchu pięciu losowo wybranych zwierząt przed zabiegiem operacyjnym. Ruch oceniano na podstawie 5-stopniowej skali zaproponowanej przez Liu (185): 0° kompletne prężenie, 1° obserwowane skurcze mięśni kończyn, bez obecności ruchu kończyn, 2° obecny ruch – ale siła mięśniowa nie zapewniała podparcia ciała, 3° siła mięśniowa kończyn tylnych zapewnia podparcie ciała, ale z widocznymi trudnościami, 4° normalna siła mięśniowa i funkcja kończyn tylnych. Jednocześnie obserwowano również stan czynności wydalniczych pęcherza moczowego i odbytu.

#### **3.4.1.2 Somatosensoryczne potencjały wywołane**

W celu uzyskania obiektywnej oceny stanu neurologicznego operowanych zwierząt w ostatnim dniu obserwacji przeprowadzono badania przewodnictwa aferentnego rdzenia na podstawie badania somatosensorycznych potencjałów wywołanych, które wykonano aparatem Keypoint (Medtronic, Alpine, Dania) sprzężonego z komputerem przenośnym klasy PC. Badania przeprowadzano w znieczuleniu ogólnym, które uzyskiwano stosując ten sam protokół znieczulenia jak poprzednio. Następnie otwierano kanał kręgowy drogą laminektomii na poziomie Th7-Th9, również z zastosowaniem tych samych procedur jak podczas laminektomii w odcinku lędźwiowym z zachowaniem szczególnej ostrożności, aby nie spowodować uszkodzenia opony twardej i rdzenia kręgowego. W kolejnym etapie badania obustronnie wypreparowywano nerwy kulszowe na wysokości środkowej części uda. Elektroda bipolarną stymulowano nerw kulszowy, natomiast przy pomocy odbiorczej pary elektrod umieszczonej na sznurach grzbietowo-bocznych segmentów rdzenia kręgowego Th7-Th9, bipolarnie rejestrowano zapis SSEP (ryc. 8). Do stymulacji elektrycznej z częstotliwością 1 Hz wykorzystano monopolarne impulsy prostokątne o czasie trwania 0,2 ms i natężeniu maksymalnie do 6,0 mA. Rejestrowane z rdzenia potencjały były uśredniane (do 25 rejestrowanych sygnałów na każde uśrednienie, wzmocnienie zwykle 10  $\mu\text{V/D}$ , filtr górnoprzepustowy 5 kHz a dolnoprzepustowy 10 Hz). W rejestracji potencjału wyróżniono dwie składowe: I składowa – odzwierciedlała przewodnictwo na poziomie strefy wejścia do rdzenia kręgowego korzeni grzbietowych jak i w sznurach grzbietowych, II – odzwierciedlała aktywność bioelektryczną struktur rogów brzusznych i istoty szarej pośredniej rdzenia kręgowego, łącznie z przewodnictwem sznurów grzbietowo-bocznych rdzenia kręgowego (186, 187). Urządzenie Keypoint przedstawia rejestrowane fale w postaci graficznej oraz

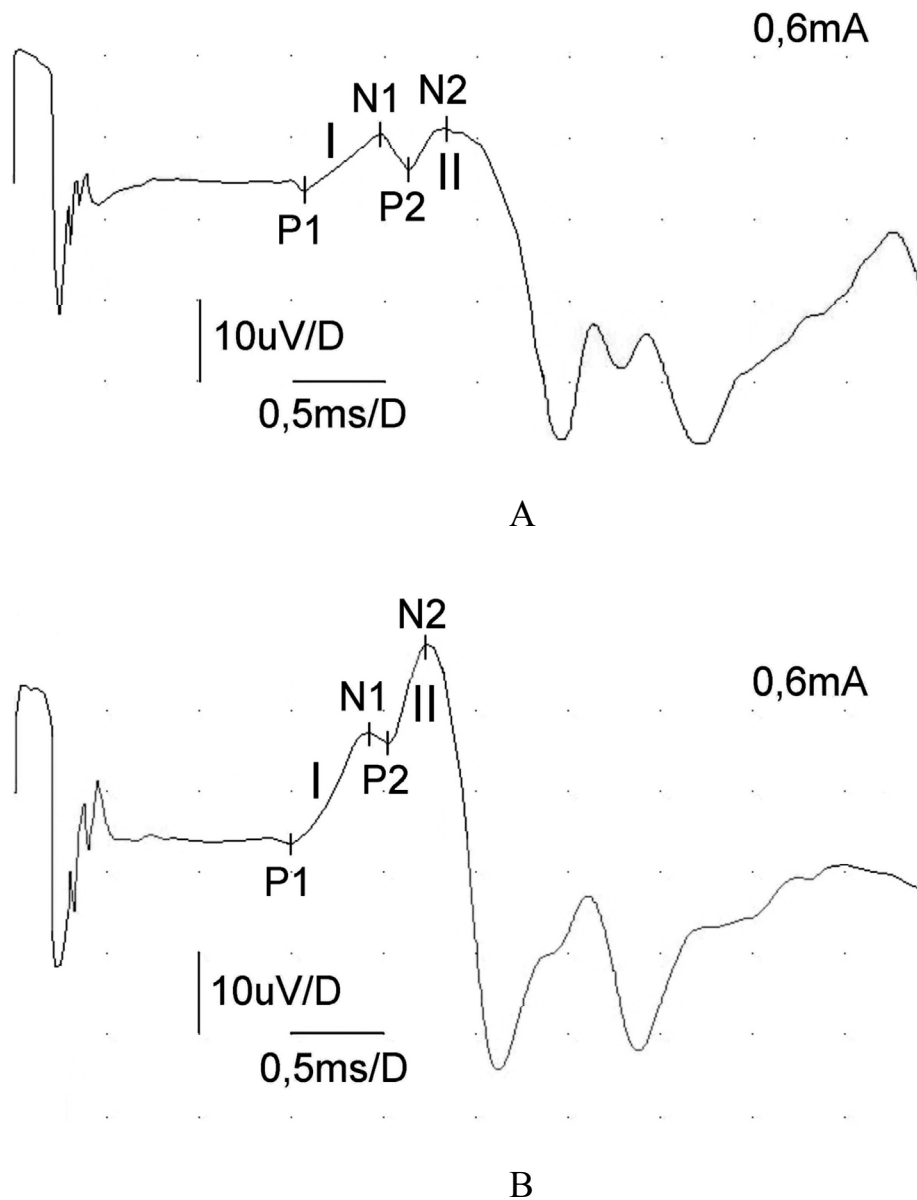


A



B

**Rycina 8.** Sposób rejestracji SSEP. Elektrody stymulujące znajdują się na nerwie kulszowym na wysokości środkowej części uda, natomiast elektrody odbiorcze umieszczone są na oponie twardej sąsiadującej z sznurami grzbietowo-bocznymi rdzenia kręgowego na poziomie Th7-9 (szczur nr 5 z grupy G4) (A). Stymulację nerwów kulszowych przeprowadzono obustronnie a następnie wyniki uśredniano (B).



**Rycina 9.** Zapis potencjału SSEP z naniesionymi składowymi I i II. A – szczur nr 5 (grupa G2), B – szczur nr 3 (grupa G1). Zwraca uwagę znaczne obniżenie amplitudy składowych SSEP I i II w grupie zwierząt po laminiektomii (grupa G2).

umożliwia odczyt wartości latencji i amplitud poszczególnych składowych potencjału, które w kolejnym etapie opracowania poddane zostały analizie statystycznej (ryc. 9).

### **3.4.2 Zabezpieczenie materiału tkankowego do dalszych badań**

Po zakończeniu badania SSEP zwierzęta usypiano dootrzewnową iniekcją Pentobarbitalu (100 mg/kg). Po pojawieniu się arefleksji i objawów niewydolności krążeniowo-oddechowej przeprowadzano torakotomię. W celu usunięcia krwi z łożyska naczyniowego katetyrzowano aortę piersiową i otwierano prawy przedsionek serca. Do cewnika znajdującego się w aorcie podawano we wlewie kroplowym 40 ml roztworu heparyny (5000 j. heparyny w 500ml 0,9% NaCl). Po podaniu roztworu heparyny, przetaczano również we wlewie kroplowym 40 ml 10 % zbuforowany roztwór formaliny.

Do dalszych badań pobierano „en-bloc” fragment kręgosłupa lędźwiowego między poziomami L4 i L6, z przylegającymi mięśniami przykręgosłupowymi umieszczając go w 10% zbuforowanym roztworze formaliny.

### **3.4.3 Tomografia komputerowa**

W celu uzyskania potwierdzenia rozległości oraz trwałości ubytku kostnego po przeprowadzonej laminiektomii u losowo wybranego zwierzęcia z każdej grupy wykonano tomografię komputerową wstępnie utrwalonych fragmentów kręgosłupa. Badanie przeprowadzono aparatem General Electric ProSpeed SX Advantage w oknie kostnym w przekrojach poprzecznych.

### **3.4.4 Ocena histologiczna i histomorfometryczna**

Po utrwalaniu preparatów w 10% zbuforowanym roztworze formaliny przez 24 godziny następowało odwapnienie struktur kostnych kręgosłupa poprzez umieszczanie preparatów w 10% roztworze kwasu azotowego na okres 8 dni. Po odwapnieniu materiał zatapiano w parafinie. Następnie przy pomocy mikrotomu wykonywano 9 przekrojów poprzecznych w odstępach co 1 mm, zaczynając od krążka międzykręgowego L4/L5 aż do krążka międzykręgowego L5/L6 (120) uzyskując skrawki parafinowe o grubości 4µm, które następnie były barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną (H+E) i oceniane w mikroskopie świetlnym. Do wizualizacji sporządzonych preparatów histologicznych użyto metody prezentacji cyfrowej preparatu mikroskopowego (188). W tym celu standardowy mikroskop świetlny został przekonfigurowany do generatora wirtualnych preparatów. Tak przygotowany mikroskop świetlny Axioplan 2 był doposażony w stół skanujący sterowany kontrolerem MCU28 oraz aparat cyfrowy AxioCam (Carl Zeiss, Goettingen, Niemcy). Montowana z zapamiętywanych obrazów cyfrowych mapa bitowa

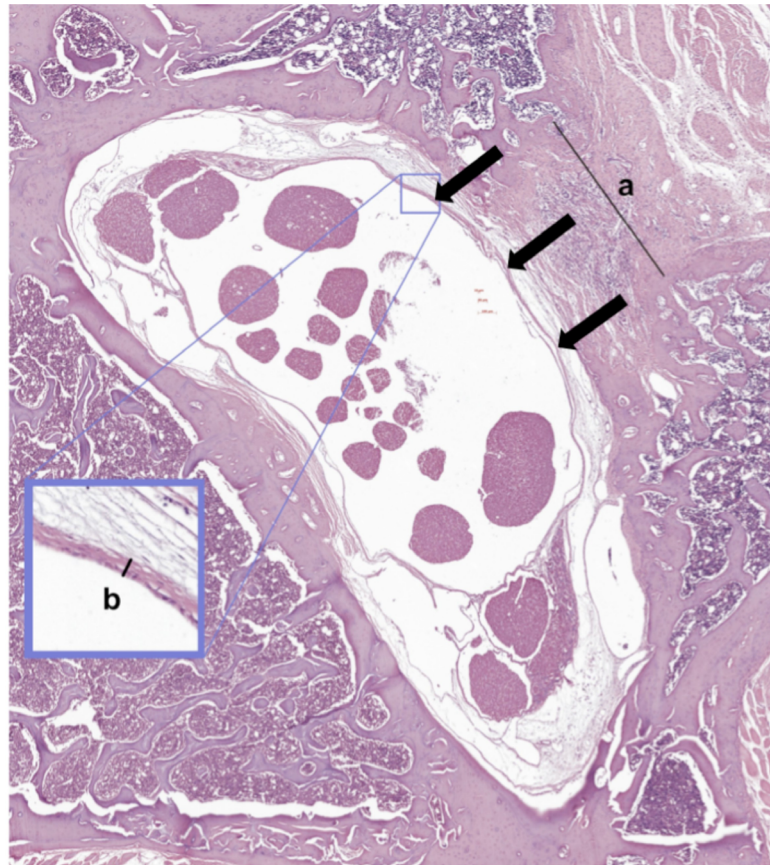
była konwertowana i zapamiętywana w standardowym formacie TIFF. We wszystkich obrazach uzyskano rozdzielczość 0,53292  $\mu\text{m}$ /piksel. System komputerowy automatycznie nanosił skalę (odcinek o długości 100  $\mu\text{m}$ ) na tak otrzymywane obrazy cyfrowe. Dla zaoszczędzenia powierzchni dyskowej serwera, pliki były konwertowane do formatu JPG2000 ze stopniem kompresji 10:1. Zastosowana technika pozwalała na uwidocznienie struktur kostnych kręgosłupa, okolicy okołokręgosłupowej, opony twardej, przestrzeni nadtwardówkowej, korzeni ogona końskiego oraz zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych. Do dalszej analizy wykorzystano przekroje zawierające bliznę nadoponową na wysokości obustronnych zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych znajdujących się w otworach międzykręgowych. Dalszą analizę obrazów histologicznych przeprowadzono za pomocą programu do cyfrowej analizy obrazu ImageJ (National Institute of Health, Stany Zjednoczone).

Rozległość blizny nadoponowej oceniano na podstawie skali zaproponowanej przez He i wsp. (120). Jest to skala czterostopniowa, która klasyfikuje rozległość blizny do jednego z czterech stopni: 0° – blizna nieobecna, I° – cienki włóknisty pasek oddzielający oponę twardą od właściwej blizny położonej wyżej, II° – zrost blizny z oponą, ale na odcinku krótszym niż 2/3 laminektomii, III° – zrost blizny z oponą na odcinku dłuższym niż 2/3 laminektomii, sięgający obustronnie do korzeni nerwowych.

W kolejnym etapie badań oceniano grubość opony twardej na analizowanym poziomie. W tym celu przeprowadzano pomiar w trzech punktach - na granicy kostnej laminektomii (obustronnie) oraz centralnie pomiędzy tymi punktami (środek laminektomii), a następnie pomiary te uśredniano (ryc. 10). Dodatkowo wyznaczano średnią odległość pomiędzy dwoma skrajnymi punktami w grupach od G2 do G6 w celu uzyskania punktów referencyjnych dla wykonania pomiarów w grupie pierwszej (G1), która była pozbawiona charakterystycznych punktów odniesienia pod postacią granic kostnych laminektomii. Tak uzyskaną odległość dzielono na pół, którą następnie odkładano obustronnie od środka opony twardej i w ten sposób wyznaczanych miejscach dokonywano pomiaru.

Następnie oceniano wpływ powstawania blizny na struktury położone wewnątrzoponowo. Poszukiwano zrostów opony pajęczej z oponą twardą i korzeniami nerwowymi ogona końskiego.

Dodatkowo na każdym preparacie histologicznym manualnie zliczano całkowitą liczbę neuronów obecnych w obustronnych zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych.



**Rycina 10.** Przekrój poprzeczny kręgosłupa lędźwiowego (szczur numer 7 z grupy G5) na wysokości laminektomii. Linia oznaczona jako „a” odzwierciedla szerokość laminektomii, na podstawie której wyznaczano miejsca pomiaru grubości opony oznaczone strzałkami - odpowiednio w centrum laminektomii i na wysokości krawędzi kostnej. Przykładowy pomiar grubości opony „b”. Cyfrowy preparat histologiczny w barwieniu H+E (10x).

### 3.4.5 Analiza immunohistochemiczna

Analizą immunohistochemiczną objęto ekspresję osteopontyny (OPN) w bliźnie nadoponowej, innych strukturach kanału kręgowego (tkanka kostna, opona twarda, korzenie nerwowe, naczynia krwionośne) oraz w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych). Dodatkowo oceniano całkowitą ilość naczyń krwionośnych w bliźnie nadoponowej poprzez barwienie przeciwciałem przeciwko CD31 (PECAM-1). Skrawki histologiczne deparafinizowano w ksylenie a następnie uwadniano w malejących stężeniach alkoholu etylowego, a w ostatnim etapie w wodzie destylowanej. Po wypłukaniu w buforze TRIS preparaty były inkubowane w 3% roztworze wody utlenionej w celu zahamowania endogennej peroksydazy. Tak przygotowane preparaty

inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej z przeciwciałem monoklonalnym przeciwko OPN (AKm2A1; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., Stany Zjednoczone) w stężeniu 2  $\mu\text{g/ml}$  lub z króliczym oczyszczonym przeciwciałem poliklonalnym anti-CD31 (M-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., Stany Zjednoczone) w stężeniu 4  $\mu\text{g/ml}$ . Związanie pierwotnych przeciwciał wykrywano systemem peroksydazowym LSAB2 Dako (Dako, Carpinteria, CA., Stany Zjednoczone) i aminoetylkarbazolem zgodnie z instrukcjami producenta. Dodatkowo preparaty podbarwiano były hematoksyliną i w ostatnim etapie preparaty „fiksowano” przy użyciu środka Faramount (Dako, Carpinteria, CA., Stany Zjednoczone). Jako ujemną kontrolę zastosowano wtórne barwienie immunohistochemiczne z pominięciem przeciwciała pierwotnego.

Preparaty zostały poddane analizie w mikroskopie świetlnym (Leica, Niemcy), a następnie miejsca reprezentatywne fotografowano kamerą cyfrową (Mikromax, Stany Zjednoczone) sprzężoną z mikroskopem. W kolejnym etapie wstępnie oceniano i porównywano, pomiędzy grupami, lokalizację ekspresji OPN w poszczególnych strukturach kanału kręgowego. Następnie w każdej strukturze: oponach, bliźnie nadoponowej, tkankach otaczających korzenie ze zwojami czuciowymi w otworach międzykręgowych, naczyniach krwionośnych, tkance kostnej, wyznaczano intensywności barwienia przeciwko OPN według skali półilościowej, która klasyfikuje intensywność barwienia w jednym z trzech stopni: 0 - brak barwienia, 1 - słabe barwienie, 2 - średnie barwienie, 3 - silne barwienie. Stopień ekspresji OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych oceniano jako procent dodatnio barwiących się neuronów do całkowitej ilości neuronów na jednym preparacie. Na slajdach zabarwionych przeciwciałem anti-CD31 zliczano naczynia krwionośne w bliźnie nadoponowej obecnej w kanale kręgowym i wypełniającej ubytek kostny po laminotomii do wysokości blaszki zewnętrznej łuku kręgu.

### **3.5 Metody statystyczne**

W analizie statystycznej wykorzystano oprogramowanie JMP 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, Stany Zjednoczone). W zależności od typu uzyskanych danych wykorzystano następujące testy statystyczne: Test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych, test Chi-Square, dokładny test Fisher'a oraz współczynniki korelacji Pearson'a ( $r$ ) i Spearman'a ( $\rho$ ). Dla każdego testu, za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość  $p \leq 0,05$ .

## 4. Wyniki

### 4.1 Obserwacja kliniczna

U 30% zwierząt w grupach doświadczalnych od 2 do 6 po wykonaniu laminiektomii wystąpiło krwawienie ze splotów żylnych kanału kręgowego co wymagało kilkuminutowej hemostazy (wacik bawełniany). Po zatrzymaniu krwawienia rana została kilkakrotnie wypłukana solą fizjologiczną w celu usunięcia wszystkich pozostałości włókien bawełnianych mogących indukować powstawanie blizny. U żadnego ze zwierząt nie zaobserwowano śródoperacyjnie płynotoku płynu mózgowo-rdzeniowego. Wszystkie zwierzęta wybudziły się samoistnie, kiedy ustało działanie anestetyków. We wczesnym okresie pooperacyjnym większość szczurów spała w klatkach. Kilka godzin później zwierzęta wracały do normalnego cyklu aktywności. Nie obserwowano oznak bólu, niedożywienia lub odwodnienia przez cały okres obserwacji. W 6 przypadkach (1 przypadek w grupie 3, 4 przypadki w grupie 4 i 1 przypadek w grupie 6) zaobserwowano w miejscu operacji tworzenie się ropni z przetoką skórną, mimo to zwierzęta nie wykazywały objawów neurologicznych lub symptomów uogólnionego zakażenia. Zostały one wykluczone z dalszej analizy i poddane uspieniu natychmiast po zdiagnozowaniu ropnia (2 tygodnie po operacji). U pozostałych zwierząt nie wykazano objawów zakażenia rany operacyjnej. W ocenie funkcji ruchowej (zapis video) podczas pierwszego pooperacyjnego badania (24 godziny po operacji) zaobserwowano nieznaczną trudność w poruszaniu się po płaskiej powierzchni (3 stopień skali wg Liu) w 6 przypadkach (po jednym w grupach 2, 3, 4, 5) i w 2 przypadkach w grupie 6. Zwierzęta te uzyskały maksymalną ocenę w skali wg Liu podczas następnego badania (48 godzin po operacji). Do końca okresu obserwacji żadne ze zwierząt nie miało trudności w poruszaniu się (4 stopień według Liu). Również żadne ze zwierząt nie wykazywało oznak zaburzeń czynności zwieraczy pęcherza lub odbytu podczas całego okresu obserwacji.

### 4.2 Somatosensoryczne potencjały wywołane

Łącznie 54 zwierzęta zostały zakwalifikowane do analizy elektrofizjologicznej (6 szczurów wykluczono wcześniej ze względu na infekcję rany operacyjnej). Podczas wykonywania laminiektomii, w odcinku piersiowym kręgosłupa, w 4 przypadkach - po jednym zwierzęciu w grupach 2, 3, 4 i 5 nastąpiło uszkodzenie opony z płynotokiem płynu mózgowo-rdzeniowego. Zwierzęta te zostały wykluczone z dalszych badań ze



względu na możliwość uszkodzenia rdzenia kręgowego i nieznaną wpływ płynotoku na przewodnictwo nerwowe. W pozostałych przypadkach uzyskano powtarzalne zapisy SSEP składające się z głównego negatywnego załamka (składowa II) poprzedzonego mniejszym pozytywnym załamkiem (składowa I). Przykładowe zapisy badanych potencjałów przedstawia rycina 9. Amplitudy i latencje potencjałów z obu stron zostały uśrednione, a tak uzyskane wartości analizowano i porównywano pomiędzy grupami doświadczalnymi.

#### 4.2.1 Eksperyment pierwszy

W eksperymencie pierwszym dokonano porównania grupy zwierząt bez otwarcia kanału kręgowego (grupa G1) z grupą zwierząt, u których wykonano laminektomię (grupa G2). W porównaniu wyników zaobserwowano brak różnic pomiędzy wartościami latencji I i II składowej SSEP (odpowiednio  $p = 0,376$  i  $p = 0,25$ ). Natomiast w grupie G2 wykonanie laminektomii spowodowało statystycznie znaczącą utratę wartości amplitud I i II składowej SSEP (odpowiednio  $p = 0,004$  i  $p = 0,005$ ), co potwierdza skuteczność zastosowanego modelu doświadczalnego w wywoływaniu patologicznej blizny nadoponowej (tab. II).

*Tabela II. Wartości amplitudy i latencji I i II składowej SSEP w eksperymencie pierwszym*

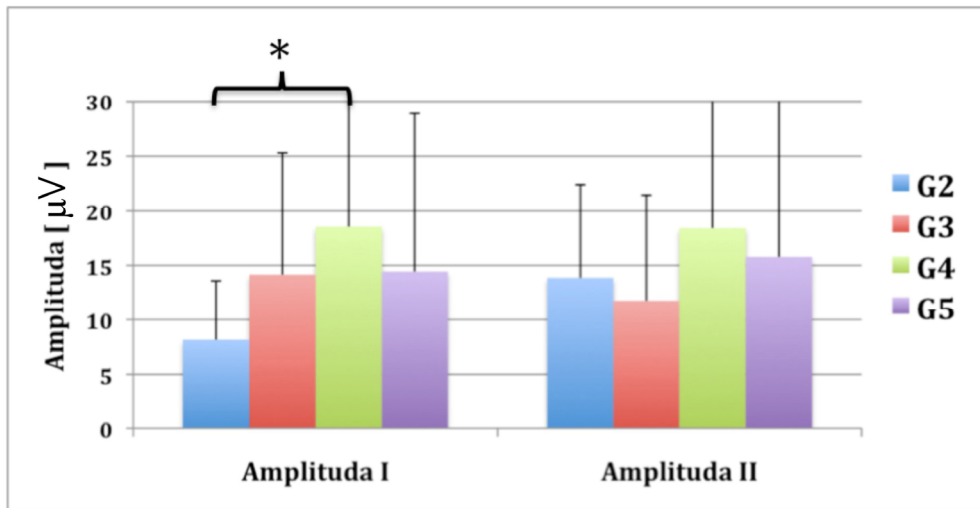
Grupa doświadczalna	Latencja I [ms]	Latencja II [ms]	Amplituda I [ $\mu$ V]	Amplituda II [ $\mu$ V]
<b>G1</b> (n=10)	1,51 $\pm$ 0,32	1,92 $\pm$ 0,547	24,5 $\pm$ 6,21	22,6 $\pm$ 2,11
<b>G2</b> (n=9)	1,4 $\pm$ 0,24	2,19 $\pm$ 0,51	14,57 $\pm$ 8,19	14 $\pm$ 1,78
<b>p</b>	0,3760	0,25	<b>0,004**</b>	<b>0,005*</b>

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$

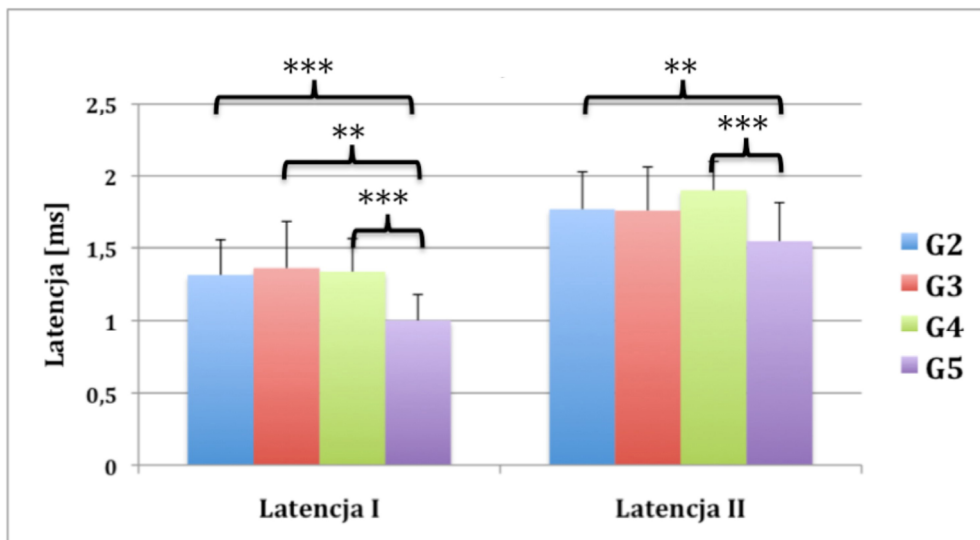
#### 4.2.2 Eksperyment drugi

W grupie zwierząt G4 z quercetyną zastosowaną miejscowo zaobserwowano statystycznie znaczącą wyższą wartość amplitudy składowej I SSEP (18,55  $\pm$  17,05  $\mu$ V) w porównaniu do grupy kontrolnej – G2 (8,15  $\pm$  5,43  $\mu$ V;  $p = 0,0238$ ) (ryc. 11). Zależności takiej nie zanotowano w przypadku quercetyny zastosowanej enteralnie (grupa G5). Nie wykazano znaczących różnic pomiędzy grupami analizując wartości amplitudy składowej II SSEP. Natomiast grupa z quercetyną zastosowaną enteralnie (grupy G5)

miała najkrótszą latencję składowej I ( $1,002 \pm 0,18$  ms) w stosunku do grupy kontrolnej – G2 ( $1,31 \pm 0,24$  ms;  $p < 0,0001$ ). Grupy ze spongostanem (grupa G3) ( $1,36 \pm 0,33$  ms;  $p = 0,0034$ ) oraz z quercetyną zastosowaną miejscowo (grupa G4) ( $1,34 \pm 0,23$ ms;  $p < 0,0001$ ) miały także najkrótszą latencję składowej załamka II ( $1,55 \pm 0,27$  ms) w porównaniu do grupy z laminektomią bez prewencji blizny – G2 ( $1,77 \pm 0,26$  ms;  $p = 0,0045$ ) oraz grupy G4 ( $1,90 \pm 0,20$  ms;  $p < 0,0001$ ).



A



B

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$

**Rycina 11.** Porównanie wartości amplitud (A) i latencji (B) składowych I i II SSEP w eksperymencie drugim. W grupie G4 obserwowano najwyższą wartość amplitudy składowej I w porównaniu do grupy kontrolnej (G2). W grupie G5 odnotowano najkrótszą latencję składowych I i II spośród wszystkich grup doświadczalnych.

### 4.2.3 Eksperyment trzeci

Zastosowanie TachoCombu w prewencji blizny miało pozytywny wpływ na amplitudy składowych I i II SSEP w stosunku do grupy kontrolnej (odpowiednio  $p = 0,0429$  i  $p = 0,0060$ ). Natomiast nie zaobserwowano takiego wpływu na latencje składowych I i II SSEP ( $p = 0,067$ ,  $p = 0,8982$ ) (tab. III).

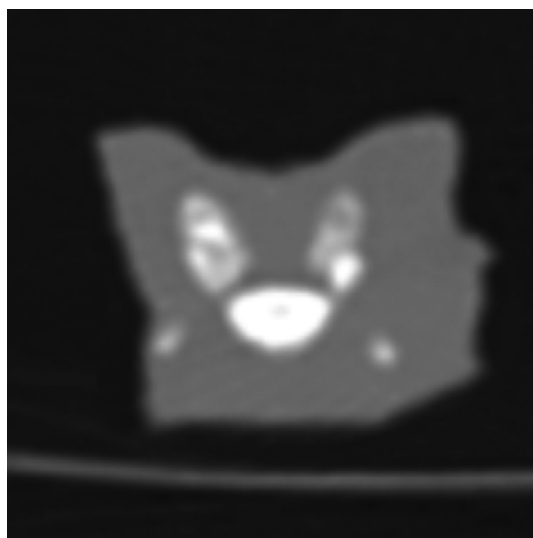
**Tabela III.** Wartości amplitudy i latencji składowych I i II SSEP w eksperymencie trzecim

Grupa doświadczalna	Latencja I [ms]	Latencja II [ms]	Amplituda I [ $\mu$ V]	Amplituda II [ $\mu$ V]
<b>G2</b> (n = 9)	1,4 $\pm$ 0,24	2,19 $\pm$ 0,505	14,57 $\pm$ 8,19	14 $\pm$ 1,78
<b>G6</b> (n=9)	1,07 $\pm$ 0,15	1,61 $\pm$ 0,20	18,12 $\pm$ 19,83	21,22 $\pm$ 13,64
<b>p</b>	0,0670	0,8982	<b>0,0429*</b>	<b>0,0060*</b>

\*  $p < 0,05$

### 4.3 Tomografia komputerowa kręgosłupa

Tomografia komputerowa kręgosłupa w przekrojach poprzecznych wykonana u losowo wybranych zwierząt z każdej grupy nie wykazała znamienych różnic w morfologii i rozległości wykonanej laminektomii. We wszystkich badanych przypadkach stawy międzykręgowy nie zostały uszkodzone (ryc. 12).



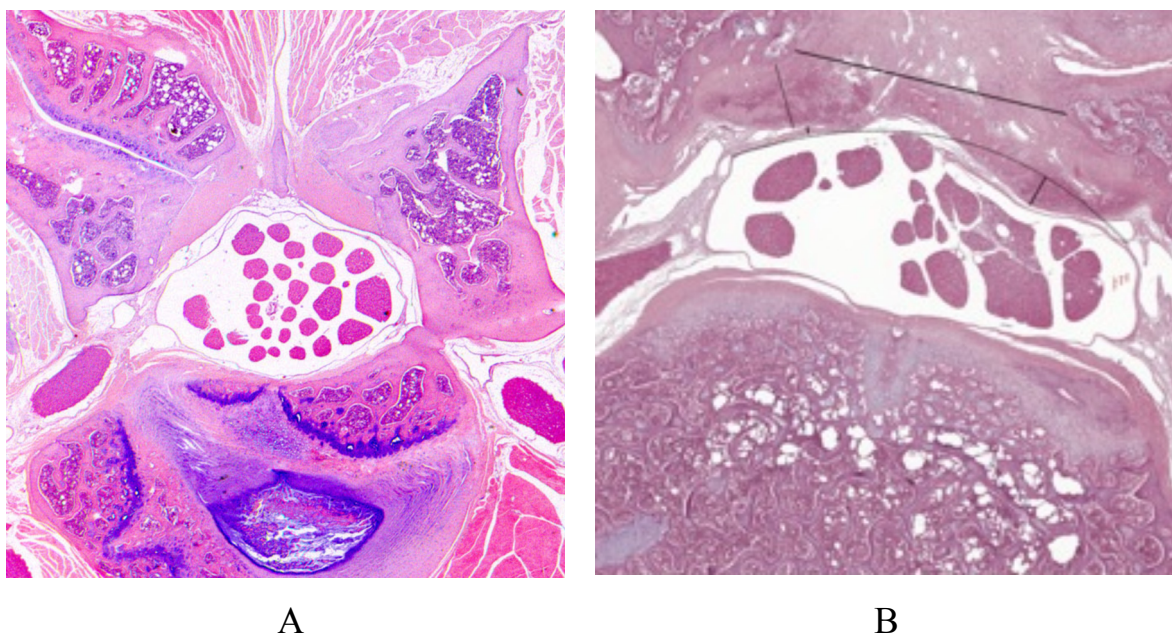
**Rycina 12.** Badanie tomografii komputerowej kręgosłupa lędźwiowego szczura w projekcji osiowej na poziomie laminektomii. Widoczne obustronnie zachowane stawy międzykręgowy.

## 4.4 Ocena histologiczna i histomorfometryczna

### 4.4.1 Eksperyment pierwszy

W 2 przypadkach zarówno w grupach doświadczalnych G1 jak i G2 preparaty zostały poddane powtórnemu opracowaniu (wycięciu skrawków), gdyż nie zawierały obustronnych zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych. Jeden preparat z grupy G2 został wykluczony z dalszej oceny z powodu całkowitego zamknięcia ubytku kostnego w miejscu laminektomii przez odrastającą tkankę kostną. W grupie G1, zgodnie z przewidywaniami, nie zaobserwowano blizny w kanale kręgowym natomiast tkanka włóknista była obecna w mięśniach przykręgosłupowych w miejscu operacji.

Spośród zwierząt w grupie G2 w 5 (56%) przypadkach bliznę nadoponową oceniono w stopniu 3, w 2 (22%) przypadkach w stopniu 2 i w kolejnych 2 (22%) przypadkach w stopniu 1 w skali wg He. Żadne ze zwierząt nie było wolne od blizny nadoponowej. Opona twarda była statystycznie grubsza ( $p = 0,0001$ ) w grupie po laminektomii (G2) porównując do grupy bez otwarcia kanału kręgowego (G1). Zrosty pajęczynówki z oponą twardą i korzeniami nerwowymi ogona końskiego zaobserwowano w 6 (67%) preparatach w grupie G2 i w 5 (50%) preparatów w grupie G1 (ryc. 13).



**Rycina 13.** Eksperyment pierwszy. Przekroje poprzeczne kręgosłupa lędźwiowego na poziomie L5 w grupie G1 (szczur nr 1) - A oraz w grupie G2 (szczur nr 3) - B. Zwraca uwagę swobodne ułożenie korzeni nerwowych w worku oponowym w grupie bez laminektomii, natomiast na rycinie B widoczne są zrosty korzeni nerwowych ze sobą oraz z oponą. Jednocześnie widoczna jest rozległa blizna nadoponowa (3 stopień wg skali He) powodująca deformację worka oponowego. H+E (10x).

Nie wykazano statystycznie istotnej zależności ( $p = 0,403$ ), pomiędzy obecnością zrostów opony pajęczej z oponą twardą i korzeniami nerwowymi ogona końskiego w grupach G1 i G2. Jednocześnie zrosty pajęczynówki z oponą twardą w grupie G1 (bez laminektomii) nie wykazywały zwiększonej ilości komórek i nasilenia zwłóknienia, co było zauważalne u zwierząt w grupie G2 (po laminektomii). Liczba komórek nerwowych w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych, zliczanych na jednym preparacie histologicznym, była porównywalna w obu grupach ( $p = 0,298$ ) (tab. IV). Rozległość blizny wyrażona w skali wg He silnie dodatnio korelowała ze średnią wartością grubości opony twardej w grupie G2 ( $\rho = 0,775$ ,  $p = 0,014$ ). Nie zaobserwowano związku pomiędzy rozległością blizny a amplitudą składowej I SSEP ( $\rho = 0,452$ ,  $p = 0,222$ ) i amplitudą składowej II SSEP ( $\rho = 0,452$ ,  $p = 0,222$ ).

**Tabela IV.** Ocena histologiczna opony twardej i neuronów w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w eksperymencie pierwszym w grupach doświadczalnych G1 i G2

Grupa doświadczalna	Grubość opony [ $\mu\text{m}$ ]	Liczba neuronów w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych
<b>G1</b> (n=10)	11,73 $\pm$ 1,67	353,5 $\pm$ 84,11
<b>G2</b> (n = 9)	21,8 $\pm$ 6,3	385,57 $\pm$ 63,51
<b>p</b>	<b>&lt; 0,0001***</b>	0,298

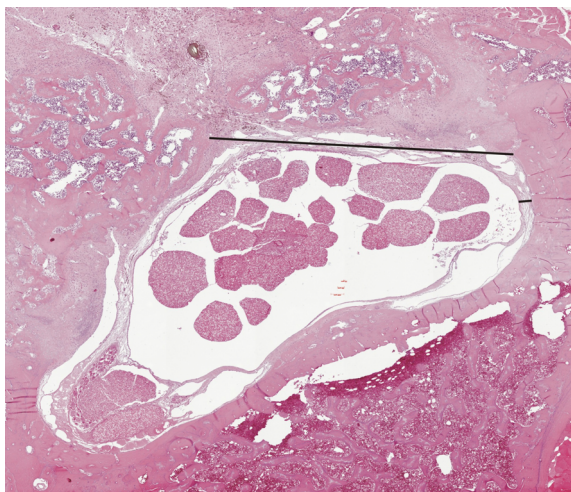
\*\*\*  $p < 0,0005$

#### 4.4.2 Eksperyment drugi

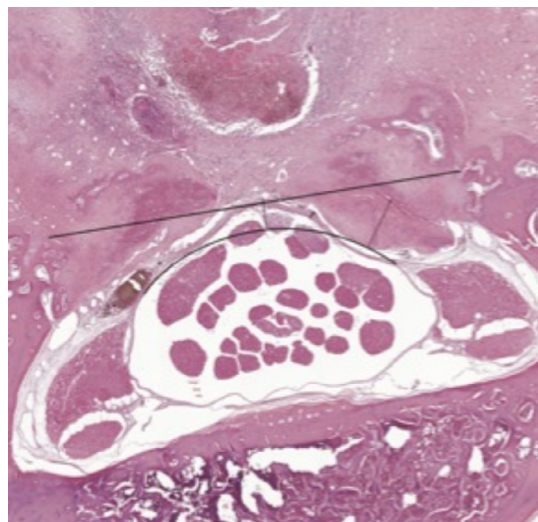
W 4 przypadkach (2 szczury w grupie G5, po jednym szczurze w grupach G3 i G4) dokonano powtórnego opracowania (wycięcia skrawków) preparatów histologicznych w celu uzyskania właściwych do analizy obrazów. Wszystkie preparaty zawierały bliznę nadoponową w miejscu wykonanej laminektomii. Nie zaobserwowano całkowitego zamknięcia ubytku kostnego w miejscu laminektomii na żadnym z preparatów (ryc. 14).

W grupie G5 blizna nadoponowa została oceniona w I stopniu skali wg He u 6 (60%) zwierząt. Zaledwie 2 (20%) szczury w grupie kontrolnej uzyskały taki wynik ( $p = 0,0053$ ). W grupie G4 tylko 1 szczur został oceniony w I stopniu skali. Wszystkie szczury w grupie G3 zostały oszacowane w wyższych stopniach niż I stopień skali wg He (ryc. 15).

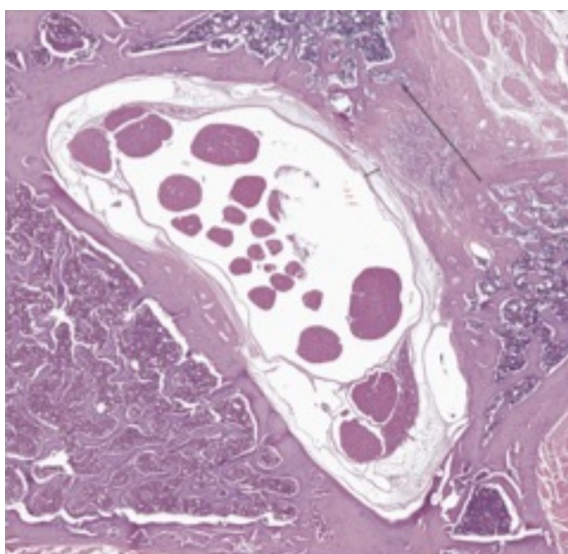




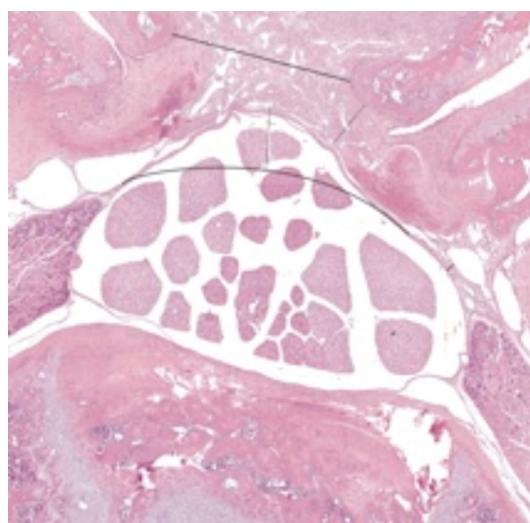
A



B

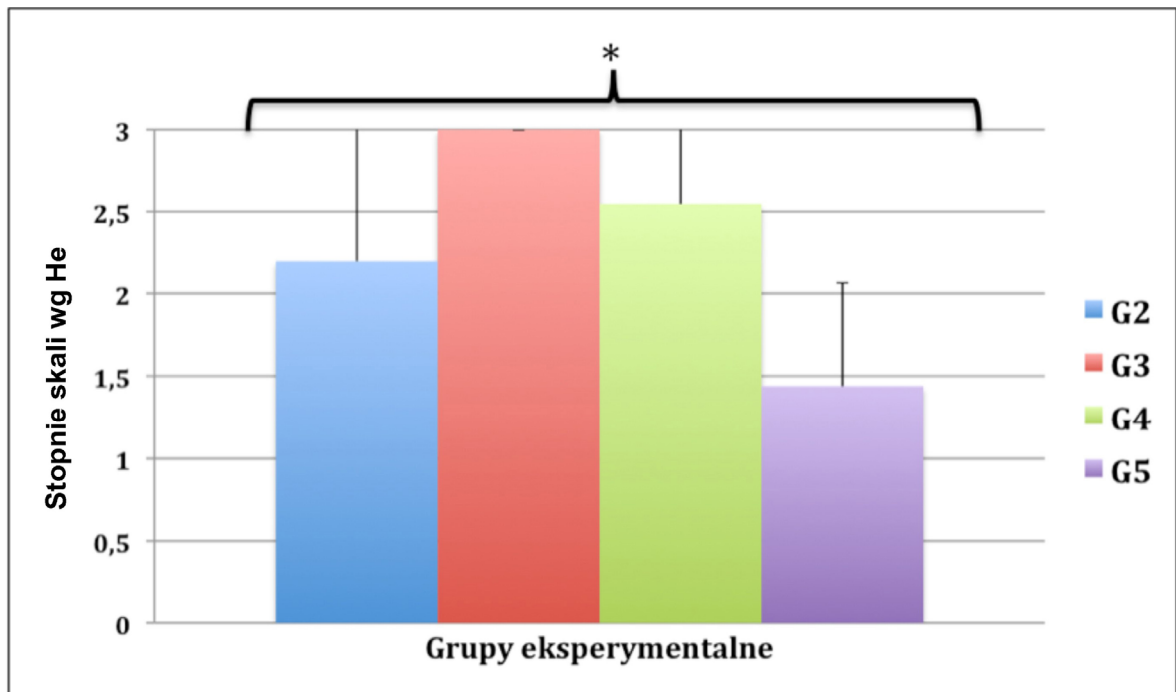


C



D

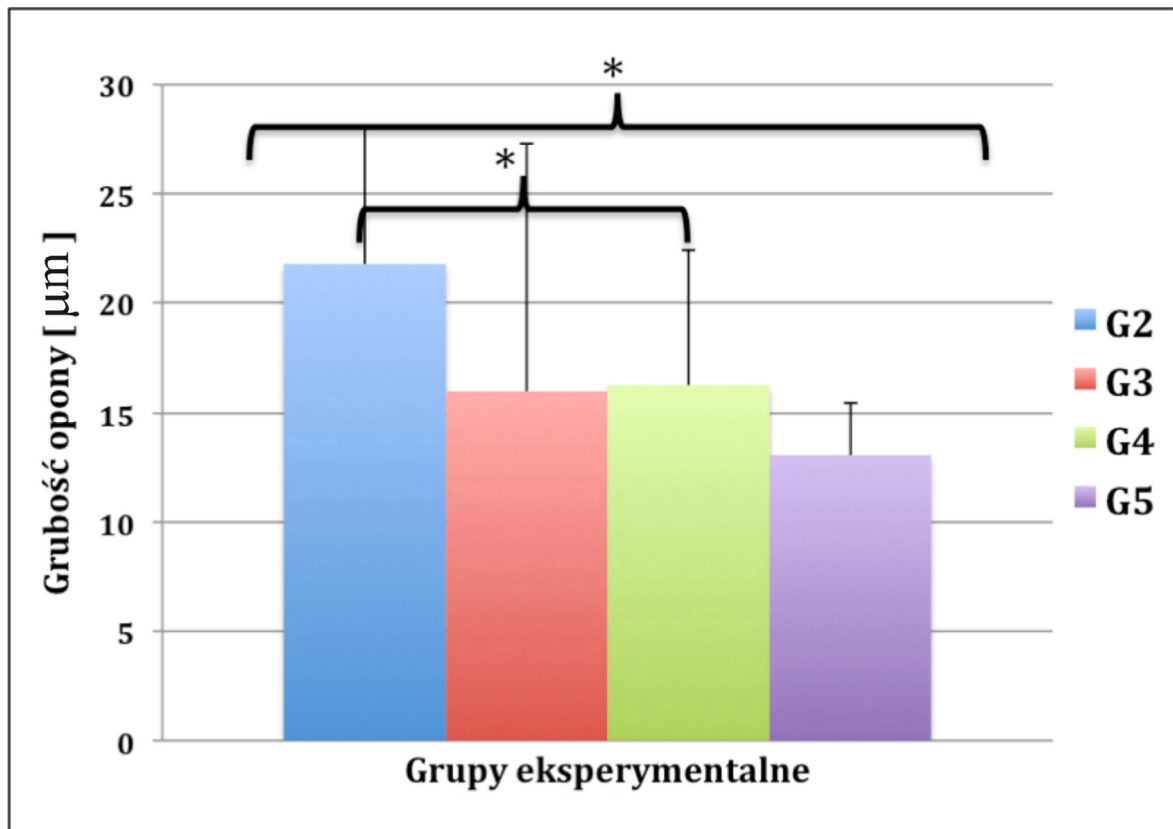
**Rycina 14.** Przekroje poprzeczne kregosłupa lędźwiowego na poziomie L5 odpowiednio w: A – grupa G3 (szczur nr 2), B – grupa G4 (szczur nr 4), C – grupa G5 (szczur nr 8), D – grupa G6 (szczur nr 2). W G5 (quercetyna zastosowana enteralnie) obserwowano mniej rozległą blizną, oraz cieńszą oponę w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie G6 z TachoCombem wykazano statystycznie cieńszą oponę, natomiast rozległość blizny była porównywalna do grupy kontrolnej. H+E (10x).



\*  $p < 0,05$

**Rycina 15.** Rozległość blizny nadoponowej w skali wg He w eksperymencie drugim. Quercetyna podawana enteralnie (grupa G5) statystycznie istotnie zmniejszyła rozległość blizny w porównaniu do wszystkich innych grup badawczych.

Dodatkowo w grupie G5 z quercetyną podawaną enteralnie szczury miały najcieńszą oponę twardą spośród wszystkich innych grup badawczych ( $21,8 \pm 6,3 \mu\text{m}$ ,  $16 \pm 11,31 \mu\text{m}$ ,  $16,27 \pm 6,17 \mu\text{m}$ ,  $13,06 \pm 2,41 \mu\text{m}$ , odpowiednio dla grup od G2 do G5;  $p = 0,0168$ ). Grupa G4 z quercetyną zastosowaną miejscowo również wykazywała mniejsze wartości pomiaru grubości opony twardej w porównaniu z grupą kontrolną ( $p = 0,0319$ ) (ryc. 16). W przeprowadzonych badaniach statystycznych nie wykazałem istotnych różnic w częstości występowania zrostów pajęczynówki (odpowiednio 67%, 77%, 67% i 60% dla grup G2, G3, G4, G5;  $p = 0,63$ ). Podobnie nie występowały różnice w liczbie neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych zliczanych na jednym preparacie histologicznym ( $385,57 \pm 63,51$ ,  $367,78 \pm 45,93$ ,  $346,5 \pm 25,45$ ,  $371,0 \pm 35,59$  odpowiednio dla grup G2, G3, G4, G5;  $p = 0,4395$ ). Rozległość blizny w ocenie skali wg He nie miała wpływu na grubość opony twardej w grupach G3, G4, G5 w przeciwieństwie do grupy G2 gdzie taka zależność została zaobserwowana (dane z eksperymentu pierwszego). Rozległość blizny dodatnio korelowała z wydłużeniem latencji I składowej SSEP w grupach gdzie zastosowano quercetynę doustnie (G4) lub miejscowo



\*  $p < 0,05$

**Rycina 16.** Wyniki pomiarów grubości opony twardej w eksperymencie drugim. W grupie z quercetyną podawaną enteralnie (G5) zaobserwowano najcieńszą oponę twardą spośród wszystkich innych grup badawczych. Natomiast grupa z quercetyną podawaną miejscowo (G4) miała cieńszą oponę w porównaniu do grupy kontrolnej (G2).

(G5) (odpowiednio  $p = 0,5274$ ,  $p = 0,0047$ ). Dodatkowo stwierdzono podobną zależność sumarycznie dla wszystkich grup zwierząt z eksperymentu drugiego zarówno dla latencji I składowej SSEP ( $p = 0,5445$ ,  $p = 0,0009$ ) jak i latencji II składowej ( $p = 0,4939$ ,  $p = 0,0030$ ). Wykonane dalsze obliczenia statystyczne wykazały, że grubość opony twardej nie miała wpływu na inne parametry histologiczne jak i elektrofizjologiczne w eksperymencie drugim.

#### 4.4.3 Eksperyment trzeci

Rozległość blizny nadoponowej nie uległa zmianie po zastosowaniu TachoCombu. U 5 (56%) zwierząt z grupy G6 blizna została oceniona na 3 stopień skali wg He, natomiast w grupie kontrolnej (G2) tylko 4 (40%) szczury miały najbardziej rozległą bliznę (III stopień skali wg He) ( $p = 0,8078$ ). Jednakże w grupie G6 zaobserwowano



znacząco cieńszą oponę twardą w porównaniu z grupą kontrolną (G2) ( $p = 0,0452$ ) (tab. V). W przestrzeni nadoponowej stwierdzono obecność pianki fibrynowej ulegającej biodegradacji z udziałem wielojądrowych komórek typu odczynu wokoło ciała obcego. Obecność zrostów pajęczynówki wykazano w 7 (78%) przypadkach, a liczba neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych ( $358,89 \pm 36,42$ ) nie różniła się znacząco w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie kontrolnej (G2) zrosty pajęczynówki odnotowano w 7 (70%) przypadkach, a liczba neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych wynosiła  $385,57 \pm 63,51$ ). Wyższa amplituda II składowej SSEP występowała u zwierząt u których również stwierdzono bardziej rozległą bliznę w skali wg He ( $p = 0,5863$ ,  $p = 0,0052$ ).

**Tabela V.** Ocena histologiczna opony twardej i neuronów w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w eksperymencie trzecim w grupach doświadczalnych G2 i G6

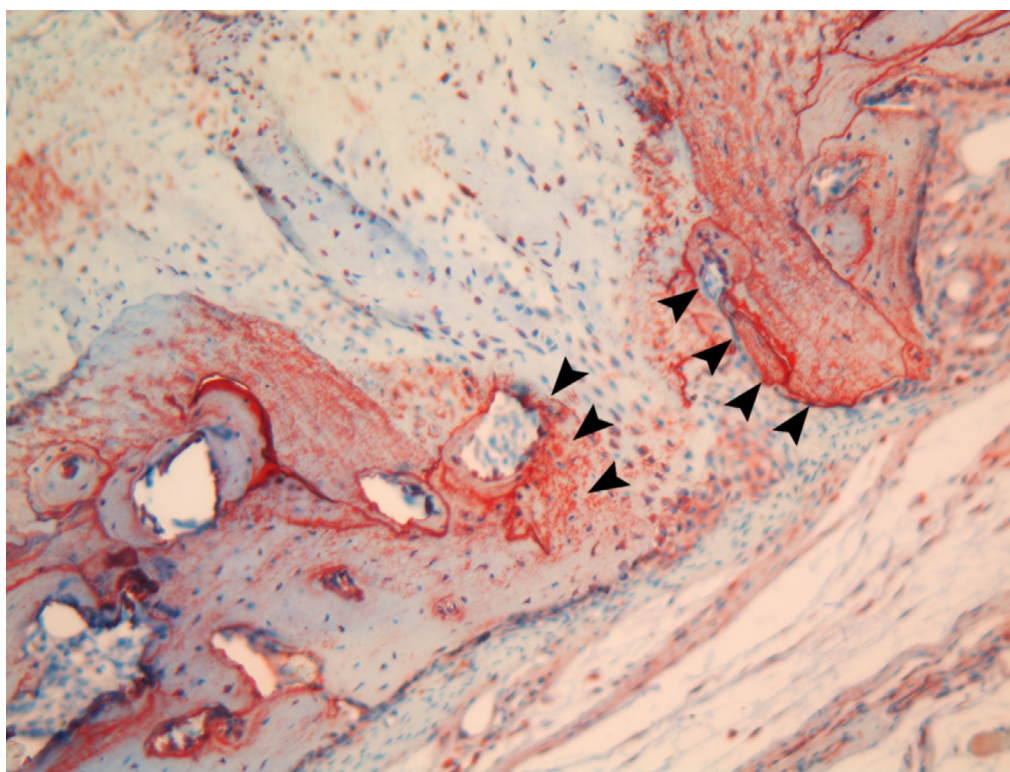
Grupa doświadczalna	Grubość opony [ $\mu\text{m}$ ]	Liczba neuronów w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych
<b>G2</b> (n=9)	$21,8 \pm 6,3$	$385,57 \pm 63,51$
<b>G6</b> (n=9)	$16,31 \pm 4,59$	$358,89 \pm 36,42$
<b>p</b>	<b>0,0452*</b>	0,2628

\*  $p < 0,05$

## 4.5 Ocena immunohistochemiczna

### 4.5.1 Eksperyment pierwszy

Ekspresja OPN była zawsze obecna w tkance kostnej grupy doświadczalnej bez laminektomii (G1), również słaba ekspresja została także zaobserwowana w korzeniach nerwowych ogona końskiego (3 szczury) oraz naczyniach krwionośnych przestrzeni nadoponowej. W 4 przypadkach w obu grupach (G1 i G2), odpowiednio w 40% i w 44% wystąpiło pozytywne barwienie na OPN w więzadłach żółtych. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję OPN w miejscu granic kostnych laminektomii (miejsce odbudowy kości) w grupie G2 w porównaniu do łuków kręgowych w grupie zwierząt bez laminektomii (G1) (ryc.17). Analizując pozostałe badane obszary preparatów immunohistochemicznych zwraca uwagę zwiększona ekspresja OPN w każdym z nich w grupie G2 (tab. VI). Immunoreaktywność dla OPN była obecna w bliźnie nadoponowej, zarówno w samej tkance włóknistej jak i naczyniach krwionośnych blizny u 6 z 9 zwierząt



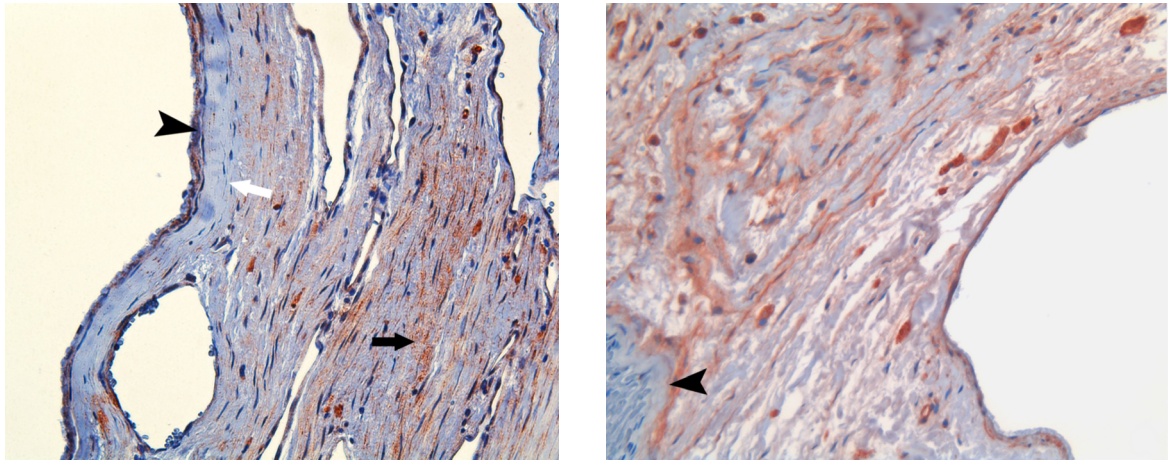
**Rycina 17.** Przykładowy obraz histologiczny ekspresji OPN w tkance kostnej u zwierzęcia po laminektomii. Wysoka ekspresja OPN (zaznaczona grotami) w tkance kostnej otaczającej miejsce laminektomii – grupa G5 (szczur nr 4). Immunohistochemia OPN (20x).

**Tabela VI.** Ocena półilościowa intensywności ekspresji OPN w eksperymencie pierwszym w grupach doświadczalnych G1 i G2

Grupa doświadczalna	Opona twarda i pajęczka	Blizna	Tkanka włóknista otworu międzykręgowego	Więzadło żółte	Naczynia krwionośne blizny	Zrosty pajęczynówki	Korzenie nerwów rdzeniowych
<b>G1 (n=10)</b>							
0	0	-	6	6	-	0	7
1	1	-	4	4	-	0	3
2	0	-	0	0	-	0	0
3	0	-	0	0	-	0	0
<b>G2 (n=9)</b>							
0	2	3	1	5	3	2	2
1	5	5	4	1	3	4	7
2	2	1	3	2	3	0	0
3	0	0	1	1	0	0	0
<b>p</b>	<b>0,0054</b>	* -	<b>0,0238*</b>	0,1057	-	<b>0,0013**</b>	<b>0,0332*</b>

Ocena półilościowa ekspresji OPN: 0 - brak barwienia, 1 - słabe barwienie, 2 - średnia barwienie, 3 - silne barwienie

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$



A

B

**Rycina 18.** Przykładowe preparaty obrazujące ekspresję OPN w tkankach kanału kręgowego. A – grupa G2 (szczur nr 3), intensywna ekspresja OPN w przestrzeni nadoponowej - bliźnie nadoponowej (czarna strzałka). Dodatkowo obecne są OPN pozytywne zrosty pajęczynówki (czarny grot) oraz pogrubienie opony twardej. B – grupa G2 (szczur nr 10), ekspresja OPN w tkance otaczającej korzeń nerwowy / zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w otworze międzykręgowym (czarny grot). Immunohistochemia OPN (20x).

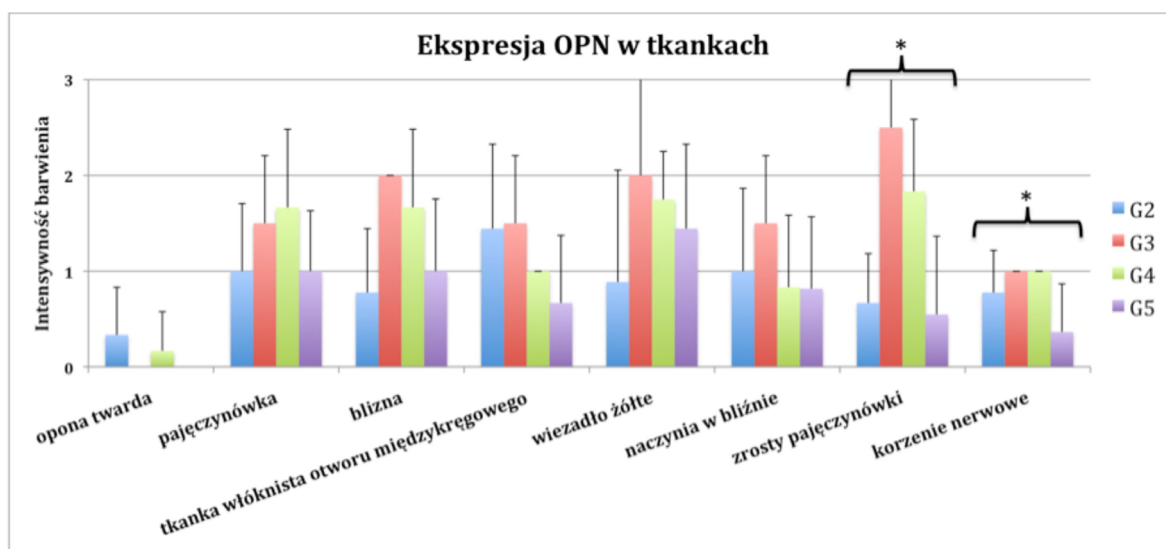
(67%) (ryc. 18). Jednakże nie wykazano zależności pomiędzy rozległością blizny w skali wg He, a intensywnością ekspresji OPN w bliźnie ( $p = 0,296$ ,  $p = 0,326$ ). W grupie G2 wykazano statystycznie istotnie zwiększoną ekspresję OPN w oponach twardej i pajęczej w porównaniu do zwierząt w grupie G1 ( $p = 0,0054$ ). Spośród 6 zwierząt ze zrostami pajęczynówki w grupie G2 w 4 przypadkach były one OPN immunoreaktywne, natomiast w grupie bez laminiektomii (G1) w żadnym ze zrostów nie obserwowano ekspresji OPN ( $p = 0,0013$ ). Obecność ekspresji OPN w tkance włóknistej otaczającej korzenie ze zwojami czuciowymi w otworze międzykręgowym była tak samo częsta jak w samej bliźnie nadoponowej, jednakże intensywność ekspresji była znacząco zwiększona w stosunku do grupy G1 ( $p = 0,0238$ ). Jednocześnie zaobserwowano zwiększoną intensywność barwienia OPN wewnątrzoponowo (korzenie nerwowe ogona końskiego) w grupie zwierząt poddanej laminiektomii (G2) ( $p = 0,0332$ ). Liczba OPN immunoreaktywnych neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych była istotnie zwiększona w grupie G2 w porównaniu do zwierząt w grupie G1 ( $p = 0,0002$ ,  $43,041 \pm 3,706$  vs  $21,227 \pm 3,481$ ). Liczba reaktywnych OPN neuronów pozytywnie korelowała z rozległością blizny wyrażonej w skali wg He ( $\rho = 0,59$ ,  $p = 0,021$ ) oraz z intensywnością ekspresji OPN w bliźnie nadoponowej ( $\rho = 0,699$ ,  $p = 0,004$ ). Natomiast, nie wykazano zależności pomiędzy liczbą OPN pozytywnych neuronów,

a grubością opony ( $r = 0,806$ ,  $p = 0,194$ ), intensywnością ekspresji OPN wokół zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych ( $\rho = -0,369$ ,  $p = 0,176$ ) oraz amplitudą składowej I ( $r = 0,583$ ,  $p = 0,417$ ) i amplitudą składowej II SSEP ( $r = 0,659$ ,  $p = 0,341$ ). Podobnie latencja I i II składowej SSEP także nie miała statystycznie znamiennej zależności z ilością OPN pozytywnych neuronów.

Liczba naczyń krwionośnych w bliźnie wahała się pomiędzy 33 a 59 na jednym preparacie ( $46,78 \pm 8,983$ ). Nie znaleziono statystycznie znamiennej zależności pomiędzy ilością naczyń w bliźnie nadoponowej, a rozległością blizny w skali wg He, amplitudą składowych I i II, latencją składowych I i II SSEP oraz grubością opony twardej. Jednakże, liczba naczyń dodatnio korelowała z liczbą OPN pozytywnych neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych ( $\rho = 0,548$ ,  $p = 0,034$ ).

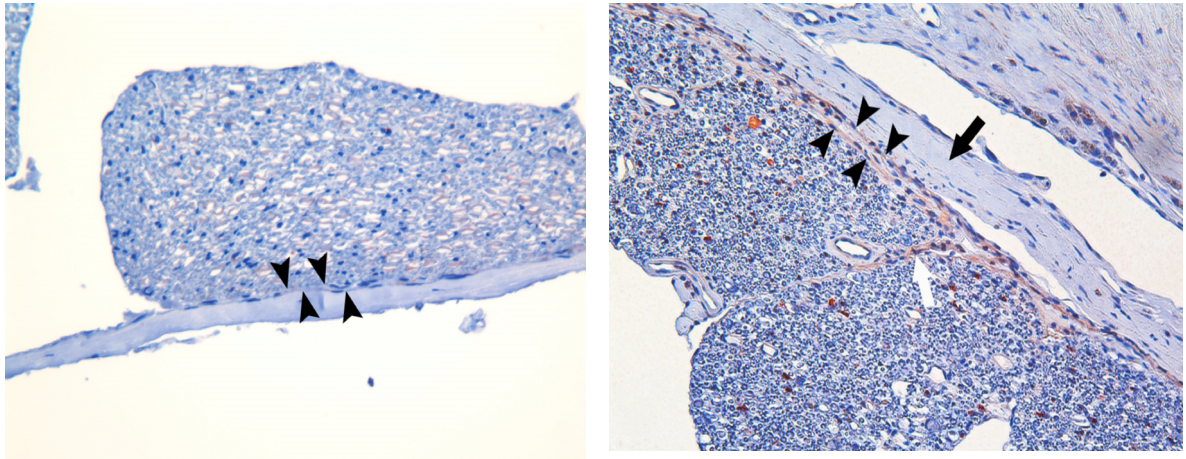
#### 4.5.2 Eksperyment drugi

Grupa doświadczalna z quercetyną stosowaną enteralnie (G5) miała słabszą ekspresję OPN w korzeniach ogona końskiego (uśrednione wyniki oceny półilościowej ekspresji OPN wynosiły: 0,78, 1, 1, 0,36 odpowiednio dla grup G2, G3, G4, G5;  $p = 0,0106$ ) oraz zrostach pajęczynówki z oponą twardą i korzeniami nerwów rdzeniowych (0,67, 2,5, 1,83, 0,55 odpowiednio dla grup G2, G3, G4, G5;  $p = 0,0112$ ) (ryc. 19 i 20). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami G2, G3, G4, G5



**Rycina 19.** Ocena półilościowa intensywności ekspresji OPN w eksperymencie drugim w grupach doświadczalnych G2 ( $n=9$ ), G3 ( $n=9$ ), G4 ( $n=6$ ) i G5 ( $n=10$ ). Zaobserwowano statystycznie mniejszą ekspresję OPN w korzeniach nerwów rdzeniowych i zrostach pajęczynówki w grupie G5. \*  $p < 0,05$ .



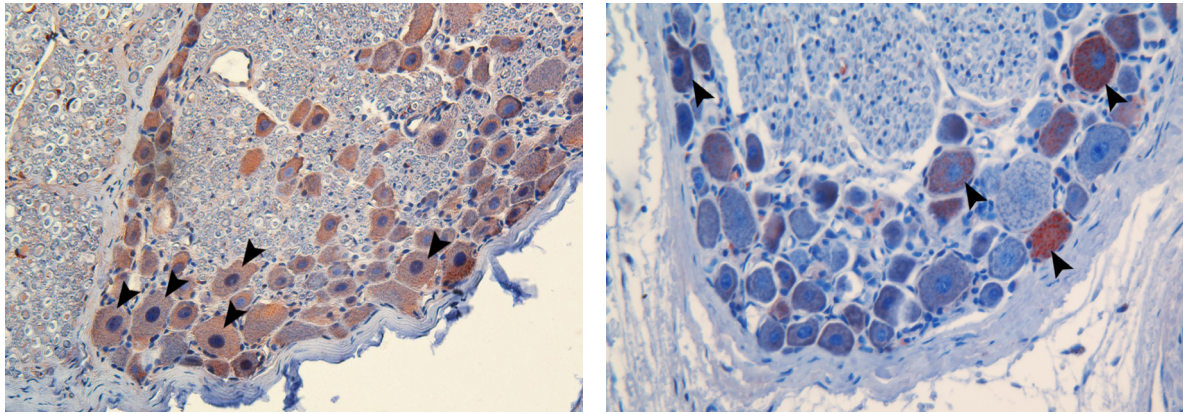


A

B

**Rycina 20.** Ekspresja OPN w zrostach pajęczynówki i korzeniach nerwowych w eksperymencie drugim. A - W grupie z quercetyną zastosowaną enteralnie (G5, przykładowy preparat - szczur nr 9) zrosty korzeni nerwowych z pajęczynówką (oraz oponą twardą) były OPN negatywne (czarne grotki). Natomiast w przypadku prewencji blizny quercetyną stosowaną miejscowo (G4, przykładowy preparat - szczur nr 6), ale także w innych grupach (G2, G3, G6) zaobserwowano OPN pozytywne zrosty korzeni nerwowych z pajęczynówką oraz pomiędzy korzeniami nerwowymi (czarne grotki) współlistniejące z pogrubieniem opony twardej (strzałka) - B. Immunohistochemia OPN (20x).

w intensywności barwienia dla OPN w pozostałych ocenianych strukturach: oponie twardej (0,33, 0, 0,17, 0;  $p = 0,1067$ ), pajęczynówce (1, 1,5, 1,7, 1;  $p = 0,6619$ ), błonie (0,78, 2, 1,67, 1;  $p = 0,1952$ ), naczyniach krwionośnych blizny (1, 1,5, 0,83, 0,82;  $p = 0,8464$ ), więzadłach żółtych (0,89, 2, 1,75, 1,44;  $p = 0,1182$ ) oraz tkance włóknistej otaczającej zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych (1,44, 1,5, 1, 0,67;  $p = 0,2332$ ). W grupie G5 wykazano statystycznie znamienne większy procent OPN pozytywnych neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych 81,53% w porównaniu do grup G2 35,8%, G3 39% i G4 55,92% ( $p = 0,0008$ ) (ryc. 21). W grupie w której quercetynę podawano enteralnie (G5) zaobserwowano, że statystycznie krótsze latencje I składowej SSEP występują u zwierząt z większą liczbą OPN pozytywnych neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych ( $\rho = -0,7769$ ,  $p = 0,00399$ ). Podobna zależność występowała, aczkolwiek słabiej wyrażona, gdy analizowano sumarycznie wszystkie grupy (G2, G3, G4, G5) z eksperymentu drugiego ( $\rho = -0,5832$ ,  $p = 0,0111$ ). Dla powyższych grup związek ten istniał także w odniesieniu do latencji II składowej SSEP ( $\rho = -0,5044$ ,  $p = 0,0328$ ). Wysoka liczba OPN pozytywnych neuronów współlistniała z mniej rozległą blizną ( $\rho = -0,5363$ ,  $p = 0,0218$ ).

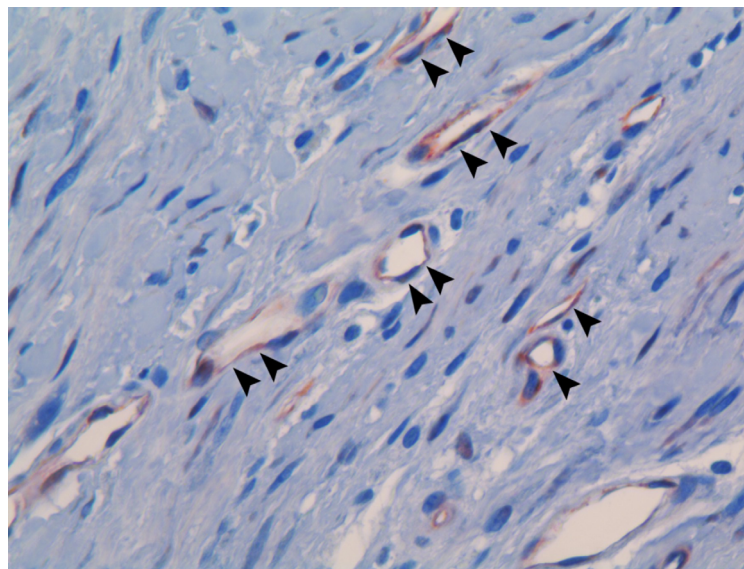


A

B

**Rycina 21.** Ekspresja OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych. Zwiększony odsetek OPN pozytywnych neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych (oznaczone czarnymi grotami) w grupie G5 (szczur nr 3) - A w porównaniu do grupy bez prewencji blizny (G2, szczur nr 6) - B. OPN immunohistochemia (20x).

Spośród badanych grup (G2, G3, G4, G5) najwyższą liczbę naczyń krwionośnych w bliznie wykazano w grupie z quercetyną zastosowaną miejscowo (grupa G4) ( $52,17 \pm 6,85$ ), następnie w grupie kontrolnej (G2) ( $46,78 \pm 8,98$ ) i grupie ze spongostanem (G3) ( $48,53 \pm 9,19$ ), natomiast najmniej naczyń zaobserwowano w grupie z quercetyną podawaną enteralnie (G5) ( $39,9 \pm 9,94$ ) (ryc. 22). Zależność ta jednak nie była statystycznie znamienne ( $p = 0,0819$ ). Ponadto nie znaleziono związku pomiędzy ilością naczyń w bliznie a żadnym innym ocenianym parametrem w grupach G2, G3, G4, G5.

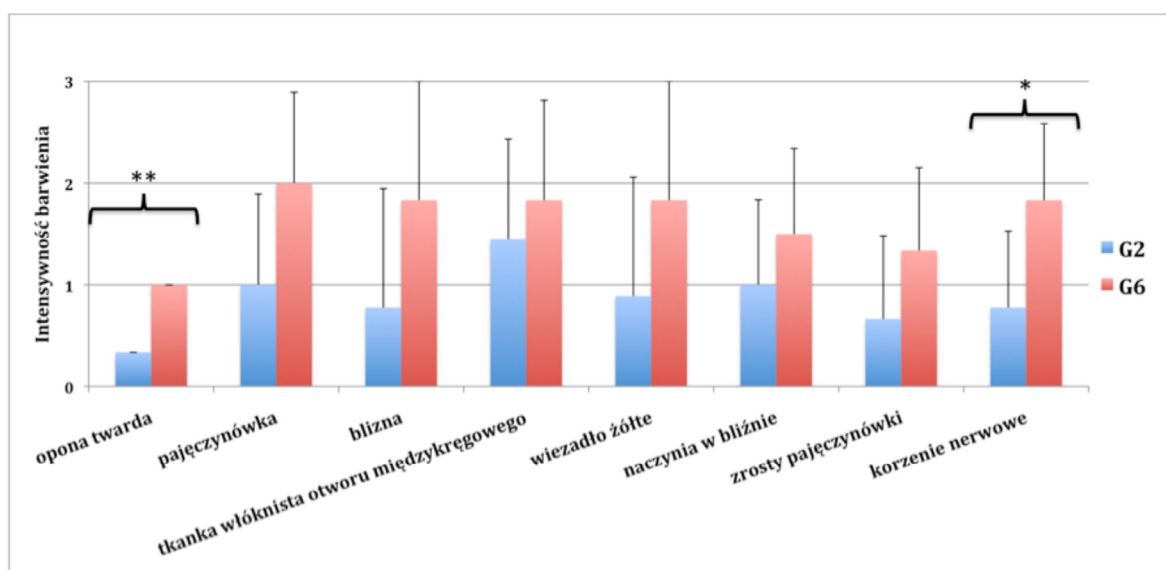


**Rycina 22.** Ekspresja CD31 w śródbłonku naczyń krwionośnych (czarne grotki). Grupa z laminektomią bez prewencji blizny (grupa G2, szczur nr 8). CD31 immunohistochemia (20x).

### 4.5.3 Eksperyment trzeci

W grupie doświadczalnej (G6) zastosowanie TachoCombu spowodowało większą ekspresję OPN w oponie twardej (grupa G6 1,00, grupa G2 0,33;  $p = 0,0031$ ) jak i w korzeniach nerwowych (grupa G6 1,83, grupa G2 0,78;  $p = 0,0137$ ). W pozostałych badanych tkankach nie zaobserwowano istotnych różnic (ryc. 23). Nie wykazano różnic w immunoreaktywności OPN zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa G6 58,8%, grupa G2 35,8%;  $p = 0,1787$ ). Podobnie jak w przypadku prewencji blizny przy pomocy quercetyny tak i w tym - stwierdzono ujemną korelację pomiędzy liczbą OPN pozytywnych neuronów a latencją składowej I SSEP ( $\rho = -0,5606$ ,  $p = 0,0370$ ) oraz latencją składowej II SSEP ( $\rho = -0,5667$ ,  $p = 0,0346$ ). Pozostałe badane zależności nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej.

Liczba naczyń krwionośnych w bliźnie nadoponowej nie różniła się znacząco pomiędzy obiema grupami:  $51,5 \pm 13,14$  i  $46,78 \pm 8,98$ , odpowiednio dla grup G6 i G2 ( $p = 0,4639$ ). W grupie G6 nie stwierdzono również zależności pomiędzy ilością naczyń krwionośnych, a innymi badanymi parametrami.



**Rycina 23.** Ocena półilościowa intensywności ekspresji OPN w eksperymencie trzecim w grupach doświadczalnych G2 ( $n=9$ ) i G6 ( $n=9$ ). Wykazano statystycznie istotną zwiększoną ekspresję OPN w oponie twardej i korzeniach nerwów rdzeniowych w grupie z zastosowanym TachoCombem odpowiednio  $** p < 0,005$  i  $* p < 0,05$ .

## 5. Omówienie

Niepowodzenia operacyjne ("Failed Back Surgery Syndrome"), rozumiane jako nawrót bólu, obserwuje się u około 5-15% pacjentów poddanych laminektomii / discektomii w celu leczenia bólu korzeniowego (189, 190). Rola blizny nadoponowej obecnej w przypadkach słabych wyników chirurgicznych jest przyczyną rozbieżnych poglądów (23-27, 191). Najnowsze badania kliniczne wskazują, że nie występuje korelacja pomiędzy rozległością blizny nadoponowej obserwowanej w badaniu rezonansu magnetycznego a obecnością / nasileniem bólu, co skłania do dalszych badań nad przyczynami nawrotowego bólu.

Od czasów pierwszych badań, od 1948 roku, nad blizną nadoponową (19, 56) stosowano wiele modeli zwierzęcych włączając: króliki (127, 192), psy (90, 193-195), koty (96) oraz szczury (128, 185, 196). Mnogość zaproponowanych modeli doświadczalnych uniemożliwia standaryzację techniki chirurgicznej, metod oceny oraz porównywania rozległości i patomorfologii blizny, a także wyników zastosowanych sposobów prewencji. W swoich badaniach wykorzystywałem model szczury zaproponowany przez He i wsp. (120). Zapewnia on powtarzalność wyników oraz minimalizuje ilość zwierząt w grupie doświadczalnej. Podstawową różnicą w odniesieniu do doświadczeń przeprowadzonych przez He i wsp. (120) było zastosowanie wiertarki wysokoobrotowej do wykonania laminektomii w naszym modelu doświadczalnym w celu zminimalizowania traumatyzacji struktur nerwowych kanału kręgowego oraz zapewnienia lepszej hemostazy niż w przypadku użycia różnego rodzaju kleszczy kostnych (128, 195, 197). Do przeprowadzenia operacji na kręgosłupie szczura niezbędnym jest zastosowanie mikroskopu operacyjnego lub lup chirurgicznych (108, 121, 127, 195, 197). Nabyta przeze mnie praktyka w operacjach na zwierzętach wskazuje, że mikroskop operacyjny zapewnia lepsze oświetlenie, co jest bardzo istotne przy małym polu operacyjnym.

Typy używanych środków anestetycznych różnią się i obejmują najczęściej: pentotal, halotan, podtlenek azotu (121, 128, 195). Mieszanka ketaminy i ksylazyny zapewnia stabilną, łatwo dawkowaną w mg/kg anestezję przez około 2 godziny bez istotnego wpływu na czynność ośrodka oddechowego.

Zastosowanie jednej dawki antybiotyku w celu prewencji antybakteryjnej jest ogólnie zalecane (195, 197). Jednakże, mimo podania antybiotyku zaobserwowaliśmy tworzenie się ropni w ranie operacyjnej. Podczas gdy w innych grupach były to odosobnione przypadki, w grupie z quercetyną podawaną miejscowo było ich szczególnie



dużo, co może wskazywać na uprzednio nie opisywany, bezpośredni wpływ immunosupresyjny quercetyny w tak wysokiej dawce podanej miejscowo. Na podstawie późniejszych doświadczeń własnych z Laboratorium Mikrochirurgicznego Cleveland Clinic wydaje się, iż w przypadku procedur na strukturach kostnych kanału kręgowego uzasadnione jest zastosowanie trzech dawek antybiotyku, co praktycznie eliminuje problem zakażeń ran operacyjnych.

W ocenie klinicznej we wszystkich grupach nie wykazaliśmy trwałych deficytów neurologicznych co było zgodne z naszymi założeniami, gdyż efekt wywoływany przez samą bliznę nadoponową na struktury nerwowe kanału kręgowego i okolicy przykręgosłupowej wydaje się być zbyt subtelny aby był obserwowany (185, 198). Przejściowe trudności (pierwsze 24 godziny) z poruszaniem się u 6 zwierząt wydają się mieć związek z iniekcją anestetyku i antybiotyku domięśniowo. Natomiast neurologiczne objawy ubytkowe są obserwowane w przypadku równoczesnego wykonania laminektomii i uszkodzenia dysku międzykręgowego (199).

Wpływ przepukliny jądra miażdżystego na powstawanie bólu korzeniowego został wyjaśniony przez Olmarkera i wsp. (32-35), którzy wykazali, że kluczowym etapem w patofizjologii rwy kulszowej jest oddziaływanie TNF-alfa, uwalnianego z uszkodzonego jądra miażdżystego na korzenie ze zwojami czuciowymi. Opierając się na tych wynikach oraz udowodnionym brakiem prostej zależności pomiędzy rozległością blizny nadoponowej w kanale kręgowym a objawami zaproponowałem pogląd, iż hipotetycznie blizna nadoponowa może być źródłem bólu poprzez wpływ uwalnianych cytokin zapalnych na korzenie ze zwojami czuciowymi nerwów rdzeniowych, raczej niż poprzez ucisk lub też unieruchomienie korzenia nerwowego przez tkankę bliznowatą. Dodatkowo, korzenie ze zwojami czuciowymi nerwów rdzeniowych są w anatomicznej bliskości z tworzącą się pooperacyjną blizną nadoponową, co jeszcze bardziej uprawdopodabnia taki mechanizm patofizjologiczny.

W warunkach fizjologicznych ekspresja OPN jest obserwowana w tkance kostnej odzwierciedlając nieustające procesy resorpcji kości i kościotworzenia. Wzrost ekspresji OPN następuje podczas gojenia się złamań kości kiedy dochodzi do zwiększonej produkcji tkanki kostnej (200, 201). W naszym modelu doświadczalnym intensywna ekspresja OPN została zaobserwowana na granicy laminektomii, wskazując na wzrost kości dążący do zamknięcia ubytku, do czego doszło w jednym przypadku w grupie G2. Istnieje znacząca różnica pomiędzy modelami doświadczalnymi opartymi na małych zwierzętach (głównie szczury) a ludźmi, gdzie generalnie nie dochodzi do całkowitego zamknięcia defektu

kostnego po operacji wykonanej drogą laminektomii (193, 200, 201). Rozległość tworzącej się blizny była nieco mniejsza w porównaniu do badania He i wsp. (120), na którym się opieraliśmy. Różnica ta może wynikać z zastosowania bardziej atraumatycznej techniki mikrochirurgicznej (wiertarka wysokoobrotowa) (202) oraz pozostawienia nienaruszonych stawów międzykręgowych kręgosłupa. Niestabilność kręgosłupa oraz stan zapalny stawów międzykręgowych uprzednio łączono z nadmiernym bliznowaceniem w przestrzeni nadoponowej oraz objawami neurologicznymi korzeniowymi (108, 192). Opona twarda jest w bezpośrednim kontakcie z tworzącą się blizną, w wyniku czego następuje jej odczynowe pogrubienie, co było również zaobserwowane przez Cemil i wsp. (203).

Zwiększona ekspresja OPN w bliźnie nadoponowej jest analogiczna do zwiększonej ekspresji OPN w przypadkach zwłóknienia narządów wewnętrznych, gdzie OPN wykazuje synergistyczne działanie z TGF - beta 1 i wpływa na proliferację fibroblastów, tworzenie matriks zewnątrzkomórkowego, adhezję do matriks zewnątrzkomórkowego i przetrwanie komórek (204). Rozległość blizny mierzona w skali wg He nie korelowała z aktywnością włóknienia wyrażoną intensywnością ekspresji OPN w bliźnie. Jednakże, wpływ zewnątrzoponowo umiejscowionego stanu zapalnego i zwłóknienia na oponę twardą został potwierdzony poprzez obecność grubszej opony oraz zwiększoną ekspresję OPN w oponach w grupie zwierząt z laminektomią (G2).

Nie wykazałem zwiększonej liczby szczurów ze zrostami w obrębie pajęczynówki w grupie zwierząt po wykonaniu laminektomii (grupa G2) w porównaniu do grupy doświadczalnej bez otwarcia kanału kręgowego (G1). Wcześniej takie obserwacje były opisywane w innych badaniach doświadczalnych (63, 123). Natomiast u 2/3 zwierząt z grupy po otwarciu kanału kręgowego (G2) zaobserwowałem OPN pozytywne zrosty pajęczynówki, a nie miały one miejsca u żadnego szczura w grupie G1 – bez otwarcia kanału kręgowego. W swoich badaniach odnotowałem również zwiększoną ekspresję OPN wewnątrzoponowo w korzeniach nerwowych ogona końskiego. Obie obserwacje jasno potwierdzają obecność aktywnego włóknienia pomiędzy pajęczynówką, korzeniami nerwowymi i oponą twardą oraz są dowodem wpływu nadoponowego stanu zapalnego oraz zwłóknienia na struktury anatomiczne wewnątrzoponowe. Wykazanie pozytywnej ekspresji OPN, może również znacząco pomóc w rozróżnieniu prawdziwych zrostów pajęczynówki od artefaktów powstałych podczas przygotowywania preparatów histologicznych.

Wysoka ekspresja OPN w moich badaniach miała również miejsce w śródbłonku naczyń krwionośnych blizny. Poprzednie badania łączyły wysoką OPN

immunoreaktywność endotelium ze zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych oraz chemotrakcją obwodowych komórek zapalnych (127). Zwiększona przepuszczalność naczyń krwionośnych po laminiektomii była poprzednio opisana przez Nakano i wsp. (205) i współistniała z tworzącymi się zrostami pajęczynówki. Wpływ laminiektomii i tworzenia się nadoponowej blizny na elementy nerwowe kanału kręgowego wykazałem zarówno w badaniach elektrofizjologicznych, histologicznych, jak i immunohistochemicznych. Statystycznie znamiennej utrata amplitudy I i II składowej SSEP potwierdza uprzednio opublikowane wyniki (28), jednakże w swoich badaniach nie stwierdziłem zależności pomiędzy tymi obserwacjami a rozległością blizny.

Ekspresja OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych u zwierząt bez laminiektomii (grupa G1) była porównywalna do wyników poprzednio publikowanych, gdzie u nieoperowanych myszy i szczurów zaobserwowano, że do 25% neuronów jest OPN pozytywnych, głównie dużych neuronów będących prawdopodobnie mechanoreceptorami (75). Po aksotomii na modelu mysim następuje zwiększona transkrypcja OPN (zwiększenie OPN mRNA o około 35%), która utrzymuje się przez około 3 tygodnie. Natomiast liczba OPN pozytywnych neuronów nie ulegała zmianie (75). W swoich badaniach 6 tygodni po operacji obserwuję znamiennej dwukrotny wzrost liczby OPN immunoreaktywnych neuronów w odpowiedzi na laminiektomię. W poprzednich badaniach stwierdzono zwiększoną ekspresję OPN po uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego (zarówno mózgu, jak i rdzenia kręgowego), jednakże efekt ten był obserwowany głównie w makrofagach i komórkach glejowych (76, 79, 80). U zwierząt bez genu dla OPN („OPN knock-out”) występuje znacząco większa utrata istoty białej jak i neuronów po urazie rdzenia kręgowego w porównaniu do „dzikiego” genotypu (80). Ekspresja OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych korelowała z rozległością blizny oraz ilością naczyń krwionośnych w bliźnie. Prawdopodobnie zależność ta odzwierciedla możliwy wpływ zwiększonego „ładunku” cytokin prozapalnych w przestrzeni nadoponowej (intensywne włóknienie) jak i „ładunku” komórek prozapalnych (bogate unaczynienie blizny) na korzenie ze zwojami czuciowymi nerwów rdzeniowych (127). Z drugiej jednak strony unaczynienie blizny może mieć także odwrotny efekt, a mianowicie zapobieganie niedokrwieniu, które też jest opisywaną przyczyną bólu korzeniowego (205, 206). Dodatkowo intensywna ekspresja OPN w tkance otaczającej korzeń i zwój czuciowy korzenia nerwu rdzeniowego w otworze międzykręgowym uprawdopodobnia teorię „uwięźnięcia korzenia nerwowego” jako jednej ze składowych w patologii nawrotowego bólu (14, 105, 118). W eksperymencie

pierwszym nie udowodniłem zależności pomiędzy wykładnikami histologicznymi i immunohistochemicznymi blizny, a zaburzeniami funkcjonalnymi opisywanymi w świetle uzyskanych wyników SSEP.

Zastosowanie quercetyny będącej znanym składnikiem diety o udowodnionej wielorakiej skuteczności w zapobieganiu zwłóknieniu narządów (140, 143, 144) oraz działaniu neuroprotektynnym wydaje się być bardzo atrakcyjną potencjalną terapią pooperacyjnej blizny nadoponowej. Najnowsze badania sugerują również, iż quercetyna może skutecznie zmniejszać rozległość uszkodzeń tkanki nerwowej po urazach rdzenia kręgowego (207-209). W naszym badaniu quercetyna zastosowana miejscowo (nasączona quercetyną pianka fibrynowa) spowodowała nieakceptowalnie wysoki odsetek zakażeń ran operacyjnych mimo zastosowania antybiotyku. Prawdopodobnie bardzo wysoka dawka quercetyny spowodowała zaburzenie w gojeniu się rany i ułatwiła wystąpienie zakażenia. Co ciekawe, quercetyna zastosowana lokalnie okazała się wcześniej skuteczna w leczeniu ropnych zmian dziąseł, jamy ustnej (210). Obecnie trwają badania nad zastosowaniem quercetyny w opatrunkach biopolimerowych gdzie wykorzystywane jest jej działanie przeciwzapalne (211). Dotychczas jednak nie opublikowano wyników zastosowania tego typu opatrunku.

Pomimo powikłań ropnych u 4 zwierząt, u pozostałych 6 w grupie G4 odnotowałem pozytywny efekt zastosowania quercetyny pod postacią braku utraty amplitudy składowej I SSEP, typowej u zwierząt w grupie kontrolnej (G2). Nie wykazałem wpływu quercetyny na rozległość blizny nadoponowej, jednakże zaobserwowałem jej pozytywny efekt na grubość opony twardej.

Lokalna aplikacja środka hamującego bliznę była wcześniej opisywana przez wielu autorów. Najczęściej stosowano mitomycynę - C oraz 5 - fluorouracyl poprzez jednorazową aplikację nasączonym bawełnianym gazikiem (82, 123, 196, 212, 213). Oba te preparaty działają poprzez hamowanie podziałów komórkowych. Metoda ta okazała się skuteczna pod względem redukcji blizny oraz zmniejszenia adhezji blizny do opony twardej co ułatwiało reoperację (196). Podjęto próbę zastosowania cyklosporyny A, jednakże nie wykazano pozytywnego efektu po jej aplikacji (123). Cemil i wsp. (203) stwierdzili, że zastosowanie pimekrolimusu (immunosupresant) ma podobny efekt jak mitomycyna - C. Pimekrolimus zmniejsza rozległość blizny oraz zapobiega odczynowemu pogrubieniu opony twardej. Wszystkie te preparaty charakteryzują się bardzo silnymi właściwościami biologicznymi, które mogą prowadzić do powikłań zarówno miejscowych (upośledzone gojenie rany, płynotok płynu mózgowo-rdzeniowego z rany operacyjnej)

oraz ogólnych (immunosupresja). Wydaje się, iż szczególnie ryzykowne byłoby zapobieganie bliźnie przy użyciu tych środków w przypadkach wielopoziomowej laminektomii (potrzeba zastosowania stosunkowo wysokiej dawki leku) oraz uszkodzenia opony twardej podczas operacji (przenikanie leku do płynu mózgowo-rdzeniowego, upośledzenie gojenia opony twardej). Emmez i wsp. (126) zaproponowali zastosowanie interferonu gamma z pozytywnym efektem. Jednakże sposób aplikacji - trzydniowa infuzja bezpośrednio do rany praktycznie eliminuje tą metodę z zastosowań klinicznych. Gerszten i wsp. w swojej pracy na szczurach i psach (128, 129) zaproponowali zastosowanie jednej dawki promieniownia (700 cGy) na 24 godziny przed wykonaniem laminektomii w celu prewencji powstawania blizny. Po zastosowaniu takiej terapii zaobserwowano spadek liczby fibroblastów w bliźnie, mniejszą bliznę a także mniej zrostów w obrębie opony pajęczej. Nie stwierdzono powikłań związanych z gojeniem się rany. Mimo udowodnionej skuteczności metody mało prawdopodobne jest zastosowanie kliniczne tej techniki ze względu na możliwe powikłania (indukcja nowotworów, upośledzenie gojenia rany), a także aspekt ekonomiczny (127). Podobne badanie przeprowadzili Bora i wsp (127) z zastosowaniem dawki promieniowania 900 cGy i zaobserwował podobny efekt jak po zastosowaniu membrany Preclude (GoreTex).

Na obecnym etapie badań, ze względu na wysoki odsetek zakażeń ran operacyjnych, zastosowanie quercetyny miejscowo w prewencji blizny w opisywanej dawce i sposobie podania nie wydaje się mieć uzasadnienia. Jednakże, nie jest wykluczone, że po modyfikacji dawki oraz techniki podania można będzie spodziewać się dobrych wyników.

Spośród potencjalnych metod prewencji blizny stosowanych ogólnie jedynie sterydy i niesterydowe środki przeciwzapalne poddane zostały testom laboratoryjnym. Obie te grupy leków zmniejszają odczyn zapalny związany z gojeniem się rany poprzez inhibicję produkcji prostaglandyn. Nakano i wsp. (121) stwierdzili podobny pozytywny wpływ indometacyny i metylprednizolonu na przepuszczalność naczyń krwionośnych w przestrzeni nadoponowej i podoponowej kanału kręgowego oraz obserwowali mniejszą liczbę zrostów pajęczynówki. W tej pracy indometacyna była zastosowana eksperymentalnie w dawce przekraczającej dawkę terapeutyczną u człowieka. Ponadto, nie poddano ocenie samej blizny oraz zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych. Nie stwierdzono natomiast objawów niepożądanych po zastosowaniu sterydów. Podjęto również próbę zastosowania sterydów miejscowo, co skutkowało powstawaniem krwiaków w miejscu laminektomii, opóźnieniem gojenia ran i powstawaniem ropni (89).

He i wsp. (120) zastosowali ketoprofen, przez 7 dni po laminiektomii i zaobserwowali zmniejszoną liczbę komórek zapalnych, mniejszą powierzchnię blizny i osłabienie kościotworzenia. Co ciekawe nie wykazali oni prewencyjnego efektu jeśli chodzi o rozległość blizny (wg skali przez nich zaproponowanej i używanej także w tej pracy). Dodatkowo efekt działania ketoprofenu był krótkotrwały, gdyż 90 dni po operacji ilość komórek zapalnych była większa właśnie w tej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono również zwiększoną częstość występowania powierzchownych krwiaków (znany efekt niesterydowych leków przeciwzapalnych blokujący szlak cyklooksygenazy płytkowej). Osłabienie kościotworzenia, poprzez inhibicję produkcji prostaglandyn, jest szczególnie niepożądane w procedurach operacyjnych wykonywanych z zamiarem uzyskania artrodezy pomiędzy operowanymi segmentami kręgosłupa.

Podsumowując powyższe fakty należy stwierdzić, że obecnie nie istnieje skuteczna i bezpieczna metoda zapobiegania pooperacyjnej bliznie nadoponowej mogąca być zastosowana ogólnie. Mimo to ten typ prewencji ma zdecydowane zalety w porównaniu do działania miejscowego takie jak: brak problemu biokompatybilności, łatwość zastosowania, możliwość przerwania terapii w dowolnym momencie bez potrzeby reoperacji.

Quercetyna była wcześniej badana na zwierzęcych modelach doświadczalnych w różnych patologiach, głównie zwłóknieniu płuc, nerek, wątroby a także urazach rdzenia kręgowego (140, 143, 144, 207-209). W pracach tych najczęściej stosowano dawkę 10 mg/kg do 32 mg/kg (144, 207-209, 214), którą zastosowaliśmy w tej pracy ze względu na podobną drogę podania, dobrą skuteczność i brak działań nieporządanych (144). Przeprowadzono także badanie kliniczne u ludzi oceniające efekt zastosowania quercetyny w infekcji górnych dróg oddechowych. Podawano dawkę 1000 mg dziennie przez 12 tygodni, co jest od 10 do 20 razy większą dawką, niż średnie dzienne spożycie. Nie zaobserwowano objawów niepożądanych po takiej terapii (131, 215).

W naszych badaniach doświadczalnych u żadnego ze zwierząt w grupie doświadczalnej G5 nie zaobserwowałem zakażenia rany pooperacyjnej w przeciwieństwie do grupy z quercetyną aplikowaną miejscowo (G4). W ocenie elektrofizjologicznej u zwierząt, u których zastosowano quercetynę enteralnie stwierdziliśmy niższe latencje składowych I i II SSEP, w porównaniu do grupy kontrolnej przemawiające za pozytywnym efektem jej zastosowania. Dotychczas, według naszej wiedzy nikt wcześniej nie stosował SSEP do oceny metod prewencji pooperacyjnej blizny nadtwardówkowej w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. W odróżnieniu do eksperymentu pierwszego zaobserwowałem związek pomiędzy rozległością blizny a latencją składowych

I i II SSEP dla grupy doświadczalnej G5 oraz u wszystkich zwierząt poddanych eksperymentowi drugiemu. Różnica ta może wynikać z większej ilości zwierząt w analizie statystycznej lub może być związana z efektem zastosowanej prewencji blizny. Quercetyna podawana enteralnie pozytywnie działała na rozległość blizny w stosunku do grupy bez prewencji (G2). Zwierzęta z grupy G5 legitymowały się cieńszą oponą twardą.

W badaniu He i wsp. (120) po zastosowaniu ketoprofenu nie zaobserwowano istotnego zmniejszenia rozległości blizny. W tym doświadczeniu nie była oceniana grubość opony twardej. Uzyskane wyniki są porównywalne z wynikami po zastosowaniu pimekrolimusu lub mitomycyny-C (203). Mniejsza ekspresja OPN w korzeniach nerwowych i zrostach pajęczynówki wskazuje na podobny efekt jaki został zaobserwowany po zastosowaniu sterydów (205) bez potencjalnych efektów ubocznego oddziaływania sterydów. Szczególnie ciekawym efektem jest ponad dwukrotne zwiększenie OPN pozytywnych neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w stosunku do grupy kontrolnej. Zwiększona ekspresja OPN następowała po aksotomii (75) oraz po laminektomii - na podstawie eksperymentu pierwszego. Wiadomo również, że ekspresja OPN jest markerem neuronów, które są zdolne przetrwać w następstwie urazu ośrodkowego układu nerwowego (79). W naszym eksperymencie zwiększona ekspresja OPN korelowała z krótszą latencją sygnału SSEP, a także z mniej rozległą blizną. Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że wzrost ekspresji OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych jest markerem „dobrostanu” strukturalnego jak i funkcjonalnego neuronów po uszkodzeniu.

Podsumowując quercetyna podawana enteralnie przez 4 tygodnie w wysokiej dawce skutecznie hamuje rozwój blizny nadoponowej oraz oddziaływanie protekcyjne na elementy nerwowe kanału kręgowego. Badania na większym modelu zwierzęcym przyniosłyby więcej informacji przed możliwym etapem badań przedklinicznych. Jako szeroko rozpowszechniony składnik normalnej diety (130-132) oraz w świetle wcześniejszych badań klinicznych (215), jej zastosowanie powinno być względnie tanie, dostępne i bezpieczne.

Od początku badań nad blizną nadoponową i sposobów jej zapobiegania metody barierowe stosowane lokalnie wydawały się być najlepszym rozwiązaniem ze względu na brak efektów ogólnoustrojowych oraz jednorazową aplikację. Mimo pozornej prostoty tego podejścia do chwili obecnej nie znaleziono skutecznego i bezpiecznego środka. Badane były różne materiały i substancje: wolne przeszczepy / transfery tkanki tłuszczowej (96, 195, 216, 217), przeszczepy fragmentów kości (90), kwas hialuronidowy (218), pianka

żelatynowa (89), siatki wikrylowe (217, 219), GoreTex (127, 194, 197, 220), DuraGen (216), Adcon-L (15, 108-110, 202), Silastic (90, 221), Dacron (90, 96), Seprafilm (197), Oxiplex/SP Gel (119).

Nadal, najszerszej stosowaną miejscową metodą zapobiegania bliznie są wolne transfery tkanki tłuszczowej (83), pomimo znanych problemów i możliwości wystąpienia powikłań (92, 95-97). Quist i wsp. (195) wykazali wyższość tkanki tłuszczowej nad membraną PEO/PBT (GoreTex) w okresie do jednego roku obserwacji w badaniu na psach. Wiele błon i żeli było zastosowanych tylko doświadczalnie. Badaniom klinicznym poddano jedynie preparaty Adcon-L i Oxiplex/SP Gel. Mimo pierwszych bardzo pomyślnych wyników Adcon-L został wycofany z rynku po raportach wskazujących na zaburzenie gojenia się opony (113, 114), natomiast Oxiplex/SP Gel wymaga dalszych badań aby potwierdzić jego skuteczność i profil bezpieczeństwa (119).

TachoComb jest znanym i szeroko stosowanym preparatem, który doskonale nadaje się do wodoszczelnego zamykania opony twardej (179). Zastosowanie TachoCombu w hamowaniu blizny nadoponowej jest uzasadnione jego działaniem hemostatycznym - zapobieganie powstawaniu krwiaka w miejscu fenestracji, hemilaminektomii i laminektomii oraz tworzeniu bariery oddzielającej mięśnie przykręgosłupowe od odsłoniętego worka oponowego (182). Przewagą tego preparatu nad innymi produktami np. GoreTex, który również potencjalnie skutecznie przeciwdziała tworzeniu się blizny nadoponowej, jest jego elastyczność, co umożliwia właściwe przyleganie do opony twardej (194). Korzystne działanie TachoCombu wykazali Lee i wsp. (182), w badaniu udowadniającym wyższą skuteczność TachoCombu niż Spongostanu i Tabotampu w hamowaniu powstawania blizny. Ocena skuteczności preparatu została sprawdzona tylko w odniesieniu do rozległości blizny. Nie oceniano dotychczas w badaniach doświadczalnych, po zastosowaniu TachoCombu parametrów elektrofizjologicznych układu nerwowego, jego wpływu na oponę i struktury nerwowe wewnątrzoponowe oraz oddziaływanie na korzenie ze zwojami czuciowymi nerwów rdzeniowych.

W naszym badaniu stwierdziliśmy jego skuteczność w zapobieganiu negatywnemu oddziaływaniu blizny na przewodnictwo nerwowe. Powyższych wyników nie da się porównać z żadną inną metodą barierową, ponieważ nie były one badane przy użyciu metod neurofizjologicznych (108-110, 115, 119). TachoComb chroni przed utratą amplitudy SSEP w przeciwieństwie do quercetyny, która wpływa głównie na latencję



sygnału SSEP. Przyczyny oraz znaczenie kliniczne tych różnic wymagają dalszych badań. Zastosowanie TachoCombu nie ma wpływu na rozległość blizny, natomiast niektóre spośród sztucznych materiałów barierowych (Dacron, Silastic, pianka żelatynowa) mogą nasilać bliznowacenie będąc swoistym rusztowaniem dla rozrostu tkanki łącznej (89). TachoComb chroni oponę twardą przed włóknieniem (opona twarda była cieńsza w grupie G6 niż w grupie kontrolnej G2). Podobny efekt zaobserwował Cemil i wsp. po zastosowaniu pimekrolimusu (203). Natomiast bardziej rozległa blizna wiązała się z niższą amplitudą sygnału SSEP w naszych badaniach, co również nie było wcześniej opisane w dostępnej literaturze. Sześć tygodni po operacji zaobserwowaliśmy pozostałości TachoCombu w przestrzeni nadoponowej co jest zgodne z poprzednimi badaniami dotyczącymi opłucnej gdzie całkowita resorpcja następowała po 12 tygodniach (162). Równocześnie zanotowaliśmy także obecność komórek wokoło ciała obcego, co również zostało wcześniej wykazane w naszych badaniach (162). Wykazaliśmy również silną ekspresję OPN w oponie twardej czego wcześniej nie wykazano.

TachoComb jest materiałem zaprojektowanym specjalnie do użycia u ludzi więc profil wchłanianości może być inny u szczura ze względu na brak pełnej biokompatybilności. Nie zaobserwowaliśmy reakcji odrzucania Tachocombu tak jak w przypadku Silastic (90, 221). Zwiększona ekspresja OPN w oponie twardej, mimo iż była ona cieńsza w porównaniu do grupy kontrolnej oraz w korzeniach nerwowych może wskazywać na to, że włóknienie mogło zostać opóźnione ale postępuje w miarę rozkładu preparatu. Quist i wsp. (195) zwracają uwagę na konieczność wydłużenia czasu obserwacji po implantacji materiału biodegradowalnego, gdyż można spodziewać się spadku ich skuteczności po dłuższym okresie. Podobnie jak w przypadku zastosowania quercetyny, po implantacji TachoCombu zaobserwowałem zależność pomiędzy latencją sygnału SSEP, a ekspresją OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych, czego nie obserwowałem w eksperymencie pierwszym. Wyjaśnienie tej bardzo ciekawej zależności wymaga dalszych badań doświadczalnych.

Podsumowując powyższe fakty należy stwierdzić, że TachoComb może być dobrą alternatywą dla tkanki tłuszczowej w prewencji blizny nadoponowej, zwłaszcza w przypadku uszkodzenia opony wymagającego naprawy, jednak konieczny jest dłuższy okres obserwacji w badaniach doświadczalnych w celu potwierdzenia jego skuteczności.

## 6. Wnioski

1. Opracowany model doświadczalny charakteryzuje się wysoką powtarzalnością oraz jednorodnością uzyskiwanych wyników. Zastosowana technika operacyjna umożliwia maksymalne ograniczenie powikłań pooperacyjnych oraz zapewnia jednorodne powstawanie blizny nadoponowej. Somatosensoryczne potencjały wywołane charakteryzowały się zdecydowanie wyższą czułością w stosunku do badania klinicznego w ocenie funkcjonalnej wpływu blizny nadoponowej na zwoje czuciowe i na inne korzenie nerwowe. Zastosowane metody histologiczne pozwalają na dokładną ocenę ilościową i jakościową blizny nadoponowej, natomiast ocena immunohistochemiczna pozwala zbadać wpływ blizny na korzenie nerwowe.
2. Na podstawie opisanego modelu doświadczalnego wykazano negatywny wpływ powstawania blizny nadoponowej na zwoje czuciowe i inne korzenie nerwowe. W ocenie czynnościowej korzeni, w 6 tygodni po laminektomii, odnotowano statystycznie gorsze wyniki oceny elektrofizjologicznej w porównaniu do grupy kontrolnej. Negatywny wpływ tworzącej się blizny znalazł również odzwierciedlenie w ocenie mikroskopowej pod postacią odczynowego pogrubienia opony twardej oraz aktywnych procesów włóknienia wewnątrzoponowego, z wysoka ekspresja osteopontyny pomiędzy korzeniami nerwowymi i oponą pajęczą. Obecność blizny powodowała również zwiększoną ekspresję osteopontyny w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych co uprawdopodobnia teorię głoszącą, że podrażnienie zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych przez bliznę nadoponową może być źródłem nawrotowego bólu.
3. Quercetyna podana miejscowo, w wysokiej dawce, zwykle zaburzała gojenie rany operacyjnej i powodowała zmiany zapalne z odczynem ropnym. Jednak w niektórych przypadkach zaobserwowano jej pozytywne działanie prewencyjne. Zatem konieczna jest zmiana dawki i techniki podawania miejscowego quercetyny przy planowaniu tego typu interwencji.  
Quercetyna podawana enteralnie nie powodowała zaburzeń w gojeniu ran, miała pozytywny efekt na rozległość blizny, grubość opony, oraz korzystny wpływ na parametry elektrofizjologiczne. Podana enteralnie quercetyna działa podobnie do sterydów ale bez ryzyka działań niepożądanych. Uzyskane wyniki stwarzają podstawy do dalszych badań. Quercetyna podawana enteralnie może być obiecującą

nową metodą zapobiegania pooperacyjnej bliznie nadoponowej w kanale kręgowym odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa.

TachoComb wykazał działanie protekcyjne na układ nerwowy w ocenie elektrofizjologicznej, oraz potencjalnie wytworzył ochronną barierę oddzielającą tworzącą się bliznę od opony twardej. Jednakże dla pełnej oceny skuteczności klinicznej tego preparatu potrzebny jest dłuższy okres obserwacji.

## 7. Streszczenie

**Wstęp:** Dokładna rola pooperacyjnej blizny nadoponowej w niepowodzeniach po operacjach z dostępu tylnego w odcinku lędźwiowo-krzyżowym kręgosłupa rozumianych jako nawrót bólu jest szeroko dyskutowana. Najnowsze badania kliniczne wskazują, że nie istnieje korelacja pomiędzy rozległością blizny nadoponowej obserwowanej w badaniu MR kręgosłupa, a nasileniem bólu. Badania doświadczalne dowiodły negatywny wpływ tworzącej się blizny w przestrzeni nadoponowej na funkcję struktur nerwowych kanału kręgowego, co implikuje dalsze badania nad wyjaśnieniem tego fenomenu.

**Cel:** Praca ma na celu ustanowienie modelu doświadczalnego powstawania blizny nadoponowej na modelu szczurzym ze szczególnym uwzględnieniem oceny wpływu blizny na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych i inne korzenie nerwowe. Kolejnym celem pracy jest zbadanie efektywności zapobiegania bliznie poprzez zastosowanie quercetyny enteralnie i miejscowo oraz TachoCombu.

**Materiał i Metody:** Badanie doświadczalne przeprowadzono na 60 szczurach u których wykonano laminectomię na poziomie L5. Zwierzęta przydzielono do 6 grup doświadczalnych i przeprowadzono trzy eksperymenty. W eksperymencie pierwszym (grupy G1 i G2) ustanowiono model doświadczalny powstawania blizny nadoponowej i jej wpływ na struktury nerwowe w porównaniu do zwierząt które nie zostały poddane otwarciu kanału kręgowego. Eksperyment drugi (grupy G2, G3, G4 i G5) miał na celu zbadanie wpływu quercetyny zastosowanej miejscowo i ogólnie jako prewencji blizny nadoponowej. Natomiast w eksperymencie trzecim (grupy G2 i G6) oceniano wpływ Tachocombu na tworzenie się blizny nadoponowej. Czas obserwacji wynosił 6 tygodni. Zwierzęta oceniano klinicznie, elektrofizjologicznie (somatosensoryczne potencjały wywołane), histologicznie z oceną morfometryczną oraz immunohistochemicznie poprzez badanie ekspresji osteopontyny (OPN) i CD 31.

**Wyniki:** W eksperymencie pierwszym stwierdzono znamienne negatywny wpływ tworzącej się blizny nadoponowej na struktury nerwowe kanału kręgowego. Zwierzęta po laminectomii miały dłuższe latencje sygnału somatosensorycznych potencjałów wywołanych. Jednocześnie zaobserwowano pogrubienie opony twardej wraz z aktywnym procesem włóknienia wewnątrzoponowo (OPN pozytywne zrosty pajęczynówki). Wzrost ekspresji OPN stwierdzono również w otworach międzykręgowych bezpośrednio wokół neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych. Eksperyment drugi wykazał neuroprotektoryjne i przeciwłóknieniowe właściwości quercetyny podawanej enteralnie przez 4 tygodnie. W wyniku tej terapii zaobserwowano wyższe amplitudy sygnału

somatosensorycznych potencjałów wywołanych, cieńszą oponę twardą, mniej rozległą bliznę oraz mniejszą aktywność procesów włóknienia. Dodatkowo stwierdzono wysoki odsetek neuronów zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych z ekspresją OPN. Natomiast miejscowe podanie quercetyny wiązało się z nieakceptowalnie wysokimi odsetkami powikłań infekcyjnych. TachoComb (eksperyment trzeci) wykazał pewne działanie neuroprotecyjne potwierdzone w badaniach elektrofizjologicznych oraz stworzył efektywną barierę pomiędzy oponą oraz blizną, natomiast nie miał wpływu na rozległość blizny oraz wewnątrzoponowe procesy włóknienia.

**Wnioski:** W tej pracy doświadczalnej został ustanowiony powtarzalny model powstawania blizny nadoponowej mającej niekorzystny wpływ na struktury nerwowe kanału kręgowego. Zastosowanie quercetyny enteralnie przez 4 tygodnie po laminiektomii efektywnie chroni przed nadmiernym tworzeniem się blizny i jej negatywnym wpływem na zwoje czuciowe korzeni nerwów rdzeniowych i inne korzenie nerwowe. Quercetyna podawana miejscowo w wysokiej jednorazowej dawce powoduje zaburzenia gojenia rany oraz powikłania infekcyjne. TachoComb stanowił skuteczną barierę pomiędzy oponą a blizną z pewnym działaniem neuroprotecyjnym, natomiast dla pełnej oceny skuteczności tego preparatu potrzebny jest dłuższy okres obserwacji. Quercetyna podawana enteralnie może być obiecującą nową metodą zapobiegania pooperacyjnej bliznie nadoponowej w kanale kręgowym odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa.

## 8. Abstract

### **Influence of postoperative epidural scar on nerve roots in lumbar spine – experimental study**

**Introduction:** Exact role of peridural scar formation in „failed back surgery syndrome” after posterior approaches to lumbosacral spine presenting as recurrent pain is currently widely debated. The most recent studies indicate that there is no significant correlation between extent of peridural scar as seen in MR studies and presence and intensity of recurrent pain. However, experimental studies have proven negative effect of peridural scar formation on function of nerve roots and dorsal root ganglia, which implies further studies to elucidate the exact mechanism of this interaction.

**Aim:** This study has two specific aims. The first is to establish a new model of peridural scar formation in a rat model, with a significant attention paid to the influence of epidural scar formation on neural elements of vertebral canal. The second aim is to evaluate the efficacy of peridural scar formation prevention with TachoComb and quercetine applied either locally or enterally.

**Material and Methods:** Total number of 60 rats underwent L5 laminectomy in this study. Animals were divided into 6 experimental groups comprising three experiments. In experiment 1 (groups G1 and G2) the experimental model of peridural scar formation was established and the results were compared to animals without laminectomy. Experiment 2 (groups G2, G3, G4 and G5) tested peridural scar formation prevention with quercetine (locally or enterally), while in experiment 3 (groups G2 and G6) the efficacy of the scar prevention with TachoComb was evaluated. The animals were observed for 6 weeks. Evaluation techniques included: clinical assessment, neurophysiology (somatosensory evoked potentials - SSEP), histology with morphometry and immunohistochemistry - osteopontine and CD31 expression.

**Results:** Peridural scar formation has clearly negative influence on nerve roots and dorsal root ganglia as seen in experiment 1. Animals after laminectomy had elongation of SSEP latencies as well as thicker dura and evidence of intradural active fibrosis processes (OPN positive arachnoid adhesions). Additionally high OPN expression was observed in intervertebral foramen directly adjacent to dorsal root ganglia and in neurons of dorsal root ganglia. Experiment 2 has proven the neuroprotective and antifibrotic properties of quercetine applied enterally for 4 weeks. As a result of such therapy thinner dura, higher SSEP amplitudes, less extent scar and lower intensity of fibrosis were appreciated.

Interestingly there was also a significant increase of OPN positive neurons in dorsal root ganglia. Local administration of quercetine resulted in unacceptably high rate of wound infection. TachoComb (experiment 3) showed some neuroprotective potential as observed in neurophysiological assessment and was able to create an effective barrier separating peridural scar from dura. However, there was no positive effect on scar extent and intradural fibrosis.

**Conclusions:** This has established an effective and highly reproducible model of peridural scar formation with negative effects on neural elements of vertebral canal. Quercetine applied enterally for 4 weeks after laminectomy has a protective effect against scar formation in epidural space and its negative influence on nerve roots and dorsal root ganglia. However, quercetine administered locally in one high dose negatively affects wound healing with subsequent infections. TachoComb acts as a barrier between invading scar and dura with some neuroprotective effects, although to fully assess this action longer observation period is warranted. Enteral therapy with quercetine might be a future new method of peridural scar formation prevention in lumbosacral spine.

## 9. Piśmiennictwo

1. Gil K, Frymoyer JW. The management of treatment failures after decompressive surgery. *The Adult Spine: Principles and Practice*. 1991;21:849-1870
2. Zeidman SM, Long DM. Failed back surgery syndrome. In: Menezes AH, Sonntag VKH, editors. *Principles of Spine Surgery*. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 657-67
3. Burton CV, Kirkaldy-Willis WH, Yong-Hing K, Heithoff KB. Causes of failure of surgery on the lumbar spine. *Clin Orthop Relat Res*. 1981:191-9
4. Bertagnoli R, Yue JJ, Fenk-Mayer A, Eerulkar J, Emerson JW. Treatment of symptomatic adjacent-segment degeneration after lumbar fusion with total disc arthroplasty by using the prodisc prosthesis: a prospective study with 2-year minimum follow up. *J Neurosurg Spine*. 2006;4:91-7
5. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Section 1: Overview in Musculoskeletal conditions in the United States. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999
6. Asch HL, Lewis PJ, Moreland DB, Egnatchik JG, Yu YJ, Clabeaux DE, et al. Prospective multiple outcomes study of outpatient lumbar microdiscectomy: should 75 to 80% success rates be the norm? *J Neurosurg*. 2002;96:34-44
7. Weber H. Lumbar disc herniation. A prospective study of prognostic factors including a controlled trial. Part I. *J Oslo City Hosp*. 1978;28:33-61
8. Keller JT, Dunsker SB, McWhorter JM, Ongkiko CM, Saunders MC, Mayfield FH. The fate of autogenous grafts to the spinal dura. An experimental study. *J Neurosurg*. 1978;49:412-8
9. Atlas SJ, Keller RB, Chang Y, Deyo RA, Singer DE. Surgical and nonsurgical management of sciatica secondary to a lumbar disc herniation: five-year outcomes from the Maine Lumbar Spine Study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:1179-87
10. Burton CV. Lumbosacral arachnoiditis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1978;3:24-30
11. Cook SD, Prewett AB, Dalton JE, Whitecloud TS, 3rd. Reduction in perineural scar formation after laminectomy with Polyactive membrane sheets. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19:1815-25
12. Atlas SJ, Deyo RA, Keller RB, Chapin AM, Patrick DL, Long JM, et al. The Maine Lumbar Spine Study, Part III. 1-year outcomes of surgical and nonsurgical management of lumbar spinal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21:1787-94; discussion 94-5
13. Atlas SJ, Deyo RA, Keller RB, Chapin AM, Patrick DL, Long JM, et al. The Maine Lumbar Spine Study, Part II. 1-year outcomes of surgical and nonsurgical management of sciatica. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21:1777-86
14. Ross JS, Robertson JT, Frederickson RC, Petrie JL, Obuchowski N, Modic MT, et al. Association between peridural scar and recurrent radicular pain after lumbar discectomy: magnetic resonance evaluation. ADCON-L European Study Group. *Neurosurgery*. 1996;38:855-61; discussion 61-3
15. Robertson JT. Role of peridural fibrosis in the failed back: a review. *Eur Spine J*. 1996; 5 Suppl 1:S2-6
16. Manchikanti L, Saini B, Singh V. Spinal endoscopy and lysis of epidural adhesions in the management of chronic low back pain. *Pain Physician*. 2001;4:240-65
17. Benoist M, Ficat C, Baraf P, Cauchoix J. Postoperative lumbar epiduro-arachnoiditis. Diagnostic and therapeutic aspects. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1980; 5:432-6
18. Cauchoix J, Ficat C, Girard B. Repeat surgery after disc excision. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1978;3:256-9



19. Key JA, Ford LT. Experimental intervertebral-disc lesions. *J Bone Joint Surg Am.* 1948;30A:621-30
20. Fager CA, Freidberg SR. Analysis of failures and poor results of lumbar spine surgery. *Spine (Phila Pa 1976).* 1980;5:87-94
21. North RB, Campbell JN, James CS, Conover-Walker MK, Wang H, Piantadosi S, et al. Failed back surgery syndrome: 5-year follow-up in 102 patients undergoing repeated operation. *Neurosurgery.* 1991;28:685-90; discussion 90-1
22. Hurme M, Katevuo K, Nykvist F, Aalto T, Alaranta H, Einola S. CT five years after myelographic diagnosis of lumbar disk herniation. *Acta Radiol.* 1991;32:286-9
23. Ronnberg K, Lind B, Zoega B, Gadeholt-Gothlin G, Halldin K, Gellerstedt M, et al. Peridural scar and its relation to clinical outcome: a randomised study on surgically treated lumbar disc herniation patients. *Eur Spine J.* 2008;17:1714-20
24. Nygaard OP, Kloster R, Dullerud R, Jacobsen EA, Mellgren SI. No association between peridural scar and outcome after lumbar microdiscectomy. *Acta Neurochir (Wien).* 1997;139:1095-100
25. Vogelsang JP, Finkenstaedt M, Vogelsang M, Markakis E. Recurrent pain after lumbar discectomy: the diagnostic value of peridural scar on MRI. *Eur Spine J.* 1999;8:475-9
26. Cervellini P, Curri D, Bernardi L, Volpin L, Benedetti A. Computed tomography after lumbar disc surgery: a comparison between symptomatic and asymptomatic patients. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1988;43:44-7
27. Annertz M, Jonsson B, Stromqvist B, Holtas S. Serial MRI in the early postoperative period after lumbar discectomy. *Neuroradiology.* 1995;37:177-82
28. Jou IM, Tai TW, Tsai CL, Tsai TM, Yung WS, Jung YC. Spinal somatosensory evoked potential to evaluate neurophysiologic changes associated with postlaminotomy fibrosis: an experimental study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007;32:2111-8
29. Johnson EW, Burkhart JA, Earl WC. Electromyography in postlaminectomy patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 1972;53:407-9
30. Mack EW. Electromyographic observations on the postoperative disc patient. *J Neurosurg.* 1951;8:469-72
31. Johnson EW, Melvin JL. Value of electromyography in lumbar radiculopathy. *Arch Phys Med Rehabil.* 1971;52:239-43
32. Olmarker K, Blomquist J, Stromberg J, Nannmark U, Thomsen P, Rydevik B. Inflammatogenic properties of nucleus pulposus. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995;20:665-9
33. Olmarker K, Larsson K. Tumor necrosis factor alpha and nucleus-pulposus-induced nerve root injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 1998;23:2538-44
34. Olmarker K, Rydevik B. [New information concerning pain caused by herniated disk and sciatica. Exposure to disk tissue sensitizes the nerve roots]. *Lakartidningen.* 1998;95:5618-22
35. Olmarker K, Rydevik B. Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity: possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26:863-9
36. Breig A, Marions O. Biomechanics of the Lumbosacral Nerve Roots. *Acta Radiol Diagn (Stockh).* 1963;1:1141-60
37. Kusch SD, Ulstrom CL, Michael CJ. The tissue origin of low back pain and sciatica: A report of pain response to tissue stimulation during operations on the lumbar spine using local anesthesia. *Orthop Clin Nroth Am.* 1991;22:181-7

38. Acus RW, 3rd, Flanagan JP. Perineural fibrosis of superficial peroneal nerve complicating ankle sprain: a case report. *Foot Ankle*. 1991;11:233-5
39. Schwartzman RJ. Brachial plexus traction injuries. *Hand Clin*. 1991;7:547-56
40. Wilgis EF, Murphy R. The significance of longitudinal excursion in peripheral nerves. *Hand Clin*. 1986;2:761-6
41. Brzezicki G, Jankowski R, Blok T, Klimczak A, Szymas J, Huber J, et al. Postlaminectomy osteopontin expression and associated neurophysiological findings in rat peridural scar model. *Spine (Phila Pa 1976)*.36:378-85
42. Schimizzi AL, Massie JB, Murphy M, Perry A, Kim CW, Garfin SR, et al. High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a preclinical postlaminectomy rat model. *Spine J*. 2006;6:550-6
43. Finnegan WJ, Fenlin JM, Marvel JP, Nardini RJ, Rothman RH. Results of surgical intervention in the symptomatic multiply-operated back patient. Analysis of sixty-seven cases followed for three to seven years. *J Bone Joint Surg Am*. 1979;61:1077-82
44. Law JD, Lehman RA, Kirsch WM. Reoperation after lumbar intervertebral disc surgery. *J Neurosurg*. 1978;48:259-63
45. Schlarb H, Wenker H. Re-operations performed on patients suffering from an intervertebral disc prolapse in the lumbar region. *Adv Neurosurg*. 1977;4:32-5
46. Waddell G, Kummel EG, Lotto WN, Graham JD, Hall H, McCulloch JA. Failed lumbar disc surgery and repeat surgery following industrial injuries. *J Bone Joint Surg Am*. 1979;61:201-7
47. O'Leary R, Wood EJ, Guillou PJ. Pathological scarring: strategic interventions. *Eur J Surg*. 2002;168:523-34
48. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004;187:11S-6S
49. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994;331:1286-92
50. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest*. 1993;92:2597-601
51. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:770-4
52. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359:693-9
53. Ogawa Y, Ksander GA, Pratt BM, Sawamura SJ, Ziman JM, Gerhardt CO, et al. Differences in the biological activities of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor in vivo. *Growth Factors*. 1991;5:57-68
54. Wiens R, Rak M, Cox N, Abraham S, Juurlink BH, Kulyk WM, et al. Synchrotron FTIR microspectroscopic analysis of the effects of anti-inflammatory therapeutics on wound healing in laminectomized rats. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387:1679-89
55. Songer MN, Rauschnig W, Carson EW, Pandit SM. Analysis of peridural scar formation and its prevention after lumbar laminotomy and discectomy in dogs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:571-80; discussion 9-80
56. LaRocca H, Macnab I. The laminectomy membrane. Studies in its evolution, characteristics, effects and prophylaxis in dogs. *J Bone Joint Surg Br*. 1974;56B:545-50

57. Mikawa Y, Hamagami H, Shikata J, Higashi S, Yamamuro T, Hyon SH, et al. An experimental study on prevention of postlaminectomy scar formation by the use of new materials. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1986;11:843-6
58. Lee HM, Yang KH, Han DY, Kim NH. An experimental study on prevention of postlaminectomy scar formation. *Yonsei Med J*. 1990;31:359-66
59. Hoyland JA, Freemont AJ, Denton J, Thomas AM, McMillan JJ, Jayson MI. Retained surgical swab debris in post-laminectomy arachnoiditis and peridural fibrosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1988;70:659-62
60. Cooper RG, Mitchell WS, Illingworth KJ, Forbes WS, Gillespie JE, Jayson MI. The role of epidural fibrosis and defective fibrinolysis in the persistence of postlaminectomy back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1991;16:1044-8
61. Klimiuk PS, Pountain GD, Keegan AL, Jayson MI. Serial measurements of fibrinolytic activity in acute low back pain and sciatica. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1987;12:925-8
62. Pountain GD, Keegan AL, Jayson MI. Impaired fibrinolytic activity in defined chronic back pain syndromes. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1987;12:83-6
63. Bezer M, Gokkus K, Kocaoglu B, Guven O. The influence of vertebral instability on peridural circulation and concomitant peridural fibrosis formation. *Eur Spine J*. 2006;15:959-64
64. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signalling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:723-49
65. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM*. 2002;95:3-13
66. Chakraborty G, Jain S, Behera R, Ahmed M, Sharma P, Kumar V, et al. The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Curr Mol Med*. 2006;6:819-30
67. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol*. 2006;16:79-87
68. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2005;2:e251
69. Lee SH, Seo GS, Park YN, Yoo TM, Sohn DH. Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:2367-78
70. Junaid A, Amara FM. Osteopontin: correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and PI3-kinase-mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells. *Histopathology*. 2004;44:136-46
71. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P, et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int*. 1999;56:571-80
72. Iczkiewicz J, Rose S, Jenner P. Osteopontin (Eta-1) is present in the rat basal ganglia. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;132:64-72
73. Lee MY, Choi JS, Lim SW, Cha JH, Chun MH, Chung JW. Expression of osteopontin mRNA in developing rat brainstem and cerebellum. *Cell Tissue Res*. 2001;306:179-85
74. Shin SL, Cha JH, Chun MH, Chung JW, Lee MY. Expression of osteopontin mRNA in the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 1999;273:73-6
75. Marsh BC, Kerr NC, Isles N, Denhardt DT, Wynick D. Osteopontin expression and function within the dorsal root ganglion. *Neuroreport*. 2007;18:153-7
76. Schroeter M, Zickler P, Denhardt DT, Hartung HP, Jander S. Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice. *Brain*. 2006;129:1426-37

77. Wang X, Louden C, Yue TL, Ellison JA, Barone FC, Solleveld HA, et al. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci*. 1998;18:2075-83
78. Kim SY, Choi YS, Choi JS, Cha JH, Kim ON, Lee SB, et al. Osteopontin in kainic acid-induced microglial reactions in the rat brain. *Mol Cells*. 2002;13:429-35
79. Meller R, Stevens SL, Minami M, Cameron JA, King S, Rosenzweig H, et al. Neuroprotection by osteopontin in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:217-25
80. Hashimoto M, Sun D, Rittling SR, Denhardt DT, Young W. Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *J Neurosci*. 2007;27:3603-11
81. Ahn M, Lee Y, Moon C, Jin JK, Matsumoto Y, Koh CS, et al. Upregulation of osteopontin in Schwann cells of the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci Lett*. 2004;372:137-41
82. Dogulu F, Kurt G, Emmez H, Erdem O, Memis L, Baykaner K, et al. Topical mitomycin C-induced inhibition of postlaminectomy peridural fibrosis in rabbits. *J Neurosurg*. 2003;99:76-9
83. Tao H, Fan H. Implantation of amniotic membrane to reduce postlaminectomy epidural adhesions. *Eur Spine J*. 2009;18:1202-12
84. Kanamori M, Kawaguchi Y, Ohmori K, Kimura T, Md HT, Matsui H. The fate of autogenous free-fat grafts after posterior lumbar surgery: part 1. A postoperative serial magnetic resonance imaging study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:2258-63
85. Kanamori M, Kawaguchi Y, Ohmori K, Kimura T, Tsuji H, Matsui H. The fate of autogenous free-fat grafts after posterior lumbar surgery: part 2. Magnetic resonance imaging and histologic studies in repeated surgery cases. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:2264-70
86. Langenskiold A, Kiviluoto O. Prevention of epidural scar formation after operations on the lumbar spine by means of free fat transplants. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*. 1976:92-5
87. Langenskiold A, Valle M. Epidurally placed free fat grafts visualized by CT scanning 15-18 years after discectomy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1985;10:97-8
88. Kiviluoto O. Use of free fat transplants to prevent epidural scar formation. An experimental study. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1976:3-75
89. Jacobs RR, McClain O, Neff J. Control of postlaminectomy scar formation: an experimental and clinical study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1980;5:223-9
90. Barbera J, Gonzalez J, Esquerdo J, Broseta J, Barcia-Salorio JL. Prophylaxis of the laminectomy membrane. An experimental study in dogs. *J Neurosurg*. 1978;49:419-24
91. Gill GG, Sakovich L, Thompson E. Pedicle fat grafts for the prevention of scar formation after laminectomy. An experimental study in dogs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1979;4:176-86
92. Gorgulu A, Simsek O, Cobanoglu S, Imer M, Parsak T. The effect of epidural free fat graft on the outcome of lumbar disc surgery. *Neurosurg Rev*. 2004;27:181-4
93. Bernsmann K, Kramer J, Ziozios I, Wehmeier J, Wiese M. Lumbar micro disc surgery with and without autologous fat graft. A prospective randomized trial evaluated with reference to clinical and social factors. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001;121:476-80

94. Jensen TT, Asmussen K, Berg-Hansen EM, Lauritsen B, Manniche C, Vinterberg H, et al. First-time operation for lumbar disc herniation with or without free fat transplantation. Prospective triple-blind randomized study with reference to clinical factors and enhanced computed tomographic scan 1 year after operation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21:1072-6
95. MacKay MA, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Kurz LT, Hecht B, Schwartz M. The effect of interposition membrane on the outcome of lumbar laminectomy and discectomy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:1793-6
96. Hiraizumi Y, Transfeldt EE, Fujimaki E, Nambu M. Application of polyvinyl alcohol hydrogel membrane as anti-adhesive interposition after spinal surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:2272-7
97. Trevor PB, Martin RA, Saunders GK, Trotter EJ. Healing characteristics of free and pedicle fat grafts after dorsal laminectomy and durotomy in dogs. *Vet Surg*. 1991;20:282-90
98. Wheeler SJ, Sharp NJ. *Small Animal Spinal Disorders: Diagnosis and Surgery*. London: Mosby-Wolfe; 1994.
99. Imran Y, Halim Y. Acute cauda equina syndrome secondary to free fat graft following spinal decompression. *Singapore Med J*. 2005;46:25-7
100. Mayer PJ, Jacobsen FS. Cauda equina syndrome after surgical treatment of lumbar spinal stenosis with application of free autogenous fat graft. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am*. 1989;71:1090-3
101. Prusick VR, Lint DS, Bruder WJ. Cauda equina syndrome as a complication of free epidural fat-grafting. A report of two cases and a review of the literature. *J Bone Joint Surg Am*. 1988;70:1256-8
102. Van Akkerveeken PF, Van de Kraan W, Muller JW. The fate of the free fat graft. A prospective clinical study using CT scanning. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1986;11:501-4
103. da Costa RC, Pippi NL, Graca DL, Fialho SA, Alves A, Groff AC, et al. The effects of free fat graft or cellulose membrane implants on laminectomy membrane formation in dogs. *Vet J*. 2006;171:491-9
104. Frederickson RC. ADCON-L: a review of its development, mechanism of action, and preclinical data. *Eur Spine J*. 1996;5 Suppl 1:S7-9
105. Alkalay RN, Kim DH, Urry DW, Xu J, Parker TM, Glazer PA. Prevention of postlaminectomy epidural fibrosis using bioelastic materials. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28:1659-65
106. Neel HB, 3rd. Implants of Gore-Tex. *Arch Otolaryngol*. 1983;109:427-33
107. Ahmad S, Coker GT, Silver J, Wujek J. ADCON-L is a potent and long acting inhibitor of surgical adhesions. *J Invest Surg*. 1992;5:247
108. Robertson JT, Meric AL, Dohan FC, Jr., Schweitzer JB, Wujek JR, Ahmad S. The reduction of postlaminectomy peridural fibrosis in rabbits by a carbohydrate polymer. *J Neurosurg*. 1993;79:89-95
109. Wujek JR, Ahmad S, Harel A, Maier KH, Roufa D, Silver J. A carbohydrate polymer that effectively prevents epidural fibrosis at laminectomy sites in the rat. *Exp Neurol*. 1991;114:237-45
110. de Tribolet N, Robertson JT. Lack of postdiscectomy adhesions following application of ADCON-L: a case report. *Eur Spine J*. 1996;5 Suppl 1:S18-20
111. Ganzer D, Giese K, Volker L, Pietzner U, Follak N, Merk H. Two-year results after lumbar microdiscectomy with and without prophylaxis of a peridural fibrosis using Adcon-L. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2003;123:17-21

112. Richter HP, Kast E, Tomczak R, Besenfelder W, Gaus W. Results of applying ADCON-L gel after lumbar discectomy: the German ADCON-L study. *J Neurosurg.* 2001;95:179-89
113. Hieb LD, Stevens DL. Spontaneous postoperative cerebrospinal fluid leaks following application of anti-adhesion barrier gel: case report and review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26:748-51
114. Kuhn J, Hofmann B, Knitelius HO, Coenen HH, Bewermeyer H. Bilateral subdural haematomata and lumbar pseudomeningocele due to a chronic leakage of liquor cerebrospinalis after a lumbar discectomy with the application of ADCON-L gel. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:1031-3
115. Robertson JT, Maier K, Anderson RW, Mule JL, Palatinsky EA. Prevention of epidural fibrosis with ADCON-L in presence of a durotomy during lumbar disc surgery: experiences with a pre-clinical model. *Neurol Res.* 1999;21 Suppl 1:S61-6
116. Rodgers KE, Schwartz HE, Roda N, Thornton M, Kobak W, diZerega GS. Effect of oxiplex\* films (PEO/CMC) on adhesion formation and reformation in rabbit models and on peritoneal infection in a rat model. *Fertil Steril.* 2000;73:831-8
117. Kitano T, Zerwekh JE, Edwards ML, Usui Y, Allen MD. Viscous carboxymethylcellulose in the prevention of epidural scar formation. *Spine (Phila Pa 1976).* 1991;16:820-3
118. Rodgers KE, Robertson JT, Espinoza T, Oppelt W, Cortese S, diZerega GS, et al. Reduction of epidural fibrosis in lumbar surgery with Oxiplex adhesion barriers of carboxymethylcellulose and polyethylene oxide. *Spine J.* 2003;3:277-83; discussion 84
119. Kim KD, Wang JC, Robertson DP, Brodke DS, BenDebba M, Block KM, et al. Reduction of leg pain and lower-extremity weakness for 1 year with Oxiplex/SP gel following laminectomy, laminotomy, and discectomy. *Neurosurg Focus.* 2004;17:ECP1
120. He Y, Revel M, Loty B. A quantitative model of post-laminectomy scar formation. Effects of a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995;20:557-63; discussion 79-80
121. Nakano M, Matsui H, Miaki K, Tsuji H. Postlaminectomy adhesion of the cauda equina. Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs on cauda equina adhesion in rats. *Spine (Phila Pa 1976).* 1998;23:298-304
122. Sandoval MA, Hernandez-Vaquero D. Preventing peridural fibrosis with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Eur Spine J.* 2008;17:451-5
123. Yildiz KH, Gezen F, Is M, Cukur S, Dosoglu M. Mitomycin C, 5-fluorouracil, and cyclosporin A prevent epidural fibrosis in an experimental laminectomy model. *Eur Spine J.* 2007;16:1525-30
124. Henderson R, Weir B, Davis L, Mielke B, Grace M. Attempted experimental modification of the postlaminectomy membrane by local instillation of recombinant tissue-plasminogen activator gel. *Spine (Phila Pa 1976).* 1993;18:1268-72
125. Ceviz A, Arslan A, Ak HE, Inaloz S. The effect of urokinase in preventing the formation of epidural fibrosis and/or leptomeningeal arachnoiditis. *Surg Neurol.* 1997;47:124-7
126. Emmez H, Kardes O, Dogulu F, Kurt G, Memis L, Baykaner MK. Role of antifibrotic cytokine interferon-gamma in the prevention of postlaminectomy peridural fibrosis in rats. *Neurosurgery.* 2008;62:1351-7; discussion 7-8
127. Bora H, Aykol SV, Akyurek N, Akmansu M, Ataoglu O. Inhibition of epidural scar tissue formation after spinal surgery: external irradiation vs. spinal membrane application. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:507-13

128. Gerszten PC, Moossy JJ, Bahri S, Kalend A, Martinez AJ. Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a rat model. *Neurosurgery*. 1999;44:597-602; discussion -3
129. Gerszten PC, Moossy JJ, Flickinger JC, Gerszten K, Kalend A, Martinez AJ. Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a dog model. *Neurosurgery*. 2000;46:1478-85
130. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*. 1998;426:331-6
131. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*. 1976;24:117-91
132. Anton R. *Flavonoids and Traditional Medicine*. New York: Alan R. Liss; 1988.
133. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*. 1993;20:21-9
134. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:375-83
135. Jackson JK, Higo T, Hunter WL, Burt HM. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm Res*. 2006;55:168-75
136. Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2001;221:155-60
137. Iwao K, Tsukamoto I. Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1427:112-20
138. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res*. 1994;54:4952-7
139. Yuan ZP, Chen LJ, Fan LY, Tang MH, Yang GL, Yang HS, et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3193-9
140. Hu Q, Noor M, Wong YF, Hylands PJ, Simmonds MS, Xu Q, et al. In vitro anti-fibrotic activities of herbal compounds and herbs. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:3033-41
141. Li HL, Liu C, de Couto G, Ouzounian M, Sun M, Wang AB, et al. Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*. 2008;118:879-93
142. Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science*. 2004;304:600-2
143. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000;33:742-50
144. Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2003;48:824-9
145. Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*. 1994;54:2424-8

146. Phan TT, Lim IJ, Sun L, Chan SY, Bay BH, Tan EK, et al. Quercetin inhibits fibronectin production by keloid-derived fibroblasts. Implication for the treatment of excessive scars. *J Dermatol Sci.* 2003;33:192-4
147. Phan TT, Sun L, Bay BH, Chan SY, Lee ST. Dietary compounds inhibit proliferation and contraction of keloid and hypertrophic scar-derived fibroblasts in vitro: therapeutic implication for excessive scarring. *J Trauma.* 2003;54:1212-24
148. Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today.* 1998;4:19-24
149. Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104:1435-58
150. Polo M, Kim YJ, Kucukcelebi A, Hayward PG, Ko F, Robson MC. An in vivo model of human proliferative scar. *J Surg Res.* 1998;74:187-95
151. Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg.* 1999;43:179-84
152. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98:827-33
153. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 1995;108 ( Pt 3):985-1002
154. Phan TT, Lim IJ, Chan SY, Tan EK, Lee ST, Longaker MT. Suppression of transforming growth factor beta/smad signaling in keloid-derived fibroblasts by quercetin: implications for the treatment of excessive scars. *J Trauma.* 2004;57:1032-7
155. Cho JW, Cho SY, Lee SR, Lee KS. Onion extract and quercetin induce matrix metalloproteinase-1 in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 2005;25:347-52
156. Bureau G, Longpre F, Martinoli MG. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 2008;86:403-10
157. Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, et al. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull.* 2007;73:55-63
158. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96:67-202
159. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:592-604
160. Martis G, Miko I, Szendroi T, Kathy S, Kovacs J, Hajdu Z. Results with collagen fleece coated with fibrin glue (TachoComb). A macroscopical and histological experimental study. *Acta Chir Hung.* 1997;36:221-2
161. Schelling G, Block T, Blanke E, Hammer C, Brendel W, Gokel M. The effectiveness of a fibrinogen-thrombin-collagen-based hemostatic agent in an experimental arterial bleeding model. *Ann Surg.* 1987;205:432-5
162. Getman V, Devyatko E, Wolner E, et al. Fleece bound sealing prevents pleural adhesions. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2006;5:243-6
163. Frilling A, Stavrou GA, Mischinger HJ, de Hemptinne B, Rokkjaer M, Klempnauer J, et al. Effectiveness of a new carrier-bound fibrin sealant versus argon beamer as haemostatic agent during liver resection: a randomised prospective trial. *Langenbecks Arch Surg.* 2005;390:114-20



164. Cerwenka H, Bacher H, Werkgartner G, El-Shabrawi A, Mischinger HJ. Massive liver haemorrhage and rupture caused by HELLP-syndrome treated by collagen fleeces coated with fibrin glue. *Eur J Surg.* 1998;164:709-11
165. Carbon RT, Baar S, Waldschmidt J, Huemmer HP, Simon SI. Innovative minimally invasive pediatric surgery is of therapeutic value for splenic injury. *J Pediatr Surg.* 2002;37:1146-50
166. Schwaitzberg SD, Chan MW, Cole DJ, Read M, Nichols T, Bellinger D, et al. Comparison of poly-N-acetyl glucosamine with commercially available topical hemostats for achieving hemostasis in coagulopathic models of splenic hemorrhage. *J Trauma.* 2004;57:S29-32
167. Joseph T, Adeosun A, Paes T, Bahal V. Randomised controlled trial to evaluate the efficacy of TachoComb H patches in controlling PTFE suture-hole bleeding. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;27:549-52
168. Czerny M, Verrel F, Weber H, Muller N, Kircheis L, Lang W, et al. Collagen patch coated with fibrin glue components. Treatment of suture hole bleedings in vascular reconstruction. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2000;41:553-7
169. Pupka A, Rucinski A, Pawlowski S, Barc P, Janczak D, Kaluza G, et al. Use of mesh fibrous dressing covered with fibrin glue (TachoComb) in hemostasis after vascular anastomoses in the groin. *Polim Med.* 2004;34:47-51
170. Shimamoto T, Marui A, Nishina T, Saji Y, Komeda M. The TachoSil-Pledget stitch: towards eradication of suture hole bleeding. *Ann Thorac Surg.* 2008;86:2002-4
171. Droghetti A, Schiavini A, Muriana P, Folloni A, Picarone M, Bonadiman C, et al. A prospective randomized trial comparing completion technique of fissures for lobectomy: stapler versus precision dissection and sealant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;136:383-91
172. Higashiyama M, Takami K, Higaki N, Kodama K. Pulmonary middle lobe fixation using TachoComb in patients undergoing right upper lobectomy with complete oblique fissure. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2004;3:107-9
173. Muramatsu T, Ohmori K, Shimamura M, Furuichi M, Takeshita S, Negishi N. Staple line reinforcement with fleece-coated fibrin glue (TachoComb) after thoroscopic bullectomy for the treatment of spontaneous pneumothorax. *Surg Today.* 2007;37:745-9
174. Takanami I. Closure of a bronchopleural fistula using a fibrin-glue coated collagen patch. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2003;2:387-8
175. Carbon RT, Baar S, Waldschmidt J, Hummer HP, Simon S. [Minimal invasive pediatric surgery: development and progress by innovative technology]. *Klin Padiatr.* 2001;213:99-103
176. Molnar TF, Farkas A, Stankovics J, Horvath OP. A new method for coping with lung parenchyma destruction in paediatric thoracic surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34:675-6
177. Tamasauskas A, Sinkunas K, Draf W, Deltuva V, Matukevicius A, Rastenyte D, et al. Management of cerebrospinal fluid leak after surgical removal of pituitary adenomas. *Medicina (Kaunas).* 2008;44:302-7
178. Reddy M, Schoggl A, Reddy B, Saringer W, Weigel G, Matula C. A clinical study of a fibrinogen-based collagen fleece for dural repair in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien).* 2002;144:265-9; discussion 9
179. Nistor RF, Chiari FM, Maier H, Hehl K. The fixed combination of collagen with components of fibrin adhesive-a new hemostypic agent in skull base procedures. *Skull Base Surg.* 1997;7:23-30

180. Aletsee C, Konopik V, Dazert S, Dieler R. Surgery of anterior skull base fractures. *Laryngorhinootologie*. 2003;82:626-31
181. Brzezicki G, Jankowski R, Blok T, Szymas J, Huber J, Szukala A, et al. Evaluation of epidural scar formation in lumbar spine after TachoComb application - an experimental study. *Neurol Neurochir Pol*. 2008;42:223-30
182. Lee JY, Ebel H, Friese M, Schillinger G, Schroder R, Klug N. Influence of TachoComb in comparison to local hemostyptic agents on epidural fibrosis in a rat laminectomy model. *Minim Invasive Neurosurg*. 2003;46:106-9
183. Institute of Laboratory Animal Research. Commission on Life Sciences NRC. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996
184. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;218:669-96
185. Liu S, Boutrand JP, Tadie M. Use of a collagen-based sealant to prevent in vivo epidural adhesions in an adult rat laminectomy model. *J Neurosurg*. 2001;94:61-7
186. Fehlings MG, Tator CH, Linden RD. The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1989;74:241-59
187. Huber J, Grottel K, Kupczyk B. Actions of group I and II afferent fibers on motoneurons of the medial gastrocnemius, lateral and soleus muscles in rat. *Nowiny Lek*. 1998;67:1188-99
188. Szymaś J. Reconfiguration of standard microscope to generate virtual slides for neuropathology. *Neuroskop*. 2005;7:88-91
189. Davis RA. A long-term outcome analysis of 984 surgically treated herniated lumbar discs. *J Neurosurg*. 1994;80:415-21
190. Hoffman RM, Wheeler KJ, Deyo RA. Surgery for herniated lumbar discs: a literature synthesis. *J Gen Intern Med*. 1993;8:487-96
191. Grane P, Tullberg T, Rydberg J, Lindgren L. Postoperative lumbar MR imaging with contrast enhancement. Comparison between symptomatic and asymptomatic patients. *Acta Radiol*. 1996;37:366-72
192. Boot DA, Hughes SP. The prevention of adhesions after laminectomy. Adverse results of Zenoderm implantations into laminectomy sites in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*. 1987:296-302
193. Lawson KJ, Malycky JL, Berry JL, Steffee AD. Lamina repair and replacement to control laminectomy membrane formation in dogs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1991;16:S222-6
194. Llado A, Guimera J, Garcia F, Navarro A. Expanded polytetrafluoroethylene membrane for the prevention of peridural fibrosis after spinal surgery: an experimental study. *Eur Spine J*. 1999;8:138-43
195. Quist JJ, Dhert WJ, Meij BP, Visser WJ, Oner FC, Hazewinkel HA, et al. The prevention of peridural adhesions. A comparative long-term histomorphometric study using a biodegradable barrier and a fat graft. *J Bone Joint Surg Br*. 1998;80:520-6
196. Lee JY, Stenzel W, Ebel H, Wedekind C, Ernestus RI, Klug N. Mitomycin C in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats. *J Neurosurg*. 2004;100:52-5
197. Topsakal C, Akpolat N, Erol FS, Ozveren MF, Akdemir I, Kaplan M, et al. Seprafilm superior to Gore-Tex in the prevention of peridural fibrosis. *J Neurosurg*. 2004;101:295-302

198. Liu S, Boutrand JP, Bittoun J, Tadie M. A collagen-based sealant to prevent in vivo reformation of epidural scar adhesions in an adult rat laminectomy model. *J Neurosurg.* 2002;97:69-74
199. Massie JB, Huang B, Malkmus S, Yaksh TL, Kim CW, Garfin SR, et al. A preclinical post laminectomy rat model mimics the human post laminectomy syndrome. *J Neurosci Methods.* 2004;137:283-9
200. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Guldborg RE. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2007;22:286-97
201. Yamazaki M, Nakajima F, Ogasawara A, Moriya H, Majeska RJ, Einhorn TA. Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81:508-15
202. Gasiński P, Radek M, Józwiak J, Łyczak P. Blizna oponowa w operacjach ocinka lędźwiowego kręgosłupa - mechanizm powstawania, problemy kliniczne i próby profilaktyki. *Neurol Neurochir Pol.* 2000;34:983-93
203. Cemil B, Tun K, Kaptanoglu E, Kaymaz F, Cevirgen B, Comert A, et al. Use of pimecrolimus to prevent epidural fibrosis in a postlaminectomy rat model. *J Neurosurg Spine.* 2009;11:758-63
204. Tachihara H, Kikuchi S, Konno S, Sekiguchi M. Does facet joint inflammation induce radiculopathy?: an investigation using a rat model of lumbar facet joint inflammation. *Spine.* 2007;32:406-12
205. Nakano M, Matsui H, Miaki K, Yamagami T, Tsuji H. Postlaminectomy adhesion of the cauda equina. Changes of postoperative vascular permeability of the equina in rats. *Spine (Phila Pa 1976).* 1997;22:1105-14
206. Saal JS, Franson RC, Dobrow R, Saal JA, White AH, Goldthwaite N. High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniations. *Spine (Phila Pa 1976).* 1990;15:674-8
207. Schultke E, Griebel RW, Juurlink BH. Quercetin attenuates inflammatory processes after spinal cord injury in an animal model. *Spinal Cord.*48:857-61
208. Schultke E, Griebel RW, Juurlink BH. Quercetin administration after spinal cord trauma changes S-100 levels. *Can J Neurol Sci.*37:223-8
209. Schultke E, Kamencic H, Skihar VM, Griebel R, Juurlink B. Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: correlation of treatment duration with recovery of motor function. *Spinal Cord.*48:112-7
210. Timofeev AA, Maksjutina NP, Voitenko GN, Dobrovolskii Iu N. The use of quercetin granules for treating suppurative soft-tissue wounds of the maxillofacial area and neck. *Stomatologija (Mosk).* 1989;68:11-3
211. Dias AM, Braga ME, Seabra IJ, Ferreira P, Gil MH, de Sousa HC. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. *Int J Pharm.*408:9-19
212. Sun Y, Wang LX, Wang L, Sun SX, Cao XJ, Wang P, et al. A comparison of the effectiveness of mitomycin C and 5-fluorouracil in the prevention of peridural adhesion after laminectomy. *J Neurosurg Spine.* 2007;7:423-8
213. Kurt G, Aytar MH, Dogulu F, Cemil B, Erdem O, Baykaner MK, et al. A comparison of the local effectiveness of mitomycin C, aprotinin, and Adcon-L in experimental peridural fibrosis. *Surg Neurol.* 2008;70:608-13; discussion 13
214. Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:2081-7

215. Heinz SA, Henson DA, Austin MD, Jin F, Nieman DC. Quercetin supplementation and upper respiratory tract infection: A randomized community clinical trial. *Pharmacol Res.* 62:237-42
216. Tatsui CE, Martinez G, Li X, Pattany P, Levi AD. Evaluation of DuraGen in preventing peridural fibrosis in rabbits. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2005. *J Neurosurg Spine.* 2006;4:51-9
217. Akdemir H, Pasaoglu A, Selcuklu A, Ozturk F, Kurtsoy A. Prevention of adhesions after laminectomy: an experimental study in dogs. *Res Exp Med (Berl).* 1993;193:39-46
218. Massie JB, Schimizzi AL, Huang B, Kim CW, Garfin SR, Akeson WH. Topical high molecular weight hyaluronan reduces radicular pain post laminectomy in a rat model. *Spine J.* 2005;5:494-502
219. Park YK, Tator CH. Prevention of arachnoiditis and postoperative tethering of the spinal cord with Gore-Tex surgical membrane: an experimental study with rats. *Neurosurgery.* 1998;42:813-23; discussion 23-4
220. Mohsenipour I, Daniaux M, Aichner F, Twerdy K. Prevention of local scar formation after operative discectomy for lumbar disc herniation. *Acta Neurochir (Wien).* 1998;140:9-13
221. Nambu M. Rubber with high water contain. *MOL.* 1986;6:86-91

## 10. Spis tabel i rycin

### Aneks I (tabele)

Tabela I	Przegląd metod prewencji blizny nadoponowej
Tabela II	Wartości amplitudy i latencji I i II składowej SSEP w eksperymencie pierwszym
Tabela III	Wartości amplitudy i latencji I i II składowej SSEP w eksperymencie trzecim
Tabela IV	Ocena histologiczna opony twardej i neuronów w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w eksperymencie pierwszym
Tabela V	Ocena histologiczna opony twardej i neuronów w zwojach czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych w eksperymencie trzecim
Tabela VI	Ocena półilościowa intensywności ekspresji OPN w eksperymencie pierwszym

### Aneks II (ryciny)

Rycina 1	Badanie MRI w czasie T2 w przekrojach strzałkowym (A) i poprzecznym (B) ukazuje rozległą bliznę nadoponową otaczającą worek oponowy u 59-letniej pacjentki w rok po laminiektomii na poziomie L5.
Rycina 2	Trójwymiarowy model struktury cząsteczki quercetyny (A). Makroskopowy wygląd komercyjnie dostępnej quercetyny w postaci proszku o ponad 95% czystości (B).
Rycina 3	Schemat mechanizmu działania quercetyny w prewencji hipertroficzej blizny.
Rycina 4	Preparat TachoComb w oryginalnym opakowaniu zapewniającym sterylność (A). TachoComb jest preparatem złożonym z pianki fibrynowej pokrytej klejem fibrynowym. Powierzchnia pokryta klejem jest oznaczona kolorem żółtym w celu ułatwienia jego stosowania (B).
Rycina 5	Samiec szczura rasy Wistar - waga 500 mg (A). Szczur po znieczuleniu, usunięciu sierści oraz odkażeniu pola operacyjnego ułożony na stoliku operacyjnym (B).
Rycina 6	Wiertarka szybkoobrotowa z wiertłem średnicy 1 mm, używana do wykonywania laminiektomii lędźwiowej.

- Rycina 7 Makroskopowy obraz laminektomii na poziomie L5 (A). Obraz z mikroskopu operacyjnego ukazuje wykonaną laminektomię na poziomie L5 (B).
- Rycina 8 Sposób rejestracji SSEP.
- Rycina 9 Zapis potencjału SSEP z naniesionymi składowymi I i II.
- Rycina 10 Przekrój poprzeczny kręgosłupa lędźwiowego na wysokości laminektomii. Sposób pomiaru grubości opony.
- Rycina 11 Porównanie wartości amplitud (A) i latencji (B) składowych I i II SSEP w eksperymencie drugim.
- Rycina 12 Badanie tomografii komputerowej kręgosłupa lędźwiowego szczura w projekcji osiowej na poziomie laminektomii.
- Rycina 13 Eksperyment pierwszy. Przekroje poprzeczne kręgosłupa lędźwiowego na poziomie L5.
- Rycina 14 Przekroje poprzeczne kręgosłupa lędźwiowego na poziomie L5 w grupach G3, G4, G5 i G6.
- Rycina 15 Rozległość blizny nadoponowej w skali wg He w eksperymencie drugim.
- Rycina 16 Wyniki pomiarów grubości opony twardej w eksperymencie drugim.
- Rycina 17 Przykładowy obraz histologiczny ekspresji OPN w tkance kostnej u zwierzęcia po laminektomii.
- Rycina 18 Przykładowe preparaty obrazujące ekspresję OPN w tkankach kanału kręgowego.
- Rycina 19 Ocena półilościowa intensywności ekspresji OPN w eksperymencie drugim.
- Rycina 20 Ekspresja OPN w zrostach pajęczynówki i korzeniach nerwowych w eksperymencie drugim.
- Rycina 21 Ekspresja OPN w neuronach zwojów czuciowych korzeni nerwów rdzeniowych.
- Rycina 22 Ekspresja CD31 w śródbłonku naczyń krwionośnych.
- Rycina 23 Ocena półilościowa intensywności ekspresji OPN w eksperymencie trzecim.

