

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Piotr Czarnecki

Regeneracja nerwu strzałkowego szczura po zespoleniu koniec do boku

rozprawa doktorska

promotor:

prof. dr hab. med. Leszek Romanowski

Katedra i Klinika Traumatologii,
Ortopedii i Chirurgii Ręki

praca wykonana w ramach grantu KBN N N403 1083 33

Poznań 2008

Szczególnie dziękuję mojemu Nauczycielowi,
prof. dr hab. med. Leszkowi Romanowskiemu za zawsze cenne uwagi i pomoc.

Dziękuję prof. dr hab. med. Elżbiecie Kaczmarek, prof. dr hab. med. Wiesławie Biczysko, prof. dr hab. n. med. Juliuszowi Huberowi, mgr Agnieszce Szukale oraz dr Aleksandrowi Astapowowi za pomoc w wykonaniu badań.

1. Spis treści

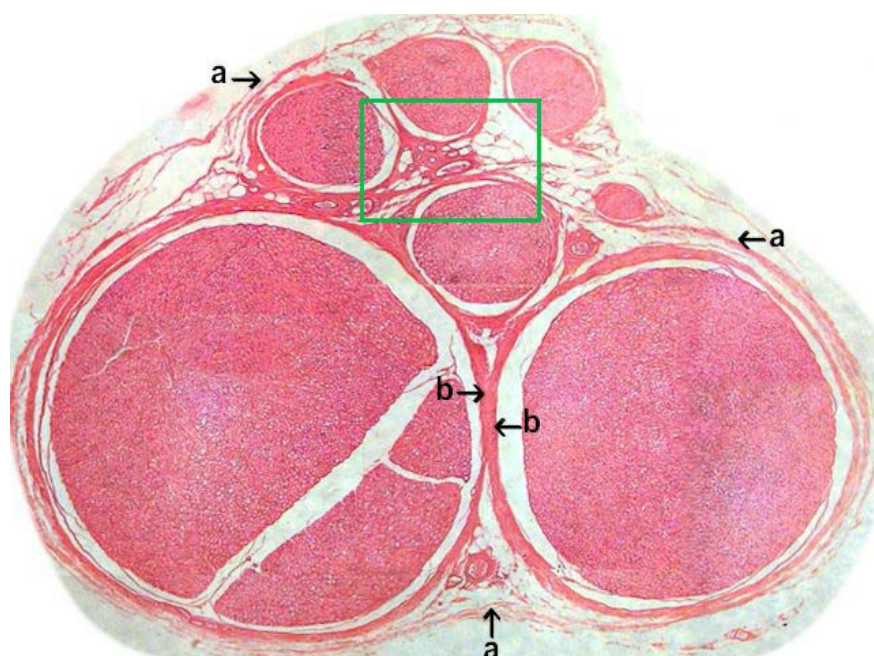
2.	Wstęp	5
	Definicja, etiologia, częstość występowania oraz podział uszkodzeń nerwów	5
	Regeneracja nerwu.....	6
	Historia leczenia uszkodzeń nerwów	9
	Klasyczne możliwości naprawy nerwów	10
	Szew koniec do końca	10
	Rekonstrukcja wolnym przeszczepem	11
	Zastosowanie neurotub.....	11
	Alternatywne możliwości leczenia uszkodzeń nerwów	12
	Współczesne problemy leczenia uszkodzeń nerwów	12
	Koncepcja szwu nerwu koniec do boku	13
	Możliwości oceny regeneracji nerwów u szczura	15
3.	Założenia i cele pracy	17
4.	Materiał i metodyka	18
	Materiał badawczy	18
	Metodyka	19
	Operacja	19
	Badanie odcisku łap tylnych	20
	Badanie elektrofizjologiczne	22
	Badanie histomorfometryczne.....	24
	Analiza statystyczna	26
5.	Wyniki badań.....	27
	Wyniki badania odcisku łap tylnych	27
	Ocena funkcji nerwu strzałkowego	27
	Ocena funkcji nerwu piszczelowego	28
	Ocena funkcji nerwu kulszowego.....	29
	Zależności pomiędzy wynikami	30
	Podsumowanie	30
	Wyniki badania elektroneurograficznego	32
	Badanie nerwu strzałkowego	32

Badanie nerwu piszczelowego	35
Zależności pomiędzy badanymi parametrami	38
Podsumowanie	38
Wyniki badania histomorfometrycznego	39
Badanie nerwu strzałkowego	39
Badanie nerwu piszczelowego	42
Zależności pomiędzy badanymi parametrami w nerwie strzałkowym i piszczelowym ...	44
Podsumowanie	44
6. Dyskusja	45
Badanie odcisków łap tylnych	45
Badanie elektroneurofizjologiczne	46
Badanie histomorfometryczne	47
Podsumowanie	49
7. Wnioski	50
8. Skróty	51
9. Spis rycin i tabel	52
Ryciny	52
Tabele	53
10. Piśmiennictwo	55
11. Streszczenie	64
12. Abstract	66

2. Wstęp

Definicja, etiologia, częstość występowania oraz podział uszkodzeń nerwów

Nerw (od łac. nervus "ścięgno, struna") - splot różnej długości i grubości włókien nerwowych (wypustek neuronów - aksonów) okrytych wspólną otoczką, wchodzących w skład obwodowego układu nerwowego i przewodzących bodźce czuciowe (włókna aferentne) i ruchowe (włókna eferentne) oraz włókna układu autonomicznego. Jest to struktura o skomplikowanej budowie, zawierająca elementy tkanki nerwowej (aksony, komórki Schwanna, mielina), elementy tkanki łącznej (epineurium, perineurium, endoneurium) oraz własne naczynia krwionośne - Rycina 1. (1) (2) (3)



Rycina 1 Makroskopowy obraz przekroju nerwu: a – epineurium, b – perineurium, zielonym prostokątem zaznaczono naczynie nerwu

Uszkodzenie nerwu jest sytuacją, w której pod wpływem urazu dochodzi do przerwania ciągłości jednej bądź wielu struktur wchodzących w jego skład. W zależności od mechanizmu oraz energii urazu uszkodzenie może obejmować poszczególne elementy budowy nerwu, na tej podstawie opierają się przyjęte klasyfikacje stopnia ciężkości uszkodzeń nerwów (Tabela 1). (4) (5)

Uszkodzenie nerwu występuje w 2 – 3% wszystkich urazów i jest znacznym problemem klinicznym oraz społecznym, ponieważ pacjenci często wymagają wielu operacji rekonstrukcyjnych, których efekt jest często niezadowalający. Do uszkodzeń dochodzi najczęściej w obrębie kończyny górnej w mechanizmie przecięcia ostrym przedmiotem lub zmiążdżenia. (6) (7) (8) (2) (9) (10) (11) (12)

Tabela 1 Klasyfikacje uszkodzeń nerwów wg Seddona i Sunderlanda

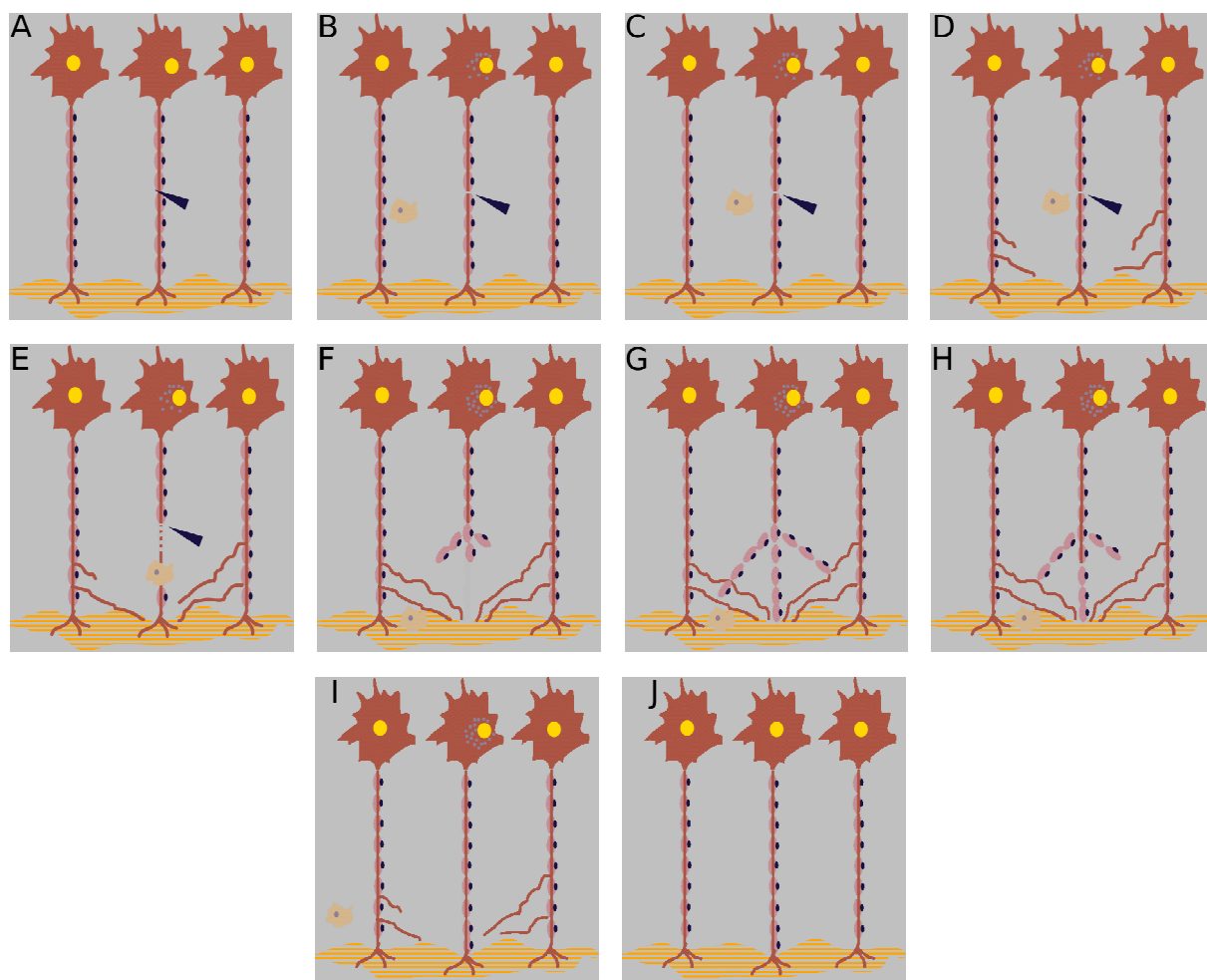
Seddon	Sunderland	Zmiany patofizjologiczne	Spontaniczny powrót funkcji
Neuropraxia	I	Uszkodzenie mieliny, zachowanie aksonów, brak degeneracji.	pełen
Axonotmesis	II	Uszkodzenie aksonów, zachowanie osłonki endoneuralnej, degeneracja aksonów.	pełen
	III	Uszkodzenie osłonki endoneuralnej, zachowanie osłonki perineuralnej, degeneracja aksonów.	częściowy
	IV	Zachowanie jedynie osłonki epineuralnej, degeneracja aksonów.	częściowy
Neurotmesis	V	Całkowite przerwanie ciągłości nerwu.	brak

Regeneracja nerwu

Po każdym uszkodzeniu od stopnia II według Sunderlanda następuje degeneracja struktur nerwu obwodowo od miejsca uszkodzenia obejmująca akson wraz z zakończeniami oraz osłonkę mielinową. W procesie tym uczestniczą komórki Schwanna, które ulegają wzmożonym podziałom oraz makrofagi, które migrują do miejsca uszkodzenia pod wpływem odpowiednich czynników. Podobny proces został również opisany w kierunku bliższym o miejsca uszkodzenia, do pierwszego przewężenia Ranviera. Niektórzy autorzy stwierdzili zmiany zachodzące dalej w aksonie oraz w ciele komórki nerwowej, takie jak obrzęk i migracja obwodowa jądra komórkowego, ciała komórki, rozproszenie ciałek Nissla. Są to procesy związane z przestawieniem się komórki na wzmożoną syntezę elementów budulcowych potrzebnych do regeneracji. (13) (14)

Kikut bliższy nerwu organizuje się, na końcu aksonów powstaje tzw. stożek wzrostu i jeśli spełnione są odpowiednie warunki (kontakt osłonki epi lub perineuralnej kikutu dalszego), komórki Schwanna, ulegające wzmożonym podziałom, tworzą tunel łączący miejsce uszkodzenia. Jeśli wypustki stożka wzrostu natrafią na kolumny komórek Schwanna, wtedy są prowadzone dalej w kierunku obwodowym na zasadzie neurotropizmu. Po udanym wzroście aksonu do miejsca efektora lub receptora, komórki Schwanna rozpoczynają syntezę mieliny odbudowując odpowiednią strukturę nerwu - Rycina 2, Tabela 2. (15) (14)

Zasadniczą rolą chirurga jest umożliwienie regeneracji poprzez stworzenie odpowiednich warunków – maksymalnie prawidłowego ułożenia i orientacji kikutów nerwu poprzez zbliżenie ich osłonek lub wypełnienie ubytku osłonki.



Rycina 2 Kolejne etapy regeneracji nerwu: A – uszkodzenie, B, C – migracja makrofagów, D – neurotropizm okolicznych aksonów, E – degeneracja, F, G – tworzenie kolumn komórek Schwanna, H – wzrost aksonu w kierunku efektorów lub receptora, I – unerwienie efektorów lub receptora, J – zakończenie regeneracji

Dla regeneracji niezbędne jest istnienie zjawiska neurotropizmu – ukierunkowania regeneracji oraz neurotrofizmu – podtrzymania wzrostu i odżywiania nerwu. (16) (17) Biorą w nich udział odpowiednie czynniki, m. in.:

- NGF (nerve growth factor) – jeden z pierwszych opisanych czynników wzrostu, podtrzymujący rozwój włókien zwłaszcza czuciowych i autonomicznych, dodatkowo wpływa na system immunologiczny i wydzielania wewnętrznego, działa poprzez połączenie z receptorem TrkA oraz poprzez cytokiny, jest uwalniany z komórek tłuszczowych (18) (19) (20)
- IGF-1 (insulin-like growth factor 1) – wpływa na większość komórek, w komórkach nerwowych reguluje wzrost i rozwój, działa poprzez połączenie z receptorem IGFR, po uszkodzeniu działa głównie w okolicy stożka wzrostu, stymuluje produkcję tubulin, proliferację fibroblastów, makrofagów oraz komórek Schwanna, (14) (21)
- CNTF (ciliary neurotrophic factor) – produkowany przez komórki Schwanna i astrocyty, głównie stymuluje rozwój motoneuronów, jest synergistą NGF, (22)
- EPO (erytropoetyna) – jedna z cytokin produkowana także w komórkach zwojowych oraz komórkach Schwanna po uszkodzeniu nerwu, uczestniczy w regeneracji poprzez

zmniejszenie reakcji zapalnej, wpływ na naczynia krwionośne nerwu, synergizm z IGF-1, (23)

- NNT 1, 3 (neurotrofina 1, 3) – niedawno odkryte czynniki neurotroficzne należące do cytokin, które mogą brać udział w rozwoju obwodowego układu nerwowego, (1)
- laminina – obecna w błonach podstawnych głównie tkanki mięśniowej, wydzielana do macierzy pozakomórkowej, gdzie utrzymuje połączenia międzykomórkowe. (1)

Tabela 2 Procesy zachodzące po uszkodzeniu nerwu oraz czas ich wystąpienia

czas od urazu	degeneracja	regeneracja
6 h	Przemieszczenie jądra komórkowego i rozproszenie ciałek Nissla.	Pojawiają się wypustki aksonalne.
1 dzień	W okolicy uszkodzenia pojawiają się makrofagi, stymuluje to proliferację komórek Schwanna. Pojawia się obrzęk kikuta dalszego.	Tworzenie stożków wzrostu zawierających element cytoszkieletu na końcu wypustek. Ciała uszkodzonych komórek powiększają się.
2 dni		W aksoplazmie pojawiają się mitochondria, potrzebne do transportu aksonalnego.
3 dni	Proces degeneracji obejmuje wszystkie zmienilinizowane aksony. Średnica aksonów maleje, a mielina zaczyna się rozpadać. Makrofagi i komórki Schwanna uprzątają pozostałości, co może trwać do 3 miesięcy. Maksymalne nasilenie proliferacji komórek Schwanna.	
4 dni		Wzrasta produkcja RNA w ciele komórki. Rozpoczyna się wzrost aksonów.
tydzień	Infiltracja komórek zapalnych oraz krwinek czerwonych wzdłuż rozpadającej się mieliny.	Podział komórek Schwanna, które zaczynają otaczać regenerujące aksony i hamują rozpad mieliny w tych miejscach. Obrzęk aksoplazmy spowodowany pojawieniem się mitochondriów.
2 tygodnie	Po uprzątnięciu pozostałości po rozpadzie, następuje zmniejszenie średnicy tuby nerwowej.	Komórki Schwanna otaczają regenerujące aksony i hamują rozpad mieliny.
3 tygodnie	Ukończenie zmian degeneracyjnych w kikucie dalszym.	Akson otoczony jest mielina, spada ilość organelli w komórkach Schwanna. Większość aksonów znajduje się poza tubami endoneurium.
4 tygodnie		Kontynuacja mielinizacji.

Historia leczenia uszkodzeń nerwów

Najwcześniejsze wzmianki o leczeniu uszkodzeń nerwów wiążą się z działalnością Galena, który podjął dyskusję na ten temat w roku 200 naszej ery rozróżniając nerw od ścięgna. Według doniesień i zapisów historycznych Paul z Arginii wykonał szew nerwu w roku 600, Rhazes i Avicenna w IX wieku, Ali Abu Ibn Sina z Persji w X wieku, ale brak jest dowodów na skuteczność tych operacji. (2)

Pierwsze znane i potwierdzone doniesienia na temat leczenia uszkodzeń nerwów pochodzą z trzynastego wieku, kiedy William de Salieto (1210-77) dokonał próby połączenia kikutów nerwu po urazowym przecięciu. Dokładniejszy opis techniki dał Gabriele Ferrara (1543-1627), który podczas operacji użył mieszanki wina i rozmarynu do oczyszczenia igły oraz nici, zbliżył szwem kikuty nerwu a następnie unieruchomił operowaną kończynę, aby spowodować zmniejszenie ryzyka uszkodzenia zespolenia. Koncepcję pierwotnego szwu epineuralnego przedstawił Hueter (1871, 1873) a w 1864 roku Nelaton opisał szew wtórny. (13) (24)

Podłoże teoretyczne do leczenia uszkodzeń nerwów przedstawił Muller w 1842, który wykazał istnienie aksonów w części dalszej od miejsca naprawy nerwu kulszowego królika. (25) Opracowanie i pomyślne wykonanie eksperymentu naukowego przez Hightona w 1795 (26) dało dowód możliwości wykonania szwu uszkodzonego nerwu i jego późniejszej regeneracji. Doświadczenie wykonane na psach polegało na przecięciu i następnie szwie nerwu błędnego a po 6 tygodniach wykonanie tej samej procedury po drugiej stronie. Przeżycie zwierząt musiało wiązać się z pomyślnym dokonaniem regeneracji przynajmniej jednego z nerwów i stanowiło bezpośredni jej dowód.

Techniki szwu nerwu po urazie zawdzięczają swój rozwój Wojnom Światowym, w których często dochodziło do uszkodzeń. Tak duży materiał dostarczył również spostrzeżeń na temat dolegliwości spowodowanych brakiem odpowiedniego zaopatrzenia uszkodzenia nerwu.

Dalsze lata to przede wszystkim rozwój badań eksperymentalnych jak i klinicznych nad możliwościami rekonstrukcji nerwów, zaproponowane zostały techniki przeszczepów auto i allogenicznym, uzupełniania ubytku neurotubą, transfery nerwów, szew koniec do boku, przeszczepy z naczyń żylnych oraz błon podstawnych miocytów.

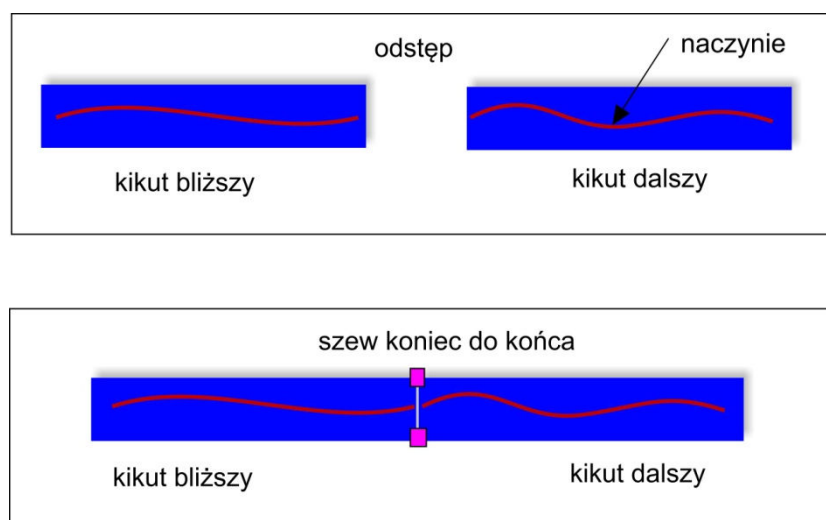
Klasyczne możliwości naprawy nerwów

Szew koniec do końca

Jest to najskuteczniejsza metoda naprawy, polegająca na bezpośrednim zbliżeniu i zeszcyciu kikutów nerwu (Rycina 3). (9) (24) (2) (8) (3) (27) Najczęściej możliwa do wykonania świeżo po urazie, ewentualnie wtórnie, jeśli ubytek po resekcji nerwiaków pozwala na zbliżenie kikutów bez napięcia. Posiada następujące odmiany:

1. Szew epineuralny – łączone jest epineurium
2. Szew fascikularny – łączone jest nerwie pęczkowe
3. Szew mieszany – połączeni obydwu powyższych technik

Ze względu na większy stopień trudności technicznej i brak przewagi w wyniku regeneracji, druga technika jest znacznie rzadziej stosowana. W celu zespolenia stosuje się szwy pojedyncze w minimalnej ilości zapewniającej zbliżenie kikutów, orientację ułatwia położenie naczyń nerwu oraz znajomość układu pęczków na odpowiednim poziomie uszkodzenia. (3) (24) Jest to istotne dla odpowiedniego dopasowania pęczków prowadzących odpowiednie grupy włókien (ruchowe, czuciowe, autonomiczne) tak, aby trafiły do odpowiednich tub, a następnie receptorów i efektorów.



Rycina 3 Szew koniec do końca, orientacja ułatwiona przez położenie naczyń krwionośnego

Rzadko, ze względu na niższą odporność mechaniczną zespolenia, do połączenia kikutów stosowany jest klej tkankowy. (28)

Dodatkowo proponowane są modyfikacje z odciążeniem miejsca zespolenia, które pozwala na zmniejszenie napięcia w miejscu połączenia osłonek obu kikutów nerwu, zmniejszenie ryzyka niedokrwienia i poprawę wyników regeneracji. (20) (29) (30) (31)

Rekonstrukcja wolnym przeszczepem

W przypadku istnienia ubytku pnia nerwu, pierwotnego lub po resekcji nerwiaka pourazowego bądź związanej z nieudaną wcześniejszą naprawą możliwe jest połączenie kikutów nerwu jednym lub więcej przeszczepem pobranym z innej okolicy ciała (Rycina 4). Ze względu na utratę funkcji w miejscu pobrania najchętniej używa się nerwu łydkowego, ew. nerwów skórnych ramienia i przedramienia lub nerwów międzyżebrowych. (24) (3) (9)

Przeszczepy powinny wypełnić ubytek, przekraczając o 10-15% średnicę zaopatrywanego nerwu. Wyniki regeneracji są gorsze niż w szwie koniec do końca ze względu na dwa miejsca zespolenia, mniejszą średnicę przeszczepów oraz ich długość. (32) (24)



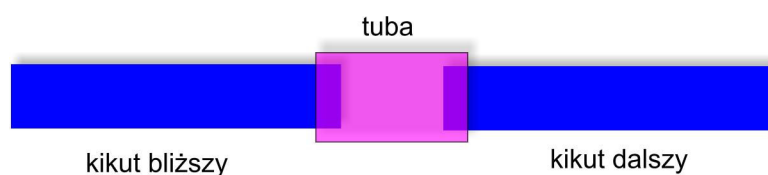
Rycina 4 Rekonstrukcja wolnym przeszczepem nerwu, przeszczepy z nadmiarem wypełniają średnicę ubytku

Minusami tej techniki jest brak funkcji w miejscu pobrania nerwu, ograniczona wielkość ubytku, wykonywanie dwóch zespołów przeszczepu. Z powodu braku własnego unaczynienia i konieczności odżywiania przeszczepu poprzez przenikanie substancji z otoczenia mogą wystąpić trudności w przetrwaniu przeszczepów w zmienionym rozległym urazem środowisku. (33)

Zastosowanie neurotub

Ubytek do 4 cm można również uzupełnić tubą wytworzoną syntetycznie, która stanowi tunel dla stożka wzrostu, kierując go do kikuta dalszego (Rycina 5). (34) (35) Poprzez wypełnienie tub czynnikami stymulującymi wzrost nerwów lub koloniami komórek Schwanna możliwe jest uzyskanie lepszych efektów regeneracji. Tuba wypełnia całą średnicę ubytku nerwu, nie wymaga pobierania przeszczepów – brak uszkodzenia dodatkowych struktur. Jednak z powodu swojej szczelności ogranicza odżywianie wzrastającego nerwu z zewnątrz. (36) (20) (34) (3) (37)

Zastosowanie mają neurotuby z materiałów niewchłanialnych: silikon, gore-tex oraz wchłanialnych: kwas poliglikolowy, kolagen, fibronektyna. Te drugie nie wymagają usuwania podczas kolejnej operacji. (38) (17)



Rycina 5 Rekonstrukcja i wypełnienie ubytku neurotubą

Alternatywne możliwości leczenia uszkodzeń nerwów

Istnieją inne techniki zaopatrywania lub rekonstrukcji uszkodzeń nerwów, które są rzadziej stosowane ze względu na trudności techniczne, trwające badania eksperymentalne lub niewielkie doświadczenie kliniczne. (38) (17) (39) Do tych możliwości należą:

- przeszczepy unaczynione – pobierane z nerwu łydkowego wraz z sąsiadującą żyłą, piszczelowego przedniego lub użycie uszypułowanego nerwu łokciowego w uszkodzeniach nerwów przedramienia mogą zapewnić lepszą regenerację, ale technika ta jest trudniejsza do wykonania i bardziej czasochłonna, (40) (41)
- allogeniczne przeszczepy nerwu – posiadają odpowiednią średnicę i potrzebną długość do uzupełnienia ubytku. Procedura wiąże się z odpowiednim przygotowaniem logistycznym do transplantacji oraz późniejszym stosowaniem immunosupresji, co powoduje jej ograniczone zastosowanie i powolny rozwój, (42) (43) (44)
- przeszczepy predegenerowane – z pobranego od dawcy przeszczepu nerwu usuwane są elementy układu nerwowego wraz z czynnikami neurosupresyjnymi oraz immunogennymi, z tego powodu nie wymagają immunosupresji po transplantacji, (45) (46)
- przeszczepy z naczyń żylnych – tuby z naczyń żylnych mogą być wypełnione dodatkowo błonami podstawnymi miocytów, które wydzielają lamininę. Stwarza to dobre środowisko do regeneracji z dodatkowo działającymi czynnikami neurotroficznymi, (47) (48) (49) (50) (51)
- transfery nerwów – użycie dodatkowych gałęzi lub pni nerwów o mniejszej istotności w celu reinerwacji kikuta dalszego uszkodzonego nerwu – stosuje się nerwy międzyżebrowe, nerw przeponowy, gałęzie nerwu łokciowego czy mięśniowo-skórnego. (52) (53)

Współczesne problemy leczenia uszkodzeń nerwów

Mimo wciąż doskonalonych oraz nowych technik naprawy nerwów, wiele sytuacji klinicznych wciąż pozostaje bez opcji leczniczej mogącej zapewnić dobre rezultaty. Do problemów takich należą:

1. duże ubytki nerwów – najczęściej wynik urazu o dużej rozległości lub powikłanym niedokrwieniem i martwicą – zmiążdżenia, urazy naczyń (Rycina 6), (11) (27) (44)
2. trudności w odnalezieniu lub brak kikuta bliższego nerwu – spotykane w sytuacji wyrwania nerwu w urazach maszyną lub przy uszkodzeniu splotu ramiennego, (54) (11) (55)
3. brak regeneracji po naprawie czy rekonstrukcji klasycznymi metodami – stosowane metody szwu nerwu lub rekonstrukcji wolnymi przeszczepami lub neurotubą nie przyniosły efektu, brak źródeł przeszczepu nerwu do ponownej rekonstrukcji,

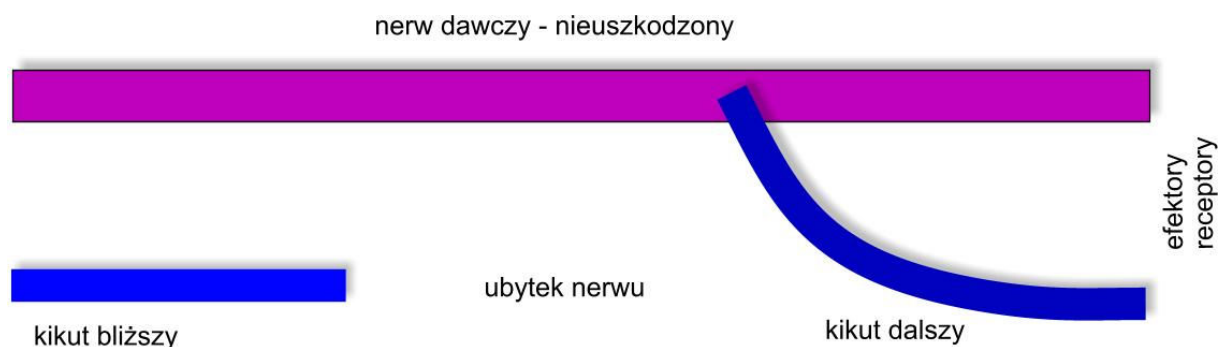
4. częściowa regeneracja po naprawie nerwu obejmująca funkcje czuciowe, brak powrotu funkcji ruchowej,
5. przedłużający się proces regeneracji powodujący nieodwracalne zmiany w mięśniach – brak funkcji ruchowej po zakończeniu regeneracji,
6. trudności w diagnostyce i zaopatrywaniu uszkodzeń wielu nerwów jak przypadku uszkodzenia splotu ramiennego,
7. leczenie uszkodzeń po awulsji korzeni nerwowych – brak możliwości technicznych i bariera biologiczna dla regeneracji przy replantacji korzeni do odpowiedniego odcinka rdzenia kręgowego.



Rycina 6 Ubytek nerwu pośrodkowego w przykurczu niedokrwiennym, narzędziami zaznaczono kikuty nerwu

Koncepcja szwu nerwu koniec do boku

Szew koniec do boku (end-to-side, ETS, terminolateral neurorrhaphy) opiera się na zespoleniu kikuta dalszego nerwu, który został uszkodzony (nerw biorczy) do przebiegającego w pobliżu prawidłowego nerwu (nerw dawczy) i związana jest z możliwością wytworzenia pobocznych połączeń z nerwu zdrowego (collateral sprouting), regenerujących poprzez kikut dalszy nerwu uszkodzonego (Rycina 7).



Rycina 7 Koncepcja szwu koniec do boku, kikut dalszy łączony jest możliwie najbliżej efektora bądź receptora

Historia tego typu zespolenia sięga końca XIX wieku (Lietievant 1873), ale udokumentowana została poprzez publikację Kennedy’ego w 1901. (56) Badania były kontynuowane do lat trzydziestych (Balance 1903, Harris i Low 1903, Powers 1904, Sherren 1906, Balance 1926, Gatta 1938) (57) (58) (59) a następnie temat zaniechano i ponownie „odkryto” na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Doświadczenia przeprowadzone przez Viterbo w 1992, Lundborga w 1994 przyniosły dowody na istnienie regeneracji po naprawie koniec do boku. Udowodniono istnienie włókien nerwowych dystalnie od miejsca zespolenia, preparaty mikroskopii elektronowej pokazały miejsce odejścia pobocznych włókien. (60) (61) (62) (63) (64) (65) Spektakularne badania z zastosowaniem barwienia z transportem wstecznym ukazały przechodzenie barwnika transportem aksonalnym z części obwodowej poprzez zespolenie do zwojów rdzenia kręgowego. (66) (67) (68)

Rozwijane badania doświadczalne na zwierzętach stały się podłożem do rozpoczęcia badań klinicznych, które do dziś przynoszą kontrowersyjne rezultaty. (63) (69) (70) (71) (72) (73) (74) Wyniki takich operacji są znacznie gorsze niż w warunkach doświadczalnych na zwierzętach. (75) (70) (58) (76)

Kolejnym dyskusyjnym problemem jest właściwe dopasowanie nerwu biorczego do dawczego. Opisano lepsze rezultaty szwu koniec do boku pomiędzy nerwami synergistycznymi, o mniejszej średnicy i przewodzie jednego rodzaju włókien (np. nerw ruchowy). (77) (78) Dlatego sprzeczne rezultaty tej techniki w warunkach klinicznych mogą wynikać z niewłaściwego doboru nerwów do zespolenia, a dobrych rezultatów można spodziewać się przy zawężeniu wskazań. (79) (75)

Część autorów porusza problem uszkodzenia nerwu dawczego, jako czynnik stymulujący regenerację poprzez zespolenie. Proponowane są różne metody uszkodzenia: zmiażdżenie, nacięcie, również otwarcie okienka epineuralnego związane jest z częściowym uszkodzeniem przylegających włókien nerwowych. (80) (81) Należy również przypuszczać, że w stosowanych modelach bez otwierania epineurium nerwu dawczego również dochodzi do uszkodzenia włókien nerwowych podczas zakładania szwów. Może to powodować dodatkową stymulację regeneracji nieuwzględnianą później w interpretacji wyników.

Ten sposób naprawy uszkodzenia nerwu wciąż budzi wiele emocji, ponieważ posiada wyraźne zalety i możliwe szerokie zastosowanie:

- zaopatrzenie dużych ubytków nerwu bez potrzeby pobierania przeszczepów,
- brak konieczności odszukania kikuta bliższego – nie jest on potrzebny do wykonania procedury,
- wykonanie jednego zespolenia – możliwe lepsze efekty regeneracji,
- krótka odległość od zespolenia do efektorów – szybsze uzyskanie efektu klinicznego.

W badaniach klinicznych szew taki jest stosowany w następujących sytuacjach:

1. rekonstrukcja splotu ramiennego,
2. naprawa uszkodzeń jednego z dużych nerwów przedramienia: pośrodkowego lub łokciowego,
3. leczenie uszkodzeń nerwów palcowych właściwych przy amputacjach całkowitych lub częściowych poprzez doszycie do sąsiedniego nerwu,
4. leczenie uszkodzeń nerwu twarzowego.

Z powodu niedostatecznej bazy teoretycznej, ryzyka uszkodzenia zdrowego nerwu dawczego zwłaszcza w kontekście słabych wyników klinicznych, wciąż istnieją następujące wątpliwości związane z tą techniką:

1. Jaki jest potencjał regeneracji w nerwie biorczym?
2. Czy istotne jest naruszenie struktury nerwu dawczego (otwarcie epineurum)?
3. Czy dochodzi do upośledzenia lub ograniczenia funkcji nerwu dawczego?
4. Jaki jest potencjał nerwu dawczego?

Możliwości oceny regeneracji nerwów u szczura

Badacze posługują się wieloma testami oceny regeneracji u szczura, który jest najczęściej wykorzystywanym modelem do badań nerwów. (82) (83) Do oceny regeneracji proponowane są metody z następujących grup:

- testy funkcjonalne: analiza chodu, odcisków łap, badanie czucia, ocena potliwości, siły skurczu mięśnia, ocena posługiwania się kończyną, czasu podparcia,
- badania elektroneurofizjologiczne: rejestracja potencjałów nerwu, mięśnia, potencjałów wywołanych,
- badania histologiczne: ocena morfometryczna, barwienie z transportem wstecznym,
- ocena masy mięśnia,
- badania mikroangiograficzne.

Istnieje ponad 20 opisanych testów funkcjonalnych, z których najczęściej używane są zgodne z opisywaną powyżej metodyką. (83) (82) (84) Większość autorów udowadnia istotną korelację pomiędzy wykładnikami funkcjonalnymi a morfologicznymi i fizjologicznymi. (82) (85) (86) Pojawiły się jednak badania na dużych grupach zwierząt (170 szczurów rasy Lewis), które stwierdzają brak zależności pomiędzy najczęściej stosowanymi wykładnikami regeneracji. (87) Należy wnioskować, że wciąż nie można opierać wniosków na jednej metodzie oceny, należy stosować badania, które oceniają odmienne aspekty regeneracji.

Metoda przedstawiana jest w wielu ułatwiających wykonanie wariantach. (88) (89) Do analizy chodu proponowane jest również użycie sprzętu (kamery, komputera), które nie były ujęte w oryginalnej metodzie. Takie rozwinięcie pozwala na analizę innych parametrów związanych z chodem zwierzęcia – czas podparcia, kąt kostkowy. (90) (91) (89) (92)

Metoda posiada również wady wynikające z dużych możliwości adaptacji szczura do wykonywania upośledzonej funkcji. Zastępowanie działania odnerwionych mięśni innymi tym samym daje lepszy obraz odcisku łapy i zafałszowanie wyników regeneracji. Również odcisk łapy zdrowej część autorów uznaje za zafałszowany w wyniku zwiększonego obciążania podczas gojenia i postępu regeneracji w łapie operowanej.

W grupie badań elektrofizjologicznych bazuje się na elektroneurografii, elektromiografii, rejestracji potencjałów wywołanych czuciowych (SEP) z rejestracją nadkorową i ruchowych (MEP). Najczęściej wyznacza się następujące parametry: amplitudę, latencję oraz prędkość przewodzenia. (83) (82) Znalazłem niewiele opisów zastosowania stymulacji cewką elektromagnetyczną z wykorzystaniem innej techniki badania. (93)

Ocena preparatów mikroskopowych pozwala stwierdzić obecność włókien nerwowych w regenerującym nerwie. W literaturze istnieje wiele opisów metodyki otrzymywania preparatów jak również ich oceny jakościowej i ilościowej. (94) (95) (50) Na podstawie analizy obrazu określa się ilość włókien zmienilinizowanych, ich średnicę, stosunek grubości mieliny do średnicy włókna, stosunek ilości włókien zmienilinizowanych do niezmienilinizowanych, gęstość włókien. (83) (82) (94) (96) (95)

Dodatkową pulę testów stanowią rzadziej stosowane metody oceny: pomiar siły skurczu mięśni, pomiar masy mięśni, badanie reakcji na ból. (83) (82) Ostatnio zyskuje na popularności metoda barwienia wstecznego, w której barwnik transportowany poprzez zespolenie i w przypadku jego wydolności i obecności regeneracji stwierdzany jest proksymalnie w komórkach zwojowych rdzenia kręgowego. Jest to metoda spektakularna, ale technicznie trudna w wykonaniu. (66)

3. Założenia i cele pracy

Na podstawie analizy piśmiennictwa oraz dotychczas prowadzonych badań nie udaje się jednoznacznie ustalić skuteczności. Dostępne publikacje, wykorzystujące różną metodykę opierają się często na niewielkim materiale i wynikającym z tego opracowaniu statystycznym o małym zaufaniu. (97) (69)

Najczęściej autorzy porównują szew koniec do boku do szwu koniec do końca, co uważam za nieadekwatne do najczęstszych sytuacji klinicznych. (97) Skuteczność badana tej koncepcji powinna być oceniana w kontekście innych metod rekonstrukcji ubytku nerwu takich jak np. użycie wolnych przeszczepów.

Nie jest również jasne, czy otwieranie osłonki epineuralnej nerwu dawczego ma wpływ na jakość regeneracji nerwu biorczego i czy powoduje zaburzenie funkcji nerwu dawczego. (61) (98)

Z tego powodu założyłem:

1. Możliwość regeneracji nerwu po zespoleniu koniec do boku
2. Brak różnic w jakości regeneracji w stosunku do rekonstrukcji nerwu wolnym przeszczepem
3. Brak wpływu otwarcia osłonki nerwu dawczego na jakość regeneracji nerwu biorczego
4. Brak upośledzenia funkcji nerwu dawczego

Zgodnie z wyżej wymienionymi założeniami celami pracy było:

1. zbadanie możliwości i skuteczności regeneracji nerwu rekonstruowanego za pomocą szwu koniec do boku,
2. porównanie regeneracji do klasycznej techniki rekonstrukcji wolnym przeszczepem,
3. określenie wpływu wykonania okienka epineuralnego w nerwie dawczym na stopień regeneracji nerwu biorczego,
4. określenie stopnia upośledzenia funkcji nerwu dawczego.

4. Materiał i metodyka

Materiał badawczy

Szczur jest najczęściej stosowanym modelem eksperymentalnym do badań nerwów głównie ze względu na histologiczne podobieństwo tkanki nerwowej do człowieka. Jako zwierzę eksperymentalne szczur jest stosunkowo tani, łatwy w utrzymaniu, dobrze poznany jeśli chodzi o stosowane leki anestetyczne oraz metody oceny funkcji nerwów.

Badaniu poddałem 45 szczurów, samic rasy Wistar o wadze od 197 do 260g (średnia 229g, SD 14g). Zwierzęta podzieliłem losowo na trzy grupy:

- A. szew koniec do boku bez nacięcia epineurium nerwu dawczego,
- B. szew koniec do boku z nacięciem epineurium nerwu dawczego,
- C. rekonstrukcja wolnym przeszczepem nerwu.

Wybrane zwierzęta są zaliczane do grupy, w której rzadko dochodzi do autotomii operowanej kończyny, dodatkowo charakteryzują się niską agresywnością.

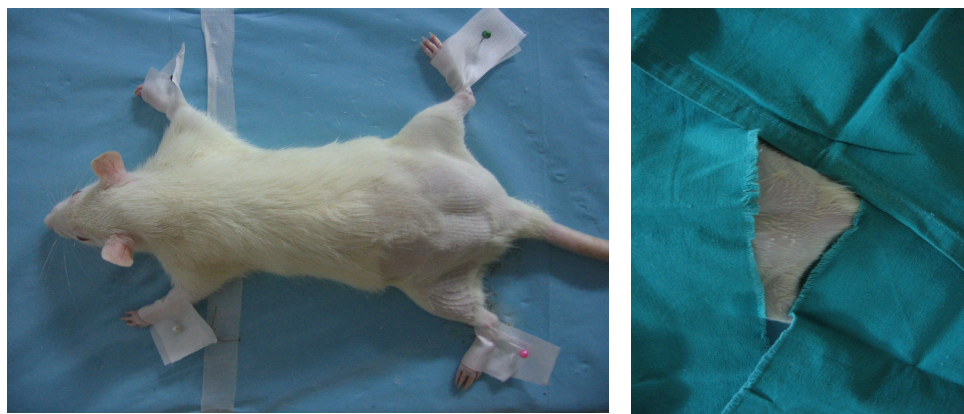
Jako nerw dawczy służył nerw piszczelowy, nerwem biorczym, rekonstruowanym był nerw strzałkowy. Taki wybór został podyktowany dwukrotnie większą średnicą nerwu piszczelowego, co technicznie umożliwia doszycie do niego nerwu strzałkowego. Nerw piszczelowy posiada również prawie dwukrotnie większą liczbę włókien nerwowych, co teoretycznie stanowi większy potencjał do regeneracji nerwu dawczego i może odpowiadać sytuacji klinicznej.

Metodyka

Operacja

Zwierzęta znieczulałem dootrzewnowo preparatem ketaminy (Ketanest) w dawce 90mg/kg masy ciała. Działanie leku rozpoczynało się po około 20 minutach od podania i utrzymywało przez około 2 godziny. Dodatkowo okolicę operowaną ostrzykiwałem roztworem lignokainy w stężeniu 1%.

Wykorzystywałem technikę mikrochirurgiczną, atraumatyczną, stosując odpowiednie narzędzia oraz powiększenie mikroskopu operacyjnego. Operowałem w warunkach aseptycznych, goliłem okolicę operowaną, przemywałem roztworem skażonym alkoholu i okładałem jałowymi chustami (Rycina 8).



Rycina 8 Przygotowanie zwierzęcia i pola operacyjnego

Operowałem po stronie prawej, strona przeciwna służyła jako kontrola.

Po przecięciu skóry wzdłuż brzegu talerza kości biodrowej, odwarstwiałem mięśnie pośladkowe dochodząc do przestrzeni, w której nerw kulszowy dzieli się na nerw strzałkowy, piszczelowy i łydkowy. Po odcięciu nerwu strzałkowego około 2 cm od miejsca jego odejścia wykonywałem odpowiednio (Rycina 9):

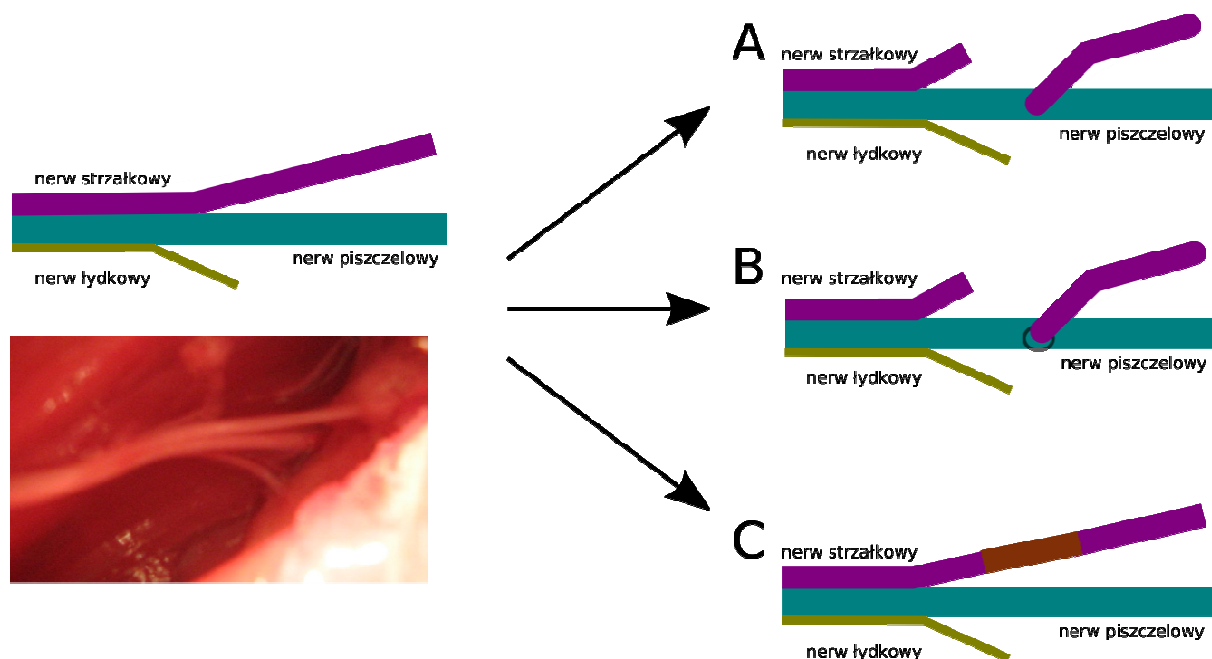
- A. w grupie A – doszycie kikuta dalszego nerwu strzałkowego do boku nerwu piszczelowego,
- B. w grupie B – jak wyżej, ale uprzednio otwierałem w kształcie owalnym epineurium nerwu piszczelowego i do brzegów ubytku wszywałem nerw strzałkowy,
- C. w grupie C – wycinałem fragment nerwu strzałkowego o długości 1 cm a następnie wszywałem go w ubytek po odwróceniu o 180° jako wolny przeszczep.

Okienko wykonywałem unosząc epineurium mikropęsetą, nacinając je następnie mikronożyczkami.

Część bliższą nerwu strzałkowego resekowałem do miejsca odejścia od nerwu kulszowego, aby zapobiec ewentualnej spontanicznej regeneracji. Stosowałem minimalną ilość szwów

monofilamentowych niewchłanianych Ethilon 10-0 (Ethicon), zapewniającą odpowiednią orientację i wytrzymałość zespoleń, w grupie A oraz B po 3 szwy, w grupie C po 2 szwy na zespolenie.

Zastosowanie pobranego miejscowo fragmentu nerwu strzałkowego eliminuje potrzebę uszkodzenia innej okolicy ciała. Odwrócenie przeszczepu o 180° zwiększa wiarygodność rekonstrukcji nie wpływając na jej wyniki. (99)



Rycina 9 Schemat i obraz śródoperacyjny podziału nerwu kulszowego oraz poszczególne grupy badawcze

Dojście operacyjne zeszywałem warstwowo szwem monofilamentowym wchłanianym PDS 4-0 (Ethicon), ranę pozostawiałem bez opatrunku.

Zwierzęta po wybudzeniu i kontroli stanu ogólnego przenoszone były do zwierzętarni Katedry i Kliniki Traumatologii, Ortopedii i Chirurgii Ręki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, gdzie otrzymywały pokarm i wodę wedle potrzeb oraz przebywały do zakończenia badania przez okres 24 tygodni w cyklu dobowym 12/12 godzin.

Po zakończeniu badania zwierzęta uśmiercałem stosując dawkę ketaminy przekraczającą dwukrotnie dawkę śmiertelną.

Badanie odcisku łap tylnych

Analiza odcisku łap szczura została przedstawiona w latach 80 ubiegłego wieku i ulegała stopniowej ewolucji. (100) (101) Jest obecnie ogólnie przyjętą i akceptowaną metodą oceny powrotu funkcji nerwów kulszowego, strzałkowego oraz piszczelowego u szczura. (88) (82) Analiza opiera się na wyznaczeniu długości śladu (PL – print length), odległości pomiędzy 1 a 5 (TS - toe spread) oraz 2 a 4 palcem (ITS – intermediary toe spread), a następnie

wyznaczeniu wartości opracowanych doświadczalnie współczynników. Parametry te oceniają funkcję nerwu kulszowego (SFI – sciatic function index), strzałkowego (PFI – peroneal function index) i piszczelowego (TFI – tibial function index). Współczynniki wylicza się według wzorów wyznaczonych doświadczalnie i potwierdzonych analizami statystycznymi. Otrzymane wartości wahają się od -100 – brak funkcji do 0 – pełna funkcja.

Współczynniki obliczałem na podstawie następujących wzorów:

1. $PFI = 174,9(EPL - NPL)/NPL + 80,3(ETS-NTS)/NTS - 13,4$
2. $TFI = -37,2(EPL - NPL)/NPL + 104,4(ETS-NTS)/NTS + 45,6(EIT-NITS)/NITS - 8,8$
3. $SFI = -38,8(EPL - NPL)/NPL + 109,5(ETS-NTS)/NTS + 13,3(EIT-NITS)/NITS - 8,8$

Oznaczenia E (EPL, ETS, EIT) stosują się do odpowiednich parametrów po stronie operowanej (experimental) a N (NPL, NTS, NIT) do nieoperowanej (nonoperated).

Zaletami opisywanej metody jest:

1. możliwość wielokrotnej oceny a tym samym śledzenia regeneracji,
2. nieinwazyjność, brak potrzeby znieczulania i operowania szczura,
3. porównywalność pomiędzy badaczami,
4. prostota wykonania, brak potrzeby posiadania kosztownego sprzętu.

Wadami opisywanej metody są:

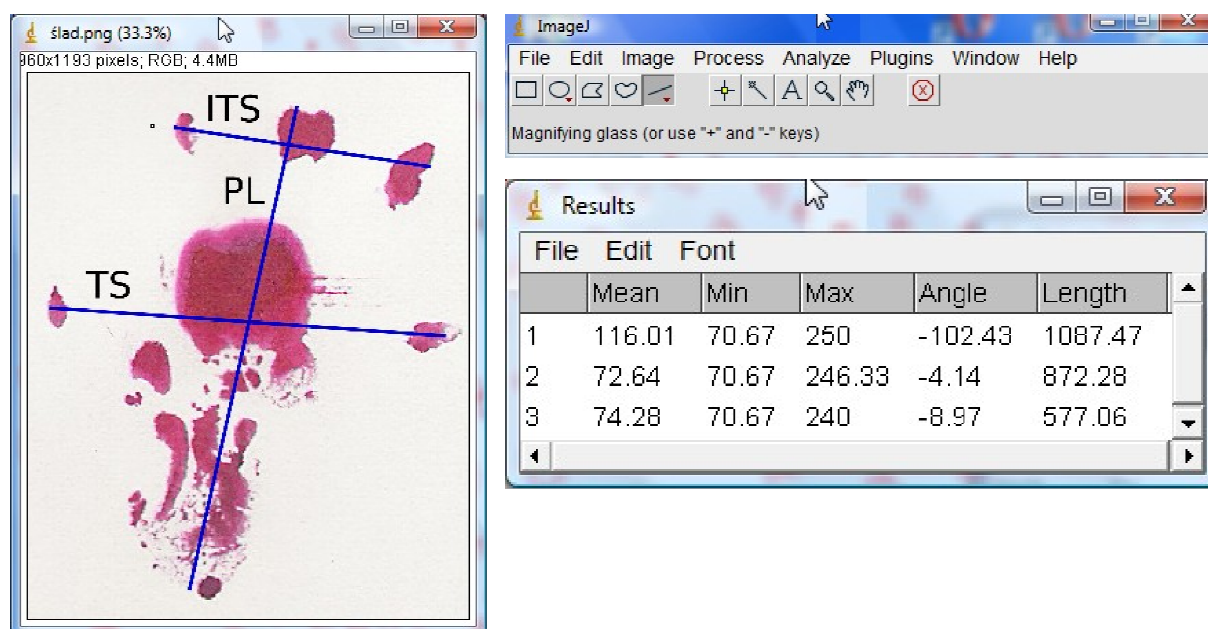
1. trudna interpretacja wyników ze względu na duże możliwości adaptacyjne szczura,
2. trudność w uzyskaniu poprawnego odcisku łapy w sytuacji dużych ubytków ruchowych lub wtórnych przykurczów.

Badanie przeprowadzałem co dwa tygodnie, pierwsze po dwóch tygodniach po operacji. Tylne łapy szczura maczałem w tuszu biurowym odpowiednio czerwonym dla łapy prawej i niebieskim dla łapy lewej. Zwierzę umieszczałem na specjalnie przygotowanej ścieżce, wyłożonej opisaniem datą badania i numerem zwierzęcia papierem, na której końcu znajdował się obszar zacieniony (Rycina 10). Badanie powtarzałem aż do otrzymania śladów możliwych się do oceny.



Rycina 10 Obraz odcisków tylnych łap szczura

Po wyschnięciu odciski skanowałem przy pomocy skanera płaskiego firmy Hewlett-Packard w rozdzielczości 300dpi i zapisywałem w formacie JPEG. Tak przygotowany obraz analizowałem przy pomocy programu ImageJ 1.39u, (National Institute of Health), w którym dokonywałem pomiaru wyżej wymienionych wartości w odpowiednim powiększeniu (Rycina 11). Otrzymane wartości przeliczałem na odpowiednie współczynniki w programie Microsoft Excel.



Rycina 11 Wykonywanie pomiarów z odcisku tylnej łapy szczura (opis wartości w tekście)

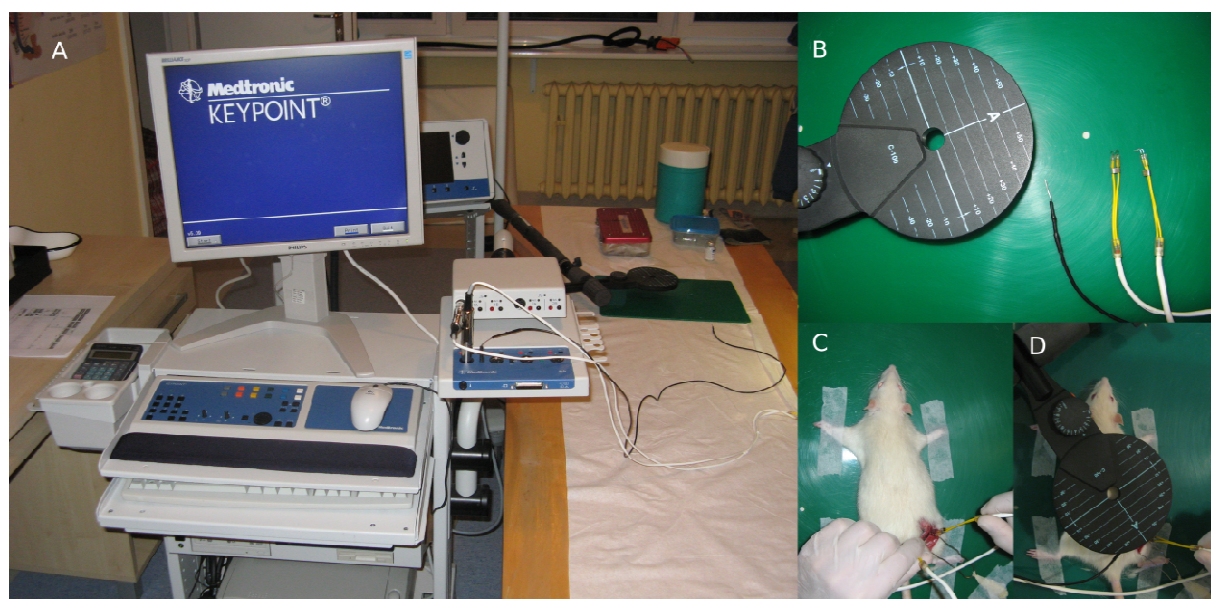
Badanie elektrofizjologiczne

Kolejnym badaniem określającym regenerację nerwu strzałkowego wspólnego (biorca) oraz ewentualnego uszkodzenia nerwu piszczelowego (dawca) jest badanie przewodnictwa impulsów nerwowych. Grupę kontrolną stanowiły dane z badań elektroneurograficznych odpowiednich pni nerwowych po stronie przeciwnej (nieoperowanych), co częściowo eliminowało zmiany osobnicze mierzonych wartości. Badanie wykonałem po 24 tygodniach od operacji, stosując opisane wcześniej dojście operacyjne, po jego zakończeniu pobierałem materiał do wykonania preparatów histologicznych.

Zastosowałem dwa punkty stymulacji:

1. włókna ruchowe nerwu kulszowego stymulowane poprzez parę srebrnych elektrod bipolarnych przyłożonych na przebiegu, 1 cm przed miejscem zespolenia,
2. włókna zstępujące istoty białej rdzenia kręgowego stymulowane cewką elektromagnetyczną a rejestracje przeprowadzano techniką MEP (Motor Evoked Potentials – ruchowe potencjały wywołane indukowane polem magnetycznym) 10 cm przed miejscem zespolenia.

Miejscem rejestracji był nerw strzałkowy oraz nerw piszczelowy. Srebrne elektrody bipolarne przykładane były około 1 cm od miejsca zespoleń, bez naciągania nerwu (Rycina 12). Przed każdym badaniem sprawdzałem położenie elektrody uziemiającej.

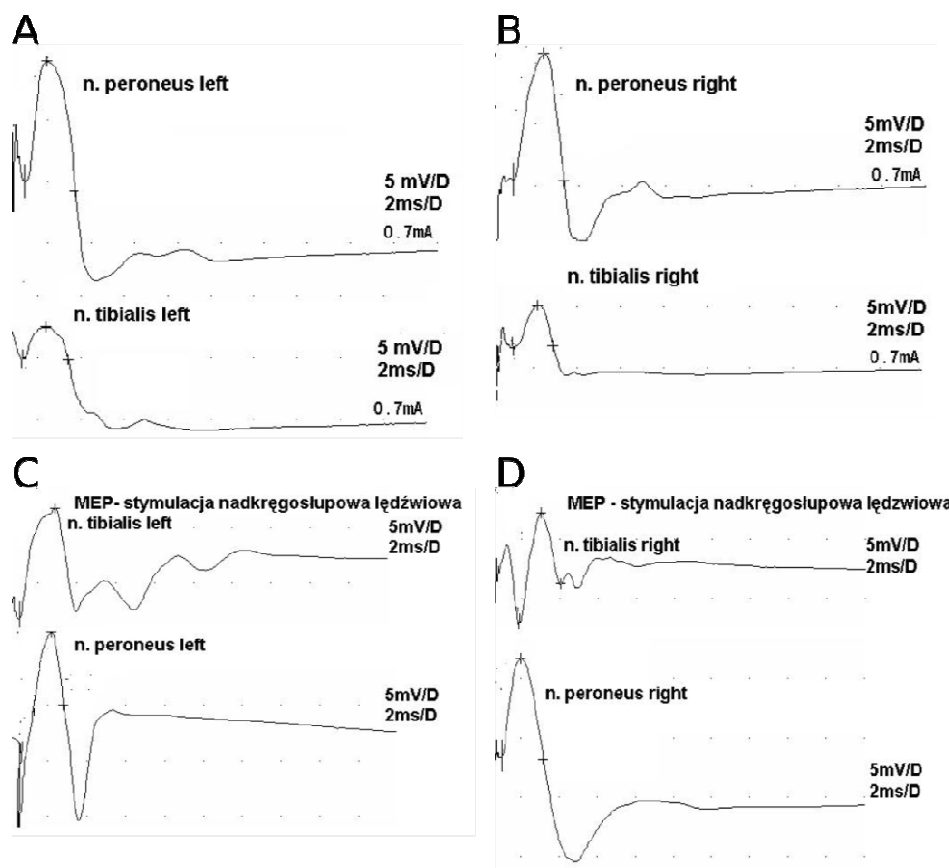


Rycina 12 Aparatura wykorzystana do badania elektroneurograficznego (A), cewka elektromagnetyczna z elektrodami (B) oraz technika wykonania badania (C – stymulacja bezpośrednia, D – MEP)

Stymulacja bezpośrednia elektrodą bipolarną była dotychczas szeroko stosowana i opisywana w literaturze jako rutynowa ocena regeneracji nerwu. (102) (103) (20) (104) Dodatkowo pojawiły się doniesienia o możliwości stymulacji pośredniej MEP, stosowanej klinicznie u ludzi. Metoda ta jest wyjątkowo opisywana w doświadczeniach na zwierzętach, głównie w stymulacji przezczaszkowej i rejestracji z mięśni na obwodzie. (93) Możliwość użycia cewki indukcyjnej w badaniu MEP może wyeliminować część zakłóceń w stymulacji elektrodą, spowodowanych jej bliską odległością od elektrody rejestrującej.

Analizowanym parametrem były wartości amplitudy potencjału wywołanego oraz latencji – czasu od momentu stymulacji do rejestracji (Rycina 13). Bezpośrednio zastosowałem stymulację elektrycznymi impulsami prostokątnymi o czasie trwania 0,1ms i częstotliwości 1Hz. Stymulację rozpoczynałem od natężenia prądu 0,06mA do wartości progowej, przy której amplituda nie ulegała zwiększeniu (Rycina 13).

Badanie przeprowadziłem w Zakładzie Patofizjologii Narządu Ruchu Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przy użyciu aparatu KeyPoint (stymulacja bezpośrednia nerwu) oraz MagPro (stymulacja rdzeniowa cewką elektromagnetyczną) wyprodukowanymi przez firmę Medtronic.



Rycina 13 Potencjały uzyskane w badaniu stymulacją bezpośrednią (A – lewa strona, B – prawa strona) oraz MEP (C – lewa strona, D – prawa strona)

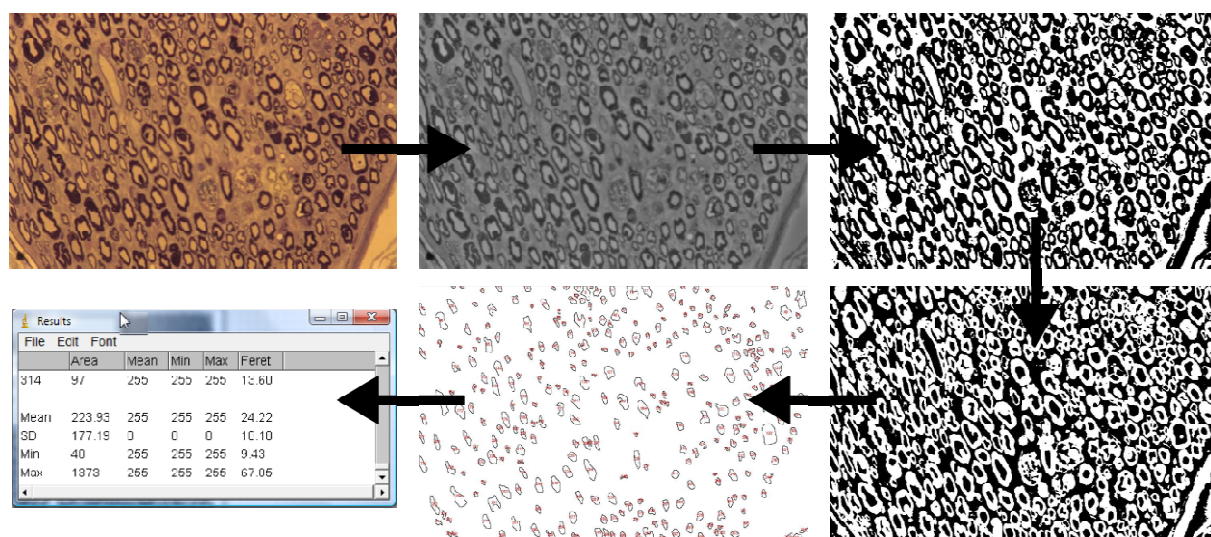
Badanie histomorfometryczne

Badanie oparłem na ocenie morfometrycznej, jako obiektywnej metodzie oceny elementów ilościowych nerwu. W literaturze proponowane są metody: manualna, półautomatyczna oraz automatyczna. Autorzy często opisują wady metody manualnej, jako zbyt czasochłonnej oraz automatycznej jako zbyt niedokładnej. (105) (95) (106) W badaniu wykorzystałem metodę półautomatyczną, wpływając na kolejne etapy oceny, zwłaszcza przygotowanie obrazu do obliczeń, modyfikując je w zależności od charakteru obrazu. (107) (94) (95)

Po zakończonym badaniu elektroneurofizjologicznym pobierałem preparaty nerwu strzałkowego oraz piszczelowego po stronie operowanej u wszystkich zwierząt oraz nieoperowanej u 15 losowo wybranych zwierząt (norma). Preparaty pobierałem 1cm od miejsca zespolenia i umieszczałem w odpowiednio oznakowanych numerem zwierzęcia oraz symbolem preparatu probówkach, zanurzając tkankę w roztworze Karnowskiego o temperaturze 4°C i pH 7,34.

Następnie preparaty przekazywałem do Pracowni Mikroskopii Elektronowej gdzie były umieszczane w buforze, osmowane i odwadniane. Kolejne etapy przygotowania preparatów obejmowały: zanurzanie w roztworach eponu, barwienie błękitem toluidyny oraz wykonanie skrawków półcienkich 0,5μm, które umieszczane były na szkiełku mikroskopowym.

Tak wykonane preparaty analizowałem w mikroskopii świetlnej w powiększeniu obiektywu 40x w Pracowni Morfometrii i Przetwarzania Obrazów Medycznych, wykonując cyfrowe zapisy trzech pól z każdego preparatu przy pomocy kamery i systemu Motic. Do analizy morfometrycznej używałem programu ImageJ z odpowiednio dobranymi wtyczkami. Proces przygotowania do analizy zawierał: skalowanie jednostek pomiarowych, redukcję szumów, konwersję do obrazu w 8 bitowej skali szarości, progowanie w celu wyeksponowania włókien nerwowych a następnie inwersji (Rycina 14).



Rycina 14 Kolejne etapy morfometrii: obraz wyjściowy, konwersja do odcieni szarości, wynik progowania, inwersja, zliczanie cząstek, wyniki liczbowe

Wynikiem właściwej analizy morfometrycznej (zliczania cząstek) o stałych parametrach zakresu wielkości wykrywanych cząstek, jak i stopnia ich okrągłości były następujące wartości wyznaczone w trzech odrębnych polach preparatu:

1. liczba włókien nerwowych w polu
2. średnica włókna bez osłonki mielinowej
3. powierzchnia włókna

Ponieważ zliczane cząstki nie były kołami, wyznaczałem średnicę Fereta, czyli odległość pomiędzy liniami równoległymi do brzegów cząstki.

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki surowe poddałem analizie statystycznej przy pomocy programu Statistica 7.1 (Statsoft). Wybór metod i odpowiednich testów był uzależniony od skali, na której opisane były analizowane zmienne, oraz charakteru rozkładu wyników i ewentualnego ich powiązania. (108) (109)

Cechy ilościowe zostały opisane statystykami podstawowymi przy użyciu średniej i odchylenia standardowego (SD).

Badałem istnienie istotnych różnic pomiędzy zmiennymi w poszczególnych grupach; w tej samej grupie, ale w różnych momentach badania jak i ewentualne istnienie korelacji pomiędzy zmiennymi.

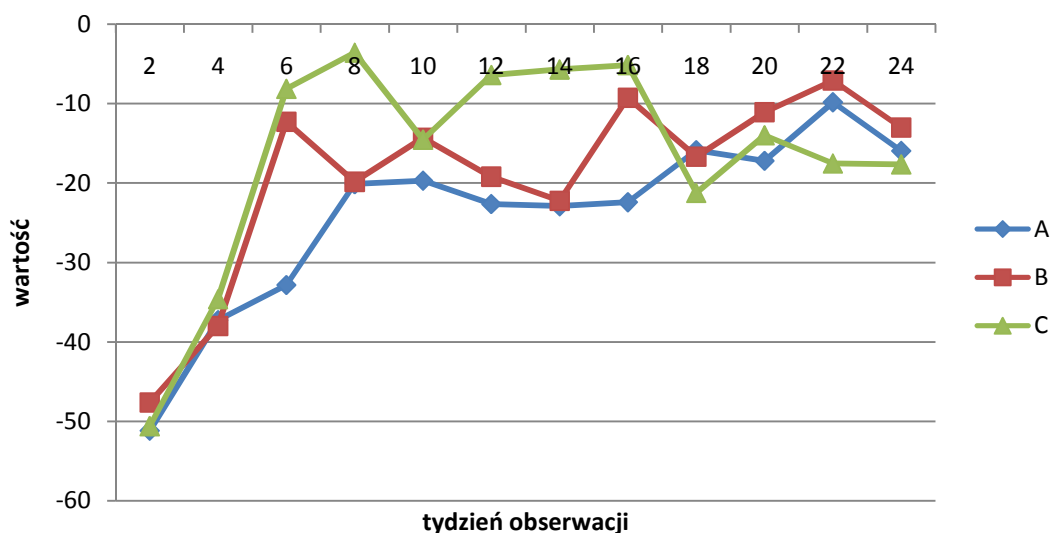
Za przedział ufności, przy którym wynik został uznany za istotny statystycznie przyjąłem $p < 0,05$.

5. Wyniki badań

Wyniki badania odcisku łap tylnych

Wartości wszystkich badanych współczynników w poszczególnych grupach i okresach obserwacji przedstawia tabela zbiorcza (Tabela 8).

Ocena funkcji nerwu strzałkowego



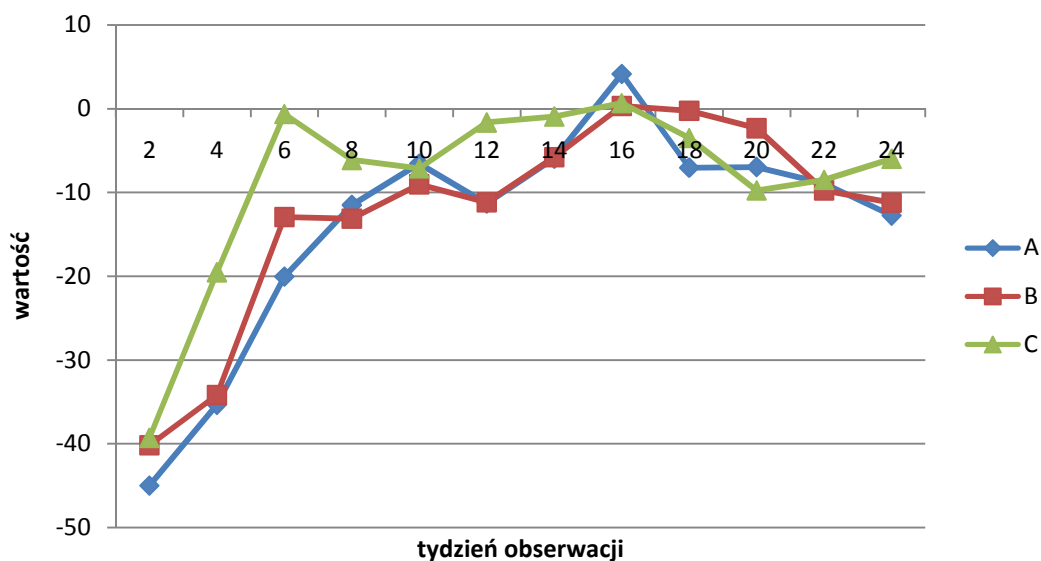
Rycina 15 Wartości PFI w poszczególnych okresach obserwacji i grupach

Analiza statystyczna wykazała stabilizację wartości współczynnika PFI od 8 tygodnia po operacji (test ANOVA). W punkcie końcowym (24 tygodnie po operacji) nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami współczynnika w poszczególnych grupach badawczych (test ANOVA, testy post-hoc Scheffe oraz LSD) - Tabela 3.

Tabela 3 Poziomy istotności różnic pomiędzy średnimi wskaźnika PFI w punkcie końcowym badania

poziom istotności test Scheffe				poziom istotności test LSD			
grupa	A	B	C	grupa	A	B	C
A		0,91	0,91	A		0,66	0,67
B	0,91		0,68	B	0,66		0,38
C	0,91	0,68		C	0,67	0,38	

Ocena funkcji nerwu piszczelowego



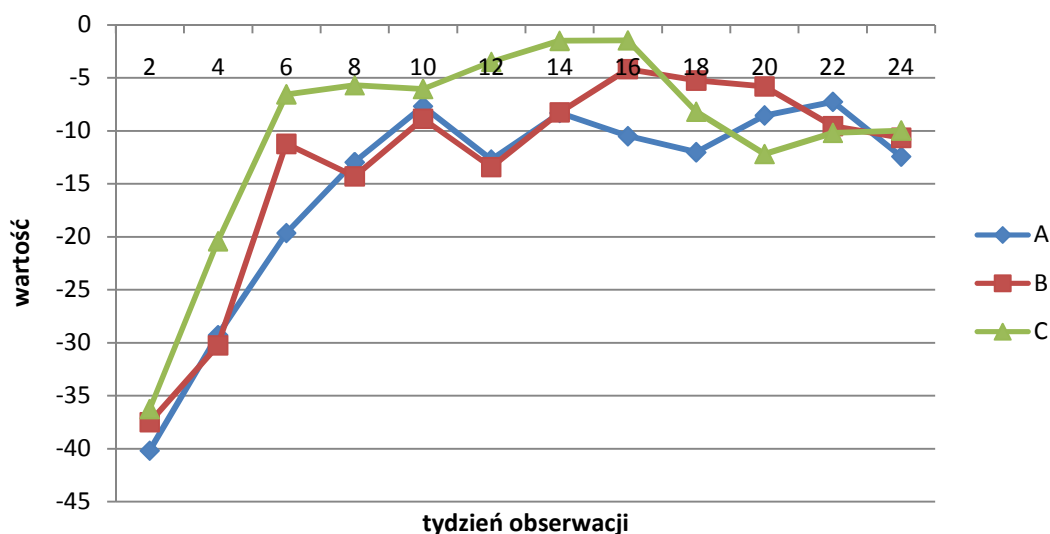
Rycina 16 Wartości TFI w poszczególnych okresach obserwacji i grupach

Analiza statystyczna wykazała stabilizację wartości współczynnika TFI od 6 tygodnia po operacji (test ANOVA). W punkcie końcowym (24 tygodnie po operacji) nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami współczynnika w poszczególnych grupach badawczych (test ANOVA, testy post-hoc Scheffe oraz LSD) - Tabela 4.

Tabela 4 Poziomy istotności różnic pomiędzy średnimi wskaźnika TFI w punkcie końcowym badania

poziom istotności test Scheffe				poziom istotności test LSD			
grupa	A	B	C	grupa	A	B	C
A		0,96	0,48	A		0,78	0,23
B	0,96		0,62	B	0,78		0,33
C	0,48	0,62		C	0,23	0,33	

Ocena funkcji nerwu kulszowego



Rycina 17 Wartości SFI w poszczególnych okresach obserwacji i grupach

Analiza statystyczna wykazała stabilizację wartości współczynnika SFI od 6 tygodnia po operacji (test ANOVA). W punkcie końcowym (24 tygodnie po operacji) nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami współczynnika w poszczególnych grupach badawczych (test ANOVA, testy post-hoc Scheffe oraz LSD) - Tabela 5.

Tabela 5 Poziomy istotności różnic pomiędzy średnimi wskaźnika SFI w punkcie końcowym badania

poziom istotności test Scheffe				poziom istotności test LSD			
grupa	A	B	C	grupa	A	B	C
A		0,94	0,89	A		0,73	0,63
B	0,94		0,99	B	0,73		0,89
C	0,89	0,99		C	0,63	0,89	

Zależności pomiędzy wynikami

Zależności pomiędzy parametrami nerwu strzałkowego i piszczelowego

Wykonałem analizę statystyczną korelacji wartości PFI i TFI w poszczególnych grupach badawczych w punkcie końcowym, aby stwierdzić czy lepsza funkcja nerwu strzałkowego mogła być związana z pogorszeniem wykładników funkcji nerwu piszczelowego. Stwierdziłem jedynie istotne dodatnie korelacje dla poszczególnych grup. Należy zauważyć, że współczynnik korelacji r był najmniejszy w grupie C a największy w grupie B (Tabela 6).

Tabela 6 Zależności pomiędzy PFI a TFI w poszczególnych grupach

grupa	Korelacja PFI i TFI	
	r	p
A	0,74	<0,05
B	0,85	<0,05
C	0,55	<0,05

Zależności pomiędzy czasem a wartością poszczególnych współczynników

Stwierdziłem istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy wartościami współczynników PFI, TFI oraz SFI a czasem obserwacji. Wartości p oraz współczynnika korelacji Pearsona przedstawia Tabela 7.

Tabela 7 Zależność pomiędzy współczynnikami PFI, TFI i SFI a czasem obserwacji

grupa	PFI		TFI		SFI	
	Współczynnik korelacji r	Wartość p	Współczynnik korelacji r	Wartość p	Współczynnik korelacji r	Wartość p
A	0,49	0,0001	0,43	0,0001	0,43	0,0001
B	0,39	0,003	0,44	0,0001	0,43	0,0001
C	0,23	0,0001	0,31	0,0001	0,28	0,0001

Podsumowanie

Wartości wszystkich badanych współczynników istotnie zależały od czasu i rosły do 8 tygodnia (PFI) lub 6 tygodnia (SFI) badania. W punkcie końcowym nie stwierdziłem istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi.

Tabela 8 Średnia i odchylenie standardowe parametrów w poszczególnych grupach i tygodniach obserwacji

grupa	parametr	okres obserwacji (tygodnie)											
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
A		PFI											
	średnia	-51,17	-37,27	-32,83	-20,11	-19,70	-22,64	-22,89	-22,41	-15,88	-17,20	-9,83	-15,94
	SD	21,51	16,54	19,46	16,59	17,75	10,57	17,35	12,60	13,55	10,73	11,49	17,00
	średnia	-47,61	-37,97	-12,27	-19,83	-14,31	-19,19	-22,22	-9,25	-16,66	-11,06	-7,08	-12,99
	SD	17,47	9,18	35,06	15,85	19,19	16,71	21,95	17,90	17,36	18,50	12,46	21,84
C	średnia	-50,60	-34,61	-8,12	-3,57	-14,52	-6,37	-5,68	-5,13	-21,22	-13,97	-17,51	-17,63
	SD	17,03	9,16	35,72	19,25	17,17	17,70	24,01	11,65	10,76	10,88	11,10	12,46
		TFI											
A	średnia	-45,00	-35,36	-20,06	-11,52	-6,57	-11,33	-5,97	4,12	-7,06	-6,98	-8,96	-12,77
	SD	11,48	20,75	17,63	14,80	10,47	19,10	14,29	28,17	9,18	11,26	12,08	10,18
B	średnia	-40,20	-34,19	-12,95	-13,15	-9,05	-11,20	-5,81	0,30	-0,26	-2,36	-9,77	-11,25
	SD	9,38	9,97	17,88	14,52	8,75	16,68	12,35	12,61	16,09	11,95	15,49	18,70
C	średnia	-39,31	-19,55	-0,66	-6,13	-7,14	-1,66	-0,95	0,65	-3,51	-9,77	-8,53	-5,99
	SD	12,55	15,95	21,28	18,68	6,57	15,93	13,93	13,57	13,31	12,33	10,13	12,55
		SFI											
A	średnia	-40,19	-29,29	-19,65	-12,97	-7,69	-12,72	-8,33	-10,51	-12,03	-8,56	-7,27	-12,44
	SD	9,29	17,88	17,80	12,82	10,87	14,35	10,95	18,89	7,84	11,44	11,50	10,98
B	średnia	-37,51	-30,26	-11,25	-14,32	-8,87	-13,44	-8,27	-4,20	-5,27	-5,82	-9,57	-10,67
	SD	7,55	9,55	16,74	14,19	6,73	13,52	11,16	12,37	14,69	10,98	11,82	16,46
C	średnia	-36,27	-20,42	-6,56	-5,70	-6,05	-3,49	-1,51	-1,47	-8,19	-12,20	-10,19	-9,97
	SD	10,00	12,91	17,88	18,52	6,66	13,68	12,36	11,20	11,27	11,32	9,23	10,93

Wyniki badania elektroneurograficznego

Badanie nerwu strzałkowego

Szczegółowe wartości amplitudy i latencji badanych w stymulacji bezpośredniej i MEP dla nerwu strzałkowego przedstawia Tabela 9, a graficzne porównanie rycina 18 do 21.

Tabela 9 Zestawienie wyników amplitudy i latencji oraz liczba zbadanych zwierząt

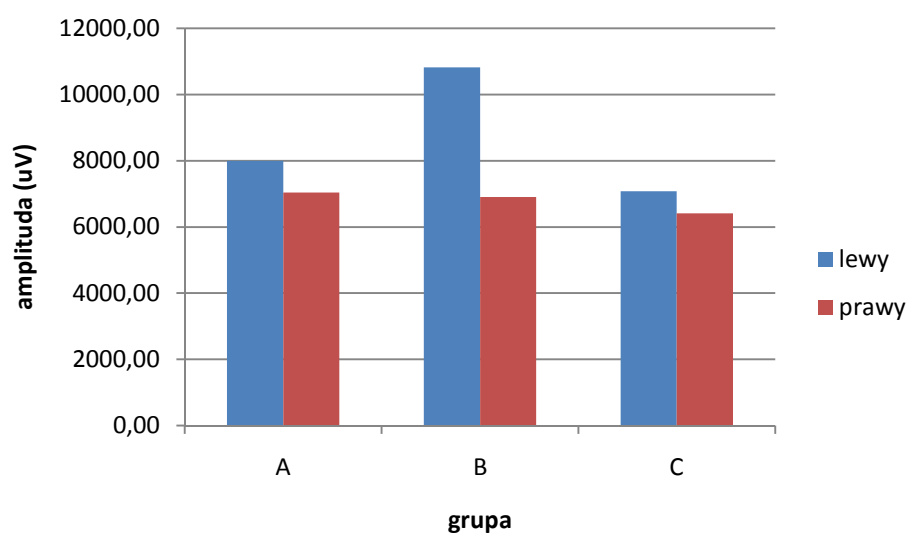
grupa	amplituda (μV)				latencja (ms)				liczba
	strona lewa (norma)		strona prawa		strona lewa (norma)		strona prawa		
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	
Stymulacja bezpośrednia									
A	8000,00	4459,07	7042,86	3520,65	0,89	0,20	1,02	0,27	14
B	10818,18	6856,21	6908,33	2523,87	0,88	0,13	0,92	0,27	12
C	7078,57	5847,71	6414,29	4310,96	1,01	0,38	0,96	0,25	14
Stymulacja MEP									
A	9238,46	6242,53	7353,85	4823,83	1,59	0,36	1,56	0,65	13
B	11991,67	7939,48	9958,33	6324,62	1,57	0,19	1,51	0,32	12
C	8013,33	5614,00	10514,29	5540,18	1,70	0,29	1,57	0,34	15

Zarówno w stymulacji bezpośredniej jak i pośredniej MEP nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami amplitudy i latencji nerwu strzałkowego badanymi po stronie operowanej (prawa) w stosunku do strony nieoperowanej (lewa). Wartości poziomu istotności p testów t-Studenta przedstawione są w Tabela 10.

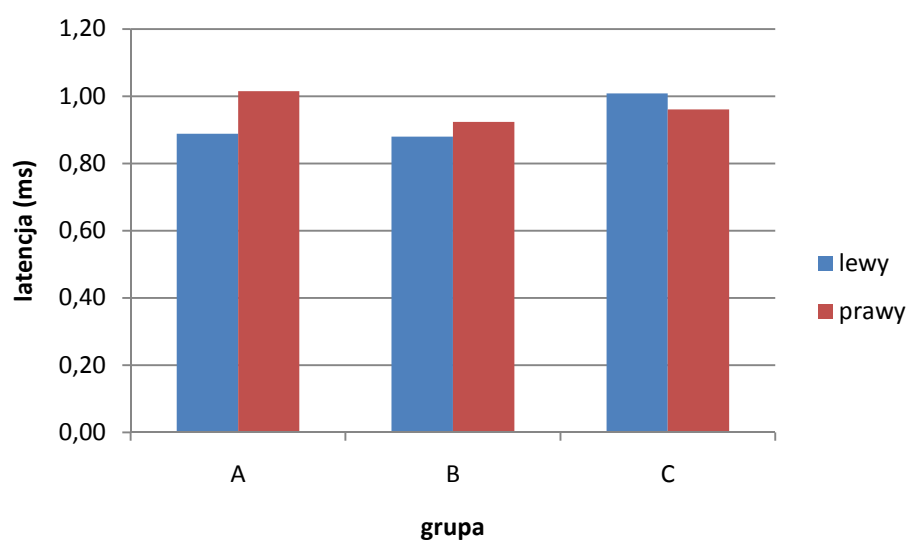
Tabela 10 Wartości p dla różnic amplitudy i latencji pomiędzy stroną operowaną a kontrolną

grupa	Wartość p amplituda	Wartość p latencja	Wartość p amplituda	Wartość p latencja
	Stymulacja bezpośrednia		Stymulacja MEP	
A	0,54	0,18	0,40	0,89
B	0,079	0,62	0,50	0,61
C	0,73	0,70	0,24	0,28

Stymulacja bezpośrednia



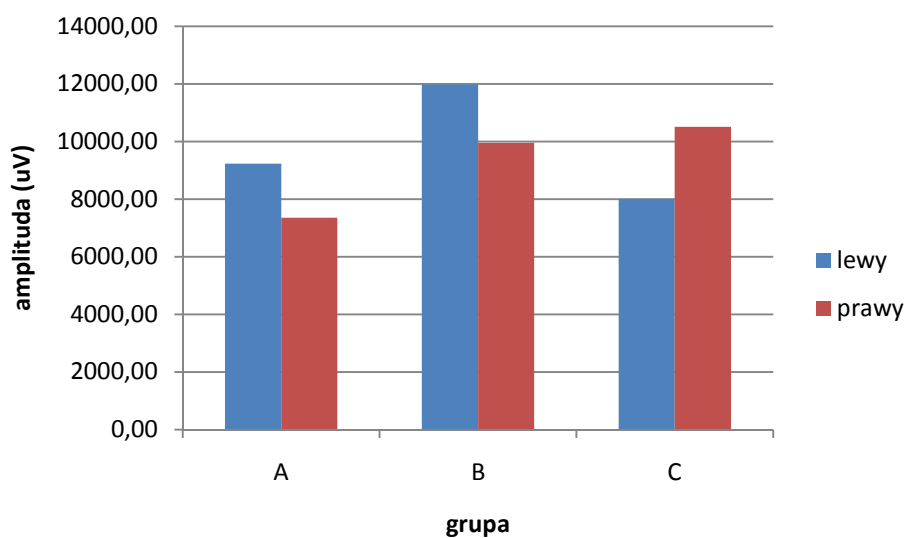
Rycina 18 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach



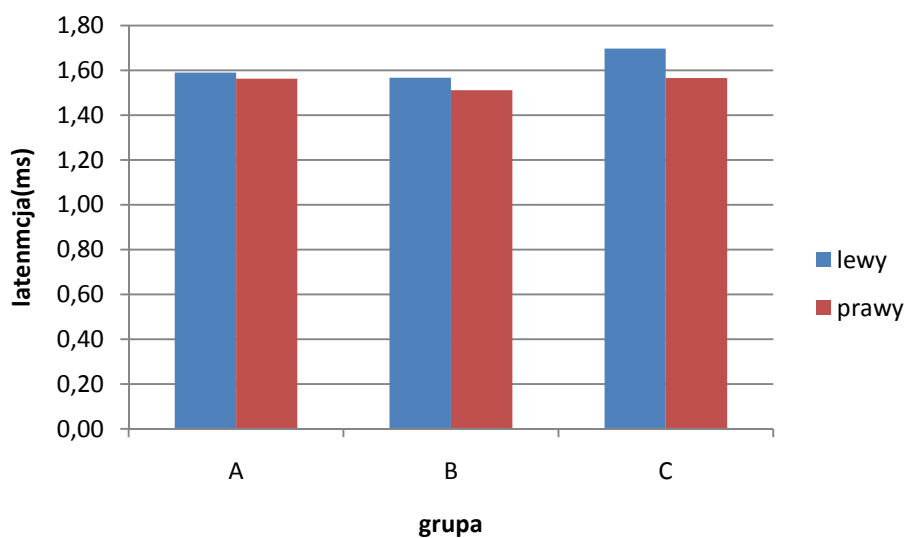
Rycina 19 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach

Posługując się analizą wariancji ANOVA oraz odpowiednimi testami post hoc wykluczyłem istotne różnice w wartościach badanych parametrów pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (Tabela 13).

Stymulacja MEP



Rycina 20 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach



Rycina 21 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach

Posługując się analizą wariancji ANOVA oraz odpowiednimi testami post hoc wykluczyłem istotne różnice w wartościach badanych parametrów pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (Tabela 13).

Badanie nerwu piszczelowego

Szczegółowe wartości amplitudy i latencji badanych w stymulacji bezpośredniej i MEP dla nerwu piszczelowego przedstawia Tabela 11, a graficzne porównanie rycina 22 do 25.

Tabela 11 Zestawienie wyników amplitudy i latencji oraz liczba zbadanych zwierząt

grupa	Amplituda (μV)				Latencja (ms)				liczba
	strona lewa (norma)		strona prawa		strona lewa (norma)		strona prawa		
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	
Stymulacja bezpośrednia									
A	8000,00	4459,07	7042,86	3520,65	0,89	0,20	1,02	0,27	14
B	10818,18	6856,21	6908,33	2523,87	0,88	0,13	0,92	0,27	12
C	7078,57	5847,71	6414,29	4310,96	1,01	0,38	0,96	0,25	14
Stymulacja MEP									
A	9238,46	6242,53	7353,85	4823,83	1,59	0,36	1,56	0,65	13
B	11991,67	7939,48	9958,33	6324,62	1,57	0,19	1,51	0,32	12
C	8013,33	5614,00	10514,29	5540,18	1,70	0,29	1,57	0,34	12

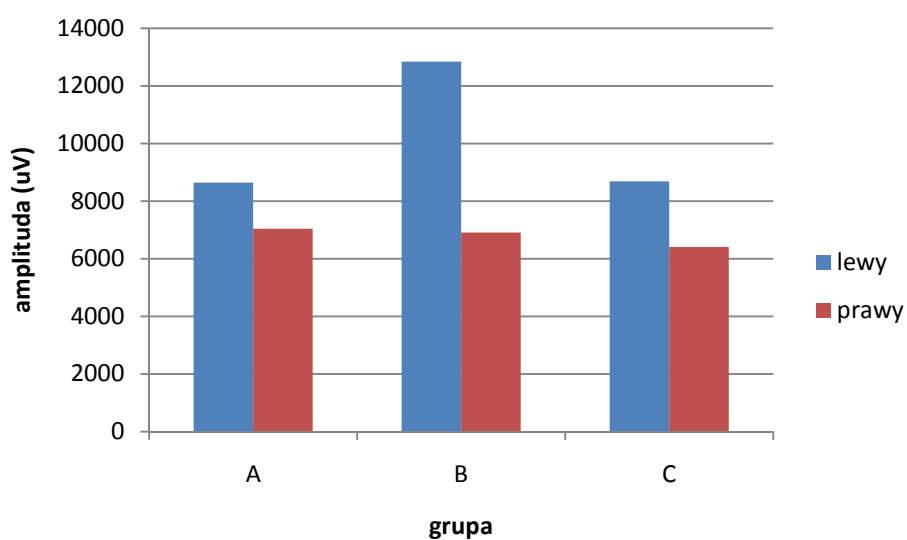
Zarówno w stymulacji bezpośredniej jak i pośredniej MEP stwierdziłem istotne statystycznie zmniejszenie wartości amplitudy nerwu piszczelowego po stronie operowanej (prawa) w stosunku do strony nieoperowanej w grupie A oraz B. Nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic w wartościach latencji. Wyniki testów t-Studenta przedstawia Tabela 12.

Tabela 12 Wartości p dla różnic amplitudy i latencji pomiędzy stroną operowaną a kontrolną

grupa	Wartość p amplituda	Wartość p latencja	Wartość p amplituda	Wartość p latencja
	Stymulacja bezpośrednia		Stymulacja MEP	
A	0,04	0,35	0,17	0,14
B	0,01	0,11	0,01	0,75
C	0,25	0,37	0,96	0,15

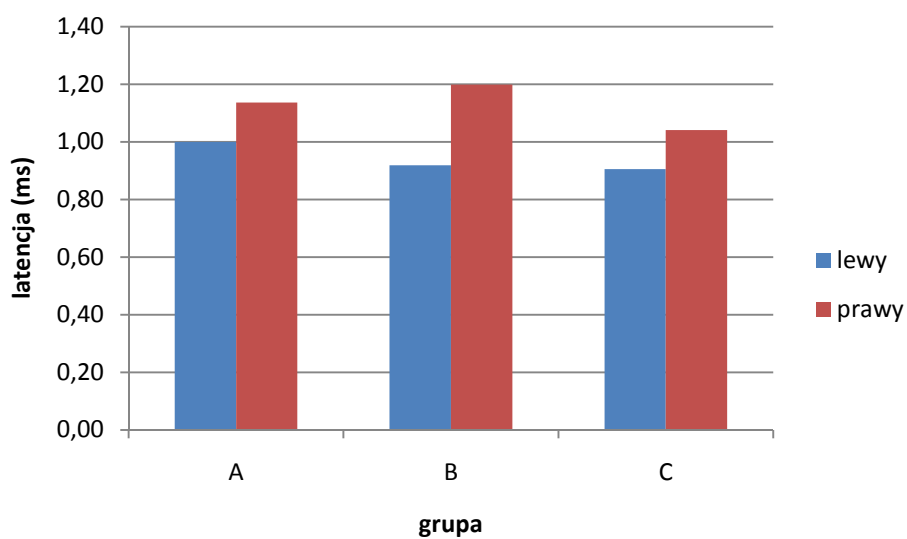
Posługując się analizą wariancji ANOVA oraz odpowiednimi testami post hoc wykluczyłem istotne różnice w wartościach badanych parametrów pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (Tabela 13).

Stymulacja bezpośrednia



Rycina 22 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach

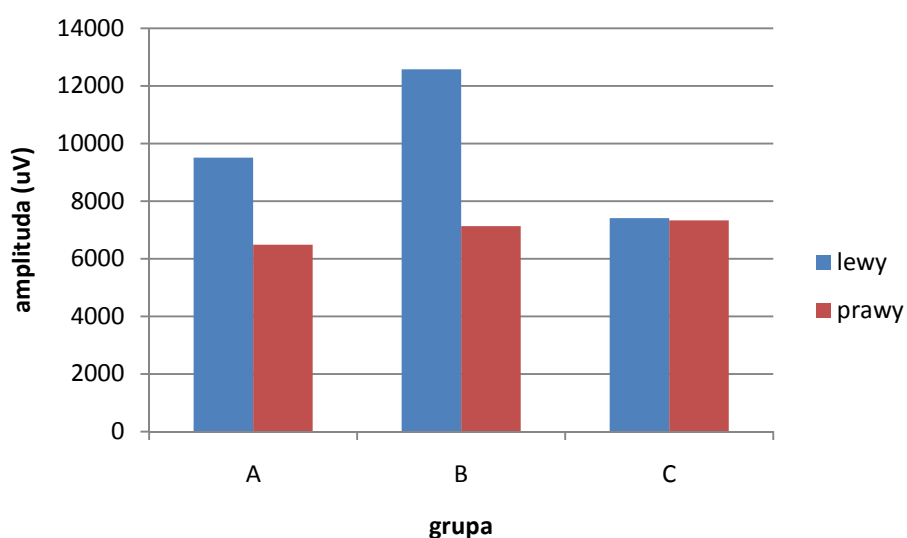
Analiza statystyczna wykazała, że wartości amplitudy w grupie A oraz B są istotnie niższe po stronie operowanej (Tabela 12).



Rycina 23 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach

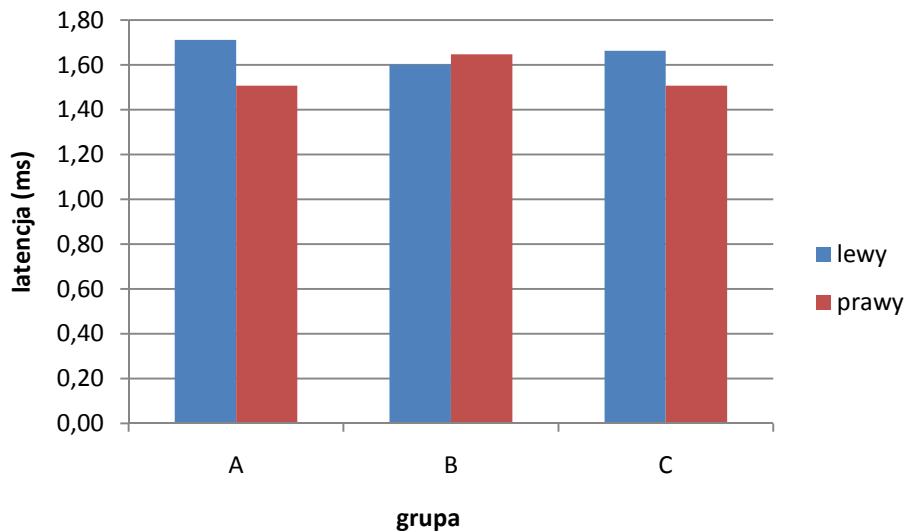
Wartości latencji pomiędzy stroną operowaną a nieoperowaną w poszczególnych grupach nie różniły się istotnie (Tabela 12)

Stymulacja MEP



Rycina 24 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach

Analiza statystyczna wykazała, że wartości amplitudy w grupie B są istotnie niższe po stronie operowanej (Tabela 12), różnica w pozostałych grupach jest nieistotna.



Rycina 25 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach

Wartości latencji pomiędzy stroną operowaną a nieoperowaną w poszczególnych grupach nie różniły się istotnie (Tabela 12)

Tabela 13 Wartości p testu ANOVA analizy wariancji pomiędzy grupami po stronie operowanej

nerw	p amplituda	p latencja	p amplituda	p latencja
	Stymulacja bezpośrednia		Stymulacja MEP	
strzałkowy	0,89	0,67	0,31	0,94
piszczelowy	0,96	0,60	0,83	0,40

Analiza wariancji sugeruje, że we wszystkich grupach badawczych zarówno dla nerwu piszczelowego jak i strzałkowego otrzymano wartości amplitudy i latencji nieróżniące się istotnie między sobą (Tabela 13).

Zależności pomiędzy badanymi parametrami

Dla nerwu strzałkowego stwierdziłem istotne dodatnie korelacje pomiędzy amplitudą i latencją badaną obiema metodami po stronie operowanej, w nerwie piszczelowym taka korelacja nie wystąpiła (Tabela 14).

Tabela 14 Wartości p oraz współczynnika korelacji r Pearsona

parametr	nerw strzałkowy		nerw piszczelowy	
	Współczynnik korelacji r	Wartość p	Współczynnik korelacji r	Wartość p
amplituda	0,41	0,01	0,14	0,42
latencja	0,42	0,008	-0,09	0,59

Nie stwierdziłem istotnych ujemnych korelacji wartości badanych parametrów pomiędzy nerwem strzałkowym a piszczelowym po stronie operowanej.

Podsumowanie

Nie stwierdziłem istotnych różnic w parametrach operowanego nerwu strzałkowego w stosunku do nieoperowanego. Parametry w poszczególnych grupach badawczych nie różniły się istotnie między sobą.

Nerw piszczelowy miał niższą amplitudę w grupach ze szwem koniec do boku w porównaniu do wartości po stronie nieoperowanej. Amplituda i latencja w poszczególnych grupach badawczych nie różniły się istotnie między sobą.

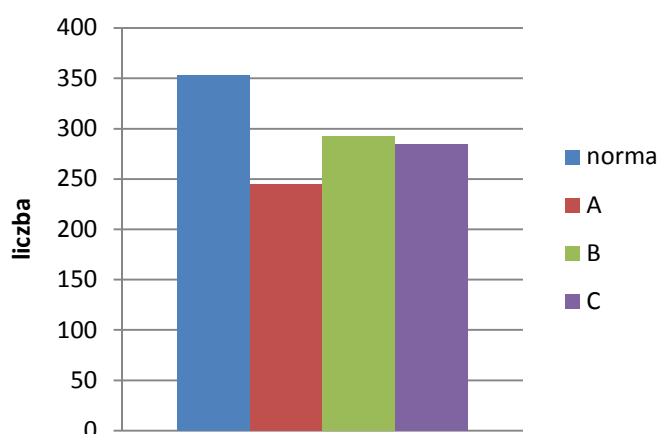
Wyniki badania histomorfometrycznego

Badanie nerwu strzałkowego

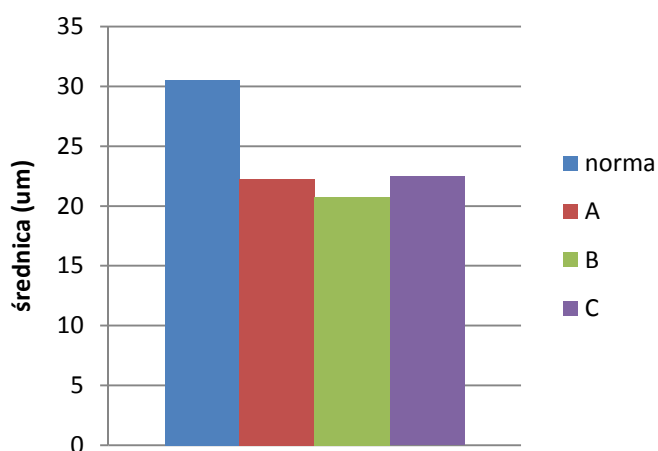
Wartości odpowiednich parametrów morfometrycznych przedstawia Tabela 15 oraz rycina 26 do 28.

Tabela 15 Średnia i odchylenie standardowe analizowanych parametrów morfometrycznych

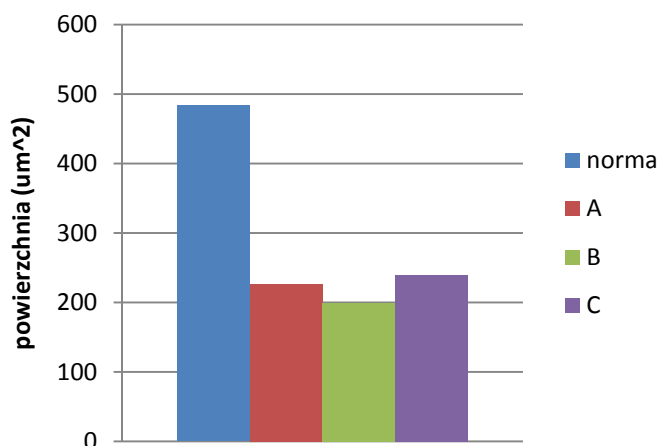
gupa	liczba		średnica		powierzchnia		liczba zwierząt
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	
norma	353,53	149,08	30,53	7,37	483,27	233,97	15
A	244,88	119,56	22,25	5,44	226,38	123,46	8
B	293,00	138,04	20,78	2,11	199,56	27,48	9
C	284,46	102,68	22,46	3,50	239,85	69,55	13



Rycina 26 Średnia liczba włókien w poszczególnych grupach i w nerwie strzałkowym nieoperowanym



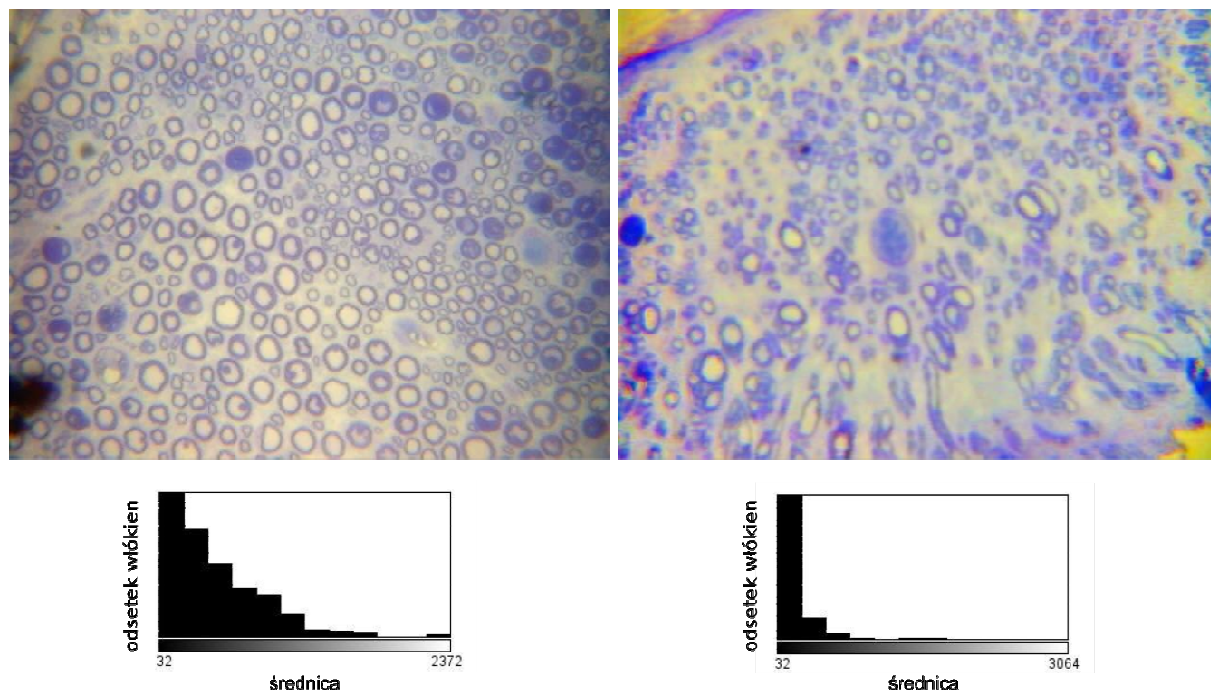
Rycina 27 Średnia średnica aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie strzałkowym nieoperowanym



Rycina 28 Średnia powierzchnia aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie strzałkowym nieoperowanym

W ocenie histologicznej w operowanych nerwach strzałkowych stwierdziłem włókna nerwowe zmienilizowane w liczbie nieróżniące się od nerwu nieoperowanego (Rycina 29), jednak ich średnica oraz powierzchnia były istotnie mniejsze w stosunku do normy (nerw nieoperowany po stronie przeciwnej) - Tabela 16.

Nie stwierdziłem istotnej różnicy w wartościach badanych parametrów pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (A, B, C).



Rycina 29 Obraz histologiczny nerwu strzałkowego z dystrybucją średnic włókien (nieoperowany po lewej, operowany po prawej) – w nerwie operowanym występuje charakterystyczne przesunięcie w kierunku włókien mniejszych, niewielka ilość włókien o większej średnicy

Tabela 16 Wartości p analizy wariancji Scheffe post hoc ANOVA (liczba, średnica i powierzchnia) różnic pomiędzy poszczególnymi grupami a normą (istotne wartości zaznaczono)

grupa	liczba				średnica				powierzchnia			
	norma	A	B	C	norma	A	B	C	norma	A	B	C
norma		0,06	0,27	0,17		0,004	0,0004	0,003		0,0004	0,0006	0,004
A	0,06		0,45	0,50	0,004		1,00	1,00	0,004		1,00	1,00
B	0,27	0,45		0,88	0,0004	1,00		1,00	0,0006	1,00		1,00
C	0,17	0,50	0,88		0,003	1,00	1,00		0,004	1,00	1,00	

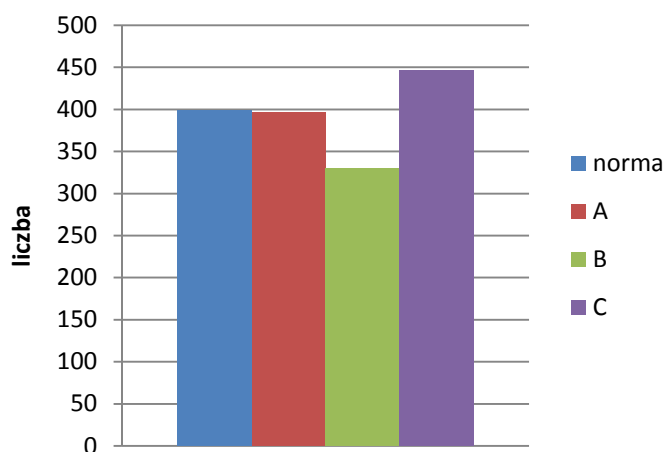
Podsumowując wyniki badania histomorfometrycznego nerwu strzałkowego – nerwy po stronie operowanej miały mniejszą średnicę i powierzchnię niż po stronie nieoperowanej. Liczba aksonów nie różniła się istotnie. W punkcie końcowym badania oceniane wartości nie różniły się pomiędzy grupami – wszystkie osiągnęły ten sam poziom regeneracji morfologicznej.

Badanie nerwu piszczelowego

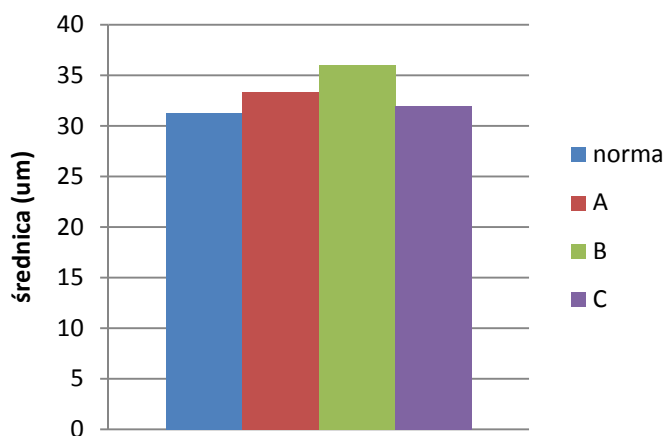
Wartości odpowiednich parametrów morfometrycznych przedstawia Tabela 17 oraz rycina 30 do 32.

Tabela 17 Średnia i odchylenie standardowe analizowanych parametrów morfometrycznych

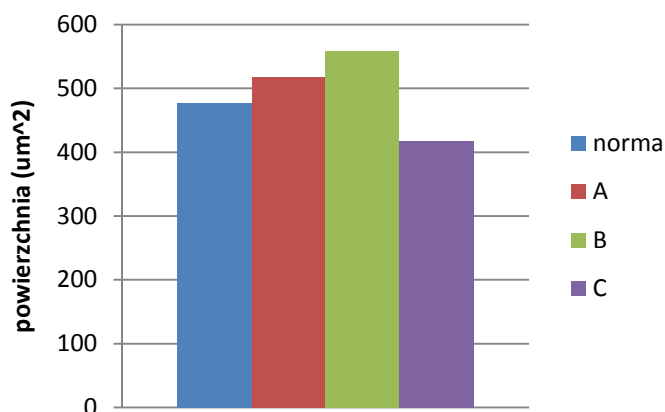
gupa	liczba		średnica		powierzchnia		liczba zwierząt
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	
norma	398,80	158,15	31,27	8,09	477,40	202,33	15
A	396,90	191,15	33,40	4,60	518,40	128,38	10
B	329,40	173,87	36,00	10,00	558,90	231,16	10
C	446,00	199,35	32,00	8,04	418,00	136,14	7



Rycina 30 Średnia liczba włókien w poszczególnych grupach i w nerwie piszczelowym nieoperowanym

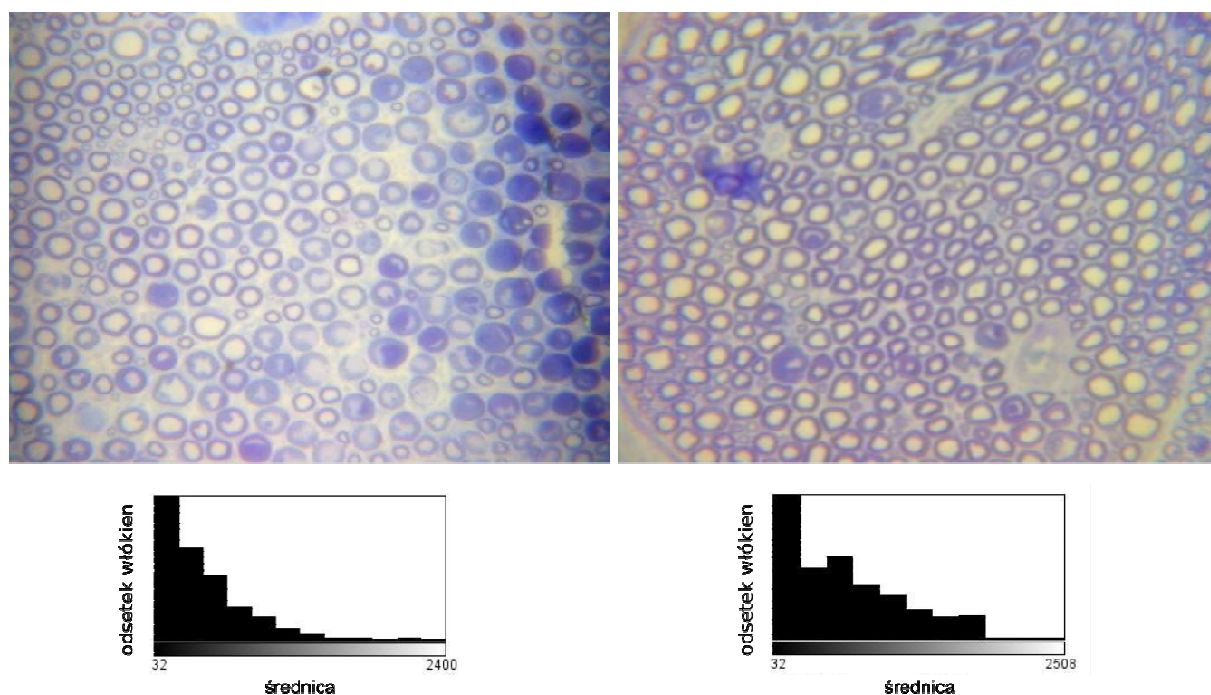


Rycina 31 Średnia średnica aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie piszczelowym nieoperowanym



Rycina 32 Średnia powierzchnia aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie piszczelowym nieoperowanym

W ocenie histologicznej nerw piszczelowy, który spełniał funkcję nerwu dawczego (grupa A oraz B) nie różnił się istotnie od nerwu prawidłowego. Nie stwierdziłem również różnicy w ocenianych parametrach w grupie, w której otwierałem epineurium nerwu piszczelowego lub nie (brak różnicy pomiędzy grupą A oraz B). Obrazy histologiczne oraz wartości p dla odpowiednich porównań przedstawia Rycina 33 i Tabela 18)



Rycina 33 Obraz histologiczny nerwu piszczelowego z dystrybucją włókien (średnica) (norma po lewej, dawczy po prawej) – podobna dystrybucja wielkości włókien (histogramy)

Tabela 18 Wartości p analizy Scheffe post hoc ANOVA pomiędzy poszczególnymi grupami i normą

grupa	liczba				średnica				powierzchnia			
	norma	A	B	C	norma	A	B	C	norma	A	B	C
norma		0,98	0,34	0,56		0,51	0,15	0,84		0,59	0,29	0,49
A	0,98		0,40	0,58	0,51		0,47	0,72	0,59		0,63	0,28
B	0,34	0,40		0,19	0,15	0,47		0,31	0,29	0,63		0,13
C	0,56	0,58	0,19		0,84	0,72	0,31		0,49	0,28	0,13	

Podsumowując wyniki badania histomorfometrycznego nerwu piszczelowego – nerw po stronie operowanej nie różnił się od nieoperowanego nerwu, a wykonanie nacięcia epineurium nie wpłynęło na wyniki.

Zależności pomiędzy badanymi parametrami w nerwie strzałkowym i piszczelowym

Stwierdziłem istotną dodatnią korelację pomiędzy powierzchnią aksonów nerwu piszczelowego i strzałkowego po stronie operowanej jedynie w grupie B oraz brak zależności w ilości i średnicy aksonów we wszystkich grupach (Tabela 19). Brak korelacji ujemnych świadczy, że większe wartości parametrów nerwu strzałkowego nie były związane z ich zmniejszeniem w nerwie piszczelowym.

Tabela 19 Zależności badanych parametrów w nerwie strzałkowym a piszczelowym po stronie operowanej (r – współczynnik korelacji Pearsona) w poszczególnych grupach badawczych (zależności istotne wyróżniono)

grupa	ilość		średnica		Powierzchnia	
	r	p	r	p	r	P
A	0,61	>0,05	0,49	>0,05	0,17	>0,05
B	-0,09	>0,05	0,93	0,001	0,81	>0,05
C	-0,37	>0,05	0,31	>0,05	0,22	>0,05

Podsumowanie

Stwierdziłem, że operowane nerwy strzałkowe miały istotnie mniejszą średnicę oraz powierzchnię niż nerwy nieoperowane. Parametry morfometryczne nerwów piszczelowych po stronie operowanej nie różniły się istotnie od strony nieoperowanej. W punkcie końcowym badania parametry nerwów strzałkowych i piszczelowych nie różniły się pomiędzy grupami badawczymi.

6. Dyskusja

Badanie odcisków łap tylnych

Zgodnie z literaturą, wynik badania odcisków łap tylnych jest zależny od sposobu jego przeprowadzenia. (88) (110) Zwierzę powinno przemieszczać się z początku ścieżki diagnostycznej do końca w sposób ciągły, nie stając jedynie na tylnych łapach – może to powodować korzystniejsze ustawienie palców łapy w sposób bierny pod wpływem siły ciężkości. Dlatego wykonywałem kilka powtórzeń badania aż do uzyskania miarodajnych śladów. Dodatkowymi problemami technicznymi opisywanymi w literaturze jest uzyskanie niewyraźnych odcisków z powodu wtórnego przykurcz lub autotomii – w badanych przeze mnie grupach takie powikłania nie miały miejsca. Wynikało to z lżejszego uszkodzenia kończyny oraz doboru odpowiedniej rasy zwierząt.

W moim doświadczeniu wykorzystałem analizę komputerową obrazu, aby zmniejszyć błąd pomiaru i usprawnić wprowadzanie i przeliczanie wyników. Uważam, że taka technika pozwala na wykonywanie obliczeń w dowolnym miejscu, łatwą archiwizację materiału oraz przeglądanie poszczególnych wyników. Duże powiększenie stosowane podczas wyznaczania odpowiednich parametrów śladu pozwala na zmniejszenie błędu, który pierwotnie wynika z mierzenia wartości na papierze linijką. Powiększenie pozwala na ocenę nawet słabego odcisku, co często się zdarza we wczesnej fazie powrotu funkcji, kiedy zwierzę nie posługuje się sprawnie kończyną.

Kolejnym elementem w ocenie odcisku łap jest czas obserwacji. W przeprowadzonym doświadczeniu wszystkie wartości dodatnio korelowały z czasem obserwacji. Podstawowe publikacje w tym temacie podają okres 6 – 8 tygodni, jako czas potrzebny na stabilizację wartości ocenianych współczynników (PFI, TFI, SFI). (88) (97) Moje wyniki są zbieżne z tymi obserwacjami, w ocenie nerwu strzałkowego czas ten był dłuższy (8 tygodni) a w pozostałych nerwach krótszy (6 tygodni). Również wartości PFI osiągnęte końcowo były na niższym poziomie niż w ocenie pozostałych nerwów (TFI, SFI). Jest to zjawisko naturalne i związane z koncepcją doświadczenia – uszkodzeniem nerwu strzałkowego. Mimo, że wartości normalizują się stosunkowo wcześniej, uważam, że istotna jest ich ocena w bardziej odległym terminie. Wielu autorów podaje krótszy czas, nie zwracając uwagi na możliwe pojawienie się w późniejszym okresie wtórnych przykurczów i deformacji łapy zmieniających wartości współczynników. (97) (111) W moim badaniu takich sytuacji nie stwierdziłem, ale wydłużenie okresu obserwacji do 24 tygodni (około jedna piąta czasu życia zwierzęcia) pozwala na stwierdzenie utrwalenia funkcji po zakończonej regeneracji.

Przedstawione wyniki wykazują brak różnic w ocenie funkcjonalnej nerwów łapy tylnej szczura w punkcie końcowym badania, co świadczy o takim samym efekcie regeneracji nerwu strzałkowego, zarówno po szwie koniec do końca jak i wolnym przeszczepem. Należy podkreślić, że zwierzę nie osiąga wartości prawidłowych, ale można stwierdzić, że są to

wyniki dobre: w zakresie nerwu strzałkowego (średnia -15,79, SD 17,40) oraz nerwu piszczelowego (średnia -9,96, SD 14,43) i łącznej ocenie nerwu kulszowego (średnia -10,99, SD 12,91) w skali 0 – funkcja prawidłowa, -100 – brak funkcji. Wyniki te są zbliżone do podawanych w literaturze. (97)

Dodatkowo stwierdziłem dodatnią korelację pomiędzy wartościami SFI i TFI, była ona silniejsza w grupach A oraz B (szew koniec do boku). Może to świadczyć o wzajemnym wpływie parametrów nerwu dawczego na wartości osiągane w nerwie biorczym i dodatkowo wyklucza upośledzenie funkcji nerwu dawczego związane z regeneracją poboczną – nie stwierdziłem istotnych korelacji negatywnych. Największe wartości współczynnika korelacji Pearsona (0,84) stwierdziłem w grupie B, co może jednak sugerować wpływ otwarcia epineurium na regenerację w ocenie funkcjonalnej, nie zostało to jednak potwierdzone w innych grupach badań (elektroencefalografia i histomorfometria).

Badanie odcisku łap szczura nie może być jedynym, na którym opiera się ocena regeneracji nerwów, ale pozwala śledzić jej dynamikę i z powodu standaryzacji metody porównywać wyniki pomiędzy autorami i ośrodkami jak to jest często proponowane w literaturze. (97) (82) (83)

Badanie elektrofizjologiczne

W tym badaniu posłużyłem się szeroko opisywaną techniką klasyczną, która obejmuje stymulację oraz rejestrację potencjałów elektrodami bipolarnymi. (112) (103) Autorzy opisujący to badanie zwracają uwagę na dużą podatność metody na zakłócenia, technikę wykonania jak i wrażliwość badanego nerwu na warunki badania. (113) (114) Szczególne znaczenie ma sposób przyłożenia elektrod, brak naciągania nerwu podczas badania, odpowiednie umieszczenie elektrody uziemiającej, temperatura, wysychanie a także odpowiednia izolacja od otaczających tkanek. (113) W pracy starałem się, aby wyżej wymienione czynniki nie wpływały na przebieg eksperymentu: sprawdzałem położenie elektrody uziemiającej, izolację oraz brak naciągania nerwu w miejscu przyłożenia elektrody rejestrującej i stymulującej, zwilżałem tkanki solą fizjologiczną.

Kilkakrotnie nie udało uzyskać się jakiegokolwiek rejestracji, również z nerwu zdrowego, co wyeliminowało część zwierząt z oceny. Trudno wyjaśnić takie zjawisko, wydaje się, że przyczyną może być błąd aparatury.

W większości przypadków rejestrowane metodą stymulacji elektrycznej (bezpośredniej) potencjały miały niskie progi pobudliwości (1mA). Może to przemawiać za tym, że włókna nerwowe w rekonstruowanych nerwach przewodzą w sposób prawidłowy. Obserwowane po 24 tygodniach od operacji zjawisko może przemawiać za kompletnością regeneracji.

Otrzymane wyniki parametrów amplitudy i latencji dla nerwu strzałkowego nie różnią się istotnie w poszczególnych grupach, jaki i nie odbiegają od wartości prawidłowych. Gorsze parametry elektrofizjologiczne nerwu rekonstruowanego podają niektórzy autorzy. (69) (38)

(20) Inni podają całkowitą normalizację wartości po długim (9 miesięcy) czasie obserwacji. (67) W nerwie piszczelowym stwierdzone istotne różnice w stosunku do normy zaburzają obraz braku zmian w nerwie dawczym, co może sugerować ewentualne uszkodzenie lub upośledzenie funkcji tego nerwu podczas procedury szycia nerwu strzałkowego lub być związane ze spadkiem parametrów na korzyść regenerującego nerwu strzałkowego. W literaturze parametry elektrofizjologiczne nerwu dawczego nie odbiegają od nerwu nieoperowanego. (67)

Część autorów stwierdziła w badaniach cyklicznych stały wzrost wartości elektroneurofizjologicznych w trakcie obserwacji aż do około 40 tygodnia po operacji. (113) (38) Jest to o tyle interesujące, że parametry oceny funkcji (PFI, SFI, TFI) stabilizują się dużo wcześniej. Może to świadczyć o stałym procesie regeneracji, który ma wciąż tendencję do poprawy.

Dodatkowym, nowym elementem, z którym nie spotkałem się w dostępnej literaturze jest wykorzystanie stymulacji nadkręgosłupowej cewką magnetyczną. Istnieją skąpe opisy zbliżonych technik. (93) Użyłem najmniejszej dostępnej cewki, o parametrach średnicy wiązki stymulującej <5mm i przenikającej do tkanek włąb od punktu stymulacji powierzchniowej na 3cm przy sile bodźca 70%. Prawdopodobnie korzystne byłoby użycie cewki mniejszych rozmiarów dedykowanej do badań małych zwierząt, aby wyeliminować możliwe zakłócenia wynikające z bliskości elektrody rejestrującej oraz precyzyjnie kierować stymulację.

Badanie ruchowych potencjałów wywołanych indukowanych polem magnetycznym było cennym uzupełnieniem klasycznie wykonywanej stymulacji elektrycznej i w moim materiale stwierdziłem istotną korelację pomiędzy wynikami otrzymanymi obydwojema metodami stymulacyjnymi. Tego typu badanie może eliminować takie problemy jak: bliskie położenie elektrody stymulującej, dodatkowe naciąganie nerwu w miejscu jej przyłożenia, zakłócenia wynikające z bezpośredniej stymulacji mięśnia poprzez przewodzenie tkankowe. Prawidłowe badanie jest jednak trudne do przeprowadzenia z powodu wrażliwości metody na orientację cewki, jej odległość od rdzenia kręgowego, a zwłaszcza artefakty ruchowe zwierzęcia podczas stymulacji (pobudzanych jest wiele grup mięśniowych jednocześnie). Metoda wymaga dalszego rozwoju i dopracowania, jednak wydaje się być obiecująca.

Często w literaturze spotyka się dodatkowo ocenę szybkości przewodzenia. (67) (113) Tego parametru nie analizowałem, ponieważ przy stałej odległości pomiędzy elektrodami lub pomiędzy cewką elektromagnetyczną a elektrodą rejestrującą, parametr taki nie dostarczyłby dodatkowych informacji do badań porównawczych.

Badanie histomorfometryczne

Zastosowane przeze mnie badanie mikroskopii świetlnej skrawków półcienkich dostarcza bardzo dobrego materiału do oceny morfometrycznej, która jest dobrym źródłem dla opracowania statystycznego. Często opisywane i przedstawiane w literaturze wybiórczo

obrazy pokazują zjawisko regeneracji, lecz nie pozwalają ocenić jej jakości oraz stopnia w stosunku do prawidłowego nerwu.

Proponowane jest wiele parametrów oceny morfometrycznej nerwu: ilość aksonów, stopień ich zmielinizowania (grubość mieliny w stosunku do średnicy włókna), powierzchnia, średnica oraz wartości pochodne takie jak gęstość (ilość na jednostkę powierzchni). (114) W badaniu wybrałem i posługiwałem się najprostszymi i najistotniejszymi parametrami, które często opisują inni autorzy. (105) (95) (82) (107)

Dla poprawnej analizy morfometrycznej potrzebny jest preparat odpowiedniej jakości, sprzęt od konwersji cyfrowej oraz technika wykonywania zliczania cząstek. (94) Na każdym z tych etapów mogą pojawić się problemy i zaburzenia wpływające na ostateczny wynik. Słaba rozdzielczość obrazu, nierównomierne doświetlenie pola, niedokładny przekrój poprzeczny przez nerw oraz nieprawidłowo ustawione parametry zliczania cząstek powodują znaczne rozbieżności w wynikach.

W badaniu zachowałem konsekwentną metodykę pomiaru, uwzględniając jednak możliwość wpływania na sposób zliczania – stosowałem technikę półautomatyczną. Technika automatyczna opiera się na pełnej powtarzalności kroków analizy brak jest w niej jednak elastyczności w zmieniających się parametrach danych wejściowych (obrazów). Technika ręczna nie jest obecnie proponowana z racji swojej czasochłonności. (107)

Głównymi problemami, na które napotkałem były opisywane przez innych autorów nieprawidłowe interpretacje (nad i niedoliczanie) spowodowane traktowaniem naczyń krwionośnych bądź elementów tkanki łącznej jako włókien nerwowych. Również restrykcyjne ustawienie parametru krągłości i minimalnej wielkości cząstki do zliczania nie eliminowało wszystkich włókien skrojonych podłużnie. Błędy te w większości wyeliminowałem przez lepsze przygotowanie materiału cyfrowego – odpowiednią obróbkę grafiki, usunięcie elementów powodujących pomyłki, pomiar większej ilości pól i uśrednienie wyniku.

Otrzymane wyniki potwierdzają regenerację nerwu zespolonego koniec do boku. Jakość histologiczna takiego nerwu jest niższa niż nerwu zdrowego, lecz nie różni się od nerwu rekonstruowanego wolnym przeszczepem. Warto zauważyć, że proces regeneracji jest aktywny – ilość włókien nie różni się od nerwu zdrowego, natomiast są one mniejsze, dużą część nerwu wypełnia blizna z tkanki łącznej – podobne wyniki otrzymują inni autorzy. (38) (61) (105) Nawet przy malej ilości i rozmiarze włókien nerwowych czynność może być wystarczająca dla dobrej funkcji. (91) Otrzymane wyniki są podobne do opisywanych w literaturze. (97) Część autorów zauważa lepsze parametry histomorfometryczne w nerwach rekonstruowanych z otwarciem epineurium nerwu dawczego. (64) W moim badaniu nie stwierdziłem różnicy wartości ocenianych parametrów pomiędzy grupą z otwartym (B) i nienaruszonym (A) epineurium nerwu dawczego.

Nerw piszczelowy jako dawca po stronie operowanej w ocenie histologicznej nie różnił się od zdrowego co potwierdziłem statystycznie. Nie jest to zgodne z wnioskami z badań

elektroencefalograficznych. Takie wyniki mogą być spowodowane uszkodzeniem osłonki nerwu dawkowego (szycie, okienko epineuralne), co ma wpływ na parametry przewodnictwa.

Dodatkowo brak negatywnych korelacji pomiędzy badanymi wartościami obu nerwów (dawkowego i biorczego) może świadczyć o braku negatywnego wpływu regeneracji pobocznej na właściwości histologiczne nerwu dawkowego. Tym samym jest to dodatkowy dowód na to, że nie obserwuje się upośledzenia funkcji tego nerwu.

Podsumowanie

Badania wykazały równorzędność szwu koniec do boku w stosunku do rekonstrukcji wolnym przeszczepem nerwu. Nie wykazałem również różnicy pomiędzy techniką z otwarciem jak i bez otwarcia epineurium.

Nerw dawczy w większości badań nie różnił się od nieoperowanego, co może świadczyć o braku upośledzenia jego funkcji. Jedyną różnicą była istotnie mniejsza amplituda odpowiedzi elektrycznej z nerwu piszczelowego, co może świadczyć o cechach uszkodzenia aksonalnego.

7. Wnioski

1. Regeneracja nerwu strzałkowego szczura po zespoleniu do boku nerwu piszczelowego występuje i jest tak samo skuteczna jak po rekonstrukcji wolnym przeszczepem nerwu.
2. Średnica oraz powierzchnia włókien nerwowych nerwu strzałkowego po szwie koniec do boku oraz rekonstrukcji wolnym przeszczepem jest istotnie mniejsza niż w nerwie nieoperowanym.
3. Otwarcie epineurium w nerwie piszczelowym nie wpływa istotnie na regenerację nerwu strzałkowego.
4. Nerw piszczelowy (dawczy) ma istotnie zmniejszone parametry przewodnictwa (amplitudę) niż nerw nieoperowany, co może świadczyć o uszkodzeniu aksonalnym.

8. Skróty

DPI – dots per inch, ilość punktów na cal

EPO - erytropoetyna

ETS – end-to-side, szew koniec do boku

IGF-1 - insulin-like growth factor 1, insulinopochodny czynnik wzrostu 1

ITS – intermediary toe spread, odległość pomiędzy 2 a 4 palcem

JPEG - Joint Photographic Experts Group

MEP –motor evoked potentials, ruchowe potencjały wywołane indukowane polem magnetycznym

NGF - nerve growth factor, czynnik wzrostu nerwów

NNT – neurotrofina

SD – standard deviation, odchylenie standardowe

PFI – peroneal function index

PL – print length, długość śladu

SEP – sensory evoked potentials, potencjały wywołane bodźcem czuciowym

SFI – sciatic function index

TFI – tibial function index

TS - toe spread, odległości pomiędzy 1 a 5 palcem

9. Spis rycin i tabel

Ryciny

Rycina 1 Makroskopowy obraz przekroju nerwu: a – epineurium, b – perineurium, zielonym prostokątem zaznaczono naczynie nerwu	5
Rycina 2 Kolejne etapy regeneracji nerwu: A – uszkodzenie, B, C – migracja makrofagów, D – neurotropizm okolicznych aksonów, E – degeneracja, F, G – tworzenie kolumn komórek Schwanna, H – wzrost aksonu w kierunku efektora lub receptora, I – unerwienie efektora lub receptora, J – zakończenie regeneracji	7
Rycina 3 Szew koniec do końca, orientacja ułatwiona przez położenie naczynia krwionośnego	10
Rycina 4 Rekonstrukcja wolnym przeszczepem nerwu, przeszczepy z nadmiarem wypełniają średnicę ubytku	11
Rycina 5 Rekonstrukcja i wypełnienie ubytku neurotubą.....	11
Rycina 6 Ubytek nerwu pośrodkowego w przykurczu niedokrwinnym, narzędziami zaznaczono kikuty nerwu	13
Rycina 7 Koncepcja szwu koniec do boku, kikut dalszy łączony jest możliwie najbliżej efektora bądź receptora	14
Rycina 8 Przygotowanie zwierzęcia i pola operacyjnego	19
Rycina 9 Schemat i obraz śródoperacyjny podziału nerwu kulszowego oraz poszczególne grupy badawcze.....	20
Rycina 10 Obraz odcisków tylnych łap szczura	21
Rycina 11 Wykonywanie pomiarów z odcisku tylnej łapy szczura(opis wartości w tekście) ...	22
Rycina 12 Aparatura wykorzystana do badania elektroneurograficznego (A), cewka elektromagnetyczna z elektrodami (B) oraz technika wykonania badania (C – stymulacja bezpośrednia, D – MEP)	23
Rycina 13 Potencjały uzyskane w badaniu stymulacją bezpośrednią (A – lewa strona, B – prawa strona) oraz MEP (C – lewa strona, D – prawa strona)	24
Rycina 14 Kolejne etapy morfometrii: obraz wyjściowy, konwersja do odcieni szarości, wynik progowania, inwersja, zliczanie cząstek, wyniki liczbowe	25
Rycina 15 Wartości PFI w poszczególnych okresach obserwacji i grupach	27
Rycina 16 Wartości TFI w poszczególnych okresach obserwacji i grupach.....	28
Rycina 17 Wartości SFI w poszczególnych okresach obserwacji i grupach.....	29
Rycina 18 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach	33
Rycina 19 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach.....	33
Rycina 20 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach	34
Rycina 21 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach.....	34
Rycina 22 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach	36
Rycina 23 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach.....	36
Rycina 24 Wartości amplitudy po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach	37

Rycina 25 Wartości latencji po stronie operowanej i zdrowej w poszczególnych grupach.....	37
Rycina 26 Średnia liczba włókien w poszczególnych grupach i w nerwie strzałkowym nieoperowanym	39
Rycina 27 Średnia średnica aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie strzałkowym nieoperowanym	39
Rycina 28 Średnia powierzchnia aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie strzałkowym nieoperowanym	40
Rycina 29 Obraz histologiczny nerwu strzałkowego z dystrybucją średnic włókien (nieoperowany po lewej, operowany po prawej) – w nerwie operowanym występuje charakterystyczne przesunięcie w kierunku włókien mniejszych, niewielka ilość włókien o większej średnicy.....	40
Rycina 30 Średnia liczba włókien w poszczególnych grupach i w nerwie piszczelowym nieoperowanym	42
Rycina 31 Średnia średnica aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie piszczelowym nieoperowanym	42
Rycina 32 Średnia powierzchnia aksonów w poszczególnych grupach i w nerwie piszczelowym nieoperowanym	43
Rycina 33 Obraz histologiczny nerwu piszczelowego z dystrybucją włókien (średnica) (norma po lewej, dawczy po prawej) – podobna dystrybucja wielkości włókien (histogramy).....	43

Tabele

Tabela 1 Klasyfikacje uszkodzeń nerwów wg Seddona i Sunderlanda.....	6
Tabela 2 Procesy zachodzące po uszkodzeniu nerwu oraz czas ich wystąpienia	8
Tabela 3 Poziomy istotności różnic pomiędzy średnimi wskaźnika PFI w punkcie końcowym badania.....	27
Tabela 4 Poziomy istotności różnic pomiędzy średnimi wskaźnika TFI w punkcie końcowym badania.....	28
Tabela 5 Poziomy istotności różnic pomiędzy średnimi wskaźnika SFI w punkcie końcowym badania	29
Tabela 6 Zależności pomiędzy PFI a TFI w poszczególnych grupach.....	30
Tabela 7 Zależność pomiędzy współczynnikami PFI, TFI i SFI a czasem obserwacji	30
Tabela 8 Średnia i odchylenie standardowe parametrów w poszczególnych grupach i tygodniach obserwacji.....	31
Tabela 9 Zestawienie wyników amplitudy i latencji oraz liczba zbadanych zwierząt.....	32
Tabela 10 Wartości p dla różnic amplitudy i latencji pomiędzy stroną operowaną a kontrolną	32
Tabela 11 Zestawienie wyników amplitudy i latencji oraz liczba zbadanych zwierząt.....	35
Tabela 12 Wartości p dla różnic amplitudy i latencji pomiędzy stroną operowaną a kontrolną	35

Tabela 13 Wartości p testu ANOVA analizy wariancji pomiędzy grupami po stronie operowanej	38
Tabela 14 Wartości p oraz współczynnika korelacji r Pearsona	38
Tabela 15 Średnia i odchylenie standardowe analizowanych parametrów morfometrycznych	39
Tabela 16 Wartości p analizy wariancji Scheffe post hoc ANOVA (liczba, średnica i powierzchnia) różnic pomiędzy poszczególnymi grupami a normą (istotne wartości zaznaczono)	41
Tabela 17 Średnia i odchylenie standardowe analizowanych parametrów morfometrycznych	42
Tabela 18 Wartości p analizy Scheffe post hoc ANOVA pomiędzy poszczególnymi grupami i normą	44
Tabela 19 Zależności badanych parametrów w nerwie strzałkowym a piszczelowym po stronie operowanej (r – współczynnik korelacji Pearsona) w poszczególnych grupach badawczych (zależności istotne wyróżniono)	44

10. Piśmiennictwo

1. Wikipedia: The Free Encyclopedia. [Online] pl.wikipedia.org.
2. **Zeineh, L, Wilhelmi, B i Zook, E.** Managing acute nerve injuries in extremities. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*. Tom 9, 3, strony 111-116.
3. **Rowshan, K, Jones, N i Gupta, R.** Current surgical techniques of peripheral nerve repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2004, 14, strony 163-170.
4. **Seddon, H J.** Three types of nerve injuries. *Brain*. 1943, Tom 43B, strony 447-461.
5. **Sunderland, S.** A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951, 74, strony 491-516.
6. **Manikowski, W, Romanowski, L i Czaja, A.** The results of untreated nerve injuries in the forearm. *Journal of Hand Surgery*. 1996, Tom 21B, 1, str. 6.
7. **Manikowski, W, i inni.** Ocena wyników leczenia operacyjnego uszkodzeń nerwu promieniowego. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*. 1997, Tom 62, 1, strony 7-9.
8. **Novak, C i Mackinnon, S E.** Peripheral nerve injuries. *eMedicine*. 2005.
9. **Manikowski, W i Strzyżewski, H.** Uszkodzenia nerwów obwodowych. [aut. książki] Wiktor Dega. *Ortopedia i Rehabilitacja*. Warszawa : PZWL, 2003.
10. **McAllister, R M, i inni.** The epidemiology and management of upper limb peripheral nerve injuries in modern practice. *Journal of Hand Surgery*. 1996, Tom 21B, 1, strony 4-13.
11. **Skowroński, J i Bielecki, M.** Urazy nerwów obwodowych w wielotkankowych uszkodzeniach kończyn. *Polish Hand Surgery*. 2002, Tom 32, 2, strony 3-13.
12. **Rutowski, R i Rydzak, B.** Analiza urazowych uszkodzeń nerwów okolicy nadgarstka. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*. 1997, Tom 62, 1, strony 46-61.
13. **Johnson, E O i Zoubos, A B.** Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. 2005, 36, strony 24-29.
14. **Burnett, M G i Zager, E L.** Patophysiology of Peripheral Nerve Injury: A Brief Review. *Neurosurgery Focus*. 2004, Tom 16.
15. **Cajal, S R.** *Degeneration and regeneration of the nervous system*. London : Oxford University Press, 1928.
16. **Boyd, J G i Gordon, T.** Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and function recovery after peripheral nerve injury. *Molecular Neurobiology*. 2003, 27, strony 277-324.

17. **Żyluk, A.** Współczesne koncepcje leczenia uszkodzeń nerwów obwodowych. *Polish Hand Surgery*. 2000, 1, strony 3-9.
18. **Houle, John D i Johnson, James E.** Nerve growth factor (NGF)-treated nitrocellulose enhances and directs the regeneration of adult rat dorsal root axons through intraspinal neural tissue transplants. *Neuroscience Letters*. 1989, 103, strony 17-23.
19. **Aloe, L.** Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends in Cell Biology*. 2004, Tom 14, 7, strony 395-399.
20. **Romanowski, L.** *Badania skuteczności rekonstrukcji nerwów z zastosowaniem technik mikrochirurgicznych*. Poznań : UM Poznań, 1997.
21. **Kanje, M, i inni.** Insulin-like growth factor(IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Research*. 1989, 486, strony 363-368.
22. **McCallister, W i Tang, P.** Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. *The Journal of Hand Surgery*. 2001, Tom 26A, 3, strony 478-487.
23. **Lykissas, M i Sakellariou, E.** Axonal regeneration stimulated by erythropoietin: An experimental study in rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007, 164, strony 107-115.
24. **Hausamen, J-E i Schmelzeisen, R.** Current principles in microsurgical nerve repair. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1996, 34, strony 143-157.
25. **Muller, J.** *Elements of Physiology*. London : Taylor and Walton, 1842.
26. **Haighton, J.** An experimental inquiry concerning the reproduction of nerves. *Philos Trans R Soc*. 1795, Tom 85, 519.
27. **Skowroński, J.** Nerve repair in extensive open injuries. *European Instructional Course Lectures*. 2001, Tom 5, strony 78-82.
28. **Temple, C L, i inni.** Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: an in vitro biomechanical assessment of techniques. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2004, Tom 20, strony 645-650.
29. *Functional comparison of epineural and sleeve technique repair using objective neurologic evaluations.* **Lubiatowski, P, Babuccu, O i Siemionow, M.** Ohio : Ohio Valley Society for Plastic and Reconstructive Surgery, 2000.
30. *Zastosowanie techniki mankietu epineuralnego w rekonstrukcji nerwów obwodowych.* **Lubiatowski, P, i inni.** Białystok : Polskie Towarzystwo Chirurgii Ręki, 2003.

31. **Manikowski, W, i inni.** Szew nerwu z odciążeniem miejsca zespolenia (wskazania, technika operacyjna, wyniki regeneracji). *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*. 1998, Tom 63, 3, strony 23-30.
32. **Myckatyn, T M.** Surgical Techniques of Nerve Grafting (Standard/Vascularized/Allograft). *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2004, Tom 14, strony 171-178.
33. **Romanowski, L.** Wpływ ułożenia i ukrwienia wolnego autogenego przeszczepu nerwu kulszowego szczura na szybkość regeneracji. *Poznańskie Roczniki Medyczne*. 1990, Tom 15.
34. **Wang, H i Lineaweaver, W C.** Nerve conduits for nerve reconstruction. *Operative Techniques in Plastic and reconstructive Surgery*. 2003, Tom 9, 2, strony 59-66.
35. **Hung, V i Dellon, L.** Reconstruction of a 4-cm Human Median Nerve Gap by Including an Autogenous Nerve Slice in a Bioabsorbable Nerve Conduit: Case Report. *Journal of Hand Surgery*. 2008, Tom 33A, strony 313-315.
36. **Romanowski, L, Manikowski, W i Kaczmarek, L.** Regeneracja nerwu kulszowego szczura rekonstruowanego neurotubą. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*. 1998, Tom 63, 3, strony 31-38.
37. **Bielecki, M, i inni.** Technika tubulizacji nerwów jako metoda pomostowania ubytków pni nerwów - badania elektrofizjologiczne. *Polish Hand Surgery*. 2002, Tom 32, 2, strony 23-36.
38. **Matsumoto, K, Ohnishi, K i Kiotani, T.** Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*. 2000, 868, strony 315-328.
39. **Thrumble, T i Archibald, S.** Bioengineering for nerve repair in the future. *Journal of the American Society for Surgery of the Hand*. 2004, Tom 4, 3, strony 134-142.
40. **Hasegawa, T, i inni.** Vascularized nerve grafts for the treatment of large nerve gap after severe trauma to an upper extremity. *Archives of Orthopedic and Trauma Surgery*. 2004, Tom 124, strony 209-213.
41. **Terzis, J K, Skoulis, T G i Soucacos, P N.** Vascularized nerve grafts: a review. *International Angiology*. 1995, Tom 14, strony 264-277.
42. **Auba, C, i inni.** Peripheral nerve regeneration through allografts compared with autografts in FK506-treated monkeys. *Journal of neurosurgery*. 2006, Tom 105, strony 602-609.
43. **Atchabedian, A, i inni.** Indefinite survival of peripheral nerve allografts after temporary Cyclosporine A immunosuppression. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 1998, Tom 13, strony 129-139.

44. **Weber, R V i Mackinnon, S E.** Bridging the neural gap. *Clinics of Plastic Surgery*. 2005, Tom 32, strony 605-616.
45. **Dubuisson, A, i inni.** Predegenerated Nerve Allografts versus Fresh Nerve Allografts in Nerve Repair. *Experimental neurology*. 1997, Tom 148, strony 378-387.
46. **Hudson.** Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue engineering*. 2004, Tom 10, strony 1641-1651.
47. **Żyłuk, A, Puchalski, P i Walaszek, I.** Wyniki rekonstrukcji niewielkich ubytków nerwów czuciowych za pomocą wstawki żyłnej. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*. 2005, Tom 70, 3, strony 167-171.
48. **Żyłuk, A, Walaszek, I i Puchalski, P.** Results of sensory nerve repair by autologous vein grafts. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai*. 2004, Tom 47, 2, str. 54.
49. **Stahl, S i Goldberg, J A.** The use of vein grafts in upper extremity nerve surgery. *European Journal of Plastic Surgery*. 1999, Tom 22, strony 255-259.
50. **Król, E, Zimnoch, L i Skowroński, J.** Regeneracja nerwów obwodowych szczura po rekonstrukcji ubytku własnopochodnym przeszczepem mięśnia 1. Ocena morfologiczna i morfometryczna. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 1993, Tom 27, 4, strony 547-553.
51. **Król, E, Drozdowski, W i Skowroński, J.** Regeneracja nerwów obwodowych szczura po rekonstrukcji ubytku własnopochodnym przeszczepem mięśnia 2. Ocena elektrofizjologiczna. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 1994, Tom 28, 4, strony 491-497.
52. **Mackinnon, S E i Weber, R.** Nerve transfers in the upper extremity. *Journal of the American Society for Surgery of the Hand*. 2004, Tom 4, 3, strony 200-213.
53. **Humpreys, D i Mackinnon, S E.** Nerve transfers. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*. 2003, Tom 9, 3, strony 89-99.
54. **Kuś, H, i inni.** Postępy w chirurgii splotu ramiennego. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*. 1997, Tom 62, 1, strony 69-74.
55. **Kuś, H, i inni.** Wskazania do wczesnej chirurgicznej rewizji urazowych uszkodzeń splotu ramiennego. *Polish Hand Surgery*. 1993, 1, strony 29-36.
56. **Kennedy, R.** On the restoration of coordinated movement after nerve crossing, with interchange of function of the cerebral cortical centres. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 1901, Tom 194B, 127.
57. **Ballance, C A, Ballance, H A i Stewart, P.** Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *British Medical Journal*. 1903, 1, strony 1009-1013.

58. **Pienaar, C, Swan, M i de Jager, W.** Clinical experience with end-to-side nerve transfer. *Journal of Hand Surgery*. 2004, Tom 29B, 5, strony 438-443.
59. **Harris, W i Low, V W.** On the importance of accurate muscular analysis in lesions of the brachial plexus; and treatment of Erb's palsy and infantile paralysis of the upper extremity by cross-union of the nerve roots. *British Medical Journal*. 1903, 2, strony 1035-1038.
60. **Viterbo, F, i inni.** Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *British Journal of Plastic Surgery*. 1994, 47, strony 75-80.
61. **Lundborg, G, i inni.** Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *Journal of Hand Surgery*. 1994, Tom 19B, 277-282.
62. **Zhao, J, Chen, Z i Chen, T.** Nerve regeneration after terminolateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *Reconstructive Microsurgery*. 1997, 13, strony 31-37.
63. **Al-Qattan, M M i Al-Thunyan, A.** Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. *British Journal of Plastic Surgery*. 1998, Tom 51, strony 238-242.
64. **Zhang, Z, i inni.** Long-term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurorrhaphy. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2000, Tom 16, strony 303-311.
65. **Kelly, E J, Jacoby, C i Terenghi, G.** End-to-side nerve coaptation: a qualitative and quantitative assessment in the primate. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2007, 60, strony 1-12.
66. **Lutz, B S, i inni.** Selection of donor nerves - an important factor in end-to-side neurorrhaphy. *British Journal of Plastic Surgery*. 2000, 53, strony 149-154.
67. **Kovacic, U, i inni.** Collateral sprouting of sensory axons after end-to-side nerve coaptation—A longitudinal study in the rat. *Experimental Neurology*. 2007, Tom 203, strony 358-369.
68. **Aszmann, C, Korak, K i Rab, M.** Neuroma prevention by end-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rats. *The Journal of Hand Surgery*. 2003, strony 1022-1027.
69. **Rovak, J, i inni.** Termino-lateral neurorrhaphy: functional axonal anatomy. *Microsurgery*. 2000, Tom 20, strony 6-14.
70. **Pondaag, W i Gilbert, A.** Results of end-to-side nerve coaptation in severe obstetric brachial plexus lesions. *Neurosurgery*. 2008, Tom 62, strony 656-663.
71. **Al-Qattan, M M.** End-to-side nerve repair. *Journal of Hand Surgery American Edition*. 2002, Tom 27, str. 739.

72. **Al-Qattan, M.** Terminolateral neurorrhaphy: review of experimental and clinical studies. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2001, Tom 17, strony 99-108.
73. **Mennen, U.** End-to-side nerve suture in clinical practice. *Hand Surgery*. 2003, Tom 8, 1, strony 33-42.
74. **Rovak, J M, Cederna, P S i Kuzon, W M.** Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2001, Tom 17, str. Id: 7.
75. **Voche, P i Outtara, D.** End-to-side neurorrhaphy for defects of palmar sensory digital nerves. *British Journal of Plastic Surgery*. 2005, 58, strony 239-244.
76. **Haniniec, P, i inni.** End-to-side anastomosis of peripheral nerve in experimental and clinical model. *International Congress Series*. 2004, 1259.
77. **Papalia, I, i inni.** Selection of the donor nerve for end-to-side neurorrhaphy. *Journal of Neurosurgery*. 2007, Tom 107, 378-382.
78. **Millesi, H i Schmidhammer, R.** End-to-side coaptation--controversial research issue or important tool in human patients. *Acta Neurochirurgica Supplementum*. 2007, Tom 100, strony 103-106.
79. **Schmidhammer, R, i inni.** Synergistic terminal motor end-to-side nerve graft repair: investigation in a non-human primate model. *Acta Neurochirurgica Supplementum*. 2007, Tom 100, strony 97-101.
80. **Zorman, P, i inni.** Ingrowth of sensory axons into an end-to-side coapted nerve stump after donor nerve crush in the rat. *Acta Neurochirurgica Supplementum*. 2007, Tom 100, strony 85-87.
81. **Hayashi, A, i inni.** Axotomy or compression is required for axonal sprouting following end-to-side neurorrhaphy. *Experimental Neurology*. 2008.
82. **Kanaya, F, Firrell, J i Breidenbach, W.** Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1996, Tom 98, 7, strony 1264-1271.
83. **Nichols, C, i inni.** Choosing the correct functional assay: A comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2005, 163, strony 143-158.
84. **Varejao, A S, Cabrita, A i Geuna, S.** Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Experimental Neurology*. 2003, 183, strony 695-699.
85. **Oliveira, E F, i inni.** Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2001, Tom 17, strony 68-75.

86. **Shen, N i Zhu, J.** Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery*. 1995, Tom 16, strony 552-555.
87. **Munro, C, i inni.** Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle and Nerve*. 1998, Tom 21, strony 1095-1097.
88. **Bain, J R, Mackinnon, S E i Hunter, D A.** Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1989, Tom 89, 129-36.
89. **Varejao, A S, Meek, M i Ferreira, A.** Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience*. 2001, 108, strony 1-9.
90. **Bozkurt, A, Tholl, S i Wehner, S.** Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI — A novel computerized approach for the assesment of the static sciatic index (SSI). *Journal of Neuroscience Methods*. 2008, 170, strony 117-122.
91. **Varejao, A.** Functional Assesment of Peripheral Nerve Recovery in Rat: Gait Kinematics. *Microsurgery*. 2001, 21, strony 383-388.
92. **Bervar, M.** Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000, 102, strony 109-116.
93. **Zhang, Y P, i inni.** Use of magnetic stimulation to elicit motor evoked potentials, somatosensory evoked potentials, and H-reflexes in non-sedated rodents. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007, Tom 165, strony 9-17.
94. **Mackinnon, S E, Hudson, A i Hunter, D.** Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1985, Tom 75, 3, strony 384-388.
95. **Urso-Baiarda, F i Grobbelaar, A.** Practical nerve morphometry. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006, 156, strony 333-341.
96. **Cai, Z, Cash, K i Thompson, P D.** Accuracy of sampling methods in morphometric studies of human sural nerves. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2002, Tom 2, 9, strony 181-186.
97. **De Sa, J M i Mazzer, N.** The end-to-side peripheral nerve repair Functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2004, 136, strony 45-53.
98. **Yan, J-G, Matloub, H i Sanger, J.** A modified end-to-side method for peripheral nerve repair: large epineurial window helicoid technique versus small epineurial window standard end-to-side technique. *The Journal of Hand Surgery*. 2002, Tom 27A, 3, strony 484-491.

99. **Sotereanos, D G, i inni.** Reversing nerve-graft polarity in a rat model: the effect on function. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 1992, Tom 8, strony 303-307.
100. **de Medinaceli, L, Freed, W J i Wyatt, R J.** An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements from walking tracks. *Experimental Neurology*. 1982, Tom 77, str. 634.
101. **de Medinaceli, L.** Use of sciatic function index and walking track assessment. *Microsurgery*. 1990, Tom 11, strony 191-192.
102. **Terzis, J K, Dykes, R W i Hakstian, R W.** Electrophysiological recordings in peripheral nerve surgery. *Journal of Hand Surgery*. 1976, Tom 52, 1.
103. *Wartość badania szybkości przewodzenia nerwu kulszowego szczura w ocenie jego regeneracji.* **Romanowski, L, Huber, J i Wilusz, A.** Wrocław : Materiały IV Sympozjum Mikrochirurgii, 1997.
104. **Monach, J, Drodzdowski, W i Skowroński, J.** Elektroneurograficzna i elektromiograficzna ocena reinerwacji mięśni szkieletowych szczura po mikrochirurgicznej implantacji nerwu w brzuszec mięśnia. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 1994, Tom 28, 1, strony 13-25.
105. **Ghalib, N, Houstava, L i Haninec, P.** Morphometric analysis of early regeneration of motor axons through motor and cutaneous nerve grafts. *Annals of Anatomy*. 2001, 183, strony 363-368.
106. **Lindemuth, R, Mink, D i Ernzerhof, C.** Automated and representative fascicle selection for computer-assisted morphometry of myelinated nerve fibres in peripheral nerves. *Computers in Biology and Medicine*. 2002, 32, strony 1-11.
107. **da Silva, A P i Rodrigues, C.** Peripheral nerve morphometry: Comparison between manual and semi-automated methods in the analysis of a small nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007, 159, strony 153-157.
108. **Feinstein, A.** *Principles of Medical Statistics*. London : Chapman & Hall/CRC, 2002.
109. **Petrie, A i Sabin, C.** *Medical Statistics at a Glance*. London : Blackwell Science, 2000.
110. **Monte-Rasso, V, Barbieri, C i Mazzer, N.** s the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *Journal of Neuroscience Methods*. 2008, Tom 170, strony 255-261.
111. **Kerns, J.** End-to-side nerve grafting of the tibial nerve to bridge a neuroma-incontinuity. *Wiley InterScience*. 2005.
112. **Rosen, J M i Jewett, D L.** Physiologic methods of evaluating experimental nerve repairs. [aut. książki] DL Jewett i H R McCarol. *Nerve repair*. St Louis : Mosby, 1980, strony 15-161.

113. **Rupp, A, Dornseifer, U i Fischer, A.** Electrophysiologic assessment of sciatic nerve regeneration in the rat: Surrounding limb muscles feature strongly in recordings from the gastrocnemius muscle. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007, 166, strony 266-277.
114. **Vleggeert-Lankamp, C i van den Berg, R J.** Electrophysiology and morphometry of the Aa- and Ah-fiber populations in the normal and regenerating rat sciatic nerve. *Experimental Neurology*. 2004, 187, strony 337-349.

11. Streszczenie

Wstęp

Pomimo długiej historii badań nad leczeniem uszkodzeń nerwów wciąż pozostają specyficzne, trudne problemy kliniczne czekające na odpowiednie rozwiązania. Należą do nich duże ubytki nerwów lub brak regeneracji pomimo naprawy uszkodzenia.

Zaproponowany na początku XX wieku a szerzej badany w ostatnich latach szew nerwu koniec do boku mógłby stanowić rozwiązanie niektórych z wyżej wymienionych problemów. W odróżnieniu od zachęcających badań eksperymentalnych próby kliniczne nie przynoszą satysfakcjonujących rezultatów. Wciąż brakuje ustaleń co do niektórych aspektów tej techniki: otwierania epineurium nerwu dawczego, potencjalnego uszkodzenia nerwu dawczego i spodziewanego poziomu regeneracji nerwu biorczego.

Cel pracy

Celem pracy było określenie czy regeneracja po szwie koniec do boku jest możliwa, jaka jest jej jakość, czy zasadne jest otwieranie epineurium nerwu dawczego oraz czy nerw dawczy ulega uszkodzeniu po takiej procedurze.

Materiał i metodyka

Badaniu poddałem 45 szczurów rasy Wistar, podzielonych na trzy równe grupy: A – szew koniec do boku bez otwarcia epineurium, B - szew koniec do boku z otwarciem epineurium, C – rekonstrukcja wolnym przeszczepem nerwu. Operowana była strona prawa, po której uszkadzałem a następnie naprawiałem nerw strzałkowy. Jako nerw dawczy służył nerw piszczelowy. Stosowałem technikę mikrochirurgiczną, okres obserwacji wynosił 24 tygodnie.

Wykonywałem ocenę wykorzystując następujące metody:

1. Badanie odcisku łap tylnych – wykonywane co 2 tygodnie, w wyniku którego otrzymałem współczynniki oceny funkcjonalnej regeneracji (PFI, TFI i SFI)
2. Badanie elektrofizjologiczne – oceniałem amplitudę i latencję rejestrując potencjał na nerwie strzałkowym i piszczelowym po stronie operowanej i zdrowej, stymulowałem nerw kulszowy bezpośrednio elektrodą lub lędźwiowy odcinek kręgosłupa przy pomocy cewki elektromagnetycznej
3. Badanie histomorfometryczne – pobierałem próbki nerwu strzałkowego i piszczelowego po stronie operowanej i nieoperowanej i po przygotowaniu preparatów histologicznych wykonywałem badanie morfometryczne oceniając ilość włókien nerwowych, średnicę i powierzchnię.

Wyniki

Badanie odcisku łap tylnych

Wartości badanych współczynników stabilizowały się po 6 tygodniach (TFI i SFI) oraz po 8 tygodniach (PFI). W punkcie końcowym badania, wartości nie różniły się pomiędzy grupami.

Badanie elektroneurofizjologiczne

Nie stwierdziłem różnic w badanych parametrach operowanego nerwu strzałkowego w stosunku do wartości prawidłowych jak również w porównaniu pomiędzy grupami badawczymi. W nerwie piszczelowym stwierdziłem istotnie niższą amplitudę w stosunku do nerwu nieoperowanego, ale jedynie w grupach ze szwem koniec do boku. Nie stwierdziłem istotnych różnic pomiędzy grupami.

Otrzymane wyniki świadczą o pełnej regeneracji elektrofizjologicznej nerwu strzałkowego oraz upośledzeniu funkcji nerwu piszczelowego w grupach A oraz B. Wartości w poszczególnych grupach nie różniły się między sobą.

Badanie histomorfometryczne

W badaniu nerwu strzałkowego istotnie niższa od normalnych była średnica i powierzchnia włókien nerwowych we wszystkich grupach. Nie stwierdziłem różnic w badanych parametrach pomiędzy grupami, co świadczy o podobnej regeneracji morfologicznej.

Wnioski

1. Regeneracja nerwu strzałkowego szczura po zespoleniu do boku nerwu piszczelowego występuje i jest tak samo skuteczna jak po rekonstrukcji wolnym przeszczepem nerwu.
2. Średnica oraz powierzchnia włókien nerwowych nerwu strzałkowego po szwie koniec do boku oraz rekonstrukcji wolnym przeszczepem jest istotnie mniejsza niż w nerwie nieoperowanym.
3. Otwarcie epineurium nie wpływa istotnie na regenerację nerwu strzałkowego.
4. Nerw piszczelowy (dawczy) ma istotnie zmniejszoną amplitudę niż nerw nieoperowany, co może świadczyć o uszkodzeniu aksonalnym.

12. Abstract

A big number of clinical problems with nerve reconstruction can be found despite the long history of nerve research. One of the possibilities in specific situations is end-to-side neurorrhaphy (ETS), described at the beginning of XX century and then rediscovered in 90s. There is no solid data on quality of recipient nerve regeneration, possible donor nerve damage and epineural window necessity.

The aim of the research was to evaluate possible regeneration after end-to-side neurorrhaphy, its quality, possible donor nerve damage and influence of epineural window on regeneration.

45 female Wistar rats were divided into 3 equal groups: A – ETS without epineural window, B – ETS with epineural window, C – free graft reconstruction. Right peroneal nerve was operated and tibial nerve was selected for donor. Follow-up period was 24 weeks.

Regeneration was evaluated by:

1. Foot print analysis every 2 weeks with PFI, TFI, SFI calculations
2. Electroneurography with direct sciatic nerve stimulation and indirect magnetic stimulation, amplitude and latency was recorded on peroneal and tibial nerves on both sides
3. Histomorphometry with digital conversion of semithin section, axon count, diameter and area calculations with semiautomated method

There was no statistical significant difference between groups investigated in all the parameters. The functional indexes have stabilized after 8 weeks (PFI) and 6 weeks (TFI and SFI) and were positively time related.

Lower amplitude of tibial nerve potential in group A and B was proved in comparison to nonoperated side. Neurographic parameters of peroneal nerve didn't differ significantly.

Histomorphometry revealed significantly lower diameter and area of axons in operated peroneal nerves compared to nonoperated. The axon count was at normal level in every group. Tibial nerve parameters did not differ from nonoperated values.

Conclusions:

1. Regeneration of peroneal nerve after ETS is at the same level as in free graft reconstruction.
2. Peroneal nerve after ETS and free graft reconstruction has lower diameter and area then nonoperated.
3. Epineural window does not influence the regeneration result of peroneal nerve.
4. Tibial nerve potentials have lower amplitude in ETS groups, which can be a sign of axonal impairment.