

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**Wydział Lekarski I**

**Zakład Patofizjologii Narządu Ruchu**



**Agnieszka Szymankiewicz - Szukała**

**Model doświadczalny udaru niedokrwiennego  
w badaniach neurofizjologicznych przewodnictwa eferentnego  
metodą ruchowych potencjałów wywołanych indukowanymi polem magnetycznym**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: dr hab. n. med. Juliusz Huber**

**Poznań 2012**

*Serdeczne podziękowania dla Promotora tej pracy  
dr hab. n. med. Juliusza Hubera za wyrozumiałość, cierpliwość,  
motywację i pomoc bez której ta praca nigdy by nie powstała.*

*Dziękuję dr Piotrowi Czarneckiemu i mgr Aleksandrze Siebert  
za pomoc w wykonaniu badań.*

<b>Skróty i najważniejsze terminy stosowane w pracy</b>	<b>4</b>
<b>1. Wstęp</b>	<b>5</b>
1.1 Definicja, podział oraz czynniki ryzyka udaru niedokrwiennego	7
1.2 Aspekty anatomiczne i czynnościowe drogi korowo-rdzeniowej	9
1.3 Znaczenie badań ruchowych potencjałów wywołanych do diagnostyki przewodnictwa eferentnego	12
1.4 Mechanizm powstawania udaru niedokrwiennego w badaniach klinicznych i eksperymentalnych	14
1.5 Udar niedokrwienny w badaniach neurofizjologii eksperymentalnej	17
<b>2. Cele pracy</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiał i metody</b>	<b>22</b>
3.1 Materiał badawczy	22
3.2 Metodyka pracy	24
3.2.1 Metodyka wywołania udaru niedokrwiennego	27
3.2.2 Badania temperatury	27
3.2.3 Badania ruchowych potencjałów wywołanych	28
3.2.4 Badania histologiczne	30
3.2.5 Metody analizy statystycznej	32
<b>4. Wyniki badań</b>	<b>33</b>
4.1 Wyniki badania temperatury przed i po wywołaniu udaru niedokrwiennego w poszczególnych grupach zwierząt	33
4.2 Wyniki badań ruchowych potencjałów wywołanych przed i po wywołaniu udaru niedokrwiennego w poszczególnych grupach zwierząt	34
4.3 Wyniki badań histologicznych w poszczególnych grupach zwierząt	41
4.4 Zależności pomiędzy parametrami ruchowych potencjałów wywołanych i temperatury w poszczególnych grupach zwierząt	44
<b>5. Dyskusja</b>	<b>48</b>
<b>6. Wnioski</b>	<b>53</b>
<b>7. Piśmiennictwo</b>	<b>54</b>
<b>8. Streszczenia w języku polskim i angielskim</b>	<b>64</b>
<b>9. Spis tabel i rycin</b>	<b>68</b>

## **Skróty i najważniejsze terminy stosowane w pracy**

H+E – w badaniu histologicznym, metoda barwienia hematoksyliną i eozyną

Ipsilateralna – tożstronna, w badaniach MEP dotyczy strony, z której wykonywano rejestrację, zgodnej ze stroną stymulowaną bodźcami na poziomie nadrženiowym lub stroną okluzji tętnicy szyjnej zewnętrznej

Kontraletaralna – drugostronna, w badaniach MEP dotyczy strony, z której wykonywano rejestrację, przeciwnej do strony stymulowanej bodźcami na poziomie nadrženiowym lub stroną okluzji tętnicy szyjnej zewnętrznej

L-strona lewa

LKD – lewa kończyna tylna

P-strona prawa

PKD - prawa kończyna tylna

n. – nerw

nn. - nerwy

MEP – ruchowe potencjały wywołane indukowane polem magnetycznym (ang. „motor evoked potentials”) - badanie przewodnictwa eferentnego, polegające na wywołaniu potencjału ruchowego w mięśniu lub w nerwie na skutek pobudzenia wiązką pola magnetycznego struktur nerwowych na poziomie ośrodków nadrženiowych

SEP – somatosensoryczne potencjały wywołane (ang. „somatosensory evoked potentials”)

TMS – przezczaszkowa stymulacja polem magnetycznym (ang. „transcranial magnetic stimulation”)

## 1. Wstęp

Udar mózgu należy do chorób XXI wieku, którego skutki wpływają znacząco na relacje społeczne i ekonomiczne. Jest trzecią przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych ekonomicznie, a drugą w krajach rozwijających się jak i główną przyczyną niepełnosprawności w populacji osób dorosłych. Jest najczęściej spotykaną chorobą układu nerwowego i najpoważniejszym problemem medycznym ze względu na swoje następstwa jak i skomplikowaną terapię (114). Obecnie jest drugą co do częstości chorobą w skali światowej (78), a 1/6 ludzi z globalnej populacji doświadczyła jej skutków (103). Rocznie w Europie na udar choruje jeden milion ludzi, a w Stanach Zjednoczonych pół miliona (17, 65, 83). W Polsce częstość występowania udarów jest podobna, ale współczynnik umieralności jest znacznie wyższy niż w Stanach Zjednoczonych, Japonii i w Państwach Europy Zachodniej (102, 114). Światowy budżet pochłania 6% dochodu na leczenie następstw oraz profilaktykę udarów zarówno krwotocznych jak i niedokrwienych (35,125).

W Polsce przeważająca część udarów ma swoją przyczynę w procesach niedokrwienych (87%) a rzadziej w krwotocznych (25%). Mężczyźni zapadają na udar niedokrwieny częściej aniżeli kobiety (mężczyźni - 177/100000, kobiety – 125/100000). Umieralność z powodu udaru niedokrwienego dotyczy również głównie mężczyzn, ale współczynnik niepełnosprawności jest w obu płciach podobny (121).

W związku z wyżej wymienionymi faktami, w których przewija się ważność etiopatogenezy i przebiegu udaru, badania nad bezpośrednimi i pośrednimi ich skutkami są przedmiotem wielu publikacji naukowych (54-56, 67, 83, 103, 129). Przyczyna udaru jest najczęstszym celem badań naukowych zwłaszcza w odniesieniu do ludzi, jednakże ze zrozumiałych względów stanowi ona również problem badań podstawowych (50). Pulsinelli (94) oraz Pulsinelli i Buchan (96) wskazali, że chociaż modele zwierzęce udaru były przeprowadzane wielokrotnie, to jednak ich wynik nie pozwolił na kliniczne określenie skutków leków w testach farmakologicznych związanych z ich właściwością neuroprotekcijną. Skutki udaru oraz czas trwania następstw przed zgonem wydają się być jeszcze niedostatecznie poznane (124), chociaż należy przypuszczać, że ich zrozumienie doprowadzi do odkryć, na bazie których możliwa będzie skuteczna prewencja choroby udarowej. Przyjęte przez niektórych badaczy aksjomaty odnośnie nieodwracalnych skutków udaru po określonym czasie od samego incydentu (35), ograniczyły między innymi rozwój jak i zakres poszukiwania środków farmakologicznych, które mogłyby skompensować skutki niedokrwienia. Przykładem tego było wprowadzenie rewolucyjnego w latach

dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku preparatu Solu-Medrol do wczesnego leczenia następstw udaru, chociaż jak wykazały późniejsze obserwacje, jego skutek jest zmienny w zależności od długości czasu trwania niedokrwienia (25, 26). Dlatego w mojej pracy podjęłam próbę sprecyzowania najdłuższego czasu trwania niedokrwienia mózgu w warunkach eksperymentalnych, które pomimo jego występowania, jest odwracalne w niekorzystnych skutkach dla czynności neuronów kory ruchowej mózgu. Wiarygodność spodziewanych rezultatów opieram na wykorzystaniu preferowanej obecnie metody badania stanu czynnościowego drogi korowo-rdzeniowej w neurofizjologii klinicznej, jaką jest rejestracja ruchowych potencjałów wywołanych indukowanych polem magnetycznym (MEP) (3, 36, 45, 81, 98, 118). Dotychczasowe badania w tym zakresie, gdzie metodę MEP wykorzystano, dotyczyły głównie modelu udaru niedokrwiennego w warunkach eksperymentalnych i obserwacji jego następstw po 6 godzinach (110). Rejestracje MEP wykonywano z mięśni lub nerwów przeważnie po okluzji tętnicy środkowej mózgu lub w przypadkach obserwacji następstw niedrożności tej tętnicy u ludzi w okresie 3 miesięcy (118).

Powodem, dla którego zainteresowało mnie zjawisko zmienności przewodnictwa impulsów eferentnych w drodze korowo-rdzeniowej w następstwie niedrożności tętnicy szyjnej wspólnej, jest duża częstość występowania tego schorzenia jako powodu udaru niedokrwiennego u ludzi. Nowacki i Bajer-Czajkowska (83) wskazują, że miejscowe 70% zwężenie światła tego naczynia występuje u 20% chorych, natomiast istnieje mała ilość doniesień wyjaśniających jego skutki (82), co wskazuje na ważność podejmowanego tematu.

Kety (64) uważa, że niedrożność tętnic szyjnych nie wywołuje znaczących zmian w krążeniu mózgowym większości ssaków łącznie z człowiekiem, natomiast Zea Longa i współpracownicy nadmienią (134), że okluzja wewnątrzczaszkowych tętniczych gałęzi szyjnych nie wywołuje udaru w ogóle. Ma to miejsce z powodu licznych anastomoz tworzących połączenia pomiędzy gałęziami zewnętrznymi i wewnętrznymi tętnic szyjnych. Z drugiej strony Garcia (42) jak i Dougherty i współpracownicy (33) stwierdzają, że większość gryzoni jest idealnym modelem do obserwacji selektywnych skutków udaru po zaciśnięciu tętnicy szyjnej jedno- lub obustronnie.

W dostępnej literaturze nie znalazłam opisów badań nad przebiegiem udaru niedokrwiennego u szczurów po okluzji tętnicy szyjnej wspólnej z wykorzystaniem oceny skutków niedokrwienia neuronów kory ruchowej, po stymulacji polem magnetycznym i rejestracji potencjałów ruchowych z nerwów, a nie mięśni kończyny tylnej.

## 1.1 Definicja, podział oraz czynniki ryzyka udaru niedokrwiennego

Udar mózgu jest to (cyt. za Światowa Organizacja Zdrowia – WHO) ....,nagle wystąpienie ogniskowych lub uogólnionych zaburzeń czynności mózgu trwające dłużej niż 24 godziny, spowodowanych przez przyczyny naczyniowe”... (52). Może być wywołany różnymi przyczynami takimi jak choroba dużych naczyń (20%), choroba małych naczyń (20%), jako następstwo zawałów mózgu spowodowanych zatorowością pochodzenia sercowego (22-30%), natomiast 2-3% ludzi choruje z powodu udaru o innej etiologii (29, 114).

W praktyce klinicznej istnieją różne klasyfikacje udarów mózgu, które uwzględniają zarówno ich typ jak i etiologię. Najczęściej stosowany jest podział na udary niedokrwienne, które stanowią 80% ogółu lub krwotoczne stanowiące 15% oraz udary nieskalsyfikowane stanowiące 5%. Bardzo często stosowaną klasyfikacją w badaniach klinicznych jest klasyfikacja TOAST, która podobnie jak wyżej wymieniona definicja, dzieli udary na spowodowane zmianami w dużych naczyniach które doprowadzają krew do mózgu, w małych naczyniach śródmózgowych lub zatorom pochodzenia sercowego (1). Przy klasyfikacji udarów można też wyróżnić zaproponowaną przez Bamforda i współpracowników (10), która odnosi się do obrazu klinicznego i według niej udary możemy podzielić na:

- udary obejmujące obszar unaczynienia przez tętnice przednie mózgu (ang. Total Anterior Circulation Syndrome) – TACS,
- część obszaru unaczynienia przez tętnice przednie mózgu (ang. Partial Anterior Circulation Syndrome) - PACS,
- udary lakunarne – zatokowe (ang. Lacunar Syndrome) - LACS,
- udary będące wynikiem niedrożności z kręgu unaczynienia tylniego (ang. Posterior Circulation Syndrome) - POCS.

Wśród neurologów rozpowszechniony jest podział etiologiczny, w którym na pierwszym miejscu pod względem częstości wymieniane są udary miażdżycowo-zakrzepowe, następnie zatorowe pochodzenia sercowego, krwotoczne, lakunarne oraz o innej etiologii (68, 93).

Zaburzenia krążenia o charakterze niedokrwinnym w ośrodkowym układzie nerwowym można podzielić dodatkowo w zależności od:

- mechanizmu patogenetycznego na: zakrzepowo-zatorowy, zatorowy, zatokowy (lakunarny, który najczęściej jest skutkiem uszkodzenia małych naczyń), hemodynamiczny związany ze

spadkiem ciśnienia systemowego (którego konsekwencją jest zaburzenie perfuzji w ośrodkowym układzie nerwowym),

- umiejscowienia: zespoły objawowe półkulowy, korowy, podkorowy, pniowy, mózdkowy.

Podział udarów niedokrwiennych mózgu w zależności od dynamiki objawów dotyczy:

-przemijających napadów ischemicznych,

-odwracalnych udarów niedokrwiennych,

-postępujących udarów niedokrwiennych oraz,

-udarów mózgu dokonanych (68, 93).

Pod względem lokalizacji niedokrwienia wyróżnia się objawy zamknięcia lub zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej, tętnicy środkowej mózgu oraz tętnicy kręgowej. Największa część udarów niedokrwiennych, bo aż 70% wszystkich udarów mózgu to udary w zakresie niedrożności tętnicy szyjnej wewnętrznej, która zaopatruje większą część półkul mózgowych za wyjątkiem płatów potylicznych i przyśrodkowych części płatów skroniowych (2, 114).

Czynniki ryzyka udaru niedokrwiennego można podzielić na modyfikowalne i niemodyfikowalne.

Do modyfikowalnych zaliczamy:

- nadciśnienie tętnicze,

- cukrzycę,

- palenie papierosów,

- migotanie przedsionków, zawał serca z zakrzepem, zastawkowe wady serca,

- zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej,

- hiperhomocysteinemię,

- zaburzenia krzepnięcia,

- przemijające ataki niedokrwienia,

- brak aktywności fizycznej i styl życia,

- dietę i otyłość,

- hormonalną terapię zastępczą,

- przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych,

- infekcje (29, 30, 68, 72, 83).



Do niemodyfikowalnych zaliczamy:

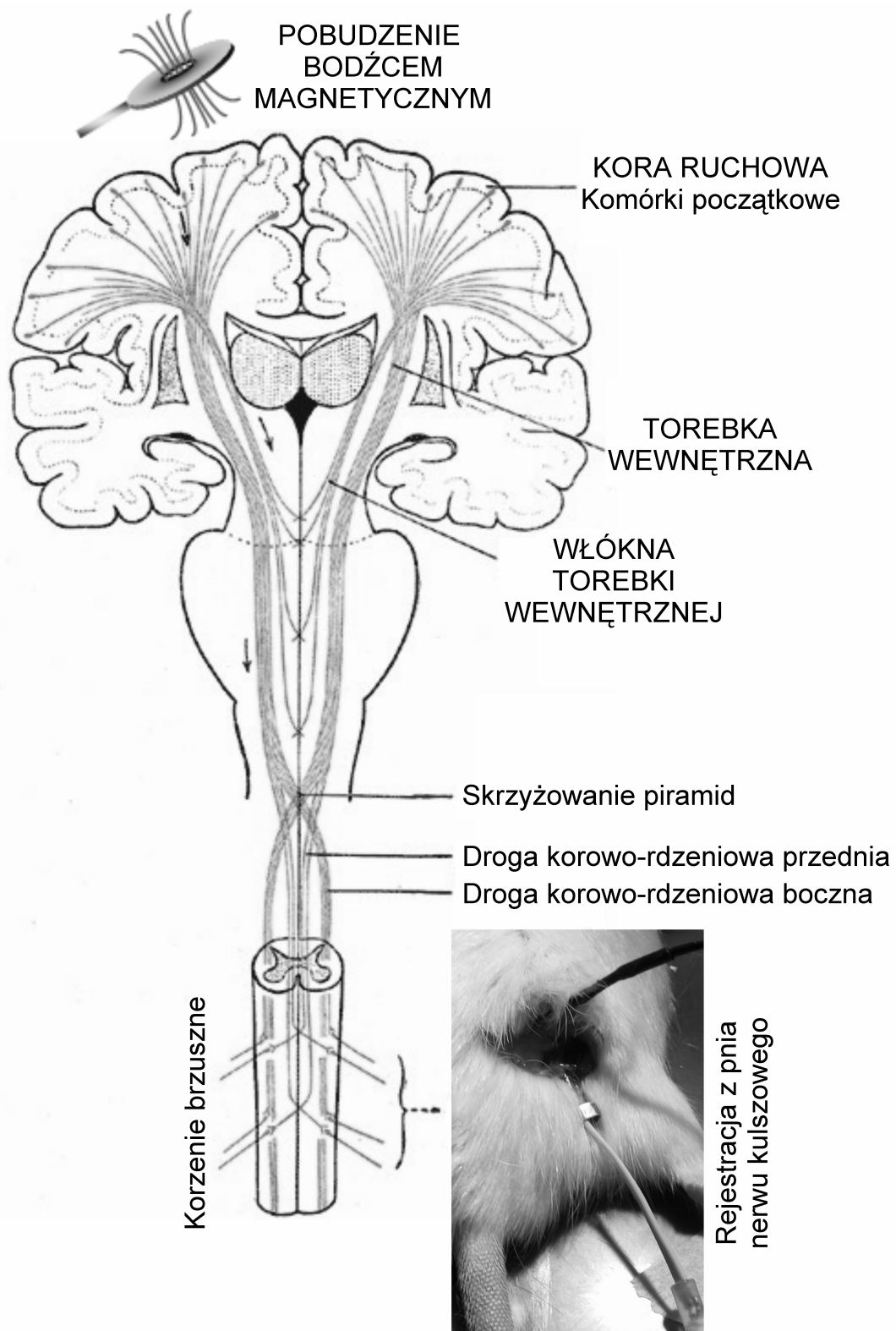
- płeć,
- wiek,
- rasę,
- czynniki genetyczne,
- przebyty udar mózgu (68, 83).

## **1.2 Aspekty anatomiczne i czynnościowe drogi korowo-rdzeniowej**

Z ośrodków kory mózgu, biegną do rdzenia kręgowego włókna dróg korowo-rdzeniowych, których komórkami macierzystymi są u szczura i człowieka głównie olbrzymie komórki Betza (86, 87). Są one zlokalizowane w 4 i częściowo 6 polu kory ruchowej (wg Brodmanna). Komórki te ułożone są somatopicznie w obrębie tych pól, określanych jako pierwszorzędowa kora ruchowa, co oznacza, że poszczególne unerwiane okolice ciała mają swoją określoną reprezentację korową. Na swoim przebiegu włókna korowo – rdzeniowej tworzą wieniec promienisty wchodzą do tylnej części odnogi torebki wewnętrznej. Stąd biegną dalej przez odnogę mózgu i część brzusznią mostu, gdzie tworzą pęczki o przebiegu podłużnym, przechodząc niżej do rdzenia przedłużonego. Tutaj włókna korowo-rdzeniowej ponownie gromadzą się we wspólną wiązkę, tworząc na przedniej powierzchni mózgowia wyniosłość zwaną piramidą (87). W dolnej części rdzenia przedłużonego na pograniczu z rdzeniem kręgowym, 80-90% włókien drogi piramidowej ulega skrzyżowaniu i przechodzi do sznura bocznego strony przeciwległej tworząc drogę korowo-rdzeniową boczną. Około 10-20% włókien pozostaje po tej samej stronie, biegnąc w sznurze przednim rdzenia kręgowego jako droga korowo – rdzeniowa przednia. W sznurze bocznym oprócz włókien skrzyżowanych biegnie pewna liczba włókien nieskrzyżowanych, które czasami wyróżnia się jako drogę korowo- rdzeniową boczną nieskrzyżowaną (13, 87) (rycina 1).

U ludzi, impulsy eferentne z komórek piramidowych kory ruchowej przewodzone są do motoneuronów ośrodków rdzeniowych dla unerwienia kończyn górnych i dolnych na drodze polisynaptycznej (105, 108). W pośredniczeniu impulsów biorą udział przynajmniej 2-3 interneurony pobudzające lub przynajmniej 3 interneurony wydzielające na zakończeniach synaps nerwowo-nerwowych mediator hamujący w drodze do alfa-motoneuronów (9, 87). U szczura występuje duże podobieństwo połączeń synaptycznych na poziomie ośrodków

rdzeniowych (86, 108) z tym, że ogólnie podkreśla się mniejszą ilość zaangażowanych interneuronów w pośredniczeniu przewodnictwa korowo-rdzeniowego.



Rycina 1. Schemat przebiegu dróg piramidowych w płaszczyźnie czołowej oraz idea ich pobudzenia jak i sposobu rejestracji ruchowych potencjałów wywołanych stosowane w pracy.

Shapovalow (108) opisuje podobieństwo anatomiczne i funkcjonalne właśnie drogi korowo-rdzeniowej u ludzi i gryzoni. Podobnie przebiega kontrola impulsów eferentnych z ośrodków kory ruchowej mózgu do rdzeniowych ośrodków unerwiających mięśnie kończyn przednich i tylnych przez impulsy z wielu grup włókien aferentnych (59, 74). Należy przypuszczać, iż czynność eferentna przewodzona przez drogi korowo-rdzeniowe w następstwie pobudzenia impulsem magnetycznym, w warunkach eksperymentalnych w niniejszej pracy jest pośredniczona przez dwa interneurony. Prędkość przewodzenia włókien ruchowych drogi korowo-rdzeniowej bocznej, szacuje się na podstawie badań elektrofizjologicznych u szczura jak i neurofizjologii klinicznej u człowieka w zakresie od 42,0 do 68,0 m/s (53).

W badaniach Nielsen i współpracowników u szczurów (81) próbowano określić, które szlaki eferentne przewodzą impulsy nerwowe w następstwie przeczaszkowej stymulacji magnetycznej. Autorzy ci opisali trzy zakresy latencji (3-6ms, 8-12ms, 14-18ms), przy których rejestrowano potencjały MEP i stwierdzili, że oprócz drogi korowo-rdzeniowej nie są one przewodzone przez szlak czerwienno-rdzeniowy z śródmózgowia, ale bardziej przez szlak siatkowo-rdzeniowy biorący początek z pnia mózgu i biegnący w obrębie sznura bocznego rdzenia kręgowego. Rejestracje wykonywano z mięśni kończyn przednich, podczas gdy bezpośrednie przewodnictwo dróg korowo-rdzeniowych dla ośrodków mięśni kończyn tylnych odprowadzali z nerwów.

Rozległa stymulacja kory ruchowej bodźcem elektrycznym, wywołuje aktywację neuronów drogi korowo-rdzeniowej, prowadząc do powstawania serii czterech lub więcej salw do ośrodków rdzenia z rejestracją określaną mianem fali I. Panuje przekonanie, że chociaż ta metoda jest mniej ogniskowa i selektywna niż stymulacja bezpośrednia małych obszarów kory ruchowej, można z jej pomocą określić topografię ośrodków dla unerwienia mięśni. W odróżnieniu od innych badaczy Kakinohana i współpracownicy są przekonani (61), że potencjały MEP indukowanych polem magnetycznym jest sumarycznym obrazem przewodnictwa impulsów przewodzonych przez szlak korowo-rdzeniowy do ośrodków ruchowych rdzenia oraz na poziomie struktur złącza nerwowo-mięśniowego.

### **1.3 Znaczenie badań ruchowych potencjałów wywołanych do diagnostyki przewodnictwa eferentnego**

Badania nad wykorzystaniem pola magnetycznego do pobudzenia struktur nerwowych (TMS) w tym długich szlaków przewodzących impulsację eferentną do ośrodków rdzeniowych mają długą historię (27, 28, 44, 49). TMS nie ma charakteru czysto diagnostycznego, ale również charakter leczniczy w zaburzeniach ruchowych takich jak choroba Parkinsona, leczeniu depresji czy ataksji mózdkowej (49). W 1982 roku Polson i wsp. (91) udowodnili, że możliwe jest drażnienie nerwu na obwodzie za pomocą silnego impulsowego pola magnetycznego, co doprowadza do depolaryzacji błony komórki nerwowej z następczym wyzwoleniem potencjału czynnościowego (138). Trzy lat później Barker i współpracownikom (11) udało się doprowadzić do skutecznej stymulacji mózgu, które to odkrycie zapoczątkowało erę techniki TMS (57). Początkowo TMS była stosowana w diagnostyce neurologicznej oraz jako narzędzie w wielu badaniach neurofizjologicznych i neuropsychologicznych (138). Udowodniono, że TMS jest niezwykle wartościowym narzędziem do badania organizacji i interakcji korowych ośrodków ruchowych (101).

Aplikacja badań MEP w warunkach klinicznych do interpretacji zjawisk zachodzących w przewodnictwie eferentnym została opisana w szczegółach przez Rösler (98). Badania MEP zostały wykorzystywane do oceny klinicznej, na zasadzie porównania wyników przed i po leczeniu ostrego zawału tętnicy środkowej mózgu. Zmiany parametrów MEP wykazały wyraźną dodatnią korelację z oceną stanu klinicznego u chorych w skalach Barthel i Rankin. W przypadku badania chorych bezpośrednio po zawale tętnicy środkowej mózgu, potencjały MEP nie były rejestrowane i wówczas wyniki oceny klinicznej były złe. Natomiast w przypadku potencjałów MEP prawidłowych lub o nieznacznie wydłużonej latencji, wyniki badań klinicznych były prognostycznie dobre (3, 118).

Szereg prac u chorych po udarze niedokrwiennym wykazało, że MEP są czułym wskaźnikiem prognostycznym co do efektów i ukierunkowania leczenia zachowawczego, mającego na celu odtworzenie utraconej funkcji ruchowej (80, 123). Rejestrowane potencjały MEP są wówczas albo nieobecne albo mają małą amplitudę i wydłużony czas trwania, natomiast ośrodkowy czas przewodnictwa eferentnego jest tylko nieznacznie wydłużony. U tych badanych chorych stwierdza się natomiast wzrost progu pobudliwości neuronów korowych (22, 127).

W związku z wzrastającą incydentalnością udaru niedokrwiennego powiązaną z obniżeniem średniej wieku oraz problemami coraz bardziej skomplikowanych aspektów

etiologicznych jak i samego przebiegu początku choroby, o których wspomniałam we *Wstępie* należy stwierdzić, że obecnie wzrasta zapotrzebowanie na coraz bardziej precyzyjne narzędzia diagnostyczne neurofizjologii umożliwiające indywidualną ocenę sprawności przewodnictwa eferentnego u chorych. Do niedawna jedną z głównych metod neurofizjologicznych w badaniach nad udarami mózgu były badania somatosensorycznych potencjałów wywołanych, oceniających drogi czuciowe obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego, na skutek bodźców elektrycznych aplikowanych naskórnice w nerwach kończyn górnych i dolnych (107). Badania MEP wykazują jednak większą przydatność w porównaniu z badaniami przewodnictwa aferentnego SEP, głównie z uwagi na większą rzetelność otrzymywanych rezultatów. Kakinohana i współpracownicy (62) na pierwszym miejscu stawiają tutaj sam problem rejestracji potencjałów SEP o amplitudzie rzędu mikrowoltów wymagających procesu uśrednienia komputerowego, w przeciwieństwie do rejestracji potencjałów MEP o wartościach amplitudy wyrażanych w miliwoltach. Badania neurofizjologii klinicznej ruchowych potencjałów wywołanych indukowanych polem magnetycznym u chorych po udarach spełniają kryteria czułości i specyficzności (47, 49).

Panuje przekonanie, że badanie ruchowych potencjałów wywołanych u chorych po udarach z punktu widzenia funkcjonalnego jest komplementarnym z wynikami neuroobrazowania o wysokiej rozdzielczości uszkodzonej struktury. Zaletą badania MEP jest możliwość śledzenia procesów neuroplastycznych lub ich braku na kolejnych etapach leczenia po udarze mózgu (100). Dzięki tej metodzie potwierdzono zależność pomiędzy płcią i wiekiem a przebiegiem udaru (58, 100, 124). U chorych po udarach, badania z wykorzystaniem MEP określiły przejęcie utraconej funkcji przez neurony analogicznych ośrodków kory ruchowej bardziej drugostronnej, aniżeli przez neurony przyległe do obszaru niedokrwienia (49, 58).

Natomiast istnieje niewiele badań o podobnym metodycznie charakterze w sensie poznawczym i prognostycznym u chorych po udarach krwotocznych (3), z uwagi na zachowanie ostrożności związanej z wpływem stymulacji na wznowienie procesu krwotocznego.

#### **1.4 Mechanizm powstawania udaru niedokrwiennego w badaniach klinicznych i eksperymentalnych**

Sicard i Fisher (109) opisali satysfakcjonujące kryteria modelu udaru niedokrwiennego badanego w warunkach eksperymentalnych. Według ich opinii powinny one:

1. jak najbardziej naśladować zmiany patofizjologiczne spotykane u chorych po udarach niedokrwiennych,
2. wywoływać porównywalne zmiany patologiczne,
3. wykorzystywać procedury proste, jak najmniej inwazyjne w celu zachowania selektywności (*versus* globalne niedokrwienie)
4. charakteryzować się niskimi kosztami,
5. umożliwiać rzetelne monitorowanie parametrów fizjologicznych i analizę strukturalną tkanki mózgowej.

Wydaje się, że wybrany przeze mnie model doświadczalny jedno- i obustronnego zamknięcia i ponownego udrożnienia tętnicy szyjnej wspólnej spełnia wszystkie powyższe kryteria.

Z kolei szczur (podobnie za Sicard i Fisher, 109) spełnia powyższe kryteria dobrego modelu udaru niedokrwiennego z uwagi na:

1. podobieństwo anatomii i fizjologii mózgu z człowiekiem,
2. małe wymiary tkanki mózgowej umożliwiające ich szybka analizę zmian struktury i reakcji na zmieniające się warunki,
3. niski koszt,
4. znaczące podobieństwo genotypowe z człowiekiem,
5. największą publiczną i instytucjonalną akceptację etyczną.

Badania nad modelem zwierzęcym udaru niedokrwiennego podejmowano z wielu powodów, głównie skoncentrowanych na określeniu jego następstw w długoterminowym okresie obserwacji jak i opisie działania środków farmakologicznych o charakterze neuroprotekcynym. W większości przypadków obserwacji krótkoterminowych, te próby były ograniczone od 6 do 24 godzin po wprowadzeniu czynników i wykazały brak ich klinicznej skuteczności. Były to głównie związki, w których wykorzystano mechanizm działania antagonistycznego na receptor NMDA (Selfotel), lub też działanie polegało na stabilizacji metabolizmu błony komórkowej (Citicoline) (48). Tematyka tych badań nie dotyczy jednakże

celu niniejszej pracy, w której skupiono się na wykazaniu w sposób selektywny zmian w czynności neuronów drogi korowo – rdzeniowej w następstwie lokalnego niedokrwienia (ang. „focal ischemia”). W tym aspekcie dotychczasowe badania polegały na wywołaniu (głównie u szczurów) globalnego niedokrwienia (poprzez obustronną okluzję tętnicy środkowej mózgu lub tętnic szyjnych z kombinacjami sztucznie wywołanego wzrostu ciśnienia śródczaszkowego) oraz lokalnej ischemii, wywołanej głównie poprzez zamknięcie tętnic mózgowych.

Mechanizm udaru w warunkach eksperymentalnych bardzo podobny do sytuacji klinicznej, polega ogólnie na reperfuzji, wywołaniu hiperglikemii lub poprzez zjawisko gwałtownego wzrostu temperatury (hipertermii) bądź też gwałtownej zmiany ciśnienia krwi. Wyniki badań wykazały, że hipotermia jest zjawiskiem zasadniczym w przebiegu udaru mózgu u chorych po udarach (50).

W ujęciu patofizjologicznym udary u ludzi są bardzo zbliżone do tych opisywanych w modelach eksperymentalnych u zwierząt. W najczęstszych modelach eksperymentalnych wywoływane są poprzez:

1. zaburzenia przepływu krwi,
2. niedomogi krążenia mózgowego zarówno lokalne jak i uogólnione, jak również mikro- i makroangiopatie,
3. deficyty energetyczne tkanki nerwowej (najczęściej z powodu kwasicy lub obrzęku) (16, 85, 137).

Sicard i Fisher (109) wśród modeli doświadczalnych wyróżniają także permanentny (ang. „permanent” - stały) lub przemijający (ang. „transient” – czasowy efekt niedokrwienia). Permanentne niedokrwienie wywołuje skutki w obszarze rozległym, otoczonym przez mniej zniszczoną tkankę (55).

Pomimo bardzo intensywnych badań nad procesami molekularnymi niedokrwienia mózgu nie można jednoznacznie odpowiedzieć, jaki proces zapoczątkowuje kaskadę zdarzeń prowadzących do obumierania neuronów. Ogólnie przyjmuje się, że za patologię niedokrwienia mózgu odpowiedzialnych jest wiele zjawisk i procesów molekularnych. Do tych procesów zaliczyć można spadek stężenia tlenu, znaczące obniżenie stężenia ATP i glukozy lub czynniki wpływające na gwałtowną depolaryzację błony komórkowej (114). Spadek przepływu mózgowego szybko prowadzi do deficytu energetycznego, a to z kolei zaburza istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki reakcje wymagające dostarczenia energii (20). Brak ATP hamuje działanie pomp jonowych, doprowadzając do niekontrolowanego napływu do komórek różnych jonów w tym  $Ca^{+2}$ , depolaryzacji błony

komórkowej i nieprawidłowego uwalniania neurotransmiterów (94) i w efekcie doprowadza to do obrzęku komórki oraz nadmiernej aktywacji enzymów wewnątrzkomórkowych (114).

Wśród mechanizmów powstawania niedokrwienia mózgu wymienia się także procesy patologiczne takie jak egzotoksyczność komórek, stres oksydacyjny, zjawiska apoptozy czyli obumierania i śmierci komórek, uszkodzenia integralności i funkcji struktur wewnątrzkomórkowych. Należy spodziewać się, że w sekwencji zjawisk patofizjologicznych występujących po udarze niedokrwiennym, zjawisko egzotoksyczności dotyczy głównie neuronów korowych objętych tą patologią (32). Hipoglikemia w miejscach szczególnego niedokrwienia oraz podwyższenie temperatury mózgu, mają zasadniczy wpływ na przyspieszenie nekrozy (50, 126). Wykazano, że szczególnie tkanka kory mózgu jest wrażliwa na niedokrwienie, rzadziej dotyczy to neuronów ośrodków podkorowych (129).

Biorąc pod uwagę różnego typu wywołanie udaru niedokrwiennego, takie jak zaciśnięcie tętnicy szyjnej zewnętrznej, powinno ono wywołać skutek bardziej ogniskowego niedokrwienia aniżeli uogólnionego, przeważająco zgodnostronnie (ipsilateralnie). O ile uogólniony udar związany jest z zatrzymaniem akcji serca, to ogniskowy udar związany jest z zamknięciem światła naczyń tętniczych szyjnych lub podstawnych w kole Willisa. W badaniach Rosen i współpracowników stwierdzono (97), że u młodych osobników stwierdza się mniejsze deficyty w zatrzymaniu przepływu krwi oraz większe deficyty w obrębie uszkodzenia mózgu aniżeli u starszych osobników, pomimo zastosowania tych samych modeli udaru. Garcia i współpracownicy (43) w swojej pracy opisali zmiany niedokrwienne u szczurów po okluzji naczyń wewnątrzczaszkowych, jako odpowiednika zawału krwotocznego mózgu człowieka. Zbadali oni 45 zwierząt, określili zmiany strukturalne występujące po okluzji w półkulach tożstronnych przy obserwacjach od 30 minut do 7 dni po incydencie. Stwierdzili występowanie mikroskopijnych zmian w obszarze kory przedwzrokowej już po 30 minutach, z rozprzestrzenianiem się procesu w dalszym okresie obserwacji na prążkowie i na całą korę mózgu. Autorzy Ci obserwowali różne rodzaje zmian jakościowych w zależności od czasu obserwacji. Najpierw obejmowały one obkurczenia i obrzmienia zaliczane do zmian szybkich już po 6 godzinach, natomiast po 12 godzinach, zauważyli również zmiany w komórkach glejowych takie jak odczyn eozynofilowy i karolizę. Lokalna ischemia nie wywoływała dużej nekrozy nawet po 6 godzinach.

Fiskum i współpracownicy stwierdzili (41), że ischemia, jeśli nie prowadzi bezpośrednio do śmierci komórek, to indukuje w mózgu reakcje wtórne prowadzące do ogniskowej martwicy tkanki. Spadek lub brak przepływu krwi w określonej tętnicy powoduje najczęściej niedokrwienie ogniskowe.



Zgodnie z opisem Aranowski i współpracowników (4) w warunkach doświadczalnych, w pobliżu zamknięcia światła naczynia powstaje ognisko martwicy. Natomiast w obszarze przyległym do ogniska martwicy, przepływ krwi jest nieco większy i jeśli wraca on do wartości prawidłowych, obszar ten nie ulega degradacji. Strefa ta zwana jest „penumbra”, której nazwa została wprowadzona przez Astrup i współpracowników w 1981 roku (7).

Jakościowe zmiany morfologiczne w obszarze obumarłych tkanek (zmiany nekrotyczne) spowodowanych niedokrwieniem, oszacowano w strukturach mózgowia w preparatach histologicznych wybarwianych metodą H+E (hematoksyliną i eozyną) w pracy Mathew i współpracowników (76).

Innymi badanymi parametrami w obserwacjach skutków udaru niedokrwienego w warunkach eksperymentalnych były pomiary temperatury i oraz ciśnienia tętniczego lub żylnego metodą wewnętrzną, aczkolwiek Hossmann (54, 55), wskazuje na ich niską wiarygodność z uwagi na zmienne warunki pomiaru wspomnianych parametrów u szczurów i znacząca ilość czynników na nie wpływających.

Podobny do mojego z punktu widzenia metodycznego model udaru przeprowadzili Dougherty i współpracownicy (33) oraz Choki i współpracownicy (24), badając następstwa niedokrwienia u szczurów po okluzji tętnic szyjnych i przykręgosłupowych. Jednakże zajmowali się oni bardziej skutkami z punktu widzenia neurochemicznego, aniżeli neurofizjologicznego.

### **1.5 Udar niedokrwienny w badaniach neurofizjologii eksperymentalnej**

Jak podkreślają Small i Buchan (111), zwierzęce modele udaru niedokrwienego odzwierciedlają 25% wszystkich, przebiegających podobnie udarów niedokrwienych u ludzi. Skutki udaru u człowieka są możliwe do częściowego wyleczenia poprzez stosowanie środków neuroprotecyjnych w ciągu kilku godzin od wystąpienia choroby. Dlatego też określenie maksymalnego czasu, kiedy taka neuroprotekcja jest skuteczna, stanowi jedną z najważniejszych powodów stosowania modelu udaru niedokrwienego w badaniach u zwierząt.

Pomimo wielu badań eksperymentalnych na zwierzętach z udarem mózgu, w dalszym ciągu do końca nie oddają one przebiegu tego schorzenia u ludzi. Można przytoczyć wiele różnic pomiędzy udarami występującymi w badaniach klinicznych a eksperymentalnych. Do najważniejszych różnic pomiędzy modelami zwierzęcymi a udarami u ludzi należą:

- udary mózgu przeprowadzone na zwierzętach mają najczęściej charakter niedokrwienia globalnego, natomiast udary występujące u ludzi są najczęściej lokalnymi,
- udary u zwierząt są wywoływane w warunkach kontrolowanych w znieczuleniu ogólnym, co ma wpływ na pomiar parametrów fizjologicznych.

Z drugiej strony wyniki badań histologicznych jak i czynnościowych prowadzone u zwierząt doświadczalnych, stanowią podstawę do praktycznej aplikacji leczenia chorych po udarze niedokrwinnym mózgu (67). Pomimo występowania znacznych różnic neuroanatomicznych, patofizjologicznych, genetycznych i farmakologicznych pomiędzy udarami mózgu występującymi u ludzi a udarami wywołanymi eksperymentalnie, te ostatnie pozwalają lepiej zrozumieć procesy zachodzące podczas niedokrwienia mózgu (114).

W eksperymentach na zwierzętach, udar niedokrwienno ma najczęściej charakter ogniskowy i jest związany w 80% z zakrzepem, zwężeniem lub zatorem pojedynczego naczynia doprowadzającego i dotychczas najczęściej był on wywołany zmianami w tętnicy środkowej mózgu (117). Może być to niedokrwienie trwałe lub czasowe. Reperfuzja, która następuje w tym drugim przypadku jest natychmiastowa i ujawnia się w postaci hiperperfuzji z krótkotrwałym wzrostem mikrokrazenia o około 200% w stosunku do wartości przepływu przed niedokrwieniem (67, 114). Tak gwałtowne przywrócenie mikroprzepływu, wydaje się być źródłem dodatkowego uszkodzenia mikrokrazenia i komórek mózgu (5,131). Ostatnio coraz więcej badań doświadczalnych dotyczących mechanizmów i konsekwencji niedokrwienia, prowadzących jest w bliższym klinice modelu zakrzepowym (114). Model taki po raz pierwszy zastosował Dietrich i współpracownicy (31). W strategii całkowitego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczura wykorzystuje się filamenty, mikroklipsy oraz środki farmakologiczne trwale obkurczające naczynia, ewentualnie stosuje się też embolizację w krążeniu mózgowym (75).

Braeuninger i współpracownicy (15) oraz Bhardwaj i współpracownicy (12), wskazali na problemy proceduralne związane z prawidłowym przeprowadzeniem modelu niedokrwienno u szczurów. Zaliczyli do nich zbyt małe okazy zwierząt wykorzystywane w badaniach, bowiem zbyt mała waga zwierzęcia nie pozwala na precyzyjne wykonanie procedur operacyjnych. Dalej, wielu badaczy nie zwraca uwagi na istotny wpływ płci, gdyż przebieg udaru u osobników płci żeńskiej i męskiej jest odmienny. Należy również pamiętać o tym, aby sposób anestezji był jednolity w całej badanej grupie zwierząt, jak i pamiętać o kontrolowaniu różnych parametrów fizjologicznych, z których jeden powinien być monitorowany niezmiennie (np. temperatura).

Najczęstszymi modelami udaru niedokrwienno w badaniach eksperymentalnych są:

- udar globalny (obustronne zaciśnięcie tętnicy szyjnej) (46),
- udar w obrębie większości obszarów przodomózgowia poprzez zamknięcie 2 lub 4 naczyń (95),
- udar ogniskowy (zaciśnięcie tętnicy środkowej mózgu) (117),
- udar korowy poprzez lokalne zamknięcie naczyń podpajęczynówkowych (77).

Taira i Marsala (116) w swoich badaniach opisali skutki najczęściej stosowanego modelu niedokrwienia po okluzji tętnicy środkowej mózgu. Wykazali możliwość występowania następczego krążenia obocznego, co powoduje wtórne ukrwienie mózgu, a wydaje się być niemożliwe w przypadku zamknięcia tętnicy szyjnej.

Carmichael (21) opisał skutki okluzji tętnicy lub żyły szyjnej i wykazał, że 6-minutowa przerwa w przepływie krwi nie wywołuje znacznych procesów niedokrwienych, ale już 8-minutowa przerwa wywołuje zmiany niedokrwienne w prażkowi i hipokampie, co potwierdzili Wu i współpracownicy (130).

Spośród obserwowanych efektów patologii w układzie nerwowym po niedokrwieniu, stwierdzono utworzenie nowych odgałęzień aksonów w połączeniach korowych oraz zmiany w plastyczności map korowych (84). Zmiany na poziomie komórkowym były różnie opisywane w obszarach przednich i bocznych kory mózgu, ale stwierdzono ich większe nasilenie w okolicy kory skroniowej i kory ciemieniowej (21).

W dotychczasowych pracach eksperymentalnych wykorzystujących czynniki biochemiczne, przedstawiano listę szkodliwych substancji wywołujących udar niedokrwienny, ale wśród nich mało uwagi poświęcano procesom odwracalnym. Wśród modeli nie wymagających kraniotomii wymienia się indukcje zmian w tętnicach szyjnych, które obok okluzji tętnicy środkowej mózgu stanowią jedne z najczęstszych modeli udarów niedokrwienych. Jest zrozumiałe, że czym bardziej selektywny model udaru jest stosowany, tym więcej szczegółowych informacji na temat jego skutków można uzyskać.

W dotychczasowych badaniach opisano również skutki niedokrwienia w odniesieniu do ośrodków rdzenia, wynikające z niedrożności tętnic rdzeniowych w różnych modelach zwierzęcych (21, 38, 62, 69, 71).

Metoda MEP znalazła również szerokie zastosowanie w badaniach modelu udaru niedokrwienego na zwierzętach (112, 119), również w korelacji z badaniami neuroobrazowania (45) od momentu, kiedy została opisana postać potencjału w warunkach prawidłowych (34, 37, 70, 73).

W 1987 roku Simpson i Baskin (110), jako jedni z pierwszych zarejestrowali potencjały ruchowe przy odprowadzeniu z kończyn tylnych w następstwie wywołanego udaru

eksperymentalnego u kotów znieczulanych ketaminą. Potencjały ruchowe rejestrowali po 1 i 6 godzinach od okluzji tętnicy środkowej mózgu. Wstępnie zidentyfikowali w zapisach 4 składowe odpowiedzi w grupie kontrolnej zdrowych zwierząt. Stwierdzili, że zaraz po niedokrwieniu wszystkie załamki P1, P2, N1 i N2 były obniżone, a po 5 godzinach komponenty wczesne miały obniżoną amplitudę, która następnie wzrosła. Wynika z tego, że powstałe niedokrwienie nie musi być zjawiskiem nieodwracalnym w czynności ośrodków kory ruchowej, o ile wartość parametru amplitudy MEP takie zmiany odzwierciedla. Rejestracje były wykonywane z mięśni przy użyciu elektrod igłowych. Latencja MEP P1 i N1 wynosiła mniej więcej 15ms, natomiast latencja N2 i P2 wynosiła więcej niż 15ms. W 1989 roku Ueno i współpracownicy (122) zastosowali w badaniach MEP cewkę indukcyjną „ósemkową” i wykazali, że u ludzi taka cewka może selektywnie pobudzać obszary kory ruchowej w odstępach co 5mm. U szczurów taka sama stymulacja wywołała potencjały rejestrowane z rdzenia i mięśni. W każdym przypadku potencjały rdzeniowe składały się z 4 składowych (N1-N4). Z kolei potencjał rejestrowany z mięśni miał typowy kształt monofazowy.

W innych badaniach Fehlings i współpracowników (37), wartości amplitud MEP wywoływanych monopolarnie za pomocą bodźców elektrycznych aplikowanych do kory ruchowej były podobne, natomiast wartości atencji były relatywnie krótsze w ze względu na mniejszą wartość odległości przewodzenia. W 1995 roku Fishback i współpracownicy (40) zarejestrowali u szczurów potencjały MEP podobnie jak Ueno i współpracownicy (122), wykorzystując do stymulacji małą cewkę i stosując anestezję z wykorzystaniem propofolu (stosowanym jako środek do znieczulenia płytkiego), mającego niewielki wpływ na przewodnictwo nerwowe.

Badania czynności ośrodków kory ruchowej z wykorzystaniem MEP po jedno- lub obustronnej okluzji tętnicy szyjnej doczekała się również kilku opisów, wskazujących na różny krytyczny okres czasu, kiedy powstają nieodwracalne zmiany w neuronach kory mózgu (14).

Badania SEP w modelu udaru niedokrwiennego u zwierząt opisali Steinberg i współpracownicy (113), którzy wywołali udar u kotów po wykonaniu okluzji w naczyniach mózgu. Również oni stwierdzili, że podobnie jak w przypadku badań MEP, parametry SEP nie uległy poprawie po 6 godzinach od momentu niedokrwienia. Może to przemawiać za tym, że przewodnictwo aferentne do obszaru kory czuciowej drugostronnej jest bardziej wrażliwe na zmiany aniżeli przewodnictwo impulsów ruchowych.

## 2. Cel pracy

Biorąc pod uwagę aktualne dane odnośnie skutków udaru niedokrwiennego opisywanych u ludzi oraz w modelach eksperymentalnych u zwierząt uzyskanych na podstawie przeprowadzonych badań neurofizjologicznych (*podrozdziały 1.3-1.5*), sformułowano następujące cele pracy:

1. Zbadanie stanu czynnościowego przewodnictwa eferentnego od poziomu kory ruchowej do ośrodków lędźwiowo-krzyżowego rdzenia kręgowego u zwierząt po wywołanym udarze niedokrwiennym w celu określenia zmian wczesnych, które mogą być odwracalnymi.
2. Określenie zmienności temperatury ciała zwierzęcia w przebiegu obserwacji skutków udaru niedokrwiennego wywołanego okluzją tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie z wariantem ponownego udrożnienia przepływu krwi.
3. Weryfikację histologiczną zmian w strukturze mózgowia w następstwie wywołanego niedokrwienia po jedno- lub obustronnej okluzji tętnic szyjnych wspólnych z lub bez wtórnego udrożnienia.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1 Materiał badawczy

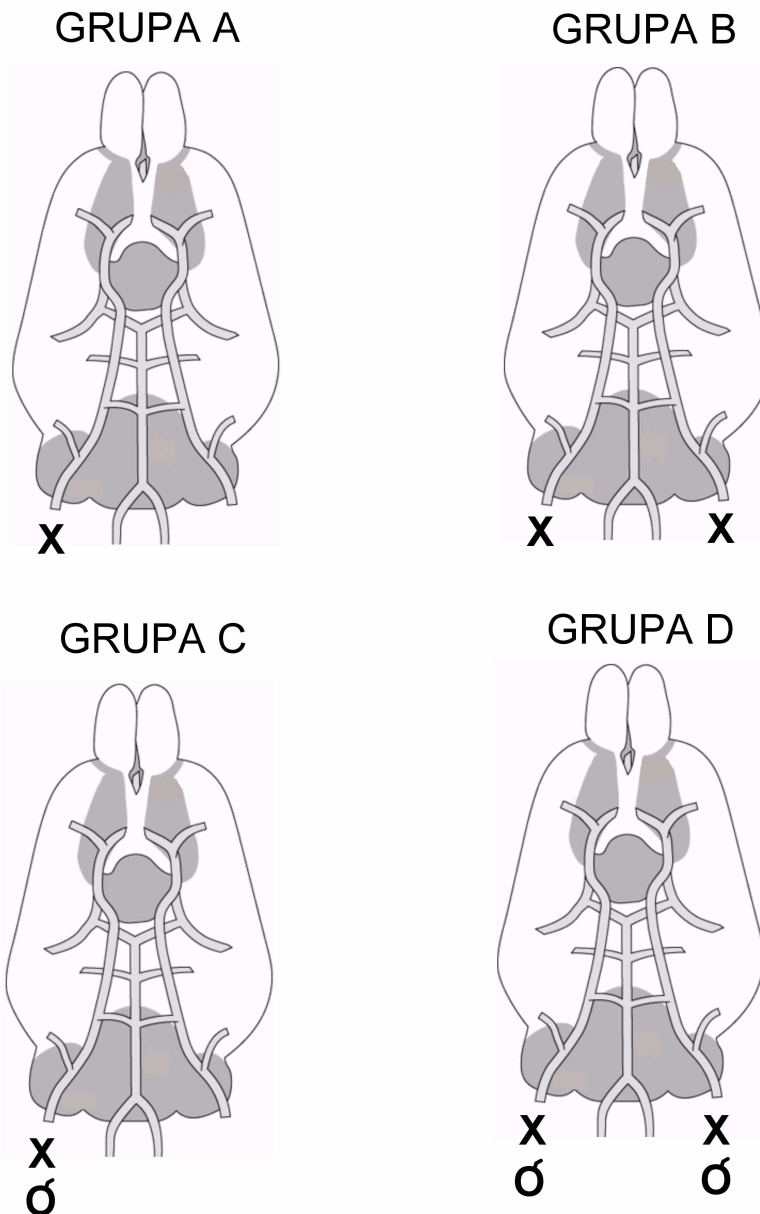
Badania przeprowadziłam w Pracowni Neurofizjologii Zakładu Patofizjologii Narządu Ruchu w Poznaniu, po uzyskaniu zgody nr 4/2008 uchwałą z dnia 15 lutego 2008 roku od Lokalnej Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Badania wykonałam na 46 dorosłych szczurach, samcach rasy Wistar o wadze od 220 do 280 g zakupionych z hodowli Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Waga zwierząt była stosunkowo niska, charakterystyczna dla samców, co niestety ograniczyło możliwość wykonania pomiaru ciśnienia żylnego (patrz poniżej). Jednakże do celów pracy wybrano samce (zwykle o niższej aniżeli samice wadze), z uwagi na stabilniejsze wartości referencyjne w pomiarach temperatury i przewodnictwa nerwowego (11, 15; *podrozdział 1.5*).

U zwierząt wywoływałam udar niedokrwienny (*podrozdział 3.2.1*), a następnie tego samego dnia wykonywałam badanie temperatury (*podrozdział 3.2.2*) oraz ruchowych potencjałów wywołanych (MEP, *podrozdział 3.2.3*) jak i pobierałam tkankę mózgową do badań histopatologicznych (*podrozdział 3.2.4*). Procedury histologiczne przeprowadzania skrawków do wizualizacji w mikroskopie jasnego pola przeprowadziłam w Katedrze Neurobiologii Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu około miesiąc po pobraniu mózgowia. Weryfikacji histologicznej dokonałam w Zakładzie Patofizjologii Narządu Ruchu, a zdjęcia z wybranych przekrojów histologicznych w Katedrze Neurobiologii miesiąc po zakończeniu wszystkich doświadczeń.

Zwierzęta (N=42) podzieliłam na 4 grupy badawcze (rycina 2):

- Grupa A – u zwierząt tej grupy wywoływałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie prawej tętnicy szyjnej (N= 19),
- Grupa B – u zwierząt tej grupy wywoływałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie tętnicy szyjnej obustronnie (N=13),
- Grupa C - u zwierząt tej grupy wywoływałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie prawej tętnicy szyjnej i ponownie ją udrożniłam (N=4)
- Grupa D - u zwierząt tej grupy wywoływałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie tętnicy szyjnej obustronnie i ponownie je udrożniłam (N=6)



Rycina 2. Schematy czterech rodzajów zabiegów na planach unaczynia mózgowia u szczura, wykonywanych w celu wywołania udaru niedokrwiennego w czterech grupach zwierząt: A-zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej jednostronnie (zawsze strona prawa), B-obustronne zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej, C-zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej jednostronnie (zawsze strona prawa) z ponownym udrożnieniem, D-obustronne zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej z obustronnym udrożnieniem. Na tej i na innych rycinach symbol „X” oznacza zamknięcie jedno- (zawsze prawa) lub obustronne tętnicy szyjnej wspólnej, natomiast „O” ponowne jej udrożnienie.

U 3 zwierząt wykonałam tylko rejestracje MEP w celu stwierdzenia, czy wartości amplitudy i latencji rejestrowane u nich oraz u zwierząt grupy A przed niedokrwieniem nie różnią się znacząco, więc mogą być traktowane wspólnie jako wartości referencyjne. U tych samych zwierząt pobierałam mózgowie do celów histopatologicznych i po wykonaniu

skrawków w płaszczyźnie poprzecznej od poziomu bregma do -5.1mm i wybarwieniu metodą H+E (podobnie jak w grupach zwierząt z wywołanym niedokrwieniem), starałam się ustalić różnicę między prawidłową tkanką mózgową a tkanką mózgową, której obraz wskazywał na skutki przeprowadzonego zabiegu niedokrwienia.

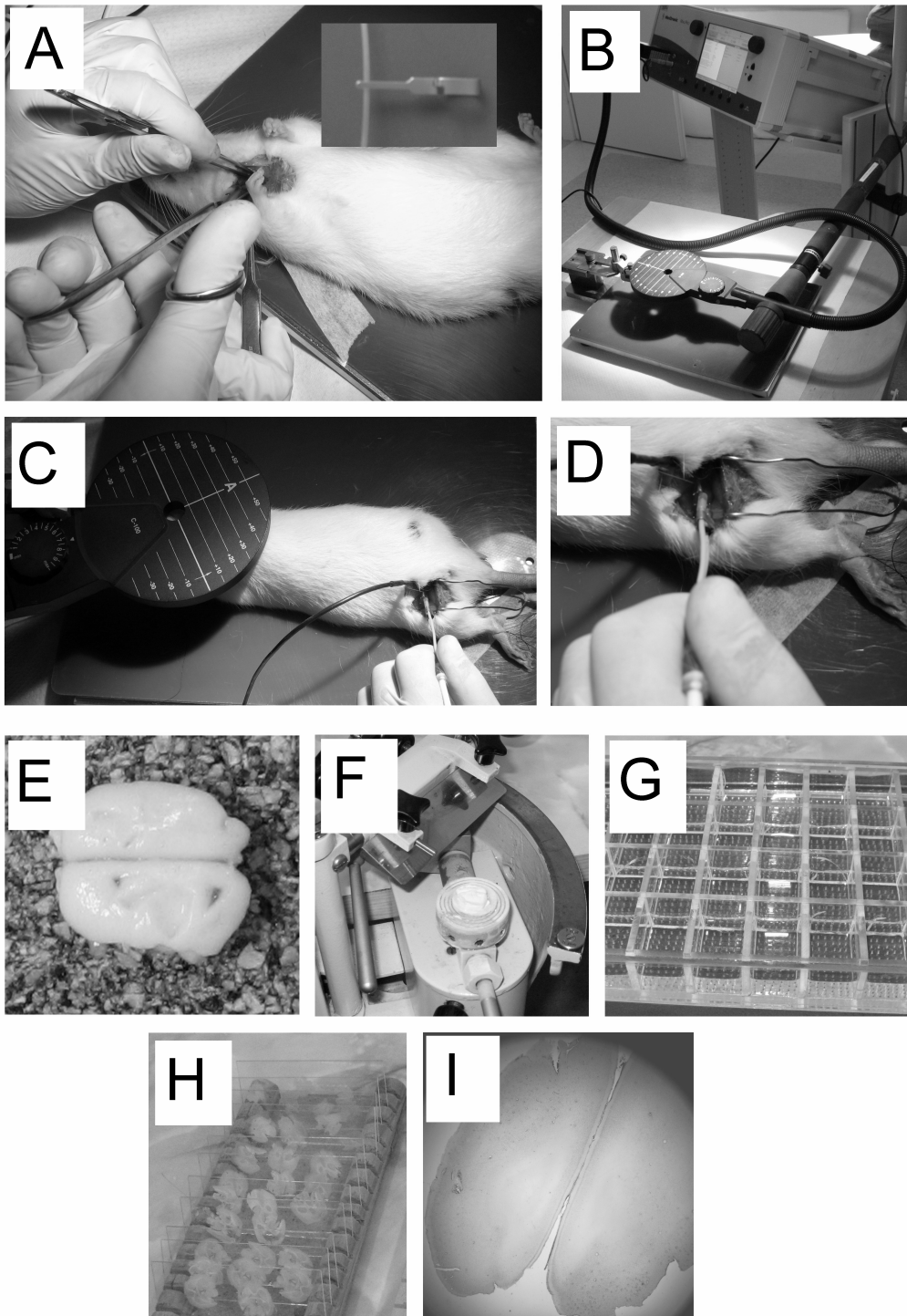
U jednego zwierzęcia w badaniu pilotażowym nie wykonałam ani rejestracji MEP lub zabiegów mających wywołać niedokrwienie w mózgowiu, aby stwierdzić czy sam zabieg stymulacji magnetycznej TMS nie wywołuje zmian naczyniowych w tkance mózgowej. U tego szczura wykonałam wyłącznie badania histologiczne weryfikujące prawidłowe struktury mózgowia.

### **3.2 Metodyka pracy**

Wszystkie zwierzęta znieczulałam dootrzewnowo ketaminą (Ketanest, Park-Davis) w dawce 90mg/kg masy ciała. Zwierzęta były znieczulone po około 25 minutach i ten stan utrzymywał się przez około dwie godziny. Aby zapobiec aspiracji śliny do dróg oddechowych zwierzęta premedykowano siarczanem atropiny w dawce 0.05mg/kg. Dawka znieczulenia była uzupełniana w miarę potrzeby. Poziom znieczulenia był sprawdzany przez kontrolę odruchu źrenicowego.

U każdego z 42 zwierząt grup A-D przeprowadzałam pomiary temperatury oraz badałam parametry rejestracji MEP. U 3 zwierząt dokonałam prób pomiaru ciśnienia żylnego (w zdrowego zwierzęcia powinno to wynosić od 90 do 120mHg). W tym celu dokonałam wenesekcję żyły szyjnej, w której umieszczałam cienką rurkę polietylenową mającą umożliwić pomiar ciśnienia żylnego. Wenflon podłączyłam trójnikiem do ciśnieniomierza oraz do wyjścia pomy infuzyjnej, z której starano się podawać śladowe ilości roztworu dwuwęglanu sodowego w 5% roztworze glukozy. Jednakże, jak wynika z moich obserwacji, ta metoda pomiaru ciśnienia jest możliwa jedynie u szczurów o ciężarze powyżej 450g, natomiast zwierzęta na których dla celów tej pracy przeprowadzone były badania były o połowę lżejsze. U wszystkich 3 zwierząt naczynia żyłne się zapadały, a wenflon szybko zawierał duże ilości skrzepów. Stąd też u pozostałych zwierząt eksperymentalnych zaniechałam pomiaru ciśnienia żylnego. W większości przypadków pomiar ciśnienia stosuje się w badaniach neurofizjologicznych tam, gdzie drobne jego zmiany w wymienionym wyżej zakresie nie mają znaczenia, natomiast stają się czynnikiem istotnym w badaniu zjawisk niedokrwienia.



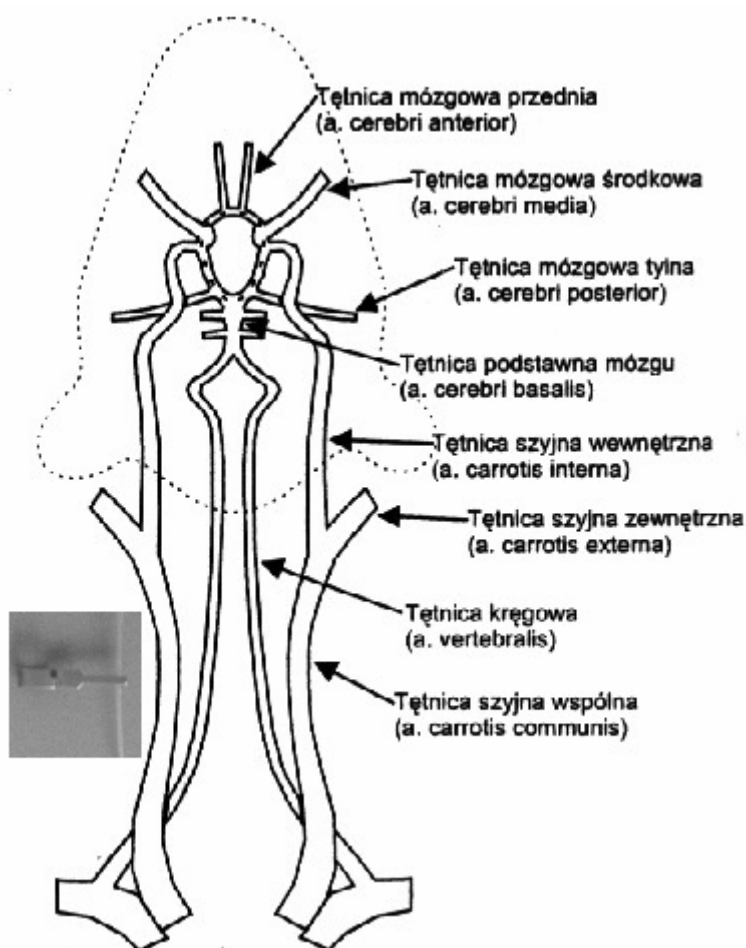


Rycina 3. Kolejne etapy przygotowania zwierzęcia oraz przeprowadzenia badań jak i fotografie stanowiska badawczego i wykorzystywanej aparatury. A-wypreparowanie tętnicy szyjnej wspólnej, pokazano mikrofotografie klipsu do zamknięcia tętnicy. B-aparat stereotaktyczny do unieruchomienia głowy zwierzęcia po znieczuleniu oraz widok głowicy stymulacyjnego pola magnetycznego połączonej z generatorem MagPro. C-widok głowicy stymulującej pola magnetycznego oraz wypreparowanego nerwu kulszowego. D-widok bipolarnych elektrod rejestrujących z zamontowanym nerwem kulszowym. E- widok mózgowia szczura po wypreparowaniu, F-mikrotom mroźniowy z zamontowanym mózgowiem, z którego wykonywano skrawki poprzeczne, G-naczynie z komórkami dzielącymi skrojone skrawki histologiczne podzielone ze względu na głębokość cięcia, H-skrawki mózgowia nałożone na szkiełka podstawowe, przykryte szkiełkami nakrywkowymi, I-przykładowa fotografia przekroju poprzecznego mózgowia w obrazie mikroskopu świetlnego.

Oprócz trudności manipulacyjnych, tego rodzaju zabiegi istotnie wpływają na zmianę ciśnienia tętniczego, a próba podawania roztworów fizjologicznych tą drogą jest elementem terapii udarowej, której nie planowałam w niniejszej pracy.

W kolejnym etapie przygotowania zwierząt umieszczałam je na grzbiecie, po czym usuwałam sierść z okolicy szyi i prawej kończyny tylnej po stronie grzbietowej. Miejsca te odkażałam 70 % alkoholem etylowym.

Dalej wypreparowałam tętnicę szyjną wspólną, w zależności od badanej grupy zwierząt była to tętnica prawa lub obie (rycina 3A i 4).



Rycina 4. Główne unaczynienie mózgowe szczura (zmodyfikowane za [114]). Fotografia po lewej obrazuje klips wykorzystany do okluzji tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie.

W trakcie preparacji, po przecięciu skóry uwidoczniamy powierzchnię mięśnia szerokiego szyi, który rozdzielamy wzdłuż przebiegu włókien. Rozpoznajemy brzeg przedni mięśnia mostkowo-obojczykowo-sutkowego i nacinały powięź powierzchowną bezpośrednio ku przodowi, do brzegu przedniego tego mięśnia. Warstwę powierzchowną przecina się wzdłuż przedniego brzegu mięśnia mostkowo-obojczykowo-sutkowego. Rozdzielenie warstwy powięzi pozwala na odsunięcie mięśnia mostkowo-obojczykowo-

sutkowego bocznie i oddzielenie go od leżących pod nim mięśni. Z kolei otwieramy przestrzeń pomiędzy mięśniem mostkowo-obojęczykowo-sutkowym a mięśniami podgnykowymi przykrywającymi krtań, tchawicę i tarczycę.

Preparujemy następną warstwę, czyli blaszkę przedtchawiczą powięzi szyi. Mięsień łopatkowo-gnykowy, tworzący boczne ograniczenie blaszki przedtchawiczej, niejednokrotnie biegnie poprzez pole operacyjne i wymaga delikatnego odsunięcia lub przecięcia. Po tym wyłania się pochewka naczyń szyjnych, która zawiera tętnicę szyjną wspólną, żyłę szyjną wewnętrzną oraz nerw błędny (rycina 4).

### **3.2.1 Metodyka wywołania udaru niedokrwiennego**

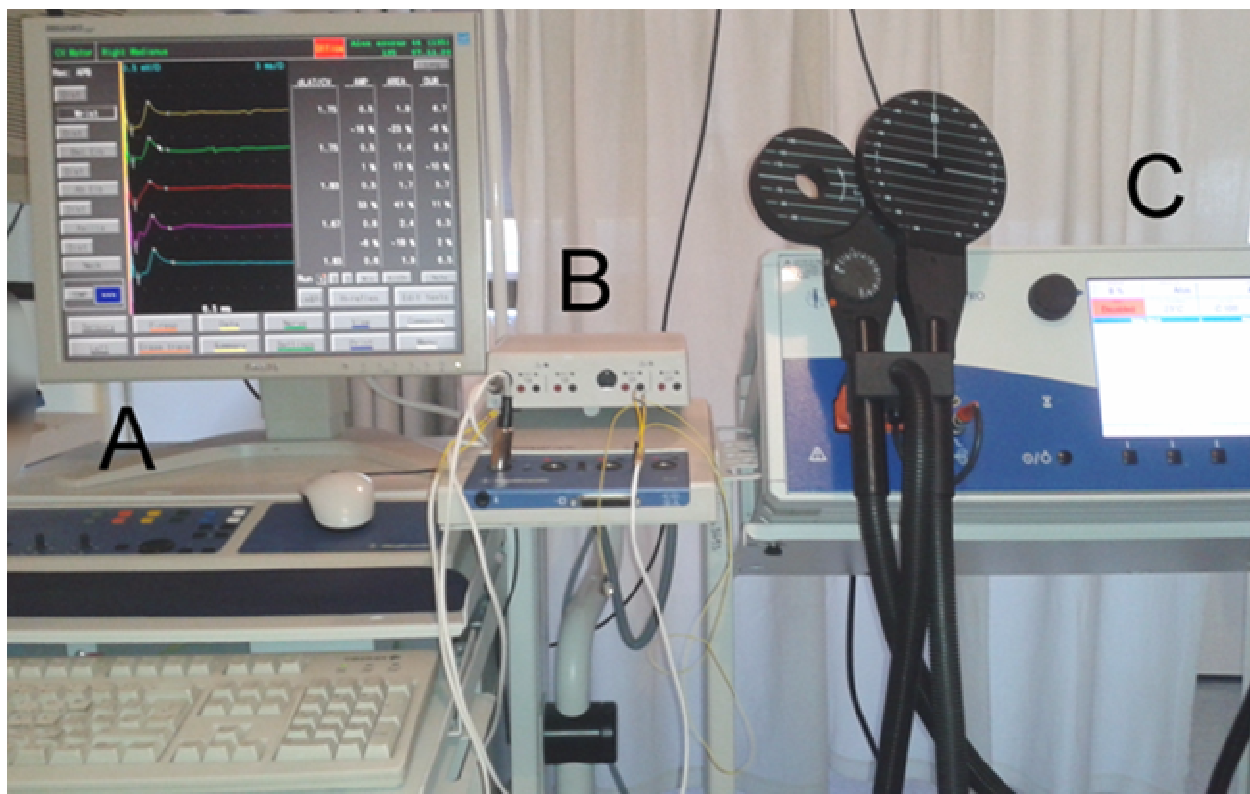
Po umieszczeniu zwierzęcia na brzuchu, jego głowę zamocowałam w aparacie stereotaktycznym oraz ułożyłam cewkę indukującą pole magnetyczne nadczaszkowo nad punktem stymulacji (rycina 3B). Dokonywałam wypreparowania nerwu kulszowego opisanego w *podrozdziale 3.2.3* (rycina 3C). Wypreparowane tętnice zaciskałam klipsem jedno- lub obustronnie w zależności od grupy badanych zwierząt (ryciny 2 i 4). W grupach A i B zamknięcie światła tętnic trwało 10 minut. W tym czasie, co minutę dokonywałam pomiaru parametrów rejestracji MEP oraz temperatury. U zwierząt grup C i D po 5 minutach okluzji, wykonywałam zdjęcie klipsa w celu ponownego udrożnienia przepływu tętnic, kolejno jedno- lub obustronnie (rycina 2). W tym czasie również, co minutę dokonywałam pomiaru parametrów rejestracji MEP oraz temperatury.

### **3.2.2 Badanie temperatury**

U wszystkich zwierząt temperaturę mierzyłam przed zaciśnięciem tętnicy szyjnej wspólnej jak i po jej zaciśnięciu i rozluźnieniu. W grupach A i B odczytów dokonywałam co minutę przez okres 10 minut, natomiast w grupach C i D temperatura była mierzona co minutę po zaciśnięciu tętnicy lub tętnic szyjnych przez okres 5 minut, a następnie co minutę przez kolejnych 5 minut po ich udrożnieniu w wariantach jedno- lub obustronnym. Temperatura była mierzona termometrem doustnie aplikowanym w postaci sondy. Sonda była podłączona do aparatu Keypoint, elektroniczny odczyt temperatury był widoczny na monitorze komputera systemu diagnostycznego.

### 3.2.3 Badanie ruchowych potencjałów wywołanych

W celu ustalenia zmian w przewodnictwie eferentnym szlaku korowo-rdzeniowego głównie bocznego do n. kulszowego prawego, wykonałam badania przezczaszkowej stymulacji magnetycznej (MEP) wzorując się metodycznie na opisie Kamidy i współpracowników (63).



Rycina 5. Zestaw aparaturowy wykorzystywany do badań opisywanych w pracy. A-zintegrowany system diagnostyczny KeyPoint firmy Medtronic, B-głowica jednostki rejestrującej potencjały wywołane z zestawem elektrod, C-aparat MagPro firmy Medtronic służący do stymulacji magnetycznej z zestawem cewek oraz generatorem.

Po ułożeniu zwierząt na brzuchu, wykonywałam nacięcie skóry po stronie prawej nad grzebieniem kości biodrowej i z tego dojścia odsłoniłam n. kulszowy prawy (rycina 3C). Po wypreparowaniu n. kulszowego prawego przed jego rozdzieleniem na gałęzie n. piszczelowego i n. strzałkowego, umieszczałam go na bipolarnej, chlorkowo-srebrowej elektrodzie odbiorczej, w której biegun dodatni zorientowany był bliżej ośrodka ruchowego a ujemny dystalnie. Odstęp pomiędzy biegunami elektrody rejestrującej wynosił 3-4 mm. Elektrode uziemiającą wkłuwałam w mięsień w bezpośredniej bliskości elektrod

rejestrujących. Cały zestaw w/w elektrod podłączałam do przedwzmacniacza rejestratora (rycina 5B).

Badania neurofizjologiczne wykonywałam przy użyciu zintegrowanego systemu diagnostycznego KeyPoint (Medtronic A/S, Skovlunde, Denmark) (rycina 5A), skonfigurowanego z aparatem do stymulacji magnetycznej MagPro R30 (Medtronic) (rycina 5C). Wszystkie rejestracje MEP wykonywałam były przy ustawieniach filtra dolnoprzepustowego 0.5Hz, a filtra górnoprzepustowego 2kHz w aparacie KeyPoint, przy podstawie czasu 5ms/D a wzmacnieniu od 0.5 do 2mV/D. Testy były przeprowadzane w tym samym pomieszczeniu, w temperaturze 21-23 °C.

Przeszczaszkową stymulację magnetyczną TSM wykonywałam cewką magnetyczną okrągłą o średnicy 10 cm (rycina 5C) umieszczoną nadczaszkowo nad korą ruchową szczura (rycina 3C). Zgodnie z opisami Hovey i Jalinous (57), cewka o średnicy od 10-14 cm indukuje największą siłę pola magnetycznego 660 V/m w zakresie od 2,2 do 2,7T. Siłę stymulacji magnetycznej określałam w wartości procentowej maksymalnego wyrzutu, przy czym w większości przypadków badanych zwierząt, siła ta zawierała się w zakresie od 30 do 70% (92). Stymulowałam zawsze półkulę prawą w obszarze kory ruchowej z ośrodkami unerwienia mięśni kończyny tylnej. Stymulowałam stroną B cewki, aczkolwiek w mojej obserwacji w badaniach u szczurów, rodzaj orientacji strony cewki nie ma większego wpływu na morfologię potencjałów MEP. W trakcie stymulacji przezczaszkowej, wykonywałam wstępne "mapowanie" kory ruchowej, polegające na przemieszczaniu cewki podczas stymulacji pojedynczymi bodźcami o wartości 40% w małym obszarze 4mm dogłowo i bocznie, w 1mm zmianach lokalizacji zgodnie z opisem Kamida i współpracowników (63). Szukałam docelowo potencjału o największej amplitudzie (nie mniejszej niż 50 $\mu$ V) i najkrótszym czasie trwania. Umożliwiło to znalezienie „gorącego obszaru” dla unerwienia mięśni kończyn tylnych gdyż zakładano, że przy rejestracji z nerwu kulszowego oszacowuje się przewodnictwo eferentne od poziomu neuronów początkowych drogi piramidowej bocznej do mięśni kończyn dolnych (99). Zgodnie z opisami metodycznymi Chen i współpracowników (23) częstotliwość stymulacji powinna wynosić 1Hz, aby nie zmieniać morfologii krótkolatencyjnego potencjału MEP, co ma miejsce przy wyższej częstotliwości, w związku ze zmianą pobudliwości neuronów pierwotnej kory ruchowej.

W pierwszej kolejności stymulację magnetyczną i rejestracje potencjałów MEP oraz pomiary temperatury wykonywałam przed zaciśnięciem tętnicy szyjnej wspólnej i te dane traktowałam jako wartości referencyjne (kontrolne) w każdej z grup zwierząt (tabela I).

Analizowanymi parametrami MEP były amplituda, mierzona  $\mu\text{V}$  od wychylenia ujemnego do dodatniego potencjału oraz jego latencja mierzona w ms, będąca czasem od momentu zadziałania impulsu magnetycznego do momentu rejestracji odpowiedzi wywołanej z n. kulszowego. Ogólnie zasady rejestracji MEP przyjąłem za standardami wymienionymi w pracy Ferreira i współpracowników (39), a cała metodyka badania była bardzo zbliżona do tej, którą opisywali Nielsen i współpracownicy (81), oraz Linden i współpracownicy (70). Jednakże rejestracje MEP Nielsen i współpracowników (81) dotyczyły odprowadzeń wewnątrzkomórkowych lub z mięśni kończyn górnych. Tego rodzaju zabiegi wymagają głębokiego znieczulenia, co implikuje problem obniżonego przewodnictwa synaptycznego w tym na poziomie płytki nerwowo-mięśniowej. Dlatego w mojej pracy zastosowałam odprowadzenie bezpośrednio z nerwu. Przewodnictwo eferentne drogi korowo-rdzeniowej jak i na poziomie ośrodka rdzeniowego i obwodowo przy takim odprowadzeniu jest małym stopniu zależne od wpływu poziomu znieczulenia (ketamina/ksylazyna) (132).

### **3.2.4 Badania histologiczne**

Po zakończeniu doświadczeń, zwierzętom podawałam dootrzewnowo ketaminę w dawce kilkakrotnie przekraczającej letalną. Następnie wykonywałam totalną kraniotomię i pobierałam mózgi do badań histopatologicznych (rycina 3E).

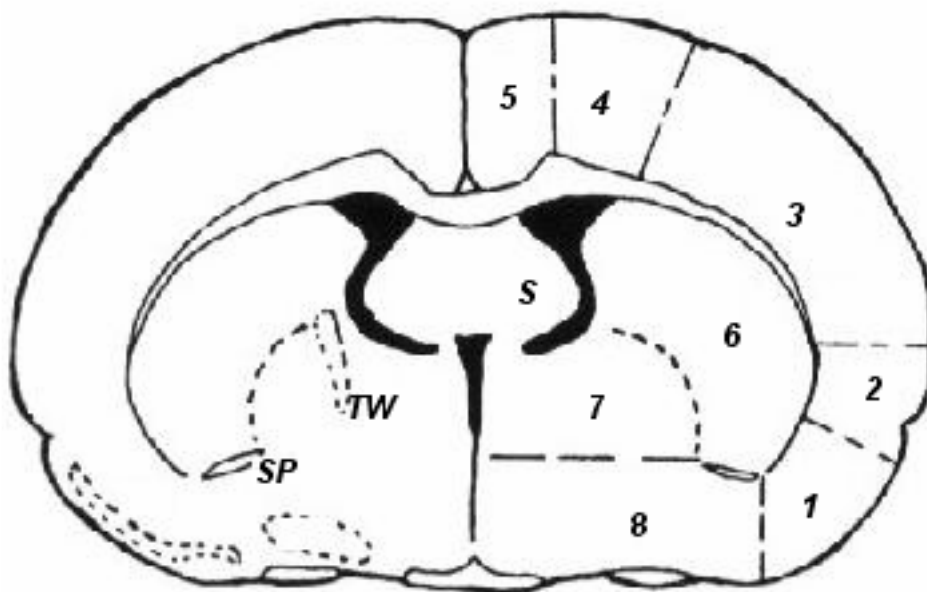
Wykonanie trwałego preparatu histologicznego jest procesem, na który składa się szereg czynności prowadzących do trwałego zachowania struktury tkanki najbardziej odpowiadającej stanowi prawidłowemu również w zakresie unaczynienia (8, 18, 133). Mózgi przechowywałam w 30% roztworze formaliny przez okres jednego miesiąca. Skrawki (przekroje poprzeczne) o grubości  $90\mu\text{m}$  były wykonane przy pomocy mikrotomu mroźniowego z wykorzystaniem  $\text{CO}_2$  (rycina 3F). Wykonano cięcia od punktu bregma do poziomów kolejno -2mm, -3.1mm, -4.1mm, -5.1 mm. Skrawki te kolekcjonowałam je do specjalnych pojemników z wodą destylowaną (rycina 3G) w celu zachowania kolejności skrawiania, a następnie umieszczałam przy użyciu pędzelka na szkiełkach podstawowych rycina (rycina 3H).

Po wyschnięciu preparatów przeprowadzałam je przez szeregi histologiczne i zamykałam w DPX po nałożeniu szkiełek nakrywkowych.

Szereg histologiczny w barwieniu hematoksyliną i eaozyną był następujący:

- umieszczenie preparatu w szklanych płuczkach i przepłukanie wodą destylowaną,
- barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E) przez 3-5 minut,

- jednokrotne przepłukanie wodą destylowaną,
- przeprowadzenie preparatu przez szereg roztworów alkoholi o wzrastającym stężeniu (30%, 70%, 90%, 100% I, 100% II w celu odwodnienia,
- przeprowadzenie przez roztwory: alkohol + ksylen, w stosunku 1:1- roztwór pośredni
- przeprowadzenie przez ksylen I, ksylen II - prześwietlenie
- zamykanie, czyli umieszczanie kropli DPX (płyn konserwujący) na mokrym preparacie i nakładanie na nie szkiełka nakrywkowego
- preparaty wysychają przez kilka dni, potem umieszcza się je w skrzynkach oraz przechowuje w lodówce bądź zamrażarce.



Rycina 6. Schemat anatomicznych obszarów kory nowej oraz obszarów jądra ogoniastego i skorupy jądra soczewkowatego na przekroju czołowym na poziomie spoidła przedniego mózgu, w odniesieniu do których dokonano opisu lokalizacji artefaktów utożsamianych z następstwami wywołania udaru niedokrwinnego. Objasnienia: 1-obszar kory gruszkowatej, 2-obszar wyspy, 3-obszar kory ciemieniowej, 4-obszar kończyny przedniej i tylnej, 5-obszar kory czołowej i zakrętu, 6-obszar skorupy i jądra ogoniastego, 7-obszar gałki bladej, 8-obszar kory przedwzrokowej przyśrodkowej i bocznej, TW-torebka wewnętrzna, S-sklepienie komory trzeciej, SP-spoidło przednie [zmodyfikowane za (43)].

Weryfikacji histologicznej otrzymanego materiału po wykonaniu procedur barwienia dokonywałam w obrazie mikroskopu świetlnego (powiększenie 5x i 10x) po zakończeniu doświadczeń u 49 szczurów. U większości zwierząt z wywołanym niedokrwieniem, zmiany w tkance mózgowej są albo wynikiem zmian nekrotycznych na skutek bezpośredniego niedokrwienia lub artefaktów w postaci ubytków tkanki nerwowej będących następstwem pęknięć drobnych naczyń. Lokalizację zmian, które w obrazie mikroskopowym uznałam za

wynik niedokrwienia nanosiłam na plany w płaszczyźnie poprzecznej według Paxinosa i Watsona (88) oraz w płaszczyźnie czołowej według Pellegrino i współpracowników (89). Obliczałam największą koncentrację zmian w określonych obszarach mózgowia, a ich lokalizację opisałam według schematu Garcia i współpracowników (43) (rycina 6).

### **3.2.5 Metody analizy statystycznej**

Otrzymane wyniki zostały poddane analizie przy pomocy programu STATISTICA v. 9.1 firmy StatSoft. Cechy ilościowe takie jak amplituda, latencja i temperatura rejestrowane u każdego ze zwierząt w grupach A-D w każdej minucie badania zostały opisane przez podanie wartości średniej, mediany, minimum, maksimum i odchylenia standardowego (SD). Rejestracje potencjałów MEP oraz pomiary temperatury wykonane przed zaciśnięciem tętnicy szyjnej wspólnej były traktowane jako wartości referencyjne (kontrolne) w każdej z grup zwierząt (tabela I).

Ze względu na brak normalności rozkładu, do weryfikacji hipotez statystycznych zastosowane zostały testy nieparametryczne. Różnice pomiędzy dwoma grupami były weryfikowane testem Manna-Whitneya. Różnice pomiędzy wynikami przed badaniem a wynikami w kolejnych minutach badania weryfikowane były testem Wilcoxon. Różnicowanie odpowiednich wyników w czterech grupach weryfikowane było testem Kruskala-Wallisa i wielokrotnymi porównaniami średnich rang. Do oceny współzależności pomiędzy amplitudą i latencją wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana.

Jako istotne statystycznie przyjęte zostały wyniki testów, w których poziom istotności był  $p \leq 0.05$ .

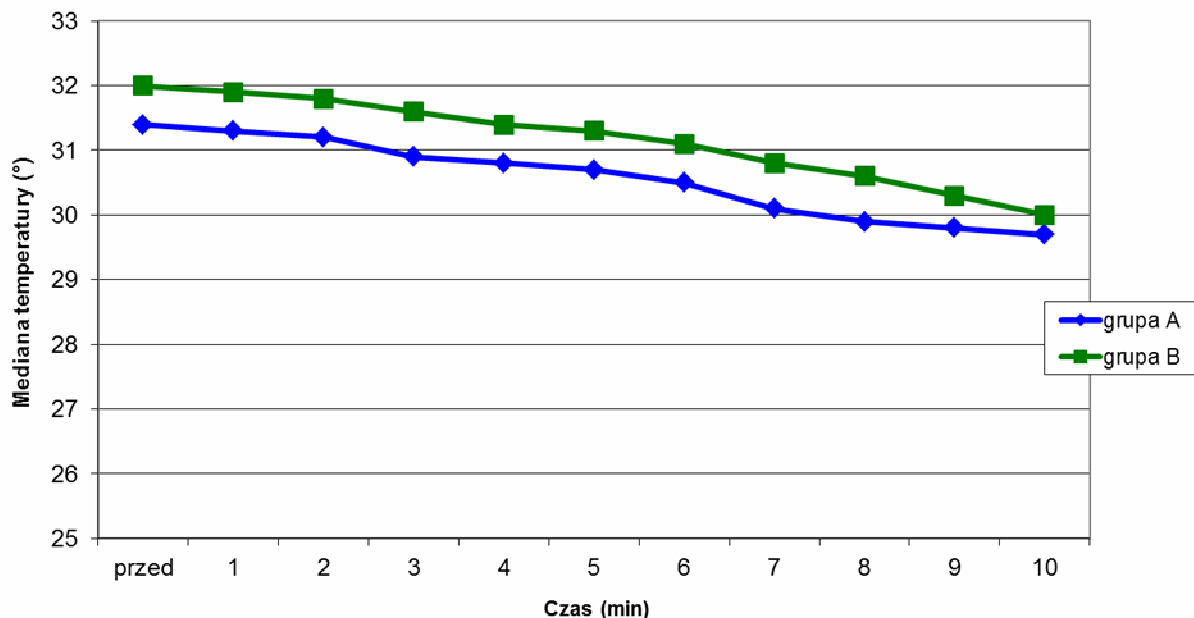


#### 4. Wyniki badań

Zestawienie wszystkich analizowanych parametrów rejestracji MEP i temperatury na kolejnych etapach obserwacji w czterech grupach zwierząt zaprezentowałam w tabeli I. W poniższych *podrozdziałach 4.1 i 4.2* przeanalizowałam ich zmienność na wykresach.

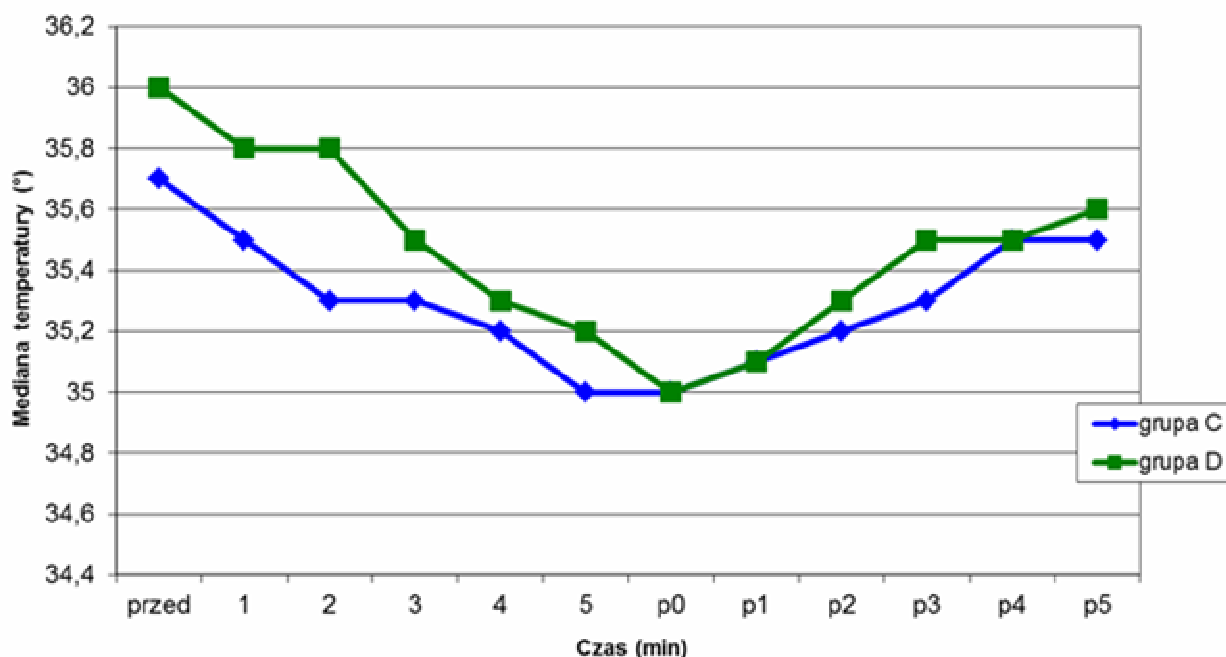
##### 4.1 Wyniki badań temperatury przed i po wywołaniu udaru niedokrwiennego w poszczególnych grupach zwierząt

Jak widać na wykresie w rycinie 7, przebieg zmienności temperatury w dwóch najliczniejszych grupach zwierząt (grupy A i B), u których dokonano permanentnej okluzji kolejno jedno- lub obustronnej bez ponownego udrożnienia naczyń ma bardzo podobny przebieg. Świadczy to o podobnym mechanizmie działania dwóch rodzajów okluzji na zmianę temperatury organizmu. W obu przypadkach zaobserwowałam obniżenie o około 2°C (w zakresie od 32°C do 29,5°C), przebiegające równomiernie do 10 minuty obserwacji. Jednakże jak wynika z zestawienia wartości normatywnych (kontrola) tego parametru przed wykonaniem niedokrwienia zaprezentowanych w tabeli I, powyższa zmiana nie była istotnie odmienna od parametrów fizjologicznych.



Rycina 7. Zmienność temperatury rejestrowanej u szczurów z grup A i B na poszczególnych etapach obserwacji. Zmienność pokazano na podstawie parametru mediany.

Zupełnie inny model zmienności parametru temperatury można zaobserwować na rycinie 8, pokazującej wyniki uzyskane u zwierząt grup C i D, gdzie po 5 minutach jedno- lub obustronnego zamknięcia przepływu tętnic, nastąpiło ich ponowne udrożnienie. Okluzja spowodowała, podobnie jak u zwierząt grup A i B, spadek parametru temperatury o około 1,5-2.0°C, a przywrócenie przepływu jedno- lub obustronnie - wzrost temperatury do wartości normalatywnej (kontrola) (patrz tabela I). Można stwierdzić, że udrożnienie tętnic wywołuje całkowitą kompensację badanego parametru w 10 minucie całkowitej obserwacji.



Rycina 8. Zmienność temperatury rejestrowanej u szczurów z grupy C i D na poszczególnych etapach obserwacji. Zmienność pokazano na podstawie parametru mediany.

#### 4.2 Wyniki badań ruchowych potencjałów wywołanych przed i po wywołaniu udaru niedokrwinnego w poszczególnych grupach zwierząt

Przebieg zmienności parametru bardziej amplitudy aniżeli latencji rejestrowanych potencjałów MEP u dwóch zwierząt grup (A i D) o skrajnie odmiennym przebiegu doświadczenia (okluzja jednostronna tętnicy bez udrożnienia i okluzja obustronna tętnicy z ponownym udrożnieniem) pokazuje rycina 9. W przypadku tylko zamknięcia światła tętnicy szyjnej prawej obserwowałam niewielki spadek amplitudy do 5 minuty obserwacji, kompensację w 5 i 6 minucie, oraz w 10 minucie doświadczenia stałą wartość amplitudy, stanowiącą 48% wartości wyjściowej (rycina 9A). U szczura z obustronną okluzją i ponownym udrożnieniem tętnic, zaobserwowałam wyłącznie spadek amplitudy potencjału MEP do 40% wartości wyjściowej w 10 minucie obserwacji (rycina 9B).

Tabela 1. Zestawienie zakresów, wartości średnich oraz odchylenia standardowego badanych parametrów amplitudy i latencji ruchowych potencjałów wywołanych jak i temperatury w poszczególnych grupach zwierząt na poszczególnych etapach obserwacji.

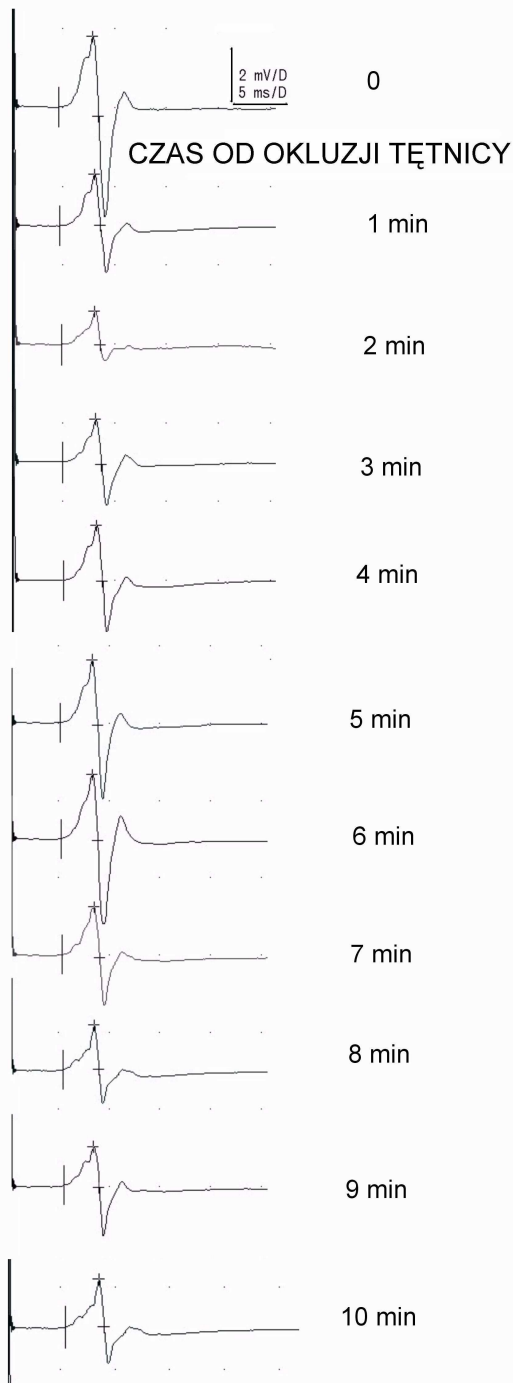
		Czas trwania niedokrwienia po zaciśnięciu tętnicy szyjnej (min.)											
Grupa doświadczalna	Parametr	Wartość referencyjna*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		N=19											
<b>Amplituda (<math>\mu</math>V, % wartości średniej)</b>													
<b>A</b> <b>N=19</b>	min.-max.	0,5-17,0	0,4-17,0	0,3-8,0	0,4-8,0	0,2-16,0	0-10,0	0-16,0	0-16,0	0-16,0	0-18,0	0-11,0	
	średnia $\pm$ SD (100%)	5,0 $\pm$ 4,4 (68,3%)	3,8 $\pm$ 4,4 (81,3%)	3,3 $\pm$ 2,1 (59,4%)	2,6 $\pm$ 2,1 (70,7%)	3,1 $\pm$ 3,5 (70,9%)	3,1 $\pm$ 2,5 (67,3%)	3,1 $\pm$ 4,1 (72,8%)	3,1 $\pm$ 4,1 (65,8%)	2,8 $\pm$ 4,0 (72,5%)	2,8 $\pm$ 4,6 (62,0%)	1,5 $\pm$ 2,8 (62,0%)	
<b>B</b> <b>N=13</b>	min.-max.	1,2-18,0	0,8-30,0	0-22,0	0-18,0	0-16,0	0-16,0	0-16,0	0-13,0	0-13,0	0-14,0	0-14,0	
	średnia $\pm$ SD (100%)	7,4 $\pm$ 4,2 (84,3%)	7,7 $\pm$ 8,0 (66,2%)	6,0 $\pm$ 6,3 (52,0%)	4,9 $\pm$ 5,2 (58,7%)	4,4 $\pm$ 4,2 (61,3%)	4,7 $\pm$ 4,5 (72,9%)	4,9 $\pm$ 4,7 (55,8%)	3,8 $\pm$ 3,8 (62,9%)	3,9 $\pm$ 3,6 (56,0%)	3,4 $\pm$ 3,6 (61,4%)	3,8 $\pm$ 4,2 (61,4%)	
<b>Czas niedokrwienia po zaciśnięciu tętnicy szyjnej (min.)      Czas niedokrwienia po udrożnieniu tętnicy szyjnej (min.)</b>													
		Wartość referencyjna*	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
		N=19											
<b>C</b>	min.-max.	5,2-15,5	1,8-16,0	2,0-11,5	2,0-16,0	2,0-7,0	1,2-17,0	1,7-9,0	1,4-5,0	1,2-8,0	0,5-6,5	1,6-13,0	0,5-3,5
	średnia $\pm$ SD (100%)	11,14 $\pm$ 3,9 (67,3%)	8,1 $\pm$ 5,4 (39,5%)	4,6 $\pm$ 3,9 (49,8%)	6,0 $\pm$ 5,8 (32,8%)	3,7 $\pm$ 2,0 (42,3%)	5,8 $\pm$ 6,5 (35,3%)	4,1 $\pm$ 2,9 (27,0%)	2,9 $\pm$ 1,4 (31,5%)	3,6 $\pm$ 2,6 (27,1%)	3,0 $\pm$ 2,2 (41,8%)	4,9 $\pm$ 4,7 (16,4%)	1,7 $\pm$ 1,1 (16,4%)
<b>D</b>	min.-max.	2,0-28	1,0-22,0	1,0-16,0	0,1-21,0	0,5-15,0	1,0-11,5	0,4-11,5	0,4-9,5	0,4-8,5	0,8-9,5	0,8-3,0	0,9-11,0
	średnia $\pm$ SD (100%)	13,1 $\pm$ 9,6 (62%)	8,3 $\pm$ 8,4 (51,2%)	6,0 $\pm$ 5,4 (41,5%)	7,3 $\pm$ 7,9 (31,8%)	4,5 $\pm$ 5,0 (35,3%)	4,3 $\pm$ 4,0 (33,2%)	4,3 $\pm$ 4,4 (30%)	3,7 $\pm$ 3,9 (25,7%)	2,7 $\pm$ 2,8 (29,5%)	2,7 $\pm$ 3,1 (24,8%)	1,4 $\pm$ 0,8 (33,5%)	3,0 $\pm$ 3,6 (33,5%)

Czas trwania niedokrwienia po zaciśnięciu tętnicy szyjnej (min.)													
Wartość referencyjna* N=19		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<b>Latencja (ms)</b>													
<b>A</b>	min.-max.	4.6-7.8	4.8-7.9	4.9-8.4	5.0-8.7	5.1-8.8	5.3-8.9	0-8.9	0-9.0	0-9.1	0-9.2	5.8-8.4	
	średnia±SD	6.2±0.85	6.3±0.8	6.4±0.9	6.5±0.9	6.6±0.9	6.7±0.9	6.3±1.9	6.0±2.5	6.1±2.3	6.1±2.7	6.9±0.8	
<b>B</b>	min.-max.	4.8-6.8	4.8-6.9	0-7.0	0-7.1	0-7.3	0-7.5	0-7.8	0-8.0	0-8.2	0-8.3	0-8.4	
	średnia±SD	5.7±0.7	5.8±0.7	5.5±1.8	5.2±2.4	5.3±2.4	5.3±2.5	5.5±2.6	5.5±2.6	5.6±2.6	6.1±2.1	6.2±2.2	
Czas niedokrwienia po zaciśnięciu tętnicy szyjnej (min.)      Czas niedokrwienia po udrożnieniu tętnicy szyjnej (min.)													
Wartość referencyjna*		1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	
<b>C</b>	min.-max.	4.1-5.1	4.8-5.4	4.9-5.5	5.0-5.9	5.1-6.0	5.4-6.3	5.4-6.3	5.3-6.2	5.2-6.2	5.1-6.1	4.8-5.8	4.6-5.2
	średnia±SD	4.7±0.4	5.1±0.3	5.2±0.3	5.4±0.4	5.7±0.4	5.7±0.4	5.7±0.4	5.6±0.4	5.7±0.5	5.4±0.5	5.2±0.4	4.9±0.2
<b>D</b>	min.-max.	5.1-6.7	5.2-6.2	5.3-7.0	5.4-6.1	5.5-7.2	5.6-7.2	5.6-7.1	5.5-6.9	5.4-6.7	5.3-6.2	5.2-6.2	5.0-6.2
	średnia±SD	5.6±0.7	5.7±0.4	5.9±0.6	6.1±0.6	6.3±0.6	6.4±0.6	6.3±0.5	6.2±0.5	6.1±0.5	5.9±0.4	5.9±0.4	5.6±0.5

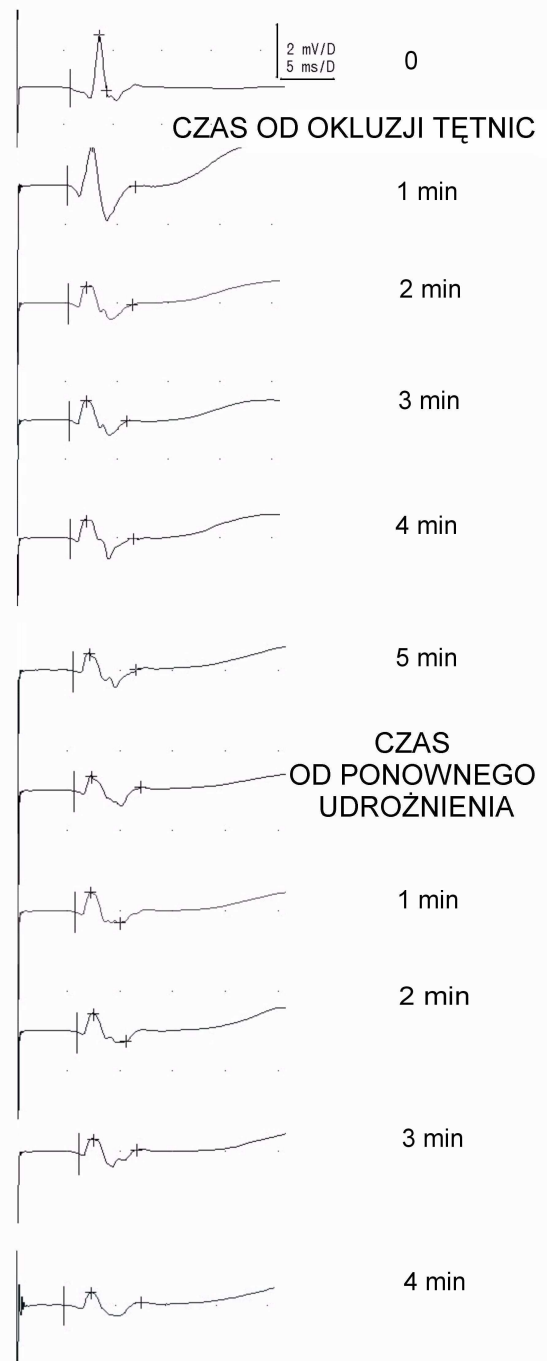
		Czas trwania niedokrwienia po zaciśnięciu tętnicy szyjnej (min.)											
		Wartość referencyjna*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		<b>Temperatura (°C)</b>											
<b>A</b>	min.-max.	29.2-33.9	29.1-33.1	28.9-32.9	28.8-32-8	28.7-32.6	28.6-32.4	28.5-32.3	28.4-31-9	28.2-31.8	27.9-31.7	27.8-31.5	
	średnia±SD	31.4±1.4	31.2±1.2	31.1±1.2	30.9±1.2	30.7-1.2	30.6±1.1	30.4±1.2	30.2±1.1	30.0±1.2	29.8±1.3	29.8±1.3	
<b>B</b>	min.-max.	29.5-36.2	29.2-35-7	29.3-35.4	29.1-35.2	28.9-35.1	28.7-34.9	28.6-34.8	28.5-34.7	28.3-34.6	28.2-34.4	27.8-34.2	
	średnia±SD	32.2±2.2	31.9±2.3	31.8±2.2	31.6±2.2	31.5±2.2	31.3±2.2	31.2±2.2	31.0±2.2	30.8±2.2	30.7±2.2	30.5±2.2	
		Czas niedokrwienia po zaciśnięciu tętnicy szyjnej (min.)					Czas niedokrwienia po udrożnieniu tętnicy szyjnej (min.)						
		Wartość referencyjna*	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
<b>C</b>	min.-max.	32.3-37.5	32.1-37.3	31.9-37.2	31.6-37.2	31.3-37.1	31.4-37.0	31.4-37.0	31.5-37.1	31.6-37.2	31.8-37.2	31.9-37.3	31.9-37.4
	średnia±SD	35.3±2.2	35.1±2.2	34.9±2.2	34.8±2.3	34.7±2.4	24.6±2.3	34.6±2.3	34.7±2.3	34.8±2.3	34.9±2.3	35.0±2.3	35.1±2.3
<b>D</b>	min.-max.	35-4-37.4	35.3-37.3	34.8-36.9	34.1-36.8	34.0-36.5	34.1-36.4	34.2-36.5	34.3-36.7	34.4-36.8	34.5-36.9	34.6-37.0	34.7-37.1
	średnia±SD	36.1±0.7	36.0±0.7	35.7±0.7	35.4±1.0	35.1±1.0	35.1±0.9	35.1±0.9	35.2±0.9	35.3±0.9	35.5±0.9	35.6±0.9	35.7±0.9

Objaśnienia: A-D-grupy zwierząt doświadczalnych z następującymi wariantami procedur eksperymentalnych; 1-10-kolejne minuty obserwacji, 0- moment udrożnienia tętnicy szyjnej u zwierząt grup C i D; \*parametry uzyskane przed zabiegiem niedokrwienia (kontrola)

## A OKLUZJA TĘTNICY SZYJNEJ PRAWEJ

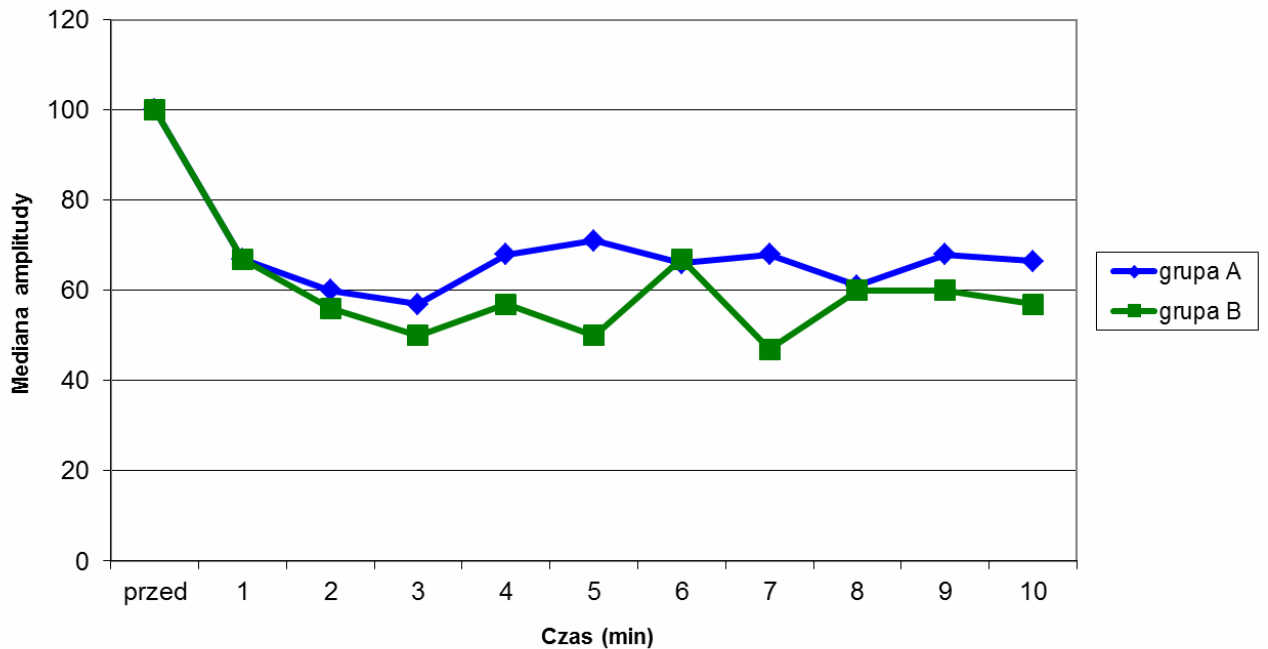


## B OKLUZJA TĘTNIC SZYJNYCH OBUSTRONNIE I PONOWNE UDROŹNIENIE



Rycina 9. Przykłady rejestracji ruchowych potencjałów wywołanych rejestrowanych u jednego ze zwierząt w następstwie okluzji tętnicy szyjnej prawej (A-grupa A) z czasem obserwacji zmian do 10 minut oraz u jednego ze zwierząt z obustronną okluzją tętnic i ponownym udrożnieniem (B-grupa D). Zwraca uwagę spadek parametru amplitudy oraz jej wyrównanie w przykładzie A przy odmiennej sekwencji zmian (wyłącznie spadek amplitudy) pokazanych w przykładzie B.

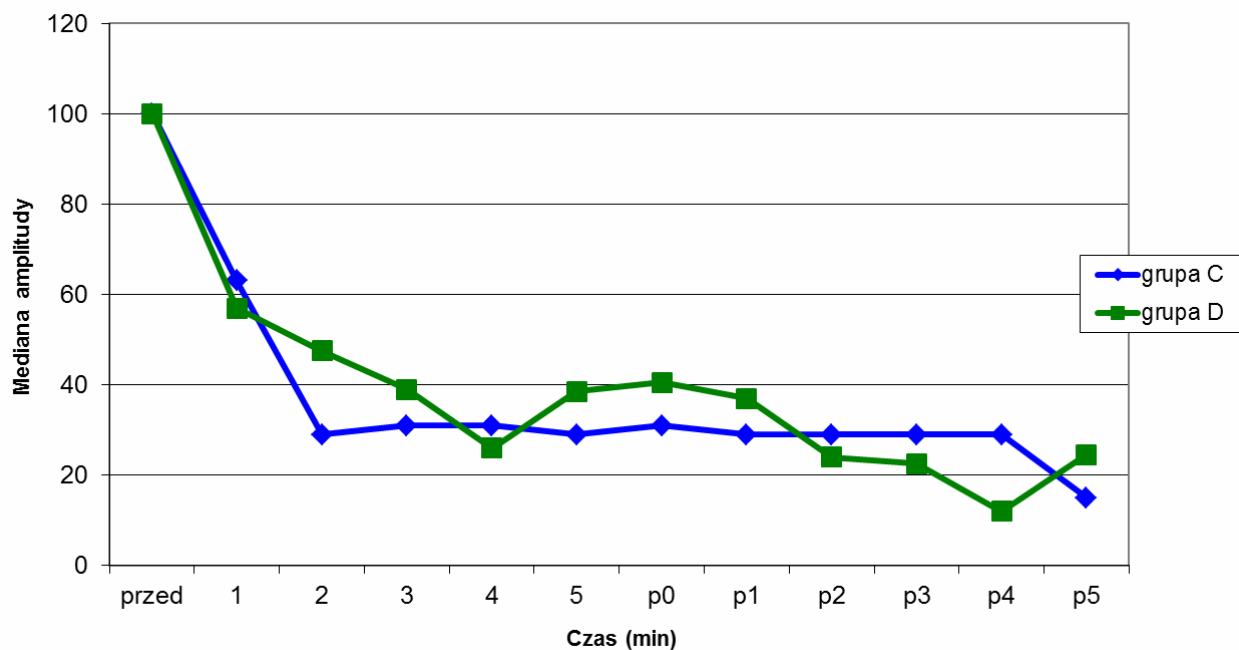
Przemawia to za wyraźnym wpływem obustronnej niedrożności tętnic szyjnych na stan czynnościowy przewodnictwa eferentnego badanej drogi korowo-rdzeniowej, który jednak nie wywołuje całkowitego zaniku aktywności aż do 10 minuty po incydencie udarowym.



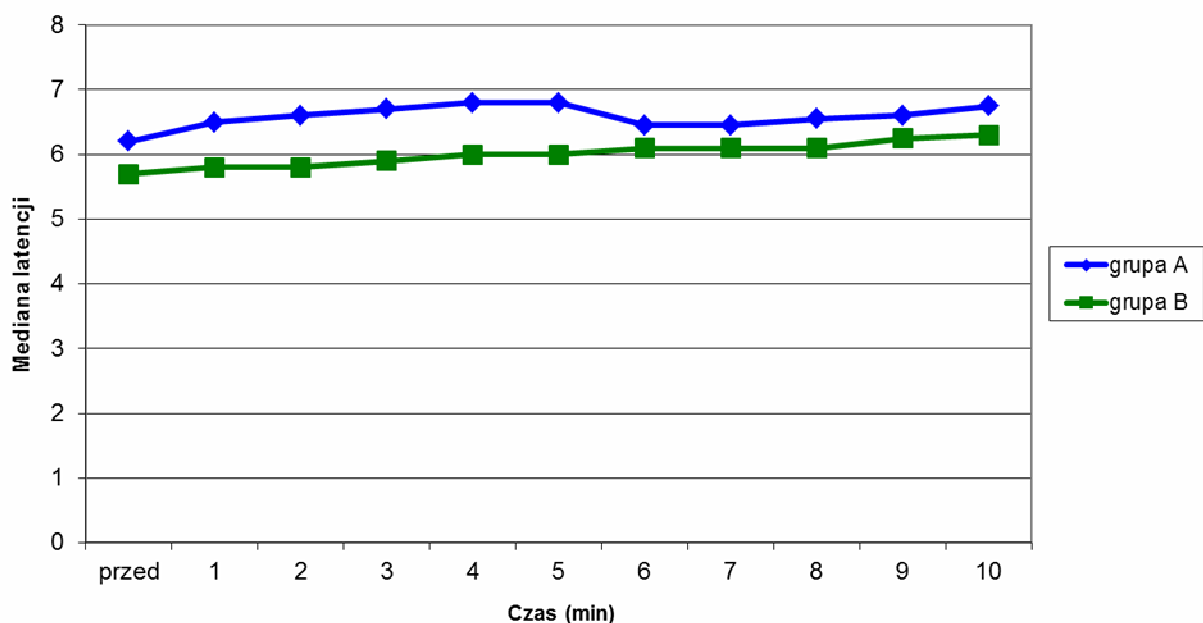
Rycina 10. Procentowe ujęcie wartości mediany amplitudy MEP w grupach A i B w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie.

Jak wynika z danych w tabeli I oraz wykresu na rycinie 10, przebieg zmienności parametru amplitudy MEP w ujęciu procentowym u zwierząt z grup A jak i B był podobny. Odnotowałam jego spadek do około 60% wartości wyjściowej w 2 minucie obserwacji oraz jego niezmiennosc aż do zakończenia doświadczenia. Ten parametru ulegał nieco większym fluktuacjom u zwierząt z grupy B w porównaniu do badanych z grupy A, ale zmiany te były nieistotne statystycznie (*podrozdział 4.4*).

Analizując dane z tabeli I oraz wykres na rycinie 11 mogłam stwierdzić, że okluzja tętnic szyjnych jedno- i obustronnie z ich ponownym udrożnieniem, wywoływała większe zmiany w przewodnictwie drogi korowo-rdzeniowej w drugiej minucie obserwacji, aniżeli u zwierząt grup A i B (patrz rycina 10). Parametr amplitudy u szczurów z grup C i D w rejestracjach MEP ulegał obniżeniu do około 40% wartości wyjściowej. Co więcej, nie obserwowałam zjawiska kompensacji tego parametru po 5 minucie doświadczenia, jak w przypadku zwierząt grup A i B.



Rycina 11. Procentowe ujęcie wartości mediana amplitudy MEP w grupach C i D w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie i ich ponownym udrożnieniu.

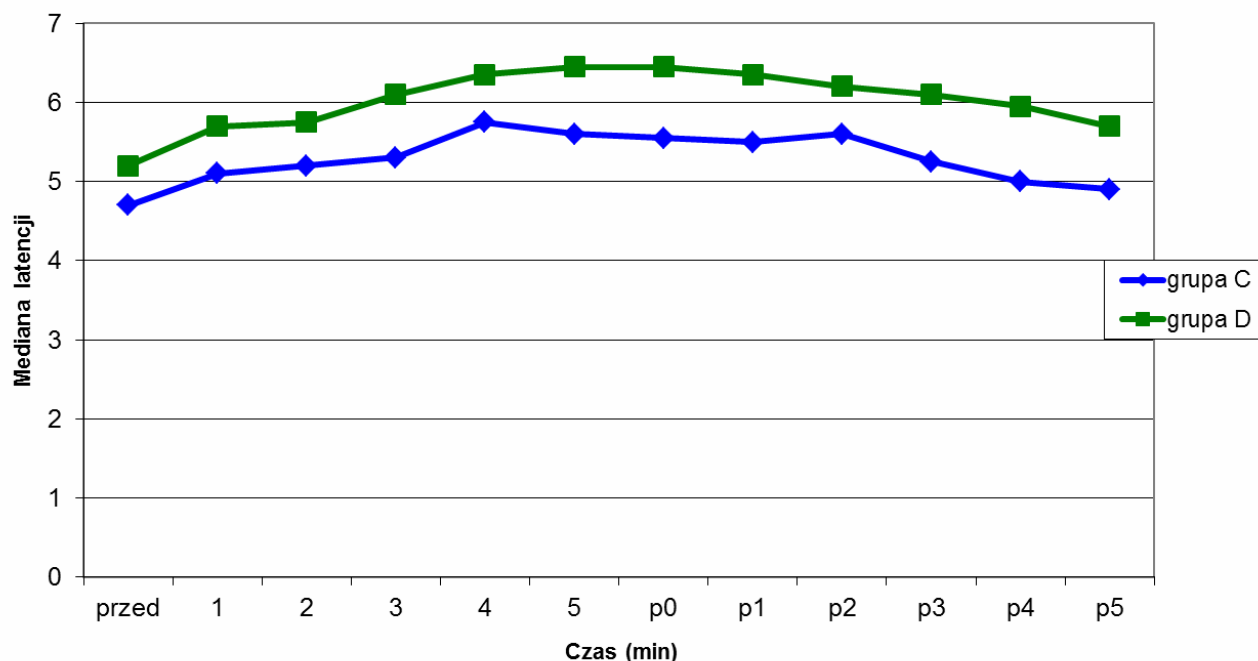


Rycina 12. Wartości mediana latencji MEP w grupach A i B w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie.

Jak wynika z danych w tabeli I oraz wykresów na rycinach 12 i 13, wartość parametru latencji potencjałów MEP rejestrowana u zwierząt grup A-D na kolejnych etapach obserwacji jest podobna i zawiera się w zakresie od 4.8 do 6.3ms. Dane przedstawione w *podrozdziale*



4.4 wskazują, że różnice tego parametru rejestrowane przed wywołaniem niedokrwienia oraz na kolejnych etapach obserwacji, w tym po ponownym udrożnieniu tętnic, są nieistotne statystycznie.

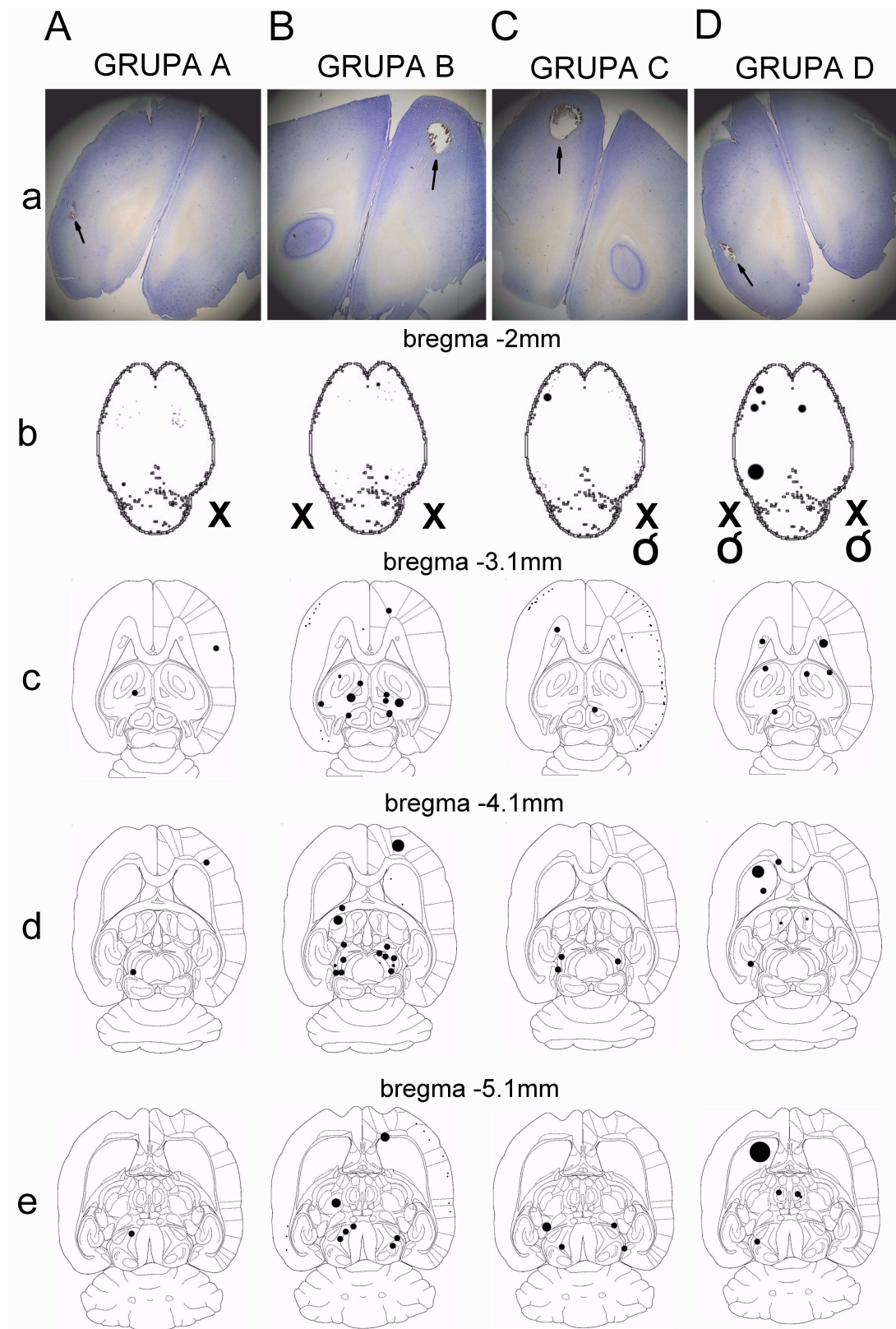


Rycina 13. Wartości mediany latencji MEP w grupach C i D w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie i ich ponownym udrożnieniu.

Ogólnie morfologia rejestrowanych przeze mnie potencjałów MEP przed wykonaniem procedur niedokrwienia, jest zgodna z obrazem składowych N1 i N2 potencjałów opisywanych przez Shao (107) przy rejestracjach odprowadzanych z nerwu. Wartości amplitud zawierały się w zakresach od 0,5 do 28mV, a latencji od 4.1 do 7.8ms (tabela I). Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że parametr amplitudy MEP jest czulszym w monitorowaniu przewodnictwa drogi korowo-rdzeniowej od parametru latencji i zmienności temperatury w obserwacji przebiegu skutków niedokrwienia.

#### 4.3 Wyniki badań histologicznych w poszczególnych grupach zwierząt

Na rycinie 14 pokazałam wyniki badań histologicznych z zaznaczeniem lokalizacji miejsc, w których obrazie mikroskopowym stwierdzono obecność lezji będących skutkami wywołania niedokrwienia. Z kolei w tabeli II dokonałam zestawienia miejsc występowania lezji na poszczególnych poziomach tkanki mózgowej w poszczególnych grupach badawczych zwierząt.



Rycina 14. Wyniki badań histologicznych z zaznaczeniem lokalizacji miejsc, w których w obrazie mikroskopowym stwierdzono obecność lezji będących skutkami wywołania niedokrwienia. Przykładowe obrazy mikroskopowe z zaznaczonymi strzałkami miejscami lezji w czterech grupach badanych zwierząt (**A-D**) u których wykonywano różny wariant niedokrwienia, pokazano w części **a** ryciny. W przykładach poniżej pokazano lokalizację lezji o różnym stopniu nasilenia, którą na schematach przekrojów poprzecznych mózgowia zaznaczono kółkami o różnej średnicy. W **b** pokazano przekroje na poziomach -2 mm od punktu bregma, w **c** -3,1 mm, w **d** -4,1 mm, w **e** -5,1 mm.

Tabela II. Zestawienie miejsc występowania lezji na poszczególnych poziomach tkanki mózgowej w poszczególnych grupach badawczych zwierząt (0-brak zmiany, 1-występowanie zmiany), na podstawie analizy w obrazie jasnego pola skrawków histologicznych wybarwionych H+E.

Strona badanego przekroju		P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L
Grupa	Typ zabiegu/poziom lezji	1 mm	1 mm	2 mm	2 mm	3,1 mm	3,1 mm	4,1 mm	4,1 mm	5,1 mm	5,1 mm	6,1 mm	6,1 mm
A	Zaciśnięta 1 tętnica szyjna (zawsze prawa)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
B	Zaciśnięte 2 tętnice szyjne	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	Zaciśnięta 1 tętnica szyjna i ponownie udrożniona (zawsze prawa)	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D	Zaciśnięte 2 tętnice szyjne i ponownie udrożnione	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Z tabeli II oraz oznaczeń na rycinie 14 wynika, że największą ilość lezji będących skutkiem niedokrwienia na wszystkich badanych poziomach mózgowia od punktu bregma zaobserwowałam u zwierząt z grup B i D, u których dokonałam obustronnej okluzji tętnic, również z wariantem przywrócenia ich drożności. U zwierząt z modelem niedokrwienia w postaci zamknięcia prawej tętnicy szyjnej wspólnej (A i C), artefakty były mniej liczne. Biorąc pod uwagę przyjęty schemat lokalizacji obszarów z następstwami wywołania niedokrwienia pokazany na rycinie 6 oraz dane zawarte w tabeli II odnośnie poziomu występowania lezji na poszczególnych poziomach tkanki mózgowej mogę stwierdzić, iż u zwierząt grup B i D były one najczęściej obecne jednostronnie w obszarze unerwienia czuciowego i ruchowego kończyny głównie przedniej aniżeli tylnej kory mózgu, obszarze skorupy i jądra ogoniastego obustronnie, obszarze gałki bladej obustronnie oraz obszarze przyległym do sklepienia komory trzeciej obustronnie. Należy nadmienić, że tego rodzaju zmiany obrazują skutki niedokrwienia krótkotrwałego, w krótkim okresie obserwacji. Tym niemniej są one strukturalnie w ścisłej relacji do zmian czynnościowych w przewodnictwie drogi korowo-rdzeniowej, gdzie zmiany parametru amplitud MEP były również najczęściej odnotowane i najwyraźniej zaznaczone u badanych zwierząt grup B i D.

Podobnie jak w pracy Mathew i współpracowników (76), wykorzystując barwienie skrawków mózgowia metodą H+E określiłam następstwa udaru w tkance mózgowej jako wyraźne ubytki struktury lub puste obszary z wybarwionymi krawędziami, będące głównie skutkiem pęknięcia naczyń. Nie zaobserwowałam oznak krwawienia w obszarach lezji. Znaczące zmiany nekrotyczne w neuronach można obserwować dopiero po 24 godzinach przeżycia zwierząt po wywołaniu udaru (76), co nie miało miejsca w przedstawionej pracy.

#### 4.4 Zależności pomiędzy badanymi parametrami ruchowych potencjałów wywołanych i temperatury w poszczególnych grupach zwierząt

W tabeli III zaprezentowano wyniki porównania parametrów amplitud i latencji MEP rejestrowanych w dwóch najliczniejszych grupach zwierząt A i B przed i po wykonaniu okluzji jedno- lub obustronnej tętnic szyjnych. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w zmienności parametru bardziej amplitudy aniżeli latencji (incydentalnie) na kolejnych etapach obserwacji. Dane te potwierdzają opisy przebiegu zmienności tych parametrów pokazane na rycinach 10 i 12 i omówione w *podrozdziale 4.2*.

Tabela III. Porównanie parametrów amplitud i latencji rejestracji MEP przed zaciśnięciem tętnic szyjnych z wartościami tych samych parametrów na kolejnych etapach obserwacji po dokonaniu wyłącznie okluzji jednostronnie (grupa A zwierząt) lub obustronnie (grupa B zwierząt). Przedstawiono poziomy istotności statystycznej w teście Wilcozona.

Porównanie wartości parametru przed okluzją z wartością po okluzji	Grupa A		Grupa B	
	amplituda	latencja	amplituda	latencja
1 minuta	<0,001*	<0,001*	0,209	0,008*
2 minuta	0,064	<0,001*	0,013*	0,050*
3 minuta	<0,001*	<0,001*	0,003*	0,209
4 minuta	0,001*	<0,001*	0,003*	0,209
5 minuta	0,008*	<0,001*	0,006*	0,209
6 minuta	0,021*	0,007*	0,050*	0,209
7 minuta	0,013*	0,056	0,006*	0,209
8 minuta	0,015*	0,056	0,007*	0,209
9 minuta	0,038*	0,078	0,013*	0,050*
10 minuta	0,036*	0,005*	0,023*	0,050*

Dane zaprezentowane w tabeli IV wskazują na brak istotnych statystycznie różnic w zmienności parametrów amplitudy i latencji w rejestracjach MEP oraz temperatury pomiędzy grupami zwierząt, u których wykonano jednostronne i obustronne zaciśnięcie tętnic.

Tabela IV. Porównanie parametrów rejestracji MEP oraz temperatury w najliczniejszych grupach A i B badanych zwierząt testem Manna-Whitneya na kolejnych etapach obserwacji.

Czas obserwacji vs. parametr	p – poziom istotności różnicy		
	amplituda	latencja	temperatura
Przed niedokrwieniem	1,000	0,161	0,594
1 minuta po niedokrwieniu	0,744	0,116	0,522
2 minuta po niedokrwieniu	0,539	0,068	0,522
3 minuta po niedokrwieniu	0,618	0,099	0,522
4 minuta po niedokrwieniu	0,399	0,099	0,500
5 minuta po niedokrwieniu	0,561	0,109	0,500
6 minuta po niedokrwieniu	0,728	0,263	0,500
7 minuta po niedokrwieniu	0,247	0,443	0,500
8 minuta po niedokrwieniu	1,000	0,417	0,512
9 minuta po niedokrwieniu	0,293	0,696	0,563
10 minuta po niedokrwieniu	0,967	0,429	0,767

Tabela V przedstawia wyniki korelacji parametru amplitudy i latencji z rejestracji MEP wykonanych w grupach A i B na kolejnych etapach obserwacji. Wyniki badań testu rang Spearmana wskazują, że wystąpiły istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi parametrami na końcowym etapie obserwacji w grupie zwierząt A (kiedy wykonano okluzję tętnicy prawej) oraz w 2 minucie obserwacji (kiedy zostały zaciśnięte tętnice szyjne obustronnie) w grupie zwierząt B. W tych przypadkach wskaźnik  $r_s$  wskazuje, iż są to korelacje dodatnie, to znaczy spadkowi parametru amplitudy towarzyszy nieznaczne wydłużenie latencji. Są to jednak przypadki incydentalne, które nie wskazują na uogólnienie występowania takiego zjawiska w modelach niedokrwienia.

Tabela V. Zestawienie współczynników korelacji rang Spearmana ( $r_s$ ) i ich poziomy istotności ( $p$ ) pomiędzy amplitudą a latencją w rejestracjach MEP przeprowadzonych w grupach zwierząt A i B (najliczniejszych).

Czas trwania niedokrwienia w minutach	Grupa A zwierząt		Grupa B zwierząt	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
1	0,339	0,156	0,484	0,094
2	0,194	0,427	0,618*	0,024*
3	0,413	0,079	0,488	0,090
4	-0,037	0,881	0,312	0,299
5	-0,149	0,569	0,380	0,200
6	0,181	0,519	0,119	0,712
7	0,183	0,532	-0,004	0,991
8	0,231	0,427	0,055	0,873
9	0,629*	0,038*	0,060	0,861
10	-0,393	0,383	0,259	0,443

W tabeli VI zaprezentowałam wyniki testu Kruskala-Wallisa porównań wielokrotnych dla parametrów rejestracji MEP i temperatury pomiędzy poszczególnymi grupami badanych zwierząt na kolejnych etapach obserwacji. W badaniach na zwierzętach należących do grup z różnymi wariantami okluzji tętnic szyjnych jedno- lub obustronnie, nie stwierdziłam żadnych istotnie statystycznych różnic w zmienności parametru amplitudy, a zmiana parametru latencji miała charakter incydentalny. Może to przemawiać za różnego rodzaju efektem zastosowanych wariantów wywołania niedokrwienia w mózgowiu na przewodnictwo eferentne drogi korowo-rdzeniowej. Największą zmienność parametru temperatury stwierdziłam w trakcie pomiarów przeprowadzonych u zwierząt w grupach B i D, to znaczy w przypadkach, kiedy wykonywałam warianty samej obustronnej okluzji tętnic oraz okluzji z ponownym udrożnieniem. Wskazuje to na największy wpływ totalnego niedokrwienia mózgowia po okluzji tętnic obustronnie na spadek temperatury ciała zwierząt.

Tabela VI. Wyniki testu Kruskala-Wallisa porównań wielokrotnych dla parametrów rejestracji MEP i temperatury pomiędzy poszczególnymi grupami badanych zwierząt na kolejnych etapach obserwacji. Gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie na poziomie  $p \leq 0.005$ . Test Kruskala-Wallisa jest nieparametrycznym odpowiednikiem analizy ANOVA i weryfikuje różnicowanie pomiędzy grupami, a porównania wielokrotne są nieparametrycznymi odpowiednikami testów post-hoc.

Analizowane parametry w kolejnych minutach doświadczenia	p testu Kruskala-Willisa	Porównania wielokrotne			
		A ↔ B	C ↔ D	A ↔ C	B ↔ D
Amplituda					
Po 1 min.	0,829	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 2 min.	0,183	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 3 min.	0,545	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 4 min.	0,013*	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 5 min.	0,120	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 6 min. / po 1 min.	0,026*	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 7 min. / po 2 min.	0,018*	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 8 min. / po 3 min.	0,041*	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 9 min. / po 4 min.	0,084	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 10 min. / po 5 min.	0,057	ni.	ni.	ni.	ni.
Latencja (ms)					
Po 1 min.	0,022*	ni.	ni.	0,022*	ni.
Po 2 min.	0,030*	ni.	ni.	0,035*	ni.
Po 3 min.	0,064	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 4 min.	0,113	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 5 min.	0,135	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 6 min./ po 1 min.	0,187	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 7 min./ po 2 min.	0,347	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 8 min./ po 3 min.	0,125	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 9 min./ po 4 min.	0,051	ni.	ni.	ni.	ni.
Po 10 min./ po 5 min.	0,004*	ni.	ni.	0,007*	ni.
Temperatura (°C)					
Po 1 min.	0,001*	ni.	ni.	ni.	0,017*
Po 2 min.	0,001*	ni.	ni.	ni.	0,018*
Po 3 min.	0,001*	ni.	ni.	ni.	0,017*
Po 4 min.	0,001*	ni.	ni.	ni.	0,021*
Po 5 min.	0,001*	ni.	ni.	ni.	0,018*
Po 6 min./ po 1 min.	0,001*	ni.	ni.	0,041*	0,017*
Po 7 min./ po 2 min.	0,001*	ni.	ni.	0,041*	0,016*
Po 8 min./ po 3 min.	0,001*	ni.	ni.	0,039*	0,011*
Po 9 min./ po 4 min.	<0,001*	ni.	ni.	0,038*	0,008*
Po 10 min./ po 5 min.	0,001*	ni.	ni.	ni.	0,006*

Legenda: W grupach zwierząt C i D wyniki w kolejnych etapach obserwacji po ponownym udrożnieniu tętnic szyjnych były porównywane z wynikami ich okluzji w grupach zwierząt A i B w minutach od 6 do 10.

## 5. Dyskusja

W moich wstępnych badaniach nad wpływem stymulacji magnetycznej na strukturę mózgowia u szczura i ewentualne zmiany w jego ukrwieniu, nie stwierdziłam w obrazie skrawków histologicznych żadnych odchyleń od stanu prawidłowego (*podrozdział 3.1*). Podobnie Conter (25), za pomocą między innymi barwienia H+E zbadał struktury korowe i podkorowe w następstwie przeczaszkowej stymulacji 1000 impulsów pola magnetycznego z maksymalną siłą stymulacji 2T przez 12 miesięcy u szczurów. W badaniach histologicznych nie wykrył żadnych zmian w organizacji komórek ani innych śladów uszkodzenia. Doszedł do wniosku, że stymulacja magnetyczna o niskiej częstotliwości nie wpływa w żaden sposób na strukturę mózgu. Stad wątpliwym jest, aby zmiany które zaobserwowałam w mózgowiu szczurów poddanych niedokrwieniu, były wynikiem przeczaszkowej stymulacji polem magnetycznym.

Większość autorów innych doniesień badających skutki udaru u zwierząt, w badaniach histopatologicznych wykorzystywało barwienie H+E w celu pokazania obszarów niedokrwienych, nie wnikając w szczegółową analizę zmian na poziomie pojedynczych komórek (76). Najczęściej opisywali oni zmiany, jako przebarwienia struktury lub lezje będące skutkiem pęknięcia małych naczyń, podobnie jak w przypadku obserwacji opisywanych w mojej pracy (116). Barwienie H+E jest wciąż popularne w weryfikacji zmian struktur mózgowia w warunkach eksperymentalnych różnych modeli udaru niedokrwienego, jako metoda niedroga i rzetelna (109).

Nagasawa i Kogure (79) oszacowywali ilościowo artefakty zgodnie z ilością komórek, przebarwień i ubytków tkanki mózgowej po barwieniu metodą H+E, najczęściej w obszarach kory nowej przedniej po zaciśnięciu tętnic szyjnych. Ta lokalizacja ściśle pokrywa się z moimi obserwacjami po weryfikacji histologicznej mózgow u zwierząt grup B i D (*podrozdział 4.3*). Wojak i współpracownicy (128) wywołali udar niedokrwienny u szczura po okluzji tętnicy podstawnej mózgu i obserwowali zmiany w preparatach histopatologicznych barwionych metodą H+E w obrębie komórek pnia mózgu. Ta lokalizacja potwierdza również potwierdza moje obserwacje odnośnie niewielkich zmian na poziomach mózgowia od -3mm do -4mm w stosunku do punktu bregma.

Nasuwa się również pytanie, w jaki sposób poziom znieczulenia mógł wpłynąć na parametry rejestrowanych przeze mnie potencjałów MEP. Stosowałam znieczulenie ketaminą, która wywołuje średni stopień znieczulenia, jak również stosowany przeze mnie rodzaj



odprowadzenia potencjałów z nerwu a nie mięśnia kończyny tylnej, pomija problem zmian w przewodnictwie na poziomie synapsy nerwowo-mięśniowej. Zandieh i współpracownicy (132) wykazali, że morfologia MEP nie podlega dużym zmianom, gdy stosowana jest narkoza o średnim lub słabym poziomie znieczulenia, na przykład ketaminą lub ksylazyną. Średni stopień znieczulenia określałam poprzez reakcję źrenic i w miarę konieczności uzupełniałam dawkę środka znieczulającego podczas przeprowadzania zabiegów. Badania Schwedlera i współpracowników wykazały (104), że u spontanicznie oddychających zwierząt po podaniu dożylnym ketaminy w ilości  $5\text{mg/kg}^{-1}$ , ciśnienie śródczaszkowe wzrosło o około  $6\text{mmHg}$  a więc należy przyjąć, że mimo dobrego efektu znieczulenia nie wpływa ona znacząco na morfologię MEP. Ketamina natomiast nie jest dobrym środkiem do znieczulenia w badaniach eksperymentalnych, kiedy monitoruje się ciśnienie krwi. Należy także spodziewać się, że podawanie dootrzewnowo ketaminy wywiera podobny wpływ na parametry MEP, co aplikacja żylna opisywana przez nadmienionych autorów.

Opisywany w mojej pracy model niedokrwienia opiera się o technikę okluzji tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie, co jest oryginalnym podejściem, rzadko dotąd opisywanym przez innych autorów. Garcia (42) uważa, że podwiązanie tętnic szyjnych nie wywołuje znaczących zmian w krążeniu mózgowym u większości zwierząt eksperymentalnych jak i u ludzi, który to pogląd podziela Kety (64). Jednakże późniejsze badania wykazały, że to podejście w modelu udaru niedokrwienego jest równie istotne jak i wywołanie go po przez okluzję tętnicy środkowej mózgu z uwagi na częstość powodu udaru z taką lokalizacją, znaczącą w populacji chorych po udarach, a więc wartą bliższego zbadania. Można założyć, że wykorzystany obecnie przeze mnie model udaru niedokrwienego, w literaturze określany jest jako „niecałkowite niedokrwienie mózgu” (51). U zwierząt łatwo jest wywołać globalny udar po bezpośredniej okluzji tętnicy środkowej mózgu. Wielu badaczy zastanawia się jednak (129), czy sam zabieg zamknięcia tej tętnicy z dojścia szyjnego nie jest bardziej urazowy aniżeli same skutki udaru. Dotychczasowe prace wykorzystują najczęściej model udaru oparty o okluzję tętnicy środkowej mózgu w celu wywołania zjawiska całkowitego niedokrwienia (79) i badano wówczas związki pomiędzy przepływem krwi w mózgu a totalnymi zmianami histopatologicznymi w tkance mózgowej. Zabieg dojścia do tętnic podstawnych mózgowia dokonuje się również z dojścia brzuszego (60) i wówczas jatrogeny wpływ dużych zmian naczyniowych jest nieodłącznym atrybutem tej metody wywołania udaru niedokrwienego.

Udar, jak wykazano w badaniach Braeuninger i współpracowników (15) ma odmienny przebieg u osobników płci męskiej i żeńskiej. W mojej pracy wykorzystałam do badań wyłącznie szczury płci męskiej. Dzięki jednolitej grupie przebieg procesu niedokrwienia był podobny u wszystkich badanych zwierząt, co zaprezentowałam w wynikach opisywanych w *podrozdziale 4.4*.

Wyniki badań temperatury uzyskane w mojej pracy, świadczą mimo wszystko o małej przydatności tego parametru w monitorowaniu skutków udaru (*podrozdział 4.1*). Są one zbliżone do obserwacji Busto i współpracowników (19) które wykazały, że temperatura u szczurów po wywołaniu udaru zwykle wynosi 33°C, ponieważ zapobiega to znacznym zmianom w tkance nerwowej i taki mechanizm może mieć charakter neuroprotekcyny.

W świetle przedstawionych powyżej danych literaturowych nie do końca zgodnych z moimi obserwacjami mogę stwierdzić, że weryfikacja wyników badań MEP na opisywanym modelu udaru może dostarczyć interesujących danych odnośnie krytycznego czasu niedrożności tętnic szyjnych, wpływającego znacząco na czynność neuronów kory ruchowej i przewodnictwa eferentnego szlaków korowo-rdzeniowych. Z przeprowadzanych badań wynika, że czasowe zamknięcie tętnicy szyjnej jednostronnie nawet przez okres 10 minut nie prowadzi do nieodwracalnych zmian w czynności neuronu ruchowego na poziomie kory mózgu, gdzie po okresie spadku amplitudy potencjału rejestrowanego z nerwu kończyny dolnej (po około 2 minutach) obserwuje się jej wzrost do wartości porównywalnej przed wystąpieniem incydentu niedokrwienego. Obustronna okluzja tętnic na poziomie szyjnym z ponownym ich udrożnieniem nie dłuższa niż 5 minut, również nie prowadzi do nieodwracalnych zmian w czynności neuronów kory ruchowej. Biorąc pod uwagę różnego typu wywołanie udaru niedokrwienego, zaciśnięcie tętnicy szyjnej zewnętrznej powinno wywołać skutek bardziej ogniskowego niedokrwienia aniżeli uogólnionego, przeważająco zgodnościowo do wywołania zjawiska. Powyższe dane również udowadniają, że okres niedokrwienia około 4 minut wymieniany przez wielu autorów (6) nie jest całkowicie tragicznych w skutkach dla pobudliwości neuronów kory ruchowej. Zmiana w unaczynieniu mózgowia zostaje prawdopodobnie skompensowana przez mechanizm wyrównania ciśnienia tętniczego poprzez anastomozy. Seitz i współpracownicy wykazali (106), że kompensacja skutków niedokrwienia lub ogólne zmiany w przepływie tętniczym krwi w mózgu realizowane są właśnie przez anastomozy i mikroanastomozy występujące pomiędzy arteriami, które rozszerzając się niwelując w ten sposób zaburzenia przepływu krwi. Zjawisko to wydaje się być jednym z mechanizmów zabezpieczających, umożliwiających reorganizację w obiegu mózgowym u człowieka w następstwie niedokrwienia mózgu, wywołanego zmianą

ciśnienia tętniczego. Potwierdzeniem tego zjawiska jest całkowicie odmienny przebieg udaru towarzyszącego okluzji tętnic szyjnych obustronnie, w którym zaobserwowałam gwałtowny spadek amplitudy MEP, bez możliwości wtórnej kompensacji ukrwienia po obustronnym udrożnieniu tętnic szyjnych w okresie 5 minut. Amplitudy rejestrowane w tych przypadkach, były zawsze znacząco obniżone przez cały czas trwania zastosowanego modelu niedokrwienia i ich wartości stanowiły około 40% wartości wyjściowej. W świetle wyników obecnej pracy, opisy Sugawara i współpracowników (115) wydają się być prawdziwe, biorąc pod uwagę aktywność neuronów po ponownym ukrwieniu.

Odrębne zagadnienia do dyskusji stanowią parametry potencjałów MEP rejestrowanych przeze mnie przed wywołaniem niedokrwienia. Zileli i Schramm (136), badając reakcje przewodnictwa eferentnego na uszkodzenie rdzenia u szczurów podali wartości referencyjne rejestrowane z mięśnia prostego uda i pokazali, że najkrótsza latencja wynosiła 6.9ms, podczas gdy w moich badaniach średnia latencja rejestrowana z nerwu kulszowego wynosiła nieco ponad 5.0ms. Należy jednak pamiętać, że różnica ta w rejestracji MEP po stymulacji nadczaszkowej wymaga doliczenia dodatkowego czasu przewodzenia rzędu 0.6-1.2ms, wynikającego z dodatkowego przejścia impulsu na synapsie nerwowo – mięśniowej. Poza tym, odpowiedź MEP rejestrowana z mięśnia może być wyraźnie obciążona artefaktem ruchowym powstającym przy skurczu po pobudzeniu jego jednostek ruchowych, którego wielkość wpływa na wartość latencji lub amplitudy.

Rejestrowany przeze mnie potencjał główny MEP miał, podobnie jak w badaniach Linden i współpracowników (70), podobną amplitudę rzędu od 0.5 do 28mV. Wartość progowa amplitudy potencjału była obserwowana już przy 15% wyrzutu stymulatora, natomiast jego maksymalna wartość została osiągnięta przy 60%. Badania Konard i współpracowników (66) wykazują, że morfologia MEP ulega zmianie bardziej w następstwie zmian patologicznych na poziomie synaptycznym aniżeli wzdłuż aksonów. Stąd należy przyjąć, że spodziewane zmiany po jednostronnym zaciśnięciu tętnicy szyjnej, pokażą bardziej zmiany na poziomie ośrodków nadrženiowych mózgu, aniżeli na poziomie samego rdzenia. Amplitudy MEP rejestrowane w mojej pracy nie różniły się znacząco wartościami w porównaniu z amplitudami odpowiedzi uzyskanymi w pracy Zhang i współpracowników (135) oraz Fishback i współpracowników (40), które wynosiły  $11.47\text{mV} \pm 5.25\text{mV}$ . W odróżnieniu od innych badaczy Kakinohana i współpracownicy (61) są przekonani, że potencjał MEP jest wyrazem sumy przewodnictwa impulsów przewodzonych przez szlak

korowo-rdzeniowy w obrębie zakrętu przyśrodkowego, neurony ruchowe rdzenia oraz struktur złącza nerwowo- mięśniowego.

Dotychczas skutki niedokrwienia wynikające z niedrożności tętnic rdzeniowych w różnych modelach na zwierzętach opisywano w odniesieniu do czynności ośrodków rdzenia z wykorzystaniem metody SEP (107). Natomiast uważa się, że metoda MEP jest bardziej przydatna w monitorowaniu przewodnictwa eferentnego szlaków korowo-rdzeniowych nie tylko w obrębie samej kory mózgu, ale również w ośrodkach podkorowych zwłaszcza, gdy niedokrwienie jest tam głównie zlokalizowane (120). Rejestracje MEP przeprowadzone w badaniach klinicznych u chorych z udarem krwotocznym mózgu z mięśnia odwodziciela krótkiego kciuka po obustronnej stymulacji kory ruchowej wyodrębniły cztery ich grupy: chorych z brakiem rejestracji MEP, chorych gdzie potencjał było można wywołać tylko po stronie zdrowej ale wykazywały one cechy patologii, chorych z rejestracją potencjałów prawidłowych lub nieznacznie obniżonych zarówno po stronie zdrowej i niedokrwiennej oraz chorych z odwróconym wzorem rejestracji (36). Za pomocą metody MEP nie sprecyzowano natomiast do końca zjawisk mających miejsce w obrębie neuronów kory ruchowej w następstwie czasowego, jedno- lub obustronnego zahamowania przepływu krwi w obrębie tętnic szyjnych, epizodów często opisywanych w praktyce klinicznej (90).

## 6. Wnioski

1. W niniejszej pracy z wykorzystaniem metod rejestracji ruchowych potencjałów wywołanych MEP wykazałam, że niedrożność tętnic szyjnych wywołuje znaczące, ale i odwracalne zmiany w krążeniu mózgowym w warunkach eksperymentalnych u szczura, których następstwem jest obniżenie, ale nie zniesienie przewodnictwa eferentnego w drodze korowo-rdzeniowej.
2. Niedrożność tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie wywołuje spadek temperatury ciała o około 2°C, natomiast ich ponowne udrożnienie po 5 minutach obserwacji wywołuje kompensację, tego parametru do wartości sprzed momentu wywołania niedokrwienia.
3. Wyniki pomiaru amplitudy w rejestracjach potencjałów MEP u zwierząt, u których wywołano permanentne niedokrwienie mózgowia poprzez okluzję tętnic szyjnych jedno- lub obustronnie, wskazują na obecność szybkich zmian (po 2 minutach niedokrwienia) w przewodnictwie drogi korowo-rdzeniowej. Zmiany te utrzymują się na tym samym poziomie aż do 10 minuty prowadzonej obserwacji.
4. Wyniki pomiaru amplitudy w rejestracjach potencjałów MEP u zwierząt, u których wywołano czasowe niedokrwienie mózgowia poprzez okluzję tętnic szyjnych jedno- lub obustronnie z ponownym udrożnieniem ich przepływu, wskazują na podobny przebieg zmian jak wymienione powyżej, ale bardziej nasilonych.
5. Otrzymane wyniki wskazują, że parametr amplitudy MEP jest czulszym w monitorowaniu przewodnictwa drogi korowo-rdzeniowej od parametru latencji i zmienności temperatury w obserwacji przebiegu skutków niedokrwienia w warunkach eksperymentalnych.
6. W obrazie histologicznym u zwierząt, u których dokonałam obustronnej okluzji tętnic (również z wariantem przywrócenia ich drożności), zmiany będące skutkiem niedokrwienia były najczęściej obecne jednostronnie w obszarze unerwienia czuciowego i ruchowego kończyny głównie przedniej aniżeli tylnej kory mózgu, obszarze skorupy i jądra ogoniastego obustronnie, obszarze gałki bladej obustronnie oraz obszarze przyległym do sklepienia komory trzeciej obustronnie.

## 7. Piśmiennictwo

1. Adams Jr. H.P., Bendixen B.H., Kappelle J.L. Love B., Gordon D.L., Marsh E.E., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definition for use in a multicenter, clinical trial, *Stroke*, 1993, 24, 35-41.
2. Adams Jr. H.D., del Zoppo G.J., von Kummer R., Management of stroke. A practical guide for the prevention, evaluation and treatment of acute stroke, 2nd Ed. Professional Communications Inc., 2002.
3. Arac N., Sagduyu A., Binai S., Ertekin C., Prognostic value of transcranial magnetic stimulation in acute stroke, *Stroke*, 1994, 25, 2183-2186.
4. Aranowski J., Cho K.H., Strong R., Grotta J.C., Neurofilament proteolysis after focal ischemia; When do cells die after experimental stroke?, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1999, 19, 6, 652-660.
5. Aranowski J., Strong R., Grotta J.C., Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1997, 17, 1048-1056.
6. Ashe P.C., Berry M.D., Apoptotic signalling cascades, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2003, 27, 199-214.
7. Astrup J., Siesjo B.K. Symon C., Threshold in cerebral ischemia: the ischemic penumbra, *Stroke*, 1981, 12, 723-725.
8. Bagiński S., Technika histologiczna, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1951.
9. Baldissera F., Hultborn H., Illert M., Integration in spinal neuronal systems, W: Handbook of Physiology. The Nervous System, vol. II, Motor control, część 1, Wyd. V.B. Brooks, Am. Physiol. Soc., Bethesda, 1981, 509-595.
10. Bamford J., Dennis M., Sandcock P., Burn J., Warlow C., The frequency causes and timing of death within 30 days of a first stroke, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1990, 53, 824-829.
11. Barker A.T., Jalinous R., Freeston I.L., Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex, *Lancet*, 1985, 1, 8437, 1106-1107.
12. Bhardwaj A., Alkayed N.J., Krisch J.R., Hurn P.D., Mechanisms of ischemic brain damage, *Curr. Cardiol Rep.*, 2003, 5, 2, 160-167.
13. Bochenek A., Reicher M., Anatomia człowieka, Tom IV. Układ Nerwowy Ośrodkowy, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
14. Bolay H., Gürsoy – Ozdemir Y., Unal I., Dalkara T., Altered mechanisms of motor – evoked potentials generation after transient focal cerebral ischemia in the rat: implications for transcranial magnetic stimulation, *Brain Res.*, 2000, 4, 873, 1, 26-33.

15. Braeuninger S., Kleinschnitz Ch., Rodent models of cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems, *Experimental and Translational Stroke Medicine*, 2009, 1, 8.
16. Bramlett H.M., Dietrich D., Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences, *Journal of Blood Flow and Metabolism*, 2004, 24, 133-150.
17. Brott T., Bogousslavsky J., Treatment of acute ischemic stroke, *N. Engl. J. Med.*, 2000, 343, 710-722.
18. Burck H-Ch., *Technika histologiczna*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich Warszawa, 1975.
19. Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y., Scheinberg P., Ginsberg M.D., Small difference in interischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1987, 7, 6, 729-738.
20. Carloni S., Carnevali A., Cimino M., Balduini W., Extended role of necrotic cell death after hypoxia-ischemia-induced neurodegeneration in the neonatal rat, *Neurobiol. Dis.*, 2007, 27, 354-361.
21. Carmichael S.T., Rodent models of the focal stroke: size, mechanism and purpose, *Journal of American Society for Experimental Neuron Therap.*, 2005, 2, 396-409.
22. Catano A., Houa M., Caroyer J.M., Ducarne H., Noel P., Magnetic transcranial stimulation in acute stroke: early excitation threshold and functional prognosis, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1996, 101, 233-239.
23. Chen R., Classen J., Gerloff C., Celnik P., Wassermann E., Cohen L., Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation, *Neurology*, 1997, 48, 1398-1403.
24. Choki J.I., Yamaguchi T., Takeya Y., Morotomi Y., Omae T., Effect of carotid artery ligation on regional cerebral blood flow in normotensive and spontaneously hypertensive rats, *Stroke*, 1977, 8, 3, 374-379.
25. Conter S.A., Neurobiological effects of extensive transcranial electromagnetic in an animal model, *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, 1993, 89, 5, 341-348.
26. Courten – Myers G.M., Kleinholz M., Wagner K.R., Xi G., Myers R.E., Efficacious experimental stroke treatment with high-dose methylprednisolone, *Stroke*, 1994, 25, 487-492.
27. Cracco R.Q., Cracco J.B., Maccabee P.J., Amassian V.E., Cerebral function revealed by transcranial magnetic stimulation, *Journal of Neuroscience Methods*, 1999, 86, 209-219.
28. Curra A., Modugno N., Inghilleri M., Manfredi M., Hallett M., Berardelli A., Transcranial magnetic stimulation techniques in clinical investigation, *Neurology*, 2002, 59, 1851-1859.

29. Członkowska A., Członkowski A., Leczenie w neurologii – kompendium, PZWL, Warszawa, 2004.
30. Diener H-Ch. , Forsting M., Udar mózgu, Urban&Partner, Wrocław, 2004.
31. Dietrich W.D., Ginsberg H.D., Busto R., Watson B.D., Photochemically induced cortical infraction in rat. Time course of hemodynamic consequences, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1986, 6, 184-194.
32. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A., Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends in Neurosci.*, 1999, 22, 391-397.
33. Dougherty J.H., Levy D.E., Rawlinson D.G., Ruff R., Weksler B.B., Plum F., Experimental cerebral ischemia produced by extracranial vascular injury: protection with indomethacin and prostacyclin, *Neurology*, 1982, 32, 9, 970-4.
34. Dull S.T., Konrad P.E., Tacker W.A.Jr., Amplitude and latency characteristics of spinal cord motor evoked potentials in the rat, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1990, 77, 1, 68-76.
35. Durukan A., Tatlisumak T., Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology and therapy of focal cerebral ischemia, *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 2007, 87, 179-197.
36. Escudero J.V., Rancho J., Bautista D., Escudero M., Lopez – Trigo J., Prognostic value of motor evoked potential obtained by transcranial magnetic brain stimulation in motor function in patients with acute ischemic stroke, *Stroke*, 1998, 29, 1854-1859.
37. Fehlings M.G., Tator Ch.H., Linden R.D., The relations ships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow, *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1989, 74, 241.
38. Feng H-L., Yan L., Guan Y-Z., Cui L-Y., Effects of transcranial magnetic stimulation on motor cortical excitability and neurofunction after cerebral ischemia reperfusion injury in rat, *Chin. Med. Sci. J.*, 2005, 20, 4, 226-230.
39. Ferreira R., Oliveirall A.R., de Barros Filholl T.E., Standardization of motor evoked potential captivation technique in rats through transcranial electric stimulus, *Acta Ortopedica Brasileira*, 2005, 13, 112-114.
40. Fishback A.S., Shields C.B., Linden R.D., Zhang Y.P., Burke D., The effects of propofol on rat transcranial magnetic motor evoked potentials, *Neurosurgery*, 1995, 37, 5, 969-974.
41. Fiskum G., Murphy A.N., Beal M.F., Mitochondria in neurodegeneration acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1999, 19, 351-369.
42. Garcia J.H., Experimental ischemic stroke: a review, *Stroke*, 1984, 15, 5-14.



43. Garcia J., Yoshida Y., Chem H., Li Y., Zahang Z.G., Lian J., Chen S., Chopp M., Progression form ischemic injury to infract following middle cerebral artery occlusion in the rat, *American Journal of Pathology*, 1993, 142, 2, 623-635.
44. Gedels L.A., History of magnetic stimulation of the nervous system, *J. Clin. Neurophysiology*, 1991, 8, 1, 3-9.
45. George M.S., Nahas Z., Kozel F.A., Li X., Denslow S., Yamanaka K., Mishory A., Foust M.J., Bohning D.E., Mechanisms and state of art of transcranial magnetic stimulation, *The Journal of ECT*, 2000, 18, 4, 170-181.
46. Ginsberg M.D., Myers R.E., The topography of impaired microvascular perfusion in the primate brain following total circulatory arrest, *Neurology*, 1972, 22, 988-1011.
47. Griskova I., Hoppner J., Ruksenas O., Dapsys K., Transcranial magnetic stimulation: the method and application, *Medicina (Kaunas)*, 2006, 42, 10, 798-804.
48. Gupta Y.K., Briyal S., Animal model sof cerebral ischemia for evaluation of drugs, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 2004, 48, 4, 379-394.
49. Hallet M., Transcranial Magnetic Stimulation: a primer, *Neuron*, 2007, 19, 55, 2, 187-199.
50. Harukuni I., Bhardwaj A., Mechanism of brain injury after global cerebral ischemia, *Neurologic Clinics*, 2006, 24, 1-21.
51. Harvey J. T., Brain scan in cerebral ischemia an experimental model in the rat, *Stroke*, 1975, 6, 703-706.
52. Hatano S., Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report, *Bull World Health Organ*, 1976, 54, 541-553.
53. Holstege G., The somatic motor system, W: The emotional motor system, Wyd. G. Holstege, R. Bandler, C. B. Saper, *Progr. Brain Res.*, 1996, 107, 9-26.
54. Hossmann K.A., Cerebral ischemia: models methods and outcomes, *Neuropharmacology*, 2008, 55, 257-270.
55. Hossmann K.A., Experimental models for the investigation of brain ischemia, *Cardiovasc. Res.*, 1998, 39, 106-120.
56. Hossmann K.A., Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2006, 26, 1057-1083.
57. Hovey Ch., Jalinous R., The guide to magnetic stimulation, The Magstim Company Ltd., Spring Gardens, Whiteland, Carmarthenshire, SA34 0HR, United Kingdom, 2006.
58. Huber J., Warzecha D., Zagłoba-Kaszuba A., Kulczyk A., Lipiec J., Sibilska-Wierzchosławska E., Aktywność obszarów kory ruchowej objętej niedokrwieniem oraz

drugostronnej u chorych po udarach badana ruchowymi potencjałami wywołanymi, *Przegląd Lekarski*, 2010, 67, 9, 787. ISSN: 00332240

59. Jankowska E., Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors, *Progress in Neurobiology*, 1992, 38, 335-378.

60. Kaga A., Fujiki M., Hori S., Nakano T., Isono M., Motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation after middle cerebral artery/or basilar occlusions in rats, *J. Clin. Neurosci.*, 2003, 10, 4, 470-475.

61. Kakinohana M., Abe M., Miyata Y., Oshiro M., Saikawa S., Arakaki K., Kuniyoshi Y., Sugahara K., Delayed response of transcranial myogenic motor – evoked potential monitoring to spinal cord ischemia during repair surgery for descending thoracic aortic aneurysm, *J. Anesth.*, 2008, 22, 304-307.

62. Kakinohana M., Nakamura S., Fuchigami T., Sugahara K., Transcranial motor evoked potentials monitoring can detect spinal cord ischemia more rapidly than spinal cord – evoked potentials monitoring during aortic occlusion in rats, *Eur. Spine J.*, 2007, 16, 787-793.

63. Kamida T., Fujiki M., Hori S., Isono M., Conduction pathways of motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation: A rodent study using a “figure – 8” coil, *Muscle & Nerve*, 1998, 21, 722-731.

64. Kety S.S., The cerebral circulation, W: *Handbook of Physiology*, Wyd.: Field J., Magoun H.W., Hall V.E., Bethesda, Am. Physiol. Soc., 1960.

65. Kolominsky-Rabas P.L., Weber M., Geleffer O., Neundoerfer B., Heuschmann P.U., Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study, *Stroke*, 2001, 32, 2735-2740.

66. Konard P.E., Tacker W.A., Levy W.J., Reedy D.P., Cook J.R., Greddes L.A., Motor evoked potentials in dog: effects of global ischemia on spinal cord and peripheral nerve signals, *Neurosurgery*, 1987, 20, 117-124.

67. Kowiański P., Lietzau G., Dziewiątkowski J., Moryś J., Doświadczalne modele zwierzęce udaru niedokrwienego mózgowia, *Udar Mózgu*, 2009, 11, 2, 70-79.

68. Kozubski W., Liberski P., *Choroby układu nerwowego*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004.

69. Lacinana M.A. de, Exuperio D.T., Carceller F., Roda J.M., Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed? *Cerebrovascular Diseases*, 2001, 11, 1, 20-30.

70. Linden R.D., Zhang Y.P., Darlene A., Burke A., Matthew A., Hunt A., Harping J.E., Shields Ch.B., Magnetic motor evoked potentials monitoring in the rat, *J. Neurosurg*, 1999, 91, 205-210.

71. Lips J., Hann P., Jager S.W. de, Vanicky I., Jacobs M.J., Kalkman C.J., The role of transcranial motor evoked potentials in predicting neurologic and histopathologic outcome after spinal cord ischemia, *Anesthesiology*, 2002, 97, 1, 183-191.
72. Lovett J.K., Coull A., Rothwell P.M., Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence studies, *Neurology*, 2004, 62, 569-573.
73. Luft A.R., Kaelin-Ling A., Till-Karsten Hauser, Cohen L.G., Thakor N.V., Hanley D.F., Transcranial magnetic stimulation in the rat., *Journal Experimental Brain Research*, 2001, 140, 1, 112-121.
74. Lundberg A., Control of spinal mechanisms from the brain, *The Nervous System: The Basic Neurosciences*, Raven Press, New York, 1975, 1, 253-265.
75. Macrae M., New models of focal cerebral ischaemia, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1992, 34, 302-308.
76. Mathew P., Bullock R., Graham D.I., Maxwell W.L., Teasdale G.M., McCulloch J., A new experimental model of contusion in the rat. Histopathological analysis and temporal patterns of cerebral blood flow disturbances, *J. Neurosurg.*, 1996, 85, 5, 860-870.
77. Miller J.D., Bullock R., Graham D.I., Chen M-H., Teasdale G.M., Ischemic brain damage in a model of acute subdural haematoma, *Neurosurgery*, 1990, 27, 433-439.
78. Murray C.J., Lopez A.D., Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study, *Lancet*, 1997, 349, 1269-1276.
79. Nagasawa H., Kogure K., Correlation between cerebral blood flow and histologic in a new model of middle cerebral artery occlusion, *Stroke*, 1989, 20, 8, 1037-1043.
80. Nascimbeni A., Gaffuri A., Imazio P., Motor evoked potentials: prognostic value in motor recovery after stroke, *Fund. Neurol.*, 2006, 21, 4, 199-203.
81. Nielsen J.B., Perez M.A., Oudega M., Enriquez- Denton M., Aimonetti J-M., Evaluation of transcranial magnetic stimulation for investigation transmission in descending motor tracts in the rat, *European Journal of Neuroscience*, 2007, 25, 805-814.
82. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N. Engl. J. Med.* 1991, 325, 445-453.
83. Nowacki P., Bajer-Czajkowska A., Profilaktyka wtórna niedokrwiennego udaru mózgu w świetle medycyny opartej na dowodach, *Polski Przegląd Neurologiczny*, 2008, 4, 3, 147-152.
84. Nudo R.J., Wise B.M., SiFuentes F., Milliken G.W. Neural substrates for the effect of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct, *Science*, 1996, 272, 1791-1794.

85. O'Neill M.J., Clemens J.A., Rodent models of global cerebral ischemia, *Curr. Protoc. Neurosci.*, 2001, 9, 9.
86. Paxinos G., *The rats nervous system*, Academic Press, Australia, 1985.
87. Paxinos G., Mai J.K., *The human nervous system*, Elsevier Academic Press, San Diego California, 2004.
88. Paxinos G., Watson Ch., *The rats brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, Elsevier Sixth edition, 2007.
89. Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J., *A stereotaxic atlas of the rat brain*, Plenum Press, New Jork, 1967.
90. Pennisi G., Rapisarda G., Bella R., Calabrese V., Maertens de Noordhout A., Delwaide P.J., Prognostic value for hand motor recovery absence of response to early transcranial magnetic stimulation in ischemic stroke potentials, *Stroke*, 1999, 30, 2666-2670.
91. Polson M.J.R., Barker A.T, Freeston I.L., Stimulating of nerve trunks with time-varying magnetic fields, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1982, 20, 243-344.
92. Pridmore S., Khan U., Moacyr A., Rosa A., George M.S., Information for assistants of repeated transcranial magnetic stimulation, *International Journal of Mental Health Nursing*, 2003, 12, 22-29.
93. Prusiński A., *Podstawy neurologii klinicznej*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1989.
94. Pulsinelli W., Pathophysiology of acute ischaemic stroke, *Lancet*, 1992, 339, 533-536.
95. Pulsinelli W.A., Brierley J.B., A new model of bilateral hemisphere ischaemia in the unanaesthetised rat, *Stroke*, 1979, 10, 267-272.
96. Pulsinelli W.A., Buchan A., The utility of animal ischemia models in predicting pharmacotherapeutic response in the clinical setting In Ginsberg, Dietrich: *Cerebrovascular Diseases*, Raven Press Publishers, 1989, 87-91.
97. Rosen Ch.L., Dinapoli V.A., Nagamine T., Crocco T., Influence of age on stroke outcome following transient focal ischemia, *J. Neurosurg.*, 2005,103, 687-694.
98. Rösler K.M., Transcranial magnetic brain stimulation: a tool to investigate central motor pathways, *News Physiol. Sci.*, 2001, 16, 297-302.
99. Rotenberg A., Muller P.A., Vahabzadeh – Hagh A.M., Navarro X., Lopez – Vales R. Pascual – Leone A., Jensen F., Lateralization of forelimb motor evoked potentials by transcranial magnetic stimulation in rat, *Clin. Neurophysiol.*, 2010, 121, 1, 104.
100. Rossini P.M., Pauri F., Transcranial magnetic stimulation in stroke, *Rozdział 16 W: Hallett M., Chakroverty S., Magnetic stimulation in clinical neurophysiology*, Elsevier, Butterworth Heinemann, 2005.

101. Rothwell J.C., Transcranial electrical and magnetic stimulation of the brain: Basic physiological mechanisms. W: *Magnetic Stimulation in Clinical Neurophysiology*, M. Hallett and S. Chokroverty (Wyd.), Philadelphia, Elsevier, Butterworth Heinemann, 2004.
102. Ryglewicz D., Hier D.B., Wiszniewska M., Członkowska A., Cichy S.S., Lechowicz W.W., Ischemic strokes more severe in Poland than in the United States, *Neurology*, 2000, 54, 2, 513-515.
103. Sashadri S., Beiser A., Kelly – Hayes M., Kase C.S., Au R., Kannel W.B., Wolf P.A., The lifetime risk of stroke, *Stroke*, 2006, 37, 345-350.
104. Schwedler M., Miletich D.J., Albrecht R.F., Cerebral blood flow and metabolism following ketamine administration, *Can. Anaesth. Soc. J.*, 1982, 29, 3, 222-225.
105. Schwindt P.C., Control of motoneuron output by pathways descending from the brain stem, Rozdział 4 w Towe A.L., Luschlei E.S. (Wyd.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol.5, Motor Coordination, Plenum Press, New York and London, 1981.
106. Seitz R.J., Bütefisch C.M., Kleiser R., Hömberg V., Reorganization of cerebral circuits in human ischemic brain disease, *Restor. Neurol. Neurosci.*, 2004, 22, 3-5, 207-229.
107. Shao Y., Cortical evoked potential changes in a rat model of acute ischemic stroke. Detection of somatosensory evoked potential and motor evoked potential, *Neural. Regeneration Research*, 2010,5, 7, 550-554.
108. Shapovalow A. I., Neuronal organization and synaptic mechanisms of supraspinal motor control in vertebrates, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1975, 72, 1-54.
109. Sicard K.M., Fisher M., Animal models of focal brain ischemia, *Experim. Translational Stroke Med.*, 2009, 1, 7. doc: 10.1186/2040-7379-1-7.
110. Simpson R.K., Baskin D.S., Early component changes in corticomotor evoked potentials following experimental stroke, *Stroke*, 1987, 18, 1141-1147.
111. Small D.L., Buchan A.M., Animal models, *British Medical Bulletin*, 2000, 56, 2, 307-317.
112. Smarcka M., Otevrel F., Kuchtickova S., Horky M., Juran v., Duba M., Experimental model of reversible focal ischaemia in the rat, *Scripta Medica*, 2001, 74, 6, 391-398.
113. Steinberg G.K., Gelb A.W., Lam A.M., Manninen P.H., Peerless S.J., Ressi Neto A., Floyd P., Correlation between somatosensory evoked potentials and neuronal ischemic changes following middle cerebral artery occlusion, *Stroke*, 1986, 17, 1193-1197.
114. Strosznajder J.B., Czernicki Z. (Wyd.), *Patologia układu nerwowego-„Mózg a niedokrwienie”*, Wydawnictwo Platan, Kraków 2005.

115. Sugawara T., Fujimura M., Noshita N., Kim G.W., Saito A., Hayashi T., Narasimhan P., Maier C.M., Chan P.H., Neuronal death/survival signalling pathways in cerebral ischemia, *The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutic*, 2004, 1, 17-25.
116. Taira Y., Marsala M., Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow and histopathologic changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat, *Stroke*, 1996, 27, 10, 1850-1858.
117. Tamura A., Graham D.I., Mc Culloch J., Teasdale G.M., Focal cerebral ischemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1981, 1, 53-60.
118. Timmerhuis Th.P.J., Hageman G., Oosterloo S.J., Rozeboom A.R., The prognostic value of cortical magnetic stimulation in acute middle cerebral artery infraction compared of other parameters, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 1996, 98, 231-236.
119. Traystman J.R., Animal models of focal and global cerebral ischemia, *ILAR Journal*, 2003, 44, 2, 85-95.
120. Trompetto C., Assini A., Buccolieri A., Marchese R., Abbruzzese G., Motor recovery following stroke: a transcranial magnetic stimulation study, *Clinical Neurophysiology*, 2000, 111, 1860-1867.
121. Turaj W., Słowik A., Wnuk M., Szczudlik A., Gender – related differences in diagnostic evaluation and outcome of ischemic stroke in Poland, *Stroke*, 2009, 40, 980-982.
122. Ueno S., Matsuda T., Fujiki M., Localized stimulation of the human brain by a part of opposing magnetic field. *Memoirs of the Faculty of Engineering, Kyushu University* 1989, 49, 161-173.
123. Vang Ch., Dunbabin D., Kilpatrick D., Correlation between functional and electrophysiological recovery in acute ischemic stroke, *Stroke*, 1999, 30, 2126-2130.
124. Ward N.S., Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke, *Postgrad. Med. J.*, 2005, 81, 958, 510-514.
125. Warlow C.P., Dennis M.S., Van Gijn J. Hankey G.J., Sandercock P.A.G., Bamford J.M., Wardlaw J.M., *Stroke: A practical guide to management*, Blackwell Science Ltd., John Wiley & Sons Oxford 2001.
126. Warner D.S., Peroperative neuroprotection: there is no magic bullet. What do I do in my daily practice, and where are we going? *Pathophysiology of cerebral ischemia*, American Society of Anesthesiologists, Annual Meeting Refresher Course, 2005.
127. Weber M., Eisen A.A., Magnetic stimulation of central and peripheral nervous systems, *Muscle and Nerve*, 2002, 25, 160-175.
128. Wojak J.C., de Crescito V., Young W., Basilar artery occlusion in rats, *Stroke*, 1991, 22, 247-252.

129. Woodruff T.M., Thundyil J., Tang S-H., Sobey Ch., Taylor S.M., Pathophysiology, treatment and animal and cellular models of human ischemic stroke, *Molecular Neurodegeneration*, 2011, 6, 1-11.
130. Wu C., Zhan R., Qi S., Fujihara H., Shimoji K. A., Forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice, *J. Neurosci. Method*, 2001, 107, 101-106.
131. Yang G.Y., Betz A.L., Reperfusion – induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rat, *Stroke*, 1994, 25, 1658-1665.
132. Zandieh S., Hopf R., Redl H., Schlag M.G. The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials, *Spinal Cord*, 2003, 41, 16-22.
133. Zawistowski S. Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1975.
134. Zea Longa E.I., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats, *Stroke*, 1989, 20, 84-91.
135. Zhang Y.P., Shields L.B.E., Zhang Y., Pei J., Hu X-M., Hoskin R., Cai J., Qiu M.S., Use of magnetic stimulation to elicit motor evoked potentials, somatosensory evoked potentials and H reflex in no – sedated rodents, *Journal of Neuroscience Methods*, 2007, 165, 1, 9-17.
136. Zileli M., Schramm J., Motor versus somatosensory evoked potential changes after acute experimental spinal cord injury in rats, *Acta Neurochirurgica*, 1991, 108, 140-146.
137. Zivin J.A., Grotta J.C., Animal stroke models. They are relevant to human disease, *Stroke*, 1990, 21, 981-983.
138. Zyss T., Technika przezczaszkowej stymulacji magnetycznej: Zagadnienia aparaturowe, Wydawnictwo Medyczne, Kraków, 2009.

## 8. Streszczenia w języku polskim i angielskim

### **Model doświadczalny udaru niedokrwiennego w badaniach neurofizjologicznych przewodnictwa eferentnego metodą ruchowych potencjałów wywołanych indukowanym polem magnetycznym**

**Wprowadzenie.** Niedrożność tętnicy szyjnej wspólnej jest przyczyną udaru niedokrwiennego u 20% chorych. Istnieje mała ilość doniesień wyjaśniających jej skutki zwłaszcza w odniesieniu do badań neurofizjologicznych weryfikujących przewodnictwo eferentne drogi korowo-rdzeniowej w warunkach eksperymentalnych.

**Cele pracy.** W pracy podjęłam następujące cele: 1. Zbadanie stanu czynnościowego przewodnictwa eferentnego od poziomu kory ruchowej do ośrodków lędźwiowo-krzyżowego rdzenia kręgowego u zwierząt po wywołanym udarze niedokrwiennym w celu określenia zmian wczesnych, które mogą być odwracalnymi. 2. Określenie zmienności temperatury ciała zwierzęcia w przebiegu obserwacji skutków udaru niedokrwiennego wywołanego okluzją tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie z wariantem ponownego udrożnienia przepływu krwi. 3. Weryfikację histologiczną zmian w strukturze mózgowia w następstwie wywołanego niedokrwienia po jedno- lub obustronnej okluzji tętnic szyjnych wspólnych z lub bez wtórnego udrożnienia.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadziłam u 42 samców szczurów rasy Wistar podzielonych na 4 grupy eksperymentalne: A. u 19 zwierząt wywołałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie prawej tętnicy szyjnej, B. u 13 zwierząt wywołałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie tętnicy szyjnej obustronnie. C. u 4 zwierząt wywołałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie prawej tętnicy szyjnej i ponowne jej udrożnienie. D. u 6 zwierząt wywołałam udar niedokrwienny poprzez zaciśnięcie tętnicy szyjnej obustronnie i ponowne ich udrożnienie. Stan przewodnictwa eferentnego drogi korowo rdzeniowej weryfikowałam metodą ruchowych potencjałów wywołanych (MEP) w następstwie stymulacji nadczaszkowej kory ruchowej i rejestracji z nerwu kulszowego po stronie przeciwnej. Dokonywałam pomiaru temperatury oraz weryfikacji histologicznej skutków niedokrwienia w skrawkach mózgowia barwionych hematoksyliną i eozyną.

**Wyniki i wnioski.** 1. W niniejszej pracy z wykorzystaniem metod rejestracji ruchowych potencjałów wywołanych MEP wykazałam, że niedrożność tętnic szyjnych wywołuje znaczące, ale i odwracalne zmiany w krążeniu mózgowym w warunkach eksperymentalnych u szczura, których następstwem jest obniżenie, ale nie zniesienie przewodnictwa eferentnego w drodze korowo-rdzeniowej. 2. Niedrożność tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie wywołuje spadek temperatury ciała o około 2°C, natomiast ich ponowne udrożnienie po 5



minutach obserwacji wywołuje kompensację tego parametru do wartości sprzed momentu wywołania niedokrwienia. 3. Wyniki pomiaru amplitudy w rejestracjach potencjałów MEP u zwierząt, u których wywołałam permanentne niedokrwienie mózgowia poprzez okluzję tętnic szyjnych jedno- lub obustronnie, wskazują na obecność szybkich zmian (po 2 minutach niedokrwienia) w przewodnictwie drogi korowo-rdzeniowej. Zmiany te utrzymują się na tym samym poziomie aż do 10 minuty prowadzonej obserwacji. 4. Wyniki pomiaru amplitudy w rejestracjach potencjałów MEP u zwierząt, u których wywołałam czasowe niedokrwienie mózgowia poprzez okluzję tętnic szyjnych jedno- lub obustronnie z ponownym udrożnieniem ich przepływu, wskazują na podobny przebieg zmian jak wymienione powyżej, ale bardziej nasilonych. 5. Otrzymane wyniki wskazują, że parametr amplitudy MEP jest czulszym w monitorowaniu przewodnictwa drogi korowo-rdzeniowej od parametru latencji i zmienności temperatury w obserwacji przebiegu skutków niedokrwienia w warunkach eksperymentalnych. 6. W obrazie histologicznym u zwierząt, u których dokonano obustronnej okluzji tętnic (również z wariantem przywrócenia ich drożności), zmiany będące skutkiem niedokrwienia były najczęściej obecne jednostronnie w obszarze unerwienia czuciowego i ruchowego kończyny głównie przedniej aniżeli tylnej kory mózgu, obszarze skorupy i jądra ogoniastego obustronnie, obszarze gałki bladej obustronnie oraz obszarze przyległym do sklepienia komory trzeciej obustronnie.

**Słowa kluczowe:** doświadczalny udar niedokrwienny, droga korowo-rdzeniowa, szczur, ruchowe potencjały wywołane indukowane polem magnetycznym, badanie temperatury, weryfikacja histologiczna

## **Experimental model of the ischemic stroke in neurophysiological studies of the efferent transmission using motor evoked potentials induced with magnetic field**

**Introduction.** Occlusion of the common carotid artery is a reason of the ischemic stroke in 20% of patients. Little data is available about explanation of its effects especially referring to the neurophysiological studies, verifying the efferent transmission of cortico-spinal tract in experimental conditions.

**Aims.** The aims of this study were as follows: 1. Examination of the functional state of the efferent transmission from level of motor cortex to lumbo-sacral spinal centres in animals following evoking the ischemic stroke in order to evaluate the early changes which might have been reversible. 2. Evaluation of the animal's body temperature changes in the course of observation the ischemic stroke effects evoked by occlusion of the common carotid artery uni- or bilaterally with variants of the additional blood flow re-occlusion. 3. Histological verification of changes in the brain structures following the evoked ischemic stroke after uni- or bilateral occlusion of the common carotid arteries with or without re-occlusion.

**Material and methods.** Studies were performed on 42 male Wistar rats divided into four experimental groups: A. in 19 animals the ischemic stroke was evoked by occlusion of common carotid artery on the right side, B. in 13 animals there was evoked the ischemic stroke by occlusion the carotid artery bilaterally, C. in 4 animals the ischemic stroke was evoked by occlusion of the right carotid artery and its subsequent releasing, D. in 6 animals the stroke was evoked by occlusion of the carotid arteries bilaterally and their subsequent releasing. The functional state of efferent transmission in cortico-spinal tract fibers was verified with the motor evoked potential method (MEP) induced with magnetic field after transcranial magnetic stimulation of motor cortex and recording potentials from contralateral ischiadic nerve. There were also performed the temperature measurements and the histological verification of stroke effects in brain slices counterstained with hematoxylin and eosin.

**Results and conclusions.** 1. In this paper using the motor evoked potentials recording method there was shown that occlusion of the carotid arteries evokes the significant but reversible changes in the brain blood flow circuit in experimental conditions in the rat which effects are the decreasing but not diminishing the efferent transmission of cortico-spinal tract. 2. Occlusion of the common carotid arteries uni- or bilaterally evokes the decreasing of body temperature at about 2°C while their subsequent re-occlusion after 5 minutes of observation evokes compensation of this parameter to values before the stroke was induced. 3. Results of the amplitude measurements in MEP recordings in animals whom the permanent stroke was

applied following occlusion of carotid arteries uni- or bilaterally indicates on fast changes (after 2 minutes of ischemia) in transmission of cortico-spinal tract. These changes were kept at the stable level up to 10 minutes of observation. 4. Results of the MEP amplitude measurements in animals whom the transient stroke was applied by occlusion of carotid arteries uni- or bilaterally with the subsequent re-occlusion, indicate on the similar course of changes as the mentioned above but more intense. 5. Obtained results indicate that the MEP amplitude parameter is more sensitive in monitoring the transmission of cortico-spinal tract from the latency parameter and temperature changes in observation of the stroke results in experimental conditions. 6. In the histological picture of brains in animals whom the bilateral occlusion was applied (also with reperfusion), the changes which were results of the ischemia were the most prominent in the sensory and motor areas of innervation mainly the fore- than hindlimbs, within putamen and caudate nuclei bilaterally, in areas of globulus pallidus bilaterally and the areas adjacent to the fornix of the third ventricle bilaterally.

**Key words:** experimental ischemic stroke, cortico-spinal tract, rat, motor evoked potentials induced with magnetic field, temperature measurements, histological verification

## 9. Spis tabel i rycin

Rycina 1. Schemat przebiegu dróg piramidowych w płaszczyźnie czołowej oraz idea ich pobudzenia jak i sposobu rejestracji ruchowych potencjałów wywołanych stosowane w pracy.

Rycina 2. Schematy czterech rodzajów zabiegów na planach unaczynia mózgowia u szczura, wykonywanych w celu wywołania udaru niedokrwienego w czterech grupach zwierząt: A-zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej jednostronnie (zawsze strona prawa), B-obustronne zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej, C-zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej jednostronnie (zawsze strona prawa) z ponownym udrożnieniem, D-obustronne zaciśnięcie tętnicy szyjnej wspólnej z obustronnym udrożnieniem. Na tej i na innych rycinach symbol „X” oznacza zamknięcie jedno- (zawsze prawa) lub obustronne tętnicy szyjnej wspólnej, natomiast „O” ponowne jej udrożnienie.

Rycina 3. Kolejne etapy przygotowania zwierzęcia oraz przeprowadzenia badań jak i fotografie stanowiska badawczego i wykorzystywanej aparatury. A-wypreparowanie tętnicy szyjnej wspólnej, pokazano mikrofotografie klipsu do zamknięcia tętnicy. B-aparat stereotaktyczny do unieruchomienia głowy zwierzęcia po znieczuleniu oraz widok głowicy stymulacyjnego pola magnetycznego połączonej z generatorem MagPro. C-widok głowicy stymulującej pola magnetycznego oraz wypreparowanego nerwu kulszowego. D-widok bipolarnych elektrod rejestrujących z zamontowanym nerwem kulszowym. E- widok mózgowia szczura po wypreparowaniu, F-mikrotom mrożeniowy z zamontowanym mózgowiem z którego wykonywano skrawki poprzeczne, G-naczynie z komórkami dzielącymi skrojone skrawki histologiczne podzielone ze względu na głębokość cięcia, H-skrawki mózgowia nałożone na szkiełka podstawowe, przykryte szkiełkami nakrywkowymi, I-przykładowa fotografia przekroju poprzecznego mózgowia w obrazie mikroskopu świetlnego.

Rycina 4. Główne unaczynienie mózgowe szczura (zmodyfikowane za [114]). Fotografia po lewej obrazuje klips wykorzystany do okluzji tętnicy szyjnej wspólnej jedno- lub obustronnie.

Rycina 5. Zestaw aparaturowy wykorzystywany do badań opisywanych w pracy. A-zintegrowany system diagnostyczny KeyPoint firmy Medtronic, B-głowica jednostki

rejestrującej potencjały wywołane z zestawem elektrod, C-aparat MagPro firmy Medtronic służący do stymulacji magnetycznej z zestawem cewek oraz generatorem.

Tabela 1. Zestawienie zakresów, wartości średnich oraz odchylenia standardowego badanych parametrów amplitudy i latencji ruchowych potencjałów wywołanych jak i temperatury w poszczególnych grupach zwierząt na poszczególnych etapach obserwacji.

Rycina 6. Schemat anatomicznych obszarów kory nowej oraz obszarów jądra ogoniastego i skorupy jądra soczewkowatego na przekroju czołowym na poziomie spoidła przedniego mózgu, w odniesieniu do których dokonano opisu lokalizacji artefaktów utożsamianych z następstwami wywołania udaru niedokrwiennego. Objasnienia: 1-obszar kory gruszkowatej, 2-obszar wyspy, 3-obszar kory ciemieniowej, 4-obszar kończyny przedniej i tylnej, 5-obszar kory czołowej i zakrętu, 6-obszar skorupy i jądra ogoniastego, 7-obszar gałki bladej, 8-obszar kory przedwzrokowej przyśrodkowej i bocznej, TW-torebka wewnętrzna, S-sklepienie komory trzeciej, SP-spoidło przednie [zmodyfikowane za (43)].

Rycina 7. Zmienność temperatury rejestrowanej u szczurów z grup A i B na poszczególnych etapach obserwacji. Zmienność pokazano na podstawie parametru mediany.

Rycina 8. Zmienność temperatury rejestrowanej u szczurów z grupy C i D na poszczególnych etapach obserwacji. Zmienność pokazano na podstawie parametru mediany.

Rycina 9. Przykłady rejestracji ruchowych potencjałów wywołanych rejestrowanych u jednego ze zwierząt w następstwie okluzji tętnicy szyjnej prawej (A-grupa A) z czasem obserwacji zmian do 10 minut oraz u jednego ze zwierząt z obustronną okluzją tętnic i ponownym udrożnieniu (B-grupa D). Zwraca uwagę spadek parametru amplitudy oraz jej wyrównanie w przykładzie A przy odmiennej sekwencji zmian (wyłącznie spadek amplitudy) pokazanych w przykładzie B.

Rycina 10. Procentowe ujęcie wartości mediany amplitudy MEP w grupach A i B w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie.

Rycina 11. Procentowe ujęcie wartości mediany amplitudy MEP w grupach C i D w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie i ich ponownym udrożnieniu.

Rycina 12. Wartości mediany latencji MEP w grupach A i B w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie.

Rycina 13. Wartości mediany latencji MEP w grupach C i D w poszczególnych minutach niedokrwienia po okluzji tętnic szyjnych kolejno jedno- i obustronnie i ich ponownym udrożnieniu.

Rycina 14. Wyniki badań histologicznych z zaznaczeniem lokalizacji miejsc, w których w obrazie mikroskopowym stwierdzono obecność lezji będących skutkami wywołania niedokrwienia. Przykładowe obrazy mikroskopowe z zaznaczonymi strzałkami miejscami lezji w czterech grupach badanych zwierząt (**A-D**) u których wykonywano różny wariant niedokrwienia, pokazano w części **a** ryciny. W przykładach poniżej pokazano lokalizację lezji o różnym stopniu nasilenia, którą na schematach przekrojów poprzecznych mózgowia zaznaczono kółkami o różnej średnicy. W **b** pokazano przekroje na poziomach -2 mm od punktu bregma, w **c** -3,1 mm, w **d** -4,1 mm, w **e** -5,1 mm.

Tabela II. Zestawienie miejsc występowania lezji na poszczególnych poziomach tkanki mózgowej w poszczególnych grupach badawczych zwierząt (0-brak zmiany, 1-występowanie zmiany), na podstawie analizy w obrazie jasnego pola skrawków histologicznych wybarwionych H+E.

Tabela III. Porównanie parametrów amplitud i latencji rejestracji MEP przed zaciśnięciem tętnic szyjnych z wartościami tych samych parametrów, na kolejnych etapach obserwacji po dokonaniu wyłącznie okluzji jednostronnie (grupa A zwierząt) lub obustronnie (grupa B zwierząt). Przedstawiono poziomy istotności statystycznej w teście Wilcoxon.

Tabela IV. Porównanie parametrów rejestracji MEP oraz temperatury w najliczniejszych grupach A i B badanych zwierząt testem Manna-Whitneya na kolejnych etapach obserwacji.

Tabela V. Zestawienie współczynników korelacji rang Spearmana ( $r_s$ ) i ich poziomy istotności ( $p$ ) pomiędzy amplitudą a latencją w rejestracjach MEP przeprowadzonych w grupach zwierząt A i B (najliczniejszych).

Tabela VI. Wyniki testu Kruskala-Wallisa porównań wielokrotnych dla parametrów rejestracji MEP i temperatury pomiędzy poszczególnymi grupami badanych zwierząt na kolejnych etapach obserwacji. Gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie na poziomie  $p \leq 0.005$ . Test Kruskala-Wallisa jest nieparametrycznym odpowiednikiem analizy ANOVA i weryfikuje różnicowanie pomiędzy grupami, a porównania wielokrotne są nieparametrycznymi odpowiednikami testów post-hoc.