

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Paweł Brzegowy

Ocena następstw urazu mechanicznego rdzenia kręgowego u  
szczura przy pomocy techniki obrazowania dyfuzji wody  
metodą rezonansu magnetycznego

*Praca doktorska*

Promotor: Dr hab. med. Andrzej Urbanik

Pracę wykonano w Katedrze Radiologii  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Kierownik: Dr hab. med. Andrzej Urbanik

Kraków, 2006

# **SPIS TREŚCI**

## **1. WSTĘP**

- 1.1. Urazy rdzenia kręgowego
- 1.2. Diagnostyka obrazowa urazów rdzenia kręgowego
- 1.3. Obrazowanie dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego - DWI
- 1.4. Zastosowanie techniki DWI do badań rdzenia kręgowego
- 1.5. Patofizjologia urazu mechanicznego rdzenia kręgowego
- 1.6. Zastosowanie techniki DWI do oceny urazu rdzenia kręgowego
- 1.7. Sposoby neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym
- 1.8. Zastosowanie metody DWI do oceny neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym
- 1.9. Aktualne możliwości zastosowania techniki DWI w diagnostyce rdzenia kręgowego u człowieka

## **2. CELE PRACY**

## **3. MATERIAŁ I METODA**

## **4. WYNIKI**

## **5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja**

## **6. WNIOSKI**

## **7. PIŚMIENNICTWO**

## **8. STRESZCZENIE**

## **9. SPIS TABEL I RYCIN**

## SPIS UŻYTYCH SKRÓTÓW

- ADC - współczynnik całkowitej dyfuzji
- ADC<sub>x</sub> - współczynnik dyfuzji dla gradientu w kierunku x (pravo-lewym)
- ADC<sub>y</sub> - współczynnik dyfuzji dla gradientu w kierunku y (brzuszo-grzbietowym)
- ADC<sub>z</sub> - współczynnik dyfuzji dla gradientu w kierunku z (kranio-kaudalnym)
- AI - współczynnik anizotropii
- AMPA - kwas  $\alpha$ -Amino-3-hydroksy-5metylo-4-izoksazylopropionowy
- DAI - obrazowanie anizotropii dyfuzji
- DTI - obrazowanie tensora dyfuzji
- DWI - obrazowanie dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego
- ID - współczynnik izotropii
- lADC - współczynnik dyfuzji podłużnej
- mGluRs - metabotropowe receptory gładaminergiczne
- MPEP - 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine
- MPR - rekonstrukcje wielopłaszczyznowe
- MRI - obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego
- NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy
- tADC - współczynnik dyfuzji poprzecznej
- TK - tomografia komputerowa

# 1. WSTĘP

## 1.1. Urazy rdzenia kręgowego

Urazy mechaniczne rdzenia kręgowego w rozwiniętych krajach całego świata dotyczą rocznie od 15 do 40 osób na milion mieszkańców. Ich ofiary w ponad 80% to mężczyźni poniżej 30 roku życia. Najczęstszą przyczyną urazów są w około 40-50% przypadków wypadki w ruchu komunikacyjnym, a następnie wypadki przy pracy (10-25%) i przy uprawianiu sportu (10-25%). U około 50% ofiar wypadków uszkodzeniu ulega szyjny odcinek rdzenia kręgowego, wynikiem czego są poważne konsekwencje neurologiczne w postaci nieodwracalnego kalectwa, a niejednokrotnie nawet śmierci [85].

Dlatego urazy rdzenia kręgowego są bardzo ważnym problemem zarówno w aspekcie medycznym jak i społecznym. Leczenie pacjentów z urazem rdzenia wymaga współpracy specjalistów różnych dyscyplin medycznych i paramedycznych, począwszy od lekarzy medycyny ratunkowej, radiologów, neurochirurgów, ortopedów, anestezyjologów, chirurgów ogólnych, neurologów, specjalistów rehabilitacji i psychologów.

Od wielu lat prowadzone są na całym świecie badania eksperymentalne, których celem jest dokładne poznanie patomechanizmów urazu rdzenia oraz szukanie metod leczenia jego skutków. Jednym z ważniejszych kroków w historii tych badań było opracowanie w 1911 roku przez Alfreda Allena doświadczalnego modelu urazu mechanicznego rdzenia kręgowego [28]. Polegał on na wykonaniu laminektomi i następnie spuszczeniu na odsłonięty rdzeń ciężarka. Ten wiarygodny i powtarzalny model urazu określany jako „weight - drop” z różnymi modyfikacjami stosowany jest do dzisiaj w wielu laboratoriach na świecie. Wynikiem coraz lepiej poznanej patofizjologii urazu rdzenia jest dynamicznie rosnąca liczba badań nad potencjalnymi lekami, których celem jest ograniczanie skutków urazu, a w szczególności hamowanie wtórnych mechanizmów urazu prowadzących do powiększania się obszaru uszkodzenia rdzenia.

Zarówno medycyna kliniczna, dla której podstawą skutecznego działania jest precyzyjna diagnostyka, jak również badania eksperymentalne, potrzebują nieinwazyjnych metod służących do dokładnej oceny urazu rdzenia i do analizy skuteczności postępowania terapeutycznego. Technika, która może sprawdzić się w obu tych dziedzinach jest obrazowanie dyfuzji wody przy pomocy rezonansu

magnetycznego (DWI). Jest to powstała w ostatnich latach jedna z nowych technik współczesnej diagnostyki obrazowej. DWI potwierdziło już swoją przydatność w diagnostyce mózgowia i może również stać się metodą obrazową mającą istotne znaczenie w diagnostyce oraz ocenie leczenia schorzeń rdzenia kręgowego. Próby takie dopiero są podejmowane i mają charakter badań doświadczalnych.

Praca ta jest wynikiem wieloletniej współpracy Katedry Radiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego z Zakładem Rezonansu Magnetycznego Instytutu Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego PAN w Krakowie i Zakładem Neuropatologii Instytutu Neurologii CM UJ, w badaniach nad eksperymentalnym urazem rdzenia kręgowego. W założeniu jest jednym z etapów przygotowań do zastosowania metody obrazowania dyfuzji wody w rezonansie magnetycznym, w diagnostyce rdzenia kręgowego u człowieka.

Wcześniejsze eksperymenty prowadzone w ramach tej współpracy, jak również opisywane w literaturze światowej opierały się głównie na badaniach DWI wypreparowanych rdzeni kręgowych (ex - vivo) oraz pojedynczych badaniach in-vivo. Wyniki tamtych badań potwierdziły możliwość zastosowania tej techniki obrazowania w badaniach urazów rdzenia kręgowego. Potwierdzono również udział procesów ekscytotoksycznych, spowodowanych działaniem kwasu glutaminowego, w patomechanizmie urazu rdzenia [1,2,103].

W tej pracy po raz pierwszy stworzono model badania, w którym zwierzęta z urazem rdzenia kręgowego poddano kilkukrotnym pomiarom DWI, w określonych odstępach czasowych. Dzięki temu uzyskano dynamiczny obraz zmian dyfuzji wody w tkankach rdzenia, jakie zachodzą bezpośrednio w pierwszych dobach po urazie mechanicznym. Po raz pierwszy podjęto również próbę oceny neuroprotektynowego działania środka farmakologicznego w urazie rdzenia, przy pomocy techniki DWI, na żywych zwierzętach. W tym celu zastosowano bloker receptorów glutaminergicznych (MPEP), którego celem było ograniczenie zjawiska ekscytotoksyczności. Ma to szczególne znaczenie ze względu na przygotowania do zastosowanie metody DWI w badaniach u człowieka.

## 1.2. Diagnostyka obrazowa urazów rdzenia kręgowego

### Techniki obrazowania

Urazy rdzenia kręgowego związane są bezpośrednio z urazami kręgosłupa. Bardzo często towarzyszą także innym obrażeniom wielonarządowym. Pierwszym etapem postępowania szpitalnego z osobami dotkniętymi uszkodzeniem kręgosłupa i rdzenia jest szybka i dokładna diagnostyka obrazowa, która opiera się na trzech zasadniczych technikach: klasycznych zdjęciach Rtg, tomografii komputerowej (TK) i rezonansie magnetycznym (MRI). Rodzaj zastosowanych metod zależy od wskazań klinicznych, ale przede wszystkim od ich dostępności [51].

- Zdjęcia Rtg ograniczają się do oceny struktur kostnych kręgosłupa. Pozwalają uwidocznić uszkodzenia kręgów - ich złamania (zwłaszcza, gdy dotyczą trzonów) lub przemieszczenia.
- Tomografia komputerowa, dzięki dużej dostępności i krótkiego czasu badania (co dotyczy zwłaszcza aparatów badających w technice spiralnej) jest dzisiaj podstawową metodą diagnostyczną w urazach kręgosłupa i rdzenia. Uzyskane podczas badania dane obrazowe można następnie przetwarzać otrzymując rekonstrukcje wielopłaszczyznowe (MPR) lub rekonstrukcje 3D, które znacznie ułatwiają ocenę i skracają czas analizy badania. Możliwość zastosowania „okien” kostnych i miękotkankowych pozwala na dokładną ocenę rodzaju i stopnia uszkodzenia kręgów oraz tkanek okołokręgosłupowych. Pozwala dokładnie ocenić kształt i wymiary kanału kręgowego, tkanki miękkie okołokręgosłupowe i w mniejszym stopniu tkanki wewnątrz kanału kręgowego. Uzyskane informacje takie jak zwężenie kanału kręgowego lub obecność w jego obrębie odłamów kostnych czy też krwiaka, mogą pośrednio wskazywać na potencjalne uszkodzenie rdzenia kręgowego.
- Rezonans magnetyczny jest obecnie jedyną metodą pozwalającą na bezpośrednie, dokładne uwidocznienie struktur wewnątrzkanałowych, w tym na zobrazowanie tkanek rdzenia kręgowego.

### Klasyczny rezonans magnetyczny - MRI

Standardowe badanie MRI rdzenia kręgowego opiera się na obrazach  $T_1$  i  $T_2$  - zależnych, wykonanych przy użyciu sekwencji echa spinowego (fast spin-echo, turbo spin echo), w płaszczyznach strzałkowych i osiowych. Przy czym obrazy  $T_2$  - zależne cechują się większą czułością niż obrazy  $T_1$  w ocenie zmian pourazowych

rdzenia [97]. W przypadkach małych ognisk stłuczenia, czy obrzęku przydatna może być sekwencja FLAIR. Natomiast dla lepszego zobrazowania zmian krwotocznych, ze względu na wysoką podatność magnetyczną deoksyhemoglobiny, użyteczne są sekwencje echa gradientowego [53].

Rezonans magnetyczny pozwala dokładnie ocenić tkanki kręgosłupa wraz z kanałem kręgowym. Przewyższa on tomografię komputerową pod względem czułości w ocenie uszkodzeń tkanek miękkich, ustępuje natomiast w przypadkach dyskretnych uszkodzeń kręgow. Precyzyjnie można ocenić przemieszczenie lub ucisk rdzenia spowodowane zwężeniem kanału kręgowego, jak również najcięższe skutki urazu w postaci naderwania lub przerwania rdzenia [50]. Należy przy tym zwrócić uwagę, że najcięższe uszkodzenia występują stosunkowo rzadko, ponieważ rdzeń kręgowy wykazuje znaczną odporność na strukturalne rozerwanie. Jednak nawet niewielkiego stopnia urazy są także niebezpieczne, ponieważ mogą spowodować zaburzenia jego czynności.

Ostre zmiany pourazowe w tkance rdzenia kręgowego w obrazach MRI można podzielić na cztery rodzaje [15,53,42,54]:

- obrzmienie rdzenia (cord swelling) - daje obraz w postaci pogrubienia rdzenia bez zmiany sygnału jego tkanek. Rzadko występuje w izolowanej postaci i najczęściej towarzyszy obrzękowi,
- obrzęk rdzenia (cord oedema) - cechuje się pogrubieniem rdzenia z jednoczesną obecnością strefy o podwyższonym (hiperintensywnym) sygnale w obrazach  $T_2$  - zależnych, co jest wynikiem wzrostu zawartości wody w tkance rdzenia. Obrzęk może występować w postaci izolowanej lub może współistnieć ze wszystkimi innymi postaciami ostrego urazu. Badania eksperymentalne wykazały, że obrzęk zaczyna się w okresie od kilku minut, do kilku godzin od urazu i może trwać do dwóch tygodni,
- stłuczenie rdzenia (cord compresion) - daje obraz mieszanego sygnału, co jest wynikiem obecności zarówno obrzęku jak i wynaczynionej krwi,
- krwiak wewnątrzrdzeniowy (cord haemorrhage) - obraz w zależności od czasu przedstawia się następująco:
  - w fazie ostrej - w obrazach  $T_2$  - zależnych wykazuje obniżenie sygnału (hipointensywność), spowodowaną obecnością deoksyhemoglobiny,
  - w fazie podostrej (po 3 - 8 dniach) - w obrazach  $T_1$  - zależnych daje sygnał podwyższony (hiperintensywny), co jest efektem przejścia deoksyhemoglobiny w methemoglobinę,

- w fazie przewlekłej - w obrazach  $T_2$  - zależnych daje obniżony sygnał, w wyniku obecności hemosydeiny,

Późne zmiany pourazowe w rdzeniu mogą mieć charakter [79,106,107]:

- mielopatii - ogniska o podwyższonym sygnale w obrazach  $T_2$  - zależnych i obniżonym (ale wyższym niż płyn mózgowo-rdzeniowy) sygnale w obrazach  $T_1$  - zależnych,
- syryngomieli - obecności tubularnej przestrzeni płynowej o sygnale odpowiadającym sygnałowi płynu mózgowo-rdzeniowego,
- zaniku rdzenia - wyrażającego się jego zwężeniem,

Informacje uzyskane na podstawie badania MRI mają bardzo dużą wartość we wczesnym postępowaniu i planowaniu leczenia. Prace kliniczne wskazują na istnienie korelacji pomiędzy typami ostrych zmian pourazowych w obrazach MR, a powrotem funkcji rdzenia. Z analiz tych wynika, że obecność krwiaka wewnątrzrdzeniowego jest czynnikiem źle rokującym pod względem powrotu funkcji neurologicznej, natomiast obrzęk rdzenia należy do zmian odwracalnych dających największe nadzieje na poprawę funkcji rdzenia [35,54,87,106].

Należy jednak zaznaczyć, że klasyczne obrazowanie MRI posiada również ograniczenia. Ostre zmiany pourazowe w obrazach  $T_1$  i  $T_2$  - zależnych wynikają z obecności w obrębie tkanki nerwowej rdzenia zwiększonej ilości wody lub krwi. MRI nie pozwala natomiast rozróżnić od siebie podstawowych dwóch rodzajów obrzęku, które również pojawiają się po urazie rdzenia – cytotoksycznego i wazogenego. Na podstawie obrazów badania MRI nie można stwierdzić, czy w obrębie obrzęku wywołanego urazem doszło do uszkodzenia włókien nerwowych. Zachowanie ciągłości struktury włókien nerwowych jest bowiem najistotniejszym czynnikiem, który decyduje o powrocie czynności rdzenia kręgowego.



### 1.3. Obrazowanie dyfuzji metodą rezonansu magnetycznego - DWI

#### Zjawisko dyfuzji

Zjawisko dyfuzji polega na przemieszczaniu się cząsteczek spowodowanym różnicą ich stężeń. Jeżeli w trakcie przemieszczania cząstki nie napotykają przeszkód, mamy do czynienia z dyfuzją swobodną. Jeżeli na swojej drodze napotykają przeszkody, to wtedy mówimy o dyfuzji ograniczonej. Istnieje kilka sposobów w jaki można opisać zjawisko dyfuzji. W układach gdzie istnieje makroskopowa różnica koncentracji cząstek, dyfuzję można ująć w sposób klasyczny, przy pomocy prawa Fick'a:

$$J = -D \Delta C$$

Wprowadzony przez to prawo współczynnik dyfuzji  $D$  jest stałą proporcjonalności między strumieniem gęstości cząstek  $J$  i gradientem ich koncentracji  $\Delta C$ . Charakteryzuje on swobodną dyfuzję w ośrodku izotropowym i jest wielkością stałą dla danej substancji, w danej temperaturze.

Procesy dyfuzyjne można również opisać przy pomocy metod fizyki statystycznej. Einstein udowodnił, że jeśli cząsteczka pierwotnie znajdowała się w punkcie  $r_0$ , to prawdopodobieństwo znalezienia jej po czasie  $t$  w punkcie  $r$  jest zgodne z rozkładem Gaussa. Dla dyfuzji swobodnej wyraża się to równaniem (Einsteina-Smoluchowskiego) określającym zależność pomiędzy średnim kwadratem drogi, a współczynnikiem dyfuzji  $D$ :

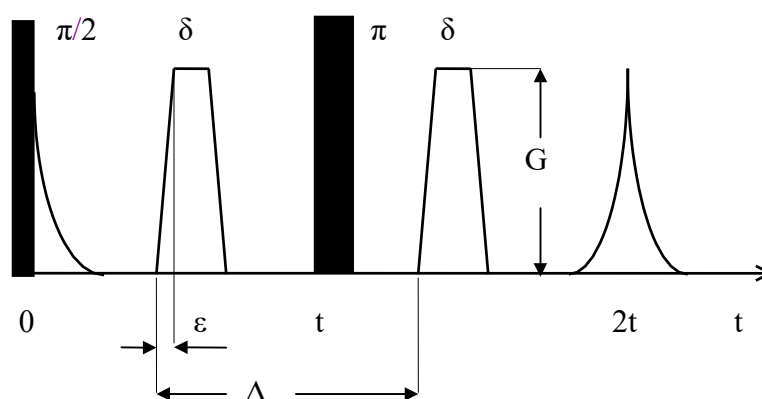
$$[(r - r_0)^2] = 6Dt$$

gdzie:  $r$  - położenie w chwili  $t$ ,  $r_0$  - położenie początkowe.

Układy biologiczne w rzeczywistości różnią się znacznie od rozważanej powyżej sytuacji dla przestrzeni idealnej (izotropowej), w której dyfuzja ma charakter swobodny. Posiadają one zazwyczaj skomplikowaną strukturę począwszy od poziomu subkomórkowego (organelle komórkowe, siateczka endoplazmatyczna, mikrotubule, mikrofilamenty), przez złożone układy komórek budujących tkanki i narządy. W wyniku takiej budowy pojawiają się liczne bariery, które utrudniają lub całkowicie uniemożliwiają swobodną dyfuzję cząsteczek, co określa się jako restrykcję dyfuzji. Taki stan, kiedy występuje przestrzenne zróżnicowanie kierunków i wartości dyfuzji nazywa się anizotropią dyfuzji [82].

## Wykorzystanie dyfuzji wody w rezonansie magnetycznym

Wpływ zjawiska dyfuzji na sygnał MR można najprościej przedstawić na przykładzie eksperymentu, który po raz pierwszy opisali Stejskal i Tanner w 1965 roku [96]. Opierał się on na sekwencji z pojedynczym echem spinowym, do którego dołączono dodatkowe gradienty dyfuzyjne symetrycznie położone względem impulsu  $\pi$  (Ryc.1).



Ryc.1. Sekwencja echa spinowego z dodanymi gradientami dyfuzyjnymi. G - amplituda gradientu,  $\epsilon$  - czas narastania gradientu,  $\delta$  - szerokość gradientu,  $\Delta$  - czas dyfuzji.

Zadaniem gradientów dyfuzyjnych jest rozróżnienie cząsteczek stacjonarnych od tych, które znajdują się w ruchu. Pierwszy impuls gradientowy (zakładając, że jest przyłożony w osi x) wprowadza przesunięcie fazowe wektora magnetyzacji poprzecznej dowolnego spinu o kąt:

$$\vartheta_1 = \gamma G x_1 dt$$

gdzie:  $\vartheta_1$  - zmiana fazy,  $x_1$  - położenie spinu w trakcie czasu trwania d gradientu G.

Następnie impuls RF  $180^\circ$  przekształca fazę spinu  $\vartheta_1$  na  $-\vartheta_2$ . Po drugim impulsie gradientowym znów pojawia się przesunięcie fazowe wektora magnetyzacji poprzecznej spinu o  $\vartheta_2 = \gamma G x_2 dt$ , gdzie  $x_2$  odpowiada pozycji spinu w trakcie trwania drugiego impulsu gradientowego. Sumaryczna zmiana fazy wektora magnetyzacji poprzecznej wynosi więc:

$$d\vartheta = \vartheta_2 - \vartheta_1 = \gamma G \delta (x_1 - x_2)$$

Z równania tego wynika, że jeżeli spin nie uległ przemieszczeniu pomiędzy dwoma impulsami gradientowymi, to sumaryczna zmiana fazy wynosi 0, oznacza to że wpływy gradientów dyfuzyjnych się równoważą. Natomiast dla spinów poruszających się w czasie  $\Delta$  zmiana fazy będzie różna od 0 i zależeć będzie od

odległości przebytej przez te spiny między impulsami gradientowymi. Spowoduje to rozfazowanie spinów w momencie powstawania echa, a co z tym jest związane, osłabienie amplitudy echa od tych spinów.

Ważnym czynnikiem w sekwencji pomiarowej jest czas dyfuzji ( $\Delta$ ), odpowiadający czasowi pomiędzy gradientami dyfuzyjnymi. W układach biologicznych występują liczne przeszkody dla dyfundujących cząstek. Jeżeli użyty czas dyfuzji będzie odpowiednio krótki, to poruszające się cząstki, nie zdążą dotrzeć do ograniczających barier, i tym samym obserwowany ruch będzie dyfuzją swobodną. Jeżeli czas będzie dłuższy, to cząstka odbije się i badany ruch będzie dyfuzją ograniczoną. Zmieniając zatem czas dyfuzji wpływa się na to, jakiej wielkości struktury (przestrzenie) na poziomie komórkowym chce się badać.

Stopień w jakim sekwencja MR jest uwrażliwiona na dyfuzję zależy od współczynnika  $b$ , który jest współczynnikiem stałym, zależnym od aparatury pomiarowej, która została zastosowana, sekwencji i wartości gradientów:

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

gdzie:  $\gamma$  - współczynnik żyromagnetyczny,  $G$  - gradient pola magnetycznego,  $\delta$  - szerokość gradientu,  $\Delta$  - czas dyfuzji.

Im  $b$  jest większe, tym większe jest tłumienie sygnału MR wskutek ruchów dyfuzyjnych i kontrast obrazu w większym stopniu zależny jest od dyfuzji. Wzrost wartości  $b$  powoduje, że obszary o szybszej dyfuzji wykazują większy spadek natężenia sygnału. Wartości współczynnika  $b$  w badaniach dyfuzji mieszczą się w granicach od kilkuset do kilku tysięcy  $s/mm^2$ .

Uzyskana z pomiaru z gradientami dyfuzyjnymi wartość amplitudy echa  $M$  oraz wartość amplitudy echa uzyskana z osobnego pomiaru bez użycia gradientów dyfuzyjnych  $M_0$  służą do wyliczenia współczynnika dyfuzji  $D$ :

$$M/M_0 = \exp(-bD)$$

Zakłada się, że opisany w ten sposób współczynnik dyfuzji jest monoexponencjalny, czyli dotyczy procesu dyfuzji zachodzącego swobodnie w nieograniczonej i jednorodnej (izotropowej) przestrzeni [55,82].

### **Całkowity współczynnik dyfuzji - ADC**

W czasie wykonywania badań DW-MRI dyfuzja cząsteczek nie jest jedynym typem ruchu zachodzącym w badanym obiekcie biologicznym. W obrębie komórek i tkanek odbywa się w sposób ciągły przemieszczanie wody i innych składników pomiędzy organellami komórkowymi, pomiędzy przestrzenią wewnątrzkomórkową,

wewnątrznaczyniową i płynem tkankowym. Poza ruchem w skali mikroskopowej odbywa się ruch tkanek i narządów wewnętrznych wywołany pracą mięśni gładkich, ruch związany z przepływem krwi oraz z oddychaniem, akcją serca, tętnieniem naczyń krwionośnych i ruchami mięśni szkieletowych. Ponieważ ruch dyfuzyjny cząstek jest stosunkowo dość wolny, to nawet wolne ruchy ciała mogą spowodować zatarcie jego efektu w obrazie MR. Dlatego stosuje się różne techniki sprzęgające sekwencję pomiarową z oddechem i akcją serca po to, aby nakładanie się tych ruchów wyeliminować lub w jak największym stopniu ograniczyć. Pomimo to nie można uniknąć sumowania się ruchów dyfuzyjnych z przepływem krwi, płynu mózgowo rdzeniowego, czy też tętnieniem naczyń krwionośnych. Dlatego aby odzwierciedlić fakt, że dyfuzja wody nie jest jedynym procesem, który bierze udział w pomiarze, dla obliczonego współczynnika dyfuzji  $D$  używa się określenia - całkowity współczynnik dyfuzji (Apparent Diffusion Coefficient - ADC) [55].

### **Dyfuzja biexponencjalna**

Opisane powyżej założenia odnoszą się do układów monoexponencjalnych, w których wartość współczynnika dyfuzji (ADC) nie zależy od zmian współczynnika  $b$ . Na podstawie badań okazało się jednak, że w układach biologicznych, ze względu na ich skomplikowaną strukturę, dyfuzja ma charakter nie-monoexponencjalny, co oznacza, że zmiany wartości współczynnika  $b$  wpływają na wartość współczynnika dyfuzji ADC. Badania dyfuzji nie-monoexponencjalnej polega na wielokrotnym powtórzeniu pomiarów z różnymi, rosnącymi wartościami współczynnika  $b$  (do kilku, a nawet kilkudziesięciu tysięcy). Dla uproszczenia zakłada się, że w obrębie tkanek występują dwa zasadnicze układy przemieszczającej się wody charakteryzujące się wolną i szybką dyfuzją (układ biexponencjalny). Przy dużych wartościach współczynnika  $b$ , przy których sygnał z obszarów o szybkiej dyfuzji ulega znacznemu osłabieniu, uwidacznia się wolna składowa, a przy małych wartościach  $b$  odwrotnie szybka składowa dyfuzji [31,103]. Obecność dyfuzji biexponencjalnej potwierdzono zarówno w tkankach mózgowia, jak i rdzenia kręgowego u zwierząt doświadczalnych i człowieka [21,47,72]. Pierwsze doniesienia wiązały szybką składową z przestrzenią zewnątrzkomórkową, a wolną składową z przestrzenią wewnątrzkomórkową. Jednak dalsze badania na modelach doświadczalnych wykazały że, zarówno dyfuzja w przestrzeni wewnątrz jak i zewnątrzkomórkowej może być anizotropowa, nie-monoexponencjalna, czyli obie składowe można zaobserwować wewnątrz i na zewnątrz komórki. Wewnątrz

komórek dyfuzja podlega silnemu ograniczeniu (restrykcji), a ADC zależy od wielkości komórki, jak i czasu dyfuzji. Natomiast dyfuzja w przestrzeni zewnątrzkomórkowej zależy przede wszystkim od przestrzennego układu komórek określanego jako stopień krętości (ang. tortuosity) [95].

### **Sposoby obrazowania dyfuzji przy pomocy rezonansu magnetycznego.**

Dyfuzję wody można badać przy pomocy rezonansu magnetycznego na kilka sposobów. Najprostszą formą są obrazy dyfuzyjnie ważone. Badanie takie polega na zastosowaniu gradientów dyfuzyjnych do dowolnej sekwencji pomiarowej. Uzyskuje się w ten sposób obraz, którego kontrast odzwierciedla wielkość dyfuzji w różnych obszarach. Najczęściej wykorzystuje się proste sekwencje echa spinowego, ze względu na dobry stosunek sygnału do szumu. Otrzymany w ten sposób obraz oprócz zależności od  $T_1$ ,  $T_2$ , czy gęstości protonowej, wykazuje również zależność od dyfuzji. Jest to wyłącznie metoda jakościowa, nie pozwalająca określić wartości ani kierunku dyfuzji.

Dokładniejszym sposobem jest obrazowanie map współczynnika dyfuzji [89]. Metoda ta wymaga wykonania dla każdej badanej warstwy czterech obrazów: trzech z gradientami dyfuzyjnymi w trzech prostopadłych do siebie osiach x, y, z oraz jednego bez gradientów. Uzyskane obrazy służą do otrzymania map współczynnika dyfuzji ADC. Porównanie otrzymanych obrazów daje pojęcie o stopniu anizotropii dyfuzji w tkankach, ale nie pozwala na jej przestrzenną analizę, ponieważ związana jest ona z osiami x, y, z aparatury pomiarowej, a nie badanego obiektu. Dlatego zmiany położenia badanego obiektu w magnecie powodują zmiany uzyskanych wyników.

Najdokładniejszym, ale i najtrudniejszym sposobem badania dyfuzji przy pomocy rezonansu magnetycznego jest obrazowanie tensora dyfuzji [10]. Badanie to polega na wykonaniu co najmniej sześciu obrazów z gradientami dyfuzyjnymi: trzech przyłożonych w osiach głównych układu pomiarowego x, y, z oraz trzech w osiach mieszanych xy, xz, yz. Ponadto badanie wymaga wykonania jednego obrazu bez gradientów dyfuzyjnych. W efekcie otrzymuje się składowe tensora w postaci macierzy :

$$\begin{array}{ccc} a_{xx} & a_{xy} & a_{xz} \\ & a_{yy} & a_{yz} \\ & & a_{zz} \end{array}$$

Łączna liczba składowych tensora, odpowiadających kierunkom gradientów dyfuzyjnych jest równa sześć. Składowe  $a_{xx}$ ,  $a_{yy}$ ,  $a_{zz}$ , są składowymi przekątnymi lub diagonalnymi. Pozostałe składowe określa się jako pozadiagonalne. Przeciwnie składowe pozadiagonalne pomija się, zakładając, że tensor jest układem symetrycznym. Składowe tensora odzwierciedlają współczynniki dyfuzji w poszczególnych kierunkach, w odniesieniu do osi układu pomiarowego. Po przekształceniach matematycznych tzw. diagonalizacji otrzymuje się trzy główne wartości składowych tensora dyfuzji w układzie współrzędnych związanym z badaną tkanką lub narządem. Wartości te są niezależne od ułożenia badanego obiektu w przestrzeni.  $\lambda_1$  oznacza kierunek z najsilniejszą dyfuzją, a  $\lambda_2$  i  $\lambda_3$  oznaczają kierunki do niego prostopadłe:

$$\begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix}$$

Dane zebrane w trakcie pomiarów służą następnie do wyliczenia parametrów charakteryzujących stopień anizotropii badanego układu. Są to:

współczynnik dyfuzji podłużnej -  $DL = \lambda_3$

współczynnik dyfuzji poprzecznej -  $DT = (\lambda_1 + \lambda_2)/2$

współczynnik izotropii -  $ID = DT/DL$

współczynnik anizotropii -  $AI = (DL - DT)/(DL + DT)$

oraz ślad macierzy -  $TR = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3$  - będący sumą głównych składników macierzy tensora.

Obrazowanie tensora dyfuzji jest metodą ilościową, pozwalającą na dokładną ocenę dyfuzji w poszczególnych kierunkach, a więc zmiany jej anizotropii. Jednak ze względu na konieczność wykonania aż siedmiu pomiarów jest to metoda najbardziej czasochłonna.

Obrazowanie dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego DWI jest już standardową i powszechnie stosowaną metodą w diagnostyce schorzeń mózgowia począwszy od chorób naczyniowych, zapalnych, przez choroby demielinizacyjne, nowotworowe i wiele innych [83,102]. Najwcześniej metoda ta znalazła zastosowanie w diagnostyce udaru niedokrwiennego mózgu, gdzie pod względem czułości w wykrywaniu wczesnych zmian, ustępuje tylko technikom perfuzyjnym. Zmiany o charakterze restrykcji dyfuzji w obszarze niedokrwienia, można zaobserwować już po około 15 minutach (w badaniach doświadczalnych po 3

minutach) od wystąpienia ischemii, przy równoczesnym braku zmian w innych metodach obrazowych (TK, konwencjonalne MRI) [56,71]. Obrazowanie tensora dyfuzji zostało wykorzystane również do mapowania przebiegu włókien nerwowych w istocie białej mózgu [64].

## 1.4. Zastosowanie techniki DWI do badań rdzenia kręgowego

### Ograniczenia metody

W odróżnieniu od badań mózgowia nie ma jeszcze standardowych procedur pozwalających na badanie metodą DWI rdzenia kręgowego. Trudności w zastosowaniu tej techniki wynikają z kilku względów. Małe rozmiary rdzenia wymagają zastosowania obrazów o wyższej niż standardowo rozdzielczości, a otaczający rdzeń, zbudowany głównie z tkanki kostnej kręgosłup powoduje zaburzenia jednorodności pola magnetycznego we wnętrzu kanału kręgowego. W wyniku tego, lepszej jakości obrazy uzyskuje się przy zastosowaniu aparatów generujących wyższe natężenia pola magnetycznego. Równocześnie sygnał MR zakłócany jest przez nakładanie się na ruch dyfuzyjny ruchu płynów i tkanek w otoczeniu. Dlatego prawie zawsze w badaniach tych, stosuje się sprzężenie sekwencji pomiarowej z akcją serca i rytmem oddechowym. Niestety nie da się wyeliminować przepływu krwi i tętnienia naczyń krwionośnych, a także ruchu przepływającego w przestrzeni podpajęczynówkowej płynu mózgowo-rdzeniowego. Dużym ograniczeniem jest również czas badania, dłuższy niż w klasycznym badaniu MRI, szczególnie jeżeli dotyczy obrazowania tensora dyfuzji.

Najlepsze wyniki uzyskuje się w badaniach eksperymentalnych *ex - vivo*, przy których można zastosować wysokie natężenie pola magnetycznego i uzyskać obrazy o bardzo wysokiej rozdzielczości. Nie ma również ograniczeń w czasie badania, dzięki czemu można otrzymać najdokładniejsze pomiary dyfuzji wody w tkankach rdzenia przy pomocy obrazowania tensora dyfuzji. Jedynym problemem są różnice w otrzymanych wartościach współczynników dyfuzji wynikające z zastosowania do utrwalania wyizolowanego rdzenia formaldehydu. Efektem jego działania jest denaturacja białek i stabilizacja błon komórkowych, co wpływa na niższe wartości współczynnika ADC [78,88].

W badaniach doświadczalnych na żywych zwierzętach pojawiają się problemy artefaktów ruchowych i ograniczenie czasu badania. W badaniach tych nie stosuje się również tak wysokich natężeń pola magnetycznego, jak w badaniach wypreparowanych rdzeni, ponieważ magnesy aparatury pomiarowej generujące wysokie pole mają zbyt małe otwory, aby można było umieścić w nich całe zwierzę. Ponadto w badaniach tych rdzeń położony jest dalej od cewki nadawczo-odbiorczej, niż w badaniach *ex - vivo*. Efektem powyższych różnic jest niższy stosunek sygnału do szumu wpływający na jakość obrazów. Problem odległości rdzenia od cewki



pomiarowej próbowano rozwiązać stosując cewki implantowane, umieszczane w tkankach grzbietu zwierząt, tuż nad odsłoniętym rdzeniem kręgowym [1,36]. Należy również pamiętać o ułożeniu badanego zwierzęcia, w taki sposób, aby rdzeń położony był idealnie równoległe do długiej osi magnesu, co ma wpływ na wyniki, zwłaszcza jeśli nie bada się pełnego tensora dyfuzji.

Istnieje wiele rodzajów sekwencji pomiarowych które można wykorzystać do obrazowania dyfuzji wody, a każda z nich ma swoje wady i zalety. Klasyczne sekwencje echa spinowego cechują się dobrym stosunkiem sygnału do szumu, jednak z powodu długiego czasu trwania są bardziej wrażliwe na artefakty ruchowe. Z kolei sekwencje oparte na zjawisku echa planarnego charakteryzują się krótkim czasem trwania, ale za to niższym stosunkiem sygnału do szumu i gorszą rozdzielczością.

### **Obrazowanie anizotropii dyfuzji wody**

Najdokładniejszym sposobem pomiaru dyfuzji wody jest obrazowanie tensora dyfuzji. Wyniki doświadczeń w badaniach tensora dyfuzji w rdzeniu kręgowym pozwoliły na stworzeniu prostszego, ale również skutecznego modelu badania dyfuzji wody.

Rdzeń kręgowy ma kształt prawie regularnego walca cechującego się dużą symetrią budowy anatomicznej. Jego zewnętrzną warstwę tworzy istota biała zbudowana z ciasno upakowanych i równoległe ułożonych względem długiej osi rdzenia zmielinizowanych włókien nerwowych. W wyniku takiej budowy istota biała odznacza się wysoką anizotropią, czyli dyfuzja wzdłuż jej włókien jest znacznie większa niż dyfuzja w kierunkach poprzecznych do włókien. Natomiast w położonej wewnątrz rdzenia istocie szarej, składającej się głównie z luźniej ułożonych komórek różnej wielkości, dyfuzja we wszystkich kierunkach ma podobne wartości. Dlatego układając rdzeń kręgowy w aparaturze pomiarowej, jak najdokładniej, jego długą osią zgodnie z długą osią z tej aparatury otrzymujemy układ, w którym struktura anatomiczna i główne kierunki dyfuzji w rdzeniu zgodne są z kierunkami układu współrzędnych aparatury pomiarowej.

Stosując taki układ rdzenia można oprzeć badanie na obrazowaniu map współczynnika dyfuzji i ograniczyć się do wykonania tylko czterech pomiarów: jednego bez gradientów dyfuzyjnych i trzech z gradientami dyfuzyjnymi zgodnymi z głównymi osiami aparatury pomiarowej x, y, z. Kierunki tych gradientów pokrywają się wtedy również z głównymi osiami rdzenia kręgowego. Oś z wyznacza zawsze

kierunek kranio-kaudalny, a pozostałe dwa kierunek brzuszno-grzbietowy i prawolewy. Niektórzy autorzy w jeszcze większy sposób skracają badanie, ograniczając badane kierunki poprzeczne tylko do jednego (x lub y). W porównaniu z obrazowaniem tensora dyfuzji opuszcza się badanie z gradientami w osiach mieszanych (xy, xz, yz). Uzyskane obrazy ważone dyfuzyjnie służą następnie do obliczenia map współczynnika dyfuzji ADC.

Wartości współczynników dyfuzji ( $ADC_x$ ,  $ADC_y$ ,  $ADC_z$ ) wykorzystuje się następnie (podobnie jak w przypadku tensora dyfuzji) do wyliczenia parametrów opisujących stopień anizotropii badanego układu:

współczynnika dyfuzji podłużnej -  $lADC = ADC_z$

współczynnika dyfuzji poprzecznej -  $tADC = (ADC_x + ADC_y)/2$

współczynnika izotropii -  $ID = tADC/lADC$

współczynnika anizotropii -  $AI = (lADC - tADC)/(lADC + tADC)$

Obliczone w ten sposób współczynniki dyfuzji nie są tożsame ze współczynnikami tensora dyfuzji, ponieważ opisują dyfuzję tylko na podstawie trzech (lub dwóch) kierunków, związaną z osiami układu pomiarowego. Ale ze względu na specyficzną budowę i ułożenie rdzenia w stosunku do układu współrzędnych aparatury pomiarowej, są powtarzalne i mogą być porównywane ze współczynnikami uzyskanymi z obliczeń tensora dyfuzji. Podstawową zaletą tego sposobu badania dyfuzji wody jest skrócenie czasu pomiaru w porównaniu do obrazowania pełnego tensora dyfuzji o około połowę, co ma szczególne znaczenie w badaniach eksperymentalnych in-vivo oraz badaniach u ludzi. Metodę tą, dla odróżnienia od obrazowania tensora dyfuzji (Diffusion Tensor Imaging - DTI) określa się jako obrazowanie anizotropii dyfuzji (Diffusion Anisotropy Imaging - DAI) [17,45,74].

Szerokie możliwości modyfikacji sposobu obrazowania, a następnie zbierania i analizowania danych sprawiają, że istnieją wśród autorów badań różnice w przedstawianiu uzyskanych wyników. W większości prac dla określenia współczynnika dyfuzji podłużnej używa się skrótu  $lADC$  (longitudinal), natomiast dla dyfuzji poprzecznej  $tADC$  (transverse), niezależnie czy dotyczy to średniej wartości dyfuzji dla dwóch kierunków (x i y), czy tylko jednego z nich. Różnice dotyczą również sposobów przedstawiania współczynnika anizotropii, definiowanego również jako:  $AI = tADC/lADC$  [89,92] lub  $AI = lADC/tADC$  [40].

## Ocena prawidłowego rdzenia kręgowego

Badania eksperymentalne zarówno na wyizolowanych rdzeniach kręgowych jak i na żywych zwierzętach prowadzone są w oparciu o badanie tensora dyfuzji, jak również różne modyfikacje obrazowania map współczynników dyfuzji różniące się ilością badań z gradientami dyfuzyjnymi w osiach poprzecznych do rdzenia.

Istotę białą rdzenia kręgowego tworzą gęsto upakowane, otoczone osłonką mielinową włókna nerwowe, zawierające w swym wnętrzu podłużnie biegnące neurofilamenty i mikrotubule wzdłuż, których odbywa się szybki transport aksonalny. Badania dyfuzji wody prawidłowych rdzeni kręgowych potwierdziły wysoce anizotropową strukturę istoty białej, w której wartość dyfuzji podłużnej (lADC) znacznie przewyższa wartość dyfuzji poprzecznej (tADC). Jednocześnie wartości dyfuzji mierzone w kierunkach poprzecznych do osi rdzenia (ADC<sub>x</sub> i ADC<sub>y</sub>) są do siebie zbliżone [14,34]. Badania doświadczalne na szczurach z genetycznie uwarunkowanym deficytem osłonek mielinowych wykazały, że istota biała w rdzeniach tych szczurów również wykazuje własności anizotropowe, niższe o około 20% niż u osobników zdrowych. Było to wynikiem znacznego zwiększenia się dyfuzji poprzecznej i w mniejszym stopniu obniżenia dyfuzji podłużnej [41]. Również badania na izolowanych nerwach ryb z zastosowaniem vinblastyny, która depolimeryzując mikrotubule hamowała szybki transport aksonalny wykazały, że w nerwach tych anizotropia również została zachowana, choć wartości dyfuzji podłużnej i poprzecznej uległy znacznemu zmniejszeniu [13]. Z powyższych badań wynika, że czynnikiem, który w decydujący sposób wpływa na wysoką anizotropię istoty białej są błony komórkowe otaczające aksony. Natomiast mielinizacja włókien zwiększa tylko stopień anizotropii, ograniczając dyfuzję w kierunkach poprzecznych i w mniejszym stopniu podnosząc wartość dyfuzji podłużnej.

W istocie szarej rdzenia zbudowanej z różniących się wielkością i kształtem komórek sytuacja nie jest tak jednoznaczna. Ogólnie wartości dyfuzji podłużnej i poprzecznej są do siebie zbliżone. Przy czym wartości tADC są większe, a wartości lADC mniejsze niż w istocie białej. Wykazano niewielkiego stopnia anizotropię w istocie szarej przy wyższym lADC niż tADC (na rdzeniach szczurów *in vitro*) [37] oraz przy nieco wyższym tADC niż lADC (na rdzeniach kotów *in vitro*) [78]. Badania wysokiej rozdzielczości rdzenia kręgowego szczura w polu 7 i 14 tesli pozwoliły na wyodrębnienie w istocie szarej miejsc o wyższej anizotropii dyfuzji, co wynikało z przebiegu włókien nerwowych. Uwidoczniono zwiększoną dyfuzję podłużną w istocie galaretowatej rogów tylnych, oraz zwiększoną dyfuzję

poprzeczną, w kierunku prawo - lewym w spoidle szarym przednim [44]. W tabeli 1 zestawiono wartości współczynników dyfuzji podłużnej i poprzecznej dla istoty białej i szarej prawidłowych rdzeni kręgowych szczurów, w badaniach in - vivo [34,39].

Tab. 1. Wartości lADC i tADC w istocie białej (WM) i szarej (GM), prawidłowych rdzeni kręgowych szczurów, w badaniach in - vivo.

		lADC [mm <sup>2</sup> /s]	tADC [mm <sup>2</sup> /s]
rdzeń piersiowy wg Feneysa [34]	WM	$2.22 \cdot 10^{-3}$	$0.36 \cdot 10^{-3}$
	GM	$1.36 \cdot 10^{-3}$	$0.41 \cdot 10^{-3}$
rdzeń szyjny wg Franconiego [39]	WM	$1.85 \cdot 10^{-3}$	$0.18 \cdot 10^{-3}$
	GM	$1.05 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$

lADC - współczynnik dyfuzji podłużnej, tADC - współczynnik dyfuzji poprzecznej

## 1.5. Patofizjologia urazu mechanicznego rdzenia kręgowego

Urazy mechaniczne rdzenia kręgowego można w stosunkowo prosty sposób, zaproponowany przez Bunge'a, podzielić na podstawie obrazu morfologicznego na cztery główne rodzaje: urazy lite, stłuczenia, lacerację i masywne zgniecenia [18].

- Urazy lite obejmują przypadki, w których rdzeń kręgowy wygląda prawie „normalnie”, bez zmian zabarwienia, kształtu czy cech tworzenia się w obrębie jego tkanek przestrzeni jamistych. Zmiany pourazowe widoczne są natomiast w obrazie mikroskopowym.
- W stłuczeniu nie stwierdza się naruszenia ciągłości powierzchni rdzenia, ale w obrębie jego tkanek obecne są krwiaki i obszary martwicy mogące przekształcić się w jamy.
- Laceracja dotyczy urazów, w których dochodzi do przerwania zewnętrznej powierzchni rdzenia, najczęściej przez przemieszczone odłamy kostne złamanych kręgów. W centrum urazu częściej niż przestrzenie płynowe pojawia się bliznowata tkanka łączna.
- W masywnym zgnieceniu, które najczęściej towarzyszy ciężkiemu złamaniu kręgosłupa, tkanki rdzenia ulegają znacznemu pofragmentowaniu, czemu towarzyszy krwawieniem, a następnie rozwój rozległej blizny łącznotkankowej obejmującej również otaczające rdzeń opony.

Zmiany, jakie zachodzą w tkankach rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym mają charakter dwustopniowy, na który składają się procesy pierwotne i wtórne. Mechanizmy pierwotne związane są z bezpośrednim działaniem czynnika uszkodzającego, który powoduje zniszczenie struktury tkanek rdzenia i następnie wyzwala kaskadę procesów wtórnych. Mechanizmy wtórne stanowią cały szereg przebiegających równocześnie i sprzężonych ze sobą procesów biochemicznych prowadzących do dalszego uszkodzenia komórek i powiększenia się obszaru urazu. Tabela 2 przedstawia zebrane najważniejsze pierwotne i wtórne mechanizmy biorące udział w patologii urazu mechanicznego rdzenia kręgowego [20,29,75,85].

Tab. 2 . Pierwotne i wtórne mechanizmy urazu rdzenia kręgowego

Mechanizmy pierwotne

---

zniszczenie struktury tkanki nerwowej

- odkształcenie
- stłuczenie
- rozerwanie

bezpośrednie uszkodzenie naczyń krwionośnych

Mechanizmy wtórne

---

zmiany w układzie sercowo-naczyniowym

- systemowe - wstrząs neurogeny
- miejscowe - krwotoki
  - skurcz naczyń
  - zaburzenia autoregulacji
  - powstawanie zakrzepów
  - zaburzenia mikrokrążenia

zniesienie bariery krew-mózg (rdzeń)

niedokrwienie i niedotlenienie

utrata zasobów energii - spadek produkcji ATP

zaburzenie funkcji  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPazy

zaburzenia elektrolitowe - wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$   
- wzrost stężenia pozakomórkowego  $\text{K}^+$

obrzęk

powstawanie wolnych rodników

ekscytotoksyczność

powstawanie pochodnych kwasu arachidonowego

apoptoza

odczyn zapalny

---

Procesy pierwotne obejmują uszkodzenie struktury neuronów począwszy od naciągnięcia, skręcenia, zgniecenia, aż do ich całkowitego przerwania oraz bezpośrednie uszkodzenia naczyń krwionośnych. Miejscowe zmiany w układzie naczyniowym wywołane zarówno pierwotnym, mechanicznym ich uszkodzeniem, jak i procesami wtórnymi obejmującymi krwawienie, skurcz naczyń, zaburzenia autoregulacji, powstawanie mikrozakrzepów, prowadzą w efekcie do obniżenia się rdzeniowego przepływu krwi. Rozwijające się w ten sposób niedokrwienie i niedotlenienie rdzenia jest jednym z głównych elementów wtórnego urazu i jest zarazem czynnikiem wyzwalającym pozostałe mechanizmy. Zmiany krwotoczne rozpoczynają się i dotyczą głównie istoty szarej, począwszy od rozdzęcia i rozerwania

venuli, następnie powstawania małych krwotoków w przestrzeniach okołonaczyniowych, aż do rozwinięcia się centralnej martwicy krwotocznej [99].

Uraz rdzenia wywołuje nie tylko miejscowe zmiany w układzie naczyniowym, ale również może prowadzić do wystąpienia wstrząsu neurogennego. Jest to wynik obniżenia napięcia układu współczulnego, które prowadzi do spadku oporu naczyniowego i zmniejszenia objętości krwi wyrzucanej przez serce. W efekcie prowadzi to do spadku ciśnienia tętniczego krwi. Wystąpienie wstrząsu poprzedza zazwyczaj krótkotrwałe (kilkuminutowe) podwyższenie ciśnienia tętniczego [98].

Ważnym czynnikiem rozwijającym się po urazie jest obrzęk tkanek rdzenia. Zgodnie z ogólnie przyjętym podziałem wyróżnia się obrzęk wazogeny i cytotoksyczny. Obrzęk wazogeny jest wynikiem uszkodzenia bariery krew-mózg i przedostawania się wysokobiałkowego osocza do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Obrzęk cytotoksyczny jest natomiast wynikiem napływu zwiększonej ilości wody do wnętrza komórek. Obrzęk tkanek rdzenia kręgowego może utrzymywać się do dwóch tygodni po urazie [19].

Niedokrwienie i związane z tym niedotlenienie powodują zaburzenie procesów tlenowej fosforylacji i wzrost użytkowania beztlenowej glikolizy, co prowadzi do zmniejszenia zapasów wysokoenergetycznych fosforanów (ATP) i wzrostu stężenia kwasu mlekowego. W wyniku tych zmian dochodzi do zaburzeń czynności  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{++}$  zależnych ATPaz i swobodnego przepływu przez błony komórkowe jonów sodu, potasu i wapnia. W efekcie prowadzi to do depolaryzacji błon komórkowych oraz wzrostu stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego [52].

Wapń jest jednym z ważniejszych mediatorów, ponieważ jest elementem pośredniczącym pomiędzy różnymi mechanizmami urazu. Wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego jest wynikiem zarówno zwiększonego napływu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak również uwolnienia jego zapasów wewnątrzkomórkowych (siateczka endoplazmatyczna, mitochondria). Prowadzi to do szeregu reakcji przyczyniających się do śmierci komórki. Przeładowanie wapniem pomp mitochondrialnych powoduje zatrzymanie tlenowej fosforylacji i jeszcze większy spadek produkcji ATP. Aktywacji ulegają zależne od wapnia enzymy wewnątrzkomórkowe (proteazy i lipazy), takie jak: fosfolipaza  $\text{A}_2$ , fosfolipaza C, endonukleaza, lipooxygenaza, cyklooxygenaza, i kalpaina [29].

Aktywacja fosfolipazy  $\text{A}_2$  powoduje uruchomienie kaskady kwasu arachidonowego. W wyniku jego przemian powstają prostaglandyny, tromboksany i

leukotrieny. Prostaglandyny (poza prostacykliną PGI<sub>2</sub>) powodują uszkodzenie neuronów poprzez zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych i modulację aktywność neurotransmiterów. Tromboksan A<sub>2</sub> powoduje wzrost agregacji płytek krwi i podobnie jak leukotrien B<sub>4</sub> nasila skurcz naczyń krwionośnych. Kalpaina natomiast niszczy składniki cytoszkieletu i receptory błonowe [29].

W wyniku przemian kwasu arachidonowego dochodzi również do uwolnienia wolnych rodników tlenowych, związków o bardzo dużej aktywności biologicznej, które poprzez peroksydację lipidów uszkadzają mitochondria, DNA, a przede wszystkim błony komórkowe[29].

Odczyny zapalne obejmują zarówno zmiany naczyniowe, odpowiedź komórkową jak i mediatory chemiczne. W pierwszej kolejności dominują nacieki neutrofili, które pojawiają się w centrum urazu już w pierwszej dobie. Następnie pojawiają się makrofagi fagocytujące zniszczone tkanki [29].

Potwierdzono również udział apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórek w patologii urazu rdzenia kręgowego. Obejmuje ona neurony, oligodendrocyty, mikroglej i prawdopodobnie astrocyty. Apoptoza w neuronach rozpoczynać się może zarówno przez aktywację receptora Fas w błonie komórkowej, jak również w ich wnętrzu kiedy na skutek nadmiernego nagromadzenia się jonów wapnia dochodzi do uszkodzenia mitochondriów i uwolnienia cytochromu c. Aktywowana w ten sposób kaskada enzymów - kaspaz - prowadzi do uszkodzenia białek cytoszkieletu, enzymów jądrowych, DNA i w końcowym efekcie do śmierci komórki [12].

### **Ekscytotoksyczność**

Termin ekscytotoksyczność oznacza neurotoksyczne działanie aminokwasów pobudzających, szczególnie kwasu glutaminowego. Substancja ta jest naturalnym neuromediatozem pobudzającym, szeroko rozpowszechnionym w ośrodkowym układzie nerwowym. W wyniku uszkodzenia tkanki nerwowej na skutek urazu lub niedotlenienia bardzo szybko, w przeciągu kilku minut dochodzi do nadmiernego uwalniania i gromadzenia się w przestrzeni pozakomórkowej kwasu glutaminowego, który aktywuje wszystkie rodzaje receptorów glutaminergicznych. Nasilona i przedłużona stymulacja tych receptorów powoduje wzrostu poziomu wapnia we wnętrzu komórek. Jest to wynikiem zarówno zwiększonego napływu z zewnątrz, jak i uwalniania z magazynów wewnątrzkomórkowych. Jony wapnia aktywują dalsze procesy wtórnego uszkodzenia i prowadzą do śmierci komórek [63,77].



Receptory glutaminergiczne, przez które działa kwas glutaminowy zostały podzielone na dwie główne grupy: receptory jonotropowe (iGluRs) - NMDA, AMPA i kainianowe oraz receptory metabotropowe (mGluRs) - typy I, II i III [26]. Receptory jonotropowe AMPA i kainianowe określa się razem jako non-NMDA. Zestawienie wszystkich receptorów glutaminergicznych zawiera tabela 3.

Tab. 3. Rodzaje receptorów glutaminergicznych (typy i podtypy)

Receptory jonotropowe - iGluRs

NMDA	NR1 NR2A, NR2B, NR2C, NR2D NR3
AMPA	GluR1, GluR2, GluR3, GluR4
Kainianowe	GluR5, GluR6, GluR7 KA1, KA2

Receptory metabotropowe - mGluRs

I	mGluR1 ( $\alpha, \beta, c, e$ ), mGluR5 (a,b)
II	mGluR2, mGluR3
III	mGluR4 (a,b), mGluR6, mGluR7, mGluR8

NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy, AMPA-kwas  $\alpha$ -Amino-3-hydroksy-5metylo-4-izoksazylopropionowy,

Receptory jonotropowe są bardzo szeroko rozpowszechnione w układzie nerwowym, nie tylko na neuronach, ale także na komórkach glejowych. Związane są z kanałami jonowymi, a ich pobudzenie prowadzi do napływu do wnętrza komórki jonów sodu, potasu i wapnia, i uruchomienia dalszej kaskady wtórnych procesów prowadzących do śmierci komórki. Receptory jonotropowe non-NMDA (GluR4, GluR6/7, KA2) zidentyfikowano w istocie białej rdzenia kręgowego na błonach komórkowych astrocytów [4]. Uważa się, że astrocyty mogą odgrywać decydującą rolę w glutaminergicznym uszkodzeniu istoty białej, jak również, że mogą modyfikować reakcje ekscytotoksyczne i „osłaniać” przed nimi neurony. Także oligodendrocyty wykazują obecność receptorów AMPA, które aktywowane przez kwas glutaminowy prowadzą do szybkiej śmierci tych komórek [105].

Na podstawie badań z selektywnymi antagonistami receptorów jonotropowych wykazano, że zarówno receptory NMDA jak i AMPA odpowiadają za uszkodzenie istoty białej rdzenia kręgowego. W badaniach tych wykazano, że

zarówno MK-801 (antagonista receptorów NMDA), jak również NBQX (antagonista receptorów AMPA) ograniczają uszkodzenie tkanki nerwowej i deficyt neurologiczny wywołane urazem. Zauważono również, że lepszy efekt neuroprotekcyny uzyskuje się stosując bloker receptorów AMPA lub kombinację blokerów AMPA i NMDA niż sam bloker receptorów NMDA [4,57,59].

Receptory metabotropowe związane są z białkiem G i systemem wtórnych przekaźników. Wszystkie ich typy z wyjątkiem mGluR6 i mGluR8 zostały znalezione w rdzeniu kręgowym. Modułują one funkcje somatosensoryczne, autonomiczne i motoryczne na poziomie rdzenia kręgowego. Receptory mGluRI zlokalizowane są zarówno pre-, jak i postsynaptycznie. Ich pobudzenie prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, powstania trifosfoinozytolu ( $IP_3$ ) i wzrostu poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego. Natomiast receptory mGluRII i III związane są z cyklazą adenylową (cAMP), znajdują się głównie presynaptycznie i pełnią funkcję autoreceptorów modulujących uwalnianie neurotransmiterów [68].

Dość dobrze poznano rozmieszczenie poszczególnych typów metabotropowych receptorów glutaminergicznych w obrębie istoty szarej rdzenia kręgowego. Zgodnie z budową warstwową istoty szarej rdzenia kręgowego, położone najbardziej grzbietowo w rogu tylnym blaszki I i II odbierają pobudzenie z małych zmielinizowanych i bezmielinowych włókien przewodzących impulsy z nocyreceptorów i termoreceptorów. Głębsze blaszki (III-V) odbierają pobudzenie z blaszek I i II i z większych zmielinizowanych włókien przewodzących impulsy z mechanoreceptorów w mięśniach, szkieletcie, skórze i tkance podskórnej [69].

Receptory mGluRI zostały zlokalizowane zarówno w rogach grzbietowych (blaszki III-V), jak i brzusznych (blaszki VI-IX). Receptory mGluR5 znaleziono we wszystkich warstwach z największym nasileniem występowania w blaszkach I i II. Motoneurony rdzenia kręgowego wykazują obecność receptorów mGluR1 oraz tylko nieznaczną obecność lub brak receptorów mGluR5. Receptory mGluR2/3 w największej ilości występują w blaszce II, po czym w mniejszej ilości obecne są w głębszych blaszkach II i IV. Taka lokalizacja wskazuje na udział receptorów mGluR2/3 i mGluR5 w procesie nocycypcji oraz na udział receptorów mGluR1 w przetwarzaniu informacji z mechanoreceptorów i integracji informacji bólowej z wyższych blaszek. Receptory metabotropowe mGluR1 obecne są również na astrocytach istoty białej rdzenia kręgowego [3,5,66,68]

Zaobserwowano również zmiany w poziomach ekspresji poszczególnych typów receptorów metabotropowych zachodzące w czasie po urazie mechanicznym.

Ilość receptorów mGluR1 wzrasta w segmentach rdzenia położonych po obu stronach od centrum urazu i utrzymuje się na zwiększonym poziomie do 60 dni po urazie. Ilość receptorów mGluR5 nielega istotnym zmianom w czasie. Natomiast ilość receptorów metabotropowych typu II stopniowo z czasem maleje, niezależnie od położenia względem urazu [66].

Również badania eksperymentalne na zwierzętach z zastosowaniem agonistów i antagonistów receptorów metabotropowych potwierdziły udział mechanizmów ekscytotoksycznych w urazie rdzenia.

AIDA – (antagonista receptorów mGluRI) i LY 367385 – (specyficzny antagonist receptorów mGluR1) - wpływają na poprawę czynności motorycznej, oraz osłabiają rozwój mechanicznej allodynii (ból powodowany przez zwykle niebolesny bodziec). Działanie neuroprotektoryjne obu tych substancji, którego ocena oparta była na podstawie obliczenia obszaru zniszczonej tkanki, widoczne było zarówno w istocie białej jak i szarej rdzenia kręgowego [69].

MPEP – (specyficzny antagonist receptorów mGluR5) - obniża poziom kwasu glutaminowego w przestrzeni pozakomórkowej oraz osłabia rozwój nadwrażliwości na bodźce termiczne. Nie wywiera natomiast wpływu na powrót funkcji motorycznej, ani na rozwój mechanicznej allodynii. Jego działanie neuroprotektoryjne zaobserwowano było tylko w istocie szarej rdzenia kręgowego [69,61,104]. Zauważono również, że MPEP może działać jako nie-kompetytywny antagonist receptorów NMDA [70]. Neuroprotektoryjne działanie MPEP potwierdzono również w eksperymentalnym niedokrwieniu mózgu, w którym uzyskano ograniczenie obszaru zawału korelującego z poprawą funkcji neurologicznej [9].

Zauważono również, że zastosowanie w urazie rdzenia agonistów receptorów metabotropowych: ACPD - receptorów mGluRII i L-AP4 - receptorów mGluRIII - spowodowało osłabienie rozwoju mechanicznej allodynii, bez poprawy czynności motorycznej, ani cech ograniczenia obszaru urazu [68].

Procesy ekscytotoksyczne biorą udział nie tylko w patologii mechanicznego urazu rdzenia i mózgu. Odgrywają one również pewną rolę w udarze niedokrwinnym mózgu, napadach padaczkowych oraz chorobach przewlekłych takich jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, płasawica Huntingtona. Dlatego receptory glutaminergiczne, których pobudzenie uruchamia te reakcje, są potencjalnymi celami dla terapii farmakologicznej [63].

## 1.6. Zastosowanie techniki DWI do oceny urazu rdzenia kręgowego

Wprowadzenie do diagnostyki układu nerwowego badań dyfuzji wody zrodziło nadzieje na uzyskanie informacji nieosiągalnych do tej pory przez konwencjonalną technikę MRI. Najlepszym tego przykładem stało się zastosowanie tej metody w diagnostyce ostrego udaru niedokrwiennego mózgu. Ischemia we wczesnym okresie powoduje załamanie się metabolizmu energetycznego tkanki nerwowej, co prowadzi do zaburzenia funkcji pompy  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  i innych pomp jonowych. W następstwie tego dochodzi do zniesienia gradientów jonowych w poprzek błon komórkowych i przemieszczenia się wody z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórek. Powstający w ten sposób obrzęk cytotoksyczny charakteryzuje się w badaniu DWI spadkiem całkowitej dyfuzji (wyrażonej współczynnikiem dyfuzji ADC). Zmniejszenie się dyfuzji poprzecznej tłumaczy się wzrostem objętości wody wewnątrzkomórkowej, gdzie występuje silniejsza restrykcja dyfuzji oraz wzrostem krętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wynikającej ze zmniejszenia jej objętości. Trudniej natomiast wytłumaczyć redukcję dyfuzji podłużnej, która może być związana z napęcznieniem komórek Schwanna (obrzękiem aksonalnym) lub spadkiem dyfuzji wewnątrz aksonów spowodowanym uszkodzeniem cytoszkieletu i wzrostem lepkości cytoplazmy. Spadek całkowitej dyfuzji w ostrym niedokrwieniu nie powoduje natomiast zmian anizotropii istoty białej, co najpewniej wiąże się z zachowaniem struktury i prostoliniowego przebiegu włókien nerwowych [32,83]. W przewlekłych zmianach niedokrwiennych obserwuje się natomiast wzrost całkowitej dyfuzji i wyraźny spadek anizotropii, wynikający ze zniszczenia struktury włókien nerwowych [83]. W odróżnieniu od obrzęku cytotoksycznego, który charakteryzuje się spadkiem ADC, w obrzęku wazogennym, spowodowanym nagromadzeniem się wody w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zaobserwowano wzrost wartości całkowitej dyfuzji ADC [32].

Podobne wyniki do tych w ostrym udarze niedokrwiennym zaobserwowano również u chorych z pourazowym rozlanym uszkodzeniu aksonalnym mózgowia, u których w ostrym okresie obecne są obszary o obniżonym ADC, co według autorów może odpowiadać rozwijającemu się obrzękowi cytotoksycznemu [58].

W pewnej sprzeczności z powyższymi danymi dotyczącymi zmian dyfuzji wody w ischemii mózgu, pozostają wyniki uzyskane na zwierzęcym modelu, które wykazały, że na wartość całkowitej dyfuzji, zarówno w prawidłowej, jak i

niedokrwionej tkance nerwowej, zasadniczy wpływ ma tylko dyfuzja wewnątrzkomórkowa [86]. W innych badaniach zaobserwowano natomiast, że sam obrzęk komórek wywołuje wzrost ADC zarówno w przestrzeni wewnątrz i zewnątrzkomórkowej, i w związku z tym nie może tłumaczyć spadku ADC w ostrym niedotlenieniu mózgu [84].

Również w diagnostyce zmian urazowych rdzenia badania dyfuzji wody przyniosły bardziej dokładne informacje o zmianach zachodzących w tkance nerwowej, choć nadal istnieją bardzo duże trudności z połączeniem zaobserwowanych zmian dyfuzji z obrazem zmian histopatologicznych. Badania na modelach zwierzęcych urazu rdzenia kręgowego z zastosowaniem DWI potwierdziły wysoką czułość tej techniki, wykazując obecność zmian anizotropii dyfuzji wody nie tylko w miejscach, gdzie widoczne były zmiany w konwencjonalnym badaniu MRI, ale również w tkankach rdzenia, w których w klasycznym badaniu MRI zmian nie stwierdzono [37].

W wyniku urazu w istocie białej w ciągu 15 minut dochodzi do napęcznienia aksonów i uszkodzenia neurofilamentów. Wiązki mieliny ulegają rozszczepieniu i dochodzi do wzrostu przepuszczalności błon komórkowych. Następstwem tych zmian jest spadek wartości anizotropii istoty białej rdzenia, spowodowany obniżeniem się dyfuzji podłużnej i wzrostem dyfuzji poprzecznej [37,38]. Przyjmuje się, że wzrost dyfuzji poprzecznej jest zapewne wynikiem destrukcji mieliny i związanym z tym wzrostem przepuszczalności błon komórkowych. Natomiast spadek dyfuzji podłużnej wiąże się, podobnie jak w przypadku zmian niedokrwieniowych mózgu, z obrzękiem aksonów oraz uszkodzeniem położonego w ich wnętrzu systemu mikrofilamentów odpowiedzialnych za transport aksonalny [89].

W późnych zmianach pourazowych w istocie szarej, w wyniku zniszczenia błon komórkowych i martwicy uszkodzonych komórek dochodzi do formowania się przestrzeni płynowych w postaci drobnych torbieli, które następnie mogą przekształcić się w większe jamy (syringomielia). Na zwierzęcym modelu, z indukowaną syringomielią zaobserwowano w miejscu uszkodzenia tkanki rdzenia wzrost wartości zarówno dyfuzji podłużnej jak i poprzecznej odpowiadające tworzącej się przestrzeni płynowej. Udowodniono, że metodą DWI można wcześniej, niż w konwencjonalnym badaniu MRI wykryć tworzenie się pourazowej torbieli w istocie szarej rdzenia kręgowego [90].

## 1.7. Sposoby neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym

Pomimo postępów w medycynie urazy rdzenia kręgowego stanowią nadal duży problem kliniczny, ekonomiczny i społeczny. Chorzy z urazami kręgosłupa wymagają długotrwałej i kosztownej rehabilitacji, której efekty nie zawsze są zadowalające. Zadaniem neuroprotekcji jest zapobieganie pogorszeniu się stanu neurologicznego chorych z urazem rdzenia kręgowego. Obejmuje ona zarówno metody chirurgiczne, celem których jest dekompresja uciśniętego przez odłamy kostne rdzenia, a następnie stabilizacja kręgosłupa, jak również leczenie farmakologiczne dążące do ograniczenia rozwoju wtórnych procesów uszkodzenia rdzenia. Potencjalna skuteczność farmakologicznej neuroprotekcji wynika z tego, że do pewnego momentu (najpewniej do chwili uszkodzenia błon komórkowych) procesy te mogą być odwracalne.

Coraz lepsza znajomość patofizjologii urazu mechanicznego rdzenia, a zwłaszcza wtórnych mechanizmów urazu skutkuje stale rosnącą liczbą badań nad nowymi środkami neuroprotekcijnymi. Poniżej wymieniono najważniejsze grupy środków farmakologicznych stosowanych dotychczas w badaniach nad neuroprotekcją urazów rdzenia kręgowego [20,30]:

- kortykosterydy,
- 21-aminosterydy,
- antagoniści receptorów opioidowych,
- TRH - hormon uwalniający tyreotropinę,
- antyoksydanty,
- blokery kanałów wapniowych,
- blokery kanałów sodowych, potasowych,
- blokery receptorów glutaminergicznych: jono i metabotropowych,
- inhibitory cyklooksygenazy - COX,
- antagoniści serotoniny,
- cyclosporyna A,
- inhibitory kaspazy,

Lekiem, który pierwszy znalazł powszechne zastosowanie w urazach rdzenia kręgowego u człowieka był metylprednisolon. Jest on obecnie stosowany standardowo, a podanie pierwszej dawki powinno nastąpić jak najszybciej po urazie, jeszcze w okresie przedszpitalnym (tzw. zasada pierwszej złotej godziny). Metylprednisolon jest kortykosterydem, którego działanie neuroprotekcyjne wiąże

się z właściwościami przeciwzapalnym, antyoksydacyjnym. Zastosowany w urazie rdzenia zmniejsza jego niedotlenienie, obrzęk, obniża poziom wapnia wewnątrzkomórkowego, hamuje peroksydację lipidów i degradację neurofilamentów. Badania wskazują, że wynik leczenia chorych przy podawaniu metylprednisolonu jest lepszy o około 20%, niż u chorych, którzy nie otrzymali takiego leczenia [16].

W ostatnich latach pojawiły się również doniesienia o badaniach nad zastosowaniem w urazie rdzenia kręgowego neurotrofin (czynników wzrostu), które zwiększają przeżywalność neuronów oraz stymulują wzrost uszkodzonych aksonów. W końcowym efekcie prowadzą do zmniejszenia się obszaru urazu i lepszego powrotu czynności behawioralnych. Do grupy tej należą: czynnik wzrostu neuronów - NGF (nerve growth factor), czynnik neurotropowy pochodzenia mózgowego - BDNF (brain derived neurotrophic factor), neurotrofina 3 - NT-3. Eksperymenty na szczurach z implantacją przeszczepów lub wstrzykiwaniem fibroblastów zawierających różne kombinacje powyższych czynników wykazały obecność cech regeneracji aksonów w obszarach urazu i polepszenie funkcji motorycznej. Również czynnik wzrostu fibroblastów - FGF (fibroblast growth factor) - poza protekcją uszkodzonych neuronów stymuluje rewaskularyzację [20,76].

Oddzielna grupę stanowią również badania eksperymentalne z przeszczepianiem w miejsce uszkodzenia rdzenia kręgowego glejowych komórek wędrownych, komórek Schwanna, komórek macierzystych czy też płodowych tkanek rdzenia kręgowego [20]. Wyniki wielu z tych badań nie są jeszcze całkowicie jednoznaczne i wymagają potwierdzenia. Niektóre, dotyczące przeszczepiania tkanek płodowych budzą też kontrowersje etyczne.

## **1.8. Zastosowanie metody DWI do oceny neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym**

Wyniki badań nad urazem rdzenia kręgowego zaowocowały w dalszej kolejności próbami zastosowania metody DWI do oceny neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie. Badania te do tej pory wykonywano tylko na wyizolowanych rdzeniach kręgowych szczurów (ex - vivo). Po wykonanym zabiegu zwierzęta były poddane obserwacji behawioralnej, następnie je uśmiercano, a wypreparowane rdzenie kręgowo poddawano badaniu DWI i ocenie histopatologicznej.

Skuteczność tej metody wykazał Nevo [74] w badaniu na modelu uszkodzenia typu weight-drop z dootrzewnowym podaniem limfocytów T skierowanych przeciwko zasadowemu białku mieliny (MBP- myelin basic protein), o potwierdzonym wcześniej działaniu neuroprotekcijnym. W badaniu ex - vivo po trzech tygodniach od urazu, na podstawie analizy współczynnika anizotropii AI oraz jego map, wykazano typowy spadek anizotropii w miejscu urazu zarówno w grupie z podanymi limfocytami jak i w grupie kontrolnej. Jednocześnie wykazano znamienne mniejszy spadek anizotropii dyfuzji w miejscu urazu w grupie leczonej w porównaniu do zwierząt nie leczonych. Uzyskane wyniki pokrywały się z oceną czynności motorycznej. Według autora wyższa anizotropia w grupie leczonej była wynikiem zahamowania destrukcji włókien nerwowych.

Również badania z zastosowaniem genetycznie modyfikowanych fibroblastów wydzielających czynnik neurotropowy pochodzenia mózgowego (BDNF - brain derived neurotrophic factor), które wszczepiano w miejsce uszkodzonego sznura bocznego rdzenia potwierdziły przydatność metody DWI. BDNF jest neurotropiną, która działa przez receptory TrkB na powierzchni aksonów drogi czerwienno-rdzeniowej i ma potwierdzone działanie neuroprotekcyjne polegające na regeneracji włókien nerwowych tej drogi nerwowej i pobudzaniu do wzrostu innych aksonów. W badaniu DWI wypreparowanych rdzeni po dwunastu tygodniach od urazu wykazano w obrębie istoty białej powyżej i poniżej uszkodzenia typowe dla urazu zmiany polegające na wzroście dyfuzji poprzecznej tADC oraz spadku dyfuzji podłużnej lADC. Zanotowano również wzrost anizotropii (wyrażony jako  $AI=tADC/lADC$ ). W grupie poddanej leczeniu wartości parametrów dyfuzji były bliższe zdrowej grupie kontrolnej niż u szczurów z przeszczepionymi niemodyfikowanymi fibroblastami. Wyniki zostały potwierdzone badaniami histopatologicznymi które wykazały istotny wzrost aksonów w leczonej grupie [89,91,93].



## 1.9. Aktualne możliwości zastosowania techniki DWI w diagnostyce rdzenia kręgowego u człowieka

W przypadku badań rdzenia kręgowego nie są dostępne jeszcze standardowe procedury diagnostyczne z użyciem DWI, tak jak ma to już miejsce w badaniach mózgowia. Wynika to przede wszystkim z opisanych wcześniej ograniczeń w zastosowaniu tej metody związanych z uwarunkowaniami anatomicznymi i zaburzeniami sygnału wywołanymi ruchem tkanek i płynów ustrojowych w otoczeniu rdzenia. Dotychczas opisane w literaturze badania wykonane były na zdrowych ochotników i wyselekcjonowanych, wąskich grupach chorych, w oparciu o obrazowanie pełnego tensora dyfuzji, jak również prostsze sposoby badania anizotropii dyfuzji. Wszystkie te badania dotyczyły głównie szyjnego odcinka rdzenia kręgowego.

Na dyfuzyjnie ważonych obrazach rdzenia kręgowego, zdrowych ochotników, nie zawsze można odróżnić istotę białą od szarej, ze względu na jeszcze niską jakość tych obrazów. Większość dotychczasowych badań prezentuje zatem wartości współczynników dyfuzji ADC dla całej tkanki rdzenia kręgowego, uzyskane na podstawie przekrojów strzałkowych. Wyniki te zgodne są z danymi uzyskanymi w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach. Potwierdzają anizotropowy charakter dyfuzji wody w rdzeniu kręgowym jak również potwierdzają, że wartości dyfuzji w kierunkach poprzecznych do osi długiej rdzenia są do siebie zbliżone [7,24,25]. Przykładowe wartości współczynników dyfuzji w prawidłowym rdzeniu kręgowym człowieka prezentuje tabela 4.

Tab. 4 . Wartości współczynników dyfuzji ADC (średnia  $\pm$  SD  $\cdot 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s), w różnych kierunkach uzyskane ze strzałkowych przekrojów szyjnego odcinka rdzenia kręgowego człowieka.

	lADC	tADC <sub>AP</sub>	tADC <sub>RL</sub>
wg Bammera [7]	1.6 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.08
wg Clarka [24]	1.55 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.03	-
wg Tsuchiya [100]	2.26 $\pm$ 0.08	1.54 $\pm$ 0.28	1.29 $\pm$ 0.52
wg Riesa [81]	2.2	0.9	0.8

lADC - współczynnik dyfuzji podłużnej, tADC<sub>AP</sub> - współczynnik dyfuzji poprzecznej w kierunku przednio-tylnym, tADC<sub>RL</sub> współczynnik dyfuzji poprzecznej w kierunku prawo-lewym

W badaniu Holdera [43] z zastosowaniem sekwencji - multishot EPI, z użyciem supresji tłuszczu i bramkowaniem sekwencji pomiarowej rytmem serca i oddechu udało się uzyskać na tyle dobre obrazy, z widoczną różnicą pomiędzy istotą białą i szarą, że pozwoliło to wyliczyć współczynniki dyfuzji dla obu tych istot oddzielnie: WM -  $tADC = 0.4 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  i  $lADC = 2.3 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  oraz GM -  $tADC = 0.6 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  i  $lADC = 2.0 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ . Wyniki te potwierdziły wysoką anizotropię istoty białej oraz wykazały również anizotropowy charakter istoty szarej. Autorzy zauważyli, że nieco wyższe wartości uzyskanych przez nich wyników, w porównaniu do badań ex - vivo u zwierząt, mogły wiązać się z wyższą temperaturą, występującą podczas badań in - vivo, a także z przepływem kapilarnym i ruchami aksoplazmy, które to czynniki według nich mogą podnosić wartości ADC.

Jasiński [48] w swoich badaniach przedstawił wyniki obrazowania pełnego tensora dyfuzji na podstawie przekrojów osiowych rdzenia kręgowego zdrowych osób. Składowe tensora wynosiły odpowiednio: dla istoty szarej -  $\lambda_1=(0.64 \pm 0.08) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ,  $\lambda_2=(0.65 \pm 0.08) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ,  $\lambda_3=(1.38 \pm 0.10) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  oraz dla istoty białej -  $\lambda_1=(0.37 \pm 0.08) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ,  $\lambda_2=(0.38 \pm 0.08) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ,  $\lambda_3=(2.20 \pm 0.07) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .

W badaniach klinicznych największą grupę pacjentów stanowią chorzy ze spondylozą szyjnego odcinka kręgosłupa i mielopatią szyjnego rdzenia kręgowego. Badania u takich pacjentów przeprowadzono zarówno w oparciu o sekwencję single shot FSE, bez bramkowania, jak i w oparciu o sekwencję multi-shot EPI z bramkowaniem zapisem EKG. W zmianach o charakterze mielopatii spowodowanych przewlekłym uciskiem, stwierdzono znamienne wzrost wartości ADC i spadek anizotropii. Wyniki badania DWI potwierdzone były konwencjonalną techniką MRI, w której ogniska mielopatii miały obniżony sygnał w obrazach  $T_1$ -zależnych i podwyższony sygnał w obrazach  $T_2$ -zależnych. Znamienne wzrost ADC w obszarze mielopatii uznany został przez autorów za objaw nieodwracalnego uszkodzenia struktury tkanki nerwowej [100]. Porównując natomiast obrazowanie dyfuzji wody z konwencjonalnym badaniem MRI wykazano, że mapy ADC mają wyższą czułość (80%) w wykrywaniu zmian o charakterze mielopatii w porównaniu z obrazami  $T_2$ -zależnymi (60%). Z kolei u pacjentów z potwierdzonymi elektrofizjologicznie objawami mielopatii czułość metody DWI wzrasta do 90%. Wykazano natomiast niższą specyficzność obrazów DWI (53%) w porównaniu z obrazami  $T_2$ -zależnymi (92%) [27].

Odwrotne wyniki uzyskano w badaniu na przykładzie dwóch pacjentów z mielopatią w przebiegu spondylozy, u których w miejscu uszkodzenia rdzenia wykazano spadek dyfuzji, co według autorów mogło być wynikiem niedotlenienia na skutek ucisku. Natomiast u chorych z zapaleniem rdzenia stwierdzono wzrost wartości ADC [7].

Zmiany w obrazach dyfuzyjnie ważonych zaobserwowano również u pacjentów we wczesnym okresie ostrego niedokrwienia rdzenia kręgowego (do 48 godzin). W obszarach potencjalnego niedokrwienia zaobserwowano podwyższony sygnał odpowiadający spadkowi ADC. Obserwacje te potwierdzono w późniejszym konwencjonalnym badaniu MRI, w którym na obrazach T<sub>2</sub>-zależnych w tych samych miejscach stwierdzono podwyższenie sygnału [60].

Również u chorych ze stwardnieniem rozsianym w miejscach ognisk demielinizacji stwierdzono istotnie podwyższoną wartość średniej dyfuzji, co mogło odpowiadać zniszczeniu włókien nerwowych lub obrzękowi wazogennemu w ostrym odczynie zapalnym [24].

Opisano także zastosowanie odmiennej techniki (line scan DTI), którą zastosowano u przedwcześnie urodzonych noworodków z bardzo niską wagą urodzeniową do oceny szyjnego odcinka rdzenia kręgowego [73].

Wszystkie z omówionych badań były wykonane w magnesach o polu 1,5T. Kolejna generacja magnesów z polem 3T jak również badania nad ulepszeniem sekwencji pomiarowych mogą przyczynić się do dalszego postępu tej techniki obrazowania, która we wszystkich opisanych dotychczas przykładach zastosowania przewyższa pod względem czułości konwencjonalną technikę MRI.

## 2. CELE PRACY

Celem pracy było zastosowanie obrazowania dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego w badaniach u szczura in - vivo do:

1. Oceny następstw urazu rdzenia kręgowego przez obliczenie współczynników dyfuzji (IADC, tADC, ID, AI) dla wybranych obszarów istoty białej i szarej na przekrojach osiowych rdzenia kręgowego i ich analiza w zależności od odległości od środka urazu i od czasu od momentu urazu.
2. Oceny wpływu substancji neuroprotekcylnej (MPEP) na zmiany zachodzące po urazie mechanicznym rdzenia kręgowego, na podstawie analizy współczynników dyfuzji (IADC, tADC, ID, AI).

### **3. MATERIAŁ I METODA**

Badania przeprowadzono w Zakładzie Rezonansu Magnetycznego Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie w ramach współpracy z Katedrą Radiologii CM UJ. Wniosek o przeprowadzenie badań eksperymentalnych pozytywnie zaopiniowała II Lokalna Komisja Etyczna w Krakowie przy Instytucie Farmakologii PAN.

#### **Zwierzęta**

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, samcach rasy Wistar o masie ciała 250 - 350 g pochodzących z licencjonowanych hodowli. Przechowywane były one w zwierzętarni, pojedynczo w klatkach, karmione standardową karmą i pojone wodą bez ograniczeń.

Eksperymenty obejmowały cztery grupy zwierząt:

- 5 osobników zdrowych,
- 5 osobników z laminektomią bez urazu,
- 10 osobników z laminektomią i urazem,
- 10 osobników z laminektomią, urazem i podanym lekiem (MPEP),

#### **Procedury zabiegowe**

Laminektomię i uraz we wszystkich przypadkach przeprowadzano w ten sam sposób. Przed zabiegiem zwierzęta ważono, a następnie usypiano podawanym dootrzewnowo 4% roztworem wodzianu chloralu w dawce 0.9 ml na 100 g masy ciała. Zabiegi wykonywano w sterylnych warunkach. Po ogoleniu i odkażeniu grzbietu szczura, przecinano skórę i mięśnie przykręgosłupowe. Następnie przy pomocy mikrowiertarki wykonywano laminektomię (usunięcie łuku kręgu) na poziomie Th12, odsłaniając rdzeń kręgowy przykryty nienaruszoną oponą twardą. Poziom uszkodzenia (Th12) wybrano ze względu na to, że w tym odcinku kręgosłupa rdzeń kręgowy położony jest najbliżej grzbietowej powierzchni ciała szczura, a tym samym najbliżej zastosowanej do pomiarów cewki powierzchniowej. Ponieważ natężenie sygnału fali elektromagnetycznej zmniejsza się proporcjonalnie do kwadratu odległości, dlatego im bliżej cewki znajduje się badana struktura tym lepszy uzyskuje się stosunek sygnału do szumu i w efekcie lepszej jakości obraz.

Uraz wykonywano w oparciu o zmodyfikowany model mechanicznego uszkodzenia rdzenia kręgowego typu „weight-drop”. Po wykonaniu laminektomii zwierzę układano na specjalnie przystosowanym stoliku stereotaktycznym ASP-01.

Nad odsłoniętym rdzeniem umieszczano pionowo ustawioną szklaną rurkę, będącą przewodniczą dla spadającego ciężarka. W dolny koniec rurki wprowadzano aluminiowy element pośredniczący (impounder) średnicy 2.5 mm. Dolny, zaokrąglony koniec impoundera, który wystawał przez dolny koniec rurki, delikatnie opierano bezpośrednio na odkrytym rdzeniu kręgowym. Uraz wykonywano spuszczać z dokładnie wyznaczonej wysokości piętnastu centymetrów metalowy ciężarek o masie 1.164 g, który uderzał w spoczywający na rdzeniu impounder.

Siłę urazu dobrano na podstawie danych z literatury tak, aby spowodować stosunkowo umiarkowany uraz rdzenia, nie powodując znacznych zmian krwotocznych ani zupełnego zniszczenia tkanek rdzenia.

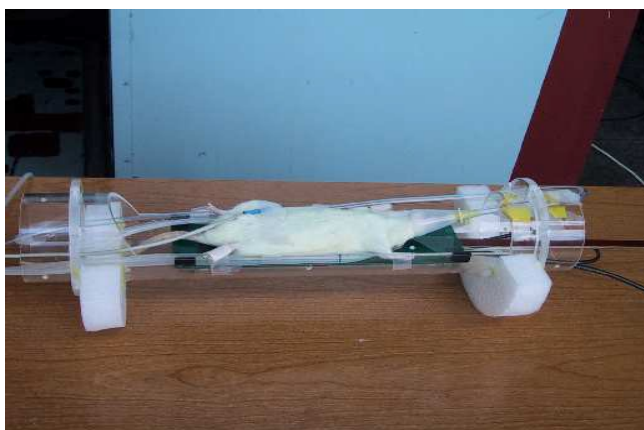
Po wykonaniu zabiegu laminektomii lub laminektomii z następowym urazem dokonywano chirurgicznego zaopatrzenia rany zeszywając warstwowo kolejno mięśnie przykręgosłupowe, powięź i skórę. Na okolicę rany stosowano niewielką ilość antybiotyku (ampicyliny). W okresie pooperacyjnym, ze względu na wegetatywne zablokowanie funkcji pęcherza moczowego spowodowaną urazem rdzenia, okresowo uciskano szczyrom brzuch, aby stymulować oddawanie moczu.

Ostatniej grupie 10 szczurów testowych oprócz wykonania urazu rdzenia kręgowego, trzykrotnie drogą dootrzewnową podano rozpuszczony w soli fizjologicznej MPEP (Novartis) - (2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine) - selektywnego antagonistę glutaminergicznych receptorów metabotropowych mGluR5, w dawce 30 mg/kg m.c. Pierwszą dawkę podano 5 minut przed wykonaniem urazu, dwie następne odpowiednio 24 i 48 godzin po urazie. Podanie pierwszej dawki przed urazem było podyktowane chęcią uzyskania jak najsilniejszego efektu jej działania, ponieważ jest to bloker tylko jednego z kilku typów receptorów glutaminergicznych równocześnie pobudzanych pod wpływem urazu rdzenia.

### **Protokół badania DWI**

Eksperymenty pomiarowe dyfuzji wody (DWI) prowadzono przy wziewnym znieczuleniu ogólnym 1.5 - 2% halotanem w mieszaninie tlenu i powietrza w stosunku objętości 40:60 z monitorowaniem podstawowych funkcji życiowych. Głębokość znieczulenia warunkowała bezruch w czasie całego badania. Uśpionego wstępnie, w specjalnie przygotowanym pojemniku, przy pomocy halotanu szczura, umieszczano w głowicy pomiarowej w pozycji na grzbiecie (Ryc. 2). Zakładano mu maskę połączoną z wentylatorem i podpinano do niego elektrody rejestrujące

równocześnie zapis EKG i rytm oddechowy. Elektrody te łączono z oscyloskopem (Tektronik TDS 3000) i dedykowanym dla zwierząt urządzeniem odpowiedzialnym za wyzwalanie sekwencji pomiarowej w odpowiedniej fazie cyklu pracy serca i oddechu (ECG Trigger Unit HSB Rapid Biomedical GmbH). W czasie badania średnia częstość akcji serca szczura wynosiła 300/min, a średnia częstość oddechu 75/min. Temperaturę ciała mierzoną termometrem endorektalnym utrzymywano na poziomie 37°C przy pomocy zainstalowanego w głowicy pomiarowej materaca wodnego. Czas pełnego jednego pomiaru DWI wynosił około trzy godziny.



Ryc. 2. Szczur umieszczony w głowicy pomiarowej.

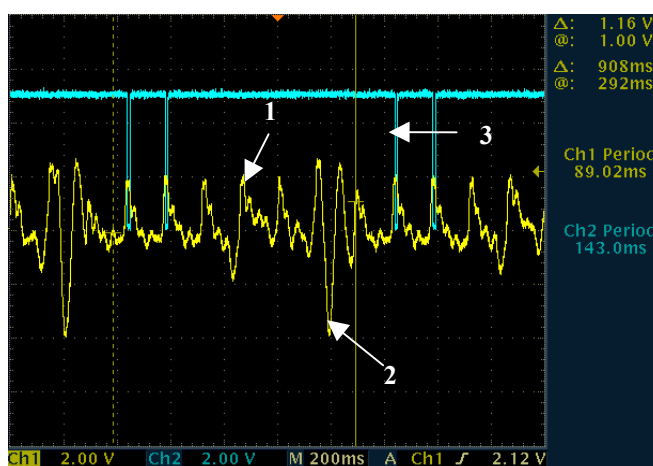
Badania pomiarowe dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego wykonano przy pomocy tomografu MR z magnesem nadprzewodzącym o polu 4.7 T i otworze średnicy 31 cm firmy Bruker, wyposażonego w cyfrową konsolę Maran DRX (Resonance Instruments Ltd). Do pomiarów użyto skonstruowanej w Instytucie Fizyki Jądrowej głowicy pomiarowej z cewką powierzchniową o wymiarach zewnętrznych 20 x 30 mm, indukcyjnie sprzężoną z torem nadawczo-odbiorczym.

Pomiary wykonano stosując standardową sekwencję echa spinowego (SE) bez gradientów dyfuzyjnych oraz z gradientami przyłożonymi w trzech prostopadłych do siebie kierunkach:

- kierunek z (kranio-kaudalny) - równoległy do osi długiej rdzenia,
- kierunek x (pravo-lewy) i
- kierunek y (brzuszo-grzbietowy) - prostopadłe do osi długiej rdzenia.

Parametry sekwencji pomiarowej były następujące: pole widzenia (FOV) = 2,5 cm, macierz obrazu = 128 x 128, grubość warstwy = 1,6 mm, rozdzielczość = 0,15 mm, czas dyfuzji 30 ms, czas echa TE = 60 ms, czas powtarzania TR = 3 s, ilość akumulacji NX = 4. Współczynnik dyfuzyjności b wynosił odpowiednio dla

poszczególnych kierunków: x - 1500 s/mm<sup>2</sup>, y - 1500 s/mm<sup>2</sup>, z - 750 s/mm<sup>2</sup>. Mniejsza wartość współczynnika b dla kierunku z wynikała z tego, że przy wyższych wartościach sygnał MR w tym kierunku szybko zanikał, co powodowało spadek stosunku sygnału do szumu. Pomimo, że wartość współczynnika b dla kierunku z, różniła się od wartości b dla kierunków x i y, to wszystkie one mieściły się w zakresie służącym do badania tzw. szybkiej składowej dyfuzji. Sekwencja pomiarowa sprzężona była z zapisem EKG i rytmem oddechowym. Wyzwalana była w drugim cyklu pracy serca następującym po oddechu (Ryc. 3).

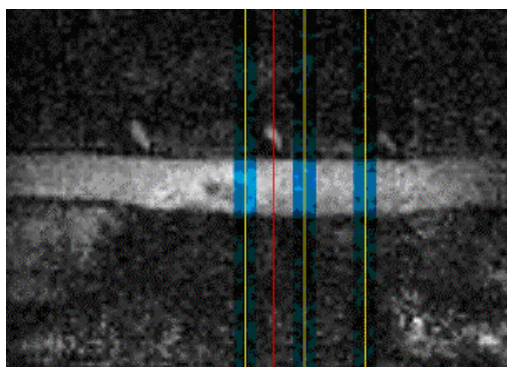


Ryc. 3. Obraz z monitora oscyloskopu: 1-krzywa EKG, 2-fala oddechowa, 3- punkt wyzwalania sekwencji pomiarowej.

Grupa pierwsza szczurów zdrowych była poddana eksperymentom pomiarowym w tomografii MR jednokrotnie. Pozostałe trzy grupy zwierząt badano cztery razy w takich samych odstępach czasowych. Pierwszy pomiar rozpoczynano 1 godzinę po wykonanym zabiegu, następne pomiary odpowiednio od zabiegu: drugi - 24 godziny, trzeci - 48 godzin i czwarty - 168 godzin (7dni).

Pomiary wykonano w trzech warstwach osiowych (aksjalnych) - prostopadłych do długiej osi rdzenia, z których pierwsza przechodziła przez środek miejsca zabiegu (laminektomii lub laminektomii i urazu), a dwie kolejne były przesunięte w kierunku dogłowym co 2.8 mm (Ryc.4). Wykonano również pomiar w jednej warstwie strzałkowej (sagitalnej) przechodzącej przez środek rdzenia, przy tych samych parametrach pomiarowych.





Ryc.4. Obraz sagitalny MR ( $T_2$ -zależny) rdzenia kręgowego szczura z zaplanowanymi przekrojami osiowymi.

W efekcie dla każdej badanej warstwy otrzymano zbiór czterech obrazów: jednego obrazu  $T_2$  bez gradientów dyfuzyjnych i trzech obrazów ważonych dyfuzyjnie - w kierunku podłużnym i dwóch kierunkach poprzecznych do długiej osi rdzenia.

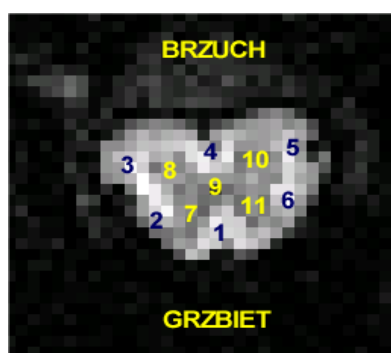
Po wykonaniu ostatniego pomiaru zwierzęta usypiano przy pomocy wodzianu chloralu i uśmiercano wykonując dosercową perfuzję zbuforowanym 4% roztworem formaliny w ilości 1 ml na 1 g masy ciała. Następnie wycinano kręgosłup i wypreparowywano rdzeń kręgowy, który umieszczano w roztworze formaliny w celu dalszego utrwalenia. Tak przygotowane rdzenie kręgowo przekazano do Zakładu Neuropatologii CM UJ, gdzie poddane zostały dalszym badaniom neuropatologicznym.

### **Analiza danych pomiarowych**

Analizę danych uzyskanych na podstawie badań dyfuzji wody wykonano za pomocą programu, który został opracowany w Instytucie Fizyki Jądrowej przy pomocy pakietu IDL (Research System Inc). Do analizy współczynników dyfuzji odzwierciedlających stan anizotropii tkanek rdzenia posłużyły przekroje osiowe, na których wyraźnie zaznaczona była granica pomiędzy istotą białą i szarą. Ocenę morfologiczną zmian w rdzeniu kręgowym oparto natomiast na analizie obrazów w przekrojach strzałkowych, ze względu na to, że polem widzenia obejmowały cały obszar laminektomii i urazu wraz z dalszymi częściami prawidłowego rdzenia.

Z uzyskanych obrazów dla każdej warstwy otrzymano trzy mapy współczynników dyfuzji, dla poszczególnych kierunków:  $ADC_x$ ,  $ADC_y$ ,  $ADC_z$ . Następnie na przekrojach osiowych wyznaczono 11 obszarów zainteresowań (ROI): 6 w obrębie sznurów istoty białej (po jednym obszarze w obrębie sznurów przednich

i tylnych oraz symetrycznie po dwa obszary w sznurach bocznych) i 5 w istocie szarej (symetrycznie w rogach przednich i tylnych oraz jeden obszar w istocie szarej pośredniej w otoczeniu kanału kręgowego). Potem na podstawie tak zaznaczonych ROI, obliczono wartości współczynników dyfuzji -  $\lambda$ ADC,  $t$ ADC oraz ich pochodne ID oraz AI. Współczynniki te obliczono w postaci średnich wartości ze wszystkich ROI istoty białej (WM) i istoty szarej (GM). Ze względu na ściśle ustalone miejsce i kierunek działania urazu mechanicznego podjęto również analizę bardziej szczegółową i pogrupowano zaznaczone obszary względem strony brzusznej i grzbietowej, co dokładnie prezentuje rycina 5. Pierwsza warstwa osiowa zawsze przechodziła przez środek zabiegu (laminektomii i urazu), warstwa druga położona 2.8 mm od pierwszej znajdowała się tuż za widocznymi w obrazie  $T_2$ -zależnym zmianami pourazowymi, natomiast warstwa ostatnia położona była 5.6 mm od pierwszej, w obszarze w którym na obrazach  $T_2$ -zależnych, w żadnej z badanych grup nie zaobserwowano zmian w morfologii i charakterze sygnału rdzenia kręgowego.



#### Istota biała - WM

- 1- sznury grzbietowe - SZG
- 2, 6 - sznury boczne (części grzbietowe) -SZBG
- 3, 5 - sznury boczne (części brzuszne) - SZBB
- 4 - sznury brzuszne - SZB

#### Istota szara - GM

- 7, 11 - rogi grzbietowe - RG
- 8, 10 - rogi brzuszne - RB
- 9 - istota szara pośrednia - ISZP

Ryc.5. Obraz przekroju osiowego rdzenia kręgowego z zaznaczonymi obszarami zainteresowań (ROI) w istocie białej i szarej.

### Obserwacje behawioralne

Równocześnie z badaniami MR dyfuzji wody prowadzono obserwacje czynności motorycznej szczurów w oparciu o 21 stopniową skalę BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) [11]. Obserwację przeprowadzano na specjalnie przygotowanym wybiegu, przed wykonaniem pomiarów DWI. W dniu zabiegu nie przeprowadzano obserwacji behawioralnych, ponieważ pierwsze badanie DWI odbywało się zaraz po wykonaniu zabiegu oraz ze względu to, że stres i ból wywołane operacją mogły wpływać na zachowanie się zwierzę.

Skala BBB została opracowana w celu oceny czynności motorycznej kończyn tylnych po urazie mechanicznym rdzenia kręgowego u szczura. Według tej skali wartość 0 oznacza porażenie kończyn tylnych (całkowity brak spontanicznych ruchów), natomiast wartość 21 przypisuje się prawidłowemu chodowi z równoległym stawianiem łap i koordynacją ruchów kończyn tylnych i przednich. Wartości w przedziale od 0 do 7 wskazują na powrót izolowanych ruchów w obrębie trzech głównych stawów kończyn tylnych (biodrowego, kolanowego i skokowego). Wyniki pomiędzy 8 i 13 odpowiadają powrotowi czynności stawiania łap w czasie chodu i koordynacji ruchów kończyn tylnych. Wartości pomiędzy 14 i 21 oznaczają powrót odstępów pomiędzy palcami podczas stąpania, dominujące równoległe ułożenie łap w stosunku do tułowia, stabilizację tułowia i pozycji ogona.

### **Analiza statystyczna**

W badanej populacji szczurów analizie poddano współczynniki dyfuzji podłużnej i poprzecznej, współczynniki izotropii i anizotropii.

Współczynniki te porównywano w obrębie każdej z grup: pomiędzy trzema warstwami osiowymi oraz pomiędzy kolejnymi pomiarami, jak również pomiędzy poszczególnymi grupami w każdej z warstw i w każdym z pomiarów.

Do wykazania różnic pomiędzy warstwami w średnich wartościach badanych parametrów (osobno dla każdej z badanych grup szczurów), z uwagi na równoczesne porównywanie trzech warstw, wykorzystano test analizy wariancji ANOVA.

W celu określenia zmiennych wpływających na obserwowane różnice wartości współczynników dyfuzji pomiędzy kolejnymi pomiarami zastosowano test analizy wariancji wieloczynnikowej.

Dla porównania wybranych par współczynników w obrębie jednej grupy szczurów w różnym czasie wykorzystano test Wicoxona'a dla zmiennych zależnych. Porównywano współczynniki dyfuzji pomiędzy pierwszym i trzecim pomiarem.

W przypadku porównań dwóch wybranych grup zwierząt ze względu na obserwowane skośne rozkłady zmiennych wykorzystano test U Manna-Whitney'a dla zmiennych niezależnych (za takie uważano współczynniki porównywane pomiędzy grupami). Porównywano:

- grupę bez laminektomii z grupą z laminektomią,
- grupę z laminektomią z grupą z laminektomią i urazem rdzenia,
- grupę z laminektomią z grupą z laminektomią, urazem rdzenia i neuroprotekcją,

- grupę z laminektomią i urazem rdzenia z grupą z laminektomią, urazem rdzenia i neuroprotekcją.

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet Stata 8.0.

## 4. WYNIKI

### Ocena morfologiczna

- **Grupa szczurów zdrowych**

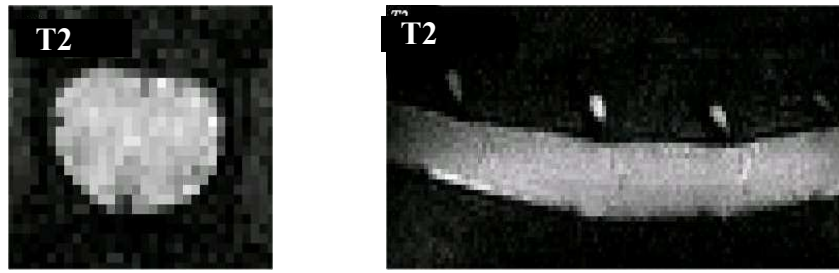
Zastosowana technika obrazowania anizotropii dyfuzji wody (DAI) pozwoliła uzyskać dobrej jakości obrazy MR rdzenia kręgowego, wolne od artefaktów ruchowych.

Rycina 6.a-c przedstawia pełny zestaw obrazów dla pojedynczego przekroju osiowego i strzałkowego prawidłowego rdzenia kręgowego szczura z odpowiadającymi im mapami współczynnika dyfuzji.

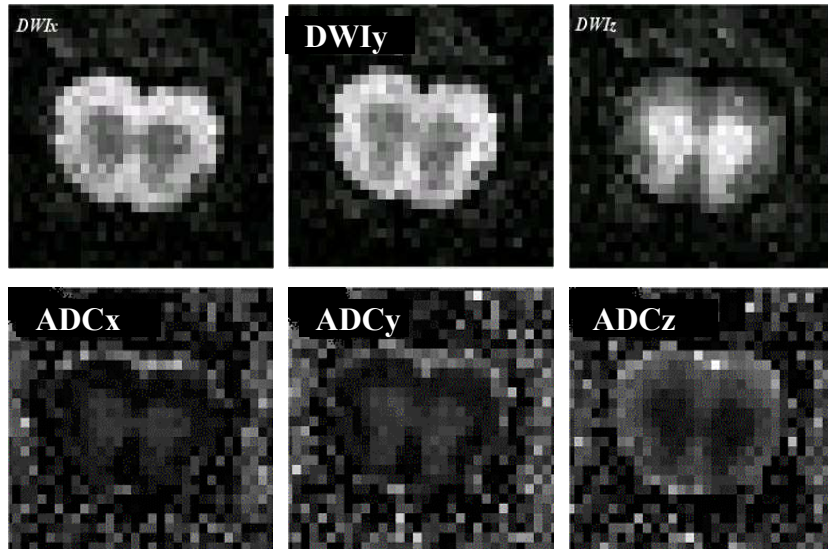
Na obrazach ważonych dyfuzyjnie (DWI) wyraźnie zaznaczona była granica pomiędzy istotą szarą i białą, niewidoczna w klasycznych obrazach  $T_2$ -zależnych. Sygnał z obszarów o silniejszej dyfuzji w kierunku zgodnym przyłożonymi gradientami ulega mocniejszemu tłumieniu, co na obrazie DWI daje ciemniejsze zabarwienie. Natomiast na mapach współczynnika dyfuzji ADC obszary te mają jaśniejsze zabarwienie.

Na obrazach DWI z gradientami w kierunkach poprzecznych do osi rdzenia (x i y) położona w centrum istota szara była ciemniejsza od istoty białej, ponieważ dyfuzja wody w tych kierunkach silniejsza jest w istocie szarej. Odpowiednio na mapach współczynnika dyfuzji ADC istota szara w tych kierunkach była jaśniejsza od istoty białej.

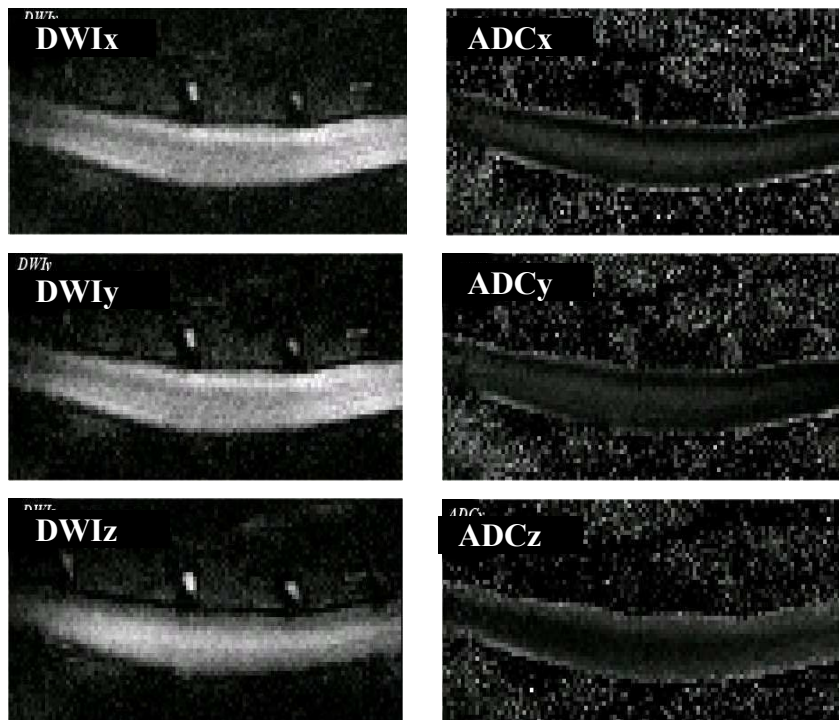
Natomiast na obrazach DWI z gradientami w kierunku z, ciemniejsza była istota biała, w której w tym kierunku dyfuzja jest znacznie silniejsza niż w istocie szarej. I odpowiednio na mapach ADC istota biała była jaśniejsza od istoty szarej.



Ryc.6.a.



Ryc.6.b.



Ryc.6.c.

Ryc.6.a-c. Obrazy prawidłowego rdzenia kręgowego szczura: bez gradientów dyfuzyjnych (a) oraz z gradientami dyfuzyjnymi (DWI) i odpowiadającymi im mapami współczynników dyfuzji (ADC) w przekroju osiowym (b) i strzałkowym (c). Kierunki gradientów: x - prawo-lewy, y - przednio-tylny, z - kranio-kaudalny.

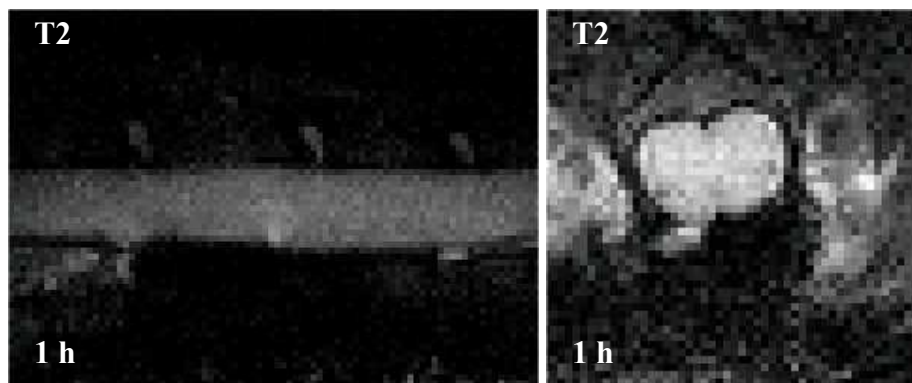
- **Grupa z laminektomią**

Zabieg laminektomii, którego celem było odsłonięcie powierzchni rdzenia kręgowego wykonywany był u wszystkich szczurów przed wykonaniem urazu. Dlatego grupa zwierząt z wykonaną samą laminektomią posłużyła w celu oceny na ile sam ten zabieg wpływał na obraz rdzenia kręgowego. Była to zatem właściwa grupa kontrolna dla pozostałych grup szczurów z urazem rdzenia. Poniżej zamieszczone ryciny prezentują obrazy rdzenia kręgowego szczura po wykonanej laminektomii w kolejnych pomiarach: obrazy  $T_2$ -zależne w przekrojach strzałkowym i osiowym w centrum zabiegu (Ryc.7) oraz strzałkowe obrazy ważone dyfuzyjnie wraz z mapami współczynników dyfuzji (Ryc.8, Ryc.9 i Ryc. 10).

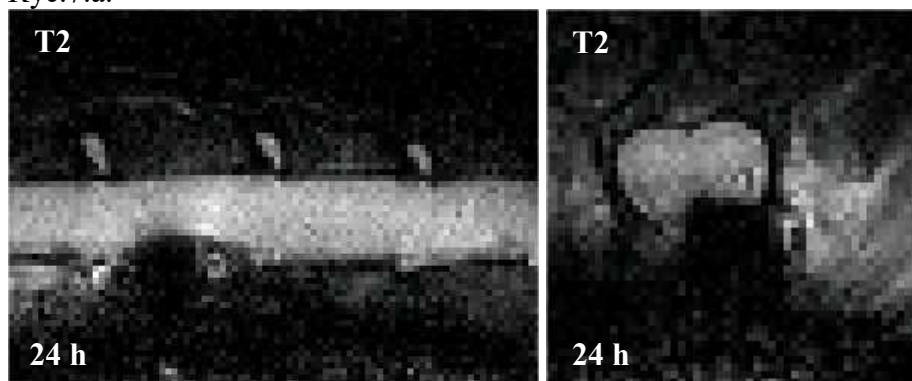
W grupie szczurów z wykonaną tylko laminektomią, na obrazach  $T_2$ -zależnych rdzenia kręgowego zaobserwowano, że w przyleganiu do powierzchni grzbietowej rdzenia, w miejscu przeprowadzonego zabiegu, dochodziło do nagromadzenia się krwi pochodzącej z przeciętych tkanek. Formujący się nad oponą twardą krwiak w pierwszych dwóch badaniach, po 1 i 24 godzinach od zabiegu wykazywał sygnał hipointensywny związany z obecnością deoksyhemoglobiny (Ryc.7.a,b), a następnie po upływie 48 godzin stał się hiperintensywny co wynikało z obecności methemoglobiny zewnątrzkomórkowej (Ryc.7.c,d).

Krwiak nadtwardówkowy powodował uciśnięcie grzbietowej powierzchni rdzenia kręgowego. Kompresja rdzenia w kolejnych pomiarach wyraźnie się nasilała (Ryc.7.a-d). Na obrazach DWI, zwłaszcza z gradientem dyfuzyjnym w kierunku y (przednio-tylnym), na poziomie zabiegu, zauważalne było dyskretne podwyższenie sygnału w środkowej części rdzenia, w obrębie istoty szarej, mogące świadczyć o spadku dyfuzji w tym kierunku.

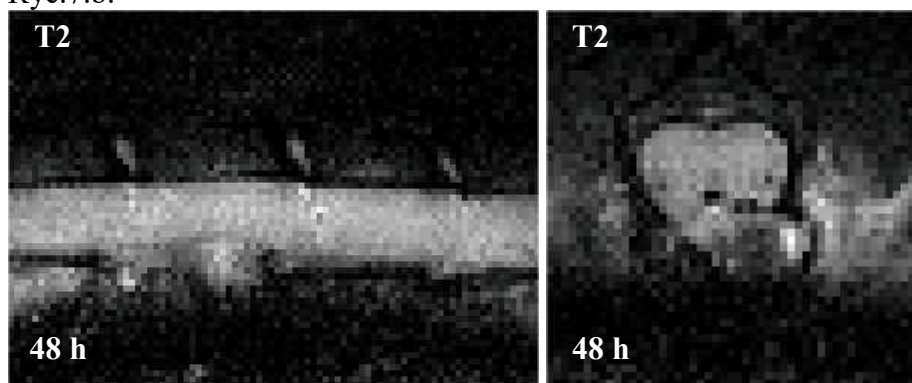




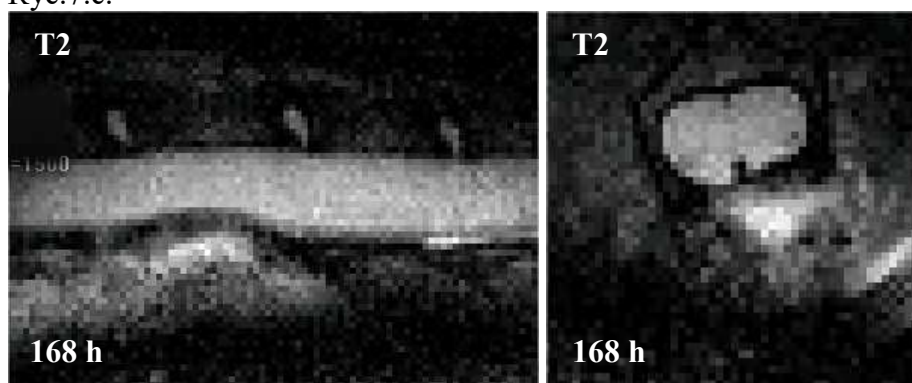
Ryc.7.a.



Ryc.7.b.



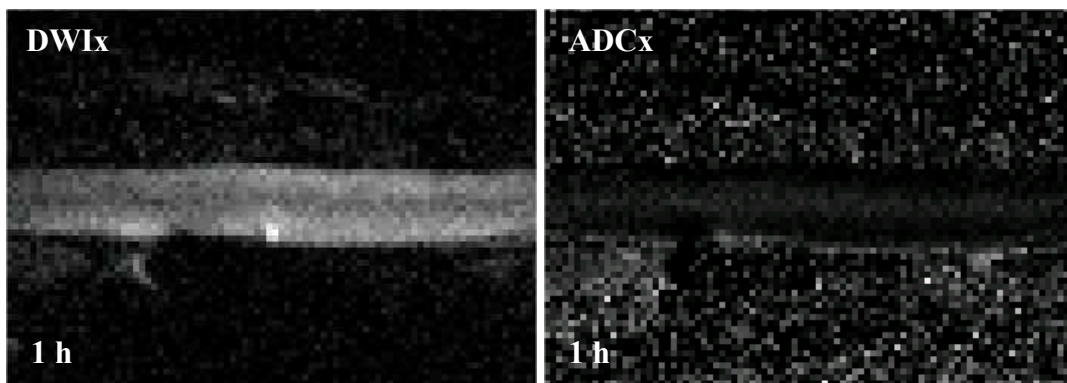
Ryc.7.c.



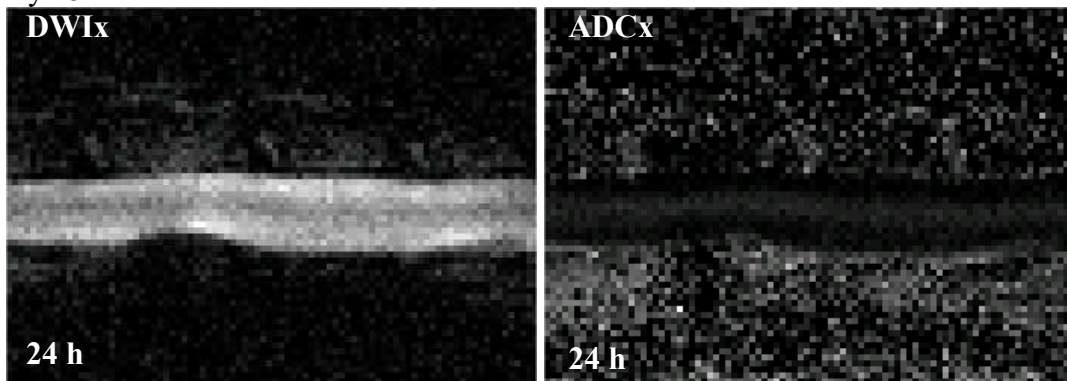
Ryc.7.d.

Ryc.7.a-d. Obrazy  $T_2$ -zależne rdzenia kręgowego szczura z laminektomią, w przekroju strzałkowym oraz osiowym przechodzącym przez centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach.

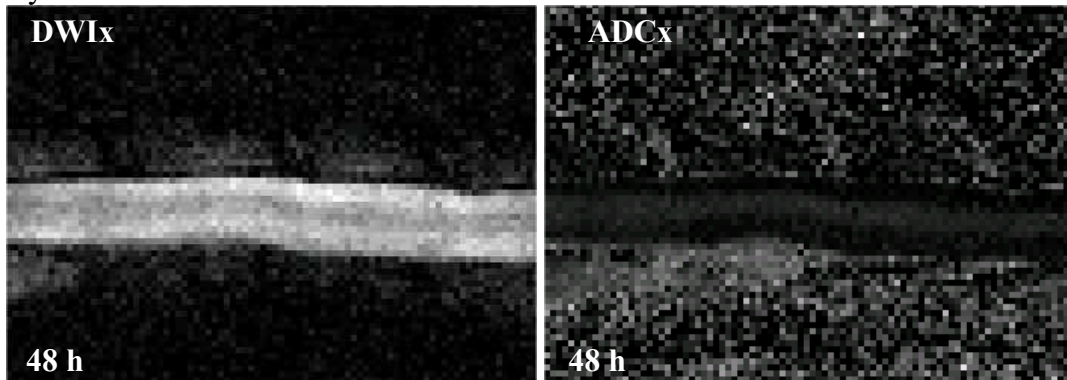




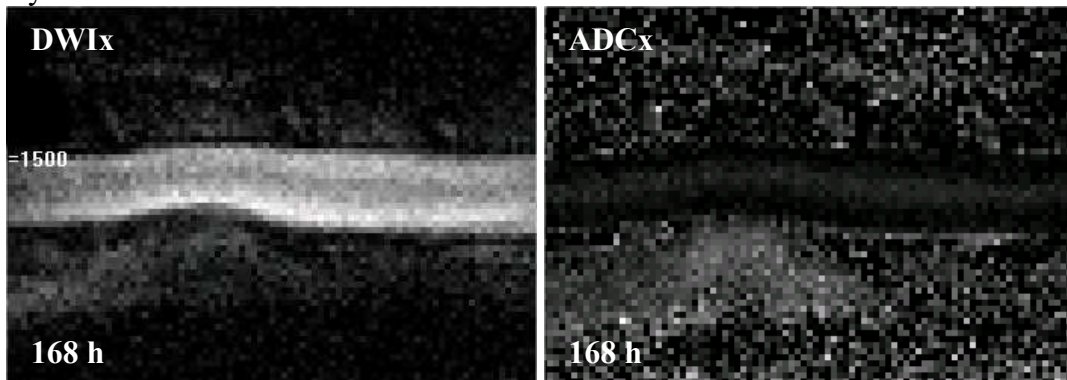
Ryc.8.a



Ryc.8.b.

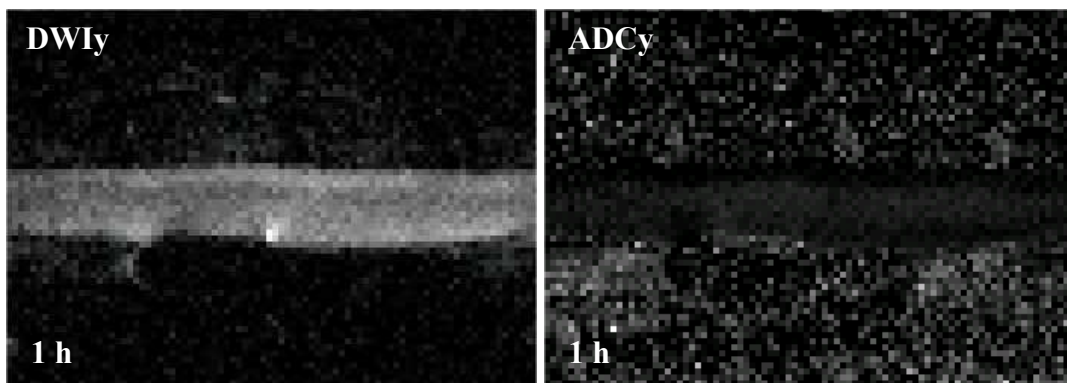


Ryc.8.c.

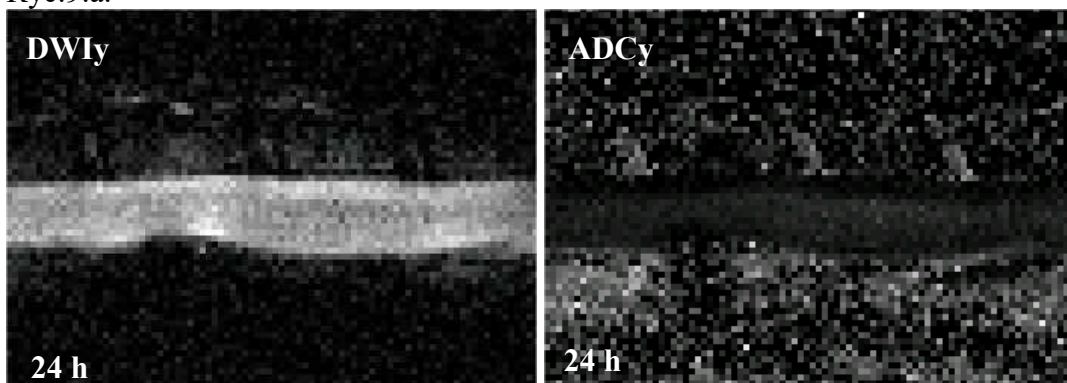


Ryc.8.d.

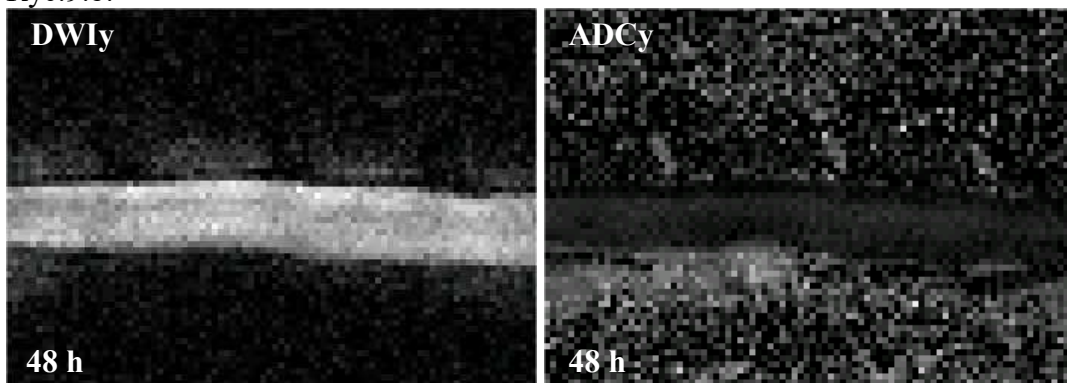
Ryc.8.a-d. Obrazy DWI rdzenia kręgowego szczura z laminiektomią, z gradientem dyfuzyjnym w kierunku x, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynników dyfuzji (ADC).



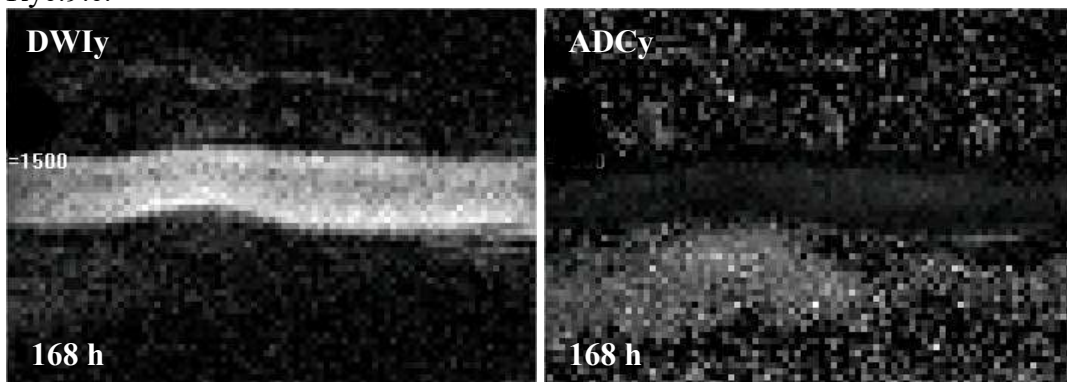
Ryc.9.a.



Ryc.9.b.

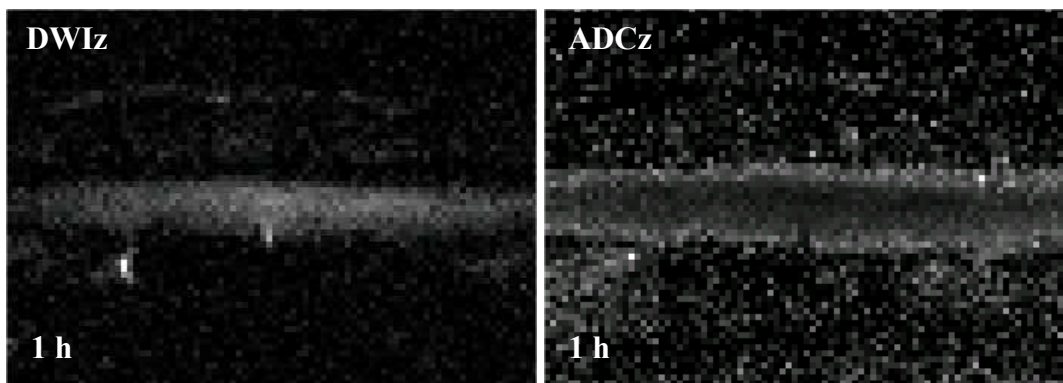


Ryc.9.c.

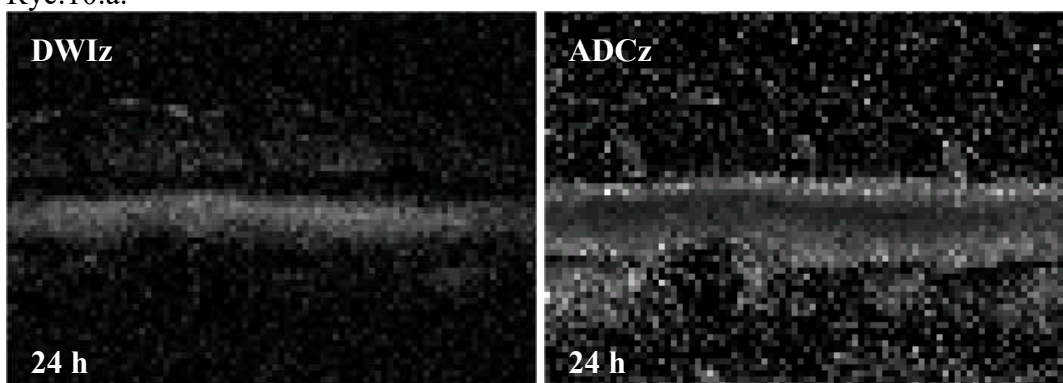


Ryc.9.d.

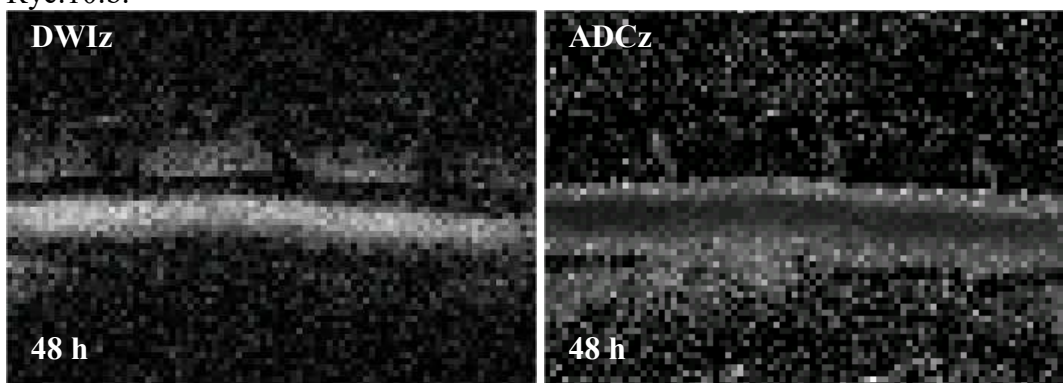
Ryc.9.a-d. Obrazy DWI rdzenia kręgowego szczura z laminectomią, z gradientem dyfuzyjnym w kierunku y, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynników dyfuzji (ADC).



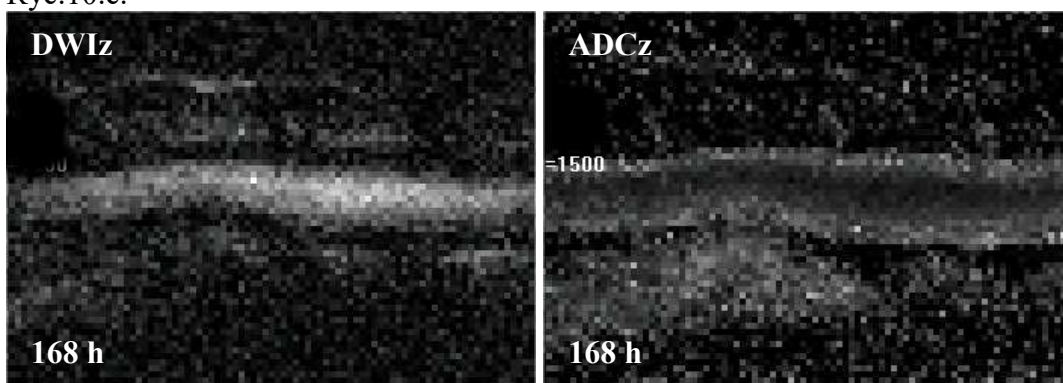
Ryc.10.a.



Ryc.10.b.



Ryc.10.c.



Ryc.10.d.

Ryc. 10.a-d. Obrazy DWI rdzenia kręgowego szczura z laminektomią, z gradientem dyfuzyjnym w kierunku z, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynników dyfuzji (ADC).

- **Grupa z laminektomią i urazem rdzenia**

W grupie szczurów z laminektomią i urazem mechanicznym, zmiany pourazowe widoczne były w obrębie rdzenia, we wszystkich czterech pomiarach. Obrazy rdzenia kręgowego z wykonanym urazem,  $T_2$ -zależne w przekroju strzałkowym i osiowym w centrum urazu oraz strzałkowe obrazy ważone dyfuzyjnie wraz z mapami współczynnika dyfuzji prezentują ryciny 11, 12, 13 i 14.

Podobnie jak w grupie szczurów z wykonaną tylko laminektomią, u szczurów z dodatkowo wykonanym urazem w przyleganiu do odsłoniętej grzbietowej powierzchni rdzenia kręgowego doszło do uformowania się krwiaka, który powodował uciśnięcie rdzenia. Charakter i dynamika zmian sygnału krwiaka nadtwardówkowego w kolejnych pomiarach były takie same jak w grupie z samą laminektomią. W porównaniu do zwierząt z samą laminektomią zauważono, że stopień deformacji rdzenia u szczurów z urazem był nieco mniejszy. Spowodowane to było najpewniej rozwijającym się wewnątrz rdzenia obrzękiem, którego działanie miało przeciwny kierunek do kierunku siły wywieranej przez krwiaka.

W pierwszym pomiarze, na obrazach strzałkowych,  $T_2$ -zależnych, jak również na dyfuzyjnie ważonych (we wszystkich kierunkach) zaobserwowano położoną w środkowej części rdzenia strefę hipointensywną, otoczoną hiperintensywnym obszarem o nieostrych granicach. Opisana strefa hipointensywna była wynikiem nagromadzenia się wynaczynionej krwi w fazie deoksyhemoglobiny i nie odpowiadały jej żadne zmiany na mapach ADC. Natomiast obwodowa strefa hiperintensywna odpowiadała obrzękowi tkanki rdzenia, a na mapach ADC (szczególnie w kierunku z) widoczna była jako ciemny obszar zmniejszonej dyfuzji (Ryc.14.a). W całości obraz przedstawiał stłuczenie rdzenia - krwiaka wewnątrzrdzeniowego otoczonego strefą obrzęku.

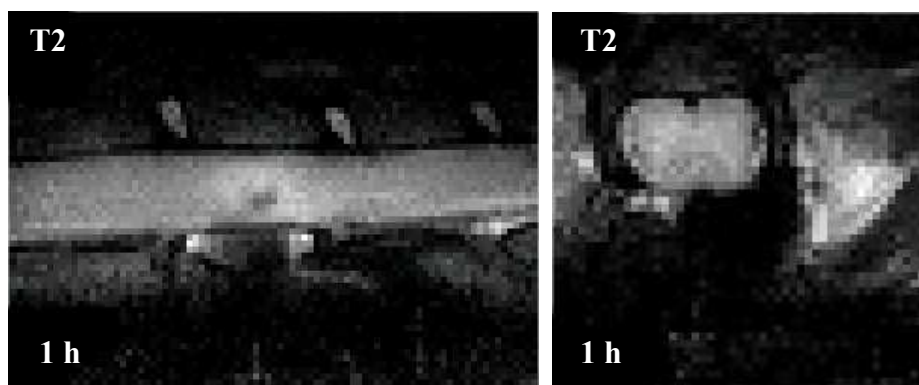
W kolejnych badaniach po 24 i 48 godzinach obszar rdzenia objętego urazem powiększył się i w całości wykazywał podwyższony sygnał (zarówno na obrazach  $T_2$ -zależnych, jak i wszystkich obrazach DWI niezależnie od kierunku) (Ryc.11.b,c. - Ryc.14.b,c). Podwyższony sygnał krwiaka położonego w centrum zmiany związany był z obecnością w jego obrębie methemoglobiny.

Po siedmiu dniach obszar urazu rdzenia uległ zmniejszeniu. Zauważalna była różnica w intensywności sygnału (zarówno na obrazach  $T_2$ -zależnych jak i DWI) pomiędzy stroną brzuszną i grzbietową, gdzie sygnał był wyraźnie silniejszy. Centrum urazu na obrazach  $T_2$ -zależnych i DWI ponownie wykazywało sygnał obniżony w stosunku do zdrowych tkanek rdzenia. Związane to było najpewniej z

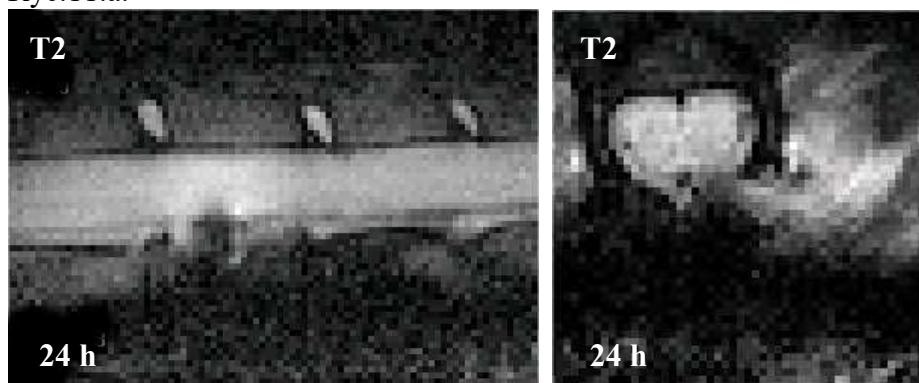
obecnością w centrum urazu hemosyderyny. W odróżnieniu od pierwszego badania obniżonej intensywności sygnału w centrum urazu w obrazach T<sub>2</sub>-zależnych, towarzyszył wzrost dyfuzji widoczny w postaci jasniejszego obszaru na wszystkich mapach ADC (Ryc.11.d. - Ryc.14.d).

Obrazy MR rdzeni kręgowych szczurów, z wykonanym urazem i podaną substancją neuroprotekcijną, zarówno klasyczne T<sub>2</sub>-zależne jak i ważone dyfuzyjnie, nie różniły w widoczny sposób ani pod względem wielkości zaobserwowanych zmian, ani pod względem charakteru sygnału od grupy z urazem rdzenia i bez neuroprotekcji.

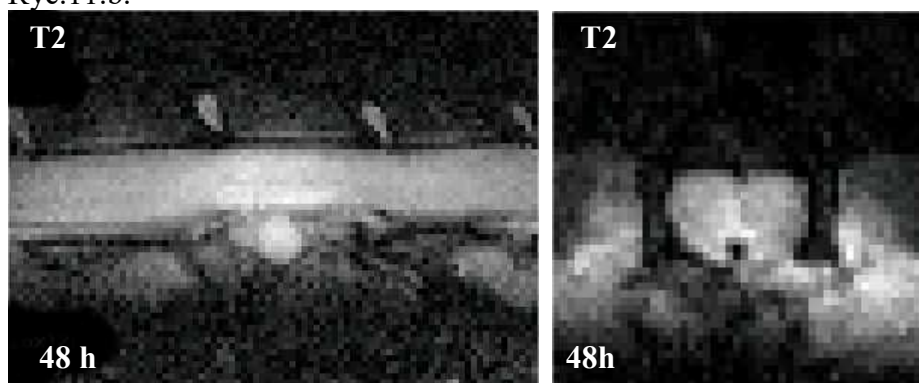




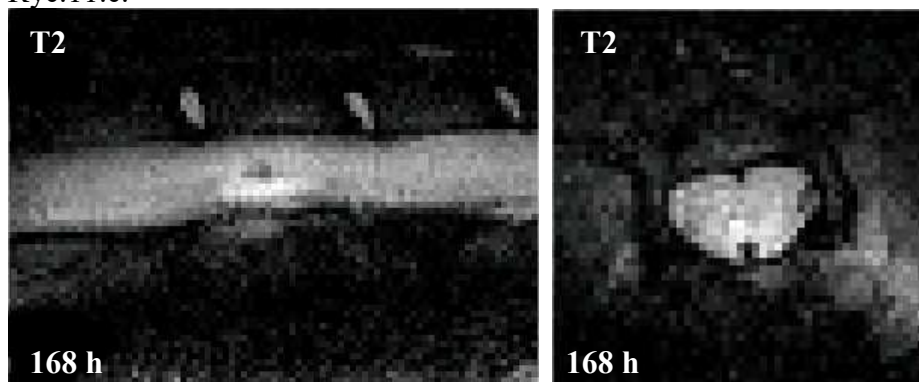
Ryc.11.a.



Ryc.11.b.

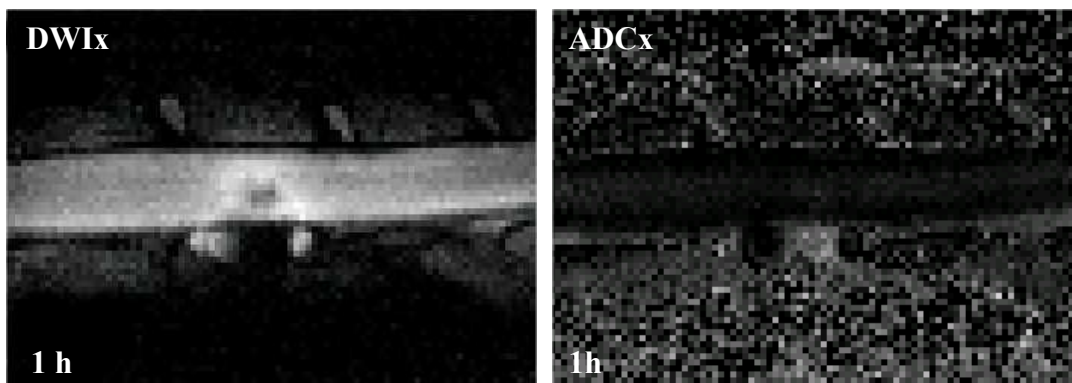


Ryc.11.c.

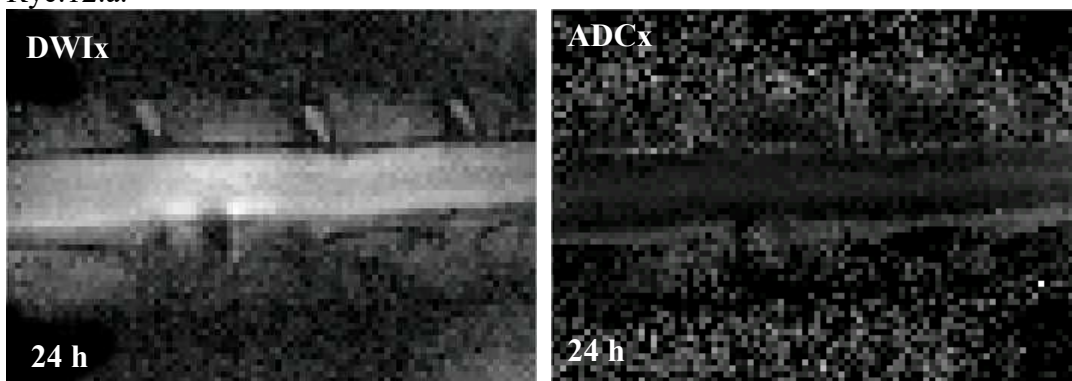


Ryc.11.d.

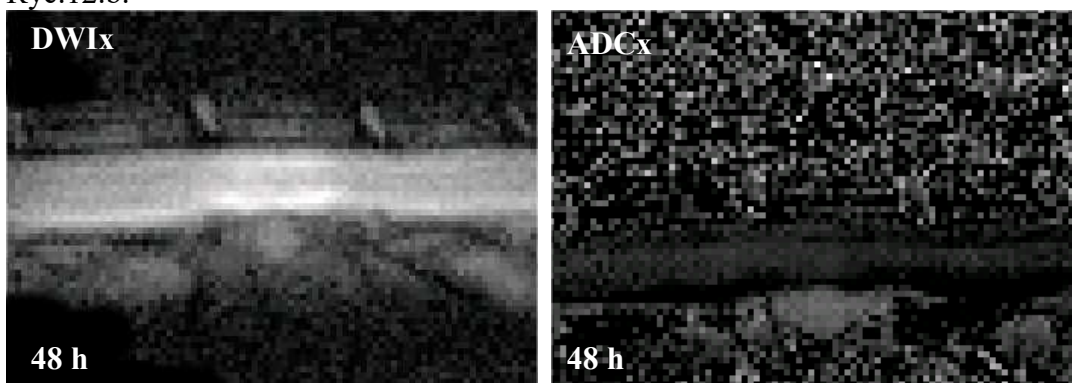
Ryc.11.a-d. Obrazy  $T_2$ -zależne rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem w przekroju strzałkowym oraz osiowym przechodzącym przez centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach.



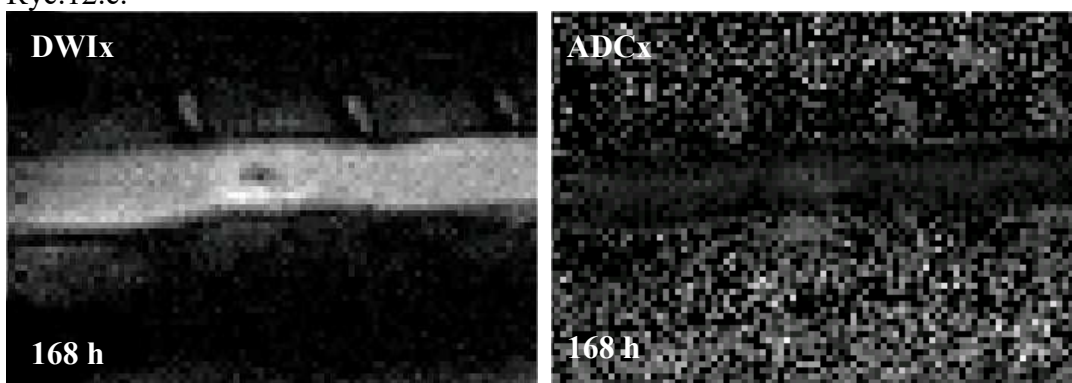
Ryc.12.a.



Ryc.12.b.

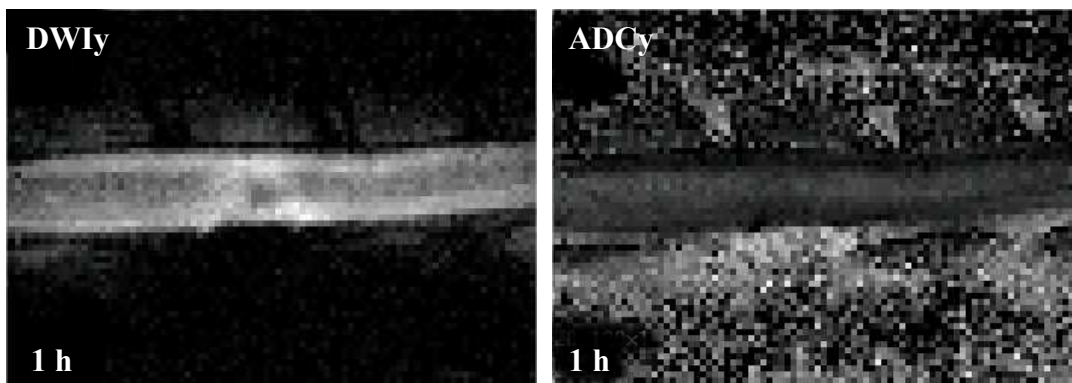


Ryc.12.c.

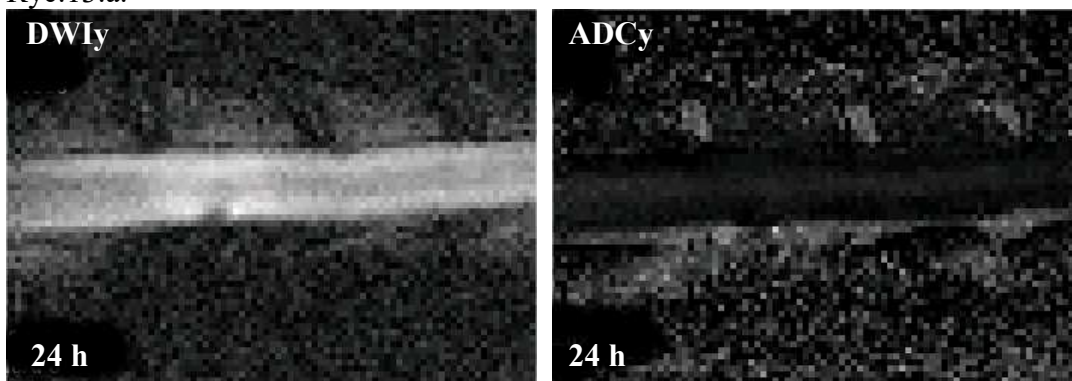


Ryc.12.d.

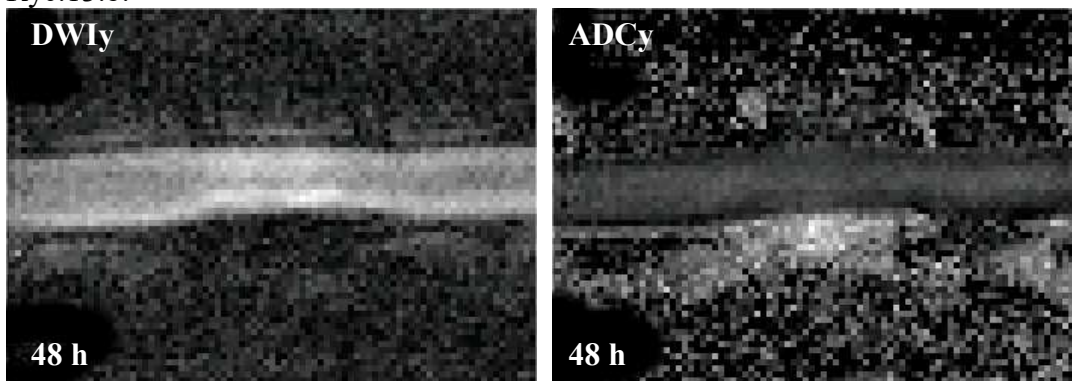
Ryc. 12.a-d. Obrazy DWI rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem, z gradientem dyfuzyjnym w kierunku x, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynników dyfuzji (ADC).



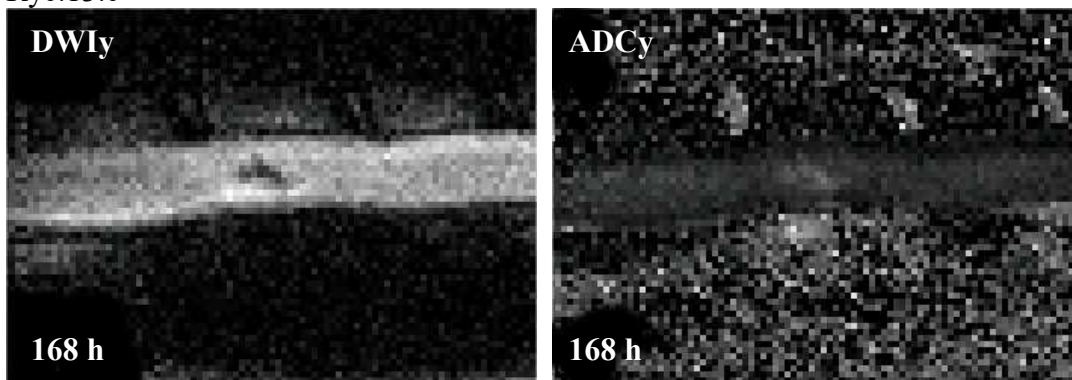
Ryc.13.a.



Ryc.13.b.



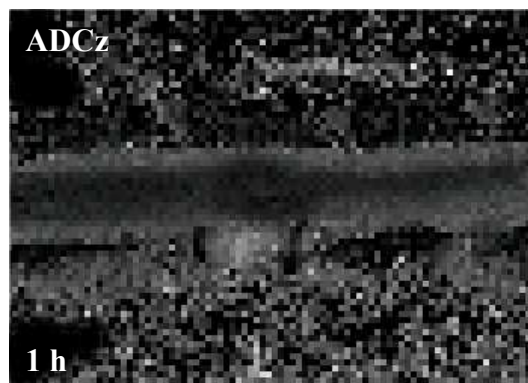
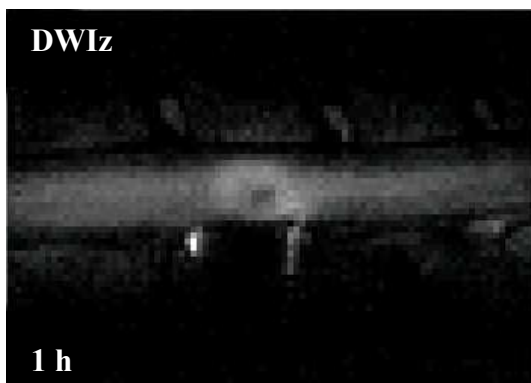
Ryc.13.c



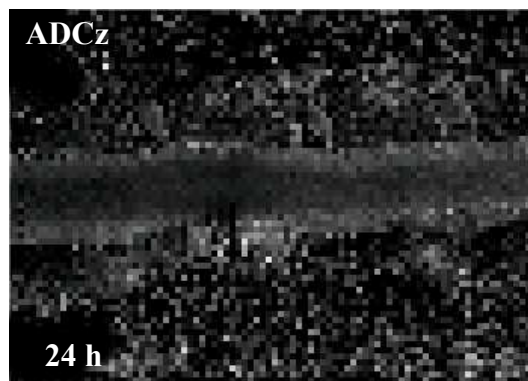
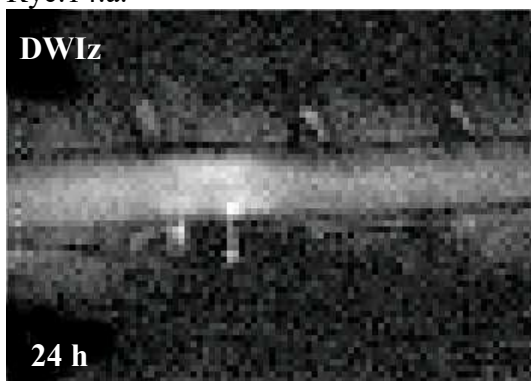
Ryc.13.d

Ryc.13.a-d. Obrazy DWI rdzenia kręgowego szczura z laminectomią i urazem, z gradientem dyfuzyjnym w kierunku y, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).

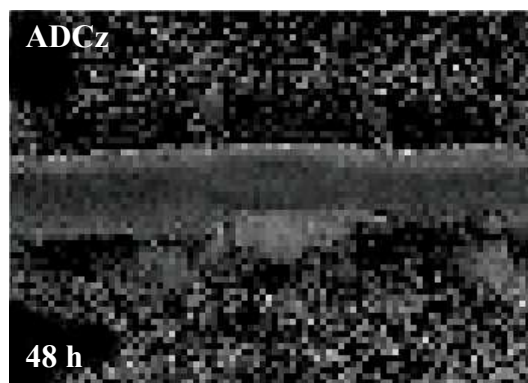
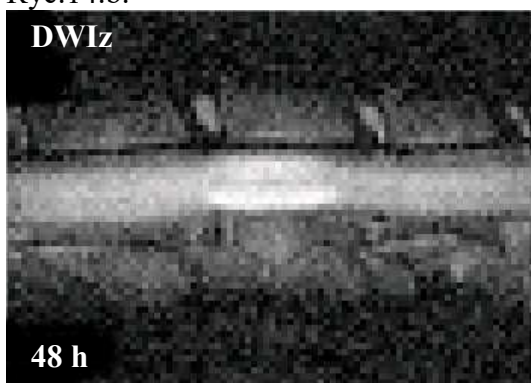




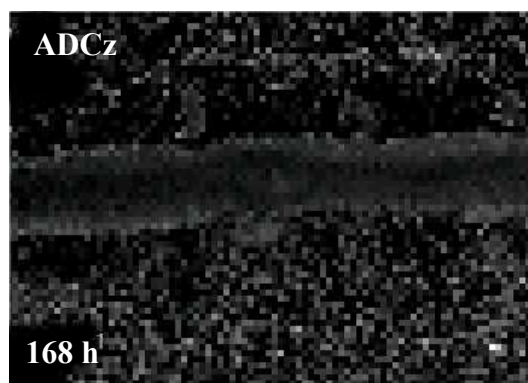
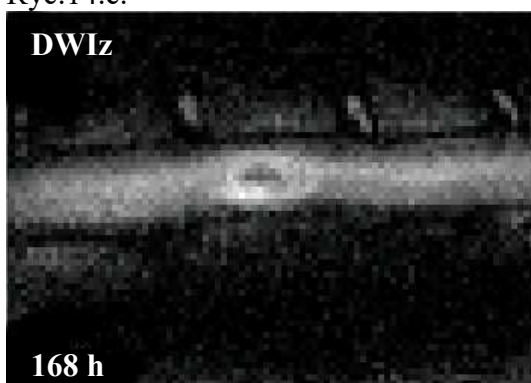
Ryc.14.a.



Ryc.14.b.



Ryc.14.c.



Ryc.14.d.

Ryc.14.a-d. Obrazy DWI rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem, z gradientem dyfuzyjnym w kierunku z, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).

## Analiza współczynników dyfuzji

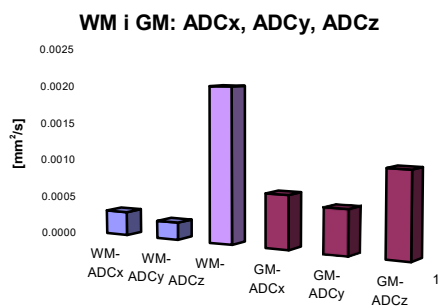
- **Grupa szczurów zdrowych**

Grupa szczurów zdrowych (bez laminektomii) posłużyła do obliczenia wartości współczynników dyfuzji dla istoty białej i szarej prawidłowego rdzenia kręgowego. Była to również grupa kontrolna dla zwierząt z wykonaną laminektomią. Celem porównania tych dwóch grup (bez laminektomii i z samą laminektomią) było określenie czy i w jakim stopniu ten zabieg, który był wykonywany również u zwierząt z urazem, wpływał na zmiany dyfuzji wody w tkance rdzenia kręgowego.

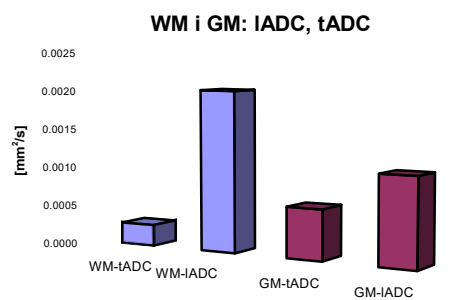
Uzyskane średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty szarej i białej rdzenia kręgowego, w grupie bez laminektomii, przedstawiono w tabeli 5 oraz na rycinie 15.a-d.

Tab. 5. Wartości lADC, tADC, ID i AI dla istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy bez laminektomii.

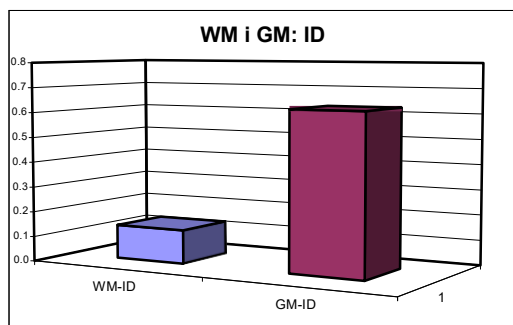
		WM	GM
lADC [mm <sup>2</sup> /s]	średnia	$2.049 \cdot 10^{-3}$	$1.111 \cdot 10^{-3}$
	min-max	$1.877 - 2.298 \cdot 10^{-3}$	$0.794 - 1.746 \cdot 10^{-3}$
	SD	$0.163 \cdot 10^{-3}$	$0.374 \cdot 10^{-3}$
tADC [mm <sup>2</sup> /s]	średnia	$0.271 \cdot 10^{-3}$	$0.641 \cdot 10^{-3}$
	max/min	$0.186 - 0.325 \cdot 10^{-3}$	$0.6 - 0.672 \cdot 10^{-3}$
	SD	$0.052 \cdot 10^{-3}$	$0.026 \cdot 10^{-3}$
ID	średnia	0.134	0.628
	min-max	0.082 - 0.161	0.381 - 0.834
	SD	0.031	0.163
AI	średnia	0.765	0.243
	max/min	0.722 - 0.849	0.0984 - 0.454
	SD	0.049	0.131



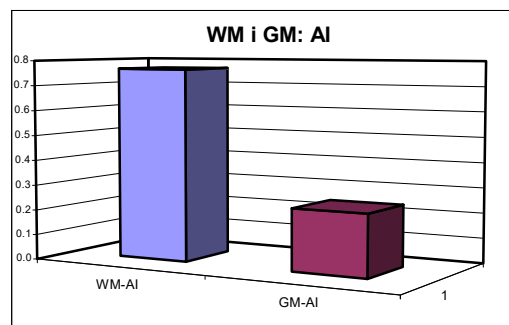
Ryc. 15.a.



Ryc. 15.b.



Ryc. 15.c.



Ryc. 15.d.

Ryc. 15.a-d. Wartości ADCx, ADCy, ADCz oraz lADC, tADC, ID i AI dla istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy bez laminektomii.

W grupie szczurów bez laminektomii zaobserwowano, że istota biała wykazywała wysoki stopień anizotropii dyfuzji wyrażony współczynnikiem AI, wynikający z prawie dziesięciokrotnie większej dyfuzji podłużnej (lADC) w stosunku do średniej dyfuzji w kierunkach poprzecznych (tADC). Współczynnik dyfuzji podłużnej w istocie białej był dwukrotnie większy niż w istocie szarej. W istocie szarej anizotropia zaznaczona była tylko nieznacznie, a wysoki był współczynnik izotropii ID. Podobnie jak w istocie białej wartość współczynnika dyfuzji podłużnej była większa od współczynnika dyfuzji poprzecznej, ale tylko niespełna dwukrotnie.

Wielkość dyfuzji w kierunkach poprzecznych do osi rdzenia (ADCx i ADCy) oddzielnie w obrębie istoty białej i szarej miały zbliżone do siebie wartości. Porównując średnią dyfuzję dla tych kierunków, wyrażoną przez współczynnik dyfuzji poprzecznej, zaobserwowano, że jest ona ponad dwa razy większa w istocie szarej, niż w białej.

Na podstawie testu ANOVA wykazano brak istotnych statystycznie różnic ( $p > 0.05$ ) w średnich wartościach współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, pomiędzy trzema badanymi warstwami osiowymi w tej grupie zwierząt.

- **Grupa z laminektomią**

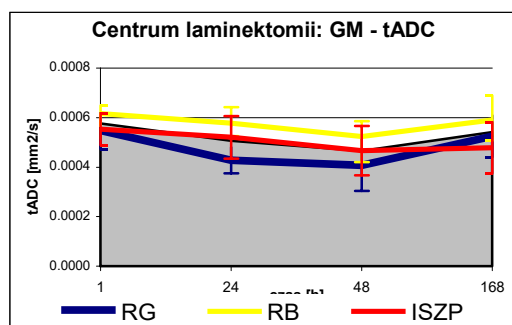
Zwierzęta z wykonaną samą laminektomią stanowiły właściwą grupę kontrolną dla dwóch pozostałych grup szczurów z wykonanym urazem rdzenia kręgowego. W grupie z laminektomią analizę współczynników dyfuzji przeprowadzono w porównaniu do grupy szczurów zdrowych bez laminektomii. Zaobserwowano różnice w wartościach porównywanych parametrów dyfuzji we wszystkich trzech warstwach osiowych, a więc również poza obszarem zmian widocznych w obrazach  $T_2$ -zależnych. Uzyskane średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty szarej i białej rdzenia kręgowego, w grupie z laminektomią, przedstawiono w tabeli 6 oraz na rycinach 17, 18 i 19.

Tab. 6. Wartości średnie lADC, tADC, ID i AI dla całej istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy z laminektomią, w trzech warstwach osiowych, w kolejnych pomiarach. Pomniejszoną czcionką poniżej wartości współczynników dyfuzji podano wartości odchylenia standardowego.

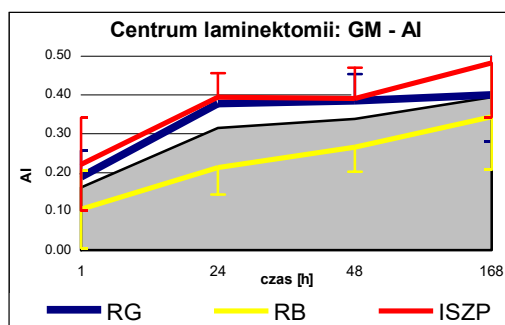
		warstwa 1		warstwa 2		warstwa 3	
		WM	GM	WM	GM	WM	GM
pomiar 1 1 h	lADC	$2.04 \cdot 10^{-3}$	$0.81 \cdot 10^{-3}$	$1.92 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$2.05 \cdot 10^{-3}$	$0.82 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.311 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.311 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.242 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.167 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.199 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.156 \cdot 10^{-3}</math></small>
	tADC	$0.25 \cdot 10^{-3}$	$0.58 \cdot 10^{-3}$	$0.26 \cdot 10^{-3}$	$0.2 \cdot 10^{-3}$	$0.25 \cdot 10^{-3}$	$0.55 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.023 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.023 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.035 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.052 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.02 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.018 \cdot 10^{-3}</math></small>
	ID	0.125	0.735	0.134	0.733	0.125	0.691
		<small>0.023</small>	<small>0.027</small>	<small>0.004</small>	<small>0.175</small>	<small>0.005</small>	<small>0.111</small>
	AI	0.778	0.162	0.764	0.170	0.779	0.194
		<small>0.036</small>	<small>0.036</small>	<small>0.006</small>	<small>0.121</small>	<small>0.009</small>	<small>0.08</small>
pomiar 2 24 h	lADC	$2.23 \cdot 10^{-3}$	$0.97 \cdot 10^{-3}$	$2.13 \cdot 10^{-3}$	$0.9 \cdot 10^{-3}$	$2.18 \cdot 10^{-3}$	$0.92 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.11 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.11 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.088 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.121 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.183 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.212 \cdot 10^{-3}</math></small>
	tADC	$0.28 \cdot 10^{-3}$	$0.50 \cdot 10^{-3}$	$0.32 \cdot 10^{-3}$	$0.51 \cdot 10^{-3}$	$0.25 \cdot 10^{-3}$	$0.58 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.014 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.142 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.114 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.085 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.086 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.11 \cdot 10^{-3}</math></small>
	ID	0.129	0.533	0.152	0.59	0.115	0.662
		<small>0.054</small>	<small>0.054</small>	<small>0.043</small>	<small>0.138</small>	<small>0.039</small>	<small>0.148</small>
	AI	0.779	0.314	0.748	0.272	0.797	0.216
		<small>0.081</small>	<small>0.081</small>	<small>0.06</small>	<small>0.115</small>	<small>0.063</small>	<small>0.114</small>
pomiar 3 48 h	lADC	$2.04 \cdot 10^{-3}$	$0.94 \cdot 10^{-3}$	$1.91 \cdot 10^{-3}$	$0.81 \cdot 10^{-3}$	$1.98 \cdot 10^{-3}$	$0.86 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.225 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.225 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.116 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.182 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.195 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.113 \cdot 10^{-3}</math></small>
	tADC	$0.24 \cdot 10^{-3}$	$0.46 \cdot 10^{-3}$	$0.23 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.24 \cdot 10^{-3}$	$0.52 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.066 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.142 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.101 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.089 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.117 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.09 \cdot 10^{-3}</math></small>
	ID	0.117	0.502	0.122	0.643	0.119	0.611
		<small>0.030</small>	<small>0.054</small>	<small>0.039</small>	<small>0.146</small>	<small>0.043</small>	<small>0.073</small>
	AI	0.794	0.338	0.789	0.235	0.794	0.251
		<small>0.049</small>	<small>0.081</small>	<small>0.065</small>	<small>0.111</small>	<small>0.065</small>	<small>0.066</small>
pomiar 4 168 h	lADC	$2.32 \cdot 10^{-3}$	$1.28 \cdot 10^{-3}$	$2.53 \cdot 10^{-3}$	$1.55 \cdot 10^{-3}$	$2.46 \cdot 10^{-3}$	$1.31 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.092 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.092 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.408 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.642 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.145 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.189 \cdot 10^{-3}</math></small>
	tADC	$0.25 \cdot 10^{-3}$	$0.54 \cdot 10^{-3}$	$0.22 \cdot 10^{-3}$	$0.56 \cdot 10^{-3}$	$0.27 \cdot 10^{-3}$	$0.64 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small><math>0.054 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.054 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.027 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.054 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.059 \cdot 10^{-3}</math></small>	<small><math>0.052 \cdot 10^{-3}</math></small>
	ID	0.106	0.447	0.089	0.404	0.111	0.496
		<small>0.019</small>	<small>0.019</small>	<small>0.0127</small>	<small>0.142</small>	<small>0.0154</small>	<small>0.033</small>
	AI	0.807	0.394	0.835	0.438	0.803	0.339
		<small>0.032</small>	<small>0.032</small>	<small>0.021</small>	<small>0.141</small>	<small>0.024</small>	<small>0.03</small>

Najsilniejsze zmiany widoczne były w istocie szarej rdzenia kręgowego, gdzie zaobserwowano znamiennej statystycznie spadek wartości tADC w obrębie wszystkich trzech badanych warstw (Ryc. 17.d. Ryc. 18.d. Ryc. 19.d.). Zmiany te obejmowały cały obszar istoty szarej. Poziom istotności statystycznej dla porównania poszczególnych części istoty szarej pomiędzy grupą z laminectomią i bez laminectomii prezentuje tabela 7. Spadek dyfuzji poprzecznej najsilniej zaznaczony był w centrum laminectomii i w kolejnych warstwach był coraz mniejszy. Na podstawie testu ANOVA nie udało się jednak wykazać istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami tADC w zależności od odległości od środka laminectomii ( $p > 0.05$ ).

W centrum zabiegu zaobserwowano również różnicę w wartościach współczynnika tADC pomiędzy poszczególnymi częściami istoty szarej (Ryc.16.a). Najsilniejszy spadek dyfuzji poprzecznej dotyczył rogów grzbietowych, położonych najbliżej miejsca zabiegu i uciskającego powierzchnię grzbietową rdzenia krwiaka. Najśłabszy spadek tADC widoczny był po stronie przeciwnej w rogach brzusznych, natomiast zmiany w istocie szarej pośredniej pokrywały się ze średnim wartościami dla całej istoty szarej.



Ryc.16.a.



Ryc.16. b.

Ryc.16.a,b. Zmiany wartości tADC i AI w centrum laminectomii, w kolejnych pomiarach, dla wybranych części istoty szarej (GM): RG - rogi grzbietowe, RB - rogi brzuszne, ISZP - istota szara pośrednia; kolorem szarym zaznaczono wartości średnie dla całej istoty szarej.

T T

Tab. 7. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynnika tADC w istocie szarej; grupa z laminectomią w porównaniu z grupą bez laminectomii, test U Manna-Whitney'a.

		pomiar			
		1 - 1h	2 - 24h	3 - 48h	4 - 168h
warstwa 1	GM	<b>0.009</b>	<b>0.009</b>	<b>0.009</b>	<b>0.025</b>
	RG	<b>0.028</b>	<b>0.009</b>	<b>0.009</b>	0.052
	RB	<b>0.047</b>	<b>0.028</b>	<b>0.009</b>	0.101
warstwa 2	GM	<b>0.009</b>	<b>0.028</b>	<b>0.009</b>	0.052
	RG	<b>0.009</b>	<b>0.028</b>	<b>0.016</b>	<b>0.025</b>
	RB	<b>0.016</b>	<b>0.047</b>	<b>0.028</b>	0.052
warstwa 3	GM	<b>0.047</b>	0.464	<b>0.028</b>	0.881
	RG	<b>0.047</b>	0.250	<b>0.028</b>	0.456
	RB	<b>0.016</b>	0.250	0.117	0.654

GM - cała istota szara, RG - rogi grzbietowe, RB - rogi brzuszne. Pogrubiałą kursywą zaznaczono wartości statystycznie istotne ( $p < 0.05$ ).

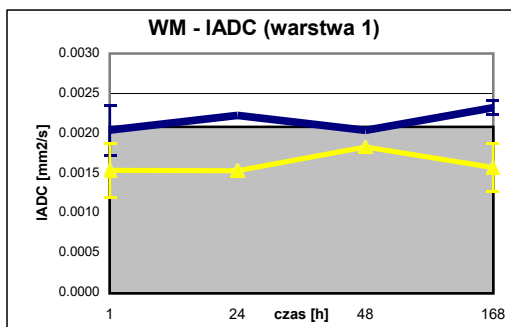
We wszystkich trzech warstwach zaobserwowano również, że wartości współczynnika tADC w istocie szarej zmieniają się w czasie. W kolejnych trzech pomiarach dyfuzja poprzeczna zmniejszała się coraz bardziej, osiągając po upływie 48 godzin najniższą zaobserwowaną wartość. W centrum laminectomii wykazano używając testu ANOVA, że czas znamienne wpływał na obserwowane różnice wartości tADC w istocie szarej ( $p = 0.024$ ) oraz na podstawie testu Wilcoxon'a, że istotna statystycznie była różnica w wartości tADC pomiędzy pomiarami po 1 i 48 godzinie ( $p = 0.043$ ). Po upływie siedmiu dni zaobserwowano odwrócenie się kierunku zmian dyfuzji poprzecznej, i wzrost jej wartości.

W istocie szarej rdzenia zaobserwowano również niewielkie pod względem wartości, statystycznie nieistotne, zmniejszenie się dyfuzji podłużnej. Zmiany te widoczne były we wszystkich trzech warstwach i niezależnie od odległości, od centrum zabiegu miały podobne nasilenie (Ryc. 17.b. Ryc. 18.b. Ryc. 19.b). Spadek tADC w trzech pierwszych pomiarach utrzymywał się na podobnym poziomie. Natomiast po upływie siedmiu dni zaobserwowano wzrost dyfuzji podłużnej w istocie szarej do wielkości przekraczający wartości dla grupy bez laminectomii.

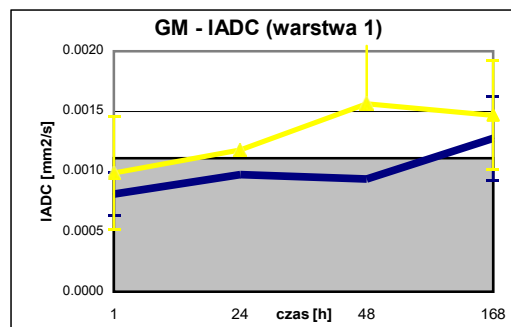
Wynikiem powyższych zmian dyfuzji wody były zmiany anizotropii istoty szarej. Zmiany AI podobnie jak tADC najsilniejsze były w rogach tylnych i istocie szarej pośredniej, a najslabiej wyrażone w rogach przednich (Ryc.16.b). W

porównywanych grupach (bez laminiektomi i z sama laminiektomią), w centrum zabiegu zaobserwowano istotną różnicę w wartościach AI w 2, 3 i 4 pomiarze (test U Mana Whitney'a: 24h -  $p=0.028$ , 48h -  $p=0.016$ , 168h -  $p=0.025$ ). Współczynnik anizotropii w pierwszym pomiarze obniżył się, a następnie w kolejnych pomiarach, niezależnie od odległości od centrum laminiektomii rósł osiągając wartości wyższe niż w grupie bez laminiektomii (Ryc. 17.h. Ryc. 18.h. Ryc. 19.h). Opisane zmiany AI w pierwszej warstwie były znamienne zależne od czasu ( $p=0.003$ ) - test ANOVA, jak również istotna była różnica pomiędzy wartościami AI po 1 i 48 godzinie ( $p=0.043$ ) - test Wilcoxon'a .

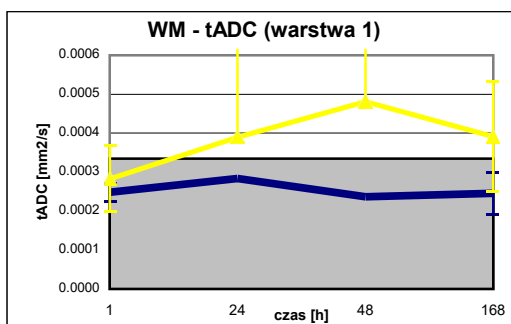
W istocie białej rdzenia kręgowego w grupie z wykonaną tylko laminiektomią zaobserwowano zmiany dotyczące przede wszystkim dyfuzji poprzecznej. Współczynnik tADC we wszystkich trzech warstwach obniżył się nieznacznie, w podobnym zakresie wartości i nie podlegał istotnym zmianom w czasie (Ryc. 17.c. Ryc. 18.c. Ryc. 19.c). Następstwem tych zmian był zauważalny niewielki, stały w czasie wzrost AI i spadek ID, widoczne we wszystkich trzech warstwach (Ryc. 17.e,g. Ryc. 18.e,g. Ryc. 19.e,g). Nie stwierdzono różnic w zmianach tADC oraz ID i AI pomiędzy warstwami. Dyfuzja podłużna w pierwszych trzech pomiarach, utrzymywała się na niezmiennym poziomie (odpowiadającym grupie bez laminiektomii), a po siedmiu dniach we wszystkich warstwach zaobserwowano, podobnie jak w istocie szarej wzrost jej wartości.



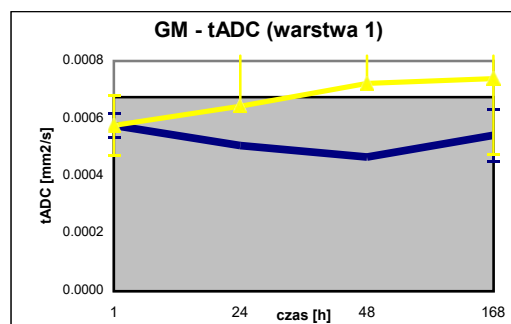
Ryc.17.a.



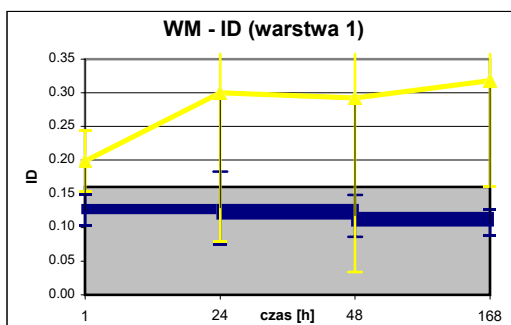
Ryc.17.b.



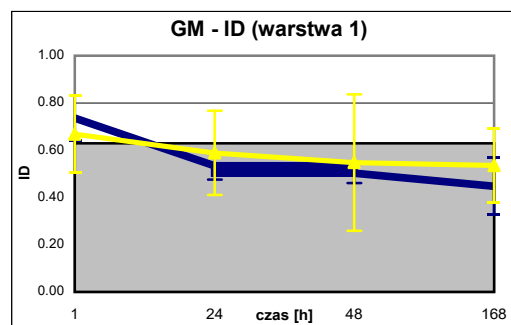
Ryc.17.c.



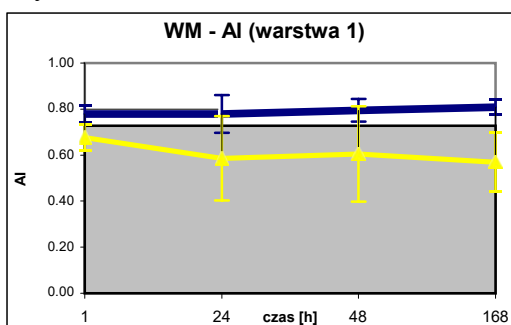
Ryc.17.d.



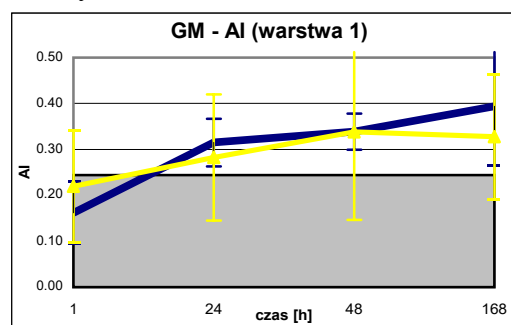
Ryc.17.e.



Ryc.17.f.



Ryc.17.g.

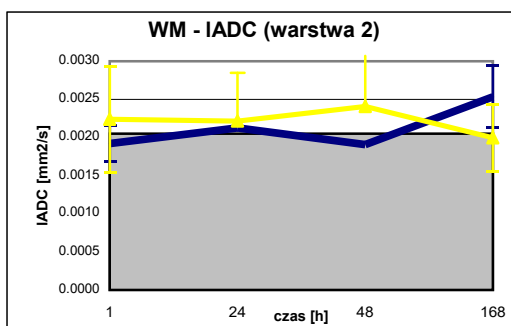


Ryc.17.h.

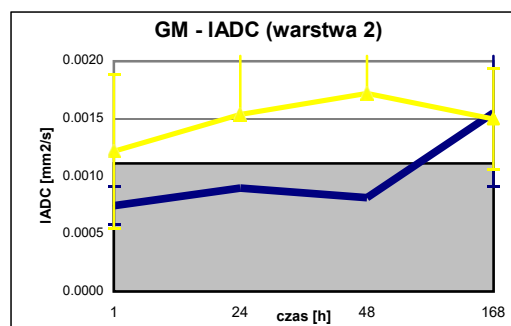
Ryc. 17.a-h. Średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, w centrum zabiegu (warstwa 1), w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy) oraz grupy z urazem (kolor żółty). Kolorem szarym zaznaczono poziom prawidłowych wartości dla grupy szczurów zdrowych bez laminektomii.

WM - istota biała, GM - istota szara, IADC - współczynnik dyfuzji podłużnej, tADC - współczynnik dyfuzji poprzecznej, ID - współczynnik izotropii, AI - współczynnik anizotropii.

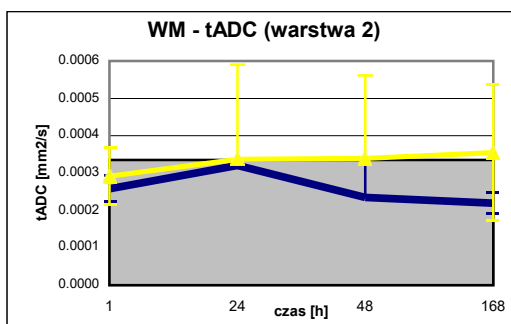




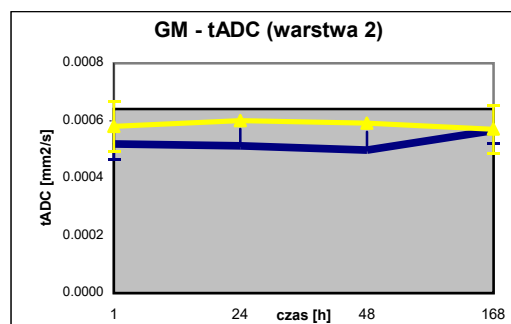
Ryc.18.a.



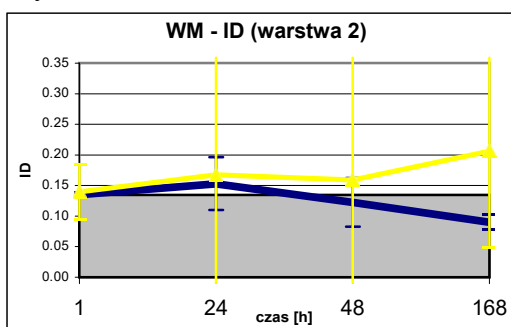
Ryc.18.b.



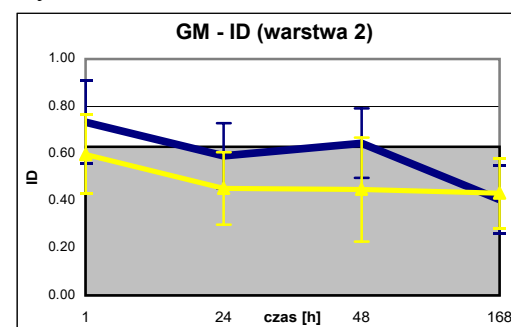
Ryc.18.c.



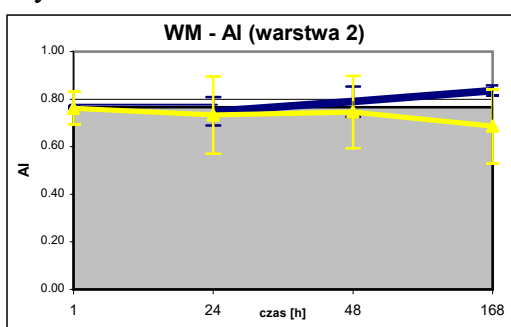
Ryc.18.d.



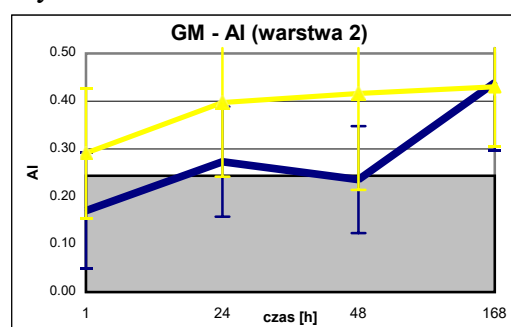
Ryc.18.e.



Ryc.18.f.



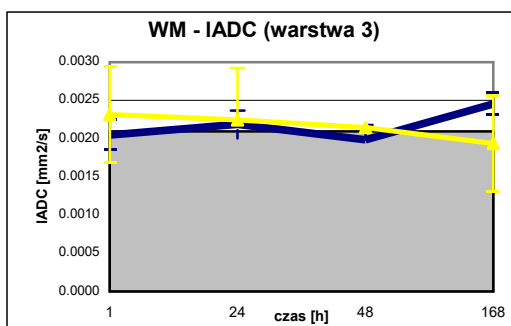
Ryc.18.g.



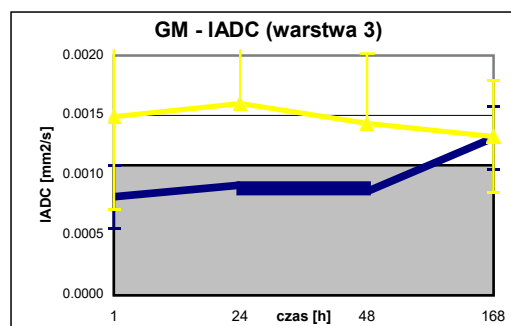
Ryc.18.h.

Ryc. 18.a-h. Średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, 2,8 mm od centrum zabiegu (warstwa 2), w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy) oraz grupy z urazem (kolor żółty). Kolorem szarym zaznaczono poziom prawidłowych wartości dla grupy szczurów zdrowych bez laminektomii.

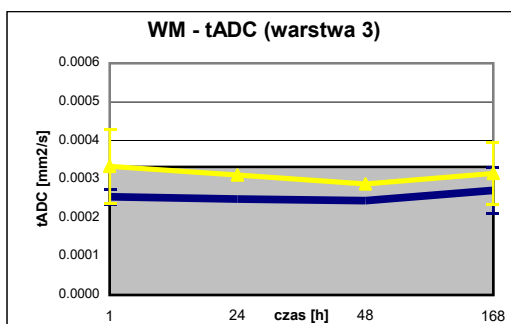
WM - istota biała, GM - istota szara, IADC - współczynnik dyfuzji podłużnej, tADC - współczynnik dyfuzji poprzecznej, ID - współczynnik izotropii, AI - współczynnik anizotropii.



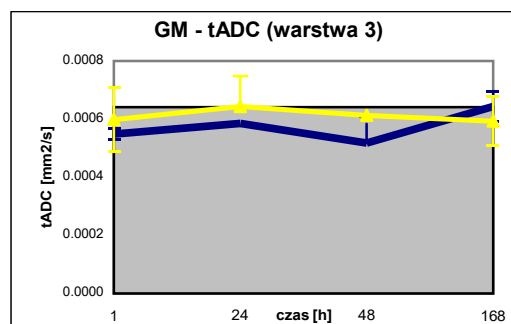
Ryc.19.a.



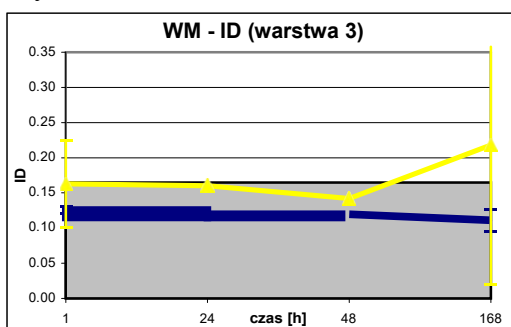
Ryc.19.b.



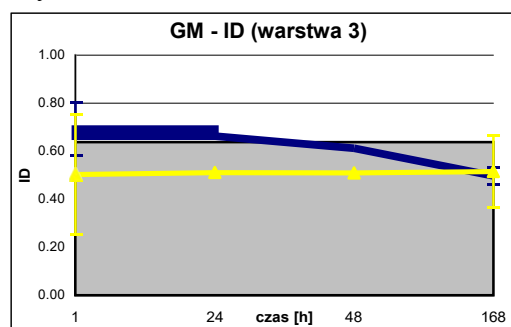
Ryc.19.c.



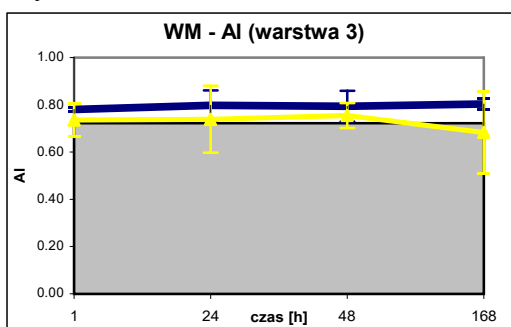
Ryc.19.d.



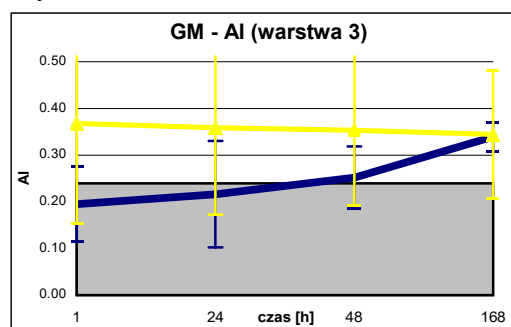
Ryc.19.e.



Ryc.19.f.



Ryc.19.g.



Ryc.19.h.

Ryc. 19.a-h. Średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, 5,6 mm od centrum zabiegu (warstwa 3), w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy) oraz grupy z urazem (kolor żółty). Kolorem szarym zaznaczono poziom prawidłowych wartości dla grupy szczurów zdrowych bez laminektomii.

WM - istota biała, GM - istota szara, IADC - współczynnik dyfuzji podłużnej, tADC - współczynnik dyfuzji poprzecznej, ID - współczynnik izotropii, AI - współczynnik anizotropii.

- **Grupa z urazem rdzenia**

Uzyskane średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty szarej i białej rdzenia kręgowego, w grupie z wykonana laminectomią i następnie urazem mechanicznym, przedstawiono w tabeli 8 oraz na rycinach 17, 18 i 19.

Tab. 8. Wartości średnie IADC, tADC, ID i AI dla całej istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy z urazem rdzenia, w trzech warstwach osiowych, w kolejnych pomiarach. Pomniejszoną czcionką poniżej wartości współczynników dyfuzji podano wartości odchylenia standardowego.

		warstwa 1		Warstwa 2		warstwa 3	
		WM	GM	WM	GM	WM	GM
pomiar 1 1 h	IADC	$1.54 \cdot 10^{-3}$	$0.99 \cdot 10^{-3}$	$2.24 \cdot 10^{-3}$	$1.22 \cdot 10^{-3}$	$2.32 \cdot 10^{-3}$	$1.49 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.344 \cdot 10^{-3}$	$0.471 \cdot 10^{-3}$	$0.692 \cdot 10^{-3}$	$0.673 \cdot 10^{-3}$	$0.627 \cdot 10^{-3}$	$0.774 \cdot 10^{-3}$
	tADC	$0.28 \cdot 10^{-3}$	$0.57 \cdot 10^{-3}$	$0.29 \cdot 10^{-3}$	$0.58 \cdot 10^{-3}$	$0.33 \cdot 10^{-3}$	$0.6 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.084 \cdot 10^{-3}$	$0.106 \cdot 10^{-3}$	$0.077 \cdot 10^{-3}$	$0.087 \cdot 10^{-3}$	$0.096 \cdot 10^{-3}$	$0.111 \cdot 10^{-3}$
	ID	0.198	0.667	0.139	0.596	0.162	0.508
		0.044	0.161	0.052	0.166	0.062	0.25
	AI	0.676	0.219	0.762	0.291	0.735	0.369
		0.057	0.121	0.069	0.136	0.071	0.214
pomiar 2 24 h	IADC	$1.53 \cdot 10^{-3}$	$1.18 \cdot 10^{-3}$	$2.21 \cdot 10^{-3}$	$1.54 \cdot 10^{-3}$	$2.24 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.36 \cdot 10^{-3}$	$0.92 \cdot 10^{-3}$	$0.635 \cdot 10^{-3}$	$0.676 \cdot 10^{-3}$	$0.682 \cdot 10^{-3}$	$0.744 \cdot 10^{-3}$
	tADC	$0.39 \cdot 10^{-3}$	$0.64 \cdot 10^{-3}$	$0.34 \cdot 10^{-3}$	$0.6 \cdot 10^{-3}$	$0.31 \cdot 10^{-3}$	$0.64 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.301 \cdot 10^{-3}$	$0.269 \cdot 10^{-3}$	$0.254 \cdot 10^{-3}$	$0.11 \cdot 10^{-3}$	$0.131 \cdot 10^{-3}$	$0.104 \cdot 10^{-3}$
	ID	0.300	0.588	0.167	0.453	0.16	0.51
		0.22	0.178	0.14	0.153	0.116	0.205
	AI	0.586	0.282	0.733	0.397	0.739	0.358
		0.182	0.137	0.162	0.155	0.141	0.186
pomiar 3 48 h	IADC	$1.83 \cdot 10^{-3}$	$1.56 \cdot 10^{-3}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$	$1.72 \cdot 10^{-3}$	$0.14 \cdot 10^{-3}$	$1.43 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.563 \cdot 10^{-3}$	$0.597 \cdot 10^{-3}$	$0.792 \cdot 10^{-3}$	$0.945 \cdot 10^{-3}$	$0.584 \cdot 10^{-3}$	$0.582 \cdot 10^{-3}$
	tADC	$0.48 \cdot 10^{-3}$	$0.72 \cdot 10^{-3}$	$0.34 \cdot 10^{-3}$	$0.59 \cdot 10^{-3}$	$0.29 \cdot 10^{-3}$	$0.61 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.379 \cdot 10^{-3}$	$0.24 \cdot 10^{-3}$	$0.222 \cdot 10^{-3}$	$0.069 \cdot 10^{-3}$	$0.054 \cdot 10^{-3}$	$0.080 \cdot 10^{-3}$
	ID	0.292	0.547	0.159	0.448	0.141	0.509
		0.258	0.288	0.131	0.22	0.036	0.199
	AI	0.605	0.338	0.745	0.416	0.754	0.353
		0.207	0.192	0.152	0.202	0.052	0.161
pomiar 4 168 h	IADC	$1.57 \cdot 10^{-3}$	$1.47 \cdot 10^{-3}$	$1.99 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$1.94 \cdot 10^{-3}$	$1.32 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.298 \cdot 10^{-3}$	$0.451 \cdot 10^{-3}$	$0.437 \cdot 10^{-3}$	$0.439 \cdot 10^{-3}$	$0.629 \cdot 10^{-3}$	$0.467 \cdot 10^{-3}$
	tADC	$0.39 \cdot 10^{-3}$	$0.74 \cdot 10^{-3}$	$0.35 \cdot 10^{-3}$	$0.57 \cdot 10^{-3}$	$0.31 \cdot 10^{-3}$	$0.59 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	$0.141 \cdot 10^{-3}$	$0.262 \cdot 10^{-3}$	$0.182 \cdot 10^{-3}$	$0.083 \cdot 10^{-3}$	$0.081 \cdot 10^{-3}$	$0.085 \cdot 10^{-3}$
	ID	0.318	0.534	0.206	0.432	0.217	0.514
		0.157	0.157	0.152	0.147	0.198	0.15
	AI	0.568	0.327	0.686	0.429	0.683	0.344
		0.127	0.135	0.156	0.125	0.174	0.137

Porównując grupy szczurów z wykonaną samą laminectomią oraz z laminectomią i urazem rdzenia, zaobserwowano, że zmiany dyfuzji wody zarówno w istocie białej jak i szarej miały w tych grupach przeciwny charakter, w odniesieniu do prawidłowego rdzenia zdrowego szczura. W istocie białej obserwowane zmiany

dotyczyły przede wszystkim pierwszej warstwy, przechodzącej przez centrum urazu, a w istocie szarej zauważalne były we wszystkich trzech warstwach.

W istocie białej w centrum urazu zaobserwowano obniżenie się dyfuzji podłużnej we wszystkich czterech pomiarach, w porównaniu do grupy kontrolnej z samą laminektomią (Ryc. 17.a). W warstwie drugiej natomiast dyfuzja podłużna w pierwszych trzech badaniach wykazywała nieznaczny wzrost, najbardziej zaznaczony po 48 godzinach (Ryc. 18.a). Stwierdzono, że różnice w wartościach IADC pomiędzy centrum urazu, a dwoma warstwami dalszymi były statystycznie istotne w pierwszym i drugim pomiarze (Tab. 9).

Tab. 9. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynnika IADC w istocie białej, w grupie z urazem; porównanie pomiędzy warstwami; test ANOVA.

	pomiar	
	1 -1h	2 - 24h
warstwa 1 : 2	<b>0.037</b>	<b>0.045</b>
warstwa 1 : 3	<b>0.019</b>	<b>0.035</b>

Pogrubiałą kursywą zaznaczono wartości statystycznie istotne ( $p < 0.05$ ).

W centrum urazu znamienne spadki dyfuzji podłużnej stwierdzono we wszystkich częściach istoty białej (Tab. 10). Spadek dyfuzji podłużnej najsilniejszy był w sznurach grzbietowych, będących miejscem bezpośredniego działania czynnika uszkodzającego. Nie zauważono natomiast różnicy pomiędzy częścią brzuszną i grzbietową sznurów bocznych. Opisane zmiany widoczne były we wszystkich pomiarach (Ryc. 20.a).

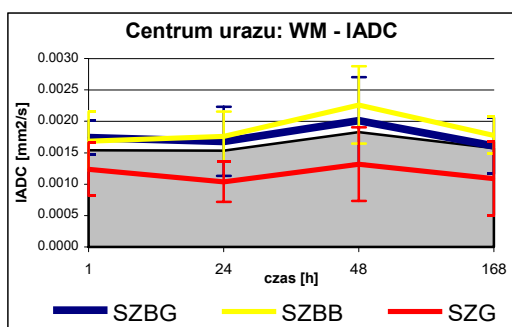
Tab. 10. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynnika IADC w istocie białej, w centrum urazu; grupa z urazem w porównaniu z grupą laminektomią; test U Manna-Whitney'a.

	pomiar			
	1 -1h	2 - 24h	3 - 48h	4 - 168h
WM	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	0.9	<b>0.011</b>
SZBG	0.05	<b>0.02</b>	0.946	<b>0.018</b>
SZBB	0.05	<b>0.014</b>	0.386	<b>0.011</b>
SZG	<b>0.013</b>	<b>0.007</b>	<b>0.037</b>	<b>0.014</b>

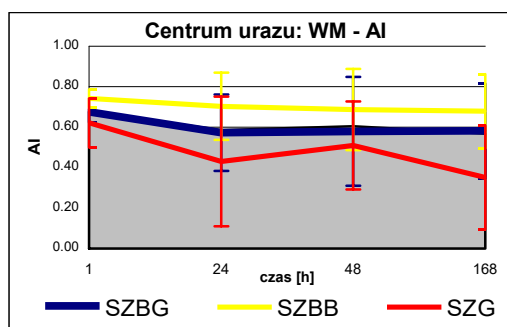
WM - cała istota biała, SZBG - części grzbietowe sznurów bocznych, SZBB - części brzuszne sznurów bocznych, SZG - sznury grzbietowe. Pogrubiałą kursywą zaznaczono wartości statystycznie istotne ( $p < 0.05$ ).

Analizując zmiany dyfuzji poprzecznej w istocie białej zaobserwowano w centrum urazu stopniowy wzrost jej wartości, w trakcie pierwszych trzech pomiarów (Ryc. 17.c). Po upływie 48 godzin współczynnik tADC osiągnął największą zaobserwowaną wartość, zmiennie różniącą się od wartości tADC dla szczurów z laminektomią ( $p=0.013$ ). W siódmym dniu od urazu zaobserwowano spadek wartości dyfuzji poprzecznej. W warstwach dalej położonych od centrum urazu dyfuzja poprzeczna utrzymywała się na nieznacznie wyższym poziomie niż u szczurów z laminektomią, nie wykazując żadnych istotnych zmian w czasie (Ryc. 18.c. i Ryc. 19.c).

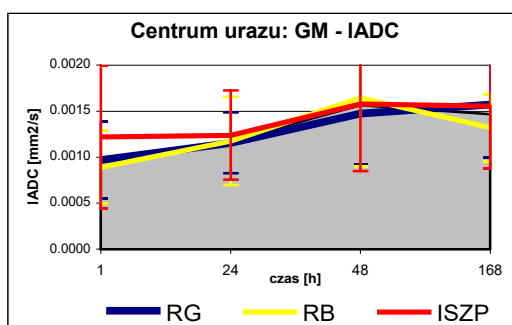
W następstwie zmian dyfuzji wody (spadku IADC i wzrostu tADC), w centrum urazu, w istocie białej rdzenia kręgowego zaobserwowano zmiennie statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej spadek anizotropii i wzrostu izotropii (Tab. 11. i Ryc. 17.e,g).



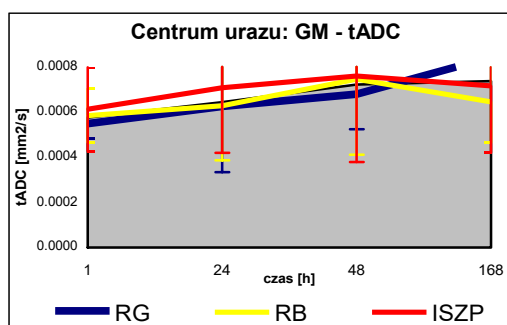
Ryc. 20.a.



Ryc. 20.b.



Ryc. 20.c.



Ryc. 20.d.

Ryc. 20.a-d. Zmiany wartości IADC, tADC i AI w centrum urazu, w kolejnych pomiarach, dla wybranych części istoty szarej (GM): RG - rogi grzbietowe, RB - rogi brzuszne, ISZP - istota szara pośrednia i białej: (WM): SZG - sznurki grzbietowe, SZBG - części grzbietowe sznurów bocznych, SZBB - części brzuszne sznurów bocznych; kolorem szarym zaznaczono wartości średnie dla całej WM i GM.

Zmiany AI najsilniej zaznaczone były w sznurach grzbietowych, a najslabiej po stronie brzusznej rdzenia (Ryc. 20). Spadek anizotropii i wzrost izotropii istoty białej nasilały się w czasie i wykazywały znamienne różnice w wartościach pomiędzy pierwszym i ostatnim pomiarem (AI  $p=0.016$ ; ID  $p=0.021$ ).

Tab. 11. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynników AI i ID w istocie białej, w centrum urazu; grupa z urazem w porównaniu z grupą z laminektomią; test U Manna-Whitney'a.

	pomiar			
	1 - 1h	2 - 24h	3 - 48h	4 - 168h
AI	<b>0.033</b>	<b>0.02</b>	<b>0.006</b>	<b>0.011</b>
ID	<b>0.033</b>	<b>0.02</b>	<b>0.006</b>	<b>0.011</b>

Pogrubiałą kursywą zaznaczono wartości statystycznie istotne ( $p<0.05$ ).

W istocie szarej we wszystkich warstwach zaobserwowano stopniowy wzrost, a następnie spadek dyfuzji podłużnej (Ryc. 17.b. Ryc. 18.b. Ryc. 19.b). Widoczne były różnice pomiędzy poszczególnymi warstwami. Po pierwszej godzinie największy wzrost IADC zaobserwowano w najdalszej trzeciej warstwie, a najslabszy w centrum urazu. W warstwie trzeciej IADC osiągnęła maksymalną wartość, istotną statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0.02$ ) najwcześniej, po 24 godzinach. W centrum urazu znamienne statystyczny wzrost IADC ( $p=0.029$ ) widoczny był do 48 godzinach, kiedy zaobserwowaną najwyższą wartość, różniącą się istotnie z grupą, z samą laminektomią ( $p=0.019$ ). W warstwie drugiej zmiany w czasie miały podobny przebieg jak w centrum urazu.

Zaobserwowane zmiany dyfuzji poprzecznej w istocie szarej dotyczyły głównie centrum urazu (Ryc. 17.d). Wartość tADC w pomiarze po pierwszej godzinie zbliżona była do wartości dla grupy kontrolnej (z samą laminektomią), a następnie zanotowano stopniowo jej wzrost przez wszystkie kolejne pomiary. Stwierdzono, że różnica wartości tADC pomiędzy pierwszym i trzecim pomiarem była na granicy poziomu statystycznej istotności  $p=0.05$ . Wtedy też (po 48 godzinach) wartość dyfuzji poprzecznej istotnie różniła się w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0.013$ ). W pozostałych dwóch warstwach dyfuzja poprzeczna w istocie szarej była nieznacznie podwyższona i nie stwierdzono tam istotnych zmian w czasie (Ryc. 18.d. Ryc. 19.d).

Zmiany dyfuzji wody wywołane urazem w podobny sposób obejmowały cały obszar istoty szarej. Dotyczyło to zarówno wartości, jak i zmian w czasie (Ryc. 20.c,d). Jedyną dostrzegalną różnicę można było zauważyć po siedmiu dniach od

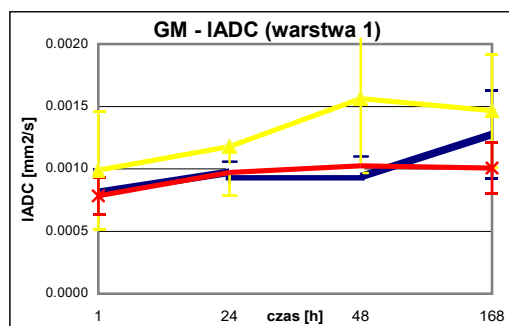
urazu, kiedy powrót dyfuzji poprzecznej i podłużnej do wartości prawidłowych wyraźniejszy był w rogach brzusznych rdzenia kręgowego.

### Ocena neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym na podstawie analizy współczynników dyfuzji

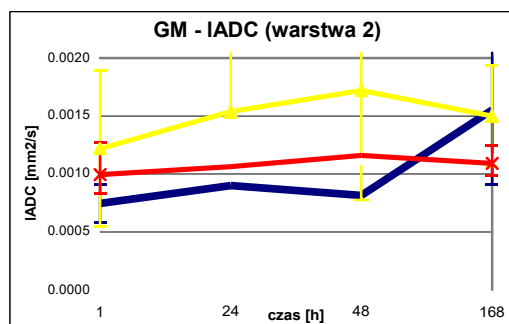
Uzyskane średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty szarej i białej rdzenia kręgowego, w grupie z urazem rdzenia i zastosowaną neuroprotekcją przedstawiono w tabeli 12.

Tab. 12. Wartości średnie lADC, tADC, ID i AI dla całej istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy z urazem rdzenia i MPEP, w trzech warstwach osiowych, w kolejnych pomiarach. Pomniejszoną czcionką poniżej wartości współczynników dyfuzji podano wartości odchylenia standardowego.

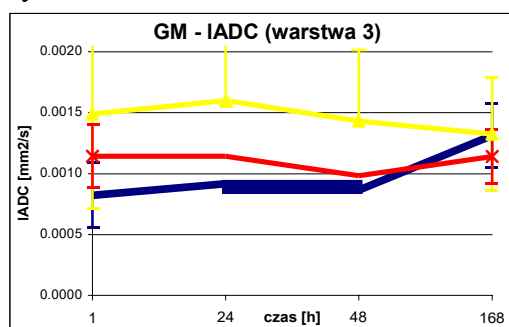
		warstwa 1		warstwa 2		warstwa 3	
		WM	GM	WM	GM	WM	GM
pomiar 1 1 h	lADC	$1.45 \cdot 10^{-3}$	$0.78 \cdot 10^{-3}$	$1.80 \cdot 10^{-3}$	$0.99 \cdot 10^{-3}$	$1.85 \cdot 10^{-3}$	$1.14 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.342 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.145 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.24 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.166 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.216 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.256 · 10<sup>-3</sup></small>
	tADC	$0.25 \cdot 10^{-5}$	$0.59 \cdot 10^{-5}$	$0.26 \cdot 10^{-5}$	$0.60 \cdot 10^{-5}$	$0.3 \cdot 10^{-5}$	$0.63 \cdot 10^{-5}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.055 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.074 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.064 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.067 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.085 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.056 · 10<sup>-5</sup></small>
	ID	0.193	0.818	0.148	0.642	0.167	0.599
	<small>0.053</small>	<small>0.21</small>	<small>0.041</small>	<small>0.173</small>	<small>0.048</small>	<small>0.158</small>	
	AI	0.684	0.122	0.745	0.235	0.717	0.267
	<small>0.074</small>	<small>0.119</small>	<small>0.061</small>	<small>0.117</small>	<small>0.068</small>	<small>0.115</small>	
pomiar 2 24 h	lADC	$1.44 \cdot 10^{-3}$	$0.97 \cdot 10^{-3}$	$1.88 \cdot 10^{-3}$	$1.06 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$1.14 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.332 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.189 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.137 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.144 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.323 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.205 · 10<sup>-3</sup></small>
	tADC	$0.32 \cdot 10^{-5}$	$0.62 \cdot 10^{-5}$	$0.25 \cdot 10^{-5}$	$0.55 \cdot 10^{-5}$	$0.32 \cdot 10^{-5}$	$0.64 \cdot 10^{-5}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.099 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.094 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.112 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.073 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.14 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.117 · 10<sup>-5</sup></small>
	ID	0.245	0.666	0.136	0.544	0.189	0.576
	<small>0.077</small>	<small>0.11</small>	<small>0.054</small>	<small>0.112</small>	<small>0.086</small>	<small>0.102</small>	
	AI	0.617	0.208	0.764	0.306	0.7	0.276
	<small>0.101</small>	<small>0.083</small>	<small>0.081</small>	<small>0.093</small>	<small>0.104</small>	<small>0.082</small>	
pomiar 3 48 h	lADC	$1.44 \cdot 10^{-3}$	$1.02 \cdot 10^{-3}$	$1.76 \cdot 10^{-3}$	$1.16 \cdot 10^{-3}$	$1.67 \cdot 10^{-3}$	$0.98 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.22 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.142 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.203 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.176 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.311 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.244 · 10<sup>-3</sup></small>
	tADC	$0.35 \cdot 10^{-5}$	$0.68 \cdot 10^{-5}$	$0.31 \cdot 10^{-5}$	$0.62 \cdot 10^{-5}$	$0.3 \cdot 10^{-5}$	$0.63 \cdot 10^{-5}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.176 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.094 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.263 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.144 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.186 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.17 · 10<sup>-5</sup></small>
	ID	0.295	0.695	0.201	0.554	0.2	0.687
	<small>0.216</small>	<small>0.16</small>	<small>0.217</small>	<small>0.129</small>	<small>0.163</small>	<small>0.202</small>	
	AI	0.588	0.197	0.704	0.299	0.69	0.206
	<small>0.192</small>	<small>0.087</small>	<small>0.209</small>	<small>0.101</small>	<small>0.18</small>	<small>0.126</small>	
pomiar 4 168 h	lADC	$1.55 \cdot 10^{-3}$	$1.01 \cdot 10^{-3}$	$1.78 \cdot 10^{-3}$	$1.09 \cdot 10^{-3}$	$1.79 \cdot 10^{-3}$	$1.14 \cdot 10^{-3}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.308 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.204 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.138 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.102 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.243 · 10<sup>-3</sup></small>	<small>0.225 · 10<sup>-3</sup></small>
	tADC	$0.30 \cdot 10^{-5}$	$0.61 \cdot 10^{-5}$	$0.26 \cdot 10^{-5}$	$0.54 \cdot 10^{-5}$	$0.28 \cdot 10^{-5}$	$0.59 \cdot 10^{-5}$
	[mm <sup>2</sup> /s]	<small>0.06 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.102 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.062 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.079 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.046 · 10<sup>-5</sup></small>	<small>0.064 · 10<sup>-5</sup></small>
	ID	0.225	0.633	0.156	0.512	0.168	0.544
	<small>0.085</small>	<small>0.125</small>	<small>0.04</small>	<small>0.1</small>	<small>0.049</small>	<small>0.112</small>	
	AI	0.648	0.235	0.737	0.335	0.719	0.306
	<small>0.109</small>	<small>0.098</small>	<small>0.06</small>	<small>0.085</small>	<small>0.069</small>	<small>0.1</small>	



Ryc.21.a.



Ryc.21.b.



Ryc.21.c.

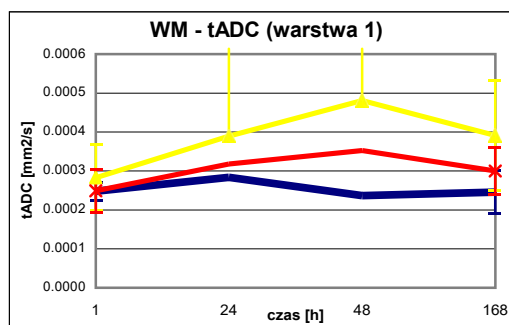
Ryc. 21.a-c. Średnie wartości współczynnika dyfuzji podłużnej (IADC) dla całej istoty szarej (GM), w trzech kolejnych warstwach, w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy), grupy z laminektomią i urazem (kolor żółty) i grupy z laminektomią, urazem i MPEP (kolor czerwony).

Na podstawie przeprowadzonej analizy współczynników dyfuzji zaobserwowano w obrębie istoty szarej, że u szczurów z zastosowaną neuroprotekcją wartości dyfuzji podłużnej, w porównaniu do grupy z laminektomią, we wszystkich trzech warstwach, w czasie trzech kolejnych pomiarów, były coraz większe, ale ten wzrost wartości IADC był mniejszy niż w grupie z urazem bez leku (Ryc. 21.a-c). Zmiany IADC zachodzące w centrum zabiegu, w grupie z podanym lekiem, podobnie jak w grupie bez leku były statystycznie zależne od czasu ( $p=0.004$ ) - test ANOVA.

Wykazano na podstawie testu U Manna-Witney'a istotną statystycznie różnicę w wartościach dyfuzji podłużnej, dla całej istoty szarej, pomiędzy grupą z

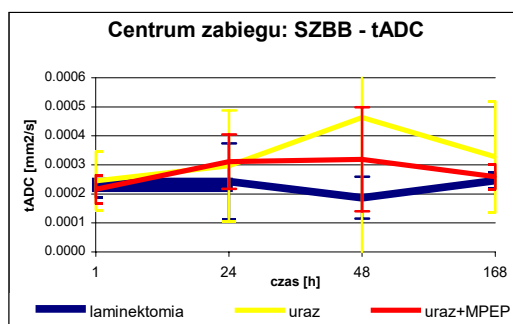


lekiem i bez leku: w centrum urazu po 48 godzinach ( $p=0.038$ ), a w drugiej warstwie po 24 godzinach ( $p=0.041$ ) i 168 godzinach ( $p=0.007$ ). Zaobserwowano również, że różnice te dotyczyły zarówno rogów brzusznych jak i grzbietowych istoty szarej (Ryc. 23.c,d).

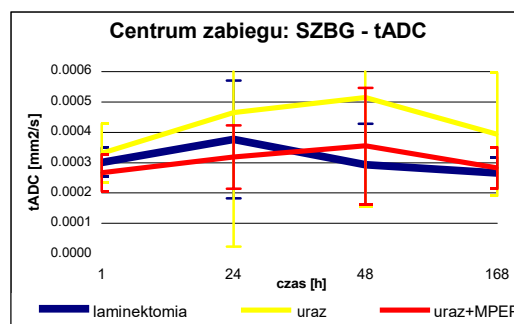


Ryc. 22. Średnie wartości współczynnika dyfuzji poprzecznej (tADC) dla całej istoty białej (WM), w centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy), grupy z laminektomią i urazem (kolor żółty) i grupy z laminektomią, urazem i MPEP (kolor czerwony).

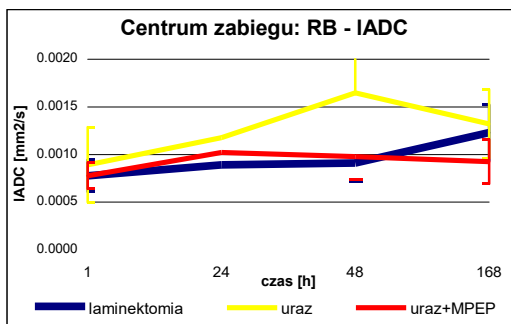
Drugą różnicę zaobserwowano w istocie białej, w której w centrum urazu, w grupie z podanym lekiem, wzrost dyfuzji poprzecznej wywołany urazem rdzenia, we wszystkich pomiarach, był mniejszy niż u szczurów bez leku (Ryc. 22). Różnice w wartościach tADC dotyczyły zarówno przedniej jak i tylnej części sznurów bocznych (Ryc. 23.a,b). Nie udało się jednak wykazać dla tej różnicy w wartościach dyfuzji poprzecznej istotności statystycznej.



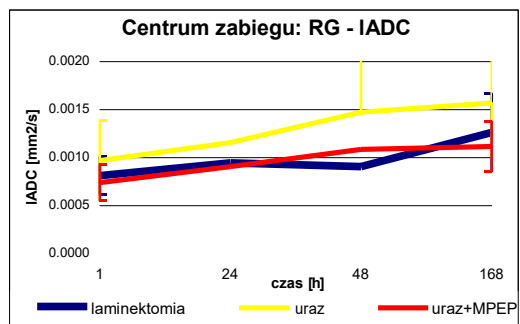
Ryc.23.a.



Ryc.23.b.



Ryc.23.c.



Ryc.23.d.

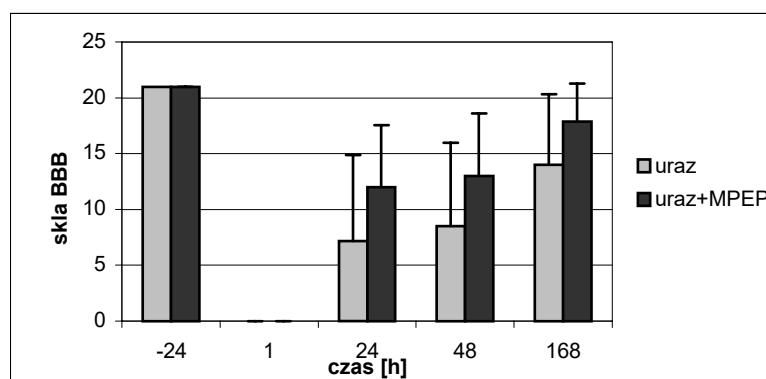
Ryc. 23.a-d. Zmiany wartości tADC w brzusznych (SZBB) i grzbietowych (SZBG) częściach sznurów bocznych oraz zmiany IADC w rogach brzusznych (RB) i grzbietowych (RG), w centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach.

## Ocena behawioralna

Zwierzęta z wykonanymi zabiegami samej laminiektomii, laminiektomii z urazem rdzenia oraz laminiektomi z urazem rdzenia i neuroprotekcją poddane zostały ocenie czynności motorycznej kończyn tylnych, w oparciu 21 stopniową skalę BBB. Ocena oparta była o dokładną analizę ruchomości trzech głównych stawów kończyn tylnych, koordynacji ruchów wszystkich kończyn między sobą i z tułowiem. Obserwacje behawioralne, które odzwierciedlały funkcję rdzenia kręgowego, prowadzono aby ocenić czy w czasie zabiegu laminiektomii nie doszło do przypadkowego urazu rdzenia, aby porównać siłę i zakres urazu pomiędzy poszczególnymi szczurami z urazem rdzenia i w celu oceny efektu neuroprotektynowego zastosowanego leku (MPEP).

W grupie szczurów z wykonana tylko laminiektomią, nie zaobserwowano żadnych deficytów funkcji rdzenia. Wszystkie osobniki wykazywały pełną sprawność motoryczną w zakresie kończyn tylnych i pełną koordynację ruchów w czasie poruszania się.

W obu grupach zwierząt z urazem rdzenia zauważono w kolejnych obserwacjach stopniową poprawę funkcji motorycznej kończyn tylnych. Zaobserwowano, że wartości średnie w skali BBB były wyższe dla szczurów z urazem i zastosowaną neuroprotekcją, niż w grupie bez neuroprotekcji, we wszystkich obserwacjach (Ryc. 24). W obu grupach zwierząt z urazem zauważono obecność pojedynczych osobników, których sprawność ruchowa odbiegała od pozostałych zwierząt. Najpewniej dlatego obserwowane różnice pomiędzy tymi dwoma grupami zwierząt nie osiągnęły istotności statystycznej.



Ryc. 24. Zmiany wartości w skali BBB dla szczurów z urazem i urazem oraz podanym lekiem.

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Dyfuzja wody w tkance nerwowej jest zdeterminowana jej budową histologiczną. Dyskretne zmiany takich czynników jak wielkość komórek, organizacja przestrzenna włókien nerwowych, ciągłość osłonek mielinowych czy przepuszczalność błon komórkowych wpływają na zmiany tego procesu. Mając zatem możliwość oceny kierunków i wartości dyfuzji wody można otrzymać dane o aktualnym stanie struktury tkanki nerwowej rdzenia i ewentualnym stopniu jej uszkodzenia. Prowadzone na świecie badania eksperymentalne z zastosowaniem techniki DWI, zarówno na wypreparowanych rdzeniach (ex-vivo) [37,41,44,74,90,91,103], jak i żywych zwierzętach (in-vivo) [31,34,39,40], mają na celu poznanie i zrozumienie, które procesy rozwijające się po urazie rdzenia i w jaki sposób, wpływają na zmiany dyfuzji wody. Służą one do opracowania procedur doświadczalnych, a w przyszłości pełnego komercyjnego oprogramowania do badań rdzenia kręgowego człowieka. Wyniki badań z zastosowaniem obrazowania DWI w diagnostyce mózgowia [58,64,71,83] i pierwsze próby zastosowania tej metody w badaniach rdzenia kręgowego u ludzi [27,60,81,100] pokazały, że technika ta zaczyna odgrywać coraz większą rolę w diagnostyce chorób układu nerwowego, ponieważ daje możliwości uzyskania informacji niedostępnych do tej pory przy pomocy innych technik diagnostyki obrazowej.

Zastosowany w prezentowanej pracy sposób obrazowania dyfuzji wody przy pomocy rezonansu magnetycznego (obrazowanie anizotropii dyfuzji - DAI), okazał się w badaniach rdzenia kręgowego metodą całkowicie wystarczającą do otrzymania powtarzalnych wyników, które następnie posłużyły do ilościowej analizy zmian dyfuzji wody w rdzeniu, po urazie mechanicznym. Zastosowana metoda, w porównaniu z obrazowaniem pełnego tensora dyfuzji, pozwoliła na skrócenie czasu badania o połowę, ograniczając przy tym stres i obciążenie lekami anestetycznymi u badanych zwierząt. Dzięki temu w tej pracy po raz pierwszy zastosowano technikę DWI do kilkakrotnie powtarzanych pomiarów, w tym trzech pierwszych w jednodniowych odstępach czasowych. Uzyskano w ten sposób informacje o charakterze i dynamice zmian dyfuzji wody w rdzeniu kręgowym zachodzących po urazie [8,17,45,46,49].

Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki badań DWI prawidłowych rdzeni kręgowych szczurów (bez laminektomii) wykazały, że dyfuzja wody w istocie białej jest silnie anizotropowa, natomiast w istocie szarej anizotropia jest tylko nieznacznie zaznaczona. Wyniki te są zgodne z badaniami doświadczalnymi innych autorów przeprowadzonymi zarówno na wypreparowanych rdzeniach jak i żywych zwierzętach [34,37,39,44]. Również wartości otrzymanych współczynników dyfuzji były podobne do tych, jakie uzyskali w swoich badaniach eksperymentalnych in-vivo na szczurach Feneys [34] i Frankoni [39]. W prezentowanej pracy anizotropia dyfuzji w istocie białej, wynikała z prawie dziesięciokrotnie większej dyfuzji podłużnej od dyfuzji poprzecznej. Podobny stosunek lADC do tADC w istocie białej rdzenia wykazał w swoich badaniach Frankoni, natomiast Feneys wykazał lADC sześciokrotnie większe od tADC. Taki charakter dyfuzji wody w istocie białej jest bezpośrednio związany z jej cytoarchitektoniką. Jak bowiem wynika z badań na szczurach z deficytem osłonek mielinowych, przeprowadzonych przez Gulianiego [41], to błony komórkowe aksonów są czynnikiem najsilniej ograniczającym dyfuzję w tkance nerwowej. Dlatego w istocie białej zbudowanej z równoległe przebiegających aksonów dyfuzja podłużna znacznie przewyższa dyfuzję poprzeczną. Natomiast mielinizacja włókien jedynie stopień anizotropii dyfuzji w istocie białej nasila, ograniczając jeszcze bardziej tADC i podwyższając lADC. W przypadku wartości współczynników dyfuzji w heterogennej istocie szarej, na którą składają się różnej wielkości komórki nerwowe i gleju, włókna nerwowe bezrdzenne lub z cienką osłonką mielinową, oraz naczynia, zarówno w prezentowanej pracy jak i u obu cytowanych wyżej autorów, stwierdzono około dwukrotnie większą wartość lADC od tADC, co warunkowało prawie izotropowy charakter dyfuzji w tej tkance.

Dzięki różnicy w wartościach dyfuzji w kierunkach równoległym i prostopadłym do osi rdzenia, między istotą białą i szarą, obrazy ważone dyfuzyjnie jak i mapy ADC prezentują bardzo wysoki kontrast pomiędzy tymi dwoma częściami rdzenia kręgowego, trudny do zauważenia lub całkowicie nieobecny na konwencjonalnych obrazach MR.

W zastosowanym modelu urazu, przed jego wykonaniem, w celu odsłonięcia rdzenia konieczne było wykonanie zabiegu laminektomii. Powodowało to powstanie krwiaka nadtwórkowego, który doprowadzał do ucisku grzbietowej części rdzenia. Mimo braku zmian charakteru sygnału rdzenia w obrazach T<sub>2</sub>-zależnych i całkowicie prawidłowej czynności ruchowej zwierząt, wywołało to znamienne

zmiany dyfuzji wody. Dotyczyły one przede wszystkim istoty szarej i wyrażały się zmniejszeniem dyfuzji poprzecznej i w mniejszym stopniu również zmniejszeniem dyfuzji podłużnej. W istocie białej działanie krwiaka powodowało, podobnie jak w istocie szarej, nasilenie restrykcji dyfuzji w kierunkach poprzecznych wyrażające się spadkiem  $tADC$ , natomiast zupełnie nie wpływało na wartości dyfuzji podłużnej. W efekcie tych zmian wzrósł jeszcze bardziej stopień anizotropii istoty białej, i obniżyła się izotropia istoty szarej.

Problem laminektomii i jej następstw w postaci krwiaka nadtworówkowego, nie był do tej pory opisywany w badaniach eksperymentalnych z zastosowaniem DWI w urazach rdzenia kręgowego, ponieważ opierają się one przede wszystkim na modelach *ex-vivo*. Wypreparowany rdzeń kręgowy nie podlega działaniu sił zewnętrznych, przez co problem ewentualnego krwiaka i powodowanego przez niego ucisku nie ma w tych badaniach znaczenia. Również tematu tego nie poruszali autorzy, którzy prowadzili podobne doświadczenia z użyciem konwencjonalnej techniki MRI zarówno w badaniach *in-vivo* jak i *ex-vivo* [33,36,42].

Wiadomo jest, że spadek całkowitej dyfuzji jest charakterystyczny dla obrzęku cytotoksycznego istoty białej mózgowia w przebiegu udaru niedokrwiennego [32]. Ten typ obrzęku jest wynikiem zwiększonego napływu wody do wnętrza aksonów. Wzrost objętości wody wewnątrzkomórkowej i z drugiej strony zmniejszenie objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej, z równoczesnym wzrostem stopnia jej krętości ma odpowiadać za spadek  $tADC$ . Natomiast obrzęk komórek Schwanna w przestrzeni zewnątrzaksonalnej i redukcja dyfuzji wewnątrz aksonów na skutek uszkodzenia cytoszkieletu i wzrostu lepkości cytoplazmy, mają odpowiadać za spadek  $lADC$  [14]. Wśród autorów istnieją jednak różnice poglądów, która frakcja wody (wewnątrz czy zewnątrzkomórkowa) ma zasadniczy wpływ na spadek wartości całkowitego ADC w obrzęku cytotoksycznym. Silva w badaniach na mózgach szczurów wykazał, że to przestrzeń wewnątrzkomórkowa, cechująca się silniejszą restrykcją dyfuzji ma większy wpływ na całkowitą wartość ADC zarówno w prawidłowym mózgu jak i w przebiegu niedotlenienia [86]. Natomiast Stanisław na podstawie symulacji komputerowej wykazał, że obrzęk aksonów prowadzi do spadku wartości ADC w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i nieznacznego wzrostu ADC wewnątrz aksonów. Dlatego według niego to zmiana objętości wody w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odpowiada przede wszystkim za spadek całkowitego ADC [95].

Wiadomo, że mimo zachowania dużej staranności i precyzji, podczas wykonywania zabiegu laminiektomii może dojść mikrouszkodzeń rdzenia kręgowego, co potwierdziła analiza histopatologiczna, w badaniach opartych na takim samym modelu eksperymentu [1]. Wykazano w nich, że w obrębie rdzenia niektórych szczurów, z wykonaną samą laminiektomią obecne były pojedyncze ciemne neurony, będące wykładnikiem jego uszkodzenia. Jednakże nie stwierdzono, aby wykonany zabieg laminiektomii prowadził do powstania silniejszego uszkodzenia tkanki nerwowej. Brak zmian charakteru sygnału rdzenia w obrazach T<sub>2</sub>-zależnych u szczurów tej grupy także przemawia przeciwko zwiększonej koncentracji wody, w miejscu ucisku rdzenia, typowej dla obrzęku.

Można zatem przypuszczać, że obserwowane obniżenie się wartości ADC u szczurów z samą laminiektomią mogło być wynikiem zmian w przestrzennej organizacji struktury rdzenia wywołanej bezpośrednim mechanicznym jego uciskiem. W przypadku istoty białej spadek dyfuzji poprzecznej tADC mógł wynikać ze zmniejszenia się wymiaru poprzecznego aksonów, bo jak wiadomo z przeprowadzonej przez Forda [38] symulacji komputerowej, wartość tADC maleje wraz ze zmniejszeniem się średnicy tych włókien. Natomiast prawidłowe wartości lADC, potwierdzałyby brak uszkodzenia osłonek mielinowych i struktur cytoszkieletu włókien osiowych. Trudniej natomiast jednoznacznie zinterpretować spadek wartości ADC w istocie szarej, ponieważ zarówno badania eksperymentalne, jak i analizy z użyciem modeli teoretycznych, próbujące korelować zmiany dyfuzji wody z procesami zachodzącymi w tkance nerwowej odnoszą się przede wszystkim do istoty białej [14,21,38,95,103]. Sądzić należy że spadek wartości ADC mógł być przede wszystkim wynikiem zwiększenia się krętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wynikającego z gęstszego upakowania elementów komórkowych, spowodowanego uciskiem i zmniejszeniem wymiarów poprzecznych rdzenia. Stąd najpewniej również wynika silniejszy spadek tADC, niż lADC w tej tkance. Stopniowe nasilanie się zmian tADC w pierwszych trzech pomiarach w centrum zabiegu wynikać mogło z powiększania się objętości krwiaka w tym okresie.

Nie można jednak również wykluczyć, że za spadek całkowitej dyfuzji w miejscu ucisku rdzenia w grupie szczurów z samą laminiektomią, może odpowiadać rozwijające się na tle kompresji niedotlenienie. Takie obserwacje wykazał w swoich badaniach, u dwóch pacjentów z mielopatią na tle przewlekłego ucisku, Bammer [7]. Według tego autora zaobserwowany w miejscu ucisku rdzenia spadek całkowitej

dyfuzji, któremu towarzyszył podwyższony sygnał w obrazach  $T_2$ -zależnych, mógł być właśnie wynikiem niedokrwienia i obrzęku komórek w tym obszarze rdzenia. Taką hipotezę potwierdzałyby również badania u osób z ostrym niedokrwieniem rdzenia, u których również stwierdzono spadek wartości ADC w obszarze niedotlenionej tkanki nerwowej [60].

Trudności interpretacyjne sprawiają wyniki uzyskane u szczurów z wykonaną samą laminectomią po siedmiu dniach od zabiegu. Nieistotny statystycznie wzrost wartości zarówno tADC jak i lADC w rdzeniu kręgowym może wynikać z błędu pomiaru. Szczury z wykonaną samą laminectomią, wykazywały pełną aktywność ruchową, co spowodowało u niektórych osobników znacznego stopnia wygięcia kręgosłupa i rdzenia w miejscu wykonanego zabiegu. Dlatego nie u wszystkich zwierząt z tej grupy udało się uzyskać w ostatnim badaniu idealnie równoległe ułożenie rdzenia kręgowego względem osi aparatury pomiarowej, co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki pomiarów. Takiego stopnia deformacja nie była widoczna w grupie z laminectomią i urazem rdzenia.

Krwiak nadtwardówkowy w kanale kręgowym jest bardzo rzadką patologią u ludzi. Może pojawiać się samoistnie, być wynikiem urazów kręgosłupa i rdzenia lub mieć charakter jatrogeny. W przypadku etiologii pourazowej najczęściej występuje w odcinku szyjnym i dotyczy około 1-2% wszystkich urazów tego odcinka kręgosłupa. Jest wynikiem uszkodzenia splotów żylnych i najczęściej lokalizuje się jest w grzbietowej części kanału kręgowego. Krwiak nadtwardówkowy może pojawić się natychmiast po urazie lub w późniejszej fazie. Przedłużony ucisk na rdzeń kręgowy może doprowadzić do jego mechanicznego uszkodzenia i rozwoju mielopatii [22,23,94].

Uzyskane w tej pracy wyniki pokazują, że sama kompresja rdzenia, wywołuje całkowity spadek dyfuzji obejmujący zarówno istotę szarą jak i białą, bez równoczesnych zmian charakteru sygnału w obrazach  $T_2$ -zależnych. Pierwsze doniesienia z zastosowania techniki DWI w badaniach u ludzi, wykazały również, że rozwijająca się pod wpływem przewlekłej kompresji rdzenia mielopatia, charakteryzuje się wzrostem całkowitej dyfuzji, co według autorów tych badań świadczyć ma o powstawaniu nieodwracalnych zmian malacyjnych w tkance nerwowej rdzenia [27,100].

Można zatem wysnuć przypuszczenie, że umiarkowany ucisk mechaniczny rdzenia powoduje w pierwszym okresie spadek całkowitej dyfuzji, a w dalszej kolejności prowadzi do uszkodzenia osłonek mielinowych i włókien nerwowych, co



wyraża się wzrostem wartości ADC. Dysponując zatem możliwością oceny zmian dyfuzji wody jaką daje technika DWI, można by w procesach przebiegających z uciskiem rdzenia, nie tylko w ostrych urazach, ale również w urazach przewlekłych, na przykład na tle spondylozy, określić czy wywołane urazem zmiany w tkance nerwowej mają jeszcze charakter odwracalny, czy są już efektem uszkodzenia struktury tej tkanki.

Zastosowany model urazu mechanicznego rdzenia kręgowego typu weight-drop należy do jednego z najczęściej stosowanych modeli urazu eksperymentalnego, ze względu na stosunkowo prosty sposób wykonania i powtarzalne wyniki [36,37,69,74]. Wyniki porównawczych analiz badań histopatologicznych wskazują, że zmiany morfologiczne obecne w rdzeniu człowieka nie różnią się zasadniczo od tych, jakie obserwuje się u zwierząt doświadczalnych [75]. Również badania Metzgera [65] porównujące przewlekły uraz rdzenia u ludzi, z modelem urazu weight-drop u szczurów, wykazały że zastosowane do tej analizy badania czynności motorycznej, elektrofizjologiczne badania potencjałów wywołanych i obrazowanie MRI, mają w obu grupach porównywalną wartość jeżeli chodzi o ocenę rozległości i ciężkości uszkodzenia rdzenia. Dlatego według cytowanego autora, ten model urazu eksperymentalnego u szczura może służyć za odpowiednik urazu rdzenia u człowieka. Najważniejsze różnice w deficycie neurologicznym rdzenia pomiędzy ludźmi i zwierzętami eksperymentalnymi wynikają z tego, że tego rodzaju uraz doświadczalny zawsze wykonuje się od strony grzbietowej rdzenia, natomiast u ludzi uszkodzenie może obejmować zarówno stronę brzuszną jak i grzbietową rdzenia

Wywołane, przy pomocy zastosowanego modelu urazu, mechaniczne uszkodzenie rdzenia na konwencjonalnych obrazach  $T_2$ -zależnych widoczne było w postaci ogniska stłuczenia z centralnie położonym hipointensywnym krwiakiem, otoczonym hiperintensywną strefą obrzęku. Podobne wyniki uzyskał Falconer w badaniach na takim samym modelu urazu rdzenia, z użyciem konwencjonalnego MRI [33]. Obwodową strefę hiperintensywną interpretował jako obszar obrzęku cytotoksycznego, a zatarcie się kontrastu pomiędzy centrum, a obwodową strefą urazu, jakie miało miejsce w pierwszej dobie po urazie jako czasową granicę pomiędzy pierwotnymi i wtórnymi mechanizmami urazu. Analogiczny był również powrót różnicy sygnału pomiędzy centrum urazu i jego obwodem, w trzeciej dobie, widoczny aż do dwóch tygodni po urazie. Podobnie jak w badaniach wykonanych w

tej pracy, autor ten zauważył, że klasyczne obrazy  $T_2$ -zależne, wykonane w dobie urazu i dwa tygodnie później, nie różnią się znamienne między sobą.

Analiza współczynników dyfuzji wykonana na podstawie własnych badań, w grupie z laminektomią i urazem rdzenia, wykazała zmiany dyfuzji wody w zależności od odległości od miejsca urazu, jak i czasu od momentu urazu. W centrum urazu w istocie białej zaobserwowano spadek dyfuzji podłużnej i wzrost dyfuzji poprzecznej, powodujące w efekcie obniżenie się anizotropii dyfuzji w tej tkance. Zmiany dyfuzji wody o takim charakterze opisali wcześniej Ford [37] oraz Fradijakis [40] i uznawane są za charakterystyczne objawy uszkodzenia istoty białej zarówno w mózgu jak i rdzeniu kręgowym. Spadek IADC w istocie białej, który jest najpewniej wyrazem obrzęku aksonalnego, pojawiającego się już kilkanaście minut po urazie oraz uszkodzenia wewnątrzaksonalnego układu mikrofilamentów, widoczny był już po pierwszej godzinie od urazu i utrzymywał się na obniżonym poziomie we wszystkich pomiarach. Dyfuzja poprzeczna, natomiast stopniowo zwiększała się w pierwszych dwóch dobach po urazie, co świadczy o tym że odpowiedzialne za to mechanizmy (uszkodzenie osłonek mielinowych i wzrost przepuszczalności błon komórkowych aksonów) są procesami narastającymi w czasie [14]. Zmiany o podobnym charakterze zaobserwował również Arfanakis w badaniach DWI u ludzi z rozlanym urazem aksonalnym mózgu [6].

Natomiast zmiany w istocie szarej, w centrum urazu, które cechowały się stopniowym wzrostem zarówno dyfuzji podłużnej jak i poprzecznej były wykładnikiem rozwijającej się stopniowo martwicy i uszkodzenia błon komórkowych, co prowadziło do powstawania przestrzeni jamistych, a w końcowym efekcie prowadzi do pourazowej jamistości rdzenia. Zostało to potwierdzone w doświadczalnym modelu indukowanej syringomielii przeprowadzonym przez Schwartz [90]. Charakterystyczne dla zmian dyfuzji wody w istocie szarej, w centrum urazu było również to, że po siedmiu dniach od urazu zarówno IADC jak i tADC wykazywały znacznie podwyższone wartości, będące efektem postępującej martwicy tkanki nerwowej.

Jak opisano wcześniej, obrazy  $T_2$ -zależne rdzenia kręgowego po urazie, po pierwszej godzinie i siedmiu dniach, nie różniły się znacząco między sobą. Natomiast mapy współczynników dyfuzji ADC oraz różnice w wartościach współczynników dyfuzji poprzecznej i podłużnej, wyraźnie wskazywały na postępujące zmiany destrukcyjne w istocie szarej w centrum urazu. Potwierdza to wyniki innych badań, eksperymentalnych na szczurach, które wskazują, że technika

DWI przewyższa pod względem czułości konwencjonalne badanie MRI, w wykrywaniu formujących się pourazowych przestrzeni jamistych w obrębie rdzenia [80,90].

Należy również zwrócić uwagę na wzrost dyfuzji podłużnej w istocie szarej, w drugiej i trzeciej warstwie, który może odpowiadać obrzękowi wazogennemu. Ten rodzaj obrzęku, który charakteryzuje wzrost całkowitej dyfuzji, rozpoczyna się w istocie szarej i następnie przesuwa odśrodkowo [32]. W prezentowanych badaniach zauważono, że najsilniejszy wzrost IADC dotyczył drugiej warstwy, położonej na brzegu widocznej w obrazach  $T_2$ -zależnych strefy urazu. Wzrost IADC obecny był również w trzeciej warstwie, gdzie najwcześniej (po 24 godzinach) osiągnął wartość maksymalną. Obrzękowi wazogennemu powinien również towarzyszyć wzrost dyfuzji poprzecznej, który mimo, że był zauważalny nie osiągnął istotności statystycznej w porównaniu do grupy z samą laminektomią. Być może był to wynik zwiększonej restrykcji dyfuzji w kierunkach poprzecznych przez działania krwiaka nadtworówkowego, przy jednoczesnym braku zmian martwiczych i związanej z tym destrukcji błon komórkowych, w tym obszarze.

Porównując uzyskane wyniki współczynników dyfuzji pomiędzy grupą z samą laminektomią oraz z laminektomią i urazem rdzenia należy zauważyć, że w przypadku bardzo jednorodnej istoty białej współczynniki izotropii i anizotropii w bardzo dobry sposób oddają zmiany dyfuzji wody zachodzące w tej tkance i mogą być traktowane jako wykładniki stopnia jej uszkodzenia [14,74,91]. Natomiast w przypadku heterogennej istoty szarej rdzenia, nie do końca się sprawdzają, na co wskazują wyniki uzyskane w centrum zabiegu, gdzie zarówno w grupie z samą laminektomią jak i z laminektomią i urazem rdzenia współczynnik anizotropii (podobnie jak współczynnik izotropii) w obu grupach osiągały bardzo podobne wartości mimo, że zmiany dyfuzji wody zachodzące w rdzeniach kręgowych tych zwierząt miały charakter zupełnie przeciwny.

Wyniki badań pokazały, że w grupie szczurów z laminektomią i urazem rdzenia zmiany dyfuzji wody nasilały się stopniowo w pierwszych trzech kolejnych pomiarach, co było zapewne wynikiem rozwijających się wewnątrz rdzenia wtórnych mechanizmów urazu. Z kolei po siedmiu dniach widoczne były cechy powrotu niektórych współczynników dyfuzji w kierunku wartości charakterystycznych dla prawidłowego rdzenia, co świadczy o częściowo odwracalnym charakterze niektórych z tych procesów. Ponieważ według przyjętej procedury badawczej, nie wykonywano badań w trzeciej i kolejnych dobach po

zabiegu, a dopiero po upływie tygodnia, nie można jednoznacznie określić granicy czasowej, kiedy dochodzi do odwrócenia się kierunku zaobserwowanych zmian dyfuzji wody w rdzeniu.

Na podstawie uzyskanych wyników zarówno w grupie z wykonaną samą laminektomią, jak również w grupie z laminektomią i urazem rdzenia udało się zaobserwować różnice pomiędzy brzuszłą i grzbietową częścią rdzenia kręgowego. Zgodnie z oczekiwaniami, wyraźniej silniejsze zmiany dyfuzji wody widoczne były w rogach grzbietowych istoty szarej i grzbietowych częściach sznurów bocznych istoty białej, które były położone bliżej działania uszkodzającej siły mechanicznej, co potwierdza wysoką czułość zastosowanej metody. Potwierdziło się również zaobserwowane wcześniej, również w badaniach nad urazem rdzenia, przez Forda [37] to, że technika DWI potrafi pokazać zmiany dyfuzji wody odzwierciedlające zaburzenia struktury tkanki nerwowej poza obszarem urazu widocznego w konwencjonalnym badaniu MRI. Wiadomo jednak również, że zmiany pourazowe, co potwierdził w swoich badaniach na podstawie oceny ekspresji ubikwityny i GFAP Adamek, wykraczają poza strefę obserwowanych zmian dyfuzji wody w badaniu DWI [2].

Coraz lepsza znajomość patomechanizmów urazu rdzenia kręgowego pociąga za sobą rozwój badań nad neuroprotekcją. Zablokowanie bowiem każdego z wtórnych mechanizmów urazu może doprowadzić do zahamowania tych procesów i efekcie ograniczenia strefy urazu, a to z kolei przekładać się na mniejszy deficyt neurologiczny. Opisane do tej pory w literaturze próby zastosowania techniki DWI do oceny neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym, oparte były tylko na badaniach *ex-vivo*. Wykazały one, że analiza współczynników dyfuzji pozwala zauważyć istotne zmiany świadczące o cechach neuroprotekcji i neuroregeneracji tkanki nerwowej, które korelowały z lepszym powrotem czynności motorycznej i obrazem histopatologicznym [74,91]. W tej pracy po raz pierwszy zastosowano technikę DWI do oceny farmakologicznej neuroprotekcji na żywych zwierzętach.

Udział receptorów metabotropowych mGluR5 w procesie ekscytotoksycznego uszkodzenia rdzenia potwierdziły między innymi badania Lorrain [61], z użyciem agonisty grupy I receptorów metabotropowych (S)-3,5-DHPG. Jego podanie drogą dordzeniowej mikroinjekcji stymulowało uwalnianie kwasu glutaminowego, natomiast wcześniejsze zastosowanie dootrzewnowe MPEP,

efekt działania tego agonisty osłabiał. Receptory mGluR5, w rdzeniu kręgowym zlokalizowane zostały wyłącznie w istocie szarej, a ich funkcja związana jest przede wszystkim z procesem nocycepcji [3,69]. Mechanizm neuroprotekcijnego działania MPEP w urazie rdzenia nie jest jednoznacznie określony i najpewniej może wynikać z kilku mechanizmów: oddziaływania na uwalnianie kwasu glutaminowego [67], hamowania kaskady apoptozy [62] oraz interakcji z receptorami jonotopowymi [101].

Efektom zastosowania MPEP - specyficznego antagonisty receptorów metabotropowych mGluR5 - u zwierząt z wykonanym urazem rdzenia, było w porównaniu do grupy szczurów z wykonanym urazem bez neuroprotekcji, osłabienie zmian dyfuzji wody zarówno w istocie szarej, jak i białej, co wskazywało na ograniczenie wtórnych, ekscytotoksycznych mechanizmów urazu i zmniejszenie stopnia uszkodzenia tkanek rdzenia. Różnice w istocie szarej dotyczyły ograniczenia zmian dyfuzji podłużnej, a w istocie białej dyfuzji poprzecznej. Przy czym statystycznie istotne były tylko różnice w istocie szarej. Należy zaznaczyć, że konwencjonalne obrazy T<sub>2</sub>-zależne szczurów z urazem i neuroprotekcją nie różniły się istotnie od grupy bez neuroprotekcji.

Uzyskane wyniki były podobne do tych jakie uzyskał Mills, przy zastosowaniu pojedynczej dawki MPEP, w takim samym modelu urazu rdzenia u szczurów [69]. W badaniach tych wykazał on na podstawie analizy histopatologicznej, statystycznie istotne ograniczenie obszaru uszkodzenia istoty szarej i nieistotne ograniczenie uszkodzenia istoty białej w centrum urazu, co przekładało się na ograniczenie pourazowej nadwrażliwości na bodźce termiczne. Nie zaobserwował on natomiast różnicy w czynności motorycznej pomiędzy szczurami z neuroprotekcją i bez. Różnica taka była zauważalna, choć nieistotna statystycznie, w prezentowanej pracy. We wszystkich pomiarach szczury z podanym MPEP wykazywały lepszą sprawność motoryczną kończyn tylnych w porównaniu do grupy z urazem, bez neuroprotekcji.

Technika rezonansu magnetycznego, z możliwością obrazowania dyfuzji wody, jest obecnie najlepszą metodą pozwalającą na dokładną ocenę urazu rdzenia kręgowego, prognozowanie jego następstw klinicznych i ocenę skuteczności leczenia. Dlatego specjalistyczne ośrodki zajmujące się leczeniem urazów rdzenia powinny mieć możliwość natychmiastowego wykonywania badania MRI. Ponieważ wczesna, dokładna diagnostyka i wynikające z niej właściwe leczenie są elementami mającymi decydujące znaczenie dla losów chorego.

## 6. WNIOSKI

1. Technika obrazowania dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego jest skuteczną metodą do oceny urazu mechanicznego rdzenia kręgowego u szczura w badaniach in - vivo.
2. Analiza współczynników dyfuzji pozwala uzyskać informacje o zmianach wartości dyfuzji wody w kierunkach równoległym i prostopadłym do rdzenia, dzięki czemu można:
  - wnioskować o charakterze zmian struktury istoty szarej i białej rdzenia spowodowanych urazem,
  - wykazać różnice w charakterze i nasileniu tych zmian w zależności od odległości od miejsca urazu,
  - wykazać różnice w nasileniu tych zmian w zależności od czasu od chwili urazu.
3. Przy pomocy obrazowania dyfuzji wody metodą rezonansu magnetycznego i analizy współczynników dyfuzji potwierdzono neuroprotekcyjne działanie MPEP w urazie mechanicznym rdzenia u szczura.
4. Jednocześnie wykazano przydatność tej metody diagnostycznej do oceny farmakologicznej neuroprotekcji rdzenia kręgowego w badaniach eksperymentalnych in - vivo.

## 7. PIŚMIENNICTWO

1. Adamek D. Doświadczalny uraz rdzenia kręgowego w ocenie neuropatologicznej i w porównaniu z obrazowaniem zmian dyfuzji wody techniką magnetycznego rezonansu jądrowego. Praca habilitacyjna. 2001.
2. Adamek D, Kałuża J, Jasiński A. Immunohistochemical investigations of excitotoxicity in experimental spinal cord trauma. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2001; 39(2):175-176.
3. Agrawal SK, Theriault E, Fehlings MG. Role of group I metabotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord white matter injury. *Journal of Neurotrauma* 1998; 11:929-941.
4. Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *The Journal of Neuroscience* 1997; 17(3):1055-1063.
5. Alvarez FJ, Villalba RM, Carr PA, Somohano PM. Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 2000; 422(3):464-487.
6. Arfanakis K, Haughton VM, Carew JD, Rogers BP, Dempsey RJ, Meyerand ME. Diffusion Tensor MR Imaging in Diffuse Axonal Injury. *American Journal of Neuroradiology* 2002; 23:794-802.
7. Bammer R, Fezekas F, Augustin M, Simbrunner J, Strasser-Fuchs S, Seifert T, Stollberger R, Hartung HP. Diffusion-weighted MR imaging of the spinal cord. *American Journal of Neuroradiology* 2000;21:587-591.
8. Banasik T, Jasiński A, Pilc A, Majcher K, Brzegowy P. Application of magnetic resonance diffusion anisotropy imaging for the assessment neuroprotecting effects of MPEP, a selective mGluR5 antagonist, on the rat spinal cord injury in vivo. *Pharmacological reports* 2005; 57:861-866.
9. Bao WL, Williams AJ, Faden AI, Tortella FC. Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Research* 2001; 922:173-179.
10. Basser PJ, Mattiello J, Le Bihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal* 1994; 66:259-267.
11. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma* 1995; 12:1-21.
12. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 2000; 17(10):915-925.
13. Beaulieu C, Allen PS. Determinant of anisotropic water diffusion in nerves. *Magnetic Resonance in Medicine* 1994; 31:394-400.

14. Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed* 2002; 15:435-455.
15. Boundurant FJ, Cobler HB, Kulkarni MV, McArdle CB, Harris JH. Acute spinal cord injury. A study using physical examination and magnetic resonance imaging. *Spine* 1990; 15(3):161-168.
16. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF. i wsp., Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the third National Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injuries Study. *JAMA* 1997; 28, 277 (20):1597-1604.
17. Brzegowy P, Jasiński A, Banasik T, Sułek Z, Adamek D, Majcher K, Pilc A, Skórka T, Węglarz WP. Investigation of neuroprotecting effect of MPEP on a rat spinal cord traumatic injury model using MR diffusion anisotropy imaging. XXXVI Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, Kraków 2003, Streszczenia str.17
18. Bunge RP, Puckett WR, Becerra J. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 1993; 59:75-89.
19. Bullock R, Maxwell WL, Kraydieh S, Teasdale GM, Adams JH. Glia swelling following human cerebral contusion: An ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54:427-434.
20. Carlson GD, Gorden C. Current developments in spinal cord injury research. *The Spine Journal* 2002; 2:116-128.
21. Chin CL, Wehrli FW, Hwang SN, Takahashi M, Hackney DB. Biexponential diffusion attenuation in the rat spinal cord: computer simulations based on anatomic image of axonal architecture. *Magnetic Resonance in Medicine* 2002; 47:455-460.
22. Chang FC, Lirng JF, Luo CB, Yen YS, Guo WY, Teng MM, Chang CY. Evaluation of clinical and MR findings for the prognosis of spinal epidural haematomas. *Clin Radiol* 2005; 60(7):762-770.
23. Chang FC, Lirng JF, Chen SS, Luo CB, Guo WY, Teng MM, Chang CY. Contrast enhancement patterns of acute spinal epidural haematomas: a report of two cases. *American Journal of Neuroradiology* 2003; 24:366-369.
24. Clark CA, Werring DJ, Miller DH. Diffusion imaging of the spinal cord in vivo: estimation of the principal diffusivities and application to multiple sclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine* 2000; 43:133-138.
25. Clark CA, Werring DJ. Diffusion tensor imaging in spinal cord: methods and applications - a review. *NMR in Biomedicine* 2002; 15:578-586.
26. Conn J, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1997; 37:205-37.



27. Demir A, Ries M, Moonen CT, Vital JM, Dehais J, Arne P, Caille JM, Dousset V. Diffusion-weighted MR imaging with apparent diffusion coefficient and apparent diffusion tensor maps in cervical spondylotic myelopathy. *Radiology* 2000; 229:37-43.
28. Dorhman GJ. Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Arch Neurol* 1972; 27:468-473.
29. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS. Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology* 2001; 24(5):254-264.
30. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS. Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary pharmacotherapy. *Clinical Neuropharmacology* 2001; 24(5):265-279.
31. Elshafiey I, Bilgen M, He R, Narayana PA. In vivo diffusion tensor imaging of rat spinal cord at 7 T. *Magnetic Resonance Imaging* 2002; 20:243-247.
32. Ebisu T, Naruse S, Horikawa Y, Ueda S, Tanaka C, Uto M, Umera M, Higuchi T. Discrimination between different types of white matter edema with diffusion-weighted MR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* 2000; 44:893-898.
33. Falconer J.C, Narayana P.A, Bhattacharjee M.B, Liu S.J. Quantative MRI of spianl cord injury in a rat model. *Magnetic Resonance in Medicine* 1994; 32:484-491.
34. Feneys DA, Narayana PA. In vivo diffusion characteristics of rat spinal cord. *Magn Reson Imaging* 1999; 17(3):717-722.
35. Flanders AE, Spettell CM, Friedman DP, Marino RJ, Herbison GJ. The relationship between the functional abilities of patients with cervical spinal cord injury and the severity of damage revealed by MR imaging. *American Journal of Neuroradiology* 1999; 20:926-934.
36. Ford JC, Hackney DB, Joseph PM, Phelan M, Alsop DC, Tabor SL, Hand CM, Markowitz RS, Black P. A method for in vivo high resolution MRI of rat spinal cord injury. *Magnetic Resonance in Medicine* 1994; 31:218-223.
37. Ford JC, Hackney DB, Alsop DC, Jara H, Joseph PM, Hand CM, Black P. MRI characterization of diffusion coefficients in a rat spinal cord injury model. *Magnetic Resonance in Medicine* 1994; 31:488-494.
38. Ford JC, Hackney DB. Numerical model for calculation of apparent diffusion coefficients (ADC) in permeable cylinders-comparison with measured ADC in spinal cord white matter. *Magnetic Resonance in Medicine* 1997; 37(3):387-94.
39. Franconi F, Lemaire L, Marescaux L, Jallet P, LeJeune JJ. In vivo quantitative microimaging of rat spinal cord at 7T. *Magnetic Resonance in* 2000; 44:893-898.
40. Fridakis M, Klkason T, Cheng H, Olson L, Spenger C. High-resolution MRI of intact and transected rat spinal cord. *Experimental Neurology* 1998; 153:299-312.

41. Guliani V, Webb A.G, Duncan I.D, Lauterbur P.C. Apparent diffusion tensor measurements in myelin-deficient rat spinal cords. *Magnetic Resonance in Medicine* 2001; 45:191-195.
42. Hackney DB, Asato R, Joseph PM, Carvlin MJ, McGrath JT, Grossman RI, Kassab EA, DeSimone D. Hemorrhage and edema in acute spinal cord compression: demonstration by MR imaging. *Radiology* 1986; 161:387-390.
43. Holder CA, Muthupillai R, Srinivasan M, Eastwood JD, Hudgins PA. Diffusion-weighted MR imaging of the normal human spinal cord in vivo. *American Journal of Neuroradiology* 2000; 21:1799-1806.
44. Ingis BA, Yang L, Wirth ED, Plant D, Mareci TH. Diffusion anisotropy in excised normal rat spinal cord measured by NMR microscopy. *Magn Reson Imaging* 1997; 15:441-450.
45. Jasiński A, Brzegowy P, Majcher K, Sułek Z, Banasik T, Węglarz WP, Skórka T. Application of MR diffusion anisotropy imaging and behavioral observation for the assessment of injury development on a rat spinal cord in vivo. *Magma* 2004, 17 Suppl 1:297-298.
46. Jasiński A, Banasik T, Sułek Z, Majcher K, Brzegowy P, Adamek D, Skórka T. Application of MR diffusion anisotropy imaging for the assessment of MPEP neuroprotection effects on the rat spinal cord injury in vivo. *Proc Int Soc Mag Reson Med* 2004; 11:2474.
47. Jasiński A, Banasik T, Konopka M, Pieniążek P, Hartel M, Skórka T, Węglarz WP. Axial DW-EPI study of biexponential water diffusion in human cervical spinal cord. *European Radiology* 2004; Supplement 2 (14):497.
48. Jasiński A, Banasik T, Konopka M, Pieniążek P, Hartel M, Skórka T. MR diffusion tensor imaging of human cervical spinal cord at high-b values. *RSNA* 2003; Streszczenia: 374.
49. Jasiński A, Sułek Z, Banasik T, Adamek D, Brzegowy P, Majcher K, Pilc A, Skórka T, Węglarz W.P. MR diffusion anisotropy imaging investigation of neuroprotecting drugs on a rat spinal cord traumatic injury model. *Magma* 2003; 16(1): 54-55
50. Katzberg RW, Benedetti PF, Drake CM, Ivanovic M, Levine RA, Beatty CS, Nemzek WR, McFall RA, Ontell FK, Bishop DM, Poirier VC, Chong BW. Acute cervical spine injuries: prospective MR imaging assessment at a level 1 trauma center. *Radiology* 1999; 213:203-212.
51. el-Khoury GY, Kathol MH, Daniel WW. Imaging of acute injuries of the cervical spine: value of plain radiography, CT and MR imaging. *American Journal of Neuroradiology* 1995; 164(1):43-50.
52. Khan M, Griebel R, Rozdilsky B, Politis M. Hemorrhagic changes in experimental spinal cord injury models. *Can J Neurol Sci* 1985; 12:259-262.
53. Kulkarni MV, Bondurant FJ, Rose SL, Narayana PA. 1.5 tesla magnetic resonance imaging of acute spinal trauma. *Radiographics* 1988; 8(6):1059-821.

54. Kulkarni MV, McArdle CB, Kopanicky D, Miner M, Cotler HB, Lee KF, Harris JH. Acute spinal cord injury: MR imaging at 1.5T. *Radiology* 1987; 164:837-843.
55. Le Bihan D. Diffusion, perfusion and functional MRI. R Press, New York 1995.
56. Li F, Han S, Tatlisumak T, Carano RA, Irie K, Sotak CH, Fisher M. A new method to improve in-bore middle cerebral artery occlusion in rats: demonstration with diffusion- and perfusion- weighted imaging. *Stroke* 1998; 29:1715-1719.
57. Li S, Stys PK. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *Journal of Neuroscience* 2000; 20(3):1190-1198.
58. Liu AY, M JA, Bagley LJ, Sinson GP, Grossman RI. Traumatic brain injury: Diffusion - weighted MR imaging Findings. *American Journal of Neuroradiology* 1999; 20:1636-1641.
59. Liu S, Ruenes GL, Yeziarski RP. NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain Research* 1997; 756:160-167.
60. Loher TJ, Bassetti CL, Lovblad KO, Stepper FP, Sturzenegger M, Kiefer C, Nedelchev K, Arnold M, Remonda L, Schroth G. Diffusion-weighted MR in acute spinal cord ischaemia. *Neuroradiology* 2003; 45:557-561.
61. Lorrain DS, Correa L, Anderson J, Varney M. Activation of spinal group I metabotropic glutamate receptors in rats evokes local glutamate release and spontaneous nociceptive behaviors: effects of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine pretreatment. *Neuroscience Letters* 2002; 327:198-202.
62. Martin LJ, Sieber FE, Traystman RJ. Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptor signaling pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(1): 153-67.
63. Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms. Abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *NeuroMolecular Medicine* 2003; 3:65-94.
64. Melhem ER, Mori S, Mukundan G, Kraut MA, Pomper MG, van Zijl PC. Diffusion tensor MR imaging of the brain and white matter tractography. *Am J Roentgenol* 2002; 178:3-16.
65. Metz GA, Curt A, van-de Meet H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 2000; 17:1-17.
66. Mills CD, Fullwood SD, Hulsebosch CE. Changes in metabotropic glutamate receptors expression following spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2001; 170:244-257.

67. Mills CD, Xu GY, McAdoo DJ, Hulsebosch CE. Involvement of metabotropic glutamate receptors in excitatory amino acid and GABA release following spinal cord injury in rat. *Journal of Neurochemistry* 2001; 79:835-848.
68. Mills CD, Johnson KM, Hulsebosch CE. Role of group II and group III metabotropic glutamate receptors in spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2002; 173:153-167.
69. Mills CD, Johnson KM, Hulsebosch CE. Group I metabotropic glutamate receptors in spinal cord injury: roles in neuroprotection and the development of chronic central pain. *Journal of Neurotrauma* 2002; 19(1):23-42.
70. Movsesyan V, O'Leary DM, Fan L, Bao W, Mullins PG, Knoblach S, Faden AI. mGluR5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine and (E)-2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine reduce traumatic neuronal injury in vitro and in vivo by antagonizing N-Methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 296:41-47.
71. Mukherjee P, Bahn MM, McKinstry RC, Shimony JS, Cull TS, Akbudak E, Snyder AZ, Conturo TE. Differences between gray matter and white matter water diffusion in stroke: diffusion-tensor MR imaging in 12 patients. *Radiology* 2000; 215:211-220.
72. Mulkern RV, Gudbjartsson H, Westin CF, Zengingonul HP, Gartner W, Guttman CR, Robertson RL, Kyriakos W, Schwartz R, Holtzman D, Jolesz FA, Maier SE. Multi-component apparent diffusion coefficients in human brain. *NMR Biomed* 1999; 12:51-62.
73. Murphy BP, Zientara GP, Huppi PS, Maier SE, Barnes PD, Jolesz FA, Volpe JJ. Line scan diffusion tensor MRI of the cervical spinal cord in preterm infants. *Magn Reson Imaging* 2001; 13: 949-953. (51)
74. Nevo U, Hauben E, Yoles E, Agranov E, Akselrod, Schwartz M, Neeman M. Diffusion anisotropy MRI for quantitative assessment of recovery in injured rat spinal cord. *Magnetic Resonance in Medicine* 2001; 45:1-9.
75. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of Neurotrauma* 2004; 4:429-440.
76. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration. *Eur J Neurosci* 2000; 12(2):776-780.
77. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of Neurotrauma* 2004; 6:754-774.
78. Pattany PM, Puckett WR, Klose KJ, Quencer RM, Bunge RP, Kasuboski L, Weaver RG. High-resolution diffusion-weighted MR of fresh and fixed cat spinal cords: evaluation of diffusion coefficients and anisotropy. *American Journal of Neuroradiology* 1997; 18:1049-1056.
79. Potter K, Saifuddin A. MRI of chronic spinal cord injury. *The British Journal of Radiology* 2003; 76:347-352.

80. Quence RM, Sheldon JJ, Post MJ, Diaz RD, Montavalo BM, Eismont FJ. MRI of the chronically injured cervical spinal cord. *Am J Roentgenol* 1986; 147(1):125-32.
81. Ries M, Jones RA, Dousset V, Moonen CT. Diffusion tensor MRI of the spinal cord. *Magnetic Resonance in Medicine* 2000;44:884-892. (50)
82. Sagnowski P, Urbanik A. Obrazowanie MR dyfuzji wody (D-MRI) - podstawy teoretyczne. *Polski Przegląd Radiologiczny* 1999; 64(2):135-137.
83. Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG. Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 2000; 217:331-345.
84. Sehy JV, Banks AA, Ackerman JJH, Neil JJ. Importance of intracellular water apparent diffusion to the measurement of membrane permeability. *Biophysical Journal* 2002; 83: 2856-2863.
85. Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, dermatographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 2001; 26:2-12.
86. Silva MD, Omae T, Helmer KG, Li F, Fisher M, Sotak CH. Separating changes in the intra- and extracellular water apparent diffusion coefficient following focal cerebral ischemia in the rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine* 2002; 48:826-837.
87. Shepard MJ, Bracken MB. Magnetic resonance imaging and neurological recovery in acute spinal cord injury: observations from the National Acute Spinal Cord Injury Study 3. *Spinal Cord* 1999; 37(12):833-837.
88. Shwartz ED, Cooper ET, Chin CL, Wehrli S, Tessler A, Hackney DB. Ex vivo evaluation of ADC values within spinal cord white matter tracts. *American Journal of Neuroradiology* 2005; 26(2):390-397.
89. Shwartz ED, Hackney DB. Diffusion-weighted MRI and the evaluation of spinal cord axonal integrity following injury and treatment. *Experimental Neurology* 2003; 184:570-589.
90. Shwartz ED, Yeziarski RP, Pattany PM, Quencer RM, Weaver RG. Diffusion-weighted MR imaging in a rat model of syringomyelia after excitotoxic spinal cord injury. *American Journal of Neuroradiology* 1999; 20:1422-1428.
91. Shwartz ED, Chin CL, Schumsky JS, Jawad AF, Brown BK, Wehrli S, Tessler A, Murray M, Hackney DB. Apparent diffusion coefficients in spinal cord transplants and surrounding white matter correlate with degree of axonal dieback after injury in rats. *American Journal of Neuroradiology* 2005; 26:7-18.
92. Shwartz ED, Chin CL, Takahashi M, Hwang SN, Hackney DB. Diffusion-weighted imaging of the spinal cord. *Neuroimaging Clinics of North America* 2002; 12:125-146.
93. Shwartz ED, Shumsky JS, Wehrli S, Tessler A, Murray M, Hackney DB. Ex vivo MR determined apparent diffusion coefficients correlate with motor recovery mediated by intraspinal transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF. *Experimental Neurology* 2003; 182:49-63.

94. Sklar EM, Post JM, Falcone S. MRI of acute spinal epidural haematomas. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23(2): 238-243.
95. Stanisz GJ, Diffusion MR in biological systems: tissue compartments and exchange. *Israel Journal of Chemistry* 2003; 43:33-44.
96. Stejskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* 1965; 42:288-292.
97. Takahashi M, Harada Y, Inoue H. Traumatic cervical cord injury at C3-4 without radiographic abnormalities: correlation of magnetic resonance findings with clinical features and outcome. *Journal Orthopaedic Surgery* 2002; 10(2):129-135.
98. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991; 75:15-26.
99. Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg* 1997; 86:483-492.
100. Tsuchiya K, Katase S, Fujikawa A, Hachiya J, Kanazawa H, Yodo K. Diffusion-weighted MRI of the cervical spinal cord using a single-shot Fast spin-echo technique: findings in normal subjects and in myelomalacia. *Neuroradiology* 2003; 45:90-94.
101. Ugolini A, Corsi M, Bordi F. Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology* 1997; 36(8):1047-1055.
102. Urbanik A, Sagnowski P. Obrazowanie MR dyfuzji wody (D-MRI)- możliwości zastosowań w diagnostyce obrazowej. *Polski Przegląd Radiologiczny* 1999; 64(2):138-140.
103. Węglarz WP, Adamek D, Markiewicz J, Skórka T, Kulinowski P, Jasiński A. Analysis of the diffusion weighted MR microscopy data of excised spinal cord of a rat on the basis of the model of restricted diffusion. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 2004; 25:88-93.
104. Walker K, Bowels M, Panesar W, Davis A, Gentry C i inni. Metabotropic glutamate receptors subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute persistent and chronic pain. *Neuropharmacology* 2001; 40:1-9.
105. Xu GY, Hughes MG, Ye Z, Hulsebosch CE, McAdoo DJ. Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Experimental Neurology* 2004; 187:329-336.
106. Yamashita Y, Takahashi M, Matsuno Y, Sakamoto Y, Oguni T, Sakae T, Yoshizumi K, Kim E.E. Chronic injuries of the spinal cord: assessment with MR imaging. *Radiology* 1990; 175:849-854.
107. Yamashita Y, Takahashi M, Matsuno Y, Kojima R, Sakamoto Y, Oguni T, Sakae T, Kim E.E. Acute spinal cord injury: magnetic resonance imaging correlated with myelopathy. *The British Journal of Radiology* 1991; 64:201-209.

## 8. STRESZCZENIE

Rezonans magnetyczny jest obecnie jedyną metodą diagnostyki obrazowej pozwalającą na dokładną ocenę rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym. Wprowadzenie metody badania dyfuzji wody przy pomocy rezonansu magnetycznego (DWI) stworzyło możliwości uzyskania informacji o zmianach zachodzących w strukturze tkanek niedostępnych do tej pory dla innych technik obrazowych. Daje to możliwości nie tylko dokładnej oceny urazu rdzenia, ale również prognozowania jego następstw klinicznych i oceny skuteczności leczenia. Praca ta jak i podobne eksperymenty na zwierzętach prowadzone na świecie, są przygotowaniem do zastosowania tej techniki w standardowych badaniach rdzenia kręgowego u ludzi. Po raz pierwszy w badaniach in-vivo wykorzystano technikę DWI do kilkakrotnie powtarzanych pomiarów, uzyskując dynamiczny obraz zmian dyfuzji w pierwszych dobach po urazie rdzenia. Pierwszy raz użyto również tę metodę do oceny farmakologicznej neuroprotekcji rdzenia w badaniach na żywych zwierzętach.

Celem pracy było zastosowanie obrazowania dyfuzji wody przy pomocy metody rezonansu magnetycznego do oceny następstw urazu rdzenia kręgowego u szczura, na podstawie analizy współczynników dyfuzji, w zależności od odległości od środka urazu i czasu od momentu urazu oraz próba zastosowania tej techniki do oceny wpływu substancji neuroprotektynowej (MPEP) na zmiany pourazowe w rdzeniu.

Materiał badawczy stanowiło 30 szczurów rasy Wistar, podzielonych na cztery grupy: 5 osobników zdrowych, 5 osobników z samą laminektomią, 10 osobników z laminektomią i urazem rdzenia oraz 10 osobników z laminektomią, urazem rdzenia i podaną dootrzewnowo substancją o potwierdzonym działaniu neuroprotektynowym – MPEP. Badania eksperymentalne przeprowadzono w Zakładzie Rezonansu Magnetycznego Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. Uraz rdzenia przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowany model typu weight-drop, który wykonywano na poziomie Th12.

Eksperymenty pomiarowe dyfuzji wody prowadzono z użyciem znieczulenia ogólnego halotanem, przy pomocy tomografu MR z magnesem nadprzewodzącym o polu 4.7 T firmy Bruker. Pomiary wykonano stosując standardową sekwencję echa spinowego, sprzężoną z zapisem EKG i rytmem oddechowym. Badania wykonano w trzech warstwach osiowych, z których pierwsza przechodziła przez środek miejsca

zabiegu (laminektomii lub laminektomii i urazu), a dwie kolejne były przesunięte w kierunku dogłowym co 2.8 mm oraz jednej warstwie strzałkowej przechodzącej przez środek rdzenia. Dla każdej warstwy wykonano 4 obrazy: jeden bez gradientów dyfuzyjnych  $T_2$ -zależny oraz trzy z gradientami przyłożonymi w kierunku równoległym (z) i prostopadłym (x,y) do osi długiej rdzenia. Grupa szczurów zdrowych była poddana eksperymentom pomiarowym jednokrotnie. Pozostałe trzy grupy zwierząt badano cztery razy w takich samych odstępach czasowych od wykonania urazu: po 1, 24, 48 i 186 godzinach.

Uzyskane obrazy DWI posłużyły do obliczenia map współczynnika dyfuzji (ADC) i następnie współczynników: dyfuzji podłużnej lADC, poprzecznej tADC, izotropii ID i anizotropii AI dla wybranych obszarów istoty białej i szarej rdzenia. Współczynniki te poddano następnie analizie statystycznej porównując je osobno w obrębie każdej z grup: pomiędzy trzema warstwami osiowymi oraz pomiędzy kolejnymi pomiarami, jak również pomiędzy poszczególnymi grupami w każdej z warstw i w każdym z pomiarów.

Szczury bez laminektomii stanowiły grupę kontrolną dla zwierząt z samą laminektomią. Porównanie tych grup służyło ocenie wpływu tego zabiegu na dyfuzję wody w rdzeniu kręgowym. W grupie bez laminektomii, istota biała rdzenia wykazywała wysoki stopień anizotropii dyfuzji wody, wynikający z prawie dziesięciokrotnie większego lADC od tADC, natomiast w istocie szarej dyfuzja była prawie izotropowa.

Efektom zabiegu laminektomii było powstanie krwiaka nadtwórkowego, który powodował ucisk grzbietowej powierzchni rdzenia, z następowym spadkiem tADC (znamiennym statystycznie) i lADC w istocie szarej oraz spadkiem tADC w istocie białej. Zaobserwowany spadek dyfuzji mógł być wynikiem zarówno bezpośredniego działania siły mechanicznej, jak również być może efektem rozwijającego się miejscowego niedokrwienia rdzenia, które w efekcie prowadziły do nasilenia restrykcji dyfuzji w tkankach rdzenia. Zwierzęta z samą laminektomią stanowiły zarazem grupę kontrolną dla dwóch pozostałych grup z laminektomią i urazem rdzenia.

W wyniku wykonanego urazu, w jego centrum, w tkance rdzenia kręgowego zaobserwowano znamienne statystycznie zmiany dyfuzji wody będące wykładnikami uszkodzenia zarówno istoty białej, jak i szarej. W istocie białej wyrażało się to spadkiem wartości lADC, jako efekt obrzęku aksonalnego i uszkodzenia wewnątrzaksonalnego układu mikrofilamentów oraz wzrostem tADC wynikającym z



uszkodzenia osłonek mielinowych i wzrostu przepuszczalności błon komórkowych. W istocie szarej natomiast postępująca destrukcja struktur komórkowych i formowanie się przestrzeni jamistych, spowodowało stopniowy wzrost zarówno lADC jak i tADC.

Zarówno w grupie z samą laminektomią, jak również w grupie z laminektomią i urazem rdzenia, zaobserwowano stopniowe narastanie zmian dyfuzji wody głównie w centrum zabiegu w pierwszych trzech pomiarach świadczące o postępującym uszkodzeniu rdzenia.

Analiza współczynników dyfuzji pozwoliła wykazać neuroprotektoryjne działanie antagonisty receptorów metabotropowych mGluR5 (MPEP), które wyrażało się mniejszym wzrostem tADC (znamiennym statystycznie) i lADC w istocie szarej oraz mniejszym wzrostem tADC w istocie białej w centrum urazu, w porównaniu do grupy z urazem bez neuroprotekcji, co świadczyło o ograniczeniu wtórnych procesów ekscytotoksycznych i zmniejszeniu stopnia uszkodzenia rdzenia.

W pracy tej wykazano przydatność techniki DWI w ocenie urazu rdzenia kręgowego u szczura w badaniach in vivo. Analiza współczynników dyfuzji pozwala wnioskować o charakterze zmian struktury istoty białej i szarej rdzenia pod wpływem urazu i jednocześnie pozwala wykazać różnice w zależności od odległości od miejsca urazu i czasu od momentu urazu. Po raz pierwszy stwierdzono przydatność tej techniki do oceny neuroprotekcji rdzenia kręgowego po urazie mechanicznym w badaniach na żywych zwierzętach, potwierdzając neuroprotektoryjne działanie MPEP.

## SUMMARY

At present magnetic resonance (MRI) is the only method of diagnostic imaging for precise evaluation of spinal cord traumatic injury. Diffusion - weighted magnetic resonance imaging (DWI) can provide information about changes of tissue structure which are not visible using other imaging techniques. It is possible not only to assess precisely spinal injury but it also gives rise prognostic implications of clinical deficit and assessment of efficiency of treatment. This study like other experiments carried out in the world on animals, is an introduction for application this method as a standard examination of human spinal cord in future. For the first time technique of DWI was used in in-vivo experiments and dynamic changes of water diffusion during first days after spinal contusion were obtained. This method was applied also for the first time to assess in - vivo pharmacological neuroprotection of the spinal cord.

The aim of this study was application of magnetic resonance diffusion imaging for assessment of spinal cord injury in rats, based on analysis of diffusion parameters depending on the distance from injury center and course of the time from the moment of injury. It was also an attempt for application of this method for the assessment of neuroprotection effect of MPEP on the posttraumatic changes in the spinal cord.

The material consisted of thirty male Wistar rats, divided into four following groups: 5 healthy animals with no surgical operation, 5 animals with laminectomy only, 10 animals with laminectomy and spinal cord injury and 10 animals with laminectomy, spinal cord injury and with intraperitoneal administration of neuroprotective drug – MPEP. Experimental investigation was performed in Magnetic Resonance Department of Institute of Nuclear Physics, Polish Academy of Sciences. Spinal cord injury was produced using a dynamic weight – drop model, on the T 12 level.

Magnetic resonance diffusion weighted imaging was carried out using general halotan anesthesia, on 4,7 T supraconducting magnet (Bruker). Standard Spin Echo sequence was used, gated by ECG and breath signals. Three axial slices were made, the first one was positioned in the central point of operation (laminectomy or laminectomy and injury) and next two displaced rostrally each 2.8 mm, and one sagittal slice positioned at the center of the spine. A set of four images were acquired for each slice: one T<sub>2</sub>-weighted with no diffusion gradients and three with diffusion

gradients applied parallel (z) and perpendicular (x,y) to long axis of the spine. The first group with no surgical procedures was measured only once. The remaining three groups were examined four times, in the same time following the surgery: 1, 24, 48 and 186 hours.

Diffusion weighted images obtained, were used to count ADC (apparent diffusion coefficient) maps and next diffusion parameters for defined regions of white and gray matter were calculated: longitudinal diffusion – lADC, transverse diffusion – tADC, isotropy index – ID and anisotropy index – AI. Statistic analysis of these parameters was performed. Diffusion parameters were compared in each group individually between slices and examinations and next between different groups in every slice end examination.

Rats without laminectomy stated group of reference for group with laminectomy only. The aim of the comparison between these two groups was to assess changes of water diffusion in spine following this surgical procedure. In group without laminectomy water diffusion in the white matter was highly anisotropic comparing to lADC what resulted in about ten times greater than tADC; while diffusion in the gray matter was almost isotropic.

The result of laminectomy was epidural haematoma that compressed the dorsal surface of the spinal cord with decrease of tADC (statistically significant) and lADC in the gray matter and decreasing lADC in the white matter. Low ADC values were result of direct mechanical compression and developed ischemia that lead to increased restriction of water diffusion in spine tissues. Group with laminectomy was a reference group for animals with laminectomy and spinal cord contusion.

Injury of the spinal cord produced statistically significant changes of water diffusion in spinal tissues that were results of both white and gray matter damage. In the white matter lADC value decreased as an effect of axonal swelling and interaxonal cytoskeletal breakdown, and tADC increased as a result of increased permeability of damaged myelin sheaths end cellular membranes. In the gray matter progression of cells damage and cavity formation produced increase of values, both lADC and tADC.

In both groups with laminectomy alone and with laminectomy and spinal cord injury progressive changes in water diffusion were observed in the center of surgery during first three examinations. These information suggested progressive spinal cord tissue damage.

Analysis of diffusion parameters allowed to confirm neuroprotective effect of MPEP - antagonist of mGluR5 metabotropic glutamate receptors. In the center of injury value of tADC in the gray matter was significantly lesser and values of lADC in the gray matter and tADC in white matter were statistically insignificant lesser then in control group with spinal cord injury but without neuroprotection. The results indicated restriction of secondary excitotoxic mechanisms and lesser degree of spinal cord tissue disruption.

In this study application of DWI in assesment of the rat spinal cord injury in - vivo was confirmed. Analysis of diffusion parameters allow to draw a conclusion about changes in the white and gray matter structure after traumatic injury and also allow to see differences that depend on the distance from injury center and time which passed from the moment of injury. For the first time the application of this method was confirmed to assess pharmacological neuroprotection of the mechanical spinal cord injury in-vivo, and neuroprotective effect of MPEP was established.

## 9. SPIS TABEL I RYCIN

### TABELE

- Tab.1. Wartości IADC i tADC w istocie białej (WM) i szarej (GM), prawidłowych rdzeni kręgowych szczurów, w badaniach in - vivo.
- Tab.2. Pierwotne i wtórne mechanizmy urazu rdzenia kręgowego.
- Tab.3. Rodzaje receptorów glutaminergicznych (typy i podtypy).
- Tab.4. Wartości współczynników dyfuzji ADC (średnia  $\pm$  SD  $\cdot 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s), w różnych kierunkach uzyskane ze strzałkowych przekrojów szyjnego odcinka rdzenia kręgowego człowieka.
- Tab.5. Wartości IADC, tADC, ID i AI dla istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy bez laminektomii.
- Tab.6. Wartości średnie IADC, tADC, ID i AI dla całej istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy z laminektomią, w trzech warstwach osiowych, w kolejnych pomiarach.
- Tab.7. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynnika tADC w istocie szarej; grupa z laminektomią w porównaniu z grupą bez laminektomii, test U Mana-Whitney'a.
- Tab.8. Wartości średnie IADC, tADC, ID i AI dla całej istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy z urazem rdzenia, w trzech warstwach osiowych, w kolejnych pomiarach.
- Tab.9. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynnika IADC w istocie białej, w grupie z urazem; porównanie pomiędzy warstwami; test ANOVA.
- Tab.10. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynnika IADC w istocie białej, w centrum urazu; grupa z urazem w porównaniu z grupą laminektomią; test U Mana-Whitney'a.
- Tab.11. Poziom istotności statystycznej dla różnic współczynników AI i ID w istocie białej, w centrum urazu; grupa z urazem w porównaniu z grupą z laminektomią; test U Mana-Whitney'a.
- Tab.12. Wartości średnie IADC, tADC, ID i AI dla całej istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy z urazem rdzenia i MPEP, w trzech warstwach osiowych, w kolejnych pomiarach.

## RYCINY

- Ryc.1. Sekwencja echa spinowego z dodanymi gradientami dyfuzyjnymi
- Ryc.2. Szczur umieszczony w głowicy pomiarowej.
- Ryc.3. Obraz z monitora oscyloskopu: 1-krzywa EKG, 2-fala oddechowa, 3-punkt wyzwania sekwencji pomiarowej.
- Ryc.4. Obraz sagitalny MR ( $T_2$ -zależny) rdzenia kręgowego szczura z zaplanowanymi przekrojami osiowymi.
- Ryc.5. Obraz przekroju osiowego rdzenia kręgowego z zaznaczonymi obszarami zainteresowań (ROI) w istocie białej i szarej.
- Ryc.6.a-c. Obrazy prawidłowego rdzenia kręgowego szczura: bez gradientów dyfuzyjnych (a) oraz z gradientami dyfuzyjnymi (DWI) i odpowiadającymi im mapami współczynnika dyfuzji (ADC) w przekroju osiowym (b) i strzałkowym (c).
- Ryc.7.a-d. Obrazy  $T_2$ -zależne rdzenia kręgowego szczura z laminektomią, w przekroju strzałkowym oraz osiowym przechodzącym przez centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach.
- Ryc.8.a-d. Obrazy DWI z gradientem dyfuzyjnym w kierunku x rdzenia kręgowego szczura z laminektomią, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).
- Ryc.9.a-d. Obrazy DWI z gradientem dyfuzyjnym w kierunku y rdzenia kręgowego szczura z laminektomią, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).
- Ryc.10.a-d. Obrazy DWI z gradientem dyfuzyjnym w kierunku z rdzenia kręgowego szczura z laminektomią w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).
- Ryc.11.a-d. Obrazy  $T_2$ -zależne rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem w przekroju strzałkowym oraz osiowym przechodzącym przez centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach.
- Ryc. 12.a-d. Obrazy DWI z gradientem dyfuzyjnym w kierunku x rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).
- Ryc.13.a-d. Obrazy DWI z gradientem dyfuzyjnym w kierunku y rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).
- Ryc.14.a-d. Obrazy DWI z gradientem dyfuzyjnym w kierunku z rdzenia kręgowego szczura z laminektomią i urazem, w przekroju strzałkowym, w kolejnych pomiarach oraz odpowiadające im mapy współczynnika dyfuzji (ADC).
- Ryc.15.a-d. Wartości  $ADC_x$ ,  $ADC_y$ ,  $ADC_z$  oraz  $lADC$ ,  $tADC$ , ID i AI dla istoty białej (WM) i szarej (GM) dla grupy bez laminektomii.
- Ryc.16.a,b. Zmiany wartości  $tADC$  i AI w centrum laminektomii, w kolejnych pomiarach, dla wybranych części istoty szarej (GM): RG - rogi grzbietowe, RB - rogi brzuszne, ISZP - istota szara pośrednia; kolorem szarym zaznaczono wartości średnie dla całej istoty szarej.
- Ryc.17.a-h. Średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, w centrum zabiegu (warstwa 1), w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy) oraz grupy z urazem (kolor żółty). Kolorem szarym zaznaczono poziomo prawidłowych wartości dla grupy szczurów zdrowych bez laminektomii.
- Ryc.18.a-h. Średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, 2,8 mm od centrum zabiegu (warstwa 2), w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy) oraz grupy z urazem (kolor

- żółty). Kolorem szarym zaznaczono poziomo prawidłowych wartości dla grupy szczurów zdrowych bez laminektomii.
- Ryc.19.a-h. Średnie wartości współczynników dyfuzji dla całej istoty białej i szarej, 5,6 mm od centrum zabiegu (warstwa 3), w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy) oraz grupy z urazem (kolor żółty). Kolorem szarym zaznaczono poziomo prawidłowych wartości dla grupy szczurów zdrowych bez laminektomii.
- Ryc.20.a-d. Zmiany wartości IADC, tADC i AI w centrum urazu, w kolejnych pomiarach, dla wybranych części istoty szarej (GM): RG - rogi grzbietowe, RB - rogi brzuszne, ISZP - istota szara pośrednia i białej: (WM): SZG - sznury grzbietowe, SZBG - części grzbietowe sznurów bocznych, SZBB - części brzuszne sznurów bocznych; kolorem szarym zaznaczono wartości średnie dla całej WM i GM.
- Ryc.21.a-c. Średnie wartości współczynnika dyfuzji podłużnej (IADC) dla całej istoty szarej (GM), w trzech kolejnych warstwach, w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy), grupy z urazem (kolor żółty) i grupy z urazem i MPEP (kolor czerwony).
- Ryc.22. Średnie wartości współczynnika dyfuzji poprzecznej (tADC) dla całej istoty białej (WM), w centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach, dla grupy z laminektomią (kolor granatowy), grupy z urazem (kolor żółty) i grupy z urazem i MPEP (kolor czerwony).
- Ryc.23.a-d. Zmiany wartości tADC w brzusznych (SZBP) i grzbietowych (SZBT) częściach sznurów bocznych oraz zmiany IADC w rogach brzusznych (RB) i grzbietowych (RG), w centrum zabiegu, w kolejnych pomiarach.
- Ryc.24. Zmiany wartości w skali BBB dla szczurów z urazem i urazem oraz podanym lekiem.