

DOLIŃSKA, Anna, GÓRKA, Dariusz, TRZĘSICKI, Michał, BIAŁOŃ, Natalia & GÓRKA, Mikołaj. The role of training and hyperbaria in the rehabilitation process after crushing injury of the sciatic nerve in mice - assessment of functional parameters using the CATWALK XT platform. *Journal of Education, Health and Sport*. 2023;13(4):150-159. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2023.13.04.016> <https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/42152> <https://zenodo.org/record/7658942>

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences). Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przynależność dyscypliny naukowej: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu). © The Authors 2023; This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited. The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper. Received: 23.01.2023. Revised: 29.01.2023. Accepted: 20.02.2023.

## Rola treningu i hiperbarii w procesie rehabilitacji po urazie zmiżdzeniowym nerwu kulszowego u myszy- ocena parametrów czynnościowych z pomocą platformy CATWALK XT

### The role of training and hyperbaria in the rehabilitation process after crushing injury of the sciatic nerve in mice - assessment of functional parameters using the CATWALK XT platform

Anna Dolińska<sup>1</sup>, Dariusz Górka<sup>1</sup>, Michał Trzęsicki<sup>1</sup>, Natalia Białoń<sup>1</sup>, Mikołaj Górka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>2</sup>Centrum Medycyny Doświadczalnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

#### ABSTRAKT

##### Wprowadzenie

Uszkodzenia nerwów obwodowych stanowią jeden z powszechniej występujących urazów w populacji i dotyczą 3 % pacjentów urazowych. Niestety pełna regeneracja funkcjonalna jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim. Próby leczenia i regeneracji uszkodzonych nerwów są częstym przedmiotem badań, szczególnie jeśli bierze się pod uwagę modele zwierzęce, a wyniki nie zawsze są zadowalające

##### Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena regeneracji funkcjonalnej po uszkodzeniu nerwu kulszowego u myszy poddanej leczeniu tlenoterapią hiperbaryczną i treningowi lokomotorycznemu oraz sprawdzenia skuteczności tych metod.

##### Materiały i Metodyka

Materiał badawczy stanowiło 75 myszy z uszkodzonym nerwem kulszowym. Myszy podzielono na trzy grupy: H- poddane terapii hiperbarycznej, T- poddane treningowi i K-nie poddane żadnej terapii(grupa kontrolna). Dokonano analizy funkcjonalnej chodu przy użyciu platformy chodu CATWALK XT na podstawie wybranych parametrów chodu.

##### Wyniki

W grupach poddanych terapii zarówno hiperbarycznej jak i treningowi wyniki analizy wykazały szybszy powrót funkcjonalny. Zauważono istotne statystycznie różnice w parametrach print area, print length , swing oraz SFI w grupach leczonych w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, natomiast w grupie myszy poddanych hiperbarii powrót funkcjonalny okazał się najskuteczniejszy i najszybszy.

##### Podsumowanie

Myszy obu grup (H, T) wykazywały szybszy powrót funkcji czuciowych i motorycznych w przeciwieństwie do grupy kontrolnej nie poddanej żadnej terapii

**Słowa kluczowe:** hiperbaria, trening lokomotoryczny, regeneracja nerwów, nerw kulszowy, rehabilitacja

## **Abstract**

### **Introduction**

Peripheral nerve injuries are one of the most common injuries in the population and affect 3% of trauma patients. Unfortunately, full functional regeneration is a relatively rare phenomenon. Attempts to heal and regenerate damaged nerves are a frequent subject of research, especially when animal models are considered, and the results are not always satisfactory

### **Aim of the study**

The aim of this study was to evaluate functional regeneration after sciatic nerve damage in mice treated with hyperbaric oxygen therapy and locomotor training, and to check the effectiveness of these methods.

### **Materials and Methods**

The research material consisted of 75 mice with a damaged sciatic nerve. The mice were divided into three groups: H- subjected to hyperbaric therapy, T- subjected to training and K- not subjected to any therapy (control group). A functional gait analysis was performed using the CATWALK XT gait platform based on selected gait parameters.

### **Results**

In the groups subjected to both hyperbaric therapy and training, the results of the analysis showed faster functional recovery. Statistically significant differences in the print area, print length, swing and SFI parameters were noted in the treated groups as opposed to the control group, while in the hyperbaric group of mice functional recovery turned out to be the most effective and fastest.

### **Conclusion**

Mice of both groups (H, T) showed a faster recovery of sensory and motor functions in contrast to the control group not subjected to any treatment

**Keywords:** hyperbaria, locomotor training, nerve regeneration, sciatic nerve, rehabilitation

## **WPROWADZENIE**

Urazy nerwów obwodowych to niewątpliwie powszechny problem. Skala problemu jest niezwykle poważna ponieważ wynosi aż 3 % wszystkich pacjentów po urazach. Przypadłość ta dotyczy osób młodych i najczęściej jest konsekwencją wypadków drogowych, w rolnictwie czy w sporcie [1].

Najczęściej stosowanymi modelami zwierzęcymi do badań nad regeneracją nerwów obwodowych są szczury i myszy. Wiąże się to z ich powszechną dostępnością oraz podobieństwem anatomicznym do ludzi w rozmieszczeniu pni nerwowych [2]. Dodatkowo gryzonie cechują się łatwością w prowadzeniu hodowli i łagodnym usposobieniem. Zastosowanie w badaniach modeli zwierzęcych pozwala imitować różne modele uszkodzeń nerwu kulszowego i wiarygodnie odzwierciedlić uzyskane wyniki w odniesieniu do człowieka.

Uszkodzenie nerwu bardzo często jest spowodowane urazem mechanicznym lub wynikiem choroby przewlekłej. Uszkodzenia mechaniczne najczęściej dotyczą nerwów powierzchownych, najmniej chronionych z anatomicznego punktu widzenia i najczęściej wiążą się z urazami kończyn. Nie bez znaczenia jest tutaj wymiar urazu oraz poziom uszkodzenia nerwu [3].

W zależności od skali urazu nerwów obwodowych, mamy do czynienia z niosącym ze sobą szeregiem następstw prowadzących do pojawienia się bólu neuropatycznego, który znacząco obniża jakość życia pacjenta, mogąc nawet doprowadzić do jego niepełnosprawności [4]. Urazy te często prowadzą do utraty różnych funkcji w zależności od wielkości i miejsca urazu.

Próby regeneracji nerwów obwodowych są przedmiotem wielu badań eksperymentalnych a niestety pełny odzysk funkcjonalny jest rzadko osiągalny. Najczęściej opisywane modele eksperymentalne dotyczą badań mechanizmów związanych z regeneracją aksonów i reinerwacją tkanek oraz oceny metod terapeutycznych w celu poprawy funkcji. Aby móc ocenić regenerację czynnościową po urazie nerwów, należy stosować obiektywne i wiarygodne metody oceny [5].

### **Znaczenie treningu lokomotorycznego i terapii hiperbarycznej**

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu treningu lokomotorycznego i terapii hiperbarycznej na ocenę funkcjonalną po uszkodzeniu nerwu kulszowego u myszy. O korzystnym wpływie treningu lokomotorycznego naukowcy rozważają już od wielu lat[6]. W przeciwieństwie do farmakoterapii i terapii fizykalnych wysiłek fizyczny posiada niewiele efektów ubocznych, dlatego jest z jednym z najczęściej wybieranych sposobów terapii po urazach i wypadkach i może być stosowany niemal u każdego u kogo występuje choć niewielka siła mięśniowa. Coraz częściej opisuje się wpływ wysiłku fizycznego na poprawę i prawidłowe funkcjonowanie mózgu. W badaniach osób starszych bez zaburzeń OUN wykazano zmiany związane z neuroplastycznością, neurogenezą i synaptogenezą indukowane regularnym wysiłkiem aerobowym.

Dodatkowo wykazano iż wysiłek fizyczny znacząco poprawia pracę mózgu poprzez redukcję stresu oksydacyjnego i zachowanie homeostazy organizmu [7,8].

Kluczową rolę w procesach regeneracyjnych komórek nerwowych pełni neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *brain-derived neurotrophic factor*). Na podstawie licznych badań naukowych, czynnik ten ma wpływ na procesy regeneracyjne komórek nerwowych w stanach pourazowych, udaru niedokrwienego czy toksycznych zatruc [9,10].

Badania z udziałem młodych mężczyzn, wykazały, że już jednorazowy aerobowy wysiłek fizyczny przyczynia się do wzrostu poziomu BDNF w surowicy i osoczu [11].

Istotnym jest zwrócenie uwagi na uzyskane wyniki badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat, które wykazują istotne i korzystne znaczenie treningu lokomotorycznego. Trening po uszkodzeniu nerwu obwodowego przyczynia się do transportu czynników neurotroficznych oraz innych substancji, mających szczególne znaczenie w procesie odbudowy i regeneracji uszkodzonego neurytu. Czynniki neurotroficzne regulują przeżycie, rozwój a także funkcje tkanki nerwowej. Na poziom BDNF w układzie nerwowym wpływa aktywność neuronów. W wyniku jego związania z receptorem TrkB (ang. *Tropomyosin receptor kinase B*), uruchomione zostają odpowiednie procesy wewnątrzkomórkowe, które w efekcie doprowadzają do zmian neuroplastycznych – zwiększenie skuteczności przekazu sygnałów oraz zwiększenie powierzchni synapsy. Istotnym jest, że zwiększa się także liczba rozgałęzień aksonalnych, co zwiększa powierzchnię neuronu i umożliwia zwiększenie liczby synaps, doprowadzając w ten sposób do wzrostu efektywności sieci neuronowych. Badania naukowe dowodzą, że regularny trening na badanym modelu zwierzęcym doprowadza do nadekspresji neurotrofin i białek adhezyjnych co może doprowadzić do wzmocnienia naturalnych mechanizmów naprawczych [12,9,10].

W przeciwieństwie do treningu lokomotorycznego HBOT [ang. *Hyperbaric oxygen therapy*] jest techniką stosunkowo młodą, prężnie rozwijającą się dopiero od lat 60 XX wieku, a więc jej działanie nie jest aż tak rozpowszechnione i do końca znane. Ta metoda terapeutyczna polega na wykorzystaniu 100% tlenu przy ciśnieniu powyżej 1 ATA. Efekt terapeutyczny wiąże z rozpuszczalnością gazu w osoczu krwi, co wpływa na zwiększenie zasięgu jego dyfuzji z naczyń włosowatych do niedotlenionych komórek.

Aktualnie prowadzone są badania pozwalające ocenić potencjał tej metody w leczeniu chorób neurologicznych.

Na mysim modelu zwierzęcym przeprowadzone zostały badania potwierdzające korzystny wpływ tlenoterapii. Myszy poddane zostały łagodnej hiperbarii, o wartości 1317 hPa z 45 % tlenem o czasie ekspozycji 3 godzin, trzy razy w tygodniu. Po upływie 11 tygodni zaobserwowany został spadek neuronów dopaminergicznych - co redukuje objawy choroby Parkinsona. Wykorzystanie łagodnego tlenu hiperbarycznego (1266-1317 hPa, 35-45 %), przyczynia się do wzrostu poziomu tlenu rozpuszczonego w osoczu krwi, a także reguluje metabolizm oksydacyjny [13,19].

Przedstawiany projekt obejmuje czynnościową ocenę regeneracji w obrębie uszkodzonego nerwu kulszowego. W niniejszej pracy postawiono za cel próbę oceny wpływu hiperbarii i treningu lokomotorycznego na bieżni na ocenę powrotu funkcji po urazie nerwu kulszowego u myszy. Oceny powrotu funkcjonalnego dokonano przy pomocy aparatury Catwalk XT, która pozwalała na ocenę 100 parametrów chodu [5,6]. Wybierając parametry do badań sugerowano się literaturą dotyczącą prac o podobnej tematyce. Postanowiono więc zastosować parametry o najwyższym poziomie trafności i wiarygodności oraz możliwości porównania wyników z badaniami innych naukowców [5].

## METODY

Materiał badawczy stanowiło 75 myszy typu dzikiego WILD TYPE z uszkodzonym nerwem kulszowym. Podzielono je na 3 równoliczne grupy:

	przed uszkodzeniem	7 dni	14 dni	21 dni	28 dni
<b>H</b>	5 myszy	5 myszy	5 myszy	5 myszy	5 myszy
<b>T</b>	5 myszy	5 myszy	5 myszy	5 myszy	5 myszy
<b>K</b>	5 myszy	5 myszy	5 myszy	5 myszy	5 myszy

Grupa H- myszy poddane hiperbarii

Grupa T- myszy poddane treningowi na bieżni

Grupa K- myszy uszkodzone nie poddane żadnej terapii

**Tab. 1. Podział myszy na grupy.**

Następnie dokonano podziału badanych modeli zwierzęcych według czasu po uszkodzeniu na: przed uszkodzeniem, 7, 14, 21 i 28 dni po uszkodzeniu po 5 sztuk dla każdej grupy. Wszystkie zwierzęta przebywać będą w indywidualnych klatkach, w temperaturze 20°C, wilgotności względnej 59-69% oraz cyklu oświetlenia 12/12. Wodę oraz pokarm podawane będą zwierzętom doświadczalnym bez żadnych ograniczeń. Doświadczenia zawsze odbywały się w godzinach 9.00-14.00. Wszystkie myszy zostały poddane terapii z wyjątkiem grupy kontrolnej (K).

#### USZKODZENIE NERWU KULSZOWEGO

W znieczuleniu ogólnym (w warunkach aseptycznych po ogoleniu i odkażeniu skóry płynem odkażającym Skinsept) na zewnętrznej powierzchni uda MYSZY, nacięta zostanie skóra (długość nacięcia – 2 cm). Następnie nerw kulszowy zostanie zmiażdżony przy pomocy klipsa neurologicznego o odpowiedniej sile nacisku. Rana będzie zaopatrzona szwami 4/0.

U wszystkich myszy uszkodzony został nerw kulszowy w prawej łapie. Po zabiegu przez 3 dni we wszystkich grupach zwierzętom podawany w wodzie do picia będzie paracetamol (zawiesina 120mg/5ml), lek o znanym ogólnie działaniu przeciwpalnym (5mg/kg m.c.).

#### TERAPIA HIPERBARYCZNA

Terapia hiperbaryczna (HBOT) prowadzona była w 100 % natężeniu tlenu, przez 7 dni w tygodniu, w ciśnieniu 2 atmosfer [ATM] przez okres 60 minut.

#### TRENING LOKOMOTORYCZNY

W celu oceny regeneracji funkcjonalnej jedną z najbardziej rzetelnych metod oceny jest ocena funkcjonalna z zastosowaniem nowoczesnego analizatora chodu Catwalk XT. Innowacyjne oprogramowanie systemu CatWalk XT pozwala na wykrywanie bardzo subtelnych zmian w chodzie w oparciu o wyższą częstotliwość próbkowania [6]. Analizator chodu CatWalk XT umożliwi dokładniejszą ocenę parametrów chodu, w przeciwieństwie do pierwotnej wersji Catwalk 7 – catwalk XT posiada kamerę o częstotliwości 100 klatek na sekundę, a Catwalk 7 – 50 klatek na sekundę, oraz pierwowzoru, skali BBB która oceniała koordynację pomiędzy przednią a tylną łapą. Jednym z ważniejszych kamieni milowych jest nie tyle odzyskanie sprawności po uszkodzeniu nerwu obwodowego co odzysk skoordynowanej lokomocji. Jednym z kryteriów koordynacji jest symbioza pomiędzy wszystkimi częściami układu ruchu [7]. Jedną z pierwszych skal do oceny koordynacji oraz pierwowzorem CatWalk'a była skala BBB (*Basso, Beattie i Bresnahan*, 1995) [5], niestety ocena koordynacji była niezwykle skomplikowana przez szybki ruch zwierzęcia, co uniemożliwiało ocenę wszystkich czterech łap jednocześnie.

Catwalk XT pozwala na wykrywanie nawet niewielkich zmian i jest przez badaczy uważana za jedną z dokładniejszych metod oceny odzysku funkcjonalnego w małych modelach zwierzęcych. Dodatkowo wersja XT pozwala na niezwykle dokładne i wyraźne odciski stóp, a możliwość nagrania całego przejścia zwierzęcia pozwala na pełną ocenę koordynacji i wszelkich zaburzeń w chodzie myszy, dzięki możliwości pełnego zobrazowania w zwolnionym tempie.

Nowoczesny system Catwalk (7, XT) pozwala na automatyczną ocenę wskaźnika funkcji kulszowej (SFI) oraz wielu parametrów pozwalających na obiektywną ocenę chodu małego zwierzęcia.

Pierwotnie SFI oceniano przy pomocy obliczeń odcisku myszy. Za pomocą tuszu wykonano pomiary, które obejmowały: (I) odległość od piątego do trzeciego palca, długość odcisku (PL); (ii) odległość od pierwszego do piątego palca, rozpiętość palca (TS); oraz (iii) odległość od drugiego do czwartego palca, pośrednie rozłożenie palców (ITS). Wszystkie trzy pomiary wykonano po stronie eksperymentalnej (E) i normalnej (N). SFI obliczono według równania:

$SFI = \frac{EPL - NPL}{EPL + NPL} \times 100$ ;  $SFI = \frac{ETS - NTS}{ETS + NTS} \times 100$ ;  $SFI = \frac{EIT - NIT}{EIT + NIT} \times 100$ ; SFI oscyluje wokół 0 dla normalnej funkcji nerwów, podczas gdy SFI około -100 oznacza całkowitą dysfunkcję [6].

Na potrzeby artykułu wybrano te parametry, które były opisywane w recenzowanych artykułach, z wysokim poziomem trafności i rzetelności.

Elisabeth A. Kappos i wsp. w swojej pracy oceniają parametry Catwalk pod kątem trafności i rzetelności pomiarów w porównaniu z innymi mierzonymi wynikami (np. analizą histologiczną). Trafność oceniano jako zastosowanie tych samych parametrów w innych artykułach w celu oceny tej samej funkcji oraz wiarygodność jako uzyskanie podobnych wyników w różnych eksperymentach [5]. W recenzowanych artykułach najczęściej stosowanymi parametrami były swing- czas unoszenia łapy, rozmiar wydruku – print area, print length- długość kroku i max contact mean- maksymalna powierzchnia kontaktu. Według literatury parametr Swing był nie tylko najczęściej używany, ale był również najbardziej wiarygodnym parametrem. Dlatego stawiamy hipotezę, że Swing Duration stanowi ważny parametr do wyboru w naszych badaniach, ponieważ cechuje się najwyższym poziomem rzetelności i trafności [5,6].

W GRUPIE T myszy poddano wymuszonemu treningowi na bieżni przez 60 min, 7 dni w tygodniu. Zwierzęta trenowały przez 5 dni po 30 minut w łącznym okresie 4 tygodni, 2 dni w tygodniu sobota, niedziela,

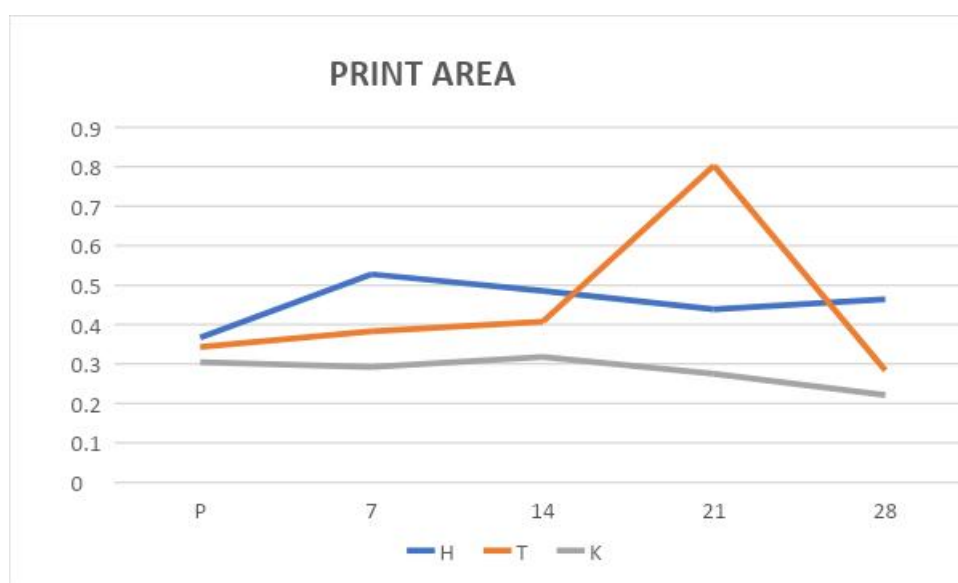
były przeznaczone na odpoczynek. Następnie dokonywano oceny funkcjonalnej za pomocą aparatury catwalk zgodnie z przedstawionymi grupami czasowymi. Pozwoliło to na ocenę szybkości powrotu funkcjonalnego u myszy w zależności od zastosowanego leczenia. Zarówno hiperbaria jak i trening mają zastosowanie terapeutyczne a grupa K uznana jest za grupę kontrolną.

#### ANALIZA FUNKCJONALNA CHODU

Ocena wzorców chodu za pomocą urządzenia *Catwalk* firmy Noldus będzie przeprowadzana przed uszkodzeniem nerwu kulszowego oraz w 7, 14, 21, 28 dniu po wywołaniu urazu. Procedura ta, nie wymaga znieczulenia i nie powoduje cierpienia lub bólu u zwierząt. Wszystkie zwierzęta będą poddawane terapii w jednakowej kolejności po odpowiednio długiej aklimatyzacji w urządzeniu (min. 2 dni od zabiegu).

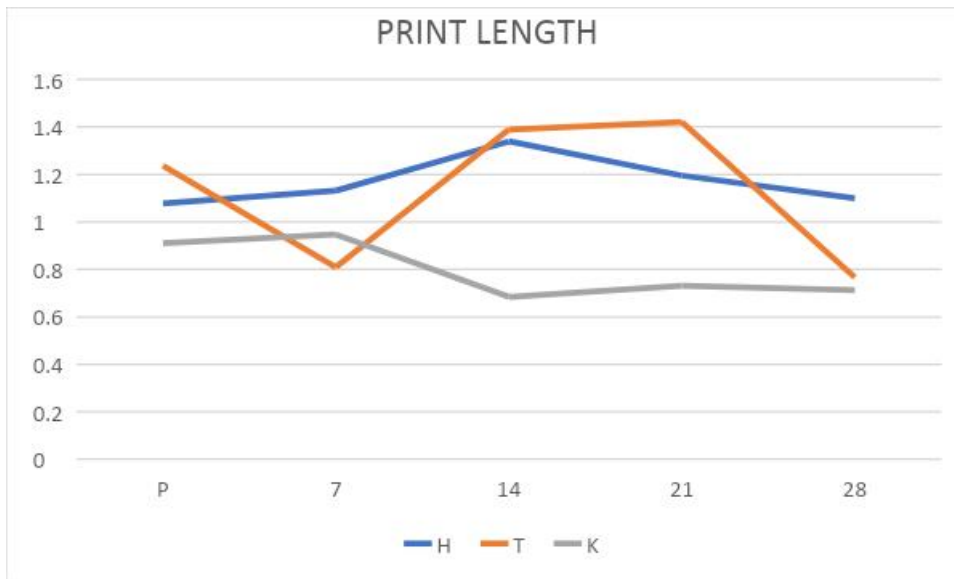
#### **WYNIKI**

Poniżej przedstawiono wyniki średnich oraz analizy statystycznej dla wybranych parametrów catwalk. Analizy statystycznej dokonano za pomocą testu t-studenta, a wartości  $p < 0,05$  wykazywały istotność statystyczną. W niniejszej pracy wykazano tylko wyniki istotne statystycznie.



**Ryc. 1.** Wykres przedstawiający istotne statystycznie wyniki parametru Print area (cm<sup>2</sup>) dotyczące wielkości pola odcisku łapy mierzony podczas maksymalnego kontaktu łapy z podłożem. Porównywano średnie wielkości pola dla trzech grup (H,T,K) przed uszkodzeniem nerwu kulszowego oraz w 7,14,21 i 28 dniu po uszkodzeniu.

W przypadku parametru Print area (pola odcisku) zauważono znaczące różnice już w 7 dniu w grupie poddanej hiperbarii ( $p < 0,05$ ). Obserwowano, że w tym czasie mysz dociskała łapę dużo bardziej i może to świadczyć o zaburzeniach propriocepcji lub czucia powierzchniowego uszkodzonej łapy. W przypadku grupy trenowanej zauważono wyraźnie zwiększony docisk łapy w 21 dniu po uszkodzeniu ( $p < 0,05$ ). Wynik ten istotnie odbiega od wyniku początkowego i mógł świadczyć o występującej anelgezji lub zaburzeniu czucia powierzchniowego. W pozostałych dniach wyniki nie były istotne statystycznie.



**Ryc. 2.** Wykres przedstawiający istotnie statystycznie wyniki parametru Print length (długość odcisku w cm) mierzoną w trakcie największego docisku łapy z podłożem. Porównywano średnie wielkości pola dla trzech grup (H,T,K) przed uszkodzeniem nerwu kulszowego oraz w 7,14,21 i 28 dniu po uszkodzeniu

Kolejnym parametrem ocenianym w niniejszej pracy była długość odcisku.

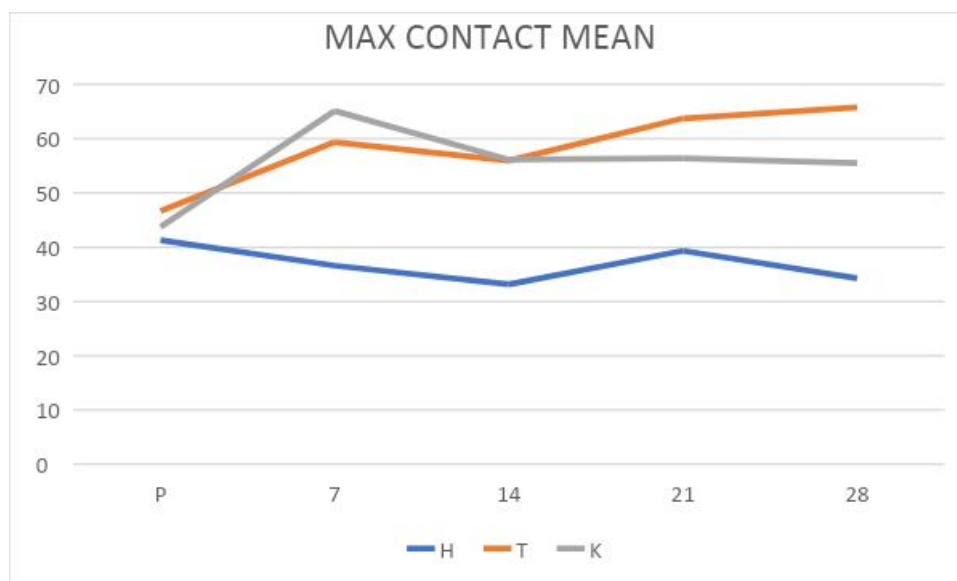
Pierwszą zauważoną zależnością było drastyczne zmniejszenie długości odcisku w 7 dniu w grupie trenowanej ( $p < 0,05$ ). Zastanawiającym jest fakt, że w tej samej grupie nie ma różnicy w polu odcisku. Nie zmienia to faktu, że zwierzęta poddane treningowi w 7 dniu po uszkodzeniu odciążały znacząco uszkodzoną kończynę co może świadczyć o występowaniu bólu, czy mechanicznej allodyni. W przypadku grupy poddanej terapii hiperbarycznej zauważono istotnie statystycznie różnice w 14 dniu, by następnie wyniki unormowały się w 21, 28 dniu i wróciły do wyników sprzed uszkodzenia. Zastanawiającym jest fakt takich różnic w grupie trenowanej. Może to świadczyć o tym, że trenowanie uszkodzonej łapy po zabiegu przyczynia się do występowania zjawiska mechanicznej allodyni i osłabia powrót funkcji w uszkodzonej łapie powodując jej zwiększony ból. Zwierzę wtedy stara się odciążać bolącą łapę, a to powoduje zmniejszenie odcisku łapy.



**Ryc. 3.** Wykres przedstawiający istotnie statystycznie wyniki parametru Swing [s]: mówiąca o czasie utrzymania łapy w powietrzu między zarejestrowanymi śladami porównywana między trzema grupami. Porównywano średnie wielkości pola dla trzech grup (H,T,K) przed uszkodzeniem nerwu kulszowego oraz w 7,14,21 i 28 dniu po uszkodzeniu

Oceniając zarejestrowany czas utrzymania łapy w powietrzu zauważono znaczący wzrost w przypadku obu terapii w 14 dniu ( $p < 0,05$ ), by następnie zaobserwować znaczący spadek tego czasu w obu grupach. Fakt, że

myszki utrzymywały łapę w powietrzu, jednocześnie odciążając kończynę świadczyć może o występowaniu bólu. Kończyna odciążona, w krótszym czasie miała kontakt z podłożem, a co za tym idzie wydłużony był czas utrzymania łapy w powietrzu. Jednocześnie może to świadczyć o występujących zaburzeniach propriocepcji i braku koordynacji między kończynowej.



**Ryc. 4.** Wykres przedstawiający istotne statystycznie wyniki parametru *Max Contact Mean Intensity* - opisywany jako średnia intensywność podczas maksymalnego kontaktu łapy z podłożem, a więc średnia ze wszystkich zarejestrowanych odcisków łapy porównywana między trzema grupami. Porównywano średnie wielkości pola dla trzech grup (H,T,K) przed uszkodzeniem nerwu kulszowego oraz w 7,14,21 i 28 dniu po uszkodzeniu

Naukowcy analizując wyniki maksymalnego kontaktu łapy z podłożem najczęściej wybierają ten parametr do oceny mechanicznej allodyni.

W niniejszej pracy zauważono zmniejszenie wyników dla tego parametru jedynie w grupie myszy trenowanych ( $p < 0,05$ ), w przypadku grupy poddanej hiperbarii nie uzyskano istotności statystycznej. Analizując wskaźnik funkcji kulszowej (SFI) zauważono istotne zmiany w 14 i 21 dniu w grupie poddanej terapii hiperbarycznej ( $p < 0,05$ ). W grupie tej SFI w 14 dniu wynosił średnio 88, w 21 - 93, w przeciwieństwie do grupy poddanej treningowi 61(14), 69(21). Można przypuszczać, iż w grupie poddanej terapii hiperbarycznej doszło do szybszej i bardziej efektywnej regeneracji funkcjonalnej niż w grupie poddanej treningowi.

## DYSKUSJA

Nasze badania pokazują wcześniejszy powrót funkcji po poddaniu terapią tlenową 100 procentowym tlenem przy ciśnieniu 2 ATA. Funkcja motoryczna uległa znacznej poprawie w GRUPIE H w porównaniu z modelem T. Było to prawdopodobnie spowodowane faktem, że myszy trenowane odczuwali większy ból i w większym stopniu obciążały uszkodzoną kończynę. Głównym narzędziem wykorzystanym do oceny powrotu funkcji w tych badaniach był analizator chodu Catwalk XT. Analiza chodu odgrywa bardzo ważną rolę w ocenie funkcji neurologicznych w wielu modelach chorób szczególnie w doświadczeniach na zwierzętach.[14] Najlepszym i niemalże najważniejszym dowodem regeneracji aksonu po uszkodzeniu nerwów obwodowych jest poprawa wyników funkcjonalnych [15]

W modelach zwierzęcych najczęściej stosuje się urządzenie Catwalk. Nowoczesny zautomatyzowany system analizy CatWalk daje możliwość jednoczesnego pomiaru dynamicznych i statycznych parametrów chodu oraz ma możliwość kontrolowania prędkości ruchu, co może powodować zmiany w tych parametrach [15]. Badania nad wykorzystaniem systemu Catwalk w ocenie odzysku funkcjonalnego są wciąż tematem rozważań badaczy, a pełny odzysk funkcji jest zjawiskiem dość rzadkim. Regeneracja po uszkodzeniu obwodowego układu nerwowego, jest zależna od rodzaju i stopnia uszkodzenia. Przywrócenie funkcji czuciowo-motorycznych po uszkodzeniu nerwów wymaga, aby włókna nerwowe zregenerowały się i ponownie unerwiały odpowiednie narządy docelowe na obwodzie. Nie zawsze udaje się osiągnąć zadowalającą regenerację czynnościową, pomimo skutecznej regeneracji i reinerwacji [4,7,15]

Watkins i Maier w swoich badania opisują rolę cytokiny prozapalnych wytwarzane przez komórki Schwanna w występowaniu bólu po uszkodzeniu nerwów. Zaobserwowali oni występowanie mechanicznej



allodini u szczurów i myszy zarówno po przecięciu jak i zmiżdżeniu nerwu. Natomiast powrót funkcji był dużo szybszy u zmiżdżeniowym uszkodzeniu nerwu u myszy niż u szczura. Dodatkowo zaobserwowano, iż Maksymalne pole odcisku po 28 dniach wraca do wyników sprzed uszkodzenia. Może to wynikać z mniejszej wagi, a co za tym idzie dużo szybszego chodu myszy [16].

Nichols i in. oraz Valero-Cabré i Navarro, wykazują w swoich badaniach, iż pełny odzysk funkcjonalny niekoniecznie koreluje z wynikami histologicznymi i elektrofizjologicznymi [17,18], co nie znaczy jednak, że analiza funkcjonalna nie jest najbardziej wiarygodnym sposobem oceny, że nerw nie tylko zregenerował się, ale także stworzył użyteczne połączenia narządowe, a co za tym idzie doszło do powrotu funkcji [19].

Regeneracja funkcjonalna po uszkodzeniu nerwu kulszowego była przedmiotem wielu badań i nadal cieszy się dużym zainteresowaniem wśród badaczy. Szczególnie jeśli mówimy o modelu zwierzęcym [10,11]. Analizując nasze wcześniejsze badania należy wspomnieć, iż rzadko doszło do pełnej regeneracji nerwów, szczególnie jeśli mowa o modelu doświadczalnym w czasie 4 tygodni, należałoby jednak podkreślić, że mimo braku leczenia również dochodzi do niewielkiego powrotu funkcji, natomiast poddanie terapii znacząco przyspiesza ten proces [20,30].

Christina F. Vogelaar i wsp. w swoich badaniach poddali szczury modelu zmiżdżenia nerwu kulszowego, zarówno na poziomie funkcji nerwów, jak i ekspresji genów. Badania nad wpływem nokautów w odniesieniu do modelu zwierzęcego, szczególnie w przypadku uszkodzeń obwodowego układu nerwowego są ostatnimi czasy tematem wielu doświadczeń, a naukowcy coraz częściej oceniają zdolności regeneracyjne zmutowanych myszy [15].

W tej pracy postanowiono zastosować system analizy chodu Catwalk oraz SFI. Jedną z dotychczasowych metod oceny odzysku funkcjonalnego był wskaźnik czynnościowy (SFI) i wskaźnik kulszowy (SSI), od niedawna jednak to system Catwalk stał się jednym z najczęściej stosowanych metod, ponieważ pozwala zarówno na ocenę SFI, SSI, jak i wielu innych parametrów chodu [6,7].

Chód myszy oceniany jest poprzez analizę odbicia światła na szklanej płycie od wewnątrz. W momencie kontaktu łapy z podłożem światło odbija się od szyby i widoczny jest obszar styku łapy z podłożem. Intensywność śladu jest wizualizowana za pomocą kamery i jest zależna od obciążania łapy. Przejście przez płytę jest nagrywane i dzięki specjalnemu oprogramowaniu można wyodrębnić różne parametry chodu [6,8].

W przeciwieństwie do metody de Medinacellego, CatWalk pozwala na dokładną ocenę chodu oraz sposobu w jaki łapa jest używana podczas ruchu, podczas gdy metoda de Medinacellego mierzy jedynie zdolność używania mięśni dolnej łapy i stopy [4,6,8].

Niestety jak każda metoda Catwalk cechuje się wieloma ograniczeniami a jedną z nich jest trudność w pełnej interpretacji wszystkich parametrów chodu, zwłaszcza gdy są one oceniane indywidualnie. Aby móc w pełni rzetelnie ocenić powrót funkcji wymagane jest zrozumienie definicji każdego parametru chodu, oraz znaczenie w jaki sposób dany parametr może wpłynąć na wzorzec chodu [3].

Niezaprzeczalnie Catwalk ma jednak wiele zalet, a jedną z nich jest możliwość odtworzenia sekwencji kroku klatka po klatce, co pozwala na dokładną ocenę w stosunku do parametrów wyjściowych, stosunek łapy prawej do lewej czy ocenę koordynacji między kończynowej [4,6,11].

Dodatkowo system Catwalk Xt w porównaniu z poprzednią wersją Catwalk 7, dzięki szybszej i dokładniejszej kamerze, pozwala na jeszcze bardziej rzetelną ocenę parametrów chodu. Chen i wsp. w swoich badaniach sprawdzali różnice pomiędzy tymi dwiema wersjami systemu Catwalk, potwierdzając przy tym, że analizator chodu CatWalk XT może być instrumentem badawczym i zapewniać lepszą dokładność niż system CatWalk 7 i pozwala na ocenę nawet subtelnych zmian [6,5,21].

W tym artykule wybrano parametry o największym poziomie trafności i wiarygodności. Niewątpliwie najczęściej używanym parametrem opisywanym w literaturze pokrewnej dotyczącej regeneracji nerwów obwodowych jest parametr swing duration. W większości badań parametr ten służy do oceny mechanicznej allodini, propriocepcji i zaburzeń czucia powierzchniowego [15,5].

Jak wskazuje CatWalk, poprawa statycznych funkcji motorycznych wskazana przez SSI, nie zawsze koreluje z poprawą funkcji lokomotorycznych. Natomiast może być traktowany jako wczesny wczesny wskaźnik powrotu do funkcjonalnego [5,7,8].

Najczęściej stosowanym modelem uszkodzenia nerwu kulszowego jest szczurzy model zwierzęcy. Wynika to między innymi z anatomicznej budowy szczura. Jest nieco większy niż mysz co pozwala na lepsze zobrazowanie struktur anatomicznych co jest niezwykle ważne, szczególnie jeśli mówimy o ocenie histologicznej i immunohistochemicznej [5,7,15].

Temat wpływu wysiłku fizycznego na proces regeneracji nerwów obwodowych stały się ostatnio tematem wielu badań, a uzyskane wyniki dały uzasadnienie korzystnego wpływu ćwiczeń fizycznych na układ nerwowy. Ćwiczenia fizyczne działają niczym impuls, zwiększający aktywność neuronalną w rdzeniu kręgowym i uszkodzonych neuronach, za sprawą zwiększonej impulsacji obwodowej, powodując regenerację neuronów czuciowych, ale również ruchowych. Rola ćwiczeń lokomotorycznych na powrót funkcjonalny po uszkodzeniu nerwu obwodowego jest tematem sporu wśród badaczy. Jak wynika z przeglądu literatury, niektórzy badacze twierdzą, że ćwiczenia wykazują korzystne skutki [22,23,24], a inni twierdzą, że nie [25].



Natomiast większość autorów potwierdza korzystny wpływ treningu na proces odrostu aksonalnego i ekspresję neurotrofin [26,27].

W przeciwieństwie do treningu lokomotorycznego wpływ terapii hiperbarycznej na układ nerwowy nie jest tak rozpowszechniony i jego znaczenie w procesie naprawy nerwów obwodowych nie jest do końca znane. Niewątpliwie jest to związane z tym, że leczenie hiperbarią tlenową jest stosunkowo młodą metodą terapeutyczną. Hiperbaria tlenowa (HBO, *hyperbaric oxygen*) polega na leczeniu tlenem hiperbarycznym, gdzie pacjent zamknięty w komorze leczniczej oddycha 100-procentowym tlenem przy ciśnieniu otoczenia większym od 1 ATA. Literatura opisuje to ciśnienie jako minimalne 1,4 ATA. Możliwości terapii obejmują zabiegi w komorach jednomiejscowej (*mono-place*) lub wielomiejscowej (*multiplace*) dla 2 lub więcej osób. Prowadzenie zabiegów przy ciśnieniu otoczenia 1 ATA lub tylko na części ciała nie stanowi leczenia HBO [28,29].

Analizując przedstawione wyniki widać lepsze rezultaty w obrębie parametrów CatWalk oceniających dynamikę chodu: Swing, oraz obszaru odcisku: print Length, print area w grupach poddanych terapii można zaryzykować hipotezę dużo szybszym powrocie funkcjonalnym. Poprawa wyżej wymienionych parametrów wydaje się wpływać na lepszą koordynację i większą precyzję w trakcie chodu.

W świetle przedstawionych wyników oraz analizie piśmiennictwa można zaobserwować, że komora hiperbaryczna wykazała najbardziej pozytywny wpływ na przyspieszenie regeneracji funkcjonalnej. Świadczyć o tym mogą dużo lepsze wyniki analizy czynnościowej Catwalk jak i wyniki SFI.

Podsumowując, zauważyliśmy, że myszy wykazywały szybszy powrót funkcji czuciowych i motorycznych w grupie poddanej hiperbarii i treningowi. Myszy obu grup rozwinęły stan mechanicznej allodynii, który również powracał w miarę postępu regeneracji.

#### **WNIOSKI**

1. Istotne różnice w polu odcisku i długości odcisku zauważono już w 7 dniu po uszkodzeniu. W grupie trenowanej zaobserwowano tendencję wzrostową tych parametrów w 21 dniu, co może świadczyć o występującej anelgezji lub zaburzeniu czucia powierzchniowego.
2. W grupie trenowanej zauważono zwiększony stan mechanicznej allodynii w porównaniu do grupy myszy poddanych hiperbarii.
3. Terapia hiperbaryczna zastosowana w celu poprawy odzyskiwania funkcji kończyn w przypadku uszkodzenia nerwów obwodowych w tych badaniach jest wykonalna i może nieść korzyści porównywalne do kinezyterapii.
4. Zastosowanie terapii skojarzonej w której zastosowalibyśmy obie terapie równocześnie mogłoby dać jeszcze bardziej imponujące wyniki i dużo szybszą regenerację po uszkodzeniu nerwów obwodowych.
5. Myszy obu grup (H, T) wykazywały szybszy powrót funkcji czuciowych i motorycznych w przeciwieństwie do grupy kontrolnej nie poddanej żadnej terapii.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods*. 2007 Aug 15;164(1):120-30.
- [2] A.L. Luís, S. Amado, S. Geuna, J.M. Rodrigues, M.J. Simões, J.D. Santos, F. Fregnan, S. Raimondo, A. Prieto Veloso, A.J.A. Ferreira, P.A.S. Armada-da-Silva, A.S.P. Varejão, A.C. Maurício, Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp, *Journal of Neuroscience Methods*, Volume 163, Issue 1, 2007, Pages 92-104, ISSN 0165-0270, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.017>.
- [3] Marek Wiecheć, Mariusz Krelowski; *Peripheral nerve damage – causes, symptoms, management. Rehabilitation in peripheral nerve injuries – upper limb; From the practice of the cabinet*, 2019.
- [4] Wang R, Rossomando A, Sah DW, Ossipov MH, King T, Porreca F.; Artemin induced functional recovery and reinnervation after partial nerve injury; *Pain*. 2014 Mar;155(3):476-84. doi: 10.1016/j.pain.2013.11.007
- [5] Elisabeth A. Kappos, Patricia K. Sieberl, Patricia E. Engels, Alessio V. Mariolo, Salvatore Dirk J. Schaefer, Daniel F. Kalbermatten ;Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models; *Brain and Behavior*; 22 March 2017 DOI: 10.1002/brb3.723
- [6] Chen et al, Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* 2014, doi:10.1186/1743-0003-11-62
- [7] Ewelina Pałasz, Agnieszka Bąk, Anna Gąsiorowska, Grażyna Niewiadomska; The role of trophic factors and inflammatory processes in physical activity-induced neuroprotection in Parkinson's disease; *Postepy Hig Med Dosw*, 2017; 71: 713-726
- [8] A.Bozkurta, J.Scheffela, G.A.BrookbE, A. Joostenc, C.V.Suscheka, D.M.O'Deya, N.Palluaa R.Deumensbc ; Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis ; *Behavioural Brain Research*; Volume 219, 2011
- [9]Markiewicz R., Koziół M., Olajossy M., Masiak J. Can the neurotrophic factor BDNF be an indicator of effective rehabilitation effects in schizophrenia? *Psychiatrist. Pol*, 2018.

- [10] Kusuda Y, Takemura A, Nakano M, Ishihara A. Mild hyperbaric oxygen inhibits the decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra of mice with MPTP-induced Parkinson's disease. *Neurosci Res.*, 2018
- [11] Filus JF., Rybakowski J. (2010). Serum BDNF levels and intensity of depressive symptoms. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia* 5: 155-162
- [12] Fumiko Nagatomo, Hidemi Fujino, Hiroyo Kondo, and Akihiko Ishihara. Oxygen Concentration-Dependent Oxidative Stress Levels in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2012
- [13] Kusuda Y, Takemura A, Nakano M, Ishihara A. Mild hyperbaric oxygen inhibits the decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra of mice with MPTP-induced Parkinson's disease. *Neurosci Res.*, 2018
- [14] Dr. Frank P.T. Hamers, Guido C. Koopmans, and Elbert A.J. Joosten. CatWalk-Assisted Gait Analysis in the Assessment of Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*. Apr 2006.537-548. <http://doi.org/10.1089/neu.2006.23.537>
- [15] Christina F. Vogelaar Dorien H. Vrinten Marco F.M. Hoekman Jan H. Brakkee J. Peter H. Burbach Frank P.T. Hamers ; Functional characterization of sciatic nerve regeneration in C57BL/6J mice ; Rudolf Magnus Institute of Neuroscience, Department of Pharmacology and Anatomy, University Medical Center Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584 CG Utrecht, The Netherlands.
- [16] Watkins LR, Maier SF (University of Colorado, Boulder, USA). Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain (Minisymposium). *J Intern Med*, 2005;257:139–155
- [17] Nichols, C. M., Myckatyn, T. M., Rickman, S. R., Fox, I. K., Hadlock, T., & Mackinnon, S. E. (2005). Choosing the correct functional assay: A comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behavioural Brain Research*, 163, 143–158
- [18] Valero-Cabré, A., & Navarro, X. (2002). Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *Journal of Neurotrauma*, 19, 1475–1485.
- [19] Lee, M.-J., Chang, C. P., Lee, Y. H., Wu, Y. C., Tseng, H. W., Tung, Y. Y., ... Chern, Y. (2009). Longitudinal evaluation of an N-ethyl-N-nitrosourea-created murine model with normal pressure hydrocephalus. *PLoS ONE*, 4, e7868.
- [20] Natalia Białoń, Michał Trzęsicki, Anna Dolińska, Dariusz Górka, The impact of physical activity on repair processes occurring in the central and peripheral nervous system, *We expand the horizons* col. XXVIII, 2021, 84-90
- [21] Kowalska B, Sudoł – Szopińska I. Ultrasound assessment of selected peripheral nerve pathologies. Part III: Injuries and postoperative. *Journal of ultrasonography* 2013; 13: 82 – 92.
- [22] A. Bozkurt, R. Deumens, J. Scheffel, D.M. O'Dey, J. Weis, E.A. Joosten, T. Führmann, G.A. Brook, N. Pallua; CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury, *Journal of Neuroscience Methods*, Volume 173, Issue 1, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.05.020>.
- [23] van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helders PJ, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997;78:70–77.
- [24] van Meeteren NL, Brakkee JH, Helders PJ, Gispen WH. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst.* 1998 3:277–282
- [25] Soucy M, Seburn K, Gardiner P. Is increased voluntary motor activity beneficial or detrimental during the period of motor nerve regeneration/reinnervation? *Can J Appl Physiol.* 1996, 218–224.
- [26] Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibanez CF. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science.* 1995;268:1495–1499
- [27] Hutchinson KJ, Gomez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain.* 2004, 1403–1414
- [28] Claudia Pitzer, Barbara Kurpiers & Ahmed Eltokhi, Gait performance of adolescent mice assessed by the CatWalk XT depends on age, strain and sex and correlates with speed and body weight, *Scientific Reports*, 2021.
- [29] G.L. Toledo, B. S. Sangalette, L. C. Passerotti, Guided neural regeneration with autologous fat grafting and oxygen hyperbaric therapy; *Original Research Anatomy*, 2020, <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0138>
- [30] Jason R. Bingham, Kevin R. Kniery, Nikolas L. Jorstad, Iren Horkayne-Szakaly, Zachary S. Hoffer, Shashikumar K. Salgar, “Stem cell therapy to promote limb function recovery in peripheral nerve damage in a rat model” *Experimental research, Annals of Medicine and Surgery*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.03.009>.