



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

Dynamika zmian rdzenia kręgowego w obrazowaniu tensora dyfuzji (DTI) na modelu zwierzęcym

Rozprawa na stopień doktora nauk weterynaryjnych

lek. wet. Karolina Owsieńska-Schmidt

Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów,

Wydział Medycyny Weterynaryjnej,

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotorzy:

dr hab. Marcin Wrzosek, prof. UPWr, dipl. ECVN

Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów,

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

dr hab. Anna Zimny, prof. UMW

Katedra Radiologii, Zakład Radiologii Ogólnej, Zabiegowej i Neuroradiologii

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław 2023

*ProHum – Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska – planowanie badań eksperymentalnych, tworzenie
i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami transferowania ich do badań
klinicznych w medycynie człowieka*

Umowa nr POWR.03.02.00-00-I008/17

Podziękowania

Pragnę podziękować mojemu promotorowi, Panu Profesorowi Marcinowi Wrzoscowi, za wyjątkowy dar dydaktyczny, którym sprawił, że jako studentka zainteresowałam się neurologią weterynaryjną, oraz za przekazaną wiedzę, motywację, pomoc merytoryczną i poświęcony czas w realizacji pracy doktorskiej.

Dziękuję mojej promotor, Pani Profesor Annie Zimny z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, za ogrom przekazanej wiedzy z dziedziny neuroradiologii, za zaangażowanie, pomoc merytoryczną, poświęcony czas oraz interdyscyplinarne podejście do rozwiązania przedstawionych w pracy problemów.

Dziękuję naszemu zespołowi: lek. wet. Paulinie Drobot, lek. wet. Aleksandrze Banasik, lek. wet. Laurze Brewińskiej, lek. wet. Tomaszowi Serzysko i lek. wet. Michałowi Płóciennikowi za wspólną pracę oraz codzienne wsparcie w prowadzeniu badań i pisaniu niniejszej rozprawy.

Dziękuję doktorowi Przemysławowi Podgórskiemu z Katedry Radiologii Uniwersytetu Medycznego za wsparcie w tworzeniu protokołów obrazowania metodą tensora dyfuzji oraz pomoc w opracowaniu metodologii badania.

Dziękuję technikom elektroradiologii: mgr inż. Iwonie Trybuchowskiej-Leki oraz Agnieszce Struss za ich zaangażowanie w wykonane badania rezonansem, a także codzienne wsparcie i motywowanie w prowadzeniu badań.

Dziękuję moim rodzicom za miłość, wsparcie, otuchę, wiarę we mnie oraz możliwość robienia w życiu tego, co kocham. Dziękuję im również za wychowanie jakie mi dali i przykład jaki dla mnie stanowią.

Dziękuję mojemu mężowi Pawłowi za jego miłość, oparcie, pomoc i codzienną motywację do pracy. Rodzina, jaką wspólnie stworzyliśmy, była dla mnie wytchnieniem w trudnych chwilach.

Dziękuję także wszystkim osobom, których nie wymieniłam z nazwiska, a które zawsze okazywały mi życzliwą pomoc i wsparcie w trakcie tych czterech lat pracy.

Rozprawę dedykuję mojej córce Marysi,

która urodziła się podczas trwania moich badań naukowych,

w trudnym czasie pandemii.

Bez Ciebie moja praca i wysiłek nie miałyby sensu.

Spis treści

Alfabetyczny wykaz użytych skrótów i oznaczeń	8
Streszczenie pracy w języku polskim	10
Streszczenie pracy w języku angielskim (abstract)	13
Wstęp	16
Występowanie uszkodzeń rdzenia kręgowego u ludzi i zwierząt	16
Patofizjologia ostrego uszkodzenia rdzenia kręgowego	16
Bariery dla regeneracji.....	18
Uszkodzenia rdzenia kręgowego związane z dyskopatią u psów.....	18
Diagnostyka uszkodzeń rdzenia kręgowego	21
Konwencjonalne metody diagnostyczne	21
Wyzwania współczesnej neuroradiologii.....	22
Zaawansowane techniki neuroobrazowania	22
Terapia uszkodzeń rdzenia kręgowego u ludzi i zwierząt	24
Aktualne zarządzanie urazami rdzenia kręgowego w medycynie człowieka.....	24
Badania nad innymi możliwościami terapeutycznymi.....	27
Postępowanie terapeutyczne w przebiegu przepukliny krążka międzykręgowego (IVDE) u psów	28
Badania metodą tensora dyfuzji na modelach zwierzęcych	29
Świnia jako model eksperymentalny w badaniach translacyjnych	30
Uzasadnienie wyboru tematyki podjętych badań	31
Cel pracy	33
Szczegółowe cele badawcze	34
Materiały i metody	35
Badanie dynamiki nieuszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu świni	35
Charakterystyka modelu – nieuszkodzonego rdzenia kręgowego.....	35
Przebieg znieczulenia do badania MR	37
Badanie MR i protokół badania DTI.....	38
Opracowanie danych pozyskanych w obrazowaniu tensora dyfuzji.....	39
Analiza statystyczna.....	41
Badanie dynamiki spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa	42
Charakterystyka modelu –uszkodzonego rdzenia kręgowego.....	42
Przebieg znieczulenia do badania MR	45
Badanie MR i protokół badania DTI.....	45

Opracowanie danych pozyskanych w obrazowaniu tensora dyfuzji.....	47
Analiza statystyczna.....	49
Wyniki	51
Badanie dynamiki nieuszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu świni	51
Badanie dynamiki spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa	62
Dyskusja	68
Badanie dynamiki nieuszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu świni	68
Badanie dynamiki spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa	75
Podsumowanie	86
Wnioski.....	89
Spis tabel	90
Spis rycin	91
Bibliografia	94
Publikacja	106

Alfabetyczny wykaz użytych skrótów i oznaczeń

3R – zasada zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (ang. *replacement, reduction, and refinement*)

AANS – American Association of Neurological Surgeons – stowarzyszenie naukowo-edukacyjne, skupiające się na rozwijaniu chirurgii neurologicznej

AD – dyfuzyjność osiowa (ang. *axial diffusivity*)

ADC – rzeczywisty współczynnik dyfuzji (ang. *apparent diffusion coefficient*)

ANNPE – ostra niekompresyjna ekstruzja jądra miazdżystego (ang. *acute non-compressive nucleus pulposus extrusion*)

ANOVA – jednoczynnikowa analiza wariancji (ang. *one-way analysis of variance*)

AO Spine – wiodąca globalna społeczność akademicka, zajmująca się innowacyjną edukacją i badaniami w zakresie opieki nad pacjentami z chorobami kręgosłupa, szczególnie skupiając się na dążeniu do poprawy jakości życia pacjentów

ASIA – skala ASIA (American Spinal Injury Association) to międzynarodowe standardy neurologicznej i funkcjonalnej klasyfikacji urazów rdzenia kręgowego

CNS – Congress of Neurological Surgeons – wiodąca organizacja zajmująca się rozwojem neurochirurgii poprzez edukację i innowacje, inspirująca i ułatwiająca prowadzenie odkryć naukowych oraz ich przełożenie na praktykę kliniczną

CSC – szyjny rdzeń kręgowy (ang. *cervical spinal cord*)

CSF – płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *cerebrospinal fluid*)

DTI – obrazowanie tensora dyfuzji (ang. *diffusion tensor imaging*)

FA – anizotropia frakcjonowana (ang. *fractional anisotropy*)

FCE – zator włóknisto-chrząstny (ang. *fibrocartilaginous embolism*)

GM – istota szara (ang. *grey matter*)

GM-1 – gangliozyd typu 1/ monosialogangliozyd (ang. *monosialoganglioside*)

HNPE – ekstruzja uwodnionego jądra miazdżystego (ang. *hydrated nucleus pulposus extrusion*)

HR – częstość akcji serca (ang. *heart rate*)

IVDD – choroba krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc disease*)

IVDE – ekstruzja krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc extrusion*)

IVDH – wypadnięcie/przepuklina krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc herniation*)

LKE – Lokalna Komisja Etyczna

LMN – dolny motoneuron (ang. *lower motoneuron*)

MAP – średnie ciśnienie tętnicze (ang. *mean arterial pressure*)

MD – średnia dyfuzyjność (ang. *mean diffusivity*)

miRNA – mikro RNA

MPSS – metyloprednizolon (ang. *methylprednisolone*)

MR-DTI – obrazowanie techniką tensora dyfuzji rezonansu magnetycznego

MRI – badanie rezonansem magnetycznym (ang. *magnetic resonance imaging*)

MSF – zmodyfikowana skala Frankela (ang. *Modified Frankel Scale*)

NMDA – jonotropowe receptory N-metylo-D-asparaginowe

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PMM – postępująca mielomalacja (ang. *pregressive myelomalacia*)

RD – dyfuzyjność promieniowa (ang. *radial diffusivity*)

ROI – obszar zainteresowania (ang. *region of interest*)

RR – częstotliwość oddechów (ang. *respiratory rate*)

SCI – uszkodzenie rdzenia kręgowego (ang. *spinal cord injury*)

SE/EPI – obrazowanie echo-plenarne (ang. *single-shot, spin-echo planner*)

SNR – stosunek sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*)

T – Tesla

TK – tomografia komputerowa (ang. *computer tomography – CT*)

TL-IVDE – ekstruzja krążka międzykręgowego w odcinku piersiowo-lędźwiowym (ang. *thoracolumbar intervertebral disc extrusion*)

TR/TE – czas powtarzania/czas echa (ang. *time repetition/time echo*)

UMN – górny motoneuron (ang. *upper motoneuron*)

WM – istota biała (ang. *white matter*)

Streszczenie pracy w języku polskim

Urazy rdzenia kręgowego stanowią poważny problem zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i człowieka. Głównym wyzwaniem jest trudność obiektywnej oceny stopnia uszkodzenia rdzenia przy użyciu standardowych metod diagnostycznych opartych na obrazach strukturalnych. W naszej pracy wykorzystaliśmy zaawansowaną technikę obrazowania rezonansem magnetycznym – tensor dyfuzji (ang. *diffusion tensor imaging* – DTI), która ma obiecujące zastosowanie w obiektywnej ocenie struktury rdzenia kręgowego na poziomie tkankowym.

Nadrzędnym celem pracy była ocena mikrostruktury rdzenia kręgowego przy użyciu techniki tensora dyfuzji na dwóch modelach zwierzęcych – modelu świni oraz modelu psa.

W pierwszej części pracy zdecydowaliśmy się zastosować tę metodę u zdrowych świń ze względu na ich szybki przyrost masy ciała oraz anatomiczne i fizjologiczne podobieństwo do człowieka. Ta część badania miała na celu weryfikację zmian parametrów uzyskanych za pomocą DTI w procesie wzrostu organizmu. Chcieliśmy również określić, czy wartości DTI zmieniają się na różnych poziomach przebiegu rdzenia kręgowego.

Modelem był zdrowy, rosnący i nieuszkodzony rdzeń kręgowy świni – zbadano 19 świń rasy polskiej białej w zakresie wagowym 24-120 kg (średnia 48 kg, mediana 48 kg) i w wieku od 2,5 do 11 miesięcy (średnia 5 miesięcy, mediana 5,5 miesiąca). Parametry DTI mierzono w trzech grupach wagowych: do 29 kg (n=5), 30-59 kg (n=6) i od 60 kg (n=8). Badanie DTI wykonano skanerem rezonansu magnetycznego o indukcji pola 1,5 Tesla (1,5T) (Philips, Ingenia). Analizę obrazu przeprowadzono przy użyciu programu Fiber Track (stacja robocza Philips, Ingenia), rysując ręcznie 9 obszarów zainteresowania (ang. *regions of interest* – ROIs), na przebiegu rdzenia kręgowego. Pomiarów wykonywano w trzech odcinkach: szyjnym, piersiowo-

łędźwiowym i łędźwiowym rdzenia kręgowego, tj. dokładnie na wysokości przestrzeni międzykręgowych C4/C5, Th13/L1 i L4/L5 oraz w każdym przypadku jeden segment doczaszkowo i jeden doogonowo od wyżej wymienionych miejsc. Wartości parametrów DTI, anizotropii frakcjonowanej (ang. *fractional anisotropy* – FA) i rzeczywistego współczynnika dyfuzji (ang. *apparent diffusion coefficient* – ADC) uzyskano dla każdego ROIs, a następnie porównano.

Wykazano, że istnieje korelacja między wiekiem i przyrostem masy ciała, a zmianą parametrów FA i ADC. Co więcej, zauważono, że wraz ze wzrostem masy ciała i wieku, wartości FA rosną, a ADC maleją, podczas gdy wartości pomiarów FA i ADC nie różniły się istotnie między trzema odcinkami rdzenia kręgowego.

Uzyskano wyniki, które mogą być przydatne w określaniu wartości referencyjnych dla nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego zwierząt i ludzi. Otrzymane w procesie wzrostu świń wartości DTI pozwoliły nam zobrazować dynamikę modelu rosnącego rdzenia kręgowego, który może być stosowany zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i człowieka, do porównawczej, obiektywnej oceny mikrostruktury rdzenia kręgowego.

Druga część badania miała na celu ocenę parametrów DTI u psów ze zdiagnozowaną kompresją rdzenia kręgowego przed i po zabiegu chirurgicznej dekompresji.

Do badania zakwalifikowano 9 psów poddanych chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego z powodu ekstruzji krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc extrusion* – IVDE) (C2/C3, C3/C4, Th11/Th12, L2/L3, L3/L4, L4/L5). Badanie MRI wykonano skanerem rezonansu magnetycznego o indukcji pola 1,5T (Philips, Ingenia) bezpośrednio przed i 10-14 dni po operacji. Dwa parametry DTI: FA i ADC, zostały zmierzone poprzez manualne naniesienie ROIs (program Fiber Track, Philips, Ingenia) w trzech miejscach: miejscu kompresji (ROI2, ang. *spinal*

cord injury – SCI), jeden segment doczaszkowo (ROI1) i jeden segment doogonowo (ROI3) od uszkodzenia rdzenia kręgowego (SCI). Oceniono stan neurologiczny przed i po operacji.

U 8 z 9 psów stan neurologiczny po zabiegu uległ poprawie. W porównaniu z wartościami przedoperacyjnymi wartości ADC mierzone w miejscu SCI wzrosły ($p = 0,01$), a wartości FA zmniejszyły się ($p = 0,03$). Odwrotnie niż w miejscu SCI, doogonowo od niego wartości ADC obniżyły się pozabiegowo ($p = 0,04$). Jednocześnie wartości ADC w kierunku doczaszkowym od miejsca uszkodzenia, a także wartości FA na poziomie doczaszkowym i doogonowym od ogniska SCI nie różniły się znacząco.

Wyniki sugerują, że DTI jest wiarygodnym narzędziem do oceny stanu rdzenia kręgowego psów, a parametry ADC pozytywnie korelują z oceną stanu neurologicznego badanych zwierząt. Co za tym idzie, pomiary wartości DTI mogą zapewnić bardziej obiektywną ocenę stanu rdzenia kręgowego. Najbardziej obiecującym zastosowaniem DTI jest przedoperacyjna ocena rokowania, dotycząca powrotu pacjenta do zdrowia.

Streszczenie pracy w języku angielskim (abstract)

Spinal cord injuries are a great concern in veterinary and human medicine. The main problem in this field is the difficulty of evaluating the degree of damage objectively using standard structural imaging methods. In our work, we used an advanced magnetic imaging technique – diffusion tensor imaging (DTI) – that has promising applications for the objective assessment of the microstructure of the spinal cord.

The overall objective of the work was to assess spinal cord microstructure using DTI, in two animal models – the swine and dog model.

We decided to apply this method to healthy pigs as a model organism due to their rapid weight gain, anatomical and physiological similarity to humans. This part of the study aimed to verify the parameters obtained using DTI change during the growth process. We also wanted to identify if the DTI values change on the course of the spinal cord different levels.

The model was a healthy growing porcine spinal cord (19 pigs, Polish White, weight 24–120 kg, mean 48 kg, median 48 kg, age 2.5–11 months, mean 5 months, median 5.5 months). DTI parameters were measured in three weight groups: up to 29 kg (five pigs), 30–59 kg (six pigs), and from 60 kg up (eight pigs). DTI was performed with a 1.5 Tesla magnetic resonance scanner (Philips, Ingenia). Image post-processing was done using the Fiber Track package (Philips Ingenia workstation) by manually drawing the regions of interest (nine ROIs). The measurements were recorded for three sections: the cervical, thoracolumbar and lumbar segments of the spinal cord at the C4/C5, Th13/L1, and L4/L5 vertebrae levels. In each case, one segment was measured cranially and one caudally from the above-mentioned places. The

values of fractional anisotropy (FA) and apparent diffusion coefficient (ADC) were obtained for each ROIs and compared.

A correlation between age, weight gain, and change in FA and ADC parameters was shown. Moreover, it is noted that, with increasing weight and age, the FA parameter increases and ADC decreases, whereas the FA and ADC measurement values did not significantly change between the three sections of the spinal cord.

Obtained results could be useful in determining reference DTI values for the undamaged spinal cords of animals and growing humans. The obtained values related to porcine growth will allow us to achieve a model of the growing spinal cord that can be used in both veterinary and human medicine for the objective assessment of the spinal cord microstructure, as the reference point.

The second part of the study aimed to assess the DTI parameters in dogs with diagnosed spinal compression before and after surgical decompression.

Nine dogs qualified for the research underwent surgical decompression of the spinal cord due to intervertebral disc extrusion (IVDE) (C2/C3, C3/C4, Th11/Th12, L2/L3, L3/L4, L4/L5). MRI was performed with a 1.5 Tesla magnetic resonance scanner (Philips, Ingenia) directly before and 10-14 days after the surgery. Two DTI parameters: FA and ADC, were measured by manually drawing ROI in three places: compression sites (ROI2=SCI), one segment cranially (ROI1) and one segment caudally (ROI3) from the spinal cord injury (SCI). The neurological status before and after surgery was assessed.

In 8/9 dogs, the neurological condition improved. ADC values measured at the SCI increased ($p = 0.01$), and FA values decreased ($p = 0.03$) after the procedure compared to the pre-operative values. Conversely, caudally to SCI ADC values after surgery decreased ($p = 0.04$).

The ADC values cranially to the lesion site, as well as FA values at the cranial and caudal levels to SCI did not change significantly.

Findings suggest that DTI is a reliable tool for the canine spinal cord condition assessment, as ADC parameters positively correlated with a neurological assessment. DTI values measurements may provide a more objective spinal cord status assessment. The most promising application of DTI is the pre-operative assessment of the prognosis for recovery.

Wstęp

Występowanie uszkodzeń rdzenia kręgowego u ludzi i zwierząt

Uszkodzenia rdzenia kręgowego (ang. *spinal cord injury* – SCI) mają poważne konsekwencje fizyczne, psychospołeczne i zawodowe dla pacjentów, a w przypadku zwierząt również dla ich opiekunów. W ciągu ostatnich kilku dekad nastąpił znaczny postęp w leczeniu osób, które doznały ostrego SCI. Do poprawy ogólnej opieki nad pacjentami przyczyniły się chociażby wczesne unieruchomienie na miejscu zdarzenia, przestrzeganie protokołów resuscytacji po ostrym urazie, stabilizacja chirurgiczna i farmakologiczna, a następnie długoterminowa rehabilitacja. Czynniki te, w połączeniu z większą świadomością społeczną i lepszymi standardami przemysłowymi, które zwiększają bezpieczeństwo pojazdów mechanicznych, pracy oraz rekreacji i sportu, prawdopodobnie przyczyniły się do zwiększenia długoterminowego przeżycia pacjentów po urazach kręgosłupa (1–4).

Pomimo tej poprawy, szanse powrotu do zdrowia pod względem neurologicznym pozostają niepomyślne dla osób, które doznały urazów skutkujących początkowo całkowitą utratą ruchu i czucia. Co jednak istotne, prognozowanie to jest również trudne do jednoznacznej oceny. To z kolei sprawia, że dotychczas powstało wiele badań, mających na celu zrozumienie i pokonanie biologicznych przeszkód w powrocie do zdrowia u pacjentów po ostrych urazach rdzenia kręgowego (5,6).

Patofizjologia ostrego uszkodzenia rdzenia kręgowego

Przebieg uszkodzenia rdzenia kręgowego można podzielić na fazę pierwotną i wtórną. Uszkodzenia pierwotne są spowodowane przez siły fizyczne początkowego zdarzenia urazowego i często stanowią najważniejszy wyznacznik ciężkości urazu. Po początkowym zniszczeniu

tkanki, spowodowanym przez siły mechaniczne, następuje błyskawiczna seria patofizjologicznych uszkodzeń związanych m.in. z procesem zapalnym i niedokrwieniem, które prowadzą do dalszych uszkodzeń wtórnych (7,8).

W następstwie urazu dochodzi do uwalniania neuroprzekaźnika pobudzającego w OUN – glutaminianu, który to oddziałuje na jonotropowe receptory NMDA (N-metylo-D-asparaginowe), w następstwie czego dochodzi do napływu jonów wapnia przez kanały wapniowe w błonach komórkowych. Prowadzi to do inicjacji kaskady procesu zapalnego, który przebiega w następujący sposób: zachodzi aktywacja fosfolipazy, kwasu arachidonowego, a następnie działanie syntetazy prostaglandyn. Aktywacja fosfolipazy i kaskady zapalenia zachodzi dodatkowo pod wpływem działania trombiny, pojawiającej się w następstwie procesu krzepnięcia – wtórnego do wybroczyn krwawych powstających w tkance nerwowej w skutek urazu. Pod wpływem prostaglandyn dochodzi do niedokrwienia w obrębie istoty szarej rdzenia kręgowego. Neurony przechodzą wówczas na metabolizm beztlenowy – dochodzi do powstania kwasu mlekowego i wytwarzania wolnych rodników. Kwas mlekowy inicjuje uwalnianie jonów żelaza (Fe^{+++}) z hemoglobiny, a ich działanie, jak i samego kwasu, powoduje uszkodzenie lipidów w osłonkach mieliniowych, powodując rozprzestrzenianie się uszkodzenia na istotę białą i postępującą demielinizację aksonów. Proces demielinizacji jest dodatkowo napędzany niedokrwieniem, które ma charakter wtórny względem uszkodzeń mikronaczyń. W skutek postępującej demielinizacji dochodzi do trwałego uszkodzenia długich dróg rdzeniowych (7,9,10).

Uznanie, że terapeutyczne ukierunkowanie tych biologicznych zdarzeń może zmniejszyć uszkodzenie tkanki nerwowej w przebiegu urazu, stanowiło podstawę wielu badań z zakresu nauk podstawowych, skoncentrowanych na opracowaniu strategii neuroprotektynnych. Testowanie takich czynników na różnych zwierzęcych modelach SCI potwierdziło, że poprawa

statusu neurologicznego może być osiągnięta poprzez ograniczenie wtórnych uszkodzeń. Jednakże odtworzenie takiego efektu w ostrym SCI u ludzi jest bardzo trudne, o czym świadczy szereg prac naukowych i eksperymentalnych działań terapeutycznych z zastosowaniem czynników o potencjalnym działaniu neuroprotektynym (np. metyloprednizolon, czynniki wzrostu, komórki macierzyste czy implantacje neurostymulujących urządzeń elektronicznych), które nie wykazały przekonującej skuteczności w badaniach na ludziach (11).

Bariery dla regeneracji

Powszechnie wiadomo, że regeneracja ośrodkowego układu nerwowego (OUN) dorosłych ssaków, w tym rdzenia kręgowego, jest trudna ze względu na ograniczoną plastyczność tkanki nerwowej. Z czasem miejsce po urazie ewoluuje i charakteryzuje się przerwaniami szlaków istoty białej, bliznowaceniem glejowym i kawitacją. Przewlekła patologia, która powstaje po ostrych procesach patofizjologicznych, stanowi znaczące utrudnienie dla odrastania aksonów w całym miejscu urazu i wokół niego. Dlatego neurobiologicznym wyzwaniem jest opracowanie strategii, mogących wspierać regenerację aksonów, które nie uległy uszkodzeniu, oraz remielinizację tych zdmielinizowanych, w celu poprawy przewodzenia sygnałów przez miejsce urazu. Wiele elementów w uszkodzonym rdzeniu kręgowym, takich jak inhibitory związane z mieliną i blizny glejowe, są uznawane za bariery dla opisanej regeneracji aksonów. Jednakże, powstało wiele strategii mających na celu pokonanie tych czynników hamujących w obrębie rdzenia oraz poprawę wewnętrznych właściwości wzrostu neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (10,12–15).

Uszkodzenia rdzenia kręgowego związane z dyskopatią u psów

Choroba krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc disease* – IVDD) jest jednym z najczęstszych schorzeń diagnozowanych u weterynaryjnych pacjentów neurologicznych.

Szacuje się, że występuje u 2% psów przychodzących do gabinetu weterynaryjnego na wizytę pierwszego kontaktu (16–18). Ostre urazy rdzenia kręgowego są najczęściej związane są z przepukliną krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc extrusion* – IVDE). Ten typ dyskopatii obejmuje przepuklinę środkowej części krążka międzykręgowego (zwapniałego jądra miażdżystego), które rozrywa zewnętrzną część krążka (pierścień włóknisty), powodując gwałtowną kompresję na rdzeń kręgowy. IVDE dotyka głównie młode dorosłe psy (w wieku od 2 do 6 lat), a wśród ras predysponowanych wymienia się rasy chondrodystroficzne (jamniki, pekińczyki, maltańczyki) oraz beagle, pudle, shih tzu, buldogi francuskie i mopsy. Znacznie rzadziej może pojawiać się także u ras dużych – rottweilerów, owczarków niemieckich i labrador retrieverów. W przebiegu IVDE obserwuje się różne objawy, od bólu do nawet całkowitego porażenia motoryki kończyn (para/tetraplegia z zachowaniem lub utratą czucia bólu głębokiego). Różnorodność objawów zależy od neurolokalizacji i stopnia ucisku, a przez to stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego (16,17,19,20).

Obecnie, głównie ze względu na wzrastającą dostępność diagnostyki zaawansowanego obrazowania rezonansem magnetycznym, rozpoznaje się wiele innych rodzajów wypadnięć dysku, które nie obejmują zwapniałego materiału jądra miażdżystego. Należą do nich ekstruzje uwodnionego jądra miażdżystego (ang. *hydrated nucleus pulposus extrusion* – HNPE), ostre niekompresyjne ekstruzje jądra miażdżystego (ang. *acute non-compressive nucleus pulposus extrusion* – ANNPE), a także ekstruzje naczyniowe – zator włóknisto-chrzęstny (ang. *fibrocartilaginous embolism* – FCE), skutkujący rozwojem mielopatii niedokrwiennej. Wszystkie one związane są z przemieszczeniem się materiału jądra miażdżystego przy zachowaniu elastyczności i struktury krążka międzykręgowego (18,19,21–25).

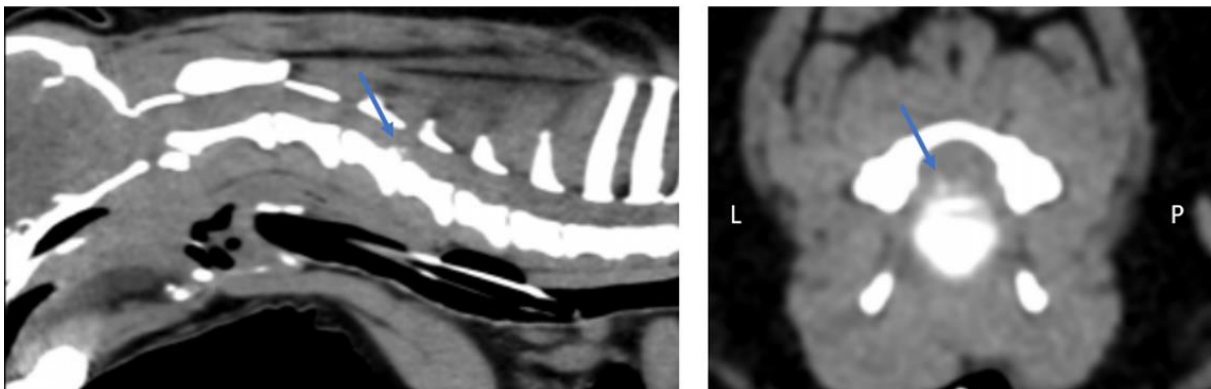
Prawdopodobieństwo wystąpienia ANNPE i FCE jest większe u psów sportowych oraz wykonujących intensywną aktywność fizyczną, w szczególności skręty i skoki. Sugeruje to, że siły biomechaniczne odgrywają ważną rolę w opisanych stanach (19,22). Dysponujemy dużą ilością danych dotyczących powrotu do zdrowia tych psów, u których zachowana jest pewna funkcja motoryczna. Natomiast dane dotyczące psów bez jej zachowania (tetra lub paraplegia), z obecną percepcją bólu i bez niej, są bardzo ograniczone (20,22,26–30). Dowiedziono już, że psy dotknięte ANNPE i FCE odzyskują funkcje wolniej i na niższym poziomie niż psy z IVDE. Wynika to z faktu, że w przebiegu ostrej ekstruzji zwapniałego materiału dyskowego dochodzi do urazu kompresyjnego i stłuczenia rdzenia kręgowego, a wtórnie do tych zjawisk ma miejsce także blok przewodzenia w uszkodzonej tkance nerwowej. Objawy występujące u psów, które doznały ANNPE, FCE lub HNPE, odzwierciedlają natomiast uszkodzenie aksonów i neuronów, co tłumaczy trudniejszy powrót do zdrowia. W związku z tym wczesna interwencja z rehabilitacją będzie u tych psów bardziej istotna niż w przypadku psów z IVDE (26). W rzeczywistości, przebieg tego rodzaju dyskopatii u psów, bardziej odzwierciedla ostre urazy rdzenia kręgowego występujące u ludzi.

Największym wyzwaniem dzisiejszej neurologii jest także fakt, że stopień kompresji lub uszkodzenia rdzenia kręgowego nie zawsze bezpośrednio koreluje z nasileniem objawów neurologicznych, co utrudnia podjęcie decyzji o najlepszym sposobie leczenia i określeniu rokowania dla pacjenta (31,32). Pojawia się w tych przypadkach potrzeba przeprowadzenia przyżyciowej specjalistycznej diagnostyki obrazowej w celu możliwie precyzyjnej oceny progностycznej dla konkretnego indywidualnego przypadku.

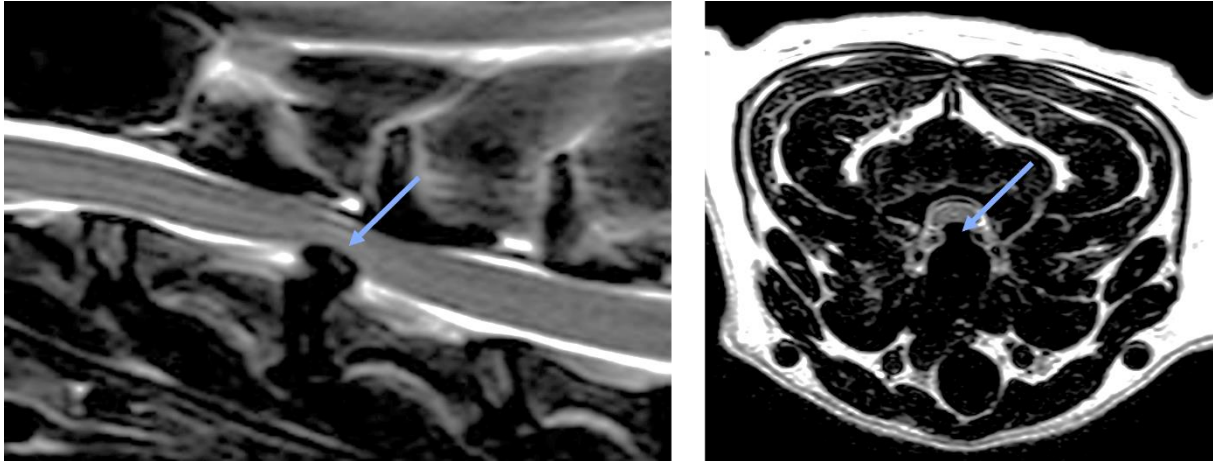
Diagnostyka uszkodzeń rdzenia kręgowego

Konwencjonalne metody diagnostyczne

Diagnozę uszkodzeń rdzenia kręgowego zarówno w medycynie człowieka, jak i weterynaryjnej, przeprowadza się za pomocą rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging* – MRI), tomografii komputerowej (ang. *computer tomography* – CT), mielografii TK (ang. *CT myelography*) lub klasycznej mielografii. Te metody obrazowania ułatwiają również planowanie leczenia i prognozowanie. Jednocześnie każda z nich różni się pod względem dokładności diagnostycznej, kosztów, dostępności i możliwych działań niepożądanych. Obrazowanie MR ma czułość diagnostyczną > 98,5% i lepszą wydajnością diagnostyczną niż tomografia komputerowa u psów z ostrymi objawami, podczas różnicowania przepukliny dyskowej od wypukliny (6,17,20,33–37) (**Rycina 1, Rycina 2**).



Rycina 1. Centralno-lewostronna przepuklina (ekstruzja) jądra miazdżystego krążka międzykręgowego u psa rasy yorkshire terrier na wysokości przestrzeni międzykręgowej C4/C5 (niebieską strzałką oznaczono materiał dyskowy, zlokalizowany w świetle kanału kręgowego). Widoczna jest rekonstrukcja tkanek miękkich w płaszczyźnie strzałkowej (lewa strona) oraz poprzecznej (prawa strona). Badanie kręgosłupa szyjnego wykonano 16-rzędowym tomografem komputerowym (GE Health Care).



Rycina 2. Centralna przepuklina (ekstruzja) jądra miażdżystego krążka międzykręgowego u buldoga francuskiego na wysokości przestrzeni międzykręgowej C3/C4 (niebieską strzałką oznaczono hipointensywny materiał dyskowy, zlokalizowany w świetle kanału kręgowego, zewnątrzrdzeniowo, powodujący umiarkowaną kompresję rdzenia kręgowego; dodatkowo widoczne podwyższenie sygnału z rdzenia kręgowego na tej wysokości, świadczące o zmianach obrzękowych śródrzeniowo, wtórnych do kompresji rdzenia). Badanie kręgosłupa szyjnego wykonano 1,5T skanerem MR (Philips, Ingenia) w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (lewa strona) oraz poprzecznej (prawa strona).

Wyzwania współczesnej neuroradiologii

Ocena radiologiczna przy użyciu standardowych metod obrazowania ma jednak swoje ograniczenia i pozwala jedynie subiektywnie określić stopień uszkodzenia rdzenia kręgowego. Najdokładniejszą metodą diagnostyczną jest badanie MR. W standardowych strukturalnych sekwencjach MR można ocenić stopień kompresji i ewentualne wtórne do uszkodzenia zmiany sygnału z rdzenia kręgowego (**Rycina 2**). Nie daje nam to jednak pełnych informacji na temat zmian na poziomie mikrostrukturalnym (31,32,38,39). Pomimo dobrze rozwiniętych i opisanych metod obrazowania, nadal istnieje luka, która skłania nas, badaczy, do poszukiwania i opracowywania dokładniejszych i bardziej obiektywnych metod oceny stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego w przebiegu tego powszechnego schorzenia.

Zaawansowane techniki neuroobrazowania

MRI to metoda, która obecnie daje nam największe możliwości diagnostyczne w chorobach ośrodkowego układu nerwowego. Oprócz standardowych projekcji strukturalnych,

dysponujemy szeregiem nowoczesnych technik. Pozwalają one na uwidocznienie mikroperfuzji ocenianej zmiany (perfuzja MR), jej składu biochemicznego (spektroskopia MR), komórkowości (dyfuzja MR), położenia względem włókien istoty białej (tensor dyfuzji MR) oraz ośrodków korowych (czynnościowy MR). Każde z tych badań pozwala na charakterystykę zmiany chorobowej pod innym względem, mając tym samym zarówno liczne zalety, jak i pewne ograniczenia. Jednocześnie możliwość precyzyjnej diagnostyki obrazowej (z zastosowaniem wyżej wymienionych technik), która uwzględnia zarówno ocenę strukturalną, jak i funkcjonalną, w znacznym stopniu decyduje o wczesnym rozpoznaniu i efektach planowanego leczenia (40).

Obrazowanie techniką tensora dyfuzji (DTI)

Obrazowanie tensora dyfuzji (ang. *diffusion tensor imaging* – DTI) to zaawansowana technika MRI, która w sposób nieinwazyjny i przyżyciowy ujawnia unikalne informacje o mikrostrukturze istoty białej (ang. *white matter* – WM) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), pozwalając tym samym wyciągnąć pośrednie wnioski na temat jego funkcjonowania (41–46). Metoda ta może być szczególnie użyteczna w przypadku pacjentów po urazach rdzenia kręgowego, ponieważ pozwala na dokładniejszą klasyfikację uszkodzeń niż konwencjonalne techniki obrazowania (standardowe sekwencje MR). Pozwala ona również na prognozowanie szans powrotu do sprawności ruchowej oraz ocenę efektów leczenia zarówno u pacjentów dorosłych oraz dzieci, jak i pacjentów weterynaryjnych (38,47–53).

DTI opiera się na przyżyciowym pomiarze dyfuzji cząsteczek wody w tkance. U podstaw techniki leży fakt, że dyfuzja nie jest chaotyczna, a ograniczona i kierunkowa, szczególnie w tak uporządkowanej strukturze jaką jest nieuszkodzona tkanka nerwowa. Ta zależność kierunkowa znana jest jako anizotropia i mierzy się ją w różnych kierunkach, a średnia uzyskanych pomiarów określa tensor dyfuzji – obiekt matematyczny, który w pełni opisuje zależność dyfuzji od

jej orientacji. Gdy znany jest tensor dyfuzji, możliwe jest ilościowe określenie anizotropii. Porównanie wartości liczbowych uzyskanych w wyniku obrazowania tą metodą, takich jak np. anizotropia frakcjonowana (ang. *fractional anisotropy* – FA) czy rzeczywisty współczynnik dyfuzji (ang. *apparent diffusion coefficient* – ADC), pozwala uzyskać informację na temat mikrostruktury i integralności istoty białej w tkance nerwowej (41,51,54,55). Parametry ADC i FA dostarczają informacji na temat dyfuzji wody w przestrzeni pozakomórkowej. Wartości FA korelują z integralnością istoty białej, odzwierciedlając spójność, organizację i gęstość wiązek włókien w rdzeniu kręgowym, podczas gdy wartości ADC określają ilość dyfuzji wody w objętości tkanki (56).

Obecnie w medycynie człowieka DTI, wraz z rekonstrukcją włókien istoty białej (traktoografią), jest najczęściej wykorzystywane do planowania chirurgicznej resekcji zmian wewnątrzczaszkowych. Do oceny parametrów dyfuzji wykorzystuje się coraz nowocześniejsze, bardziej specjalistyczne i zautomatyzowane oprogramowanie (57–61).

Terapia uszkodzeń rdzenia kręgowego u ludzi i zwierząt

Aktualne zarządzanie urazami rdzenia kręgowego w medycynie człowieka

Obecne postępowanie w przypadku SCI u ludzi jest w dużej mierze zgodne z wytycznymi American Association of Neurological Surgeons (AANS) i Congress of Neurological Surgeons (CNS). Początkowa opieka nad pacjentem ma na celu przede wszystkim zabezpieczenie dróg oddechowych, oddychania i krążenia, a następnie wczesne rozpoznanie SCI i szybkie skierowanie do specjalistycznych ośrodków. Dla ograniczenia dalszego rozwoju uszkodzenia rdzenia zalecane jest unieruchomienie kręgosłupa u wszystkich pacjentów z podejrzeniem lub potwierdzeniem urazu (sztywny kołnierz szyjny, deska do transportu, itp.). Zaleca się unikanie

hipotensji ogólnoustrojowej (skurczowe ciśnienie krwi <90 mm Hg), choćby krótkotrwałej, ponieważ wiąże się ona z gorszymi długoterminowymi wynikami neurologicznymi (62–68).

Według powyższych zaleceń konieczna jest wczesna lokalizacja i klasyfikacja uszkodzeń w układzie kostno-stawowym i nerwowym. Tomografia komputerowa (CT) zalecana jest u wszystkich pacjentów z podejrzeniem SCI. Rola rezonansu magnetycznego (MRI) we wstępnej ocenie pacjentów pozostaje niejasna, jednak zdecydowanie zaleca się wykonanie badania MR w trybie pilnym, szczególnie w przypadkach niewyjaśnionych deficytów neurologicznych (69–73).

Równocześnie z badaniami diagnostycznymi, chorzy powinni być hospitalizowani na oddziale intensywnej terapii, co gwarantuje możliwość ciągłego monitorowania układu oddechowego, serca i hemodynamiki (65,67,68,74). Zapewnienie skutecznej opieki nad chorymi z SCI wymaga współpracy wielu specjalistów różnych dziedzin medycyny.

Wczesna dekompresja chirurgiczna

Występujący w przebiegu SCI mechaniczny ucisk na rdzeń kręgowy może upośledzać przepływ krwi, powodując niedokrwienie i rozszerzenie strefy uszkodzenia tkanki nerwowej. Celem wczesnej dekompresji chirurgicznej po SCI jest zmniejszenie tego ucisku, co poprawia zaopatrzenie naczyniowe uszkodzonego obszaru i ogranicza strefę rozwinięcia wtórnego urazu. Znaczna część literatury przedklinicznej potwierdza pozytywny wpływ wczesnej dekompresji chirurgicznej na wyniki behawioralne i patologiczne pozyskane od zwierzęcych modeli SCI (75–77). W odniesieniu do dowodów klinicznych na ten temat, ostatnie badania wspierają koncepcję *Time is Spine*, która ma na celu podkreślić znaczenie wczesnej diagnozy i interwencji w celu poprawy długoterminowych wyników pacjentów po ostrych urazach rdzenia kręgowego (78).

Sterydoterapia w uszkodzeniach rdzenia kręgowego

W 2015 roku zakończono metaanalizę obejmującą 6 kluczowych badań randomizowanych i badań obserwacyjnych, w której stwierdzono, że pacjenci otrzymujący metyloprednizolon (ang. *methylprednisolone* – MPSS) w ciągu 8 godzin od urazu uzyskali o 4 punkty większą poprawę statusu neurologicznego, ocenianą wg skali motorycznej ASIA. Ta z pozoru niewielka korzyść może mieć ogromne implikacje czynnościowe dla pacjentów, jeżeli pozwoli na odzyskanie siły dłoni i stóp (79). W związku z tym w wytycznych AO Spine, opracowanych przez międzynarodowy panel ekspertów, sugeruje się rozważenie 24-godzinnego dożylnego podawania MPSS w ciągu 8 godzin od wystąpienia urazu, jeśli u danego pacjenta nie występują istotne przeciwwskazania medyczne (80). Należy jednak zachować ostrożność przy interpretacji wyników opisanego metaanalizy, w której opisano także możliwość wystąpienia wieloogniskowych komplikacji u tych pacjentów, u których zastosowano terapię MPSS, m.in. zapalenie płuc (79).

Podwyższenie ciśnienia krwi i tlenoterapia

Podwyższenie ciśnienia krwi stało się realną strategią neuroprotekcji zagrożonych tkanek poprzez dążenie do zwiększenia ich perfuzji. Aktualne wytyczne zalecają utrzymanie średniego ciśnienia tętniczego na poziomie (MAP) ≥ 85 do 90 mm Hg przez 7 dni po urazie, ponieważ stwierdzono, że przyczynia się to do poprawy długoterminowych wyników leczenia pacjentów (67,74).

Równie istotna z punktu widzenia neuroprotekcji, u osób z urazowymi uszkodzeniami rdzenia kręgowego, jest tlenoterapia, w tym przy użyciu tlenu hiperbarycznego (67,81). W przypadku zwierząt rzadziej mamy do czynienia z pourazowymi uszkodzeniami rdzenia kręgowego w takim rozumieniu jak w medycynie człowieka, a zdecydowana większość pacjentów z dyskopatią jest przytomna i w pełni wydolna oddechowo. Wyjątek stanowi popularna

obecnie grupa psów ras brachycefalicznych, u których z uwagi na uwarunkowania rasowe istnieje duże ryzyko nieprawidłowej wentylacji, a tym samym hipoksji. U tej grupy pacjentów, przy zdiagnozowaniu uszkodzenia rdzenia kręgowego, tlenoterapia w okresie hospitalizacji ma więc szczególne znaczenie neuroprotekcyjne (17,20).

Badania nad innymi możliwościami terapeutycznymi

Badania w zakresie neuroprotekcji

Obecnie trwają badania nad obiecującymi terapiami farmakologicznymi z wykorzystaniem czynników o właściwościach neuroprotekcyjnych, takich jak: ryluzol, magnez, minocykliny, GM-1 (gangliozyd typu 1/ monosialogangliozyd), czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik stymulujący kolonie granulocytów i czynnik wzrostu hepatocytów (11,82–88).

Z kolei wśród terapii nefarmakologicznych na uwagę zasługują hipotermia terapeutyczna i drenaż płynu mózgowo-rdzeniowego (86).

Badania w zakresie neuroregeneracji

Podczas gdy odpowiednio wczesne interwencje neuroprotekcyjne mogą przynieść ogromne korzyści w okresie ostrego urazu, większość pacjentów znajduje się w fazie przewlekłej, w której ewentualny dalszy powrót do zdrowia pozostaje ograniczony. W związku z tym za najbardziej obiecujące terapie neuroregeneracyjne, będące w fazie badań klinicznych lub translacyjnych, uznaje się (11,89,82,90–92):

- terapie farmakologiczne z wykorzystaniem inhibitora kinazy Rho-ROCK oraz przeciwciał anty-NOGO;
- terapie nefarmakologiczne: stymulacja rdzenia kręgowego;

- terapię komórkową z wykorzystaniem: neuronowych komórek macierzystych/prekursorowych, mezenchymalnych komórek macierzystych, komórek Schwanna oraz komórek opuszki węchowej.

Przyszłe kierunki badań

Kolejne istotne zmiany w postępowaniu z pacjentami z SCI będą prawdopodobnie wynikiem badań dostosowujących się do różnorodności urazów. Uznaje się, że największy wpływ na długotrwały powrót do zdrowia będą miały zmodyfikowane badania ukierunkowane na ocenę subpopulacji chorych z SCI (93,94).

Nowe kierunki powinny obejmować zawężenie okna włączenia do badań, aby bardziej sprecyzować rodzaje i ciężkość urazów rdzenia oraz ustalić obiektywne biomarkery do oceny ciężkości urazu i bardziej precyzyjnego przewidywania wyników neurologicznych. Biomarkery te są obecnie badane pod kątem mikro RNA (miRNA), czyli krótkich niekodujących segmentów RNA, które umożliwiają regulację potranskrypcyjnej ekspresji genów. Biomarkery dostarczają ważnych danych, mogących pomóc zidentyfikować podgrupy w ramach heterogenicznej populacji chorych z SCI, co w połączeniu z badaniami klinicznymi pozwoli na kwalifikację pacjentów do badań celowych według ich specyficznej niszy patofizjologicznej (95,96).

Kolejna generacja badań będzie musiała dalej definiować subpopulacje chorych z urazami rdzenia w oparciu o kwantyfikowalne metody obrazowania, jak np. obrazowanie metodą tensora dyfuzji (DTI).

Postępowanie terapeutyczne w przebiegu przepukliny krążka międzykręgowego (IVDE) u psów

Leczenie IVDE może być prowadzone w sposób zachowawczy lub chirurgiczny. Postępowanie zachowawcze obejmuje ściśle ograniczanie aktywności zwierzęcia na minimum 2 tygodnie oraz odpowiednie zabezpieczenie przeciwbólowe. Natomiast postępowanie

chirurgiczne obejmuje dekompresję rdzenia kręgowego przez zabieg korpektomii brzusznej (ang. *ventral slot*) korpektomii bocznej, minihemilaminektomii (pedukulektomii), hemilaminektomię lub laminektomię z durotomią, jeżeli wypadnięciu materiału dyskowego towarzyszy rozległe krwawienie. Podjęcie decyzji o wyborze postępowania medycznego lub chirurgicznego zależy od wielu czynników. W przypadku psów z zachowaną motoryką świadomą leczenie zachowawcze w połączeniu z fizjoterapią jest dopuszczalne, ale należy wziąć pod uwagę ryzyko nawrotu. U młodych aktywnych psów z wieloma zmineralizowanymi dyskami, szczególnie w przypadkach nawrotów, należy rozważyć leczenie chirurgiczne. W przypadku postępujących nierozwiązanych objawów neurologicznych lub utrzymywania się bólu pomimo odpowiedniego postępowania zachowawczego sugerowane jest leczenie chirurgiczne. W przypadku nagłego paraliżu (plegii), zwłaszcza z utratą czucia bólu głębokiego, szybki proces diagnostyczny i obiektywna ocena rokowania są szczególnie ważne przy podejmowaniu decyzji o dalszym postępowaniu z pacjentem (16,17,20,26,28,97–100). We wszystkich tych przypadkach kluczowe znaczenie ma odpowiednia diagnostyka obrazowa, a w sytuacjach niejednoznacznych zastosowanie zaawansowanego obrazowania dostępnego w nowoczesnych skanerach rezonansu magnetycznego w formie sekwencji specjalistycznych (33).

Badania metodą tensora dyfuzji na modelach zwierzęcych

Badania na zwierzęcych modelach doświadczalnych, z wykorzystaniem techniki tensora dyfuzji do oceny rdzenia kręgowego, są ograniczone. Najczęściej w literaturze pojawia się szczurzy model zarówno nienaruszonego, jak i eksperymentalnie uszkodzonego rdzenia kręgowego (43,47,50,101,102). Niektóre badania opisują psy dotknięte przepukliną krążka międzykręgowego (ang. *intervertebral disc herniation/extrusion* – IVDH/IVDE) jako duży zwierzęcy model SCI (najczęściej są to jamniki i psy ras mieszanych), podczas gdy inne wykorzystują

zdrowe psy rasy beagle jako model nieuszkodzonego rdzenia kręgowego (103–107). W jednej z publikacji opisano zastosowanie techniki DTI do oceny niezmiennego rdzenia kręgowego u 13 psów różnych ras w dwóch lokalizacjach (szyjnej i piersiowo-lędźwiowej) (108).

Świnia jako model eksperymentalny w badaniach translacyjnych

Świnia jest bardzo dobrze znanym zwierzęcym modelem doświadczalnym wykorzystywanym w medycynie translacyjnej, także jako model eksperymentalnego uszkodzenia rdzenia kręgowego. Równie często spotykana jest jako model doświadczalny do oceny skuteczności różnego rodzaju terapii urazów rdzenia kręgowego (109–112).

W naszym badaniu zdecydowaliśmy się na wykorzystanie modelu dużego zwierzęcia, tj. świni domowej bez uszkodzenia rdzenia, jako organizmu modelowego. Zdecydowały o tym szybki przyrost masy ciała, odpowiednio zbliżona do ludzi rosnących wielkość rdzenia oraz anatomiczne i fizjologiczne podobieństwo do człowieka (113). Uwzględniliśmy w analizie zarówno wagę, jak i wiek badanych świń, aby lepiej zobrazować szybki czas wzrostu wybranego modelu zwierzęcego. Cechy te umożliwiają szybkie pozyskanie wiarygodnych wyników, tworząc doskonały model do badań translacyjnych w dziedzinie medycyny weterynaryjnej i człowieka. Co więcej, rozmiar tego modelu zwierzęcego pozwala na wykorzystanie tych samych narzędzi do obrazowania, tj. skanerów, oprogramowania i metod interpretacji obrazu, stosowanych w codziennej praktyce klinicznej. Pomimo wymienionych zalet, nie ma doniesień na temat wykorzystania tych zwierząt jako modelu dla nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego, co stanowi o wartości i istotności naszych badań. Uzyskane w ten sposób wyniki łatwiej ekstrapolować do medycyny człowieka, niż gdyby zostały pozyskane w trakcie badań na gryzoniach. Jednocześnie badania na laboratoryjnych modelach doświadczalnych mają swoje ograniczenia.

Przed wszystkim wyniki te mogą nie w pełni odzwierciedlać problemy zdrowotne, które dotyczą zwierzęta towarzyszące i ludzi.

Obecnie zwierzęce modele doświadczalne wykorzystywane są w badaniach nad nowymi metodami leczenia SCI, a przeprowadzający je badacze uzyskują obiecujące wyniki (109,114–116). Paradygmaty eksperymentalne zazwyczaj obejmują jednak bardzo kontrolowane warunki urazu i powrotu do zdrowia. Trudno jest w warunkach badawczych odtworzyć naturalne sytuacje, które występują w ostrym stanie SCI u ludzi. Dlatego tak ważna jest optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych i poszukiwanie obiektywnych metod oceniających stopień uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz jego regenerację po zastosowanym leczeniu, aby tym samym ułatwić ekstrapolowanie pozyskanych wyników do medycyny człowieka i zwiększyć ich faktyczną wartość.

Uzasadnienie wyboru tematyki podjętych badań

Wiele doniesień opisuje wartości DTI u zdrowych osób (zarówno dzieci, jak i dorosłych) z nieuszkodzonym rdzeniem kręgowym, oceniając wpływ różnych czynników, takich jak wiek i region rdzenia, na zachowanie parametrów tensora dyfuzji. Uzyskane wyniki nadal nie są jednak tak jednoznaczne i dobrze opisane, gdy porówna się je z obrazowaniem mózgowia tą metodą. Pochodzą również z bardzo zróżnicowanych populacji, więc określenie uniwersalnego punktu odniesienia na tej podstawie jest utrudnione (117–121).

W związku z powyższymi aspektami istnieje potrzeba określenia wartości referencyjnych parametrów DTI nieuszkodzonego rdzenia kręgowego, które mogłyby zostać następnie bezpośrednio wykorzystane do porównania z uzyskanymi na świńskim translacyjnym modelu SCI.

DTI, w przeciwieństwie do standardowych sekwencji badania MR, pozwala na bardziej obiektywną ocenę stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego lub jego regeneracji po zastosowanym leczeniu. Mimo tych obiecujących założeń nie znaleźliśmy w dostępnej literaturze doniesień o jej wcześniejszym zastosowaniu na świńskim modelu doświadczalnym nieuszkodzonego rdzenia kręgowego.

Jak wyjaśniono, DTI jest bardzo obiecującą metodą, jednak dość rzadko stosowaną w implikacjach klinicznych do oceny rdzenia kręgowego. Uzyskanie obiektywnych wartości referencyjnych jest zatem niezbędne do wiarygodnego przełożenia wyników uzyskanych w badaniach translacyjnych, na faktyczne kliniczne zastosowania u pacjentów z SCI.

Konieczne jest lepsze zrozumienie techniki DTI i zmiennych, które mogą wpływać na zachowanie parametrów tensora dyfuzji w rdzeniu kręgowym. Naszym zdaniem bez wartości referencyjnych i bez zrozumienia wpływu czynników, takich jak np. proces wzrostu, niemożliwa jest obiektywna ocena rdzenia kręgowego za pomocą tej zaawansowanej techniki MRI.

Pomimo fantastycznego postępu w neuroobrazowaniu i jej wzrastającej dostępności w medycynie weterynaryjnej, ogólne zasady oceny i diagnostyki uszkodzeń rdzenia kręgowego nie zmieniły się tak bardzo jak technologia.

Szczególnie wartość prognostyczna uzyskanych obrazów pozostaje niejasna, podczas gdy oczekiwania dotyczące tego aspektu pozostają wysokie. Badacze nadal poszukują unikalnego badania, które znajdzie oczywisty związek między zmianami morfologicznymi/morfometrycznymi i specyficzną rozpoznania, co pozwoli jasno określić informacje prognostyczne, mające bardziej ogólne zastosowanie w szerszej populacji pacjentów. Sprzeczne wyniki w literaturze, nieuniknione różnice populacyjne i metodologiczne między badaniami oraz dostrzegalne trudności w pomiarze wielu zmiennych są jednak znaczącą przeszkodą w dokonaniu

kolejnego milowego kroku w diagnostyce i leczeniu uszkodzeń rdzenia kręgowego. Nadal istnieje luka między tym, co mogą zaoferować badania obrazowe, a tym, co oferuje klinicyście połączenie wywiadu, objawów klinicznych, badania neurologicznego i wyników innych badań – w tym obrazowania.

Mimo dobrej znajomości podstaw działania metody DTI, jest ona rzadko wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej do oceny dynamiki zmian rdzenia kręgowego w przebiegu jego uszkodzenia u pacjentów weterynaryjnych. Wydaje się jednak, że jej zastosowanie mogłoby znieść ograniczenia towarzyszące standardowym metodom obrazowania opisywanym we wcześniejszej części monografii oraz ułatwiłoby ocenę tak istotnego dla pacjenta rokowania przed i po zastosowanym leczeniu. W związku z powyższymi aspektami postanowiliśmy włączyć sekwencję DTI do standardowego protokołu obrazowego kręgosłupa, aby poszerzyć nasze możliwości diagnostyczne i zweryfikować jej faktyczną przydatność kliniczną.

Cel pracy

Celem pracy była nieinwazyjna ocena dynamiki zmian mikrostruktury rdzenia kręgowego przy użyciu zaawansowanej techniki obrazowania rezonansem magnetycznym – tensora dyfuzji (DTI) – na dwóch modelach zwierzęcych:

- a) nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego na modelu świni domowej;
- b) uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa z chorobą kompresyjną rdzenia kręgowego w przebiegu spontanicznej przepukliny krążka międzykręgowego, przed oraz po zastosowanym leczeniu chirurgicznym.

Szczegółowe cele badawcze

1. Ocena zmian poszczególnych parametrów tensora dyfuzji uzyskanych w procesie wzrostu na modelu świni (w zależności od wieku i masy ciała).
2. Zbadanie dynamiki zmian rdzenia kręgowego w obrazowaniu tensora dyfuzji na różnych kluczowych odcinkach rdzenia kręgowego.
3. Tworzenie i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych poprzez określenie wartości referencyjnych parametrów DTI dla świń z nieuszkodzonym rdzeniem kręgowym. Uzyskanie obiektywnych wartości referencyjnych jako niezbędny punkt odniesienia dla tych pozyskanych od pacjentów z urazami rdzenia kręgowego.
4. Ocena dynamiki zmian poszczególnych parametrów DTI u psów ze zdiagnozowaną kompresją rdzenia kręgowego wywołaną przepukliną krążka międzykręgowego, przed i po zabiegu chirurgicznej dekompresji.
5. Ocena przydatności metody DTI jako uzupełnienia diagnostyki i oceny skuteczności leczenia operacyjnego uszkodzeń rdzenia kręgowego w przebiegu przepukliny krążka międzykręgowego u psów.

Pierwsza część pracy dotycząca badania na nieuszkodzonym, rosnącym rdzeniu kręgowym na modelu świni została opublikowana i przedstawiona w załączeniu do niniejszej monografii.

Materiały i metody

Badanie dynamiki nieuszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu świni

Charakterystyka modelu – nieuszkodzonego rdzenia kręgowego

W badaniu wzięty udział prosięta rasy polskiej białej o początkowej zbliżonej masie ciała ok. 15-20 kg. Dokładna data urodzenia zwierząt nie była znana, ponieważ pochodziły one z fermy hodowlanej. Wiek zwierząt został oszacowany na podstawie wiedzy o typowym wieku odsadzenia zwierząt tej rasy i czasu ich obserwacji w badaniu. Badania były realizowane na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej (LKE) we Wrocławiu (nr 87/2017). Aby zagwarantować ochronę i dobrostan zwierząt biorących udział w badaniu, zastosowano zasadę 3R (ang. *replacement, reduction, and refinement*) – zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (122,123).

Każde zwierzę miało co najmniej dwa tygodnie na spokojną aklimatyzację przed rozpoczęciem badań. W tym czasie prowadzono codzienną obserwację zwierząt pod kątem ich stanu klinicznego. Zwierzęta były przyzwyczajane do kontaktu z pracownikami w celu ograniczenia czynników stresogennych podczas badań. W okresie aklimatyzacji u żadnej ze świń nie zaobserwowano klinicznych objawów choroby.

Wszystkie zwierzęta były utrzymane zgodnie z warunkami środowiskowymi wyszczególnionymi we wniosku do LKE: w boksach o wymiarach 3 m × 1,70 m, z wysoką ściółką trocinową, aby zapewnić odpowiednie warunki do rozwoju i wzrostu, bez ograniczania przestrzeni motorycznej oraz z zapewnieniem optymalnych warunków do socjalizacji między zwierzętami przez cały okres obserwacji (**Rycina 3**).



Rycina 3 . Zdjęcie przedstawia warunki, w jakich utrzymywane były zwierzęta

Główną zaletą stosowania techniki tensora dyfuzji jest możliwość przyżyciowej oceny mikrostruktury tkanki nerwowej, a podstawą działania metody jest pomiar dyfuzji wody, która zachodzi wyłącznie w żywej tkance. W związku z tym konieczne było badanie na modelu zwierzęcym i nie istniała możliwość zastąpienia go badaniami *in vitro* na tkankach lub liniach komórkowych. Badanie MR-DTI jest procedurą nieinwazyjną, a jego wartości zostały pozyskane z kontrolnych badań MRI wykonanych w ramach projektu badawczego na podstawie zgody LKE (87/2017). Liczba zwierząt zakwalifikowanych do badania została oszacowana, aby zapewnić wiarygodność i ważność uzyskanych wyników. Badania MR-DTI przeprowadzono w latach 2017-2020, a analiza danych pozyskanych w obrazowaniu techniką tensora dyfuzji odbywała się retrospektywnie.

Analizie poddano łącznie wyniki obrazowania MR-DTI od 19 zdrowych świń w wieku od 2,5 do 11 miesięcy. Parametry DTI pozyskano od zwierząt w trzech grupach wagowych: do 29 kg ($n = 5$), 30-59 kg ($n = 6$) i od 60 kg w górę ($n = 8$).

Badanie MR-DTI przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym. W każdym przypadku przed badaniem oceniano stan kliniczny zwierzęcia. Zastosowano premedykację domięśniową metomidyną (Cepetor[®], CP-Pharma, Burgdorf, Niemcy) w dawce 20 µg/kg oraz midazolamem (Midazolam Accord[®], Accord Healthcare, Devon, Wielka Brytania) w dawce 0,02 mg/kg. Po uspokojeniu zwierzęcia i uzyskaniu dostępu dożylnego przeprowadzono indukcję znieczulenia ogólnego przy użyciu propofolu (Propofol Lipuro[®], B Braun, Melsungen AG, Melsungen, Niemcy) w dawce od 2 do 5 mg/kg, w zależności od stopnia sedacji i zniesienia odruchu krtańniowego. Po indukcji i zastosowaniu dodatkowego znieczulenia miejscowego krtani za pomocą lidokainy w sprayu (Lidocain-Egis[®], 10% roztwór, EGIS, Warszawa, Polska), a zwierzę zostało zaintubowane. Znieczulenie kontynuowano w pomieszczeniu z rezonansem przy użyciu specjalnego urządzenia do znieczulenia inhalacyjnego dostosowanego do pracy w polu magnetycznym (Philips, Dameca MRI 508, Eindhoven, Holandia). Znieczulenie wziewne przeprowadzono przy użyciu izofluranu (przepływ 1,2-3,0 Vol.%). Dodatkowe wsparcie przeciwbólowe nie było konieczne podczas obrazowania zgodnie z procedurami zatwierdzonymi przez Lokalną Komisję Etyczną we Wrocławiu. Stałe monitorowanie parametrów życiowych – częstości akcji serca (ang. *heart rate* – HR), saturacji, kapnografii, wdechowego i wydechowego poziomu dwutlenku węgla (PeCO₂, EtCO₂) oraz częstotliwości oddechów (ang. *respiratory rate* – RR) – było prowadzone podczas badania przy użyciu monitora pracy serca (Philips, Invivo Monitor, Expression MR400, Eindhoven, Holandia). Po badaniu każde zwierzę było obserwowane do momentu całkowitego wybudzenia.

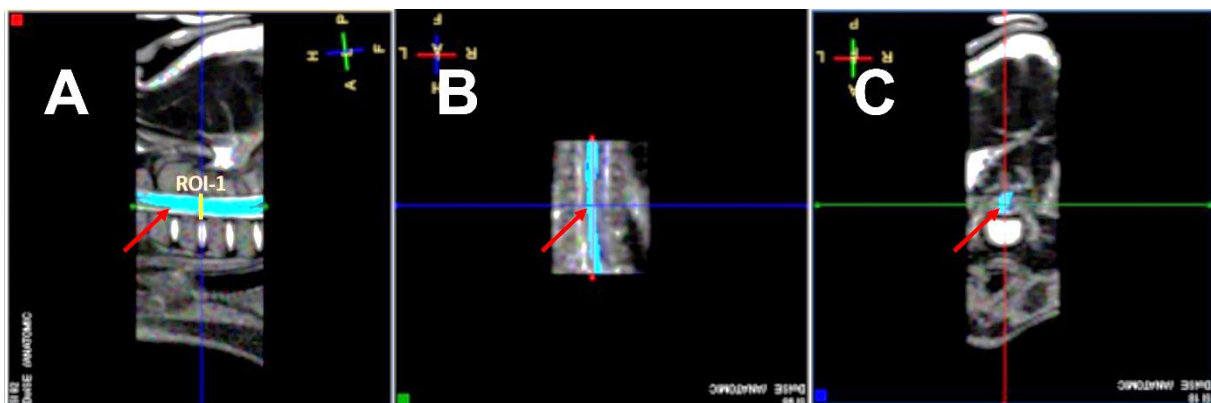
Badania MR wykonano rezonansem magnetycznym, o indukcji pola 1,5 Tesla (1,5T) (Philips, Ingenia) i maksymalnej sile gradientu 33 mT/m, przy użyciu szesnastokanałowej cewki przeznaczonej do obrazowania głowy i kręgosłupa. Protokół badania MR składał się z sekwencji T2-zależnej w płaszczyźnie strzałkowej, obejmującej przedni – czas powtarzania/czas echa, (ang. *time repetition/time echo*) TR/TE 3698/110 ms – i tylny odcinek kręgosłupa – TR/TE 3698/120 – oraz z trzech sekwencji DTI w płaszczyźnie poprzecznej.

Akwizycja DTI opierała się na obrazowaniu echo-płenarnym (ang. *single-shot spin-echo*, SE/EPI) z następującymi ustawieniami parametrów sekwencji dla poszczególnych odcinków:

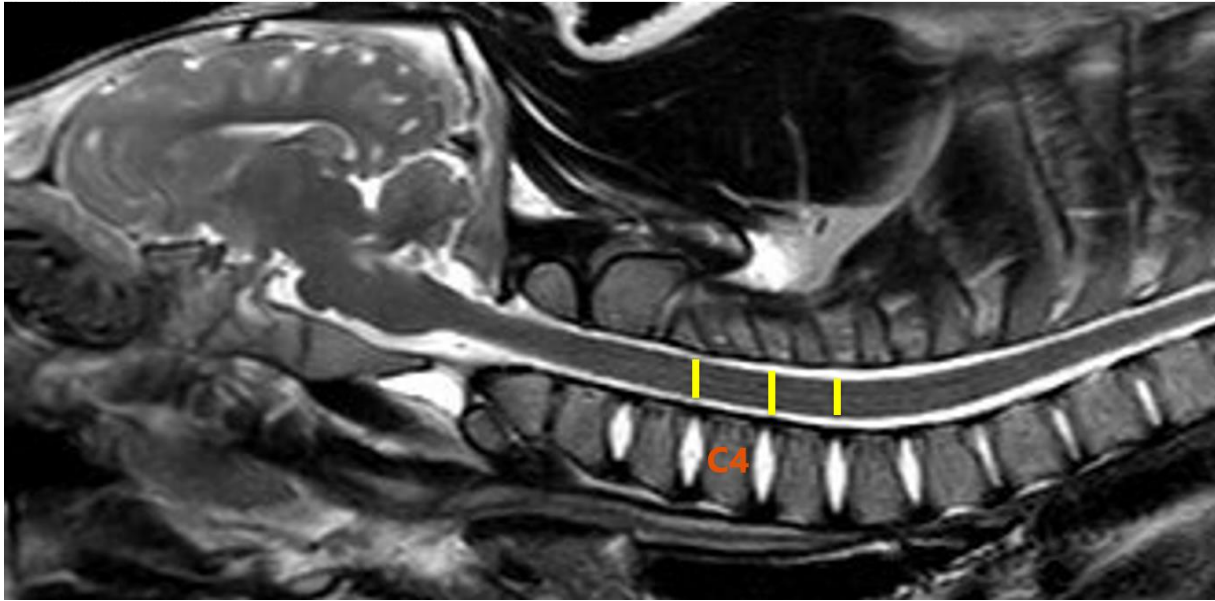
- odcinek szyjny (TR/TE 5599/118 ms, pole widzenia 160 × 160 mm, matryca 108 × 105 × 46 warstw, woksel 1,5 × 1,5 mm z warstwami osiowymi o grubości 3 mm);
- odcinek piersiowo-lędźwiowy (TR/TE 10150/118 ms, pole widzenia 180 × 180 mm, matryca 120 × 118 × 80 warstw, woksel 1,5 × 1,5 mm z warstwami osiowymi o grubości 3 mm);
- odcinek lędźwiowy (TR/TE 6680/118 ms, pole widzenia 160 × 160 mm, matryca 108 × 105 × 54 warstw, woksel 1,5 × 1,5 mm z warstwami osiowymi o grubości 3 mm).

Pomiaru prędkości dyfuzji dokonano ze średnią rozdzielczością kierunkową, tj. w 15 kierunkach dyfuzji. Współczynnik SENSE ustawiono w zakresie od 1,5 do 3,0 (124). Parametry sekwencji DTI zostały dobrane tak, aby można było uzyskać wiarygodne wartości do analizy bez wydłużania czasu znieczulenia badanych zwierząt.

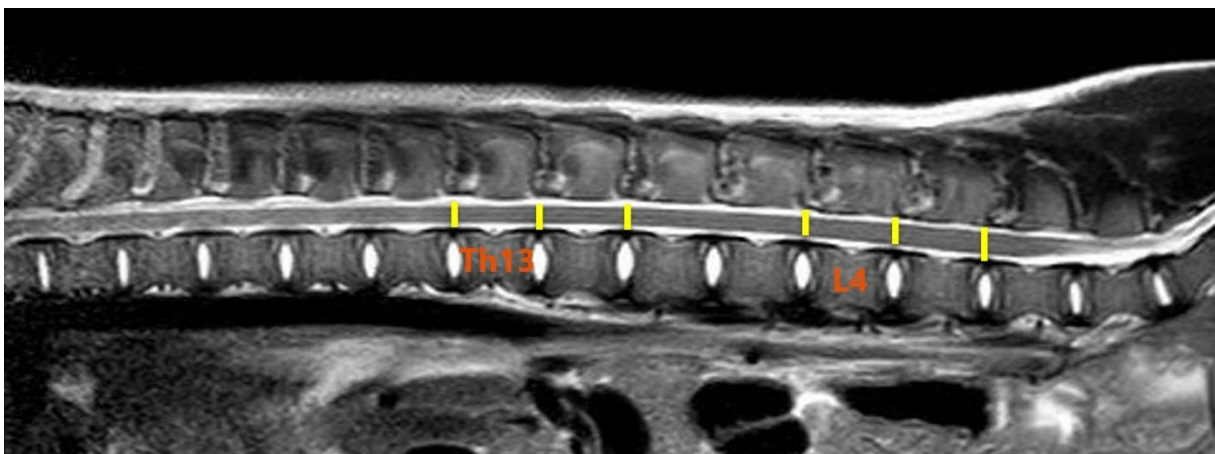
Analizę danych pozyskanych w obrazowaniu tensora dyfuzji przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Philips DTI Fiber Track Software 2013 (**Rycina 4**). Pomiary przeprowadzono w trzech odcinkach: szyjnym, piersiowo-lędźwiowym i lędźwiowym rdzenia kręgowego – dokładnie na wysokości przestrzeni międzykręgowych C4/C5, Th13/L1 i L4/L5 – oraz w każdym przypadku jeden segment w kierunku doczaszkowym i jeden segment w kierunku doogonowym (**Rycina 5**, **Rycina 6**). Punkty, z których pozyskano dane DTI na przebiegu rdzenia kręgowego, zostały wybrane tak, aby reprezentowały miejsca najbardziej podatne na spontaniczne uszkodzenia rdzenia kręgowego.



Rycina 4. Analiza obrazów pozyskanych techniką tensora dyfuzji (Philips DTI Fiber Track Software 2013). Lokalizacja pierwszego rejonu zainteresowania (ang. region of interest, ROI1) w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego. A – płaszczyzna strzałkowa, B – płaszczyzna dogrzebietowa, C – płaszczyzna poprzeczna. Czerwona strzałka wskazuje rekonstrukcję włókien istoty białej (traktografię) w poszczególnych płaszczyznach A-C.



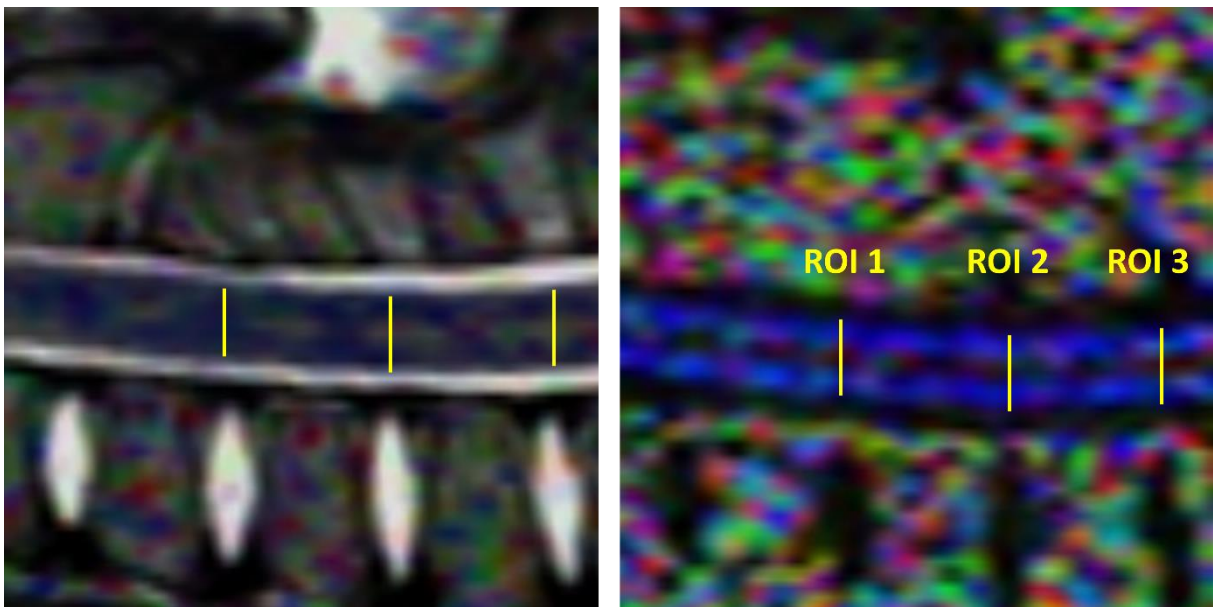
Rycina 5. Sposób lokalizacji obszarów zainteresowania (ROIs) w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego (żółte linie). Badanie kręgosłupa szyjnego wykonane 1,5T skanerem MR (Philips, Ingenia) w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej u świni z grupy badawczej. Czwarty kręg szyjny jako anatomiczny punkt odniesienia (C4).



Rycina 6. Sposób lokalizacji obszarów zainteresowania (ROIs) w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego (żółte linie). Badanie kręgosłupa piersiowo-lędźwiowego wykonane 1,5T skanerem MR (Philips, Ingenia) w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej u świni z grupy badawczej. Trzynasty kręg piersiowy (Th13) oraz czwarty kręg lędźwiowy (L4) jako anatomiczne punkty odniesienia.

Jako anatomiczny punkt odniesienia wykorzystano referencyjne strzałkowe obrazy wykonane w sekwencji T2-zależnej dla każdego ocenianego odcinka rdzenia kręgowego. Rekonstrukcję szlaków istoty białej (traktografię) przeprowadzono poprzez manualnie naniesione obszaru zainteresowania (w kształcie liniowym) dla trzech poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego. Parametry ADC i FA zostały zmierzone na mapach ADC i FA zgodnie z ręcznym

umieszczeniem dziewięciu wyżej wymienionych obszarów zainteresowania (ang. *regions of interest* – ROIs) w środku rdzenia kręgowego, w płaszczyźnie strzałkowej, centralnie w środku rdzenia kręgowego i na poziomie przestrzeni międzykręgowych. Wszystkie ROIs były podobnej wielkości (długości). Zadbano o prawidłowe umiejscowienie każdego ROI, wykorzystując obrazy strukturalne jako anatomiczny punkt odniesienia, aby uniknąć efektu częściowej objętości związanego z bliską obecnością płynu mózgowo-rdzeniowego i struktur kostnych (**Rycina 7**) (124). Parametry FA i ADC zostały obliczone i uśrednione dla wybranych wokseli dla każdego wyżej wspomnianego ROI.



Rycina 7. Obraz badania MR w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (strona lewa), i mapę FA (strona prawa) szyjnego odcinka rdzenia kręgowego, pokazujący rozmieszczenie ROIs w tym odcinku. W pozostałych segmentach rdzenia wartości DTI pozyskiwane były w sposób analogiczny.

Analiza statystyczna

Zebrane wartości tensora dyfuzji (FA i ADC) poddano analizie statystycznej. Testowanie normalności rozkładu uzyskanych danych przeprowadzono za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka.

W celu oceny zależności pomiędzy wiekiem, masą ciała, a wartościami FA i ADC (dla każdego z 9 ROIs) zastosowano regresję liniową w celu wyznaczenia współczynnika korelacji Pearsona wraz z testowaniem jego istotności statystycznej.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ang. *one-way analysis of variance – one-way ANOVA*) została wykorzystana do porównania różnic między średnimi wartościami FA i ADC między dziewięcioma ROIs dla poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego. W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej o równości wszystkich średnich, zaplanowano zastosowanie testu post hoc porównań krzyżowych metodą Tukeya (ang. *highest significant difference Turkey test – HSD Turkey test*).

Badanie dynamiki spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa

Charakterystyka modelu –uszkodzonego rdzenia kręgowego

Ta część badania została przeprowadzona jako prospektywne badanie kliniczne na psach, które zostały skierowane na konsultację neurologiczną w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w latach 2018-2020. Badania MRI zostały wykonane w Centrum Diagnostyki Eksperymentalnej i Innowacyjnych Technologii Biomedycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Badana populacja składała się z dziewięciu psów w wieku od 3,5 do 10 lat (średnia 6,5, mediana 7), o wadze od 5 do 18 kg (średnia 8,9, mediana 6,8) ze zdiagnozowaną ekstruzją krążka międzykręgowego (IVDE), skierowanych do chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego na podstawie oceny neurologicznej i wyników neuroobrazowania (badanie MR i DTI) (**Tabela 1**).

Badanie nie wymagało zgody lokalnej komisji etycznej. Właściciele wyrazili świadomą pisemną zgodę na wykonanie badania MR po ocenie wskazań w badaniu klinicznym i neurologicznym. Badanie opierało się na obrazach i danych uzyskanych z badań klinicznych. Wszystkie zwierzęta były psami należącymi do klientów, a właściciele wyrazili zgodę na wykorzystanie wyników badań obrazowych ich zwierząt w tym badaniu.

Wszystkie zwierzęta zostały poddane badaniu klinicznemu i miały udokumentowane lub wykonane badania krwi (pełne badanie morfologiczne i biochemiczne), w celu ich kwalifikacji do znieczulenia ogólnego do badania MR i późniejszego zabiegu chirurgicznego. Badanie neurologiczne obejmowało ocenę: świadomości i zachowania, postawy, chodu, występowania nieprawidłowych ruchów mimowolnych podczas wizyty, reakcji postawy i postury (w tym pozycjonowanie proprioceptywne, podskakiwanie, połowiczne skakanie), ocenę nerwów czaszkowych, odruchów rdzeniowych (odrzuch zginaczy, odrzuch rzepekowy, odrzuch piszczelowy do czaszkowy, odrzuch prostownika promieniowego nadgarstka, odrzuch kroczy, odrzuch mięśnia podskórnego), badanie palpacyjne głowy, szyi i rdzenia kręgowego. Stan neurologiczny zwierząt oceniano za pomocą zmodyfikowanej skali Frankela (ang. *Modified Frankel Scale* – MSF) (26). Po badaniu neurologicznym zwierzęta kierowano na badanie MRI. Wskazania do zabiegu chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego zostały ocenione na podstawie wyników badań neurologicznych i neuroobrazowych przez dyplomowanego specjalistę Europejskiego Koledżu Neurologii Weterynaryjnej (MW). U zwierząt, u których zdiagnozowano IVDE w odcinku szyjnym, przeprowadzono operację odbarczenia rdzenia kręgowego metodą korpektomii brzusznej (ang. *ventral slot*). U psów, u których zdiagnozowano IVDE w odcinku piersiowo-lędźwiowym, przeprowadzono zabieg hemilaminektomii. Kontrolę neurologiczną z neuroobrazowaniem (MRI i DTI) wykonano dziesięć do czternastu dni po zabiegu dekompresji podczas rutynowej kontroli pooperacyjnej.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej (IVDE – ekstruzja krążka międzykręgowego, MSF – zmodyfikowana skala Frankela)

Pies	Wiek [lata]	Waga [kg]	Rasa	Czas od początku objawów do rozpoznania [tygodnie]	IVDE	Objawy neurologiczne	MFS
1	7	18	cocker spaniel	4	C2/C3	Bolesność szyi, sztywność karku, ventro-flexia, usztywniony chód na wszystkie cztery kończyny, szeroka postawa	4 lub 5
2	8	8	jamnik	1	Th11/Th12	Kifoza w odc. piersiowym, nieprawidłowe reakcje propriocepcji w kończynach miednicznych, prawidłowe odruchy rdzeniowe w kończynach miednicznych, zatrzymanie oddawania moczu, niedowład nieambulatoryjny ze zdolnością do obciążania kończyn bez podparcia	3a
3	4	6	shih tzu	2	C2/C3	Wokalizacja podczas dotyku w okolicy szyi, nie reagująca na prowadzoną terapię przeciwbólową	5
4	8	5	jamnik	1 (6 dni)	L3/L4	Bolesność w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, wokalizacja, prawidłowe odruchy rdzeniowe, niezdolność kończyn miednicznych (ataksja)	4
5	4	13	bulldog francuski	1	L4/L5	Oslabione odruchy zginaczy w kończynach miednicznych, nieprzyjęcie moczu, parapareza bez możliwości obciążania kończyn – niedowład całkowity	3b
6	6	6	mieszaniec	1.5	C2/C3	Nawracające objawy bolesności kręgosłupa szyjnego	5
7	3.5	12	bulldog francuski	3	C3/C4	Bolesność szyi, ventroflexia, nieprawidłowe reakcje postawy we wszystkich kończynach, osłabione odruchy zginaczy w kończynach piersiowych, tetrapareza ambulatoryjna (ataksja)	4
8	8	5	yorkshire terrier	9	C5/C6	Bolesność szyi, postępujące problemy z poruszaniem się na wszystkie cztery kończyny, tetrapareza ambulatoryjna (ataksja)	4
9	10	6.8	yorkshire terrier	2	L2/L3	Nieambulatoryjny niedowład bez możliwości obciążania kończyn – niedowład całkowity	3b

Przebieg znieczulenia do badania MR

Badania MR przebiegało w znieczuleniu ogólnym i wykorzystano w nim podobny protokół dla wszystkich psów. Premedykację przeprowadzono za pomocą medetomidyny (Cepe-tor®, CP-Pharma, Burgdorf, Niemcy) w dawce 1-10 µg/kg i butorfanolu (Torbugesic®, Zoetis, Warszawa, Polska) w dawce 0,2-0,4 mg/kg podanych domięśniowo. Indukcję znieczulenia ogólnego przeprowadzono za pomocą propofolu (Propofol Lipuro® B Braun, Melsungen AG, Meldungen, Niemcy) w dawce 0,5-2 mg/kg dożylnie. Po indukcji i zastosowaniu dodatkowego znieczulenia miejscowego krtani za pomocą lidokainy w sprayu (Lidocain-Egis®, 10% roztwór, EGIS, Warszawa, Polska), a następnie zwierzę zostało zaintubowane. Zastosowano znieczulenie wziewne izofluranem. Ustawienia na parowniku wynosiły 2-3 Vol% podczas indukcji przy przepływie tlenu 60 ml/kg/min, natomiast po 5 minutach zmniejszono je do 1,5-2 Vol% w celu podtrzymania znieczulenia przy przepływie tlenu 20 ml/kg/min.

Stałe monitorowanie parametrów życiowych – tętna (HR), saturacji, kapnografii, wdechowego i wydechowego poziomu dwutlenku węgla (PeCO₂, EtCO₂) oraz częstotliwości oddechów (RR) – było prowadzone podczas badania przy urządzenia monitorującego (Philips, Invivo Monitor, Expression MR400, Eindhoven, Holandia). Po badaniu każde zwierzę było obserwowane do momentu całkowitego wybudzenia.

Badanie MR i protokół badania DTI

Badania MRI i DTI wykonano rezonansem magnetycznym o indukcji pola 1,5T (Philips, Ingenia) i maksymalnej sile gradientu 33 mT/m, przy użyciu szesnastokanałowej cewki przeznaczonej do obrazowania głowy i kręgosłupa.

Protokół diagnostyczny badania MR składał się z:

- sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (TR/TE 120/3698,1 ms);
- sekwencji T1-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (TR/TE 8,2/400 ms);
- sekwencji STIR, w płaszczyźnie strzałkowej (TR/TE 55/2000 ms);
- sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie poprzecznej (TR/TE 120/5149,6 ms);
- sekwencji T1-zależnej, w płaszczyźnie poprzecznej (TR/TE 10/593 ms);
- sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie dogrzebietowej (TR/TE 100/2000 ms).

Kontrolny protokół badania MR składał się z:

- sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (TR/TE 120/3698,1 ms)
- sekwencji T1-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (TR/TE 8,2/400 ms);
- sekwencji STIR, w płaszczyźnie strzałkowej (TR/TE 55/2000 ms);
- sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie poprzecznej (TR/TE 120/5149,6 ms).

Standardowy protokół diagnostyczny został uzupełniony o sekwencję DTI, w płaszczyźnie poprzecznej. Akwizycja DTI opierała się na obrazowaniu echo-płenarnym (SE/EPI) o następujących parametrach:

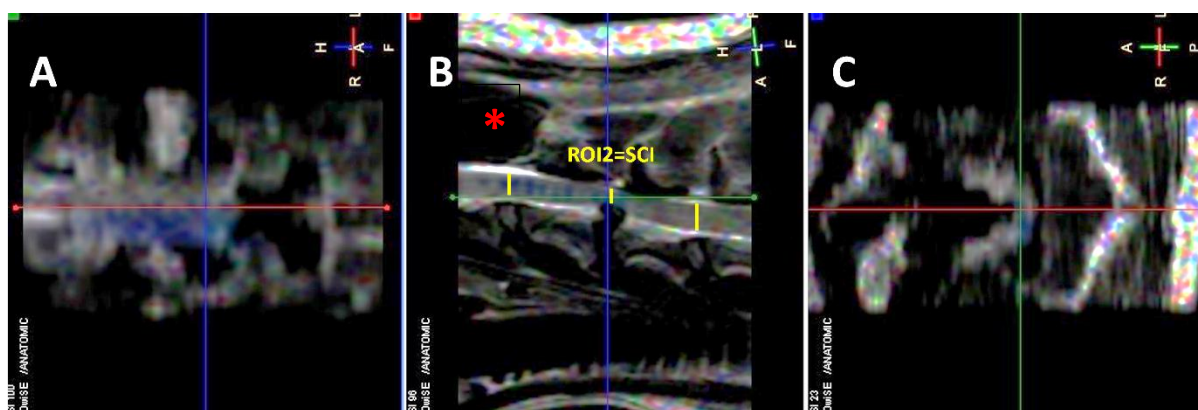
- w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego (TR/TE 118/5622,8 ms, pole widzenia 160 × 160 mm, matryca 108 × 105 × 46 warstw, woksel 1. 48 × 1,52 mm z warstwami osiowymi o grubości 1,5 mm);
- w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego (TR/TE 112/5293,2 ms, pole widzenia 160 × 160 mm, matryca 120 × 118 × 80 warstw, woksel 1,48 × 1,52 mm z warstwami osiowymi o grubości 1,5 mm).

Prędkość dyfuzji mierzono ze średnią rozdzielczością kierunkową, tj. w 15 kierunkach, ze współczynnikiem b wynoszącym 800. Współczynnik SENSE ustawiono w zakresie od 1,5 do 3,0

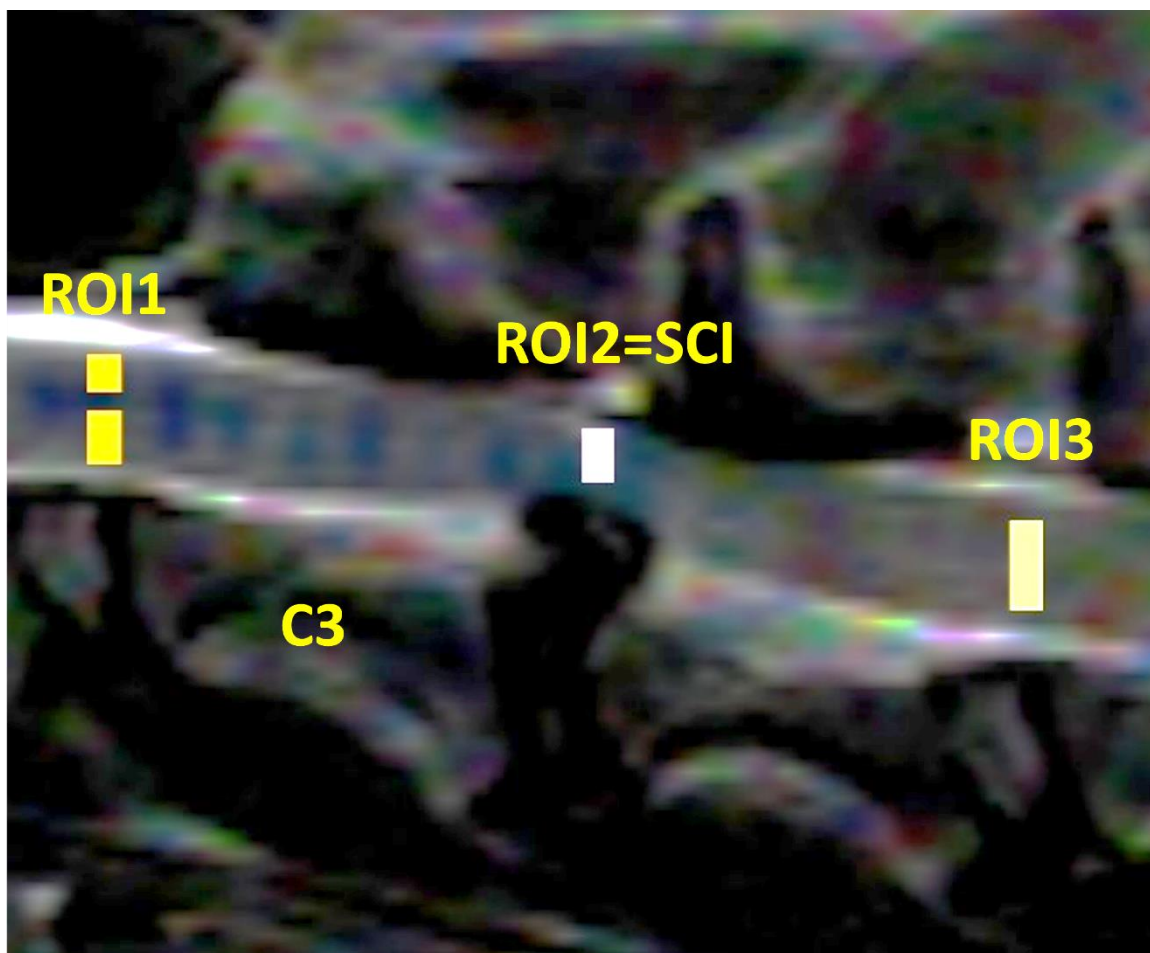
(124). Parametry sekwencji DTI zostały dobrane tak, aby uzyskać wiarygodne wartości do analizy bez znaczącego wydłużania czasu znieczulenia badanych zwierząt.

Opracowanie danych pozyskanych w obrazowaniu tensora dyfuzji

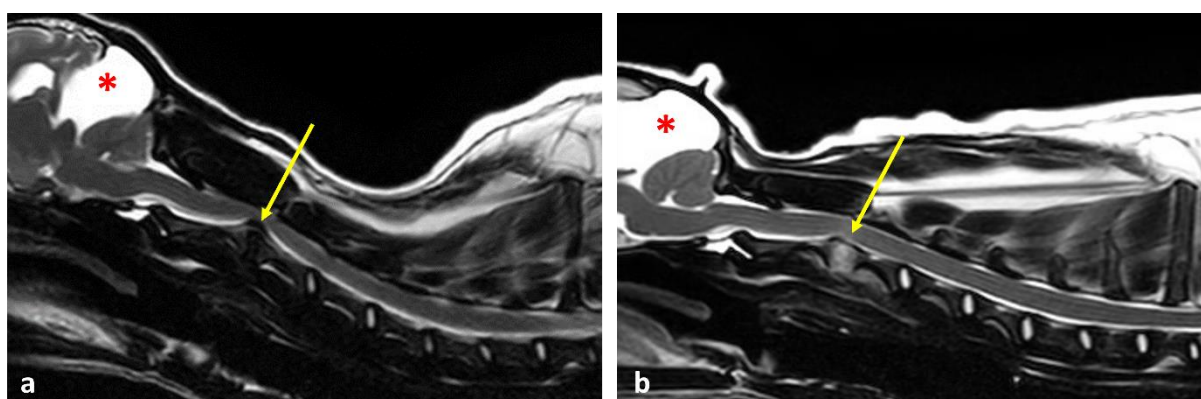
Analizę obrazów DTI przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Philips DTI Fiber Track Software 2013 (**Rycina 8, Rycina 9**). Dwa parametry DTI – anizotropia frakcjonowana (FA) i rzeczywisty współczynnik dyfuzji (ADC) – zostały pozyskane poprzez ręczne narysowanie obszarów zainteresowania (ROIs) w następujących obszarach: miejscu kompresji na rdzeń kręgowy (ROI2=SCI), jeden segment doczaszkowo (ROI1) i jeden segment doogonowo (ROI3) od uszkodzenia rdzenia kręgowego (SCI), bezpośrednio przed i 10-14 dni po zabiegu chirurgicznej dekompresji (**Rycina 10**).



Rycina 8. Analiza obrazów pozyskanych techniką tensora dyfuzji (Philips DTI Fiber Track Software 2013). Lokalizacja drugiego rejonu zainteresowania, tj. miejsca uszkodzenia rdzenia kręgowego (ROI2=SCI) w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego, u psa nr 7. Czerwona gwiazdka wskazuje wyrostek poprzeczny drugiego kręgu szyjnego (łac. axis – obrotnik), jako anatomiczny punkt odniesienia. A – płaszczyzna dogrzbietowa, B – płaszczyzna strzałkowa, C – płaszczyzna poprzeczna.



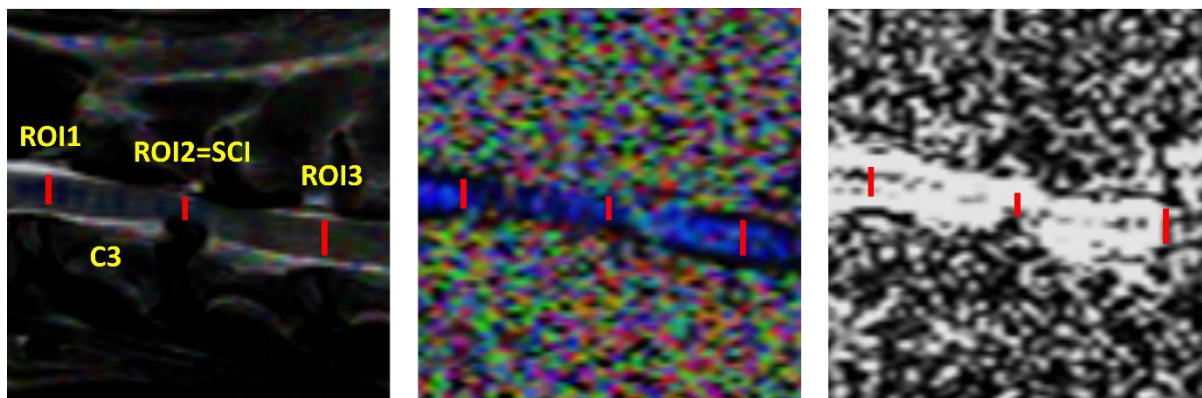
Rycina 9. Analiza obrazów pozyskanych techniką tensora dyfuzji kont. Rycina pokazuje dokładny sposób lokalizacji wszystkich trzech rejonów zainteresowania u psa nr 7, przed zabiegiem chirurgicznej dekompresji rdzenia przy użyciu mapy FA i sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej jako anatomicznego punktu odniesienia. C3 – trzon trzeciego kręgu szyjnego.



Rycina 10. A – Obraz badania MR kręgosłupa szyjnego wykonany w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej, u psa nr 3 przed zabiegiem chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego. Żółtą strzałką oznaczono drugi rejon zainteresowania, tj. miejsce kompresji/uszkodzenia rdzenia kręgowego (ROI2=SCI), w następstwie przepukliny (ekstruzji) krążka międzykręgowego C2/C3. Torbiel blaszki czworaczej mózgowia jako przypadkowa zmiana radiologiczna bez znaczenia klinicznego – oznaczona czerwoną gwiazdką. B – Kontrolny obraz badania MR kręgosłupa szyjnego wykonany w sekwencji T2-

zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej, u psa nr 3 po chirurgicznej dekompresji rdzenia. Miejsce po chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego metodą korpektomii brzusznej (ventral slot) oznaczono żółtą strzałką.

Podobnie jak w przypadku metodologii opracowanej na modelu świni, jako anatomiczny punkt odniesienia wykorzystano referencyjne strzałkowe obrazy wykonane w sekwencji T2-zależnej. Rekonstrukcja szlaków istoty białej (traktografia) została wykonana ręcznie poprzez narysowanie obszaru zainteresowania (w kształcie liniowym). Parametry ADC i FA zostały zmierzone na mapach ADC i FA zgodnie z ręcznym umieszczeniem obszarów zainteresowania (ROIs) w środku rdzenia kręgowego, w płaszczyźnie sagittalnej i na wysokości kolejnych przestrzeni międzykręgowych. Wszystkie ROIs były podobnej wielkości (długości). Zadbano o prawidłowe umiejscowienie każdego ROI, wykorzystując obrazy strukturalne jako anatomiczny punkt odniesienia (**Rycina 11**). Wartości parametrów FA i ADC zostały obliczone i uśrednione dla wybranych wokseli każdego z ROIs (124).



Rycina 11. Od lewej w kolejności: obraz badania MR w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej, oraz mapa FA i ADC szyjnego odcinka rdzenia kręgowego, obrazujące rozmieszczenie ROIs u psa nr 7 przed zabiegiem chirurgicznej dekompresji. C3 – trzon trzeciego kręgu szyjnego.

Analiza statystyczna

Zebrane wartości (FA i ADC) poddano analizie statystycznej. Testowanie normalności rozkładu uzyskanych danych przeprowadzono za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka.

W przypadku wartości spełniających założenia rozkładu normalnego ($p > 0,05$) do oceny różnic pomiędzy średnimi wartościami parametrów DTI przed i po leczeniu (odpowiednio dla ROI1, ROI2 i ROI3) wykorzystano test t-Studenta dla prób zależnych.

W przypadku wartości, które nie spełniały założeń rozkładu normalnego ($p < 0,05$), do oceny różnic pomiędzy wartościami parametrów DTI przed i po terapii (dla ROI1, ROI2 i ROI3) wykorzystano test Wilcoxon'a dla par obserwacji (ang. *Wilcoxon T-test*).

Dodatkowo, w celu porównania różnic w wartościach parametrów FA i ADC pomiędzy odpowiednio ROI1, ROI2 i ROI3 przed i po zabiegu dekompresji chirurgicznej, zastosowano:

- a) dla danych spełniających założenia rozkładu normalnego ($p > 0,05$) – jednoczynnikową analizę wariancji (ang. *one-way ANOVA*), a w przypadku odrzucenia hipotezy zerowej o równości wszystkich średnich planowano zastosowanie testu porównań krzyżowych post hoc metodą Tukey'a (ang. *HSD Turkey test*);
- b) dla danych niespełniających założeń rozkładu normalnego ($p < 0,05$) – ANOVA rang Kruskala-Wallisa, a w celu uwidocznienia różnic pomiędzy poszczególnymi ROIs zastosowano wielokrotne porównania średnich rang (wielokrotne testy U).

Do obliczeń statystycznych wykorzystano system oprogramowania do analizy danych Statistica 13.3. (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA, 2017), a wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Wyniki

Badanie dynamiki nieuszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu świni

Średnie wartości parametrów FA i ADC, uzyskane w trzech odcinkach rdzenia kręgowego, ze wszystkich obszarów zainteresowania (ROIs) przedstawiono w **Tabela 2**,

Tabela 3 i **Tabela 4** (dane DTI pozyskane przy użyciu programu Fiber Track).

Tabela 2. Średnie wartości anizotropii frakcjonowanej (FA) i rzeczywistego współczynnika dyfuzji (ADC) z poszczególnych ROIs w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego

Świnia	Wiek [miesiące]	Masa ciała [kg]	Odcinek szyjny					
			ROI1		ROI2		ROI3	
			FA C3/C4	ADC C3/C4	FA C4/C5	ADC C4/C5	FA C5/C6	ADC C5/C6
1	2,5	24	0,611	0,546	0,605	0,433	0,528	0,638
2	2,5	24	0,564	0,527	0,568	0,567	0,566	0,487
3	2,5	25	0,564	0,527	0,568	0,567	0,566	0,487
4	2,5	25	0,611	0,546	0,605	0,433	0,528	0,638
5	3	28	0,534	0,403	0,608	0,405	0,599	0,331
6	3	30	0,591	0,361	0,681	0,151	0,653	0,389
7	3	30	0,53	0,586	0,668	0,272	0,525	0,544
8	3	30	0,793	0,153	0,638	0,312	0,674	0,261
9	4	40						
10	4,5	48						
11	5	50	0,658	0,239	0,646	0,258	0,693	0,192
12	6	60						
13	6	60	0,623	0,375	0,563	0,428	0,565	0,545
14	6	60						
15	6	60	0,671	0,221	0,662	0,279	0,668	0,316
16	6	60	0,76	0,189	0,74	0,227	0,764	0,232

17	6,5	65	0,668	0,244	0,701	0,198	0,744	0,153
18	6,5	65	0,77	0,137	0,648	0,179	0,656	0,134
19	11	120	0,712	0,238	0,712	0,206	0,72	0,23

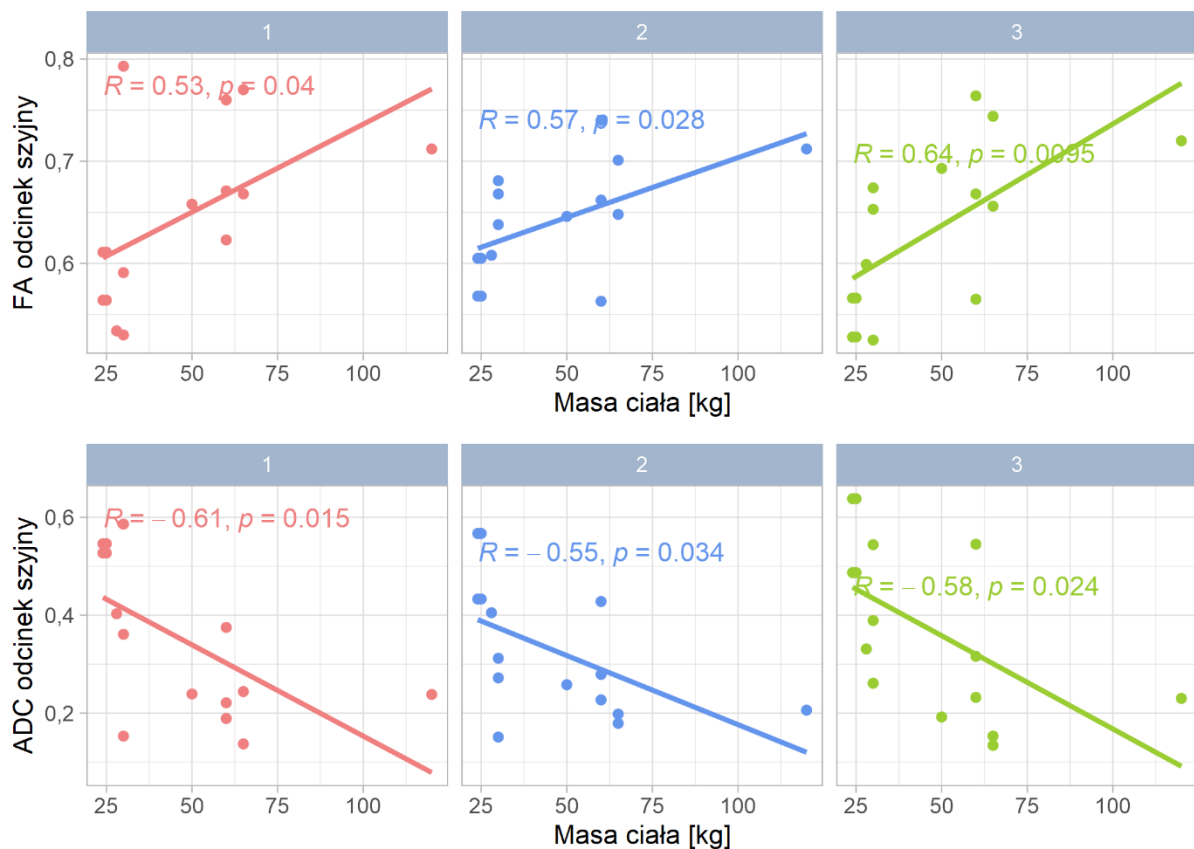
Tabela 3. Średnie wartości FA i ADC z poszczególnych ROIs w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego

Świnia	Wiek [miesiące]	Masa ciała [kg]	Odcinek piersiowo-lędźwiowy					
			ROI4		ROI5		ROI6	
			FA Th12/Th13	ADC Th12/Th13	FA Th13/L1	ADC Th13/L1	FA L1/L2	ADC L1/L2
1	2,5	24	0,606	0,502	0,581	0,526	0,645	0,417
2	2,5	24	0,66	0,41	0,634	0,44	0,546	0,645
3	2,5	25	0,66	0,41	0,634	0,44	0,546	0,645
4	2,5	25	0,606	0,502	0,581	0,526	0,645	0,417
5	3	28	0,566	0,342	0,597	0,374	0,597	0,393
6	3	30	0,565	0,485	0,621	0,446	0,561	0,468
7	3	30	0,718	0,238	0,603	0,382	0,468	0,643
8	3	30	0,594	0,471	0,619	0,354	0,632	0,519
9	4	40	0,592	0,478	0,624	0,344	0,548	0,618
10	4,5	48	0,706	0,239	0,626	0,41	0,615	0,46
11	5	50	0,553	0,463	0,59	0,395	0,622	0,403
12	6	60	0,736	0,175	0,743	0,175	0,659	0,273
13	6	60	0,629	0,248	0,592	0,41	0,642	0,307
14	6	60	0,623	0,33	0,647	0,272	0,607	0,293
15	6	60	0,653	0,246	0,681	0,231	0,576	0,463
16	6	60	0,67	0,184	0,578	0,451	0,538	0,362
17	6,5	65						
18	6,5	65						
19	11	120	0,685	0,153	0,714	0,19	0,716	0,204

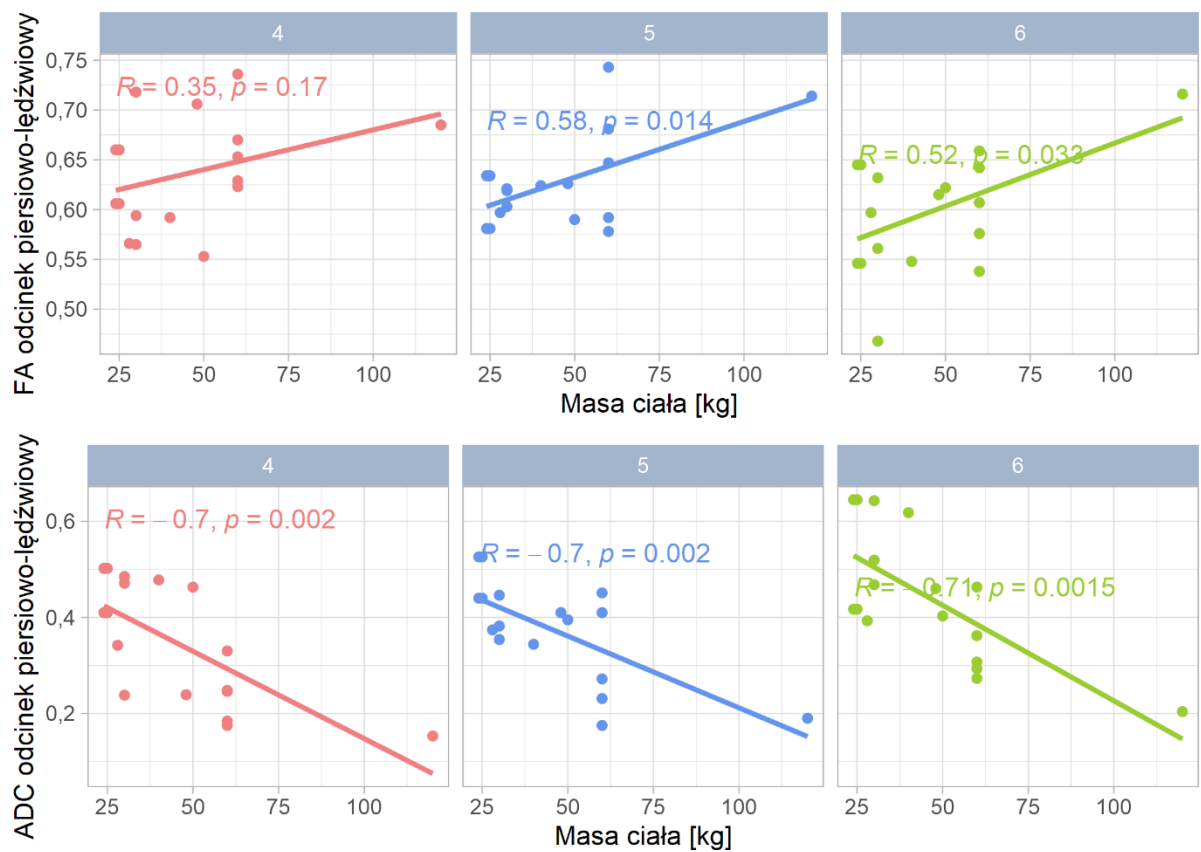
Tabela 4. Średnie wartości FA i ADC z poszczególnych ROIs w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego

Świnia	Wiek [miesiące]	Masa ciała [kg]	Odcinek lędźwiowy					
			ROI7		ROI8		ROI9	
			FA L3/L4	ADC L3/L4	FA L4/L5	ADC L4/L5	FA L5/L6	ADC L5/L6
1	2,5	24	0,577	0,478	0,539	0,405	0,546	0,589
2	2,5	24	0,529	0,488	0,541	0,605	0,55	0,501
3	2,5	25	0,529	0,488	0,541	0,605	0,55	0,501
4	2,5	25	0,577	0,478	0,539	0,405	0,546	0,589
5	3	28						
6	3	30	0,582	0,531	0,591	0,438	0,577	0,465
7	3	30	0,549	0,51	0,517	0,554	0,549	0,549
8	3	30	0,657	0,318	0,615	0,362	0,614	0,338
9	4	40	0,46	0,768	0,531	0,548	0,495	0,504
10	4,5	48	0,583	0,377	0,571	0,439	0,615	0,413
11	5	50	0,57	0,32	0,597	0,421	0,608	0,311
12	6	60	0,721	0,196	0,686	0,293	0,691	0,243
13	6	60	0,722	0,213	0,7	0,201	0,691	0,222
14	6	60	0,623	0,279	0,647	0,272	0,584	0,293
15	6	60	0,718	0,208	0,641	0,302	0,592	0,342
16	6	60	0,733	0,263	0,535	0,434	0,597	0,324
17	6,5	65						
18	6,5	65	0,603	0,392	0,614	0,374	0,628	0,311
19	11	120	0,759	0,184	0,791	0,169	0,681	0,199

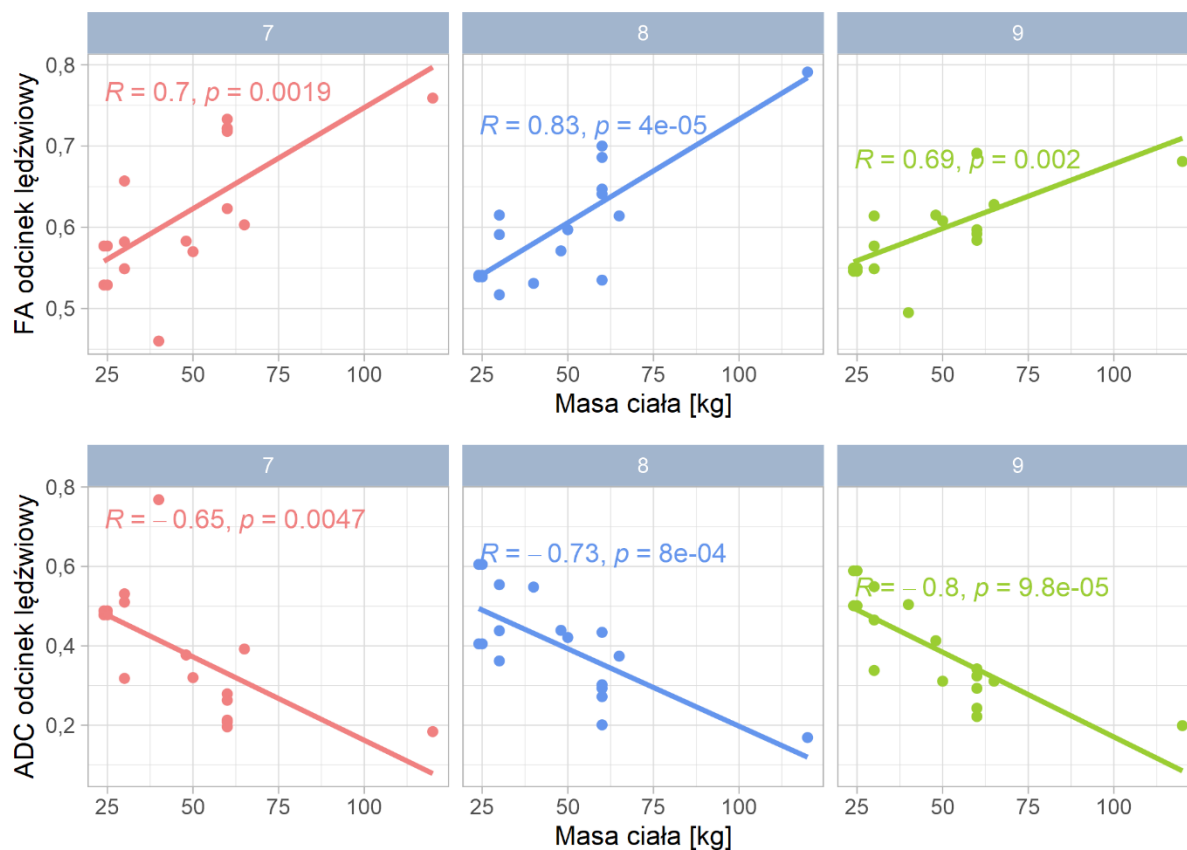
Wykazano istotny związek między masą ciała i wiekiem zwierząt, a wartościami parametrów FA i ADC dla poszczególnych dziewięciu ROIs. Zauważono, że wartości FA dodatnio, a ADC ujemnie korelują ze wzrostem masy ciała i wiekiem. Jeden region nie wykazał statystycznie istotnej korelacji między masą ciała, wiekiem i wartością FA (ROI4, w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego). Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej, w tym wartość współczynnika korelacji (R) oraz poziom istotności testu (p), przedstawiono na **Rycina 12**, **Rycina 13**, **Rycina 14**, **Rycina 15**, **Rycina 16** i **Rycina 17**.



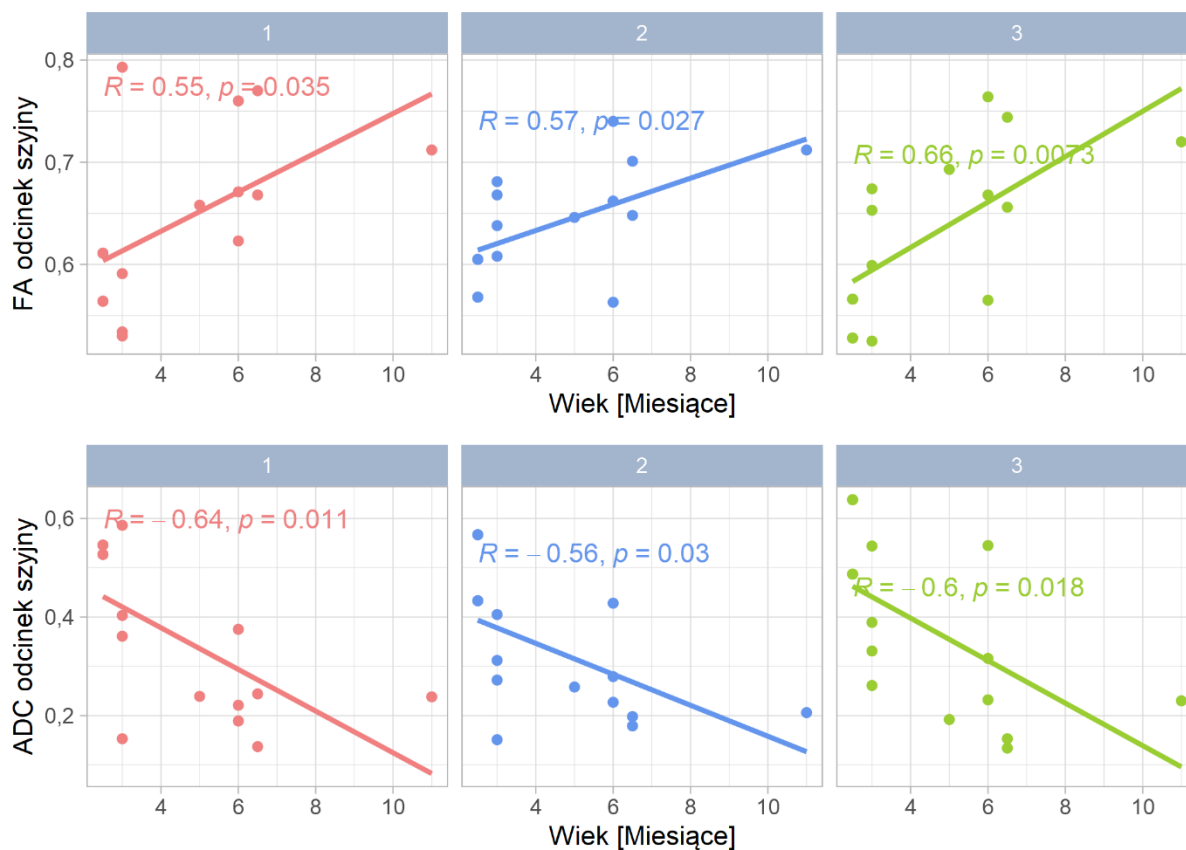
Rycina 12. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a masą ciała dla poszczególnych ROI 1-3 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).



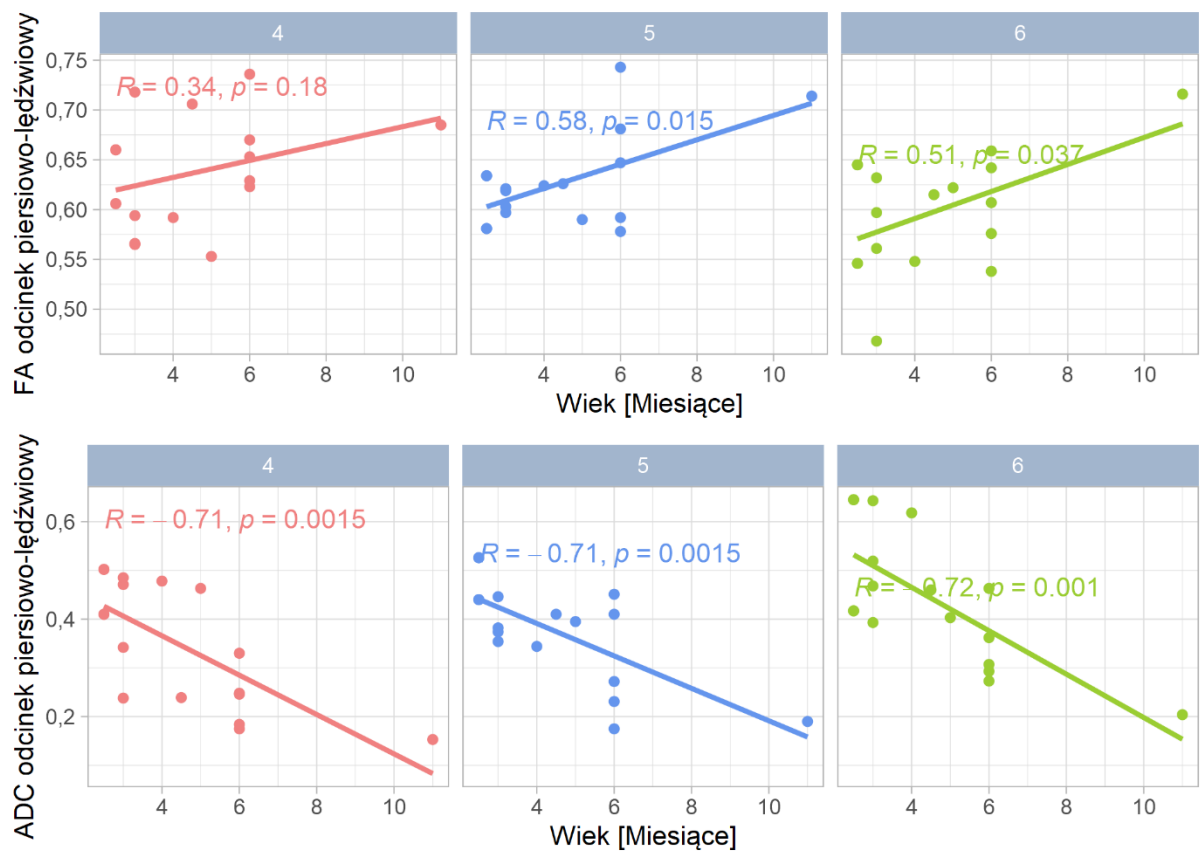
Rycina 13. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a masą ciała dla poszczególnych ROI 4-6 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).



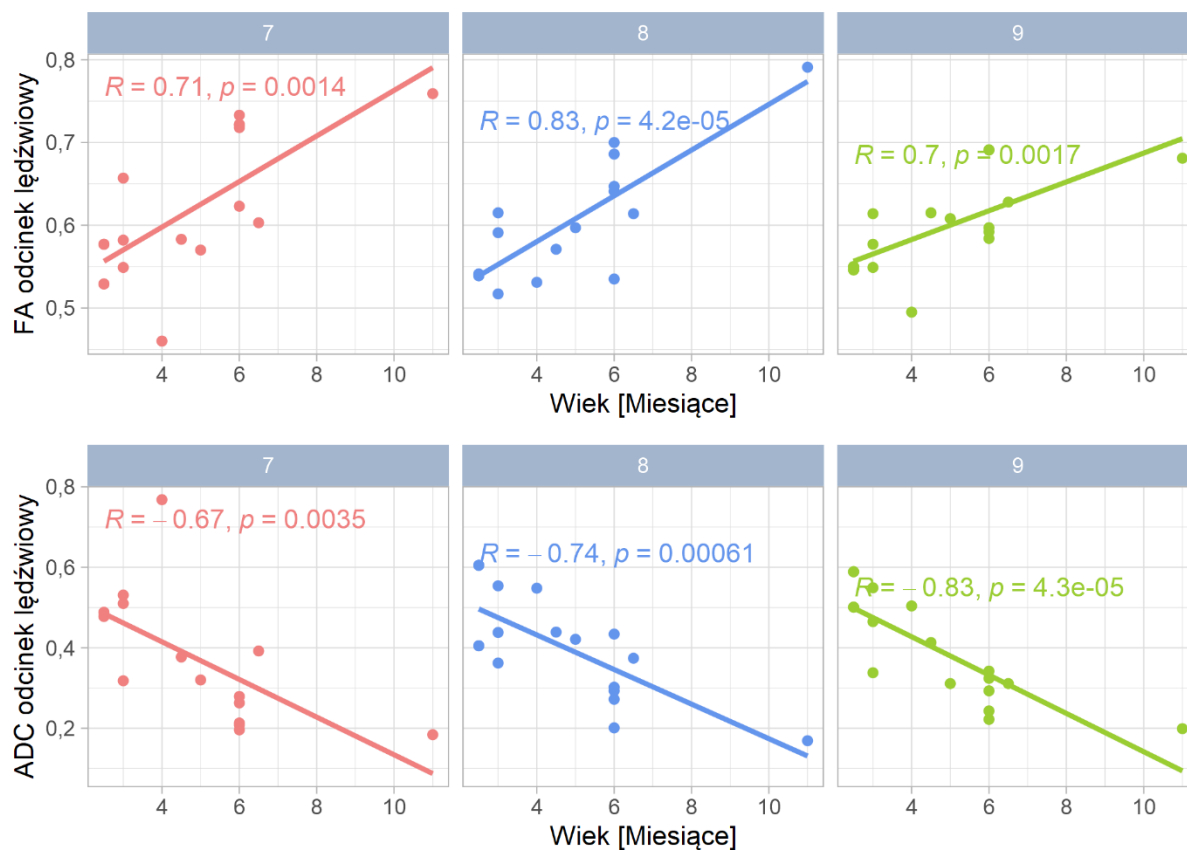
Rycina 14. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a masą ciała dla poszczególnych ROI 7-9 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).



Rycina 15. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a wiekiem badanych zwierząt dla poszczególnych ROI 1-3 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).

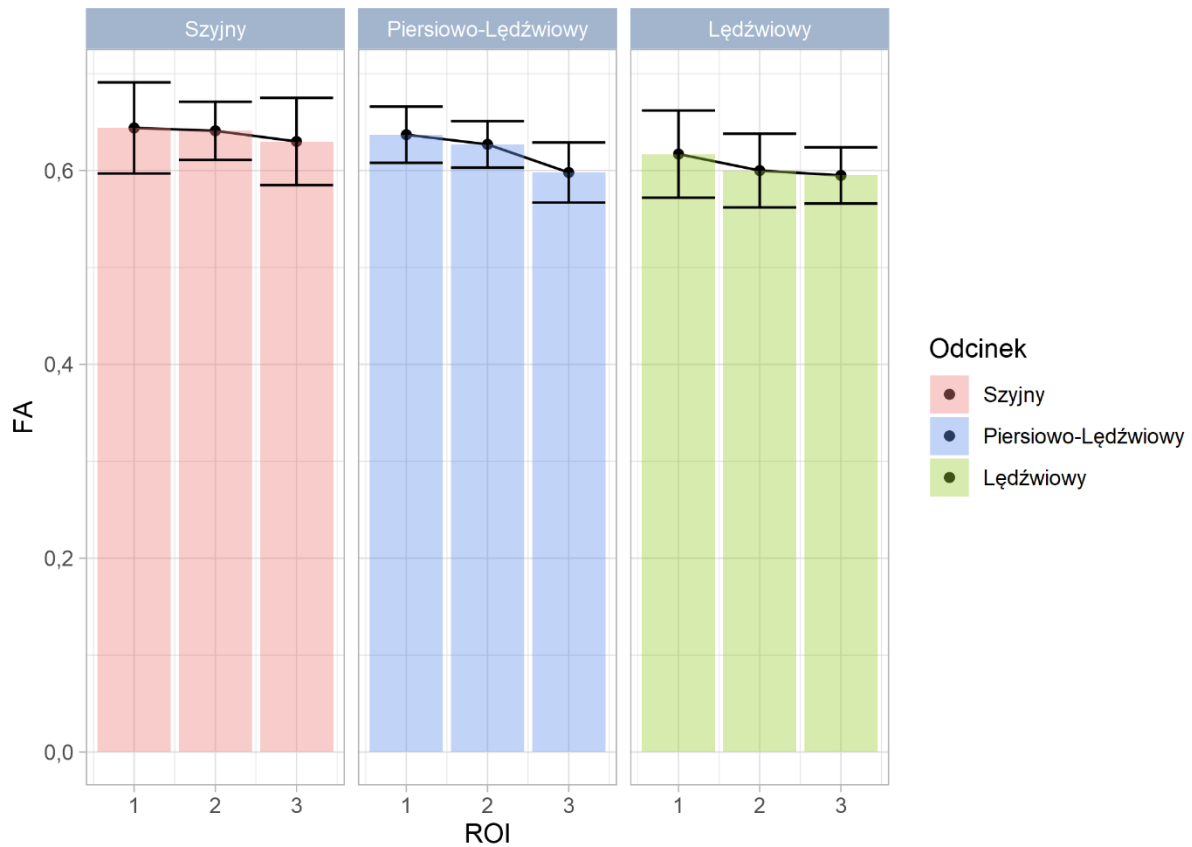


Rycina 16. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku piersiowo-łędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a wiekiem badanych zwierząt dla poszczególnych ROI 4-6 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).

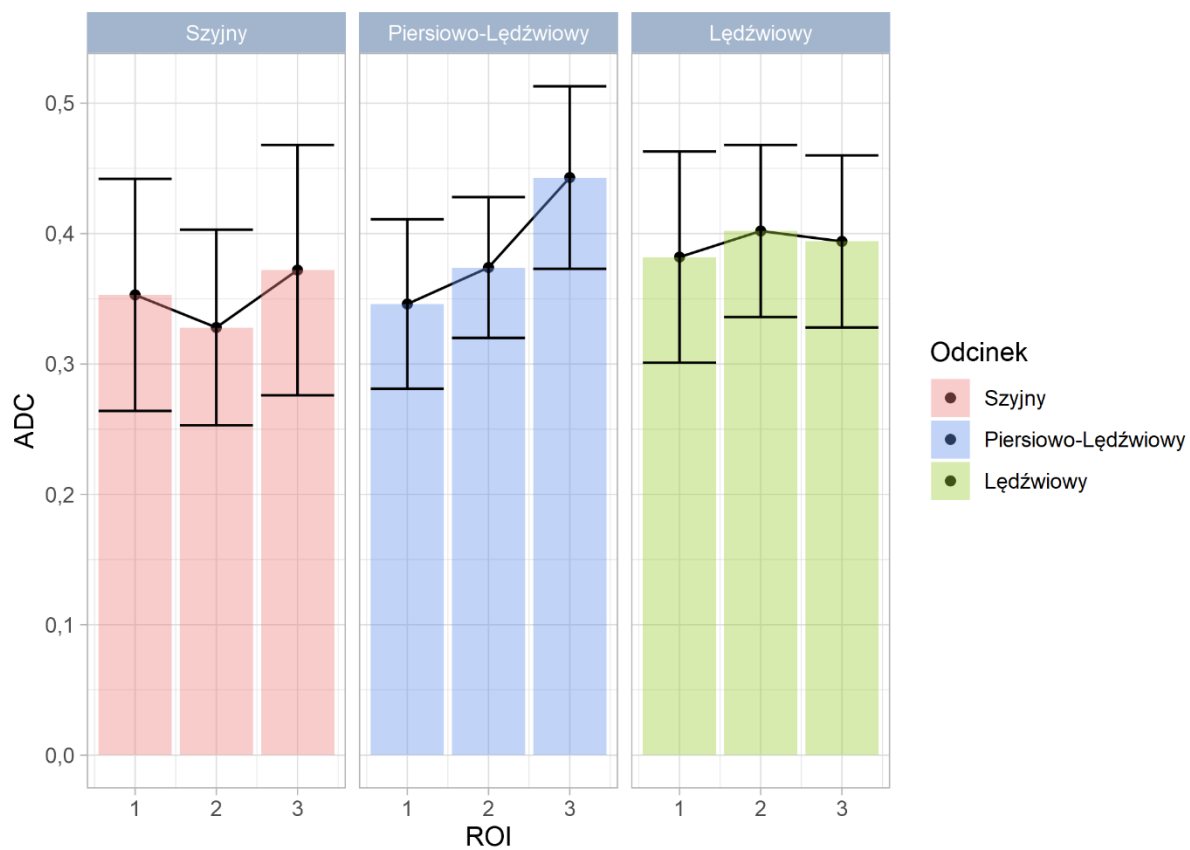


Rycina 17. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a wiekiem badanych zwierząt dla poszczególnych ROI 7-9 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).

Porównanie różnic między średnimi wartościami FA i ADC dla każdego z dziewięciu ROI, w poszczególnych odcinkach rdzenia kręgowego (odcinku szyjnym, piersiowo-lędźwiowym i lędźwiowym) nie wykazało statystycznie istotnych różnic (FA, $p = 0,241$, ADC, $p = 0,462$) (Rycina 18, Rycina 19).



Rycina 18. Wykres słupkowy wraz z wykresem ramka wąsy porównujący różnice w średnich wartościach FA między każdym z dziewięciu ROI dla poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego; jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA), $p = 0,241$.



Rycina 19. Wykres słupkowy wraz z wykresem ramka wąsy porównujący różnice w średnich wartościach ADC między każdym z dziewięciu ROI dla poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego; jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA), $p = 0,462$.

Badanie dynamiki spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa

Średnie wartości parametrów FA i ADC dla trzech ROIs przed i po zabiegu przedstawiono w **Tabela 5** (dane DTI pozyskane przy użyciu programu Fiber Track).

Tabela 5. Średnie wartości anizotropii FA i ADC [10-3 mm²/s] wraz z wartościami odchylenia standardowego dla każdego ROI przed i po chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego u psów z grupy badanej

Pies	PRZED ZABIEGIEM						10-14 PO ZABIEGU					
	ROI1		ROI2=SCI		ROI3		ROI1		ROI2		ROI3	
	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC
1	<u>0,706</u>	<u>0,089</u>	<u>0,621</u>	<u>0,377</u>	<u>0,570</u>	<u>0,406</u>	<u>0,565</u>	<u>0,815</u>	<u>0,542</u>	<u>0,708</u>	<u>0,580</u>	<u>0,327</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,341	0,068	0,337	0,437	0,356	0,491	0,287	0,756	0,302	0,651	0,306	0,355
2	<u>0,617</u>	<u>0,591</u>	<u>0,686</u>	<u>0,281</u>	<u>0,475</u>	<u>0,598</u>	<u>0,754</u>	<u>0,171</u>	<u>0,697</u>	<u>0,280</u>	<u>0,547</u>	<u>0,344</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,302	0,740	0,278	0,281	0,292	0,674	0,259	0,179	0,258	0,253	0,359	0,383
3	<u>0,611</u>	<u>0,337</u>	<u>0,700</u>	<u>0,197</u>	<u>0,606</u>	<u>0,405</u>	<u>0,691</u>	<u>0,225</u>	<u>0,535</u>	<u>0,322</u>	<u>0,579</u>	<u>0,207</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,376	0,713	0,304	0,183	0,321	0,503	0,288	0,240	0,359	0,425	0,357	0,253
4	<u>0,746</u>	<u>0,174</u>	<u>0,792</u>	<u>0,221</u>	<u>0,601</u>	<u>0,477</u>	<u>0,773</u>	<u>0,165</u>	<u>0,724</u>	<u>0,305</u>	<u>0,565</u>	<u>0,308</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,239	0,179	0,184	0,215	0,320	0,620	0,259	0,183	0,247	0,451	0,306	0,260
5	<u>0,674</u>	<u>0,336</u>	<u>0,666</u>	<u>0,251</u>	<u>0,564</u>	<u>0,340</u>	<u>0,495</u>	<u>0,684</u>	<u>0,693</u>	<u>0,327</u>	<u>0,591</u>	<u>0,295</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,278	0,422	0,297	0,257	0,333	0,369	0,302	0,667	0,281	0,461	0,340	0,513
6	<u>0,580</u>	<u>0,447</u>	<u>0,697</u>	<u>0,240</u>	<u>0,464</u>	<u>0,585</u>	<u>0,562</u>	<u>0,621</u>	<u>0,646</u>	<u>0,410</u>	<u>0,643</u>	<u>0,425</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,331	0,528	0,331	0,340	0,354	0,766	0,294	0,735	0,279	0,386	0,283	0,496
7	<u>0,697</u>	<u>0,319</u>	<u>0,697</u>	<u>0,208</u>	<u>0,606</u>	<u>0,601</u>	<u>0,529</u>	<u>0,568</u>	<u>0,583</u>	<u>0,467</u>	<u>0,666</u>	<u>0,407</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,288	0,064	0,352	0,034	0,323	0,286	0,119	0,233	0,118	0,221	0,312	0,112
8	<u>0,204</u>	<u>1,778</u>	<u>0,643</u>	<u>0,131</u>	<u>0,552</u>	<u>0,825</u>	<u>0,759</u>	<u>0,201</u>	<u>0,648</u>	<u>0,382</u>	<u>0,600</u>	<u>0,455</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,077	0,280	0,378	0,117	0,122	0,174	0,223	0,174	0,053	0,034	0,141	0,111
9	<u>0,524</u>	<u>0,892</u>	<u>0,650</u>	<u>0,714</u>	<u>0,528</u>	<u>0,773</u>	<u>0,573</u>	<u>0,896</u>	<u>0,452</u>	<u>0,849</u>	<u>0,357</u>	<u>0,957</u>
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,242	0,282	0,186	0,283	0,175	0,288	0,129	0,344	0,073	0,112	0,059	0,321

Analiza statystyczna różnic pomiędzy parametrami FA i ADC przed i po zabiegu, dla poszczególnych ROIs, wykazała:

ROI1:

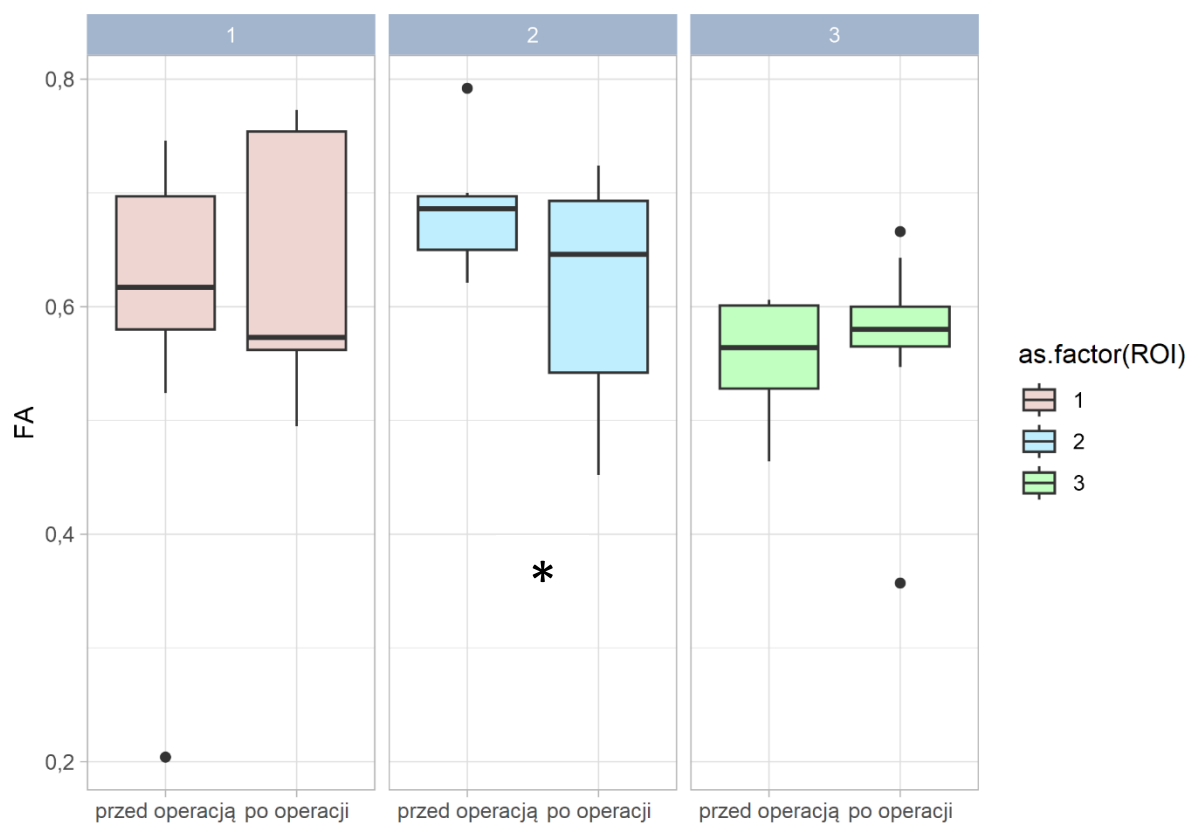
- a) wartości FA przed zabiegiem vs FA po zabiegu nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy uzyskanymi parametrami ($p = 0,95$, **Rycina 20**);
- b) wartości ADC przed zabiegiem vs ADC po zabiegu nie wykazało statystycznie istotnych różnic między uzyskanymi parametrami ($p = 0,86$, **Rycina 21**).

ROI2:

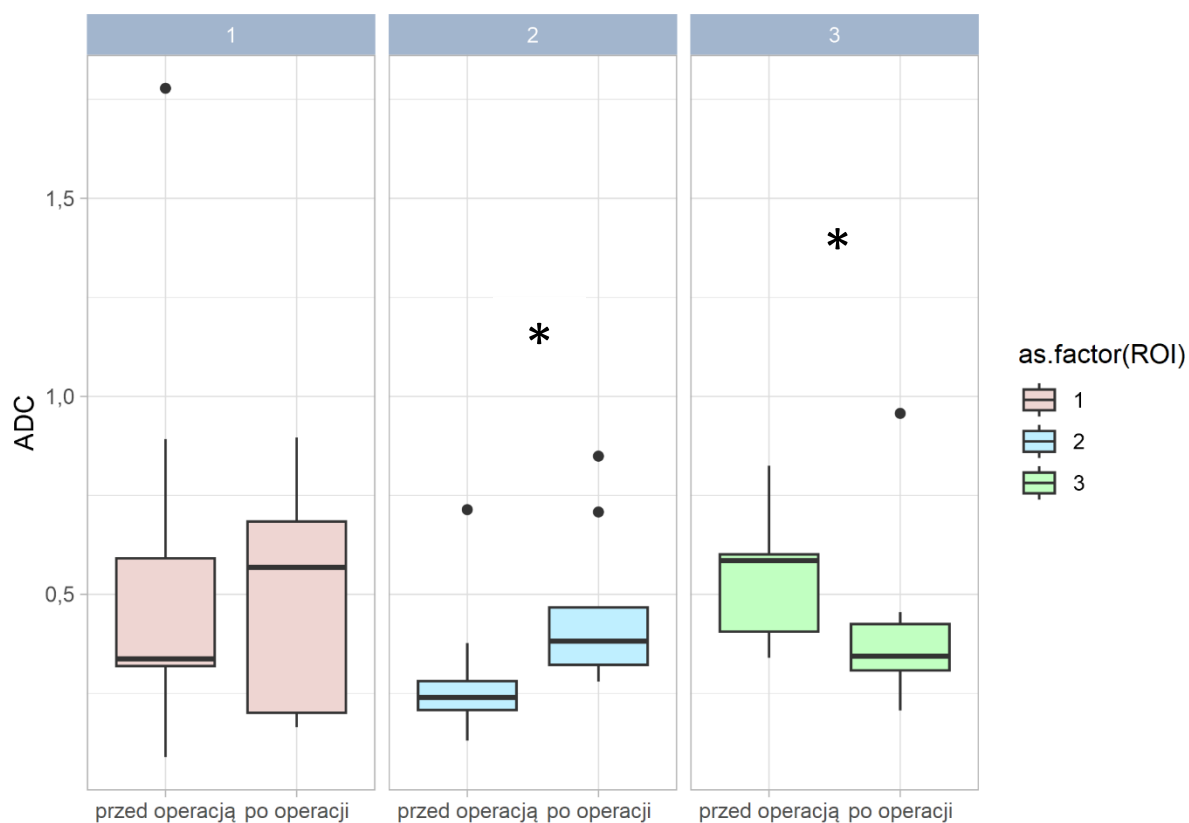
- a) wartości FA przed zabiegiem vs FA po zabiegu wykazały istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnimi ($p = 0,03$, **Rycina 20**), tj. wartości FA po operacji były znacznie niższe w porównaniu z wartościami FA przed operacją;
- b) wartości ADC przed zabiegiem vs ADC po zabiegu wykazały statystycznie istotną różnicę między uzyskanymi parametrami ($p = 0,01$, **Rycina 21**), tj. wartości ADC po operacji były istotnie wyższe w porównaniu do wartości ADC przed zabiegiem.

ROI3:

- a) wartości FA przed zabiegiem vs FA po zabiegu nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi parametrami ($p = 0,34$, **Rycina 20**);
- b) wartości ADC przed zabiegiem vs ADC po zabiegu wykazały statystycznie istotną różnicę między uzyskanymi parametrami ($p = 0,04$, **Rycina 21**) tj. wartości ADC po operacji były istotnie niższe w porównaniu z wartościami ADC przed operacją.



Rycina 20. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów FA w poszczególnych ROI przed i po zabiegu chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego u badanych psów (ROI1, ROI3 – test Wilcoxon’a dla par obserwacji, ROI2 – test t-Studenta dla prób zależnych). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.



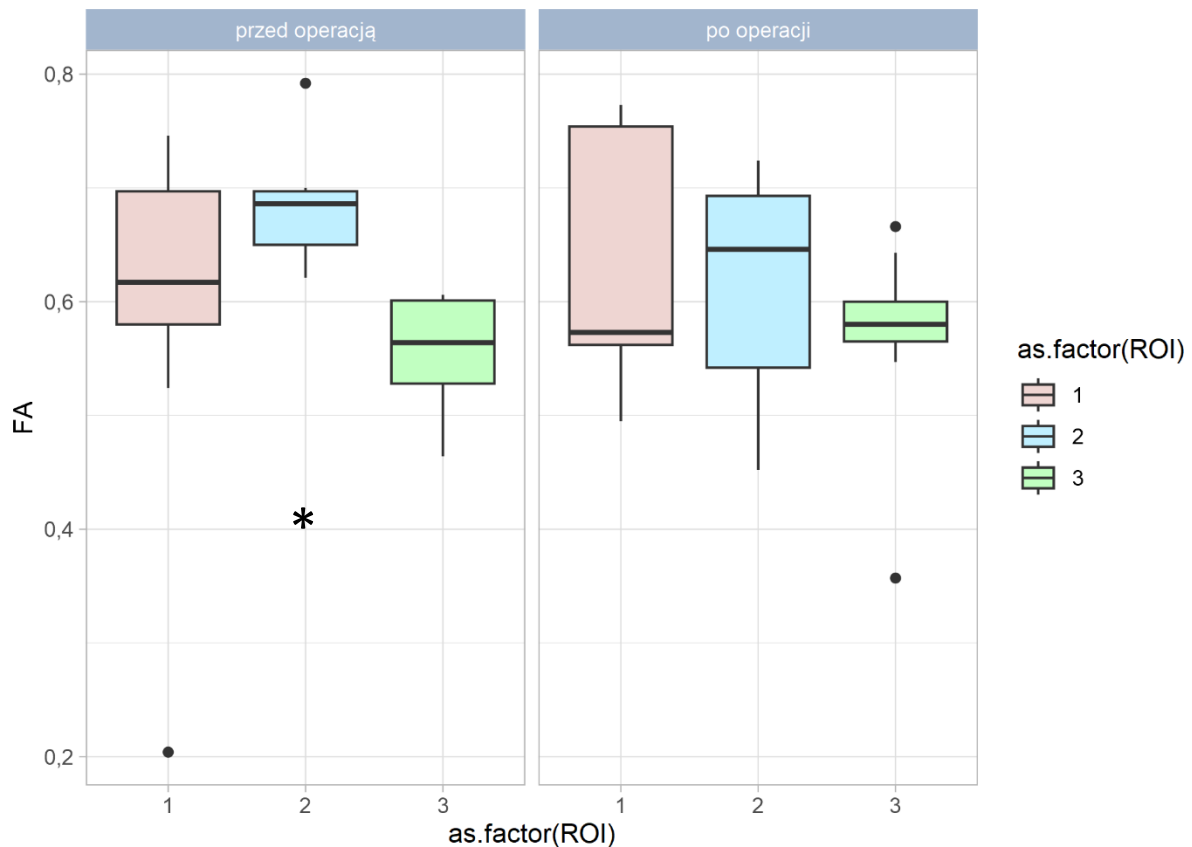
Rycina 21. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów ADC w poszczególnych ROI przed i po zabiegu chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego u badanych psów (ROI1, ROI2, ROI3 – test Wilcoxon’a dla par obserwacji). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.

W celu pełniejszego zobrazowania dynamiki uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz zmian zachodzących w jego mikrostrukturze po zastosowanym leczeniu, analizy uzupełniono o ocenę różnic w wartościach parametrów FA i ADC pomiędzy ROI1, ROI2 i ROI3, osobno przed i po dekompresji chirurgicznej.

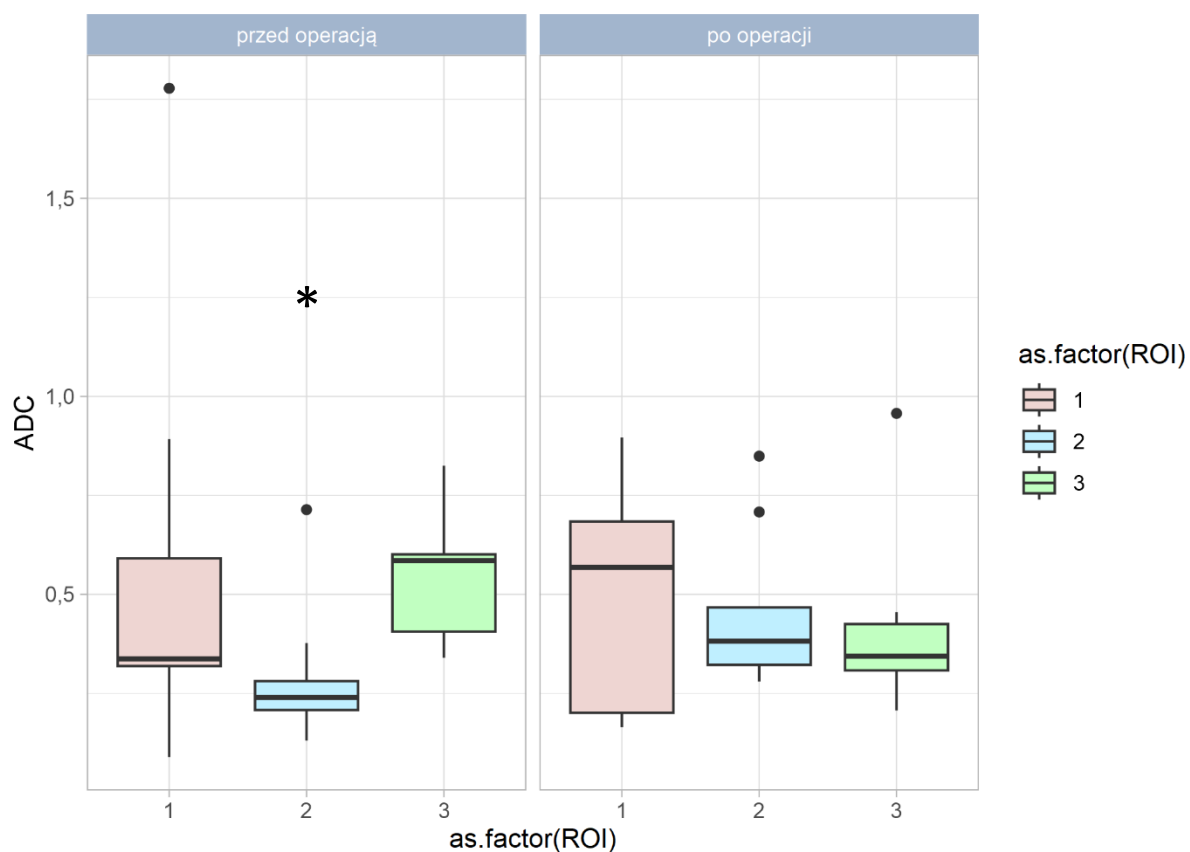
Analiza wykazała:

- 1) wartości FA w ROI1 vs ROI2 vs ROI3 przed zabiegiem – wykazały istotne statystycznie różnice w wartościach FA pomiędzy ROI2 i ROI3 ($p = 0,001$), a w pozostałych przypadkach wyniki nie różniły się istotnie (**Rycina 22**);

- 2) wartości ADC w ROI1 vs ROI2 vs ROI3 przed zabiegiem – wykazały istotne statystycznie różnice w uzyskanych wartościach ADC między ROI2 i ROI3 ($p = 0,01$), a w pozostałych przypadkach wyniki nie różniły się istotnie (**Rycina 23**);
- 3) wartości FA w ROI1 vs ROI2 vs ROI3 po zabiegu – nie wykazały statystycznie istotnych różnic między średnimi wartościami FA dla różnych ROI ($p = 0,38$) (**Rycina 22**);
- 4) wartości ADC w ROI1 vs ROI2 vs ROI3 po zabiegu – nie wykazały statystycznie istotnych różnic między średnimi wartościami ADC dla różnych ROI ($p = 0,94$) (**Rycina 23**).



Rycina 22. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów FA przed zabiegiem (lewa strona) i po zabiegu (prawa strona) pomiędzy ROI1, ROI2 i ROI3 (ANOVA rang Kruskala-Wallisa, wielokrotne testy U – dla wartości przed dekompresją; one-way ANOVA – dla wartości po dekompresji chirurgicznej). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.



Rycina 23. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów ADC przed zabiegiem (lewa strona) i po zabiegu (prawa strona) pomiędzy ROI1, ROI2 i ROI3 (ANOVA rang Kruskala-Wallisa, wielokrotne testy U – dla wartości przed dekompresją; ANOVA rang Kruskala-Wallisa – dla wartości po dekompresji chirurgicznej). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.

Dyskusja

Badanie dynamiki nieuszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu świni

W niniejszym badaniu wykazaliśmy, że świnia rasy szybkorosnącej może być wykorzystana jako alternatywny model nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego. Podstawą wyboru świni domowej jako organizmu modelowego były dowody naukowe, wykazane przez innych badaczy, na podobieństwa w strukturze neuroanatomicznej rdzeni kręgowych ludzi i świń. Tossi i wsp. w swojej analizie porównawczej wykazali, że podobieństwo to jest dużo większe niż w przypadku innych modeli zwierzęcych takich jak małpy, koty i w najmniejszym stopniu szczury (125). Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie, w którym opisano przydatność parametrów tensora dyfuzji do oceny mikrostruktury zdrowego rdzenia kręgowego u świń.

Wykazano, że istnieje korelacja między wiekiem oraz przyrostem masy ciała zdrowych świń, a zmianą parametrów FA i ADC. Zachowanie parametrów FA i ADC w miejscu uszkodzenia rdzenia kręgowego zostało już wcześniej zidentyfikowane i dobrze opisane przez innych badaczy – obserwuje się spadek wartości FA i wzrost ADC. Anizotropia frakcjonowana jest parametrem uważanym za marker integralności włókien. Spadek wartości FA skorelowany jest z dezintegracją włókien istoty białej, zachodzącą w przebiegu uszkodzenia rdzenia, podczas gdy wzrost wartości ADC sugeruje proces demielinizacyjny (49,50,54,55). W niniejszym badaniu wykazano, że w procesie wzrostu i dojrzewania zaobserwowano dokładnie odwrotne zachowanie: wartości FA rosną, a ADC maleją. W drugiej części badania ustalono, że parametry tensora dyfuzji uzyskane na modelu świńskim nie różniły się istotnie pomiędzy wybranymi punktami (ROIs) na przebiegu rdzenia kręgowego.

Inni autorzy również opisali zmiany i zależności między wartościami parametrów tensora dyfuzji w zależności od wieku w populacjach zdrowych pacjentów. Badania na różnych grupach wiekowych: 20-77 lat (n = 36) i 21-61 lat (n = 65) wykazały istotną zależność FA od wieku, przy czym wartość ta malała w całym rdzeniu. Ponadto wykazano, że uzyskane wartości FA zmniejszają się w obrębie istoty szarej (ang. *grey matter* – GM) w porównaniu do istoty białej (ang. *white matter* – WM) w procesie starzenia (117,121). Inne badanie przeprowadzone na zdrowej populacji ludzi w wieku 18-77 lat (n = 36) potwierdziło, że wartości FA maleją, a wartości ADC rosną wraz z wiekiem (118). Zależność ta jest dokładnie odwrotna do tego, co wykazaliśmy w procesie wzrostu rdzenia kręgowego na świńskim modelu. Pokazuje to, że DTI jest użyteczną metodą oceny rdzenia kręgowego, ale przy interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę procesy dojrzewania i starzenia się.

W porównaniu z rdzeniem kręgowym, trajektoria parametrów tensora dyfuzji w mózgowiu jest bardzo dobrze opisana i scharakteryzowana. W procesie wzrostu i dojrzewania obserwuje się wzrost wartości FA oraz spadek innych parametrów dyfuzji, takich jak: dyfuzyjność osiowa (ang. *axial diffusivity* – AD), dyfuzyjność promieniowa (ang. *radial diffusivity* – RD) i średnia dyfuzyjność (ang. *mean diffusivity* – MD). Wykazano, że DTI jest użyteczną metodą oceny procesu mielinizacji i zmian mikrostruktury mózgowia w okresie dojrzewania. Z wykorzystaniem DTI badaczom udało się udowodnić, które części mózgu rozwijają się szybciej, a które później. Dodatkowo dowiedziono, że stosunek GM/WM w mózgu zmniejsza się w okresie wzrostu. Od narodzin do wczesnego dzieciństwa rozmiar mózgu szybko wzrasta, podczas gdy na późniejszych etapach rozwój następuje poprzez zwiększenie objętości WM i zmniejszenie objętości GM. Wyjaśnia to zachowanie parametrów DTI w okresie dojrzewania (126,127).

Zmiany wartości parametrów tensora dyfuzji w procesie wzrostu rdzenia kręgowego u zdrowych pacjentów pediatrycznych zostały opisane, ale koncepcja nie jest tak jasna, jak w badaniach dotyczących dojrzewania mózgowia. Badacze oceniali zależność tych parametrów od wieku w różnych grupach: 6-16 lat (n = 22), poniżej 18 lat (n = 41), 0,3-18 lat (n = 121) i 6-16 lat (n = 23) (120,124,128,129). Większość badań potwierdza analogiczną zależność, jak ta stwierdzona w niniejszym badaniu w odniesieniu do wieku i masy ciała – wartości FA rosną (120,124,128,129), a inne parametry, takie jak ADC (124) lub MD, maleją (120,129). Jednak jedno badanie na grupie 121 pacjentów pediatrycznych nie potwierdziło wcześniej opisanych trendów dla wartości MD i AD w dojrzewającym mózgu i rdzeniu kręgowym (128). W większości opisanych badań zmiany parametrów tensora dyfuzji w okresie dojrzewania korelują z trwającym procesem mielinizacji i upakowaniem włókien istoty białej – podobnych do analogicznych procesów obserwowanych w mózgu. Wraz z postępującą mielinizacją zmniejsza się zawartość wody w tkance nerwowej, a średnica włókien nerwowych ulega pogrubieniu, co również znajduje odzwierciedlenie w parametrach DTI (124). Należy zauważyć, że w przeciwieństwie do mózgu, rdzeń kręgowy jest mielinizowany we wczesnym okresie rozwoju. Spadek stosunku GM/WM w procesie wzrostu, opisany również w mózgu, może nie być jedynym zjawiskiem występującym w rdzeniu kręgowym. Reynolds i wsp. wysunęli hipotezę, że wraz ze wzrostem dzieci zwiększa się udział większych aksonów, czym próbuje się tłumaczyć różnice w uzyskanych wartościach DTI w procesie wzrostu rdzenia kręgowego (128). Uznaje się również, że same parametry sekwencji, takie jak niski SNR (ang. *signal-to-noise ratio*) lub obecność artefaktów sercowych i oddechowych, mogą wpływać na jakość otrzymanych parametrów DTI rdzenia kręgowego i sprawiać, że na wartości te będzie miało wpływ więcej zmiennych niż w przypadku mózgu (45,119).

Nasze badania dowodzą, że parametry tensora dyfuzji uzyskane na świńskim modelu nie różniły się istotnie pomiędzy poszczególnymi odcinkami rdzenia kręgowego. Niemniej jednak, patrząc na uzyskane wartości liczbowe, można zauważyć pewną tendencję w zachowaniu tych parametrów: wartości FA maleją nieznacznie, a ADC rosną w kierunku doogonowym poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego (**Rycina 18**, **Rycina 19**). Wyniki innych badaczy potwierdzają opisaną tendencję, przy czym najwięcej badaczy wykorzystało parametr FA do oceny różnic w poszczególnych częściach rdzenia – najczęściej w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego (ang. *cervical spinal cord* – CSC) (130–138). Analiza regionalna wykazała, że zarówno długość rdzenia kręgowego, jak i gęstość włókien, zwiększają się w procesie dojrzewania. Zauważono, że opisane powyżej zjawisko dotyczy głównie dolnego odcinka szyjnego i środkowego odcinka piersiowego. Szacuje się, że od okresu noworodkowego do dorosłości rdzeń kręgowy zwiększa swoją długość około 2,7 razy – odcinek piersiowy o 304%, a szyjny i lędźwiowy o 238% (129). Stosunek GM/WM wzrasta w rdzeniu w kierunku doogonowym w porównaniu do poziomu rostralnego u dorosłych i dzieci. Należy również zauważyć, że w porównaniu z mózgiem proces mielinizacji w rdzeniu kręgowym jest prawdopodobnie bardziej dojrzały i jednolity u noworodków urodzonych o czasie, co również może tłumaczyć mniejszą regionalną różnicę w uzyskanych wartościach DTI (128).

Ograniczeniem naszej analizy jest fakt, że uśrednia ona wartości FA i ADC uzyskane od zwierząt na różnych etapach wzrostu, nie biorąc pod uwagę dysproporcji we wzroście długości kręgosłupa i rdzenia kręgowego. Wiadomo, że kręgosłup rośnie szybciej w porównaniu do rdzenia kręgowego podczas procesu wzrostu, a w konsekwencji rdzeń kręgowy rozciąga się tylko do odcinka lędźwiowego kręgosłupa u dorosłych ludzi i zwierząt. Ten interesujący aspekt nie został również uwzględniony w innych badaniach i publikacjach, pokazujących związek między parametrami MR-DTI na przebiegu rdzenia kręgowego lub w jego poszczególnych segmentach.

Niejednoznaczność wyników i wiele zmiennych wpływających na wartości DTI pozyskane w obrazowaniu rdzenia kręgowego wskazują na konieczność uwzględnienia wspomnianej dysproporcji przy planowaniu przyszłych badań z wykorzystaniem tej metody do oceny mikrostruktury rdzenia kręgowego na różnych etapach jego wzrostu i dojrzewania. Należy jednak pamiętać, że analiza wielowymiarowa może stanowić istotne wyzwanie interpretacyjne.

W naszej pracy okres obserwacji wzrostu zwierząt był krótki. Głównym argumentem, przemawiającym za wykorzystaniem tego modelu zwierzęcego w badaniach, jest fakt, że są to zwierzęta szybko rosnące, co pozwala znacznie skrócić czas pozyskania wyników. Praca z tym modelem pozwala uzyskać kompromis pomiędzy czasem trwania badania i wielkością zwierząt w końcowym etapie realizacji obserwacji. Zwierzęta w okresie obserwacji odzwierciedlają wiek dziecięcy i młodzieńczy u ludzi, stąd wybór czasu obserwacji oraz grupy zwierząt. Ze względu na stosunkowo krótki okres obserwacji, danych uzyskanych w naszym badaniu nie można bezpośrednio przełożyć na cały okres życia zwierząt towarzyszących lub ludzi (wliczając w to okres dorosłości). Dane mają natomiast przełożenie na etap rozwoju i dojrzewania rdzenia kręgowego, który w cytowanej literaturze z medycyny człowieka obserwowano przez ok. dwadzieścia lat. Dlatego uważamy, że u szybko rosnących zwierząt masa ciała jest lepszym parametrem do oceny procesu wzrostu niż wiek, ale w analizie uwzględniliśmy zarówno masę ciała, jak i wiek badanych świń, aby lepiej zilustrować szybki czas wzrostu wybranego modelu zwierzęcego. Ponadto, biorąc pod uwagę zależności wykazane w niniejszym badaniu, należy przyjąć, że zmiany parametrów FA i ADC wraz ze wzrostem masy ciała u świń odpowiadają zmianom uzyskiwanym u ludzi podczas procesu wzrostu i dojrzewania (w zależności od wieku). Naszym zdaniem oznacza to, że masa ciała jest wiarygodnym parametrem i lepiej odzwierciedla proces wzrostu szybko rosnących zwierząt niż wiek. Jak opisano w części dotyczącej metodyki, wiek zwierząt został oszacowany, natomiast masa ciała dokładnie udokumentowana. Analogiczne

zachowanie parametrów FA i ADC w obu korelacjach pokazuje, że wyniki są porównywalne, ale zależność od masy ciała jest najbardziej obiektywna.

W badaniu wzięty udział świnie w przedziale wagowym od 24 do 120 kg. Osobniki rasy polskiej białej osiągają wagę 120 kg w wieku około 11 miesięcy. Jest to rasa szybko rosnąca, jednak późno dojrzewająca. Świnie tej rasy kończą proces wzrostu i tym samym dojrzewania w wieku około 3 lat, a dorosła locha (samica) osiąga masę ciała 250-300 kg (139). Odnosząc się do powyższych aspektów, należy zauważyć, że świnia o wadze 120 kg nadal jest zwierzęciem w okresie wzrostu. Wyniki pozyskane w grupie wagowej zwierząt powyżej 60 kg można zatem porównać do tych, które otrzymano u młodych dorosłych ludzi jako grupy wiekowej szczególnie predysponowanej do urazowych uszkodzeń rdzenia kręgowego (3,49).

Wartości parametrów DTI udało się uzyskać tylko od jednej świni ważącej 120 kg. Wynikało to z trudności przeprowadzenia procedur badawczych na zwierzęciu o tak dużej masie ciała. Obsługa weterynaryjna była skomplikowana, a liczba leków znieczulających stosowanych podczas procesu badawczego znacznie wzrosła. Na podstawie doświadczeń z badania stwierdzono, że waga 60-65 kg będzie maksymalną i optymalną dla założonej docelowej grupy wiekowej. Mimo, że waga 120 kg jest wartością odbiegającą od pozostałych, zdecydowano się nie wykluczać jej z analizy, gdyż jej usunięcie nie zmieniło istotności statystycznej przeprowadzonych badań i analizowanych parametrów.

Interesującą alternatywą dla tego badania może być przeprowadzenie obserwacji na świnich rasy świnia miniaturowa z Getyngi (ang. *Göttingen minipig*) jako modelu zwierzęcym. Świnia miniaturowa z Getyngi jest najmniejszą świnią domową na świecie. Jako dorosły osobnik waży około 35 kg, czyli znacznie mniej niż dorosłe osobniki rasy polskiej białej. Wspomniana rasa została specjalnie opracowana do badań biomedycznych (140–143).

Zwierzęta biorące udział w badaniu miały te same cechy – tą samą rasę i linię hodowlaną, płeć, a także sposób utrzymania i żywienia – a zatem miały podobny dzienny przyrost masy ciała. Stanowi to gwarancję porównywalności uzyskanych wyników. Niemniej jednak, uważamy, że porównanie większej liczby wyników pochodzących od tego samego zwierzęcia byłoby cenne dla pełnego obrazowania modelu nienaruszonego rdzenia kręgowego i chcielibyśmy w tym kierunku rozwijać naszą pracę.

Wyniki uzyskane na modelu zwierzęcym są bardziej uniwersalne, jednorodne i powtarzalne, niż te pochodzące z pojedynczych badań DTI w populacji osób bez patologii rdzenia kręgowego w określonym przedziale wiekowym. Jest to związane z dużą różnorodnością osobniczą cech w populacji ludzkiej i jednocześnie pokazuje istotną zaletę badań na modelu świńskim. Należy również wspomnieć, że w badaniu na dużej rasie (polskiej białej) uniknęliśmy ograniczeń technicznych związanych z małym rozmiarem rdzenia kręgowego, co jest często opisywane w badaniach na pacjentach pediatrycznych (119,120,124,128,129,132).

W naszej pracy do oceny dynamiki zmian rdzenia kręgowego w procesie wzrostu wykorzystaliśmy tylko dwa parametry DTI – FA i ADC – co można uznać za ograniczenie. Tymczasem inni autorzy wykazali przydatność do oceny mikrostruktury rdzenia kręgowego również innych parametrów tensora dyfuzji takich, jak np. AD i MD, jako drugich najczęściej opisywanych oprócz FA, oraz rzadziej parametru RD (117,121,128,129). Jednak ze względu na szeroki zakres zastosowań i opisaną przydatność FA (54–56,103) i ADC (41,51,56,103) w ocenie patologii rdzenia kręgowego, zdecydowaliśmy się na ograniczenie do nich niniejszego badania.

Innym czynnikiem ograniczającym w naszym badaniu jest fakt, że umieszczenie ROI w pośrodkowej płaszczyźnie sagittalnej nie pozwala na dokładne rozróżnienie między GM i WM. Nasza metodyka wywodzi się z badań na pacjentach pediatrycznych (124) i została również

opisana w jednym badaniu na grupie dorosłych w wieku 18-77 lat ($n = 36$) (118). U noworodków i bardzo małych dzieci niewielki rozmiar rdzenia kręgowego nie pozwala na rozróżnienie między GM i WM (124). Jak wcześniej wyjaśniono w modelu świńskim, znosimy ograniczenie związane z małym rozmiarem rdzenia kręgowego, jednak chcieliśmy zastosować w badaniu metodykę odpowiednią do stosowania u ludzi w podobnym okresie wzrostu. Niemniej jednak, wierzymy, że selektywny pomiar wartości ADC i FA istoty szarej i białej w obrębie rdzenia kręgowego na modelu świńskim będzie szansą na rozwój tej pracy.

Istnieją doniesienia, że natężenie pola 3,0T zapewnia wyższą jakość DTI rdzenia kręgowego w porównaniu do 1,5T (144). Przeprowadzenie opisanych procedur z wykorzystaniem rezonansu 3,0T i porównanie uzyskanych wyników byłoby okazją do udoskonalenia naszego badania.

Badanie dynamiki spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa

W prezentowanej pracy wykazano, że wartości FA i ADC w ROI1 (doczaszkowo od uszkodzenia) nie różniły się istotnie przed i po leczeniu (**Rycina 20**, **Rycina 21**). W przypadku ROI2 (SCI) zarówno wartości FA, jak i ADC, różniły się znacząco przed i po operacji. Wartości ADC były jednak znacznie wyższe po leczeniu, a wartości FA miały tendencję malejącą (**Rycina 20**, **Rycina 21**). Pokazuje to, że interwencja chirurgiczna w tym obszarze nie jest bez znaczenia dla dynamiki i mikrostruktury rdzenia kręgowego. Nie wykazano także znaczącej różnicy w wartościach FA przed i po leczeniu w ROI3 (doogonowo od uszkodzenia). Jednak zauważono przy tym, że FA było wyższe po leczeniu w porównaniu do wartości przed leczeniem (**Rycina 20**). Wyjątkiem jest wynik FA psa nr 9 po leczeniu wynoszący ok. 0,357, który jest znacznie niższy niż wyniki innych psów i niższy niż wynik FA psa nr 9 przed leczeniem (ok. 0,528) (**Rycina 20**, **Tabela 5**). Wartości ADC w ROI3 były znacząco różne przed i po zabiegu, z odwrotną sytuacją

niż w miejscu dekompresji rdzenia kręgowego – wartości były niższe niż przed zabiegiem (**Rycina 21**). Ponownie wynik psa nr 9 był znacząco różny od pozostałych wartości (ADC ok. 0,957), a także wyższy niż sytuacja tego psa przed zabiegiem (ADC ok. 0,773) (**Rycina 21, Tabela 5**).

Interesujące wyniki uzyskano z analizy porównującej zachowanie parametrów FA i ADC przed i po leczeniu między wszystkimi 3 ROIs. Wartości FA i ADC po zabiegu nie różniły się istotnie między poszczególnymi ROIs (**Rycina 22, Rycina 23**). Natomiast przed leczeniem wartości FA i ADC różniły się znacząco między ROI2 (SCI) i ROI3. Wartości FA były znacznie niższe, a wartości ADC wyższe w kierunku doogonowym od miejsca kompresji rdzenia (**Rycina 22, Rycina 23**), co potwierdza fakt, udowodniony również przez innych badaczy, o doogonowym kierunku rozprzestrzeniania się uszkodzeń rdzenia kręgowego (49,50,54,55). Również pozabiegowo, spodziewana poprawa w parametrów FA i ADC, widoczna była doogonowo od miejsca uszkodzenia (ROI3) (**Rycina 20, Rycina 21**), co sugerowałoby, że widoczna regeneracja na poziomie mikrostrukturalnym również zachodzi od strony doogonowej.

Psy z IVDE w odcinku szyjnym (CSC) (5/9) miały mniej wyrażone deficyty neurologiczne niż z IVDE w odcinku piersiowo-lędźwiowym (TL-IVDE), z przewagą bólu i ataksji (stopień 5-4 wg MFS). Żadne zwierzę nie wykazywało oznak bólu podczas wizyty kontrolnej, a zwierzęta z ataksją były w pełni sprawne w ciągu ok. 3 tygodni po operacji.

Psy z IVDE w odcinku piersiowo-lędźwiowym (TL-IVDE) oraz lędźwiowym (4/9) wykazywały dużo silniej wyrażone i zróżnicowane deficyty neurologiczne niż w przypadku zwierząt z dyskopatią w CSC. Obserwowano objawy bólowe przez ataksję kończyn miednicznych, po nieambulatoryjną paraparezę i zaburzenia związane z oddawaniem moczu (stopień 3b – 4 wg MFS). Podczas kontroli żadne ze zwierząt nie wykazywało objawów bólowych. Powróciła prawidłowa kontrola związana z oddawaniem moczu. U psa nr 5, z nietrzymaniem moczu

wtórny do uszkodzenia dolnego motoneuronu (ang. *lower motoneuron* – LMN), prawidłowa kontrola oddawania moczu powróciła po 4 dniach od zabiegu. U psa nr 2, z zatrzymaniem oddawania moczu wtórny do uszkodzenia w obrębie górnego motoneuronu (ang. *upper motoneuron* – UMN), prawidłowa kontrola powróciła po 2 dniach od zabiegu.

Zaobserwowana dysproporcja objawów neurologicznych wprost wynika z budowy kanału rdzenia kręgowego, który ma większą średnicę w odcinku szyjnym niż w odcinku piersiowo-lędźwiowym, a co za tym idzie średnica rdzenia kręgowego i jego ruchomość jest największa w odcinku szyjnym. Tłumaczy to fakt, że w przebiegu IVDE w odcinku szyjnym częściej obserwujemy u psów objawy bólowe i ataksję niż cięższe deficyty propriocepcji czy utratę czucia bólu głębokiego. Wynika to z poziomu kompresji na rdzeń i upośledzenia przewodzenia w szlakach istoty szarej. W odcinku szyjnym, z uwagi na jego dużą ruchomość i większą średnicę kanału kręgowego, dochodzi najczęściej do kompresji powierzchownie położonych i najwrażliwszych szlaków bólu powierzchownego oraz czucia proprioceptywnego. W odcinku piersiowo-lędźwiowym, z uwagi na mniejszą średnicę i ruchomość rdzenia kręgowego, łatwiej dochodzi do kompresji na głębiej położone i mniej wrażliwe szlaki odpowiadające za ruch świadomy, powierzchowne/skórne drogi czuciowe oraz najgłębiej położone drogi czucia bólu głębokiego (145).

W przypadku 8 z 9 psów doszło do obserwowalnej poprawy stanu neurologicznego podczas kontrolnej oceny 10-14 dni po zabiegu chirurgicznej dekompresji. Wyjątkiem był wcześniej już opisany pies nr 9, który wykazywał, na podstawie oceny parametrów DTI, najcięższy stopień uszkodzenia rdzenia na poziomie mikrostrukturalnym. Uszkodzenie to postępowało mimo zastosowanego leczenia chirurgicznego (**Tabela 5**). Na podstawie oceny stanu

neurologicznego pacjenta nr 9, uzupełnionego o analizą parametrów DTI, rokowanie na powrót do zdrowia było niekorzystne.

Kontrolne badanie MR wykazało, że u wszystkich spośród operowanych zwierząt udało się usunąć całość materiału dyskowego, znosząc tym samym kompresję rdzenia kręgowego. Wciąż jednak utrzymywał się u nich podwyższony sygnał z rdzenia kręgowego w sekwencji T2-zależnej, natomiast był on wyrażony słabiej niż przed zabiegiem. Podwyższony sygnał z rdzenia kręgowego przed zabiegiem był czynnikiem, który dodatkowo przemawiał za włączeniem do protokołu diagnostycznego sekwencji DTI.

Wtórnie do IVDE mogą rozwinąć się różne patologie, takie jak postępująca mielomalacja (ang. *pregressive myelomalacia* – PMM), glejoza, poszerzenie kanału centralnego i śródmiąższowy obrzęk rdzenia. W przypadku klasycznych metod MRI wszystkie zmiany są widoczne jako sygnał patologiczny z rdzenia kręgowego, ale nie ma możliwości dokładnej oceny, jakiego rodzaju jest to patologia (146–152). Jest to problematyczne, ponieważ utrudnia lub uniemożliwia ocenę rokowania. Rozwój neuroobrazowania ma na celu umożliwienie dokładnej diagnozy rodzaju patologii. Naszym zdaniem jedną z metod, która może umożliwić taką diagnozę w przyszłości, jest DTI. Przypisując poszczególne wartości parametrów FA i ADC do konkretnej patologii i oceniając mikrostrukturalne uszkodzenie rdzenia kręgowego, możliwa będzie dokładniejsza ocena rodzaju patologii i rokowania. Szczególnie cenna byłaby możliwość oceny ryzyka rozwoju postępującej mielomalacji jako złego czynnika prognostycznego. Uważamy, że warto ocenić stan myelomeningocele za pomocą metody DTI, która już przed operacją może wykazać, że rdzeń kręgowy ma zaawansowane uszkodzenia mikrostrukturalne. Badacze podejmowali się już tego problemu, jednak potrzeba większej ilości badań dla pełnego zrozumienia. Wykazano, że istnieją różnice w pomiarach wartości FA, jak również traktografii pomiędzy zdrową

i nieprawidłową tkanką rdzenia kręgowego. Stwierdzono zmiany w traktografii w lokalizacji potwierdzonej mielomalacji nawet wtedy, gdy konwencjonalne obrazy T2-zależne w badaniu MR wykazywały niewielkie zmiany (153).

Na uwagę zasługuje fakt, że nie jest zasadne wykonywanie kontrolnego MR-DTI bezpośrednio po operacji ze względu na fakt manipulacji w obszarze lub okolicy rdzenia podczas zabiegów chirurgicznych. Potencjalnie może to prowadzić do przejściowego wzrostu wartości ADC i spadku wartości FA, co jest związane z reorganizacją dużych aksonów w momencie dekompresji na poziomie makroskopowym (154). Jest to szczególnie istotne, biorąc pod uwagę, że nasze badanie wykazało, iż w miejscu SCI (ROI2) nadal utrzymują się gorsze wartości FA i ADC 10-14 dni po operacji niż doogonowo od tego miejsca. Uzyskanie wartości DTI po miesiącu, trzech miesiącach i sześciu miesiącach od SCI i przeprowadzonego leczenia chirurgicznego byłoby wartościową informacją dla oszacowania gojenia i procesu neuroregeneracji. W niniejszej pracy nie przeprowadziliśmy badań nad tym zagadnieniem, jednak uważamy, że tego typu ocena mogłoby być cenna dla pełnej ewaluacji skuteczności prowadzonego leczenia. Uzyskanie takich danych jednak nie jest łatwe w przypadku pacjentów klinicznych, dlatego w naszej pracy ograniczyliśmy się do obrazowania kontrolnego 10-14 dni po leczeniu, kiedy odbywa się rutynowa kontrola pooperacyjna.

Obecnie rokowanie, co do powrotu pacjenta do pełnej sprawności, określa się na podstawie badania neurologicznego i zakwalifikowania pacjenta do 1 z 5 grup w zmodyfikowanej skali Frankela. Stopień nasilenia objawów neurologicznych zależy od ciężkości uszkodzenia rdzenia kręgowego, ale przy użyciu standardowego strukturalnego MRI nie jesteśmy w stanie określić stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego na poziomie mikrostrukturalnym (17,26,30,155,156). Stanowi to szczególny problem w sytuacjach, w których stopień kompresji

nie koreluje bezpośrednio z nasileniem deficytów neurologicznych. Dodatkowe zastosowanie sekwencji DTI pozwala na przyżyciową ocenę mikrostrukturalną rdzenia kręgowego przed dekompresją chirurgiczną. Jest to dodatkowe narzędzie do dokładniejszego określenia rokowania pacjenta przed podjęciem decyzji o interwencji chirurgicznej.

Kolejną zaletą może być wykorzystanie metody DTI w sytuacjach, w których podczas operacji pojawiają się komplikacje. Możliwa jest wówczas ocena, jakie zmiany mikrostrukturalne zaszły w rdzeniu kręgowym i jakie będzie to miało konsekwencje dla rokowania pacjenta. Szczególnie w sytuacji powikłań, które wystąpiły w okresie rekonwalescencji pooperacyjnej, cenna wydaje się możliwość porównania wartości parametrów DTI przed i po zastosowanym leczeniu.

Pomimo rokowania ustalonego przed operacją, istnieją duże indywidualne różnice w czasie powrotu do pełnego wyzdrowienia (20,26,30,156). Z tego powodu uważamy, że warto wykonać kontrolne badanie MRI, szczególnie u pacjentów z przedłużającym się procesem rekonwalescencji. Dodatkowe wykonanie sekwencji DTI 10-14 dni po zabiegu pozwala na ocenę mikrostrukturalną rdzenia i porównanie parametrów z tymi sprzed operacji. Uważamy, że najbardziej rozwojowym kierunkiem w neuroradiologii byłaby możliwość przewidywania czasu powrotu do zdrowia po zastosowanym leczeniu przy użyciu metody DTI. Wymagałoby to szerokich badań międzyośrodkowych na znacznej liczbie pacjentów i optymalnie w formie metaanalizy.

Jednocześnie należy mieć na uwadze fakt, że nie wszystkie zmiany, które zachodzą w przebiegu uszkodzeń rdzenia kręgowego, to te widoczne dla nas za pomocą metod obrazowych (w tym DTI). Szczególnie podczas długo trwającego procesu ekstruzji, ale także protruzji krążka międzykręgowego, może dojść do rozwinięcia się u zwierząt zjawiska bólu przewlekłego,

u podstaw którego leżą mechanizmy hipreralgezji i hipersentytyzacji (157,158). W takiej sytuacji objawy bólowe mogą utrzymywać się mimo prowadzonego leczenia zachowawczego czy chirurgicznego. Stąd, tak ważne w procesie terapeutycznym jest postawienie szybkiej diagnozy i rozpoczęcie odpowiednio dobranej terapii (w tym przeciwbólowej), monitorowanie procesu rekonwalescencji, a także edukowanie i zwiększanie świadomości opiekunów zwierząt w temacie rozpoznawania objawów bólowych (159–161).

Uważamy, że warto rozważyć włączenie sekwencji DTI do planu diagnostycznego IVDD u psów i oceny skuteczności prowadzonej terapii. Mogłoby to pozwolić na obiektywną ocenę jakości dekompresji i jej wpływu na mikrostrukturę rdzenia kręgowego oraz polepszyć całościowe zarządzanie opieką nad weterynaryjnym pacjentem z SCI.

W naszej pracy prawie 45% badanej populacji stanowiły jamniki i buldożki francuskie (2/9 psów to jamniki i 2/9 buldożki francuskie). Potwierdza to szczególnie częste występowanie IVDE u tej grupy pacjentów. W ostatnich latach w całej Europie zanotowaliśmy szczególny wzrost popularności buldogów francuskich, które z uwagi na wady budowy ich kręgosłupa, są bardzo częstymi pacjentami kierowanymi do specjalistycznych konsultacji neurologicznych (17,20). Jednocześnie jesteśmy w tej chwili na etapie, na którym wiemy już, że za metaplazję chondroitów u jamników, z zachodzącą w ich następstwie śmiercią komórek i zwapnieniem jądra miażdżystego, odpowiada ekspresja retrogeny FGF 4 na chromosomie 121. Tak więc jest jasne, że w przypadku tej rasy to czynniki genetyczne odpowiadają za wczesne ekstruzje zwapniałego materiału, skutkując kompresją i uszkodzeniem rdzenia kręgowego (162–164). U buldogów francuskich również potwierdzono występowanie retrogenów CFA 12 i FGF 4, jednak z uwagi na specyficzną budowę kręgosłupa i szybsze w porównaniu do innych ras zakończenie rdzenia kręgowego, przebieg IVDE jest u nich inny niż ten, znany nam z obserwacji tej samej

choroby u jamników. Buldogi francuskie są szczególnie predysponowane do uszkodzeń w odcinku lędźwiowym i dolnym odcinku lędźwiowym, a z uwagi na szybsze zakończenie rdzenia kręgowego szczególnie często dochodzi u nich do uszkodzeń tzw. nici końcowej (łac. *conus medullaris*), co skutkuje pojawiającym się problemem z nietrzymaniem moczu. Jednocześnie lędźwiowe uszkodzenia predysponują do rozwoju mielomalacji (162,165–167), będąc bardzo niekorzystnym wskaźnikiem prognostycznym. Dlatego w przypadku tej rasy tak kluczowa dla dobrania odpowiedniego postępowania jest prawidłowa neurolokalizacja, która może być ułatwiona poprzez włączenie obrazowania MR-DTI do diagnozy IVDE u buldogów.

Jak już wcześniej wspomniano, dane literaturowe na temat zastosowania techniki DTI w medycynie weterynaryjnej są ograniczone. Na uwagę zasługuje jednak kilka prac, które wykazały, że czas trwania urazu, w przebiegu IVDE, w momencie obrazowania nie jest bez wpływu na zachowanie parametrów tensora dyfuzji (106,168,169).

Udowodniono, że w przewlekłej fazie uszkodzenia wartości FA są niższe, a ADC wyższe, w porównaniu z tymi wartościami pozyskanymi od zdrowych psów oraz tych w fazie ostrej uszkodzenia. Przewlekły stan SCI jest wynikiem złożonych reakcji adaptacyjnych obejmujących zmiany naczyniowe, powstawanie wolnych rodników, zaburzenia równowagi jonowej, stan zapalny, demielinizację i apoptozę. Takie mechanizmy ułatwiają glejozę, aktywację astrocytów, a następnie tworzenie wypełnionych płynem śródmiażdżowych ubytków poprzez konsolidację blizny glejowej wraz z częściową remielinizacją i tworzeniem przestrzeniami między aksonami. W konsekwencji masywna utrata szlaków istoty białej może powodować zmniejszenie anizotropii, co znajduje odzwierciedlenie w spadku wartości FA. W przywołanym badaniu psy dotknięte ostrym SCI wykazywały zwiększone wartości FA w epicentrum uszkodzenia w porównaniu z grupą kontrolną. Obecność materiału dyskowego w kanale kręgowym na poziomie

epicentrum może powodować zmniejszenie przestrzeni, a tym samym ryzyko ucisku, między nienaruszonymi lub obrzękniętymi szlakami aksonalnymi, zwiększając ich anizotropię. Zwiększone wartości FA są często zgłaszane w ostrym urazowym uszkodzeniu mózgu u ludzi, a obrzęk cytotoksyczny w drogach istoty białej został postulowany jako możliwa przyczyna. Za wzrost wartości ADC w przewlekłej fazie uszkodzenia odpowiadają procesy demielinizacyjne, natomiast niższe wartości parametrów w fazie ostrej badacze tłumaczyli ograniczeniem dyfuzyjności, wywołanej odkształceniem rdzenia kręgowego przez wyciśnięty materiał dysku (168).

Szczególnym wyzwaniem jest terapia pacjentów w przewlekłej fazie SCI, stąd badacze próbowali stworzyć porównawczy model przewlekłego urazu w celu testowania różnych efektów terapeutycznych z wykorzystaniem techniki DTI do obiektywnej oceny rezultatów prowadzonego leczenia (114,169)

Na podstawie cytowanej literatury, 8 na 9 pacjentów w naszym badaniu zakwalifikowano do podostrej fazy uszkodzenia rdzenia (od 3 do 30 dni po uszkodzeniu) w momencie diagnozy IVDE, co miało potwierdzenie w wartościach parametrów FA i ADC (170,171). Jeden pies, nr 8, wykazywał objawy od 9 tygodni, znajdował się zatem już w fazie przewlekłej.

Co również istotne, doniesienia naukowe na temat potencjalnego wykorzystania sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego w neuroradiologii są coraz częstsze (172–174). Wierzymy, że otworzy to drzwi do bardziej szczegółowych badań nad SCI i zrewolucjonizuje analizę danych DTI. Wydaje się, że jest to kierunek nadchodzących zmian, zwłaszcza w przypadku tej metody, w której uzyskane dane liczbowe pozwalają nam pośrednio i obiektywnie ocenić mikrostrukturę ośrodkowego układu nerwowego.

Pomimo ogromnego postępu w neurologii, neuroradiologii i neurochirurgii, wciąż napotykamy na wiele ograniczeń dotyczących diagnostyki i leczenia SCI. Pierwszym problemem spotykanym zarówno w medycynie człowieka, jak i weterynaryjnej, jest określenie rokowania pacjenta i wybór odpowiedniej terapii (5,6,26). Nowoczesne techniki, w tym DTI, często umożliwiają znacznie dokładniejszą ocenę rokowania (47,54,175,175,176), ale nadal jest to metoda, która ma wiele ograniczeń, głównie związanych z czynnikami anatomicznymi (154).

Pierwsze ograniczenie wynika z podstawowego mechanizmu, na którym opiera się ta technika, mierząca dyfuzję wody w tkance. Umożliwia ona obserwację ruchu cząsteczek wody w tkance, jednak nie pozwala na rozróżnienie poszczególnych aksonów w istocie białej rdzenia kręgowego. Inną ważną kwestią przy interpretacji wyników – szczególnie FA – jest fakt, że makroskopowa reorganizacja aksonów może również wpływać na zmiany anizotropii, a nie tylko zmiany na poziomie komórkowym obejmujące aksony i mielinę. Należy również pamiętać, że wartość tensora dyfuzji jest parametrem uśrednionym, co również niesie ze sobą ryzyko, że czynniki anatomiczne nie są brane pod uwagę przy jego obliczaniu. Ograniczenie to można przezwyciężyć zwiększając rozdzielczość obrazu i dobierając odpowiednie parametry sekwencji. DTI wykrywa ruch wody, który wynosi około 5-10 μm w czasie pomiaru (10-50 ms według innych źródeł). Każdy fizjologiczny ruch o tej wielkości może zakłócać DTI, czyniąc wynik niedokładnym. Najbardziej znaczącym ruchem jest ruch samego rdzenia kręgowego, spowodowany pulsującymi ruchami płynu mózgowo-rdzeniowego (ang. *cerebrospinal fluid* – CSF) w wyniku aktywności pracy serca. Rdzeń kręgowy jest otoczony kilkoma różnymi strukturami, w tym płynem mózgowo-rdzeniowym, kręgami i połączeniami powietrzno-tkankowymi ze względu na bliskość płuc. Wpływa to na wysoką niejednorodność pola, spowodowaną różnymi wrażliwościami magnetycznymi tych struktur i rdzenia kręgowego. Niejednorodność pola jest

ograniczeniem, które należy wziąć pod uwagę zarówno podczas planowania sekwencji DTI, jak i przetwarzania danych. Wreszcie, niewielki rozmiar i przekrój poprzeczny samego rdzenia kręgowego jest nadal ograniczeniem, które sprawia, że wyniki obrazowania tą metodą nie są tak jednoznaczne, jak te uzyskane w badaniach DTI mózgowia (135,154).

Ograniczenia badania:

Głównym ograniczeniem tego badania jest mała liczba badanych psów. Nasza praca dostarczyła cennych i istotnych statystycznie wyników porównujących zachowanie parametrów FA i ADC przed i po zastosowanym leczeniu chirurgicznym u psów z IVDE, zgodnie z tym, co miała na celu. Jednak grupa badana była zróżnicowana pod względem różnorodności rasowej, a tym samym wielkości badanych zwierząt, a także lokalizacji SCI wtórnej do IVDE i co najważniejsze, zmiennego przebiegu objawów neurologicznych. Zmienność i niewielki rozmiar badanej populacji uniemożliwiły bezpośrednią korelację między wartościami DTI, a różnicami w standardowych sekwencjach MRI i ich związkiem ze zmianami stanu neurologicznego. Każdorazowo jednak standardowe sekwencje MRI, stan neurologiczny i zmiany wartości DTI były oceniane i porównywane oddzielnie, dla każdego zwierzęcia, co stanowiło istotną część ich oceny klinicznej i neurologicznej.

Poprzednie badania potwierdziły, że na parametry tensora dyfuzji w obrazowaniu rdzenia kręgowego ma wpływ wiele czynników, w tym dojrzewanie i starzenie się, a także region rdzenia kręgowego (117,118,120,121,124,128–130,177). Wszystkie te ograniczenia sugerują, że tylko wielośrodkowe badanie może dostarczyć bardziej wiarygodnych danych ze względu na dostępność dużej grupy pacjentów. Uważamy, że prawdziwe zrozumienie dynamiki zmian parametrów tensora dyfuzji można osiągnąć jedynie poprzez porównanie z większą i bardziej jednorodną grupą – wraz z podziałem na rasę, wiek, segment, w którym wystąpił uraz,

i nasilenie objawów neurologicznych. Naszym zdaniem tylko dzięki tego typu badaniom ta zaawansowana technika neuroobrazowania będzie mogła zostać zastosowana w praktyce klinicznej.

Innym czynnikiem ograniczającym w naszym badaniu był fakt, że umieszczenie ROIs w pośrodkowej płaszczyźnie sagittalnej nie pozwala na dokładne rozróżnienie między GM i WM. Jak opisano wcześniej, nasza metodyka pochodzi z badań na pacjentach pediatrycznych (124) i została również opisana w jednym badaniu na grupie dorosłych w wieku 18-77 lat ($n = 36$) (118). Warto pamiętać, że podobna metodyka została zastosowana u pacjentów pediatrycznych i niemowląt, u których średnica kręgosłupa jest znacznie mniejsza niż u dorosłych ludzi. Dlatego uważamy, że pomimo małej średnicy rdzenia kręgowego, metoda ta może być z powodzeniem stosowana u tej wielkości pacjentów weterynaryjnych i w porównaniu do pomiarów w płaszczyźnie poprzecznej jest łatwiejsza technicznie w przypadku manualnego nakładania ROIs.

Ze względu na fakt, że badanie zostało przeprowadzone na MR 1,5T, nie było możliwe rozróżnienie między istotą białą i szarą (132). Uważamy, że w przyszłości warto byłoby wykonać badania DTI na 3T MR, na którym możliwe jest rozróżnienie istoty białej i szarej przy użyciu odpowiednich metod, co pozwoliłoby na dokładną ocenę, a tym samym na ustalenie dokładniejszego rokowania.

Podsumowanie

Chęć poprawy jakości życia pacjentów weterynaryjnych i ludzi z uszkodzeniem rdzenia kręgowego, wymaga kontynuowania aktywnych badań nad nowymi metodami diagnostycznymi i terapeutycznymi.

Wyniki naszego badania na modelu zwierzęcym nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego w zakresie zaawansowanego obrazowania MR, wypełniają lukę między eksperymentalnymi badaniami na gryzoniach, a badaniami na ludziach. Jednocześnie wyniki te są bliższe zastosowaniu w medycynie weterynaryjnej niż bezpośrednie przełożenie zależności towarzyszących zmianom parametrów FA i ADC znanym z medycyny człowieka, na zwierzęta towarzyszące.

Przedstawiony zwierzęcy model doświadczalny nieuszkodzonego rdzenia kręgowego pozwolił na uzyskanie wartości referencyjnych, które mogą być ekstrapolowane do medycyny człowieka. Nasze badanie pokazuje szczególną przydatność szybko rosnących świń, jako organizmu modelowego dla zobrazowania dynamicznych zmian zachodzących w procesie wzrostu rdzenia kręgowego.

Opisane procedury i protokół badania DTI mogą być bezpośrednio zastosowane u zwierząt i ludzi. Ocena mikrostruktury rdzenia kręgowego z wykorzystaniem parametrów FA i ADC powinna uwzględniać etap wzrostu organizmu oraz poziom na jakim doszło do urazu.

Pomimo ograniczeń tej techniki, jest to jedna z metod, która może być szeroko stosowana w przyszłości do oceny stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego u pacjentów weterynaryjnych. Jest to również jedna z głównych metod wiarygodnej i obiektywnej oceny skuteczności różnych rodzajów terapii, w tym chirurgicznego leczenia uszkodzeń rdzenia kręgowego u psów.

Dla lepszej oceny stopnia uszkodzenia i potencjału regeneracji, konieczne jest, aby obrazowanie MR było w stanie kwantyfikować mikrostrukturę rdzenia kręgowego, stąd potrzebne są dalsze badania nad techniką tensora dyfuzji, która daje nam takie możliwości.

Identyfikacja fazy uszkodzenia rdzenia kręgowego, na podstawie obrazowania techniką tensora dyfuzji jest szczególnie przydatną cechą, zwłaszcza w przypadkach o niejasnej historii. Umożliwia to wybór odpowiedniej terapii i całościowe zarządzanie opieką nad pacjentem po urazie rdzenia kręgowego, włączając w to intensywną terapię, leczenie bólu i kontrolę oddawania moczu.

Za włączeniem DTI do protokołu diagnostycznego przemawia także często spotykana niejednoznaczność objawów związanych z neurolokalizacją w przebiegu SCI, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z zjawiskiem takim jak wstrząs rdzeniowy (ang. *spinal shock*). W oparciu o ocenę dynamiki zmian parametrów tensora dyfuzji, możliwe będzie określenie poziomu największych uszkodzeń rdzenia kręgowego na poziomie mikrostrukturalnym, co mamy nadzieję, ułatwi korelację obrazu radiologicznego, z objawami neurologicznymi pacjentów.

W przyszłych badaniach obrazowanie bazowe oraz możliwość obserwacji i oceny efektów leczenia uszkodzeń rdzenia kręgowego będą kluczowe dla lepszego wykorzystania zwierzęcych modeli doświadczalnych w ramach zasady *One Health* (poprzez zdrowie zwierząt do zdrowia ludzi).

Wnioski

1. DTI to dobra metoda do oceny mikrostruktury rdzenia kręgowego, jednak na zachowanie parametrów tensora dyfuzji wpływ ma wiele zmiennych, takich jak m.in. dojrzewanie i starzenie organizmu.
2. Wyznaczenie wartości referencyjnych parametrów DTI dla nieuszkodzonego rosnącego rdzenia kręgowego na modelu świni domowej było konieczne jako punkt odniesienia z uwagi na brak takich danych w literaturze.
3. DTI może podnieść wartość diagnostyczną badania MR w przypadku uszkodzeń rdzenia kręgowego u psów, dlatego należy rozważyć uzupełnienie o tę sekwencję standardowych protokołów obrazowania kręgosłupa opartych na sekwencjach strukturalnych.
4. Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że ze względu na proces reorganizacji dużych aksonów, zachodzący w momencie chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego, pomiar parametrów DTI w epicentrum uszkodzenia może nie być miarodajny i należy uwzględnić to zjawisko przy interpretacji wyników.
5. Dzięki przeprowadzeniu badania na dwóch modelach translacyjnych – nieuszkodzonego i spontanicznie uszkodzonego rdzenia kręgowego – nasze wyniki mogą być ekstrapolowane do medycyny człowieka i jednocześnie przyczyniają się do rozwoju medycyny weterynaryjnej.

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej (IVDE – ekstruzja krążka międzykręgowego, MSF – zmodyfikowana skala Frankela).....	44
Tabela 2. Średnie wartości anizotropii frakcjonowanej (FA) i rzeczywistego współczynnika dyfuzji (ADC) z poszczególnych ROIs w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego.....	51
Tabela 3. Średnie wartości FA i ADC z poszczególnych ROIs w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego.....	52
Tabela 4. Średnie wartości FA i ADC z poszczególnych ROIs w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego.....	53
Tabela 5. Średnie wartości anizotropii FA i ADC [10^{-3} mm ² /s] wraz z wartościami odchylenia standardowego dla każdego ROI przed i po chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego u psów z grupy badanej.....	62

Spis rycin

- Rycina 1.** Centralno-lewostronna przepuklina (ekstruzja) jądra miażdżystego krążka międzykręgowego u psa rasy yorkshire terrier na wysokości przestrzeni międzykręgowej C4/C5 (niebieską strzałką oznaczono materiał dyskowy, zlokalizowany w świetle kanału kręgowego). Widoczna jest rekonstrukcja tkanek miękkich w płaszczyźnie strzałkowej (lewa strona) oraz poprzecznej (prawa strona). Badanie kręgosłupa szyjnego wykonano 16-rzędowym tomografem komputerowym (GE Health Care)..... 21
- Rycina 2.** Centralna przepuklina (ekstruzja) jądra miażdżystego krążka międzykręgowego u buldoga francuskiego na wysokości przestrzeni międzykręgowej C3/C4 (niebieską strzałką oznaczono hipointensywny materiał dyskowy, zlokalizowany w świetle kanału kręgowego, zewnątrzrdzeniowo, powodujący umiarkowaną kompresję rdzenia kręgowego; dodatkowo widoczne podwyższenie sygnału z rdzenia kręgowego na tej wysokości, świadczące o zmianach obrzękowych śródrdzeniowo, wtórnych do kompresji rdzenia). Badanie kręgosłupa szyjnego wykonano 1,5T skanerem MR (Philips, Ingenia) w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (lewa strona) oraz poprzecznej (prawa strona). 22
- Rycina 3 .** Zdjęcie przedstawia warunki, w jakich utrzymywane były zwierzęta..... 36
- Rycina 4.** Analiza obrazów pozyskanych techniką tensora dyfuzji (Philips DTI Fiber Track Software 2013). Lokalizacja pierwszego rejonu zainteresowania (ang. region of interest, ROI1) w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego. A – płaszczyzna strzałkowa, B – płaszczyzna dogrzbietowa, C – płaszczyzna poprzeczna. Czerwona strzałka wskazuje rekonstrukcję włókien istoty białej (traktografię) w poszczególnych płaszczyznach A-C..... 39
- Rycina 5.** Sposób lokalizacji obszarów zainteresowania (ROIs) w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego (żółte linie). Badanie kręgosłupa szyjnego wykonane 1,5T skanerem MR (Philips, Ingenia) w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej u świni z grupy badawczej. Cztery kręgi szyjne jako anatomiczne punkty odniesienia (C4). 40
- Rycina 6.** Sposób lokalizacji obszarów zainteresowania (ROIs) w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego (żółte linie). Badanie kręgosłupa piersiowo-lędźwiowego wykonane 1,5T skanerem MR (Philips, Ingenia) w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej u świni z grupy badawczej. Trzynasty kręg piersiowy (Th13) oraz czwarty kręg lędźwiowy (L4) jako anatomiczne punkty odniesienia. 40
- Rycina 7.** Obraz badania MR w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej (strona lewa), i mapę FA (strona prawa) szyjnego odcinka rdzenia kręgowego, pokazujący rozmieszczenie ROIs w tym odcinku. W pozostałych segmentach rdzenia wartości DTI pozyskiwane były w sposób analogiczny..... 41
- Rycina 8.** Analiza obrazów pozyskanych techniką tensora dyfuzji (Philips DTI Fiber Track Software 2013). Lokalizacja drugiego rejonu zainteresowania, tj. miejsca uszkodzenia rdzenia kręgowego (ROI2=SCI)

w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego, u psa nr 7. Czerwona gwiazdka wskazuje wyrostek poprzeczny drugiego kręgu szyjnego (fac. axis – obrotnik), jako anatomiczny punkt odniesienia. A – płaszczyzna dogrzbietowa, B – płaszczyzna strzałkowa, C – płaszczyzna poprzeczna..... 47

Rycina 9. Analiza obrazów pozyskanych techniką tensora dyfuzji kont. Rycina pokazuje dokładny sposób lokalizacji wszystkich trzech rejonów zainteresowania u psa nr 7, przed zabiegiem chirurgicznej dekompresji rdzenia przy użyciu mapy FA i sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej jako anatomicznego punktu odniesienia. C3 – trzon trzeciego kręgu szyjnego..... 48

Rycina 10. A – Obraz badania MR kręgosłupa szyjnego wykonany w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej, u psa nr 3 przed zabiegiem chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego. Żółtą strzałką oznaczono drugi rejon zainteresowania, tj. miejsce kompresji/uszkodzenia rdzenia kręgowego (ROI2=SCI), w następstwie przepukliny (ekstruzji) krążka międzykręgowego C2/C3. Torbiel blaszki czworaczej mózgowia jako przypadkowa zmiana radiologiczna bez znaczenia klinicznego – oznaczona czerwoną gwiazdką. B – Kontrolny obraz badania MR kręgosłupa szyjnego wykonany w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej, u psa nr 3 po chirurgicznej dekompresji rdzenia. Miejsce po chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego metodą korpektomii brzusznej (ventral slot) oznaczono żółtą strzałką..... 48

Rycina 11. Od lewej w kolejności: obraz badania MR w sekwencji T2-zależnej, w płaszczyźnie strzałkowej, oraz mapa FA i ADC szyjnego odcinka rdzenia kręgowego, obrazujące rozmieszczenie ROIs u psa nr 7 przed zabiegiem chirurgicznej dekompresji. C3 – trzon trzeciego kręgu szyjnego..... 49

Rycina 12. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a masą ciała dla poszczególnych ROI 1-3 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p)..... 54

Rycina 13. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a masą ciała dla poszczególnych ROI 4-6 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p)..... 55

Rycina 14. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a masą ciała dla poszczególnych ROI 7-9 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).56

Rycina 15. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a wiekiem badanych zwierząt dla poszczególnych ROI 1-3 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p)..... 57

Rycina 16. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku piersiowo-lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a wiekiem badanych zwierząt dla poszczególnych ROI 4-6 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).	58
Rycina 17. Wykresy regresji liniowej pokazują zależność w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego między wartościami FA (górny rząd) i ADC (dolny rząd), a wiekiem badanych zwierząt dla poszczególnych ROI 7-9 wraz z wartościami współczynnika korelacji Pearsona (R) oraz poziomem jego istotności statystycznej (p).	59
Rycina 18. Wykres słupkowy wraz z wykresem ramka wąsy porównujący różnice w średnich wartościach FA między każdym z dziewięciu ROI dla poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego; jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA), $p = 0,241$	60
Rycina 19. Wykres słupkowy wraz z wykresem ramka wąsy porównujący różnice w średnich wartościach ADC między każdym z dziewięciu ROI dla poszczególnych odcinków rdzenia kręgowego; jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA), $p = 0,462$	61
Rycina 20. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów FA w poszczególnych ROI przed i po zabiegu chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego u badanych psów (ROI1, ROI3 – test Wilcoxon’a dla par obserwacji, ROI2 – test t-Studenta dla prób zależnych). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.	64
Rycina 21. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów ADC w poszczególnych ROI przed i po zabiegu chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego u badanych psów (ROI1, ROI2, ROI3 – test Wilcoxon’a dla par obserwacji). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.....	65
Rycina 22. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów FA przed zabiegiem (lewa strona) i po zabiegu (prawa strona) pomiędzy ROI1, ROI2 i ROI3 (ANOVA rang Kruskala-Wallisa, wielokrotne testy U – dla wartości przed dekompresją; one-way ANOVA – dla wartości po dekompresji chirurgicznej). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.....	66
Rycina 23. Wykresy pudełkowe porównują wartości parametrów ADC przed zabiegiem (lewa strona) i po zabiegu (prawa strona) pomiędzy ROI1, ROI2 i ROI3 (ANOVA rang Kruskala-Wallisa, wielokrotne testy U – dla wartości przed dekompresją; ANOVA rang Kruskala-Wallisa – dla wartości po dekompresji chirurgicznej). Gwiazdką oznaczono analizy w przypadku których wyniki różniły się istotnie.	67

Bibliografia

1. Wang JZ, Yang M, Meng M, Li ZH. Clinical characteristics and treatment of spinal cord injury in children and adolescents. *Chin J Traumatol Zhonghua Chuang Shang Za Zhi*. 2023 Jan;26(1):8–13.
2. Chen Y, He Y, DeVivo MJ. Changing Demographics and Injury Profile of New Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States, 1972-2014. *Arch Phys Med Rehabil*. 2016 Oct;97(10):1610–9.
3. DeVivo MJ, Vogel LC. Epidemiology of spinal cord injury in children and adolescents. *J Spinal Cord Med*. 2004;27 Suppl 1:S4-10.
4. Bahsoun S, Kuiper JH, Hulme CH, Twigg AJA, El Masri W, Glass C, et al. Evaluating patient perspectives on participating in scientific research and clinical trials for the treatment of spinal cord injury. *Sci Rep*. 2021 Feb 23;11(1):4361.
5. Burns AS, Marino RJ, Flanders AE, Flett H. Clinical diagnosis and prognosis following spinal cord injury. *Handb Clin Neurol*. 2012;109:47–62.
6. van Middendorp JJ, Goss B, Urquhart S, Atresh S, Williams RP, Schuetz M. Diagnosis and prognosis of traumatic spinal cord injury. *Glob Spine J*. 2011 Dec;1(1):1–8.
7. Zhang Y, Al Mamun A, Yuan Y, Lu Q, Xiong J, Yang S, et al. Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological intervention. *Mol Med Rep*. 2021 Jun;23(6):417.
8. Hayta E, Elden H. Acute spinal cord injury: A review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention. *J Chem Neuroanat*. 2018 Jan;87:25–31.
9. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J Off J North Am Spine Soc*. 2004;4(4):451–64.
10. Jin Y, Song Y, Lin J, Liu T, Li G, Lai B, et al. Role of inflammation in neurological damage and regeneration following spinal cord injury and its therapeutic implications. *Burns Trauma*. 2023;11.
11. Kim HN, McCrea MR, Li S. Advances in molecular therapies for targeting pathophysiology in spinal cord injury. *Expert Opin Ther Targets*. 2023 Mar 4;27(3):171–87.
12. Martin JH. Neuroplasticity of spinal cord injury and repair. *Handb Clin Neurol*. 2022;184:317–30.
13. Lim PAC, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore*. 2007 Jan;36(1):49–57.
14. Young W. Spinal cord regeneration. *Cell Transplant*. 2014;23(4–5):573–611.
15. Tran AP, Warren PM, Silver J. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):881–917.
16. Brisson BA. Intervertebral Disc Disease in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2010 Sep 1;40(5):829–58.

17. Jeffery N d., Levine J m., Olby N j., Stein V m. Intervertebral Disk Degeneration in Dogs: Consequences, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *J Vet Intern Med.* 2013;27(6):1318–33.
18. Rossi G, Stachel A, Lynch AM, Olby NJ. Intervertebral disc disease and aortic thromboembolism are the most common causes of acute paralysis in dogs and cats presenting to an emergency clinic. *Vet Rec.* 2020 Nov 14;187(10):e81.
19. Fenn J, Olby NJ; Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI). Classification of Intervertebral Disc Disease. *Front Vet Sci.* 2020 Oct 6;7:579025.
20. Olby NJ, Moore SA, Brisson B, Fenn J, Flegel T, Kortz G, et al. ACVIM consensus statement on diagnosis and management of acute canine thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *J Vet Intern Med.* 2022;36(5):1570–96.
21. Falzone C. Canine acute cervical myelopathy: Hydrated nucleus pulposus extrusion or intraspinal discal cysts? *Vet Surg VS.* 2017 Apr;46(3):376–80.
22. De Decker S, Fenn J. Acute Herniation of Nondegenerate Nucleus Pulposus: Acute Noncompressive Nucleus Pulposus Extrusion and Compressive Hydrated Nucleus Pulposus Extrusion. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018 Jan;48(1):95–109.
23. Gouveia D, Cardoso A, Carvalho C, Gonçalves AR, Gamboa Ó, Canejo-Teixeira R, et al. Influence of Spinal Shock on the Neurorehabilitation of ANNPE Dogs. *Anim Open Access J MDPI.* 2022 Jun 16;12(12):1557.
24. Bartholomew KA, Stover KE, Olby NJ, Moore SA. Clinical characteristics of canine fibrocartilaginous embolic myelopathy (FCE): a systematic review of 393 cases (1973-2013). *Vet Rec.* 2016 Dec 24;179(25):650.
25. De Risio L. A Review of Fibrocartilaginous Embolic Myelopathy and Different Types of Peracute Non-Compressive Intervertebral Disk Extrusions in Dogs and Cats. *Front Vet Sci.* 2015;2:24.
26. Olby NJ, da Costa RC, Levine JM, Stein VM; Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT SCI). Prognostic Factors in Canine Acute Intervertebral Disc Disease. *Front Vet Sci.* 2020 Nov 26;7:596059.
27. Muguet-Chanoit AC, Olby NJ, Lim JH, Gallagher R, Niman Z, Dillard S, et al. The cutaneous trunci muscle reflex: a predictor of recovery in dogs with acute thoracolumbar myelopathies caused by intervertebral disc extrusions. *Vet Surg VS.* 2012 Feb;41(2):200–6.
28. Lewis MJ, Jeffery ND, Olby NJ; Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI). Ambulation in Dogs With Absent Pain Perception After Acute Thoracolumbar Spinal Cord Injury. *Front Vet Sci.* 2020 Aug 26;7:560.
29. Jeffery ND, Barker AK, Hu HZ, Alcott CJ, Kraus KH, Scanlin EM, et al. Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disc herniation. *J Am Vet Med Assoc.* 2016 Feb 15;248(4):386–94.
30. Ito D, Matsunaga S, Jeffery ND, Sasaki N, Nishimura R, Mochizuki M, et al. Prognostic value of magnetic resonance imaging in dogs with paraplegia caused by thoracolumbar intervertebral disk extrusion: 77 cases (2000–2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Nov 1;227(9):1454–60.

31. Bach FS, Mai W, Weber LFS, Villanova Junior JA, Bianchi de Oliveira L, Montiani-Ferreira F. Association between spinal cord compression ratio in magnetic resonance imaging, initial neurological status, and recovery after ventral slot in 57 dogs with cervical disc extrusion. *Front Vet Sci.* 2023 Jan 6;9:1029127.
32. Penning V, Platt SR, Dennis R, Cappello R, Adams V. Association of spinal cord compression seen on magnetic resonance imaging with clinical outcome in 67 dogs with thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *J Small Anim Pract.* 2006;47(11):644–50.
33. da Costa RC, De Decker S, Lewis MJ, Volk H; Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI). Diagnostic Imaging in Intervertebral Disc Disease. *Front Vet Sci.* 2020 Oct 22;7:588338.
34. Olby NJ, Müntana KR, Sharp NJH, Thrall DE. The Computed Tomographic Appearance of Acute Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniations in Dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2000;41(5):396–402.
35. Lewis MJ, Cohen EB, Olby NJ. Magnetic resonance imaging features of dogs with incomplete recovery after acute, severe spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2018 Feb;56(2):133–41.
36. Tidwell AS, Specht A, Blaeser L, Kent M. Magnetic Resonance Imaging Features of Extradural Hematomas Associated with Inter Vertebral Disc Herniation in a Dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 2002;43(4):319–24.
37. Levine J m., Fosgate G t., Chen A v., Rushing R, Nghiem P p., Platt S r., et al. Magnetic Resonance Imaging in Dogs with Neurologic Impairment Due to Acute Thoracic and Lumbar Intervertebral Disk Herniation. *J Vet Intern Med.* 2009;23(6):1220–6.
38. Shanmuganathan K, Zhuo J, Bodanapally UK, Kuladeep S, Aarabi B, Adams J, et al. Comparison of Acute Diffusion Tensor Imaging and Conventional Magnetic Resonance Parameters in Predicting Long-Term Outcome after Blunt Cervical Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2020 Feb 1;37(3):458–65.
39. Ryan TM, Platt SR, Llabres-Diaz FJ, McConnell JF, Adams VJ. Detection of spinal cord compression in dogs with cervical intervertebral disc disease by magnetic resonance imaging. *Vet Rec.* 2008 Jul 5;163(1):11–5.
40. Czarnecka A, Zimny A, Szewczyk P. Zaawansowane techniki rezonansu magnetycznego w diagnostyce guzów wewnątrzczaszkowych. *Pol Przegląd Neurol.* 2010;6(1):27–37.
41. Martín Noguero T, Barousse R, Amrhein TJ, Royuela-Del-Val J, Montesinos P, Luna A. Optimizing Diffusion-Tensor Imaging Acquisition for Spinal Cord Assessment: Physical Basis and Technical Adjustments. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* 2020;40(2):403–27.
42. Rajasekaran S, Kanna RM, Shetty AP. Diffusion tensor imaging of the spinal cord and its clinical applications. *J Bone Joint Surg Br.* 2012 Aug;94(8):1024–31.
43. Vedantam A, Jirjis MB, Schmit BD, Wang MC, Ulmer JL, Kurpad SN. Diffusion tensor imaging of the spinal cord: insights from animal and human studies. *Neurosurgery.* 2014 Jan;74(1):1–8; discussion 8; quiz 8.
44. Fujiyoshi K, Konomi T, Yamada M, Hikishima K, Tsuji O, Komaki Y, et al. Diffusion tensor imaging and tractography of the spinal cord: from experimental studies to clinical application. *Exp Neurol.* 2013 Apr;242:74–82.

45. Bosma R, Stroman PW. Diffusion tensor imaging in the human spinal cord: development, limitations, and clinical applications. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(1):1–20.
46. Rutman AM, Peterson DJ, Cohen WA, Mossa-Basha M. Diffusion Tensor Imaging of the Spinal Cord: Clinical Value, Investigational Applications, and Technical Limitations. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2018;47(4):257–69.
47. Wu TL, Byun NE, Wang F, Mishra A, Janve VA, Chen LM, et al. Longitudinal assessment of recovery after spinal cord injury with behavioral measures and diffusion, quantitative magnetization transfer and functional magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*. 2020 Apr;33(4):e4216.
48. Poplawski MM, Alizadeh M, Oleson CV, Fisher J, Marino RJ, Gorniak RJ, et al. Application of Diffusion Tensor Imaging in Forecasting Neurological Injury and Recovery after Human Cervical Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2019 Nov 1;36(21):3051–61.
49. Kaushal M, Shabani S, Budde M, Kurpad S. Diffusion Tensor Imaging in Acute Spinal Cord Injury: A Review of Animal and Human Studies. *J Neurotrauma*. 2019 Aug 1;36(15):2279–86.
50. Kelley BJ, Harel NY, Kim CY, Papademetris X, Coman D, Wang X, et al. Diffusion tensor imaging as a predictor of locomotor function after experimental spinal cord injury and recovery. *J Neurotrauma*. 2014 Aug 1;31(15):1362–73.
51. Li DC, Malcolm JG, Rindler RS, Baum GR, Rao A, Khurpad SN, et al. The role of diffusion tensor imaging in spinal pathology: A review. *Neurol India*. 2017;65(5):982–92.
52. Mulcahey MJ, Samdani A, Gaughan J, Barakat N, Faro S, Betz RR, et al. Diffusion tensor imaging in pediatric spinal cord injury: preliminary examination of reliability and clinical correlation. *Spine*. 2012 Jun 1;37(13):E797-803.
53. Mulcahey MJ, Samdani AF, Gaughan JP, Barakat N, Faro S, Shah P, et al. Diagnostic accuracy of diffusion tensor imaging for pediatric cervical spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2013 Jul;51(7):532–7.
54. Zaninovich OA, Avila MJ, Kay M, Becker JL, Hurlbert RJ, Martirosyan NL. The role of diffusion tensor imaging in the diagnosis, prognosis, and assessment of recovery and treatment of spinal cord injury: a systematic review. *Neurosurg Focus*. 2019 Mar 1;46(3):E7.
55. Li XH, Wu F, Zhao F, Huang SL. Fractional anisotropy is a marker in early-stage spinal cord injury. *Brain Res*. 2017 Oct 1;1672:44–9.
56. Mamata H, Jolesz FA, Maier SE. Apparent diffusion coefficient and fractional anisotropy in spinal cord: Age and cervical spondylosis-related changes. *J Magn Reson Imaging*. 2005;22(1):38–43
57. Costabile JD, Alaswad E, D'Souza S, Thompson JA, Ormond DR. Current Applications of Diffusion Tensor Imaging and Tractography in Intracranial Tumor Resection. *Front Oncol*. 2019 May 29;9:426.
58. Yan JL, van der Hoorn A, Larkin TJ, Boonzaier NR, Matys T, Price SJ. Extent of resection of peritumoral diffusion tensor imaging-detected abnormality as a predictor of survival in adult glioblastoma patients. *J Neurosurg*. 2017 Jan;126(1):234–41.
59. Elliott CA, Danyluk H, Aronyk KE, Au K, Wheatley BM, Gross DW, et al. Intraoperative acquisition of DTI in cranial neurosurgery: readout-segmented DTI versus standard single-shot DTI. *J Neurosurg*. 2019 Aug 16;1–10.

60. Dubey A, Kataria R, Sinha VD. Role of Diffusion Tensor Imaging in Brain Tumor Surgery. *Asian J Neurosurg*. 2018;13(2):302–6.
61. Abdullah KG, Lubelski D, Nucifora PGP, Brem S. Use of diffusion tensor imaging in glioma resection. *Neurosurg Focus*. 2013 Apr;34(4):E1.
62. Readdy WJ, Chan AK, Matijakovich DJ, Dhall SD. A review and update on the guidelines for the acute non-operative management of cervical spinal cord injury. *J Neurosurg Sci*. 2015 Jun;59(2):119–28.
63. Yue JK, Chan AK, Winkler EA, Upadhyayula PS, Readdy WJ, Dhall SS. A review and update on the guidelines for the acute management of cervical spinal cord injury - Part II. *J Neurosurg Sci*. 2016 Sep;60(3):367–84.
64. Yue JK, Upadhyayula PS, Chan AK, Winkler EA, Burke JF, Readdy WJ, et al. A review and update on the current and emerging clinical trials for the acute management of cervical spine and spinal cord injuries - Part III. *J Neurosurg Sci*. 2016 Dec;60(4):529–42.
65. Furlan JC, Fehlings MG. Cardiovascular complications after acute spinal cord injury: pathophysiology, diagnosis, and management. *Neurosurg Focus*. 2008;25(5):E13.
66. Srikandarajah N, Alvi MA, Fehlings MG. Current insights into the management of spinal cord injury. *J Orthop*. 2023 Jul;41:8–13.
67. Yue JK, Winkler EA, Rick JW, Deng H, Partow CP, Upadhyayula PS, et al. Update on critical care for acute spinal cord injury in the setting of polytrauma. *Neurosurg Focus*. 2017 Nov;43(5):E19.
68. Gadot R, Smith DN, Prablek M, Grochmal JK, Fuentes A, Ropper AE. Established and Emerging Therapies in Acute Spinal Cord Injury. *Neurospine*. 2022 Jun;19(2):283–96.
69. Shabani S, Meyer BP, Budde MD, Wang MC. Diagnostic Imaging in Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2021 Jul;32(3):323–31.
70. Shah LM, Ross JS. Imaging of Spine Trauma. *Neurosurgery*. 2016 Nov;79(5):626–42.
71. Kawakyu-O'Connor D, Bordia R, Nicola R. Magnetic Resonance Imaging of Spinal Emergencies. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2016 May;24(2):325–44.
72. Wolf M, Weber MA. Neuroimaging of the Traumatic Spine. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2016 Aug;24(3):541–61.
73. Shah LM, Flanders AE. Update on New Imaging Techniques for Trauma. *Neurosurg Clin N Am*. 2017 Jan;28(1):1–21.
74. Drotleff N, Jansen O, Weckwerth C, Aach M, Schildhauer TA, Waydhas C, et al. Pilot study: advanced haemodynamic monitoring after acute spinal cord injury-Keep the pressure up? *BMC Anesthesiol*. 2022 Sep 1;22(1):277.
75. Fehlings MG, Rabin D, Sears W, Cadotte DW, Aarabi B. Current practice in the timing of surgical intervention in spinal cord injury. *Spine*. 2010 Oct 1;35(21 Suppl):S166-173.
76. Piazza M, Schuster J. Timing of Surgery After Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2017 Jan 1;28(1):31–9.

77. Badhiwala JH, Wilson JR, Witiw CD, Harrop JS, Vaccaro AR, Aarabi B, et al. The influence of timing of surgical decompression for acute spinal cord injury: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Neurol*. 2021 Feb;20(2):117–26.
78. Badhiwala JH, Ahuja CS, Fehlings MG. Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2018 Dec 20;30(1):1–18.
79. Fehlings MG, Wilson JR, Harrop JS, Kwon BK, Tetreault LA, Arnold PM, et al. Efficacy and Safety of Methylprednisolone Sodium Succinate in Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Glob Spine J*. 2017 Sep;7(3 Suppl):116S-137S.
80. Fehlings MG, Wilson JR, Tetreault LA, et al. A Clinical Practice Guideline for the Management of Patients With Acute Spinal Cord Injury: Recommendations on the Use of Methylprednisolone Sodium Succinate. *Global Spine Journal*. 2017;7(3_suppl):203S-211S.
81. Li Z, Hou X, Liu X, Ma L, Tan J. Hyperbaric Oxygen Therapy-Induced Molecular and Pathway Changes in a Rat Model of Spinal Cord Injury: A Proteomic Analysis. Dose-Response Publ Int Hormesis Soc. 2022;20(4):15593258221141580.
82. Ahuja CS, Fehlings M. Concise Review: Bridging the Gap: Novel Neuroregenerative and Neuroprotective Strategies in Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jul;5(7):914–24.
83. Pourkhodadad S, Oryan SH, Kaka G, Sadraie SH. Neuroprotective Effects of Combined Treatment with Minocycline and Olfactory Ensheathing Cells Transplantation against Inflammation and Oxidative Stress after Spinal Cord Injury. *Cell J*. 2019 Jul;21(2):220–8.
84. Sonmez E, Kabatas S, Ozen O, Karabay G, Turkoglu S, Ogus E, et al. Minocycline treatment inhibits lipid peroxidation, preserves spinal cord ultrastructure, and improves functional outcome after traumatic spinal cord injury in the rat. *Spine*. 2013 Jul 1;38(15):1253–9.
85. Aras M, Altas M, Motor S, Dokuyucu R, Yilmaz A, Ozgiray E, et al. Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. *Injury*. 2015 Aug;46(8):1471–4.
86. Song YH, Agrawal NK, Griffin JM, Schmidt CE. Recent advances in nanotherapeutic strategies for spinal cord injury repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019 Aug;148:38–59.
87. Barros TEP, Araujo FFD, Higino LDP, Marcon RM, Cristante AF. The effect of monosialoganglioside (GM-1) administration in spinal cord injury. *Acta Ortop Bras*. 2016;24(3):123–6.
88. Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, et al. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics*. 2022 Jan 1;77:100006.
89. Gómez RM, Sánchez MY, Portela-Lomba M, Ghotme K, Barreto GE, Sierra J, et al. Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*. 2018 Jul;66(7):1267–301.
90. Lewis MJ, Granger N, Jeffery ND; Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI). Emerging and Adjunctive Therapies for Spinal Cord Injury Following Acute Canine Intervertebral Disc Herniation. *Front Vet Sci*. 2020 Oct 15;7:579933.
91. Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, Hill CE, Sparling JS, Plemel JR, et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011 Aug;28(8):1611–82.

92. McMahill BG, Borjesson DL, Sieber-Blum M, Nolta JA, Sturges BK. Stem cells in canine spinal cord injury--promise for regenerative therapy in a large animal model of human disease. *Stem Cell Rev Rep*. 2015 Feb;11(1):180–93.
93. Fan B, Wei Z, Feng S. Progression in translational research on spinal cord injury based on microenvironment imbalance. *Bone Res*. 2022 Apr 8;10(1):1–26.
94. Nuechterlein A, Feng L, Yehia A, Illes J. Strengths, gaps, and future directions on the landscape of ethics-related research for spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2023 Apr 18;1–6.
95. Zhang C, Talifu Z, Xu X, Liu W, Ke H, Pan Y, et al. MicroRNAs in spinal cord injury: A narrative review. *Front Mol Neurosci*. 2023 Feb 2;16:1099256.
96. Ning B, Gao L, Liu RH, Liu Y, Zhang NS, Chen ZY. microRNAs in Spinal Cord Injury: Potential Roles and Therapeutic Implications. *Int J Biol Sci*. 2014 Sep 6;10(9):997–1006.
97. Moore SA, Tipold A, Olby NJ, Stein V, Granger N; Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT SCI). Current Approaches to the Management of Acute Thoracolumbar Disc Extrusion in Dogs. *Front Vet Sci*. 2020 Sep 3;7:610.
98. Lawler PE, Wood JH, Alleva NE, Rishniw M, Porter I, Johnson PJ. Comparison of Surgical Outcomes Associated With Compression Secondary to Hemorrhage and Intervertebral Disk Extrusions in Dogs. *Front Vet Sci*. 2022 Jul 4;9:889113.
99. Takahashi F, Honnami A, Toki M, Dosaka A, Fujita Y, Hara Y, et al. Effect of durotomy in dogs with thoracolumbar disc herniation and without deep pain perception in the hind limbs. *Vet Surg*. 2020;49(5):860–9.
100. Freeman P, Jeffery N. Is decompression in acute thoracolumbar intervertebral disc herniation overvalued? *Front Vet Sci*. 2022 Nov 9;9:1049366.
101. Li XH, Li JB, He XJ, Wang F, Huang SL, Bai ZL. Timing of diffusion tensor imaging in the acute spinal cord injury of rats. *Sci Rep*. 2015 Jul 29;5:12639.
102. Zhao C, Rao JS, Pei XJ, Lei JF, Wang ZJ, Yang ZY, et al. Longitudinal study on diffusion tensor imaging and diffusion tensor tractography following spinal cord contusion injury in rats. *Neuroradiology*. 2016 Jun;58(6):607–14.
103. Wang-Leandro A, Hobert MK, Kramer S, Rohn K, Stein VM, Tipold A. The role of diffusion tensor imaging as an objective tool for the assessment of motor function recovery after paraplegia in a naturally-occurring large animal model of spinal cord injury. *J Transl Med*. 2018 Sep 17;16(1):258.
104. Yoon H, Park NW, Ha YM, Kim J, Moon WJ, Eom K. Diffusion tensor imaging of white and grey matter within the spinal cord of normal Beagle dogs: Sub-regional differences of the various diffusion parameters. *Vet J Lond Engl 1997*. 2016 Sep;215:110–7.
105. Liu C, Yang D, Li J, Li D, Yang M, Sun W, et al. Dynamic diffusion tensor imaging of spinal cord contusion: A canine model. *J Neurosci Res*. 2018;96(6):1093–103.
106. Lewis MJ, Early PJ, Mariani CL, Munana KR, Olby NJ. Influence of Duration of Injury on Diffusion Tensor Imaging in Acute Canine Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2020 Nov;37(21):2261–7.

107. Konishi Y, Satoh H, Kuroiwa Y, Kusaka M, Yamashita A, Asada Y, et al. Application of fiber tractography and diffusion tensor imaging to evaluate spinal cord diseases in dogs. *J Vet Med Sci.* 2017;79(2):418–24.
108. Hobert MK, Stein VM, Dziallas P, Ludwig DC, Tipold A. Evaluation of normal appearing spinal cord by diffusion tensor imaging, fiber tracking, fractional anisotropy, and apparent diffusion coefficient measurement in 13 dogs. *Acta Vet Scand.* 2013 Apr 24;55(1):36.
109. Talac R, Friedman JA, Moore MJ, Lu L, Jabbari E, Windebank AJ, et al. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials.* 2004 Apr 1;25(9):1505–10.
110. Weber-Levine C, Hersh AM, Jiang K, Routkevitch D, Tsehay Y, Perdomo-Pantoja A, et al. Porcine Model of Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Neurotrauma Rep.* 2022 Sep 1;3(1):352–68.
111. Ahmed RU, Knibbe CA, Wilkins F, Sherwood LC, Howland DR, Boakye M. Porcine spinal cord injury model for translational research across multiple functional systems. *Exp Neurol.* 2023 Jan 1;359:114267.
112. Zurita M, Aguayo C, Bonilla C, Otero L, Rico M, Rodríguez A, et al. The pig model of chronic paraplegia: a challenge for experimental studies in spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2012 Jun;97(3):288–303.
113. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabrià J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin Appl.* 2014 Oct;8(9–10):715–31.
114. Alisaukaite N, Spitzbarth I, Baumgärtner W, Dziallas P, Kramer S, Denning R, et al. Chronic post-traumatic intramedullary lesions in dogs, a translational model. *PLoS ONE.* 2017 Nov 22;12(11):e0187746.
115. Moore SA, Zidan N, Spitzbarth I, Nout-Lomas YS, Granger N, da Costa RC, et al. Development of an International Canine Spinal Cord Injury (CSCI) observational registry: a collaborative data-sharing network to optimize translational studies of SCI. *Spinal Cord.* 2018 Jul;56(7):656–65.
116. Moore SA, Granger N, Olby NJ, Spitzbarth I, Jeffery ND, Tipold A, et al. Targeting Translational Successes through CANSORT-SCI: Using Pet Dogs To Identify Effective Treatments for Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2017 Jun 15;34(12):2007–18.
117. Wang K, Song Q, Zhang F, Chen Z, Hou C, Tang Y, et al. Age-related changes of the diffusion tensor imaging parameters of the normal cervical spinal cord. *Eur J Radiol.* 2014 Dec;83(12):2196–202.
118. Wei LF, Wang SS, Zheng ZC, Tian J, Xue L. Analysis of the diffusion tensor imaging parameters of a normal cervical spinal cord in a healthy population. *J Spinal Cord Med.* 2017 May;40(3):338–45.
119. Barakat N, Mohamed FB, Hunter LN, Shah P, Faro SH, Samdani AF, et al. Diffusion tensor imaging of the normal pediatric spinal cord using an inner field of view echo-planar imaging sequence. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012 Jun;33(6):1127–33.
120. Saksena S, Middleton DM, Krisa L, Shah P, Faro SH, Sinko R, et al. Diffusion Tensor Imaging of the Normal Cervical and Thoracic Pediatric Spinal Cord. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016 Nov;37(11):2150–7.

121. Chan TY, Li X, Mak KC, Cheung JP yin, Luk KDK, Hu Y. Normal values of cervical spinal cord diffusion tensor in young and middle-aged healthy Chinese. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc*. 2015 Dec;24(12):2991–8.
122. Graham ML, Prescott MJ. The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jul 15;759:19–29.
123. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Anim Open Access J MDPI*. 2019 Sep 30;9(10):754.
124. Singhi S, Tekes A, Thurnher M, Gilson WD, Izbudak I, Thompson CB, et al. Diffusion tensor imaging of the maturing paediatric cervical spinal cord: from the neonate to the young adult. *J Neuro-radiol J Neuroradiol*. 2012 Jul;39(3):142–8.
125. Toossi A, Bergin B, Marefatallah M, Parhizi B, Tyreman N, Everaert DG, et al. Comparative neuroanatomy of the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, pig, monkey, and human. *Sci Rep*. 2021 Jan 21;11(1):1955.
126. Faria AV, Zhang J, Oishi K, Li X, Jiang H, Akhter K, et al. Atlas-based analysis of neurodevelopment from infancy to adulthood using diffusion tensor imaging and applications for automated abnormality detection. *NeuroImage*. 2010 Aug 15;52(2):415–28.
127. Giorgio A, Watkins KE, Douaud G, James AC, James S, De Stefano N, et al. Changes in white matter microstructure during adolescence. *NeuroImage*. 2008 Jan 1;39(1):52–61.
128. Reynolds BB, By S, Weinberg QR, Witt AA, Newton AT, Feiler HR, et al. Quantification of DTI in the Pediatric Spinal Cord: Application to Clinical Evaluation in a Healthy Patient Population. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2019 Jul;40(7):1236–41.
129. Alizadeh M, Fisher J, Saksena S, Sultan Y, Conklin CJ, Middleton DM, et al. Age related diffusion and tractography changes in typically developing pediatric cervical and thoracic spinal cord. *NeuroImage Clin*. 2018;18:784–92.
130. Taso M, Girard OM, Duhamel G, Le Troter A, Feiweier T, Guye M, et al. Tract-specific and age-related variations of the spinal cord microstructure: a multi-parametric MRI study using diffusion tensor imaging (DTI) and inhomogeneous magnetization transfer (ihMT). *NMR Biomed*. 2016 Jun;29(6):817–32.
131. Kuhn FP, Feydy A, Launay N, Lefevre-Colau MM, Poiraudreau S, Laporte S, et al. Kinetic DTI of the cervical spine: diffusivity changes in healthy subjects. *Neuroradiology*. 2016 Sep;58(9):929–35.
132. Mohamed FB, Hunter LN, Barakat N, Liu CSJ, Sair H, Samdani AF, et al. Diffusion Tensor Imaging of the Pediatric Spinal Cord at 1.5T: Preliminary Results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Feb;32(2):339–45.
133. Ellingson BM, Ulmer JL, Kurpad SN, Schmit BD. Diffusion tensor MR imaging of the neurologically intact human spinal cord. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008 Aug;29(7):1279–84.
134. Smith SA, Jones CK, Gifford A, Belegu V, Chodkowski B, Farrell JAD, et al. Reproducibility of tract-specific magnetization transfer and diffusion tensor imaging in the cervical spinal cord at 3 tesla. *NMR Biomed*. 2010 Feb;23(2):207–17.

135. Vedantam A, Jirjis MB, Schmit BD, Wang MC, Ulmer JL, Kurpad SN. Characterization and limitations of diffusion tensor imaging metrics in the cervical spinal cord in neurologically intact subjects. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2013 Oct;38(4):861–7.
136. Wheeler-Kingshott CAM, Hickman SJ, Parker GJM, Ciccarelli O, Symms MR, Miller DH, et al. Investigating cervical spinal cord structure using axial diffusion tensor imaging. *NeuroImage*. 2002 May;16(1):93–102.
137. Uda T, Takami T, Sakamoto S, Tsuyuguchi N, Yamagata T, Ohata K. Normal variation of diffusion tensor parameters of the spinal cord in healthy subjects at 3.0-Tesla. *J Craniovertebral Junction Spine*. 2011;2(2):77–81.
138. Song T, Chen WJ, Yang B, Zhao HP, Huang JW, Cai MJ, et al. Diffusion tensor imaging in the cervical spinal cord. *Eur Spine J*. 2011 Mar;20(3):422–8.
139. Kulisiewicz, J.; Iniariski, R.; Koslacz, J.; Obidzinski, W. Selection intensity in some of Polish Large White pig breeding centres. *Ann. Anim. Sci.* 1992, 19, 23–34.
140. Bollen P, Ritskes-Hoitinga M. The welfare of pigs and minipigs. In: *The welfare of laboratory animals*. 2007. p. 275–89.
141. Murtaugh, M.P.; Monteiro-Riviere, N.A.; Panepinto, L. Swine Research Breeds, Methods, and Biomedical Models. In *Advances in Swine in Biomedical Research*; Tumbleson, M.E., Schook, L.B., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1996.
142. Gutierrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front Genet*. 2015;6:293.
143. Bhatena SJ, Berlin E, Johnson WA. The Minipig as a Model for the Study of Aging in Humans. In: Tumbleson ME, Schook LB, editors. *Advances in Swine in Biomedical Research: Volume 2*. Boston, MA: Springer US; 1996, p. 571–9.
144. Rossi C, Boss A, Lindig TM, Martirosian P, Steidle G, Maetzler W, et al. Diffusion tensor imaging of the spinal cord at 1.5 and 3.0 Tesla. *ROFO Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed*. 2007 Mar;179(3):219–24.
145. de Lahunta A, Glass E, Kent M, editors. *Front Matter*. In: *de Lahunta's Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology (Fifth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2021, p. iii.
146. Lin A, Lampe R, Bandt C, Vieson M, Park JY. Case report: Clinical and pathological findings in a canine patient with intervertebral disk extrusion resembling progressive myelomalacia. *Front Vet Sci*. 2023 Mar 16;10:1122566.
147. Okada M, Kitagawa M, Ito D, Itou T, Kanayama K, Sakai T. Magnetic resonance imaging features and clinical signs associated with presumptive and confirmed progressive myelomalacia in dogs: 12 cases (1997-2008). *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Nov 15;237(10):1160–5.
148. Cordle KJ, Seiler GS, Barnes D, Olby NJ. MRI features can help to confirm a diagnosis of progressive myelomalacia, but may not be accurate in dogs lacking characteristic clinical signs at the time of imaging. *Vet Radiol Ultrasound*. 2023;64(2):283–93.

149. Nakamoto Y, Uemura T, Hasegawa H, Nakamoto M, Ozawa T. Outcomes of dogs with progressive myelomalacia treated with hemilaminectomy or with extensive hemilaminectomy and durotomy. *Vet Surg.* 2021;50(1):81–8.
150. Hirano R, Asahina R, Hirano T, Hyakkoku A, Miura R, Kunihiro T, et al. Outcomes of extensive hemilaminectomy with durotomy on dogs with presumptive progressive myelomalacia: a retrospective study on 34 cases. *BMC Vet Res.* 2020 Dec 7;16:476.
151. Balducci F, Canal S, Contiero B, Bernardini M. Prevalence and Risk Factors for Presumptive Ascending/Descending Myelomalacia in Dogs after Thoracolumbar Intervertebral Disk Herniation. *J Vet Intern Med.* 2017;31(2):498–504.
152. Castel A, Olby NJ, Ru H, Mariani CL, Muñana KR, Early PJ. Risk factors associated with progressive myelomalacia in dogs with complete sensorimotor loss following intervertebral disc extrusion: a retrospective case-control study. *BMC Vet Res.* 2019 Dec 3;15(1):433.
153. Pease A, Miller R. The use of diffusion tensor imaging to evaluate the spinal cord in normal and abnormal dogs. *Vet Radiol Ultrasound Off J Am Coll Vet Radiol Int Vet Radiol Assoc.* 2011;52(5):492–7.
154. Mori S, Zhang J. Principles of Diffusion Tensor Imaging and Its Applications to Basic Neuroscience Research. *Neuron.* 2006 Sep 7;51(5):527–39.
155. Wang-Leandro A, Siedenburg JS, Hobert MK, Dziallas P, Rohn K, Stein VM, et al. Comparison of Preoperative Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Clinical Assessment of Deep Pain Perception as Prognostic Tools for Early Recovery of Motor Function in Paraplegic Dogs with Intervertebral Disk Herniations. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):842–8.
156. Woelfel CW, Robertson JB, Mariani CL, Muñana KR, Early PJ, Olby NJ. Outcomes and prognostic indicators in 59 paraplegic medium to large breed dogs with extensive epidural hemorrhage secondary to thoracolumbar disc extrusion. *Vet Surg.* 2021;50(3):527–36.
157. Greene SA. Chronic pain: pathophysiology and treatment implications. *Top Companion Anim Med.* 2010 Feb;25(1):5–9.
158. Moore SA. Managing Neuropathic Pain in Dogs. *Front Vet Sci.* 2016 Feb 22;3:12.
159. Gruen ME, Lascelles BDX, Colleran E, Gottlieb A, Johnson J, Lotsikas P, et al. 2022 AAHA Pain Management Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2022 Mar 1;58(2):55–76.
160. Belshaw Z, Yeates J. Assessment of quality of life and chronic pain in dogs. *Vet J Lond Engl* 1997. 2018 Sep;239:59–64.
161. Davis KN, Hellyer PW, Carr ECJ, Wallace JE, Kogan LR. Qualitative study of owner perceptions of chronic pain in their dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2019 Jan 1;254(1):88–92.
162. Brown EA, Dickinson PJ, Mansour T, Sturges BK, Aguilar M, Young AE, et al. FGF4 retrogene on CFA12 is responsible for chondrodystrophy and intervertebral disc disease in dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 24;114(43):11476–81.
163. Jensen VF, Ersbøll AK. Mechanical factors affecting the occurrence of intervertebral disc calcification in the dachshund—a population study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2000 Jun;47(5):283–96.

164. Packer RMA, Seath IJ, O'Neill DG, De Decker S, Volk HA. Dachslife 2015: an investigation of lifestyle associations with the risk of intervertebral disc disease in Dachshunds. *Canine Genet Epidemiol.* 2016;3:8.
165. Aikawa T, Shibata M, Asano M, Hara Y, Tagawa M, Orima H. A Comparison of Thoracolumbar Intervertebral Disc Extrusion in French Bulldogs and Dachshunds and Association With Congenital Vertebral Anomalies. *Vet Surg.* 2014;43(3):301–7.
166. Poli F, Calistri M, Meucci V, Di Gennaro G, Baroni M. Prevalence, clinical features, and outcome of intervertebral disc extrusion associated with extensive epidural hemorrhage in a population of French Bulldogs compared to Dachshunds. *J Vet Med Sci.* 2022 Sep;84(9):1307–12.
167. Dickinson PJ, Bannasch DL. Current Understanding of the Genetics of Intervertebral Disc Degeneration. *Front Vet Sci.* 2020 Jul 24;7:431.
168. Wang-Leandro A, Hobert MK, Alisauskaitė N, Dziallas P, Rohn K, Stein VM, et al. Spontaneous acute and chronic spinal cord injuries in paraplegic dogs: a comparative study of in vivo diffusion tensor imaging. *Spinal Cord.* 2017 Dec;55(12):1108–16.
169. Lewis MJ, Yap PT, McCullough S, Olby NJ. The Relationship between Lesion Severity Characterized by Diffusion Tensor Imaging and Motor Function in Chronic Canine Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2018 Feb 1;35(3):500–7.
170. Yoon H, Moon WJ, Nahm SS, Kim J, Eom K. Diffusion Tensor Imaging of Scarring, Necrosis, and Cavitation Based on Histopathological Findings in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury: Evaluation of Multiple Diffusion Parameters and Their Correlations with Histopathological Findings. *J Neurotrauma.* 2018 Jun 15;35(12):1387–97.
171. Shinn R, Riffe A, Edwards M, Rossmeisl J. MRI diffusion tensor imaging scalar values in dogs with intervertebral disc herniation: A comparison between manual and semiautomated region of interest methods. *Vet Radiol Ultrasound.* 2022;63(6):753–62.
172. Agarwal N, Aabedi AA, Torres-Espin A, Chou A, Wozny TA, Mummaneni PV, et al. Decision tree-based machine learning analysis of intraoperative vasopressor use to optimize neurological improvement in acute spinal cord injury. *Neurosurg Focus.* 2022 Apr 1;52(4):E9.
173. Khan O, Badhiwala JH, Wilson JRF, Jiang F, Martin AR, Fehlings MG. Predictive Modeling of Outcomes After Traumatic and Nontraumatic Spinal Cord Injury Using Machine Learning: Review of Current Progress and Future Directions. *Neurospine.* 2019 Dec;16(4):678–85.
174. Biercher A, Meller S, Wendt J, Caspari N, Schmidt-Mosig J, De Decker S, Volk HA. Using Deep Learning to Detect Spinal Cord Diseases on Thoracolumbar Magnetic Resonance Images of Dogs. *Front Vet Sci.* 2021 Nov 2;8:721167.
175. Shinn RL, Pancotto TE, Stadler KL, Werre SR, Rossmeisl JH. Magnetization transfer and diffusion tensor imaging in dogs with intervertebral disk herniation. *J Vet Intern Med.* 2020;34(6):2536–44.
176. Boekhoff TM, Flieshardt C, Ensinger EM, Fork M, Kramer S, Tipold A. Quantitative Magnetic Resonance Imaging Characteristics: Evaluation of Prognostic Value in the Dog as a Translational Model for Spinal Cord Injury. *Clin Spine Surg.* 2012 May;25(3):E81.
177. Owsieńska-Schmidt KB, Drobot P, Zimny A, Wrzosek MA. Porcine Model of the Growing Spinal Cord—Changes in Diffusion Tensor Imaging Parameters. *Animals.* 2023 Jan;13(4):565.

Publikacja