



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I CHIRURGII RĘKI

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Andrzej Żyłuk

ul. Unii Lubelskiej 1 71-252 Szczecin

☎ tel. / ☎ fax: 091-425-31-96

Szczecin, 20 grudnia 2017

Recenzja pracy doktorskiej lek. Adama Bobkiewicza pt. Zastosowanie pochewki epineuralnej jako nowej metody zapobiegającej tworzenie nerwiaków pourazowych w modelu doświadczalnym szczura”

Nerwiaki powstające w następstwie uszkodzeń nerwów są dosyć trudnym i nadal nierozwiązanym problemem klinicznym. Do ich powstania dochodzi w różnych sytuacjach, np. w kikucie amputowanego palca lub kończyny, po przypadkowym zranieniu nerwu wskutek urazu lub w czasie operacji. Nerwiak jest źródłem nieprzyjemnych dolegliwości bólowych pojawiających się przy jego dotyku lub w czasie ruchów palcem lub ręką. Przez to, powoduje także osłabienie i pogorszenie sprawności kończyny. Przyczyny powstawania nerwiaków nie są dobrze poznane i nie wiadomo, dlaczego u jednej osoby, po amputacji palca i zaopatrzeniu kikuta rozwija się nerwiak nerwu palcowego, a u drugiej, zaopatrzonej identycznie - nie. Zidentyfikowano kilka czynników sprzyjających powstawaniu nerwiaków i jednym z istotnych jest rodzaj uszkodzonego nerwu. Bolesne nerwiaki powstają stosunkowo często po uszkodzeniu gałązek czuciowych (skórnych) nerwów promieniowego, łokciowego i pośrodkowego na przedramieniu i nadgarstku. Problemem są także (choć rzadziej) nerwiaki w kikutach amputowanych palców. Praca lek. Adama Bobkiewicza dotyczy sprawdzenie skuteczności nowej techniki zaopatrywania kikuta przeciętego nerwu w zapobieganiu powstawania nerwiaka. Zastosowana technika polega na naszcyciu na koniec bliższy przeciętego nerwu pochewki epineuralnej, wypreparowanej wcześniej z wyciętego fragmentu nerwu. Ten sposób - w założeniu - ma zapobiegać wzrostowi aksonów i przez to formowaniu się nerwiaka. Podjęte przez autora badania wydają się być dobrze uzasadnione, wpisujące się w aktualne trendy w tej dziedzinie nauki i mające wymiar praktyczny.

Przedstawiona do recenzji praca jest opracowanym maszynopisem, liczącym 99 stron, z czego 15 stron stanowi wstęp, 18 stron opis materiału i metodyki, 24 strony stanowią wyniki i 10 stron to dyskusja. W pracy jest 37 rycin i 11 tabel, większość wyników podanych jest w formie tabel, wykresów i rycin. Piśmiennictwo liczy 135 pozycji ułożonych w kolejności cytowania w tekście. Układ pracy jest zatem typowy.

Ocena poszczególnych części pracy

Wstęp jest napisany rzeczowo i prawidłowo przedstawia problem badawczy.

Autor prawidłowo sformułował **4 cele pracy**:

- a. Wypreparowanie pochewki epineuralnej z nerwu kulszowego i jej zastosowanie w zapobieganiu tworzenia się nerwiaka pourazowego w modelu nerwu kulszowego szczura
- b. Ocena integralności i skuteczności zastosowania pochewki epineuralnej w okresie 12 i 24 tygodniowej obserwacji
- c. Ocena wpływu ochronnego pochewki epineuralnej na układ przestrzenny aksonów i ilość tkanki łącznej w kikucie nerwu

A.Żyłuk

- d. Porównanie efektywności zastosowania pochewki epineuralnej i techniki implantacji kikuta nerwu do mięśnia w zapobieganiu nerwiakom pourazowym

Materiał i metodyka

Badania przeprowadzono w Laboratorium Mikrochirurgii Oddziału Chirurgii Plastycznej, Cleveland Clinic w Cleveland, USA. Operacje wykonano na 72 szczurach rasy Lewis. Zwierzęta podzielono na 6 grup, po 12 szczurów w każdej grupie. Jako model do tworzenia się nerwiaka wzięto prawy nerw kulszowy, w którym wykonywano wycięcie 2 cm fragmentu w odcinku udowym.

- W grupie 1 wykonywano wycięcie 2 cm nerwu kulszowego w odcinku udowym, a kikut bliższy pozostawiano bez zabezpieczenia (grupa kontrolna I)
- W grupie 2, po wycięciu 2 cm nerwu kulszowego, jego kikut bliższy wszywano do mięśnia (grupa kontrolna II).
- W grupie 3, po wycięciu 2 cm nerwu kulszowego, na jego kikut bliższy naszywano wcześniej wypreparowaną pochewkę epineuralną
- W grupie 4, po wycięciu 2 cm nerwu kulszowego, na jego kikut bliższy naszywano wcześniej wypreparowaną pochewkę epineuralną i koniec nerwu wszywano w mięsień
- W grupie 5, po wycięciu 2 cm nerwu kulszowego, na jego kikut bliższy naszywano wcześniej wypreparowaną pochewkę epineuralną, wypełnioną własną tkanką tłuszczową
- W grupie 6, po wycięciu 2 cm nerwu kulszowego, na jego kikut bliższy naszywano wcześniej wypreparowaną pochewkę epineuralną wypełnioną własną tkanką tłuszczową i koniec nerwu wszywano w mięsień

Ponadto, wszystkie szczury były operowane jeszcze raz na 10 dni przez uśmierceniem. Dokonywano wtedy wstrzyknięcia do kikuta nerwu barwnika neuronalnego w celu oceny liczby komórek nerwowych w zwojach L4 i L5 korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego.

Dla oceny wyników w 2 odstępach czasowych, 12 zwierząt w każdej z 6 grup podzielono po połowie; jedną połowę uśmiercano po 12 tygodniach od pierwszej operacji, a drugą połowę zwierząt uśmiercano po 24 tygodniach.

Ocena wyników eksperymentu obejmowała testy kliniczne oraz ocenę makro- i mikroskopową fragmentu kikuta bliższego operowanego nerwu i zwojów L4 i L5 korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego, odpowiadających temu nerwowi. Ocenę kliniczną przeprowadzano raz na tydzień w ciągu całego okresu obserwacji. Polegała ona na monitorowaniu przyrostu masy ciała, obserwacji zachowań samookaleczających, badaniu objawu Tinela-Hoffmana w miejscu operowanego nerwu i badaniu testu uszczypnięcia (ang. pinprick test).

Makro- i mikroskopową ocenę morfologii kikuta nerwu i zwojów korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego wykonywano dwukrotnie, po 12 i 24 tygodniach od operacji, stosując do badania mikroskopowego stosownie utrwalone i wybarwione próbki pobrane z nerwów.

Analizę statystyczną wyników wykonano za pomocą zestawu testów, użytych stosownie do ocenianych zmiennych.

Metodyka pracy jest dobrana bardzo dobrze i opisana wyczerpująco.

Wyniki

Ocena kliniczna. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami, ani w I ani w II okresie obserwacji, w zakresie przyrostu masy ciała, częstości zachowań samookaleczających i występowania dodatniego testu uszczypnięcia. Występowanie dodatniego objawu Tinela-Hoffmana w miejscu

operowanym było częstsze w obu grupach kontrolnych (67% i 50%), niż w grupach badanych, gdzie nie przekraczała 33%. Ponieważ dodatni objaw Tinela-Hoffmana wskazuje na tworzenie się nerwiaka, można stwierdzić, że w grupach gdzie kikuty nerwów były zaopatrzone różnymi wariantami pochewek epineuralnych, powstawało mniej nerwiaków. Autor nie podał jednak, czy różnice były istotne statystycznie.

Badanie makro- i mikroskopowe wykazało następujące różnice między badanymi grupami. Średnica bliższego kikuta nerwu była największa w grupie I, gdzie był on pozostawiony bez żadnej interwencji. Dotyczyło to obu okresów obserwacji, przy czym w I okresie (po 12 tyg), różnice były statystycznie istotne między grupami I i wszystkimi grupami badanymi, a w II okresie (po 24 tyg) tylko między grupami I a III („czysta” pochewka epineuralna). Choć autor tego nie podaje, to z tabeli 8 wynika, że różnice w grubości bliższych kikutów nerwowych między grupą II a grupami badanymi (III-VI) nie były istotnie statystycznie, a to wskazuje, że pod tym względem obie techniki zaopatrzenia kikuta były równorzędne.

Badanie częstości występowania zrostów okołonerwowych wykazało, że było ich najwięcej w grupie I, w porównaniu z pozostałymi. Różnice były statystycznie istotne w obu okresach obserwacji. Wynik ten świadczy, że nie było różnic w częstości występowania zrostów okołonerwowych między grupą II a grupami badanymi, a to wskazuje, że pod tym względem obie techniki zaopatrzenia kikuta były równorzędne.

Tworzenie i rozprzestrzenianie się wypustek włókien nerwowych było największe w grupie I, w porównaniu z pozostałymi. Różnice były statystycznie istotne w obu okresach obserwacji. W grupach badanych (z pochewką epineuralną) praktycznie nie obserwowano tworzenia się wypustek nerwowych. Natomiast tworzyły się one w grupie II (kikut wszyty w mięsień), jednak było ich statystycznie istotnie mniej, niż w grupie I. Choć autor tego nie podaje, to z tabeli 9 wynika, że różnice w ilości wypustek włókien nerwowych między grupą II a grupami badanymi nie były istotnie statystycznie, a to wskazuje, że pod tym względem obie techniki zaopatrzenia kikuta były równorzędne.

Liczba komórek nerwowych w zwojach L4 i L5 korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego. Średnia liczba neuronów w badaniu po 12 tygodniach była większa w grupach badanych, niż w kontrolnych, ale bez istotności statystycznej. W badaniu po 24 tygodniach różnice między poszczególnymi grupami były trudne do interpretacji, przy czym największą liczbę komórek nerwowych w zwojach L4 i L5 zanotowano w grupie III („czysta” pochewka epineuralna). Nie było natomiast istotnych różnic między grupą II (kikut wszyty w mięsień) a grupami badanymi IV-VI.

Układ włókien nerwowych i stosunek zawartości tkanki nerwowej do tkanki łącznej w kikucie nerwu. Te parametry badano po zabarwieniu próbki pobranej z kikuta nerwu barwnikami masson trichrome, S100 i błękitem toluidyny. W grupie I układ włókien nerwowych i komórek Schwanna w próbce był chaotyczny i widoczny był brak organizacji włókien w pęczki. Stopień mielinizacji włókien był także istotnie mniejszy. W grupie II architektonika nerwu była zachowana, ale stopień mielinizacji i organizacji włókien w pęczki niepełny, choć większy, niż w grupie I. We wszystkich grupach badanych organizacja włókien nerwowych, rozmieszczenie komórek Schwanna i stopień mielinizacji włókien były największe, a struktura kikuta była podobna do zdrowego nerwu. Stwierdzono także, że zawartość tkanki nerwowej w stosunku do łącznej była statystycznie istotnie większa w grupach II-VI, niż w grupie I.

Wyniki przedstawiono w formie wykresów i opisu. Ta część pracy jest dosyć trudna do przebrnięcia dla czytającego ze względu na brak wyników obliczeń statystycznych w tabelach, przez co trzeba ich poszukiwać w

wysiłku w jej realizację, a uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie cenny wkład we wzbogacenie naszej wiedzy o zapobieganiu patologicznych zjawisk w obrębie układu nerwowego. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego UM w Poznaniu wnioski o dopuszczenie lek. Adama Bobkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Andrzej Żyłuk
Klinika Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

KIEROWNIK
Kliniki Chirurgii Ogólnej
i Chirurgii Ręki

AŻyłuk

prof. dr hab. n. med. Andrzej Żyłuk



tekście. Ponadto brakuje podsumowania po każdą z tabel, szczególnie tam, gdzie ich zawartość jest trudna do interpretacji (np. tabela 7). Te niedociągnięcia nie wpływają jednak na ogólną ocenę uzyskanych wyników, które uważam za wiarygodne.

Dyskusja

Dyskusja zawiera dosyć długie, ale rzeczowe omówienie uzyskanych wyników i ich odniesienie do aktualnej wiedzy w tej dziedzinie. W dyskusji poświęciłbym nieco czasu na porównanie wyników zaopatrzenia kikuta nerwu nową techniką i tradycyjnego wszywania go w mięsień. Wyniki tej pracy wskazują, że pod względem większości badanych parametrów obie te techniki były podobnie skuteczne w zapobieganiu tworzeniu się nerwiaka, a gorsze wyniki były wynikiem wysunięcia się nerwu z tunelu w mięśniu, co można uznać za niepowodzenie techniczne wykonanej procedury. Podobnie można by interpretować np. zsuniecie się pochewki epineuralnej z kikuta (do czego w tej pracy nie doszło, ale można to sobie wyobrazić). Drugim wątkiem, nieco pominiętym w dyskusji jest interpretacja wyników uzyskanych w 4 grupach badanych. Faktycznie autor nie ocenił wartości modyfikacji podstawowej techniki naszycia na koniec bliższy przeciętego nerwu pochewki epineuralnej, w postaci wstrzyknięcia do niej tkanki tłuszczowej i wszycia w mięsień. Nie napisał, czy poprawiają one wyniki, czy nie mają znaczenia. Autor w dyskusji rozwija kilka wątków, co sprawia, że jest ona interesująca i pogładowa.

Wnioski są prawidłowo sformułowane i odpowiadają na założone cele pracy.

Piśmiennictwo jest obszerne i dobrze dobrane

Ogólna ocena pracy

Niezależnie od wyrażonych kilku krytycznych uwag, dotyczących głównie interpretacji wyników w odniesieniu do grupy II, uważam, że jest to bardzo dobrze zaprojektowana praca doświadczalna, wykonana w laboratorium o światowej renomie. Znakomity warsztat badawczy - operacje mikrochirurgiczne cieniutkich nerwów, preparowanie pochewek epineuralnych, wstrzykiwanie barwnika do nerwu, metodyka badania mikroskopowego próbek - to wszystko wywołuje mój podziw i aprobatę. Ponadto bardzo dobrze dobrany zestaw metod oceny wyników tego eksperymentu, co u zwierzęcia doświadczalnego jest bardzo trudne. Bardzo dobre preparaty histologiczne, świadczące znów o doskonałym warsztacie doktoranta. Trochę gorzej przedstawiają się tylko obliczenia statystyczne, nie wszędzie zastosowane i przedstawione w sposób nieco chaotyczny. Praca także wyróżnia się pod względem edytorskim, jest staranna i dobrze ilustrowana.

Jeśli chodzi o interpretację uzyskanych wyników, to mam nieco zastrzeżeń, które przedstawiłem wcześniej, ale nie wpływają one istotnie ujemnie na ogólne wrażenie o pracy. Różnice w interpretacji wyników, szczególnie w tak złożonej metodycznie pracy doświadczalnej nie są czymś nadzwyczajnym.

Końcowa ocena pracy

Uważam, że praca lek. Adama Bobkiewicza stanowi bardzo wartościowy wkład w poznanie mechanizmów tworzenia się nerwiaków w kikutach nerwów i sposobów zapobiegania ich powstawaniu. Opisana i przetestowana technika zaopatrzenia kikuta nerwu może być użyta w praktyce i przez to wzbogacić asortyment metod używanych w leczeniu nerwiaków pourazowych. Poza bardzo dobrym wykonaniem pracy doświadczalnej, jej praktyczny aspekt ma kapitalne znaczenie.

Przedstawiona mi do recenzji praca lek. Adama Bobkiewicza jest owocem dobrego projektu badawczego, zrealizowanego starannie i za pomocą właściwie dobranych metod. Wykonawca i autor pracy włożył dużo