Rozwój unerwienia stawu biodrowego u psa domowego (*canis familiaris*).

Lek. wet. Małgorzata Malina

Promotor: dr. hab. Waldemar Sienkiewicz, prof. UWM

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składam mojemu promotorowi, dr hab., prof. UWM Waldemarowi Sienkiewiczowi za okazaną przez te wszystkie lata pomoc, mnóstwo czasu poświęconego w trakcie prac nad niniejszą rozprawą. Dziękuję za ogromną cierpliwość i wiedzę przekazaną mi, aby praca a mogła powstać. Dzięki Jego wsparciu czułam że temat, który realizuję jest ważny a praca nad nim sprawiała mi to radość.

Chciałabym również podziękować całemu zespołowi Katedry Anatomii Zwierząt, za to że zawsze byli gotowi pomóc mi gdy tej pomocy potrzebowałam. Dziękuję za wsparcie i cenne wskazówki wszystkim Kolegom i Koleżankom, ale szczególnie prof. dr hab. Jerzemu Kaleczycowi, kierownikowi Katedry Anatomii Zwierząt, gdzie praca ta powstała.

Słowa podziękowania należą się też moim bliskim i znajomym, którzy wspierali mnie w chwilach zwątpienia, odciążali mnie w obowiązkach i wspierali mnie duchowo.

Bardzo dziękuję też moim Rodzicom, którym tą pracę dedykuję. Zawsze byliście dla mnie oparciem, szczególnie w chwilach zwątpienia.

Dziękuję bardzo.

Spis treści

1. **Strona tytułowa** **1.**
2. **Podziękowania** **2.**
3. **Spis treści** **3.**
4. **Skróty użyte w pracy** **4.**
5. **Wstęp** **5.**
6. **Cel pracy** **18.**
7. **Materiał i metody** **19.**
8. **Materiał do badań** **19.**
9. **Badania preparacyjne** **20.**
10. **Barwienie immunohistochemiczne** **20.**
11. **Kontrola specyficzności przeciwciał** **21.**
12. **Analiza mikroskopowa** **21.**
13. **Wyniki** **22.**
14. **Wyniki grupa I** **22.**
15. **Badania preparacyjne** **22.**
16. **Barwienia immunohistochemiczne** **22.**
17. **Wyniki grupa II** **24.**
18. **Badania preparacyjne** **24.**
19. **Barwienia immunohistochemiczne** **29.**
20. **Wyniki grupa III** **33.**
21. **Badania preparacyjne** **33.**
22. **Barwienia immunohistochemiczne** **35.**
23. **Wyniki grupa IV** **42.**
24. **Badania preparacyjne** **42.**
25. **Barwienia immunohistochemiczne** **48.**
26. **Dyskusja** **54.**
27. **Wnioski** **63.**
28. **Streszczenie** **65.**
29. **Abstract** **67.**
30. **Literatura** **69.**

Lista skrótów użytych w pracy

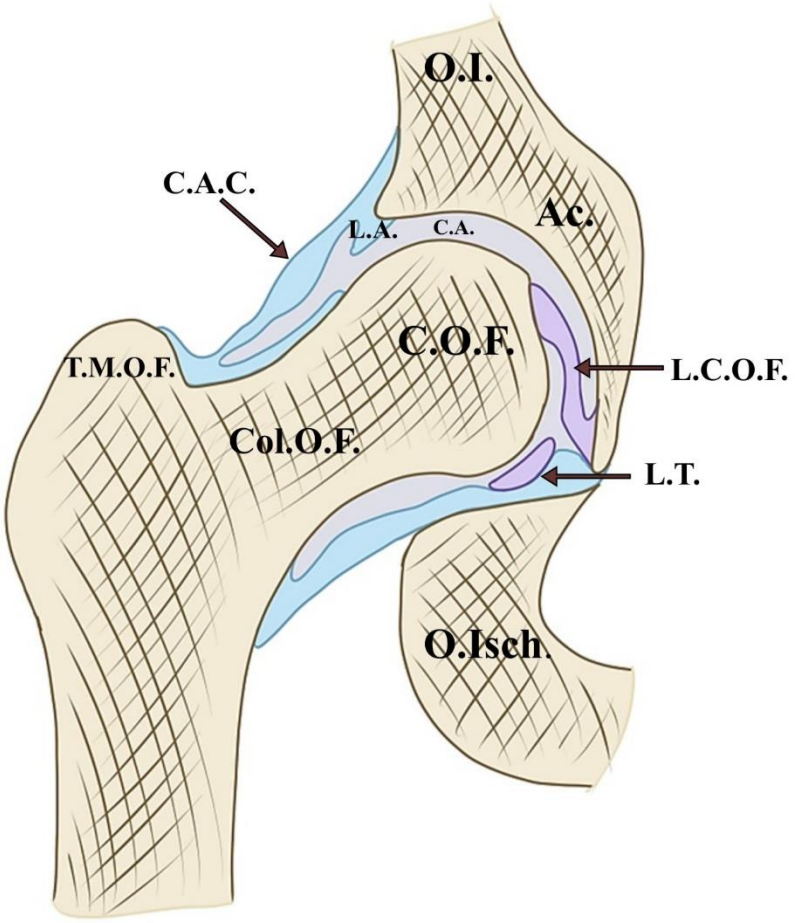
7.L.V. – siódmy kręg lędźwiowy
A.c. - panewka miednicy
A.F. – tętnicza udowa
A.S. – tętnica dostopowa
Ac. tub. – acetylowana tubulina
Bł. mazi. – błona maziowa torebki stawu biodrowego
Bł. włók. – błona włóknista torebki stawu biodrowego
C.A. – jama stawu
C.A.C. – torebka stawu biodrowego
C.I. – grzebień międzykrętarzowy
C.O.F. – głowa kości udowej
C.O.Isch – trzon kości kulszowej
C.V. – trzon kręgi
CGRP – peptyd kodowany genem kalcytoniny
Co.O.F. – trzon kości udowej
Col. O.F. - szyjka kości udowej
DßH – beta hydroksylaza dopaminy
F..L. – powierzchnia półksiężycowata
F.A. – dół panewki
F.C.O.F. – dołek głowy kości udowej
F.O. – otwór zasłonowy
F.T. – dół krętarzowy
GAL – galanina
L.A. - obrąbek panewki
L.C.O.F. – więzadło głowy kości udowej
L.T. – więzadło poprzeczne
M.A. – mięsień przywodziciel
M.B.F. – mięsień dwugłowy uda
M.G. - mięsień smukły
M.G.M. - mięsień pośladkowy średni
M.G.S. – mięsień pośladkowy powierzchowny
M.O.I. – mięsień zasłonowy wewnętrzny
M.P. – mięsień łonowy
M.Q.F. – mięsień czworogłowy uda
M.S. – mięsień krawiecki
M.T.F.L. – mięsień napinacz powięzi szerokiej
N.F. – nerw udowy
N.G.C. – nerw pośladkowy przedni
N.I. – nerw kulszowy
N.O. - nerw zasłonowy
N.S. – nerw dostopowy
Nacz. – naczynia krwionośne/
NPY – neuropepytd Y
O. Isch. – kość kulszowa
O.I. – kość biodrowa
O.P. – kość łonowa
O.S. kość krzyżowa
Obrąb. – obrąbek panewki
Okost. – okostna
R.S. gałąź spojeniowa
RA. – gałąź panewkowa
S.P. – spojenie miednicy
SP – substancja P
T. Isch. – guz kulszowy
T. Mi. – krętarz mniejszy
T.M., T.M.O.F. – krętarz większy
VACHY – pecherzykowy transporter acetylocholiny
VIP- wazoaktwny peptyd jelitowy
W.g.k.u. – więzadło głowy kości udowej

1. Wstęp

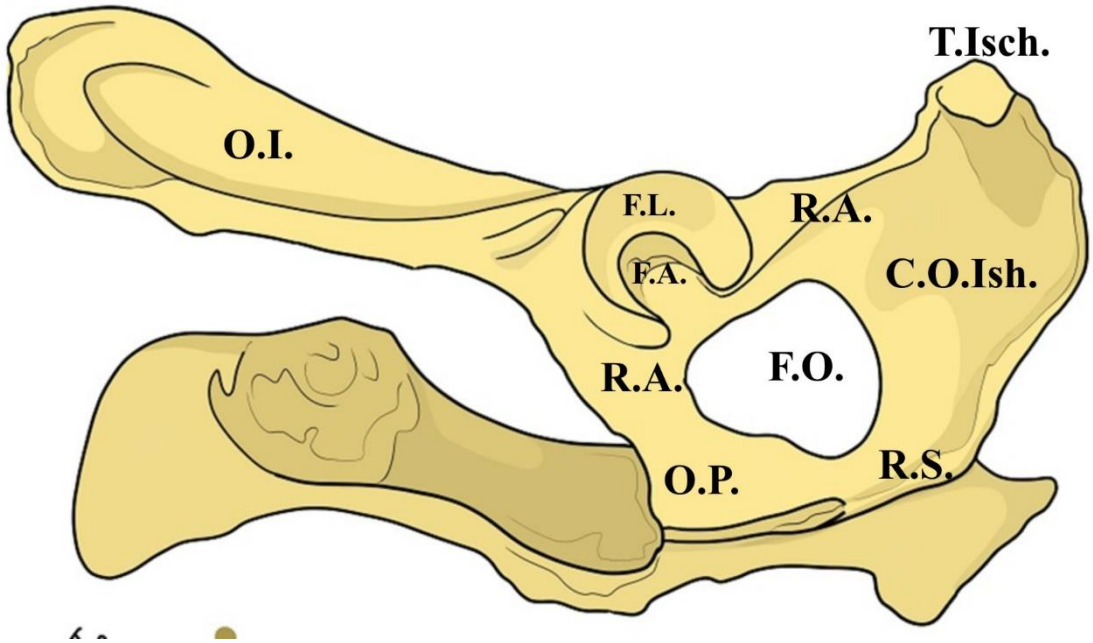
Staw jest połączeniem między kośćmi, które jest bardzo zróżnicowane w zależności od gatunku, budowy jak i ruchomości. Niezależnie od tych czynników w stawie można wyróżnić te same struktury biorące udział w jego budowie. Na budowę stawu składają się kości, a dokładniej ich powierzchnie stawowe (*facies articularis*) pokryte chrząstką stawową (*cartilago articularis*), torebka stawową (*capsula articularis*) zamykającą przestrzeń między nimi, zbudowana z dwóch błon: zewnętrznej – włóknistej (mocnej, zwanej błoną włóknistą (*membrana fibrosa*) i wewnętrznej – maziowej (cienkiej i delikatnej, zwanej błoną maziową (*membrana synovialis*), maź stawowa (*synovia*) znajdująca się wewnątrz powstałej jamy stawowej (*cavum articulare*) oraz więzadła (*ligamenta*) (rys.1.). Staw biodrowy jest stawem prostym (*art. simplex*), na który składają się dwie kości. Ze względu na kształt powierzchni stawowych jest stawem kulistym (*art. spheroidea*), co umożliwia ruch w wielu kierunkach, w tym zarówno zginanie, prostowanie jak i przywodzenie i odwodzenie oraz rotację (Kobryń i wsp. 2012).

Staw biodrowy tworzą dwie kości. Jest to kość miedniczna (*os coxe*, rys. 1, 2) oraz kość udowa (*os femoris,* rys. 1, 3). Od strony miednicy staw zbudowany jest z panewki kości miednicznej (*acetabulum ossis coxae*). Jest to miejsce gdzie połączone są z sobą trzy kości miednicy: kość kulszowa (*os ischii*), kość łonowa (*os pubis*) oraz kość biodrowa (*os ilium*). Panewka nie jest w pełni zamknięta i u mięsożerców posiada wcięcie panewkowe (*incisura acetabuli*). Przestrzeń wewnątrz panewki będąca przedłużeniem wcięcia panewki nazywana jest dołem panewkowym (*fossa acetabuli*). Boczną część panewki po stronie przyśrodkowej stanowi powierzchnia półksiężycowata (*facies lunata*). Panewka stanowi umiejscowienie dla główki kości udowej (*caput ossis femoris*). Całość panewki nadbudowana jest chrząstką, zwaną obrąbkiem panewkowym (*labrum acetabuli*), aby zwiększyć powierzchnię samej panewki i wzmocnić staw. Od strony kości udowej strukturą budującą staw jest głowa kości udowej. Na

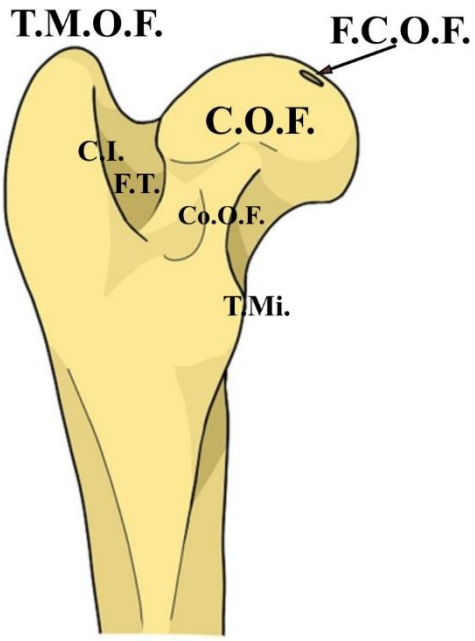
jej środku znajduje się dołek głowy (*fovea capitis*), który stanowi miejsce przyczepu więzadła (rys. 3.) (Lutnicki, 1980). Więzadło to zwane więzadłem głowy kości udowej (*lig. capitis ossis femoris*) ciągnie się od wspomnianego dołka do dołu panewki. Na poziomie wcięcia panewki tworząc swojego rodzaju most nad samym wcięciem panewki, rozciąga się solidne więzadło poprzeczne panewki (*lig. transversum acetabuli*). U psa torebka stawowa jest obszerna, mocna i gruba. Obejmuje obrąbek panewkowy i jest wzmocniona przez włókna torebki nazywane pasmem okrężnym (*zona orbicularis*) (Krysiak i wsp. 2012).



Rys.1. Schematyczny rysunek przekroju przez staw biodrowy.



Rys.2. Rycina przedstawiająca miednicę psa z panewką miednicy.



Rys.3. Koniec bliższy kości udowej.

Unaczynienie stawu biodrowego jest pochodną nie tylko od unaczynienia samej torebki stawu biodrowego, ale również główki kości udowej oraz panewki. Naczynia zaopatrujące staw to odgałęzienia tętnicy okalającej udo bocznej i przyśrodkowej (*arteria circumflexa ilium lateralis et medialis*), zasłonowej (*arteria obturatoria*) oraz tętnicy pośladkowej tylnej (arteria glutea caudalis) (Kaderly i wsp. 1982; Kaderly i wsp. 1983; Kürtül i wsp. 2003).

Ważnym zagadnieniem tak w medycynie człowieka jak i zwierząt są choroby stawów. Schorzenia te najczęściej powodują silny ból, dyskomfort i znacząco obniżają jakość życia. Mogą być to schorzenia wrodzone, uwarunkowane genetycznie jak i związane z wiekiem czy urazami (Beale 2005; Hodges i wsp. 1987; Morgan i wsp. 2000). Do chorób stawu biodrowego najczęściej występujących u zwierząt a w szczególności u psów należą między innymi: dysplazja stawu biodrowego, choroba Legg Calve Perthesa, osteoarthritis, osteochondroza.

Dysplazja stawu biodrowego (CHD) jest schorzeniem wieloczynnikowym i wielogenowym. Najczęstszą przyczyną powodującą rozwój schorzenia są: znaczne rozluźnienie samego stawu oraz opóźnione kostnienie, a w późniejszej konsekwencji zwyrodnienie stawu (OA) (Schachner 2015). Psy rodzą się z prawidłowym stawem biodrowym. Podczas wzrostu dochodzi do rozluźnienia stawu i jego nadwichnięcia, co skutkuje jego spłaszczeniem w późniejszym okresie (Ohlerth i wsp. 2019). Szczeniaki we wczesnym okresie życia zaczynają przejawiać objawy kulawizny, niechęć do chodzenia, nieprawidłowy chód (Fry i Clark 1992). Objawy pojawiają się w różnym wieku. Najczęściej manifestują się między 4 a 12 miesiącem życia (Syrcle 2017). Celem postępowania z psami przejawiającymi objawy jest eliminacja lub ograniczenie objawów bólowych. Zależnie od wieku, objawów, rasy dobierana jest odpowiednia metoda leczenia. Do tych metod najczęściej zalicza się postępowanie zachowawcze i chirurgiczne (Anderson 2011).

Choroba Legg Perthesa jest to choroba rozwojowa psów małych ras, której etiologia jest słabo poznana (Aguado i Goyenvalle 2021). Choraba nazywa jest inaczej aseptyczną

martwicą głowy kości udowej. We wczesnej fazie głowa kości obumiera jeszcze nie naruszając chrząstek stawowych, potem ulega zapadnięciu i pojawiają się zmiany w chondrocytach (Mickelson i wsp. 1981). Choroba polega na aseptycznej martwicy głowy kości udowej. Dochodzi do niej, gdy zaburzony zostaje przepływ krwi od strony szpiku kostnego, od okostnej, a także innych naczyń. Gdy dochodzi do zaburzenia osteogenezy, czyli tworzenia się i przebudowy kości w okresie intensywnego wzrostu organizmu, poprzez niedostateczne ukrwienie, pojawia się ognisko martwicy w jądrze kostnienia główki i szyjki kości udowej. Prowadzi to do zmian w strukturze kości, odwapnienia, które prowadzi do zmniejszenia wytrzymałości tkanki na urazy i prowadzi często do złamań, jak również powstawania zmian anatomicznych takich jak spłaszczenie lub zniekształcenie głowy kości udowej. Zmiany te prowadzą do zapalenia stawu biodrowego, a rozwój zwyrodnienia generuje ankylozę stawu, praktycznie wyłączając go z funkcji. Jest to przypadłość głównie u psów ras małych, predyspozycje mają zwłaszcza rasy yorkshire terrier, west highland, white terrier, sznaucer, pekińczyk, maltańczyk, ale może dotyczyć także innych ras. U psów pojawia się kulawizna, problem z poruszaniem się, zanikają mięśnie kończyn tylnych, ale może też przebiegać bezobjawowo. Postępowanie w przypadku spadku jakości życia polega na leczeniu chirurgicznym i usunięciu głowy kości udowej (Thak i wsp. 2013).

Osteoarthritis (OA), czyli choroba zwyrodnieniowa stawów jest schorzeniem powodującym zmiany w budowie strukturalnej stawów, zwłaszcza chrząstki stawowej. Powoduje to w konsekwencji kulawizny i ból. Wraz z wiekiem pogarsza się funkcjonalność stawów i zmniejsza zakres ruchomości. Psy mocno unikają obciążania stawów a w zaawansowanych przypadkach może doprowadzić nawet do ciągłego leżenia i niemożności poruszania się. Etiologia samej choroby jest kompleksowa i obejmuje wiele czynników. Pierwotna choroba w większości przypadków rozwija się idiopatycznie, ale występują czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia choroby w tym starzenie się, otyłość. Wtórne zwyrodnienie

jest wynikiem urazów i procesów chorobowych. Ta forma jest uważana za najczęściej występującą u psów. Niektóre choroby dotykające stawów mogą również spowodować rozwój zwyrodnienia w tym dysplazję stawu biodrowego czy zerwanie więzadła krzyżowego (Anderson 2020). Osteoarthritis jest najczęściej diagnozowaną chorobą stawów (nawet 80% przypadków) z objawami klinicznymi, dotyczy to zarówno zwierząt jak i ludzi (Alves i wsp. 2020).

Osteochondroza jest częstym schorzeniem, która jak OA ma wiele czynników wpływających na rozwój choroby oraz jest powszechna u ludzi i zwierząt. Do najczęstszych przyczyn potwierdzonych naukowo wymienia się czynniki genetyczne i anatomiczne. Patogeneza opiera się głównie na zaburzeniach płytki wzrostowej, nieprawidłowego procesu kostnienia, problemów z ukrwieniem i nawet nie zespolenia fragmentów kostnych, w konsekwencji objawiające się kulawizną i bólem. Fragment kostny pozostawiony luźno w stawie doprowadza do uszkodzenia stawu i rozwoju chorób wtórnych (osteoarthritis) (Ytrehus i wsp. 2007; Bieżyński i wsp. 2012). Jak wspomniano wszystkie te schorzenia charakteryzują się silna bolesnością.

W przypadku schorzeń stawów ich leczenie ich można podzielić na: chirurgiczne lub farmakologiczne. To drugie opiera się głównie na uśmierzaniu bólu i zapalenia w obrębie stawów przez podawanie niesterydowych lub sterydowych leków przeciwzapalnych. Leki te łatwo dostępne i relatywnie tanie. Niestety nie nadają się do długofalowego leczenia, a jedynie do doraźnej pomocy w walce z bólem. Do jednej z metod farmakologicznych leczenia schorzeń stawu biodrowego można zaliczyć iniekcje dostawowe. Coraz częściej stosuje się leczenie mającym na celu wspomaganie regeneracji samej powierzchni stawowej i poprawę jej ogólnego stanu np. komórki macierzyste, osocze PRP. Jednak wymagają one niejednokrotnie znieczulania pacjentów do wykonania procedury oraz ich efekt jest bardzo różny lub nawet jest go brak. Wciąż jednak najczęściej stosowanymi metodami mającymi ograniczyć lub nawet

zniwelować rozwój lub zaostrzenie przebiegu chorób stawów są metody chirurgiczne. W przypadku dysplazji najczęściej stosowanymi zabiegami są młodzieńcza symfizjodeza (JPS), potrójna osteotomia miednicy (TPO), amputacja głowy kości udowej, usunięcie mięśnia łonowego, zastosowanie protezy stawu biodrowego (THP) oraz zabieg denerwacji stawu biodrowego. Dobór odpowiedniego zabiegu jest uzależniony najczęściej poza samym schorzeniem od wieku, wielkości psa oraz zaawansowania choroby. Ogromny wpływ na stan pacjenta, jego samopoczucie ma odczuwanie bodźców bólowych, za co bezpośrednio odpowiedzialne są nerwy zaopatrujące struktury stawu. Jak dotychczas unerwienie stawu biodrowego było badane u różnych gatunków zwierząt w tym u szczura, królika, owcy, kota, psa, konia (Birnbaum i wsp. 1997; Dee 1969; Dudek i wsp. 2013; Dudek i wsp. 2017; Fearnside i Black 1999; Huang i wsp. 2013; Karahan i wsp. 2002; Kinzel i wsp. 1998; Nakajima i wsp. 2008; Rankin i Diesem 1976; Saxler i wsp. 2005, 2007; Schmaedecke i wsp. 2008; Siebenrock i wsp. 2000; Sienkiewicz i wsp. 2018a,b; Staszyk i Gasse 2002; Watkins i Li, 2006; Willick i wsp. 1998) jak i człowieka (Barnett 2021; Laumonerie i wsp. 2021). Nerwami zaopatrującymi staw biodrowy są: nerw udowy *(nervus femoralis),* zasłonowy (*obturatorius*), pośladkowy przedni (*gluteus cranialis*) i kulszowy (*ischiadicus*). W badaniach wykonanych na owcach wyznakowano neurony odpowiedzialne za unerwienie torebki stawu biodrowego przy użyciu metody wstecznego znakowania neuronów (retrograde neuronal tracing) przy użyciu znacznika Fast Blue (FB) (Dudek i wsp. 2017; Sienkiewicz i wsp. 2018a,b). Znacznik ten został wykorzystany nie tylko do wyznakowania neuronów zaopatrujących torebkę stawu biodrowego w celu określenia ich immunohistochemicznej charakterystyki (Dudek i wsp. 2017; Sienkiewicz i wsp. 2018a), ale też do weryfikacji rezultatów przeprowadzanych zabiegów odnerwienia torebki stawu biodrowego (Sienkiewicz i wsp. 2018b). Badania wykazały pośrednio nie tylko to, które nerwy zaopatrują staw biodrowy, ale również ich procentowy udział w czuciowym zaopatrzeniu stawu. Zabieg wykonany od strony bocznej stawu uszkadza

nerw pośladkowy oraz kulszowy, w wyniku tego wykazano redukcję neuronów sensorycznych zaopatrujących torebkę o 69%. W przypadku podejścia od strony przyśrodkowej, przy uszkodzeniu nerwu udowego oraz zasłonowego, odnotowano redukcję neuronów o 39,2%. Wykazano w ten sposób efektywność tych zabiegów w redukcji bólu związanego z schorzeniami tego stawu (Sienkiewicz i wsp. 2018b). Badania unerwienia stawu biodrowego u ludzi wykazują pewne różnice pomiędzy człowiekiem a zwierzętami. Spowodowane są one przede wszystkim tym, że człowiek ma inną postawę (jest spionizowany), stąd przebieg nerwów i określanie ich położenia jest inne. Torebka stawowa jest podzielona na część przednią i tylną, którą można porównać do podziału na część boczną i przyśrodkową u zwierząt. Opisywane nerwy również odnoszą się do tego, którą część torebki unerwiają. Za unerwienie przedniej części odpowiada nerw udowy, zasłonowy i nerw zasłonowy dodatkowy (ten nie jest opisywany u psa). Za unerwienie tylnej części torebki stawu odpowiada nerw czworogłowy uda (u psa nie ma potwierdzenia aby ten nerw brał czynny udział w unerwieniu stawu), pośladkowy górny, kulszowy i/lub pośladkowy dolny. W przypadku nerwów pośladkowych u zwierząt występuje różnica w nazwie ze względu na postawę zwierząt. Zamiast nerwu górnego i dolnego opisuje się nerw doczaszkowy i doogonowy. U psa wykazano udział tylko nerwu pośladkowego doczaszkowego w unerwieniu stawu. U ludzi wprowadzony jest dokładny podział na obszaryzaopatrywane przez odpowiednie nerwy. Obejmuje on nie tylko podział na torebki na część przednią i tylną, ale w każdej z nich na część boczną i przyśrodkową oraz część powierzchowną i głęboką co daje nam osiem różnym obszarów topograficznych (Barnett i wsp. 2021; Laumonerie i wsp. 2021). W badaniach na kotach Dee (1969) zaobserwował udział nerwu zasłonowego w unerwieniu torebki stawu biodrowego u dwóch tylko osobników. U reszty badanych zwierząt staw biodrowy zaopatrywany był unerwiany tylko przez nerwy kulszowy, udowy i pośladkowy przedni. U koni stwierdzono udział wszystkich czterech nerwów w zaopatrzeniu czuciowym stawu (Rankin i Diesem 1977).

W pracy na temat unerwienia stawu biodrowego u psa (Huang i wsp. 2012) wykonano sekcje 6 psów, których ciała utrwalono z użyciem 10% formaldehydu. W trakcie sekcji brano pod uwagę nerwy wychodzące z splotu lędźwiowo-krzyżowego zaopatrujące okolicę miednicy. Każdy z nerwów obserwowano w przebiegu do momentu oddawania gałązek zaopatrujących staw. Wykazano udział czterech nerwów w unerwieniu torebki stawu biodrowego: nerwu kulszowego i pośladkowego przedniego od strony bocznej oraz nerwu zasłonowego i udowego od strony przyśrodkowej co potwierdzą inne badania (Birnbaum i wsp. 1997; Fearnside i Black 1999; Gasse i wsp, 1996; Siebenrock i wsp. 2000; Staszyk i Gasse 2002; Willick i wsp. 1998). Prześledzono również nerw pośladkowy tylny - jednak nie wykazano jednak jego bezpośredniego udziału w unerwieniu stawu. Z kolei u psów w badaniu przeprowadzonym przez Kinzel i wsp. (1998) prześledzono przebieg tych nerwów i nie stwierdzono obecności czuciowych gałęzi nerwu zasłonowego zaopatrującego torebkę stawu.

Dodatkowym aspektem utrudniającym wyizolowanie poszczególnych stref unerwienia jest pośrednie unerwienie stawu biodrowego (Ascenzi i wsp. 1967; Schmaedecke i wsp. 2008). Oznacza to że cześć włókien osiąga staw przez tkankę mięśniową, okostną i tkankę łączną.

Staw biodrowy i jego torebka unerwione są zarówno przez nerwowe włókna czuciowe oraz autonomiczne. Charakter włókien i ich funkcje stwierdza się na podstawie obecności białek (neuropepdtydów) pełniących różne funkcje. Jedną z metod pozwalających na wykrycie tych biologicznie aktywnych substancji w nerwach zaopatrujących struktury stawu biodrowego są barwienia immunohistochemiczne. Immunohistochemiczne właściwości włókien nerwowych zaopatrujących torebkę stawową opisano wcześniej w odniesieniu do ludzkiego stawu biodrowego (Saxler i wsp. 2007) i kolanowego (Wojtys i wsp. 1990; Witoński i Wagrowska-Danielewicz 1999) oraz stawu kolanowego u myszy (Buma 1994), kota (Marshall i wsp. 1994; Heppelmann i wsp. 1997) i psa (Tamura i wsp. 1998). Literatura dotycząca nerwów w stawach zawiera również kilka artykułów dotyczących unerwienia dystalnych stawów kończyn u konia (Caron i wsp. 1992; Bowker i wsp. 1993a,b, 1997). Istnieją również doniesienia o obecności włókien nerwowych w stawie skroniowo-

żuchwowym człowieka (Yoshida i wsp. 1999) i owcy (Tahmasebi-Servestani i wsp. 1997) lub stawie barkowym szczura (Yoshida i wsp. 1995) czy stawów kręgosłupa (Aoki i wsp. 2004). Jednym z najważniejszych substancji znajdowaną w nerwach stawów jest peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP). Jest to neuropeptyd składający się z 37 aminokwasów. Jego obecność stwierdza się zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym (Kuzawińska i wsp. 2015). Jego obecność stwierdzono w strukturach stawowych szczura (Udman i wsp. 1998; Murata 2007; Yoshida i wsp. 1995; Hanesch i wsp. 1993a,b;), kota (Hanesch i wsp. 1991, 1995, 1997; Heppelmann i wsp. 1997), konia (Bowker i wsp. 1993a,b, 1997; Caron i wsp. 1992) i innych gatunków zwierząt jak również u człowieka. Jest głównie mediatorem bólu (Russell i wsp. 2014). W badaniach wykonanych na ludziach (Larsson i wsp. 1991; Mapp i wsp. 1990; Saxler i wsp. 2007; Walsh i wsp. 2015; Wang i wsp 2015) stwierdzono zdecydowany wzrost ilości włókien nerwowych zawierających tą substancję bądź zmiany w jej koncentracji u pacjentów z chorobami stawów. Stwierdzono obecność CGRP+ nerwów w strukturach stawu biodrowego człowieka (Saxler i wsp. 2007; Wang i wsp 2015) i innych gatunków zwierząt (Nakajima i wsp. 2008a,b). CGRP-pozytywne włókna nerwowe obecne w strukturach stawu biodrowego mają charakter czuciowy, co zostało potwierdzone badaniami przeprowadzonymi na owcach (Dudek i wsp. 2017).

Substancja P (SP) to neuropeptyd, który należy do rodziny tachikinin, składa się z 10 aminokwasów. Jest odpowiedzialny za procesy zapalne, tworzenie naczyń, reguluje procesy oddechowe, związany jest z wieloma zmysłami (Snijdelaari wsp. 2000; Harrison i Geppetti 2001). Jest także mediatorem bólu (Harrison i Geppetti 2001; Lisowska 2007a, b, Lisowska i wsp. 2015; Snijdelaar wsp. 2000). Jego obecność została potwierdzona w strukturach nerwowych różnych stawów wielu gatunków zwierząt jak też u człowieka (Bowker i wsp. 1993a,b; Caron 1992; Hanesch 1991. 1995, 1997; Kido i wsp 1993; Korahan i wsp. 2002; Luman i Gentle 2004; Mapp i wsp. 1990; Marshall i wsp. 1994; Shimizu i wsp. 1996; Tamura i wsp. 1998). Obecność SP potwierdzono we włóknach nerwowych i neuronach zaopatrujących

staw biodrowy tak zwierząt i u ludzi (Dudek i wsp. 2017; Nakajima i wsp. 2008a,b; Saxler i wsp. 2007). Podobnie jak w przypadku CGRP ilość SP ulega zmianom wraz z postępem schorzeń ortopedycznych takich jak zapalenia i zwyrodnienia stawów (Larsson i wsp. 1991; Mapp i wsp. 1990; Marshall i wsp. 1990, 1994; Saxler i wsp. 2007; Wang i wsp. 2015; Witoński i Wągrowska-Danielewicz 1999; Wojtys i wsp. 1990).

Neuropeptyd Y (NPY) składa się 36-aminokwasów, wpływa na ciśnienie tętnicze, skurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych, ma właściwości aterogenne. Oddziałuje na aktywność i fizjologię przewodu pokarmowego oraz na ośrodek głodu i sytości znajdujący się w podwzgórzu (Śliwińska-Mossoń i wsp. 2013). Nueuropepytd Y znajdowano w trukturach nerwowych zaopatrujących stawy u róznych gatunków zwierząt (Ackermann i wsp. 2001; Gatenholm i Brittberg 2019; Shimizu i wsp. 1996; Elfvin i wsp. 1998; Kido i wsp. 2001; Mapp i wsp. 1990; Uddman i wsp. 1998). Stwierdzono też występowanie tego neuropeptydu w neuronach zaopatrujących staw biodrowy u owcy (Dudek i wsp. 2017; Sienkiewicz i wsp. 2018a). W przebiegu różnych schorzeń stawów wykazano zmiany dotyczące zawartości NPY w strukturach nerwowych stawu i w mazi stawowej (Holmlund i wsp. 1991; Larsson i wsp. 1991; Mapp i wsp. 1990)

β-hydroksylaza dopaminy (DβH) jest enzymem konwertującym dopaminę do noradrenaliny. Jej obecność stwierdzana jest głównie w neuronach adrenergicznych i noradrenergicznych. (Weinshenker 2007; Ishiguro i wsp. 1993). Ponad 95% autonomicznych neuronów zaopatrujących staw biodrowy wykazało obecność tego enzymu (Sienkiewicz i wsp. 2018a). Stwierdzono też obecność włókien adrenergicznych w błonie maziowej szczura (Bjurholm i wsp. 1990). U ludzi niedobór tego enzymu (jest to bardzo rzadkie) może powodować zaburzenia w krążeniu i w konsekwencji dla stawów ich nadmierne zginanie (hyperflexia) (Senard i Rouet, 2006).

Galanina (GAL) to peptyd zbudowany z 29-aminokwasów. Syntetyzowany jest z 123-aminokwasowej preprogalaniny (Milsom 2011). Galanina jest neuropeptydem włączonym w procesy czuciowe, który, jak wykazano, łagodzi neurogenne zapalenie, moduluje aktywację neutrofili i bierze udział w rozwijającym się zapaleniu stawów (Botz i wsp. 2016). Obecność GAL wykazano w neuronach czuciowych i autonomicznych zaopatrujących torebkę stawu biodrowego w neuronach czuciowych dla torebki stawu biodrowego zbadano u owcy (Dudek i wsp. 2017; Sienkiewicz i wsp. 2018a) jak również w strukturach kostnych i stawowych u szczura (Ackermann i wsp 1999; Qinyang i wsp. 2005; Gajda i wsp. 2009; Grönblad i wsp. 1991 Qinyang i wsp. 2004).

Wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) odgrywa ważną rolę w wielu funkcjach biologicznych. Stymuluje kurczliwość serca, rozszerza naczynia krwionośne, promuje komunikację neuroendokrynno-immunologiczną, obniża ciśnienie tętnicze krwi oraz działa przeciwzapalnie i immunomodulująco (Fahrenkrug i Emson 1982; Fahrenkrug 1989; Fahrenkrug 2010). Badania wykazały że zarówno spadek jak i nadmierny wzrost tej substancji w stawie powoduje wywołanie stanu zapalnego i rozwój zwyrodnienia (Jiang i wsp. 2016). W badaniu na szczurach (Watkins i Zongming 2006) po podaniu dostawowo VIP wykazano że zwierzęta pokazywały objawy bólowe (allodynia) i przeczulicy mimo iż zwierzęta były zdrowe. Badania z użyciem wstecznego znakowania neuronów wykazały obecność VIP w neuronach czuciowych zlokalizowanych w zwojach rdzeniowych nerwów odcinka lędźwiowo-krzyżowego (Dudek i wsp. 2017).

Pęcherzykowy nośnik acetylocholiny (VAChT), jest neurotransmiterem odpowiadającym za transport acetylocholiny do pęcherzyków synaptyczych. Acetylocholina powstaje z acetylokoenzymu A i choliny przy udziale enzymu acetylotransferazy choliny (ChAT). VAChT jest markerem układu parasympatycznego (Arvidsson i wsp. 1997; Arciszewski i Zacharko-Siembida, 2008). Wiadomym jest, że system cholinergiczny odgrywa

istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu stawów (Courties i wsp. 2017; Lauwers i wsp. 2021). Badano również rozwój struktur autonomicznego układu nerwowego w tym też jego przywspółczulnej komponenty w strukturach kostnych i stawowych szczura (Sisask i wsp. 1996) natomiast w badaniach przeprowadzonych na owcach potwierdzono obecność VAChT+ neuronów unerwiających torebkę stawu biodrowego zlokalizowanych w zwojach rdzeniowych (Dudek i wsp. 2017).

W dostępnej literaturze całkowicie brakuje doniesień na temat rozwoju unerwienia stawu biodrowego. Badania skupiają się na unerwieniu stawu biodrowego dorosłych osobników i nie analizują jego rozwoju w życiu płodowym. W przypadku człowieka znane jest tylko jedno doniesienie dotyczące tego zagadnienia (Golub i Bronovitskaia 1981) nie ma natomiast w dostępnej literaturze wyników badań na temat rozwoju unerwienia tego stawu u zwierząt.

Brak dostępnych danych dotyczących rozwoju unerwienia stawu biodrowego u zwierząt, istotne znaczenie unerwienia tego stawu w przebiegu i leczeniu jego schorzeń tak u ludzi jak i zwierząt, a pośród nich szczególnie u psów skłoniły nas do podjęcia tej tematyki badawczej.

2. Cel pracy

I. Określenie intensywność rozwoju unerwienia stawu biodrowego psa w życiu płodowym i we wczesnym okresie po urodzeniu poprzez wykazanie obecności gałązek nerwowych zaopatrujących staw, a także analizę ich ilości i wielkości.

II. Opisanie zmian gęstości unerwienia struktur stawu biodrowego w trakcie jego rozwoju.

III. Opisanie kolejności pojawiania się różnych neurotransmiterów we włóknach nerwowych zaopatrujących struktury rozwijającego się stawu biodrowego.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał do badań

Badanie przeprowadzono na płodach i szczeniętach w czterech grupach wiekowych. Materiał został pobrany podczas owariohisterektomii aborcyjnej suk ciężarnych oraz od poddanych eutanazji ślepych miotów (szczenięta do 3 dnia życia). Badane grupy obejmowały trzy okresy płodowe: I grupa – płody do 3 tygodnia życia płodowego (n=10), II grupa – płody w wieku 5 tygodni życia płodowego (n=10), grupa III – płody w wieku 8 tygodni życia płodowego (n=10), oraz grupa IV – szczenieta ze ślepych miotów, z 2-3 dnia po porodzie (n=10). Psy ze względu na duże zróżnicowanie w wielkości dorosłych osobników mogą różnić się wielkością w życiu płodowym. Dla ujednolicenia wyników przedział wagowy suk mieścił się między 10-15 kg masy ciała. Wiek płodów dodatkowo został określony na podstawie wywiadu (ustalenie daty krycia) oraz różnych cech rozwojowych takich jak wielkość płodu względem matki, rozwój kończyn, obecność sierści, rozwój układu kostnego, rozwój powiek (Evans i Sack, 1973, Hermanson i wsp. 2019).

Płody i szczenięta do badań preparacyjnych były utrwalone przez immersyjne zanurzenie w roztworze paraformaldehydu 4% w buforze fosforanowym (BP) (0.1 M, pH 7.4) i przetrzymywane w tym samym roztworze aż do czasu preparacji.

Materiał do badań immunohistochemicznych został utrwalony przez immersyjne zanurzenie w roztworze paraformaldehydu 4% w BP (0.1 M pH 7.4) przez 24 godziny. Potem próbkę płukano przez kolejne 24 godziny w buforze fosforanowym (0.1 M pH 7.4). Następnie tkanki przenoszono do 30% roztworu sacharozy w (PB) (0.1 M pH 7.4). Materiał przechowywano w temperaturze 4^0C do momentu zatonięcia próbki (od około 2-6 dni). Próbki zatopiono w medium (OCT, Cell Path), po czym zamrożono w temperaturze -24^0C. Po takim przygotowaniu materiał krojono przy użyciu mikrotomu mrożeniowego (Leica Crycut 1800)

na skrawki grubości 12-16 μm i nakładano na chromalunowane szkiełka podstawowe. Szkiełka przechowywano w temperaturze -24^{0}C.

3.2. Badania preparacyjne.

Badania preparacyjne wykonano na pięciu osobnikach z każdej grupy. Ze względu na niewielkie rozmiary badanych pni nerwowych i ich odgałęzień w trakcie preparacji korzystano z różnych lup preparacyjnych. Fotografie wykonano przy użyciu aparatu fotograficznego Olympus Camedia C-5060 Wide Zoom.

3.3. Barwienie immunohistochemiczne

Przygotowany materiał badano za pomocą podwójnych i pojedynczych barwień immunohistochemicznych. Używano surowic mysich, króliczych oraz szczurzych skierowanych przeciwko acetylowanej tubulinie (AccTub), VAChT, DβH, SP, CGRP, GAL, NPY, VIP, NOS. Barwienia wybranych skrawków wykonywano na szkiełkach. Skrawki blokowano za pomocą 10% normalnej koziej surowicy. Zawierała ona dodatek 1% albuminy z surowicy bydła oraz 0.5 % Tweenu 20 w PBS x NaCl (0.1 M, pH 7.4). Blokowanie trwało 1 godzinę. Po zablokowaniu szkiełka były płukane w PBS x NaCl (0.1 M, pH 7.4), 3 razy x 10 min, po czym na skrawki nakładano mieszaninę przeciwciał pierwotnych (tabela 1) rozcieńczonych w PBS x 2NaCl (0.1 M, pH 7.4). Inkubacja z nałożonymi przeciwciałami pierwotnymi trwała 24 godziny w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej. Po inkubacji z przeciwciałami pierwotnymi szkiełka były płukane 3 razy x 10 min w PBS x NaCl (0.1 M, pH 7.4). Po tym czasie nakładano na skrawki mieszaninę przeciwciał wtórnych (tabela 2). Skrawki z mieszaniną przeciwciał wtórnych inkubowano godzinę w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej. Po inkubacji z przeciwciałami wtórnymi preparaty były płukane 3 razy x 10 min w PBS x NaCl (0.1 M, pH 7.4). Po płukaniu skrawki zostały pokryte mieszaniną glicerolu i PB (0.1 M, pH 7.4), wymieszanymi w stosunku 1:1 i przykryte szkiełkami nakrywkowymi.

Antygen	Numer referencyjny	Lot	Gatunek	Rozcieńczenie	Producent
Acetylowana Tubulina	#32-2700	#TC240595	Mysz	1:500	Invitrogen
CGRP	059K4841	C8198	Królik	1:8000	Sigma
Galanina	AB2233	2433379	Królik	1:2000	Millipore
NPY	NA1233	Z07336	Królik	1:5000	Bio Trend
NOS	N2280	245673	Mysz	1:1000	Sigma
SP	84500505	U2346709	Szczur	1:200	Bio-Rad
DβH	MAB308	0606031688	Mysz	1:500	Millipore
VIP	95350504	21062601	Mysz	1:500	Biogenesis
VAChT	V5387	98665621	Królik	1:5000	Sigma

Tabela 1. Przeciwciała pierwotne użyte do badań.

Antygen	LOT	Rozcieńczenie	Producent
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	1572559	1:1000	Life Technologies
Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG	1670155	1:1000	Life Technologies
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG	1252795	1:1000	Life Technologies

Tabela 2. Przeciwciała wtórne wykorzystane w badaniach.

3.4. Kontrola specyficzności przeciwciał

Kontrolę specyficzności barwienia przeprowadzono poprzez wykonanie testów zastąpienia pierwotnego przeciwciała normalną surowicą tego samego gatunku, ominięcia pierwotnego przeciwciała oraz testu preabsorpcji pierwotnych przeciwciał. Testy te wykazały pełną specyficzność wykonanych barwień.

3.5. Analiza mikroskopowa

Przygotowane skrawki analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 700). Dokumentacja fotograficzna została wykonana z użyciem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 700, przy zastosowaniu oprogramowania ZEN 2009. Obrazy z barwień podwójnych uzyskano przez nałożenie kanałów barwnych.

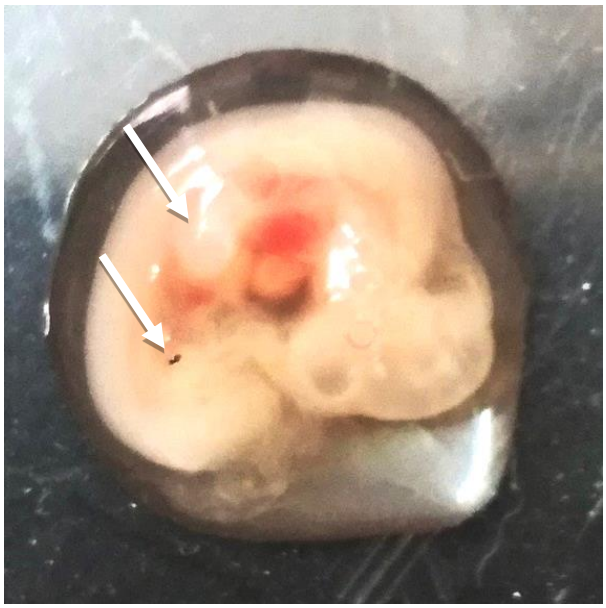
4. Wyniki

Zwierzęta wszystkich grup były prawidłowo rozwinięte. Nie stwierdzono nieprawidłowych struktur w obrębie stawu biodrowego czy też w obrębie kończyny miednicznej.

4.1 Grupa I

Badania preperacyjne

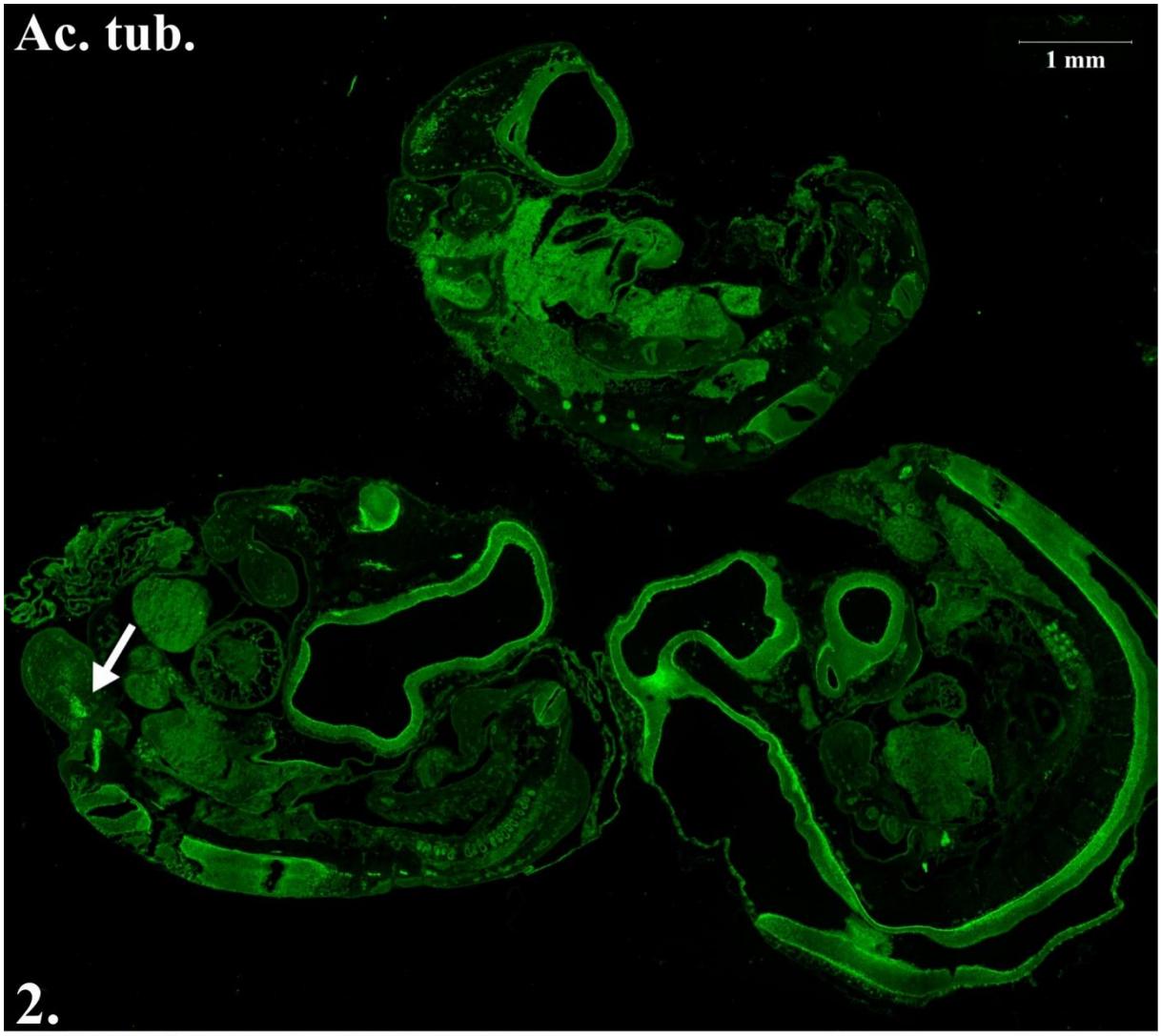
3 tydzień ciąży obejmuje wczesny rozwój płodu. Na tym etapie rozwinięte są tylko zawiązki samych kończyn (Fot. 1, strzałki). Nie stwierdzono obecności struktur stawu. W obrębie zawiązków kończyn nie znaleziono żadnych struktur chrzęstnych czy kostnych.

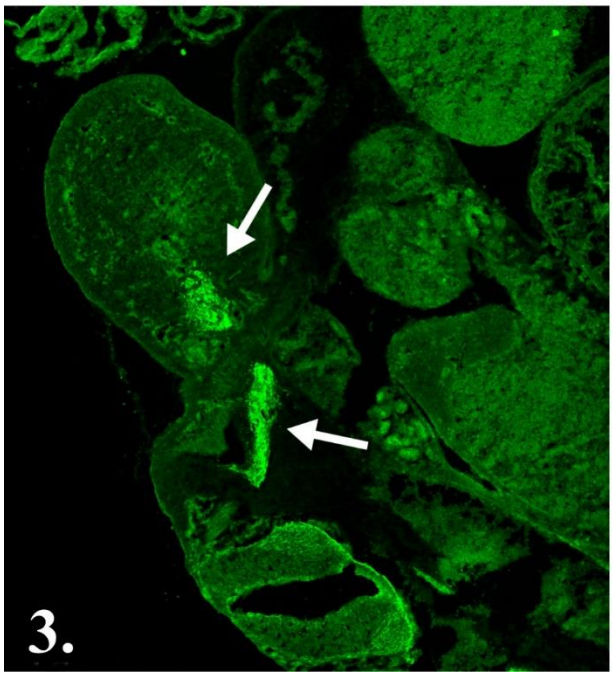


Fot. 1. Płód z zawiązkiem kończyny tylnej

Barwienia immunohistochemiczne.

Bawienie z użyciem acetylowanej tubuliny wykazało obecność dość grubego pęczka włókien nerwowych biegnącego do zawiązka kończyny miednicznej odchodzącego od rdzenia kręgowego (fot. 2, 3). Nie wykazano obecności innych substancji biologicznych w obserwowanych pęczkach włókien (tabela 3).





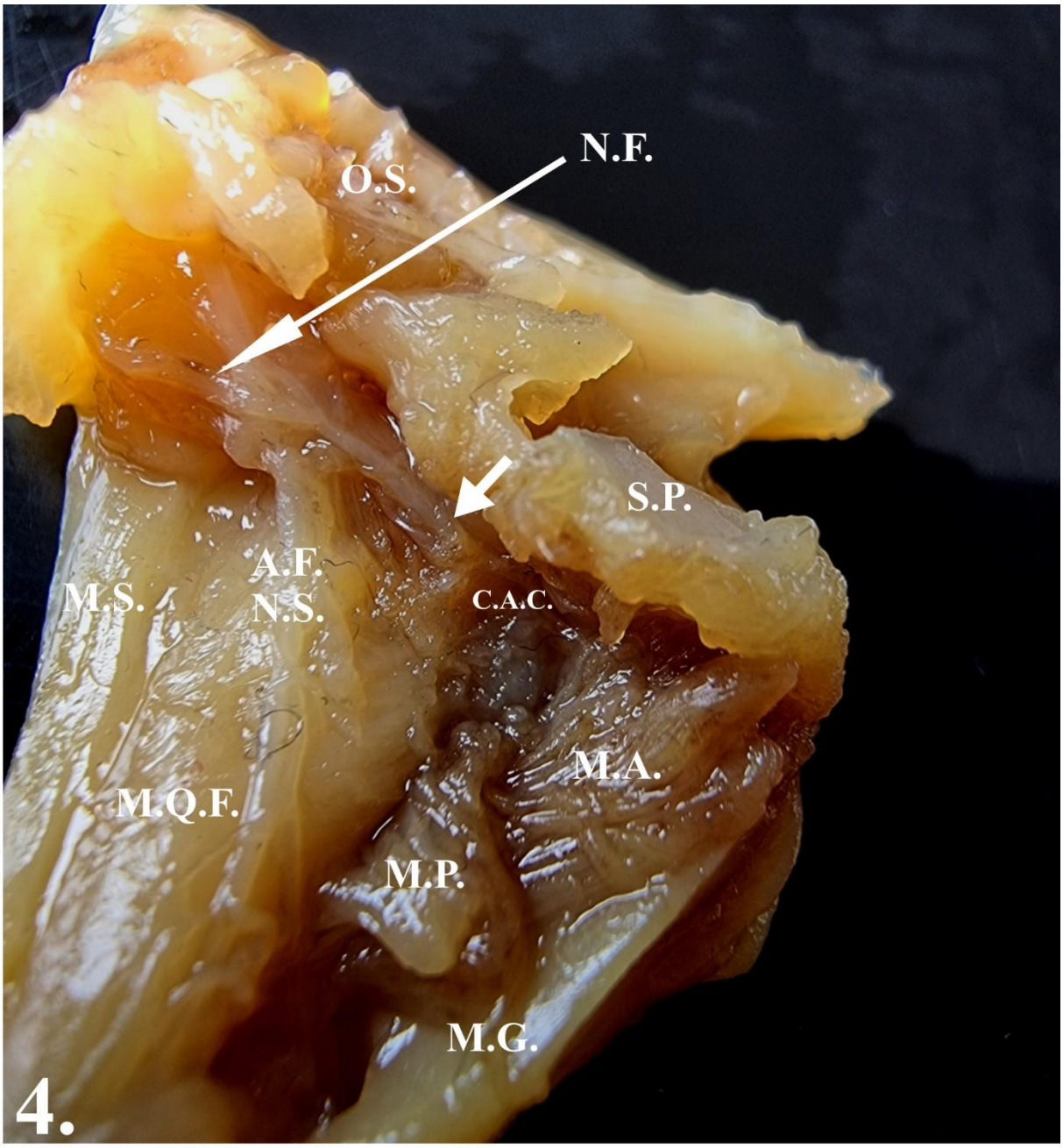
Fot. 2. Przekrój przez płód w wieku około 3 tyg. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko acetylowanej tubulinie. Strzałka wskazuje pęczek immunoreaktywnych włókien nerwowych biegnących w kierunku zawiązka kończyny.
Fot. 3. Powiększenie obszaru z fotografii 6.

4.2 Grupa II.

Badania preparacyjne

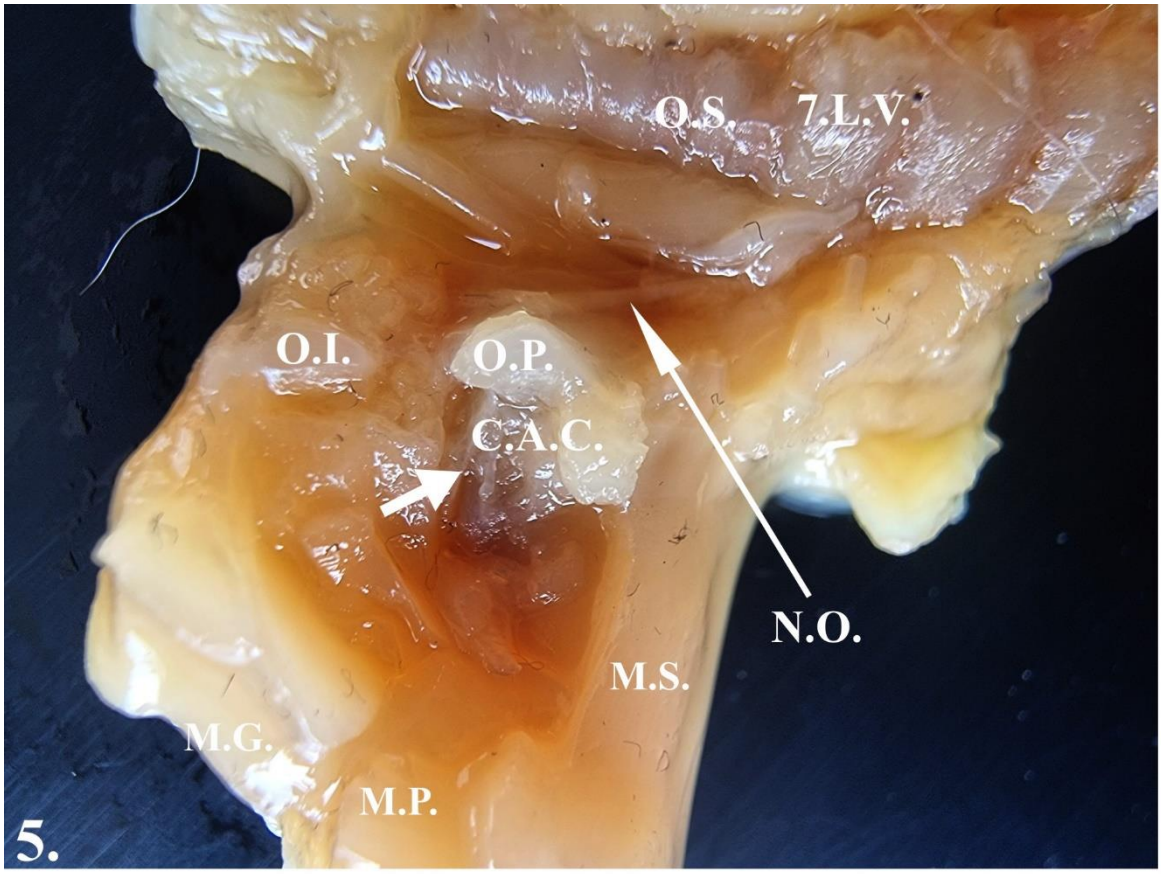
Płody w 5 tygodniu rozwoju mają w pełni rozwinięte kończyny łącznie z rusztowaniem kostnym. Brak rozwiniętej okrywy włosowej, paliczki są już porozdzielane. Powieki nie są w pełni rozwinięte, częściowo zakrywają oczy. Małżowina uszna obecna, przykrywająca przewód słuchowy. Nerwy w preparowanej okolicy są rozwinięte, bardzo cienkie, lekko transparentne i delikatne co bardzo utrudniało dokładną preparację cieniutkich gałązek zaopatrujących staw. Ze względu na wielkość stawu (od 3mm do 5mm) i wielkość nerwów (główne gałęzie około 1 mm) dokładne oczyszczenie okolicy torebki było stosunkowo trudne.

Od strony przyśrodkowej stwierdzono obecność nerwu udowego biegnącego wzdłuż mięśnia biodrowo-lędźwiowego (*m. iliopsoas*). Nerw ten biegnąc w kierunku doogonowym, wchodził w mięśnie uda i oddawał gałąź nerwu dostopowego (*n. saphenus*), cienką i złączoną z towarzyszącymi mu: tętnicą dostopową (*a. saphena*) i żyłą dostopową (*v. saphena*) (fot. 4). Niemożliwe było rozdzielenie tych struktur bez zniszczenia samego nerwu. Zaobserwowano również gałązkę nerwu udowego schodzącą na kość biodrową. Potem nerw udowy oddawał bardzo cienkie włókno wchodzące w okolicę stawu (fot. 4). Jego przebieg na kość miedniczną udało się zaobserwować u trzech płodów. Potem nerw ten stawał się zbyt cienki do dokładnej preparacji. Zaobserwowano rozdzielenie nerwu w okolicy torebki stawu na bardzo cienkie (grubości włosa) włókna bez możliwości odpreparowania ich na powierzchni stawu.



Fot. 4. Staw biodrowy 5-cio tygodniowego płodu psa, strona przyśrodkowa.
Widoczna gałązka nerwu udowego podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka).
O.S. - kość krzyżowa.
N.F. - nerw udowy (strzałka).
S.P. - spojenie miednicy.
A.F. - tętnica udowa.
N.S. - nerw dostopowy.
C.A.C. - torebka stawu biodrowego.
M.A. - mięsień przywodziciel.
M.P. - mięsień łonowy.
M.G..- mięsień smukły.
M.S. - mięsień krawiecki.
Q.F.M. - mięsień czterogłowy uda.

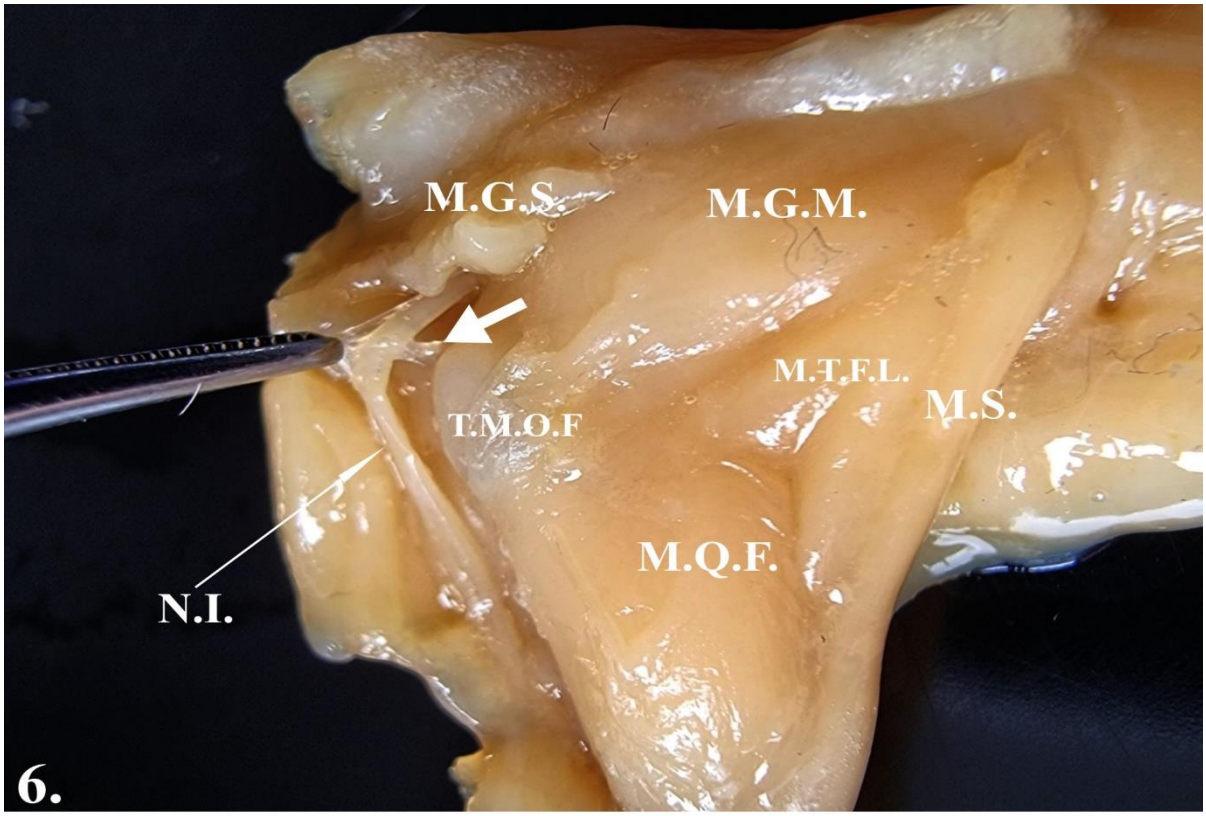
Nerw zasłonowy u wszystkich płodów w grupie, jeszcze wewnątrz jamy miednicy był łatwy do preparacji. Sam nerw opuszczał miednicę przechodząc przez doczaszkową krawędź otworu zasłonowego. Przechodził na stronę dobrzuszną dając gałęzie do okolicznych mięśni i znikał w okolicy doogonowej od stawu biodrowego (fot. 5). Gałęzie nerwu w tej okolicy były bardzo drobne, mocno rozpraszające się w preparowanej okolicy. Drobne nerwy zanikały w mięśniach i tkankach otaczających staw biodrowy.



Fot. 5. Staw biodrowy 5-cio tygodniowego płodu psa, strona przśrodkowa.
Widoczna gałązka nerwu zasłonowego podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka).
O.S. - kość krzyżowa.
7.V.L. - siódmy kręg lędźwiowy.
N.O. - nerw zasłonowy (strzałka).
O.P. - kość miedniczna.
C.A.C. - torebka stawu biodrowego.
M.A. - mięsień przywodziciel.
M.P. - mięsień łonowy.
M.G..- mięsień smukły.
M.S. - mięsień krawiecki.

Od strony bocznej wypreparowano nerw kulszowy (*n. ischiadicus*) oraz pośladkowy przedni (*n. gluteus cranialis*). Usunięto mięsień pośladkowy powierzchowny (*m. gluteus*

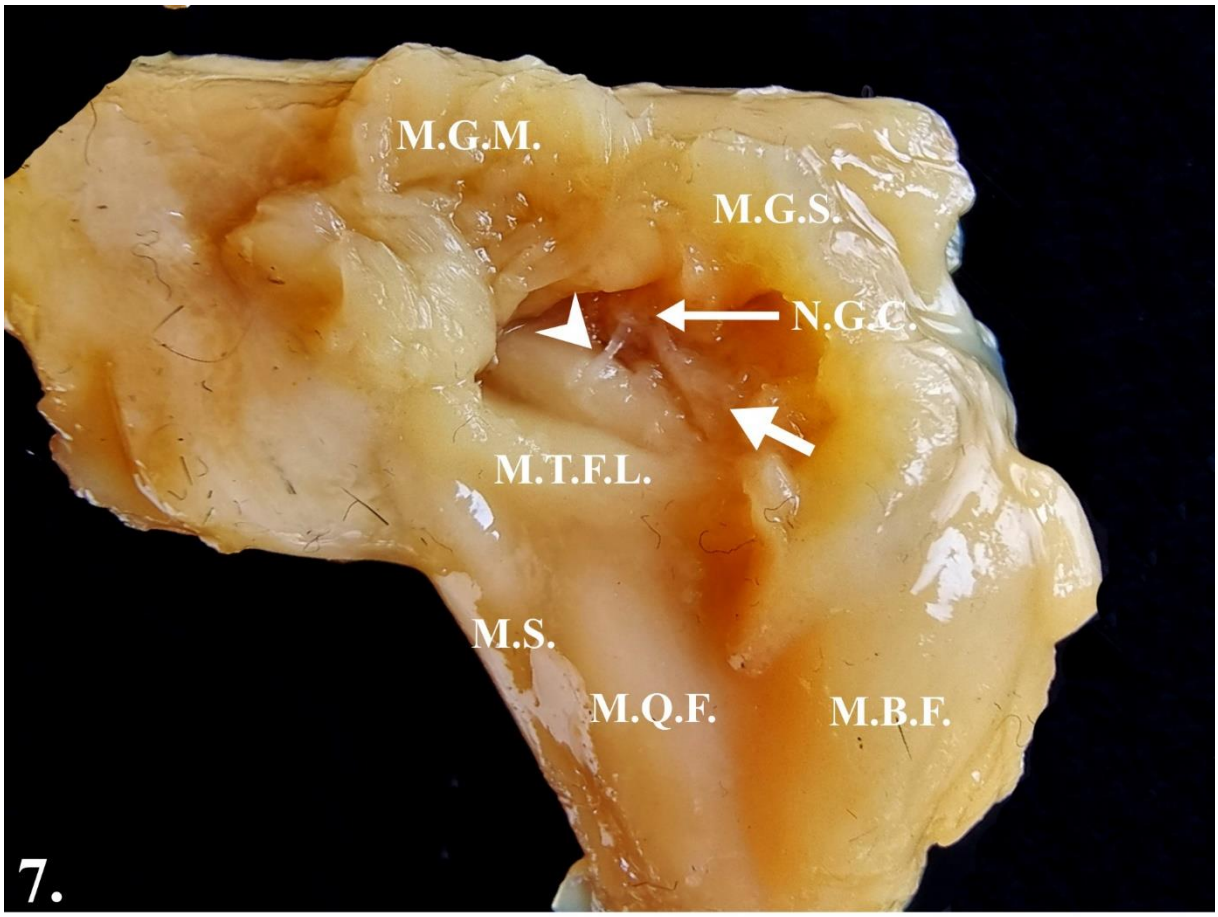
superficialis) i środkowy (*m. gluteus medius*). Nerw kulszowy przechodził nad wcięciem kulszowym większym biegnąc doogonowo. Na wysokości stawu biodrowego i kości udowej kierował się dobrzusznie. Dalszy przebieg odsłonięto usuwając mięsień dwugłowy uda (*m. biceps femoris*). Dalej kierował się dobrzusznie rozdzielając się w okolicy podkolanowej. Na wysokości stawu oddawał bardzo cienką gałązkę do stawu zaopatrując boczno-grzebietową część torebki (fot. 6). Taki przebieg nerwu kulszowego obserwowano u większości (4) badanych płodów tej grupy.



Fot. 6. Staw biodrowy 5-cio tygodniowego płodu psa, strona boczna. Usunięto mięsień pośladkowy powierzchowny i dwugłowy uda w celu uwidocznienia nerwu kulszowego (N.I.).
Widoczna gałązka nerwu podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka).
N.I. - nerw kulszowy.
M.G.S. - mięsień pośladkowy powierzchowny.
M.G.M. - mięsień pośladkowy średni.
M.T.F.L. - mięsień napinacz powięzi szerokiej.
M.S. mięsień krawiecki.
M.Q.F. - mięsień czterogłowy uda.
T.M.O.F. - krętarz większy kości udowej.

Nerw pośladkowy bardzo cienki (odsłonięty po wcześniejszym usunięciu mięśni pośladkowego powierzchownego i środkowego) przechodził w kierunku dobrzusznym nad

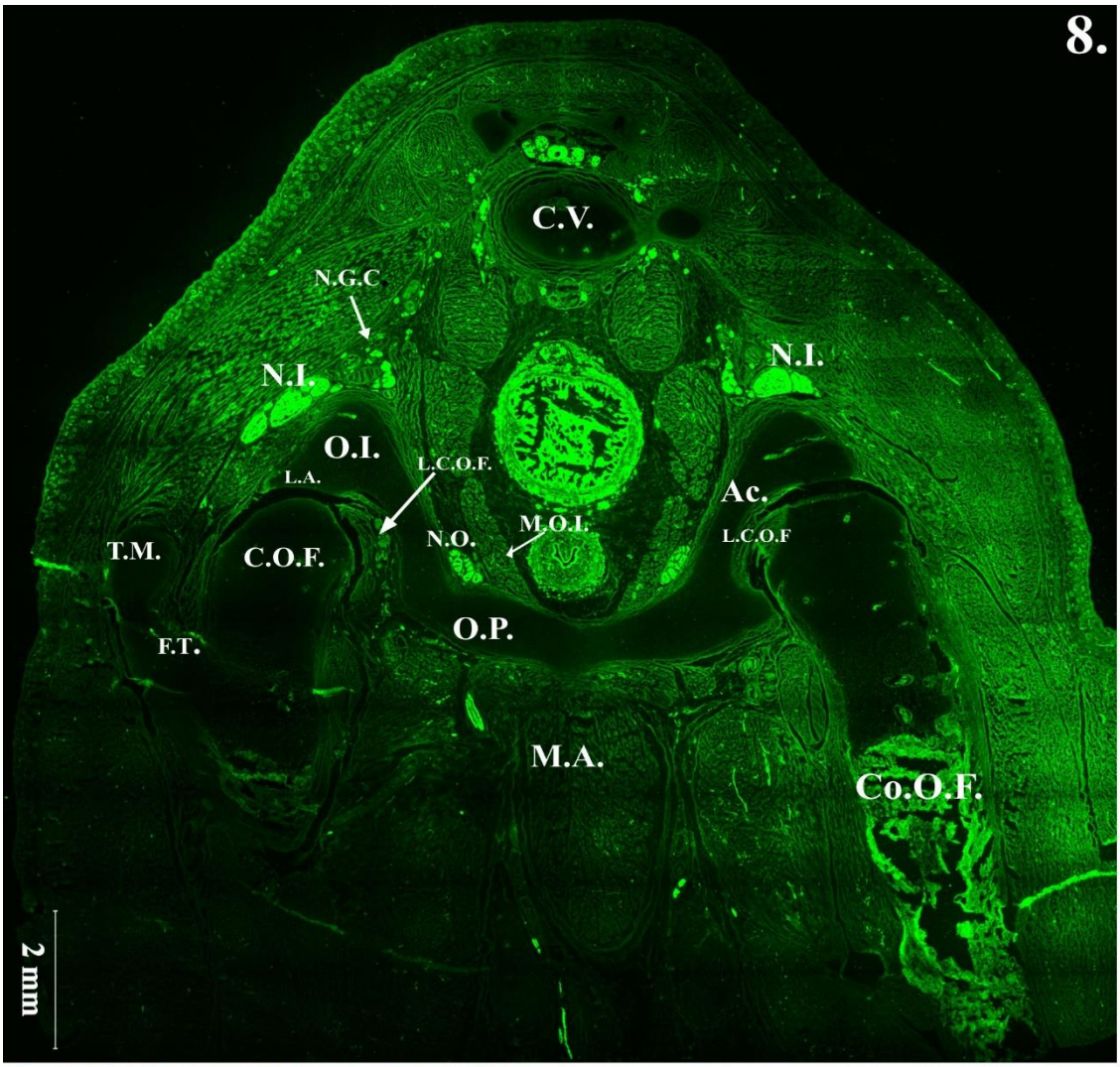
mięśniem pośladkowym głębokim (*m. gluteus profundus*). Oddawał gałązkę w kierunku doogonowym wchodząc we wspomniany mięsień (fot. 7). Jej koniec jest cienki i słabo widoczny przed osiągnieciem stawu. U większości płodów możliwość prześledzenia przebiegu nerwu do samej torebki była trudna i kończyła się w jej okolicy.

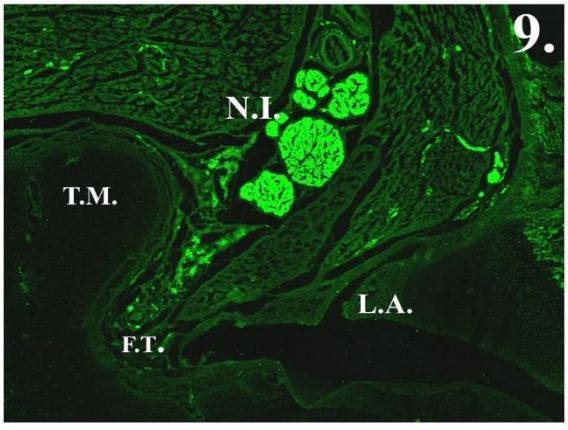


Fot. 7. Staw biodrowy 5-cio tygodniowego płodu psa, strona boczna. Mięśnie pośladkowe odpreparowano w celu uwidocznienia nerwu pośladkowego przedniego (N.G.C.). Widoczna gałązka nerwu podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka). Widoczna również gałązka do mięśnia napinacza powięzi szerokiej (grot strzałki).
N.G.C. -nerw pośladkowy przedni.
M.G.S. - mięsień pośladkowy powierzchowny.
M.G.M. - mięsień pośladkowy średni.
M.T.F.L. - mięsień napinacz powięzi szerokiej.
M.S. mięsień krawiecki.
M.B.F. - mięsień dwugłowy uda.
M.Q.F. - mięsień czterogłowy uda.

Barwienia immunohistochemiczne.

Badania immunohistohemiczne z użyciem acetylowanej tubuliny wykazały obecność licznych włókien nerwowych w okolicy badanego stawu. Stwierdzono obecność pni nerwów: kulszowego, zasłonowego, udowego i pośladkowego przedniego. Obserwowano dość liczne włókna nerwowe w okolicy obserwowanego stawu. Stwierdzono obecność licznych włókien nerwowych w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego i pojedyncze tylko włókna nerwowe w błonie maziowej, więzadle głowy kości udowej, w okostnej kości udowej oraz miednicy jak również nieliczne włókna w ścianie naczyń krwionośnych obecnych w okolicy stawu. Nie stwierdzono włókien nerwowych w obrąbku stawowym. Liczne włókna obecne były w mięśniach okalających staw biodrowy (fot. 8,9).



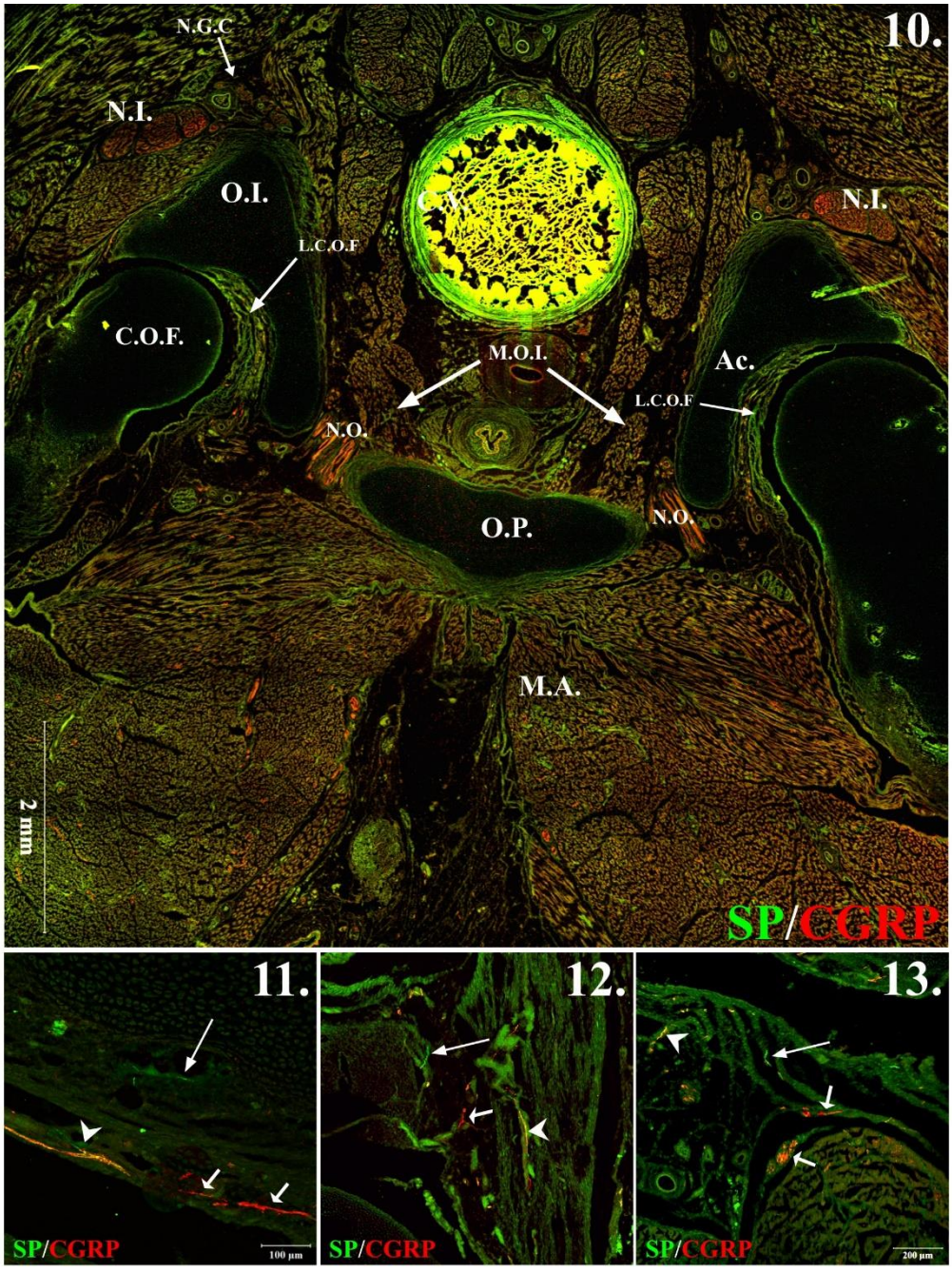


Fot. 8. Przykrój poprzeczny przez ciało 5-tygodniowego płodu na wysokości stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko acetylowanej tubulinie. Obecne liczne włoka nerwowe immunoreaktywnw dla acetylowanej tubuliny w strukturach stawu.

Fot. 9 Powiększenie obszaru górnej stawu biodrowego.Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko acetylowanej tubulinie. Obecne liczne włoka nerwowe immunoreaktywnw dla acetylowanej tubuliny w strukturach stawu.

C.V. - trzon kręgu.
N.G.C. - nerw pośladkowy przedni.
N.I. - nerw kulszowy.
O.I. - kość biodrowa.
L.C.O.F. - więzadło głowy kości udowej.
N.O. - nerw zasłonowy.
M.O.I - mięsień zasłonowy wewnętrzny.
C.O.F. -głowa kości udowej.
T.M. - krętarz większy.
F.T. - dół krętarzowy.
O.P. - kośc łonowa.
Ac. - panewka miednicy.
M.A. - mięśnie przywodziciele.
Co.O.F. - trzon kości udowej.
L.A. - obrąbek panewki.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw CGRP i SP wykazały obecność włókien nerwowych immunoreaktywnych dla CGRP , SP oraz SP/CGRP.



Fot. 10. Przykrój poprzeczny przez ciało 5-tygodniowego płodu na wysokości stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko SP i CGRP. Obecne liczne włoka nerwowe immunoreaktywnw dla SP, CGRP i SP/CGRPw strukturach stawu.
Fot. 11. SP- (strzałka), CGPP- (krótka strzałka), i SP/CGRP-immunoreaktywne (grot strzałki) włókna nerwowe w torebce włóknistej stawu biodrowego.
Fot. 12. SP- (strzałka), CGPP- (krótka strzałka), i SP/CGRP-immunoreaktywne (grot strzałki) włókna nerwowe w więzadle głowy kości udowej.
Fot. 13. SP- (strzałka), CGPP- (krótka strzałka), i SP/CGRP-immunoreaktywne (grot strzałki) włókna nerwowe w okostney kości miednicznej

N.G.C. - nerw pośladkowy przedni.
N.I. - nerw kulszowy.
O.I. - kość biodrowa.
L.C.O.F. - więzadło głowy kości udowej.
N.O. - nerw zasłonowy.
M.O.I - mięsień zasłonowy wewnętrzny.
C.O.F. -głowa kości udowej.
O.P. - kośc łonowa.
Ac. - panewka miednicy.
M.A. - mięśnie przywodziciele.

Włókna te obecne były w pniach nerwu udowego, kulszowego (fot. 10), pośladkowego przedniego oraz zasłonowego (fot. 10). Stwierdzono nieliczne włókna nerwowe SP-IR w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego (fot. 11) i pojedyncze w błonie maziowej, więzadle głowy kości udowej (fot. 12), okostnej kości udowej oraz miednicy (fot.13). Stwierdzono również obecność nielicznych włókien CGRP+ w błonie włóknistej torebki stawowej (fot. 11) i pojedyncze w błonie maziowej, więzadle głowy kości udowej (fot. 12), okostnej kości udowej oraz miednicy (fot. 13). Pojedyncze SP/CGRP+ włókna nerwowe stwierdzono w błonie włóknistej torebki stawowej (fot. 11), błonie maziowej, w więzadle głowy kości udowej (fot. 12), okostnej kości udowej oraz miednicy (fot. 13). Nie stwierdzono włókien nerwowych immunoreaktywnych dla SP i CGRP w obrąbku panewkowym. Naczynia krwionośne obecne w bezpośrednim sąsiedztwie stawu jak również w obrębie torebki stawu były zaopatrzone przez pojedyncze włókna nerwowe immunoreaktywne dla SP i SP/CGRP oraz nieliczne włókna nerwowe CGRP-IR.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw DβH i VAChT wykazały obecność pojedynczych włókien nerwowych awierających te substancje. DβH+ i VAChT+. obecne były na terenie pni nerwów udowego, kulszowego, pośladkowego przedniego oraz zasłonowego. Pojedyncze VACHT+ włókna nerwowe obserwowano w błonie włóknistej i maziowej torebki stawu biodrowego. Pojedyncze DβH+ włókna nerwowe znaleziono w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego. W ścianie naczyń krwionośnych zaopatrujących torebkę stawu biodrowego stwierdzono obecność pojedynczych włókien VACHT+ i nielicznych włókien immunoreaktywnych dla DβH.

Barwienia z użyciem kombinacji przeciwciał skierowanych przeciwko DβH i NPY wykazały obecność pojedynczych włókien immunoreaktywnych dla DβH, NPY oraz DβH/NPY. Włókna takie obecne były w pniach nerwów włączonych w unerwienie stawu biodrowego. Stwierdzono obecność pojedynczych włókien immunoreaktywnych dla DβH,

NPY i DβH/NPY w błonie włóknistej torebki stawowej. Nieliczne włókna nerwowe DβH-IR i DβH/NPY-IR oraz pojedyncze tylko NPY-IR obserwowano w ścianie naczyń krwionośnych.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw DβH i GAL wykazały obecność nielicznych włókien nerwowych DβH+ oraz pojedynczych włókien GAL+ i DβH/GAL+. Ich obecność stwierdzono wewnątrz włókien nerwowych nerwów udowego, kulszowego, pośladkowego przedniego oraz zasłonowego. Pojedyncze włókna nerwowe immunoreaktywne dla DβH, GAL i DβH/GAL stwierdzono w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego. Nieliczne włókna DβH-IR, oraz pojedyncze włókna GAL- i DβH/GAL-IR obserwowano w ścianie naczyń krwionośnych.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw VIP, VAChT oraz VIP/VAChT wykazały obecność pojedynczych włókien immunoreaktywnych dla wszystkich badanych substancji. Obserwowano pojedyncze włókna nerwowe immunoreaktywne dla VACHT, VIP i VACHT/VIP pniach nerwowych nerwów udowego, kulszowego, pośladkowego przedniego oraz zasłonowego. Ich obecność stwierdzono również w błonie włóknistej torebki stawowej oraz naczyniach krwionośnych podczas gdy w błonie maziowej występowały włókna VIP- i VACHT-IR.

4.3 Grupa III

Badania preperacyjne

Płody w wieku 8 tygodni mają w zasadzie rozwinięty układ kostno-szkieletowy, wszystkie struktury wchodzące w skład stawu biodrowego są obecne, częściowo skostniałe (trzony kości). Kończyny rozwinięte z porozdzielanymi paliczkami. Włosy czuciowe rozwinięte. Powieki zakrywają oczy całkowicie. Mieszki włosowe na ciele obecne z formującą się sierścią. Pazury uformowane. Płody nieznacznie zróżnicowane wielkością. Nerwy preparowanej okolicy są dobrze rozwinięte, nietransparentne, cienkie z widocznymi gałązkami dochodzącymi do torebki stawu. Wielkość stawu mieściła się w przedziale 5-10mm i wielkość

nerwów około do 2mm (główne gałęzie). Staw w badanej grupie płodów był dobrze dostępny, bez uszkodzenia torebki w trakcie preparacji.

Od strony przyśrodkowej stwierdzono obecność nerwu udowego oraz zasłonowego. Nerw udowy biegnący wzdłuż mięśnia biodrowo-lędźwiowego (*m. iliopsoas*), w kierunku doogonowym znikał w mięśniach uda i oddawał wyraźną gałąź schodzącą na kość biodrową. Gałąź biegnąca wzdłuż kości biodrowej oddawała cienkie włókna wchodzące w okolicę torebki stawu. Przebieg nerwu udowego na kości miednicznej udało się zaobserwować u wszystkich płodów. Nerw ten był cienki, trudny do dokładnej preparacji (ze względu na dużą ilość tkanek miękkich otaczających okolicę), ale z widocznymi gałązkami biegnącymi w okoliczne struktury oraz bezpośrednią okolicę stawu.

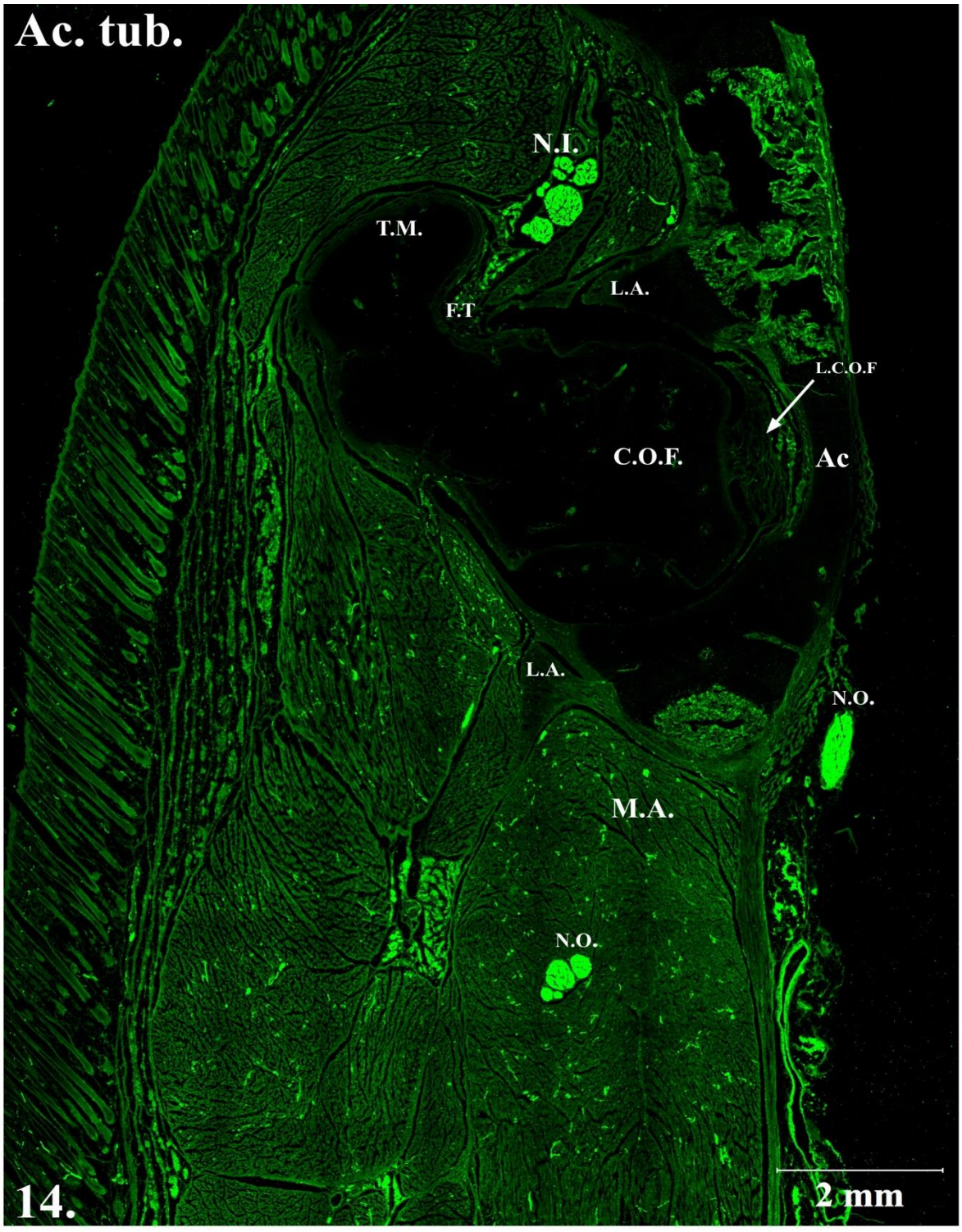
Nerw zasłonowy w całej grupie, wewnątrz jamy miednicznej był łatwy do preparacji i dobrze odgraniczony od okolicznych tkanek. Nerw ten opuszczając miednicę przechodził przez doczaszkową krawędź otworu zasłonowego. Na stronie dobrzusznej rozdzielał się na wyraźne gałęzie zaopatrujące przywodziciele uda i dawał w okolicy doogonowej gałązki do stawu biodrowego. Gałęzie tej okolicy mimo iż drobne były łatwe do identyfikacji i dobrze zaopatrujące staw i jego okolicę.

Od strony bocznej wypreparowano nerw kulszowy. Usunięto mięsień pośladkowy powierzchowny i środkowy. Nerw kulszowy był dobrze widoczny, pokaźnej grubości w całej grupie sekcjonowanych płodów. Przechodził nad wcięciem kulszowym większym biegnąc doogonowo. Przechodził nad stawem biodrowym i kością udową kierując się dobrzusznie. Usuwając mięsień dwugłowy uda odsłonięto dalszy przebieg nerwu aż do okolicy podkolanowej. W okolicy doogonowej stawu biodrowego oddawał bardzo wyraźną gałązkę (w przypadku trzech płodów nawet po 2 gałązki) do stawu zaopatrując boczno-grzebietową część torebki.

Nerw pośladkowy średniej grubości względem pozostałych nerwów (odsłonięty po usunięciu mięśnia pośladkowego powierzchownego i środkowego) przechodził w kierunku dobrzusznym nad mięśniem pośladkowym głębokim. Wchodząc w mięsień oddawał gałązkę w kierunku doogonowym. Jej koniec jest cienki i widocznie znikający w doczaszkowej części stawu. U wszystkich płodów prześledzono gałązkę tego nerwu wzdłuż mięśnia do okolicy samej torebki. W trakcie odpreparowywania nerwu od mięśnia na wysokości stawu był on cienki i u trzech płodów uległ uszkodzeniu. Sama gałązka nie przekraczała grubości włosa.

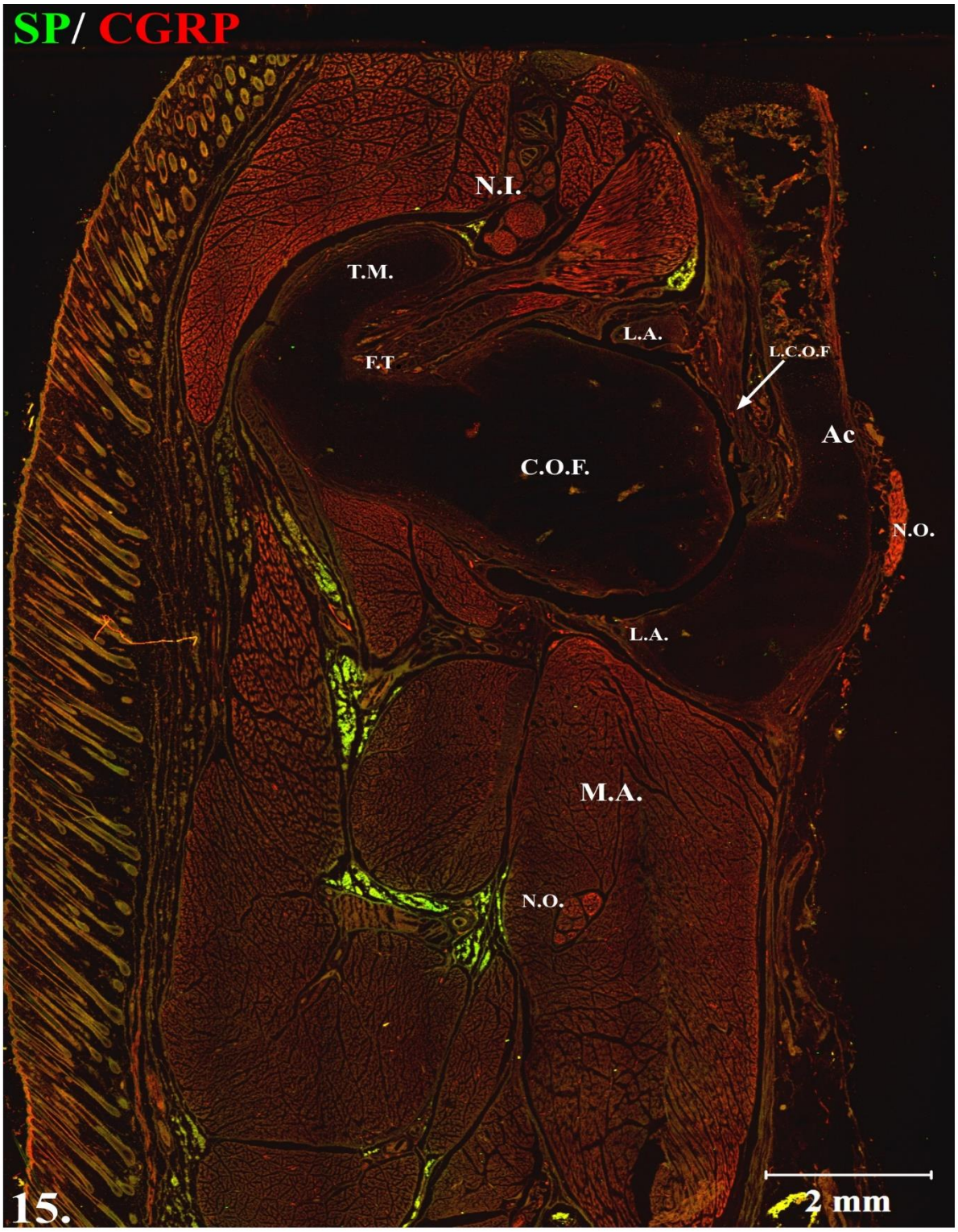
Barwienia immunohistochemiczne

Badania z użyciem acetylowanej tubuliny wykazały obecność pni nerwów: kulszowego (fot. 14), zasłonowego (fot. 14), udowego i pośladkowego przedniego. Stwierdzono obecność bardzo licznych włókien nerwowych immunoreaktywnych dla acetylowanej tubuliny. Obserwowano nieliczne włókna nerwowe w torebce stawu biodrowego, pojedyncze w więzadle głowy kości udowej, okostnej kości udowej oraz miednicy (fot. 14). Liczne włókna zaobserwowano w mięśniach okalających staw biodrowy oraz w naczyniach krwionośnych (fot. 14).



Fot. 14. Przekrój przez staw biodrowy 8-tygodniowego płodu. Barwienie z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko acetylowanej tubulinie. Obecne bardzo liczne włókna nerwowe w strukturach stawu.

N.I. - nerw kulszowy.
L.C.O.F. - więzadło głowy kości udowej.
N.O. - nerw zasłonowy.
C.O.F. -głowa kości udowej.
T.M. - krętarz większy.
F.T. - dół krętarzowy.
Ac. - panewka miednicy.
M.A. - mięśnie przywodziciele.
L.A. - obrąbek panewki.



Fot. 15. Przekrój przez staw biodrowy 8-tygodniowego płodu. Barwienie z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko SP i CGRP. Obecne liczne włókna nerwowe w strukturach stawu.

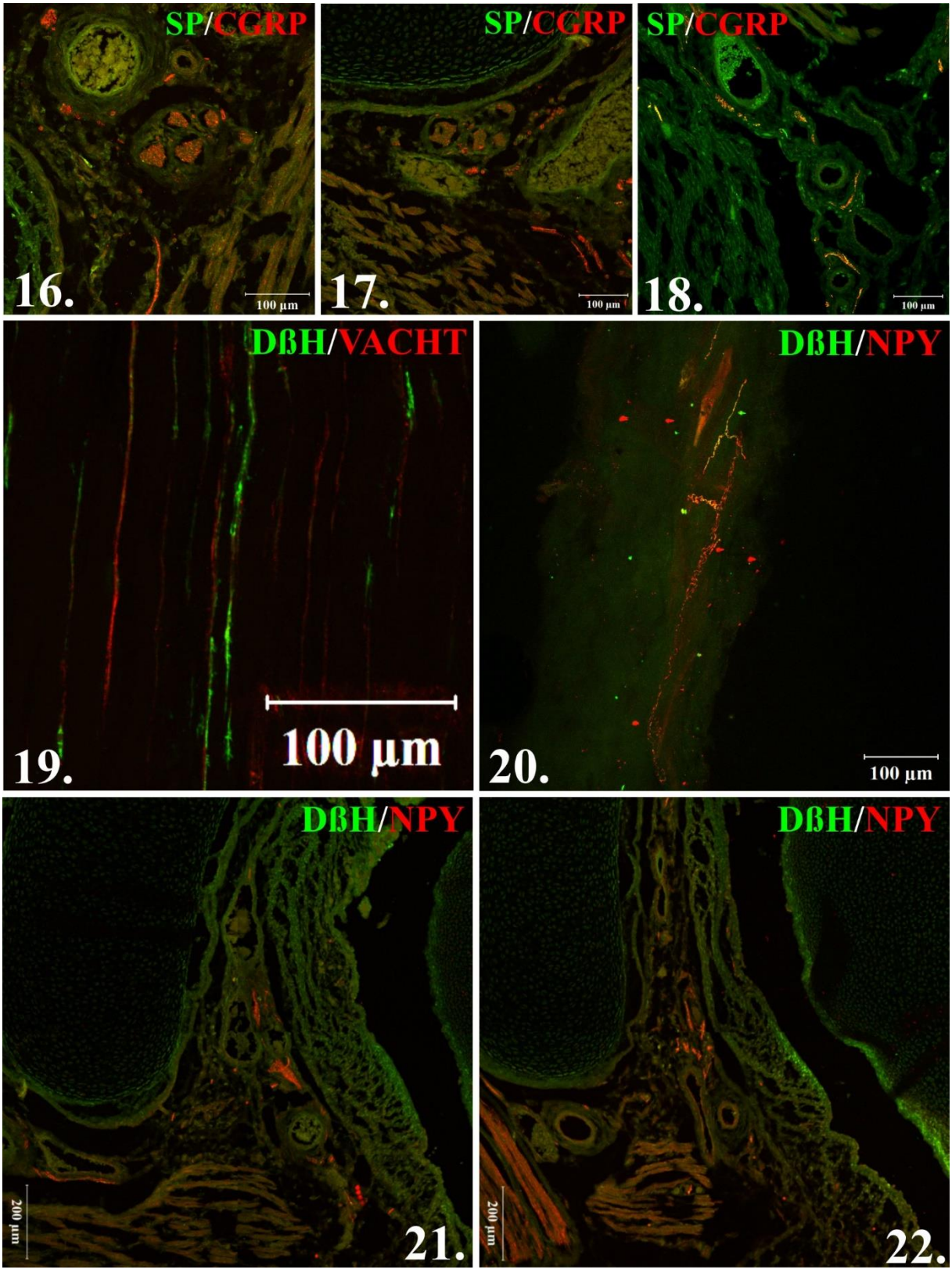
N.I. - nerw kulszowy.
L.C.O.F. - więzadło głowy kości udowej.
N.O. - nerw zasłonowy.
C.O.F. -głowa kości udowej.
T.M. - krętarz większy.
F.T. - dół krętarzowy.
Ac. - panewka miednicy.
M.A. - mięśnie przywodziciele.
L.A. - obrąbek panewki.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw CGRP i SP wykazały obecność licznych włókien nerwowych CGRP+, SP+ oraz SP/CGRP+. Liczne włókna nerwowe stwierdzono w pniach nerwu kulszowego (fot. 15), udowego, pośladkowego przedniego oraz zasłonowego (fot. 15). Nieliczne włókna nerwowe immunoreaktywne dla SP obserwowano w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego (fot. 16), pojedyncze w błonie maziowej torebki, więzadle głowy kości udowej i okostnej kości tworzących staw biodrowy (fot. 17). CGRP-IR włókna obserwowano w podobnej ilości w strukturach stawu, podczas gdy włókna wykazujące immunoreaktywność dla SP i CGRP były liczne w błonie włóknistej torebki (fot. 16), nieliczne w błonie maziowej i pojedyncze w więzadle głowy kości udowej oraz w okostnej (fot. 17). Nieliczne włókna SP/CGRP+ zaobserwowano w obrębie naczyń krwionośnych sąsiadujących i zaopatrujących staw i jego torebkę (fot. 18).

Barwienie z u życiem przeciwciał skierowanych przeciwko DβH i VAChT wykazało obecność immunoreaktywnych struktur nerwowych na terenie pni nerwów udowego, kulszowego, pośladkowego przedniego oraz zasłonowego. Pojedyncze włókna nerwowe DβH+ i VAChT+ obserwowano na terenie błony włóknistej torebki stawu biodrowego (fot. 19) oraz w okostnej kości udowej i miednicznej. Stwierdzono też obecność pojedynczych włókien VACHT+ w błonie maziowej torebki. W ścianach naczyń krwionośnych w okolicy stawu oraz w obrębie torebki stawu biodrowego stwierdzono obecność licznych włókien nerwowych DβH- i VAChT-IR.

Barwienia z użyciem przeciwciał przeciwko DβH i NPY wykazały nieliczne immunoreaktywne włókna nerwowe w wszystkich czterech nerwach zaopatrujących staw oraz strukturach otaczających staw. Obserwowano pojedyncze włókna nerwowe DβH+, NPY+ oraz DβH/NPY+ w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego (fot. 20) oraz okostnej kości udowej i miednicznej. Włókna immunopozytywne dla NPY tylko stwierdzono również w błonie maziowej torebki (fot. 21) stawu oraz w więzadle głowy kości udowej. Naczynia krwionośne

obecne w okolicy stawu biodrowego oraz w torebce były zaopatrzone przez liczne włókna DβH-IR, pojedyncze NPY-IR (fot. 22) oraz nieliczne DβH/NPY-IR.



Fot. 16. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko SP/CGRP.

Fot. 17. Okostna panewki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko SP/CGRP.

Fot. 18. Naczynia krwionośne w torebce stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko SP/CGRP.

Fot. 19. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/VACHT.

Fot. 20. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/NPY.

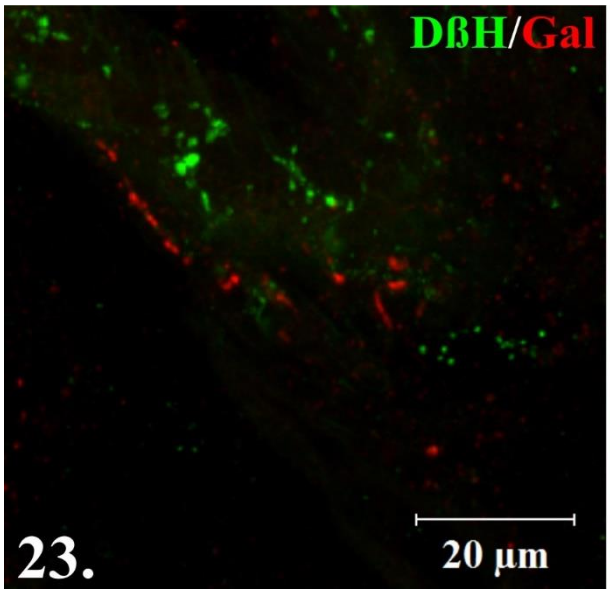
Fot. 21. Błona maziowa torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/NPY.

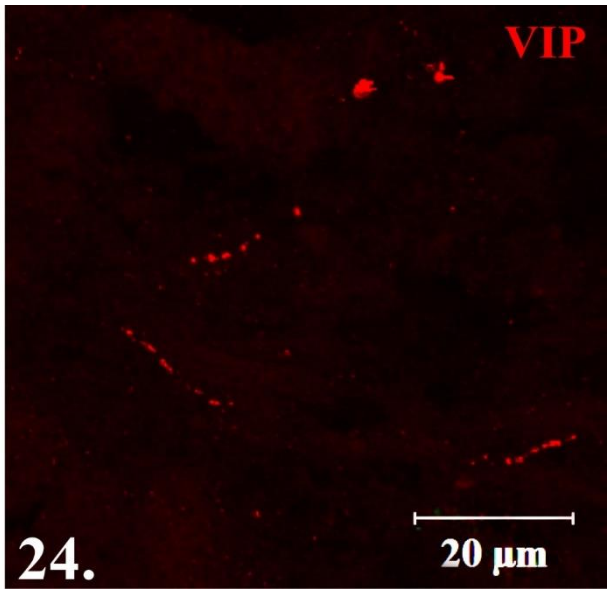
Fot. 22. Naczynia krwionośne w torebce stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/NPY.

Fot. 23. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/GAL.

Fot. 24. Błona maziowa torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko VIP.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw DβH i GAL wykazały obecność pojedynczych włókien nerwowych DβH+, GAL+ oraz DβH/GAL+. Obecność włókien nerwowych immunoreaktywnych dla badanych substancji stwierdzono w nerwach: udowym, kulszowym, pośladkowym przednim oraz zasłonowym. Obserwowano również obecność pojedynczych włókien nerwowych DβH+, GAL+ oraz DβH/GAL+ (fot. 23) w błonie włóknistej torebki stawu biodrowego. Naczyniach krwionośnych w okolicy stawu oraz w obrębie torebki stawu biodrowego wykazywały obecność licznych włókien DβH+, pojedynczych GAL+ oraz nielicznych DβH/GAL+.





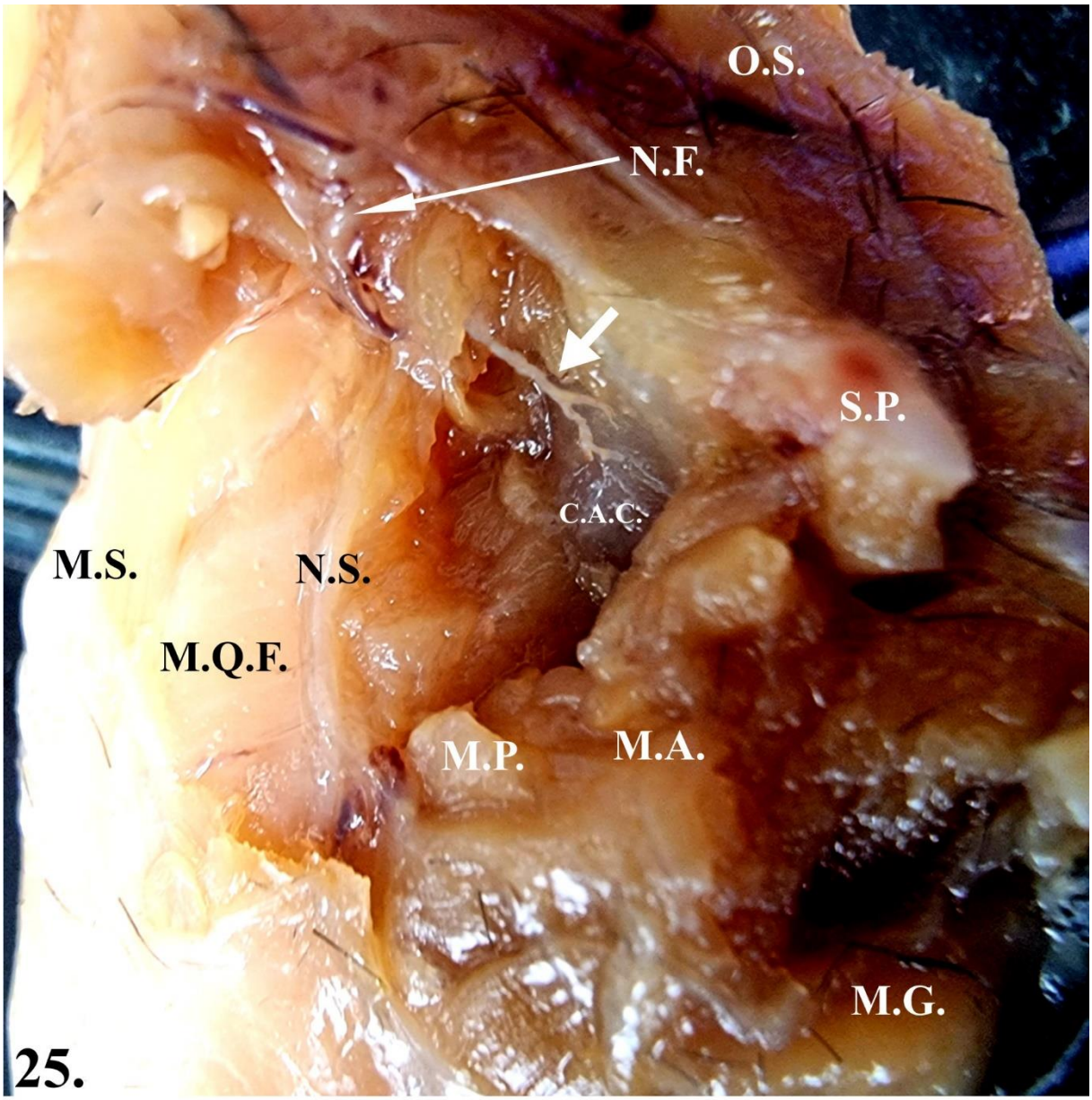
Barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw VIP i VAChT wykazały obecność nielicznych włókien VAChT+, VIP+, VAChT/VIP+ wewnątrz włókien nerwowych nerwów zasłonowego, udowego, pośladkowego przedniego oraz kulszowego. Pojedyncze włókna VAChT-, VIP- i VAChT/VIP-IR stwierdzono w błonie włóknistej i maziowej (fot. 24) torebki stawu biodrowego oraz okostnej kości tworzących staw. W naczyniach krwionośnych badanej okolicy i torebki stawu stwierdzono obecność licznych włókien VAChT-IR, nielicznych VAChT/VIP+ oraz pojedynczych tylko włókien VIP+.

4.4 Grupa IV

Badania preperacyjne

Szczenięta w do 3 dnia po urodzeniu były w pełni rozwinięte bez oznak fizycznego niedorozwoju. Powieki zamknięte. Sierść obecna na całym ciele ze zróżnicowaniem koloru. Paliczki w pełni porozdzielane z rozwiniętymi pazurami oraz obecnymi opuszkami. Mięśnie otaczające preparowaną okolicę dobrze wykształcone. Wielkość stawów nieznacznie zróżnicowana w grupie (w przedziale 12-18mm). Nerwy dobrze rozwinięte z dobrze widocznymi gałązkami zaopatrującymi staw, jego okolicę i okoliczne mięśnie (wielkość głównych pni nerwów od 2-4mm). Główne pnie nerwów wypreparowano u wszystkich badanych płodów.

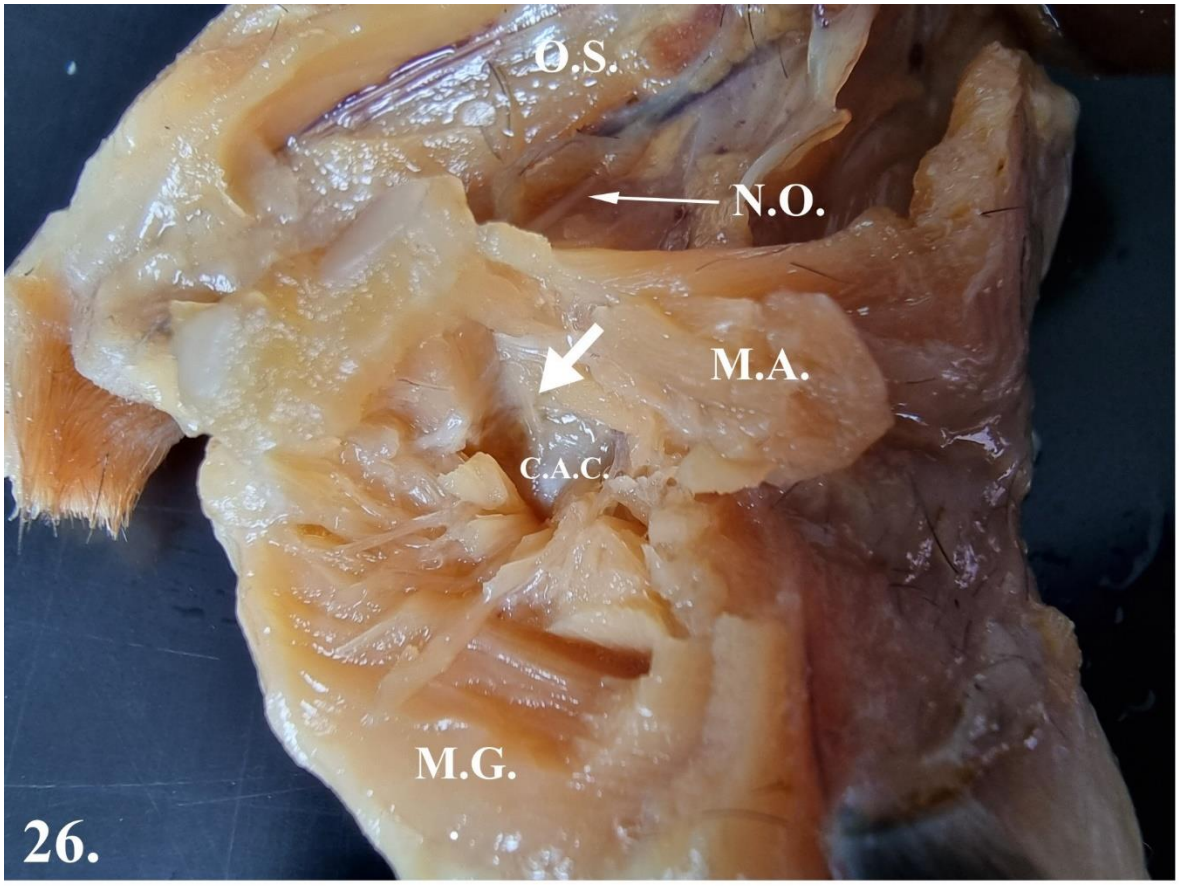
Nerw udowy wypreparowano po stronie przyśrodkowej. Główny pień nerwu biegnąc wzdłuż mięśnia biodrowo-lędźwiowego w okolicy pachwiny wchodził w mięśnie uda oddając nerw dostopowy (*n. saphenus*) i gałązkę schodzącą na kość biodrową. Potem oddawał dość cienką gałąź wchodzącą w okolicę stawu (fot. 25). Na kości miednicznej nerw biegnie w kierunku doogonowym i na wysokości panewki stawał się bardzo cienki zanikając w okolicznych tkankach i w okolicy torebki stawu biodrowego. Nerw w tej okolicy rozdziela się na liczne bardzo małe krótkie drobne włókna grubości włosa i zauważalnie kontaktuje się z okolicą stawu.



Fot. 25. Staw biodrowy trzydniowego szczenięcia, strona przyśrodkowa.
Widoczna gałązka nerwu udowego podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka).
O.S. - kość krzyżowa.
N.F. - nerw udowy (strzałka).
S.P. - spojenie miednicy.
N.S. - nerw dostopowy.
C.A.C. - torebka stawu biodrowego.
M.A. - mięsień przywodziciel.
M.P. - mięsień łonowy.
M.G..- mięsień smukły.
M.S. - mięsień krawiecki.
M.Q.F. - mięsień czterogłowy uda.

Nerw zasłonowy wewnątrz jamy miednicy jest stosunkowo gruby w stosunku do wielkości samej miednicy. Opuszczał miednicę przebijając się przez mięśnie zasłonowe, przy

doczaszkowej krawędzi otworu zasłonowego. Na stronie dobrzusznej dawał liczne wyraźne gałęzie do mięśni przywodzicieli i zanikał w okolicy doogonowej od stawu biodrowego. Obserwowane gałęzie były liczne i rozproszone w badanej okolicy. Ich znaczna ilość nieznacznie utrudniała stwierdzenie jak duża ich cześć brała udział w unerwieniu torebki. Zaobserwowano przynajmniej po dwie gałęzie kończące się w okolicy samej torebki stawu a w dwóch przypadkach stwierdzono obecność 3 gałęzi stawowych tego nerwu (fot. 26).

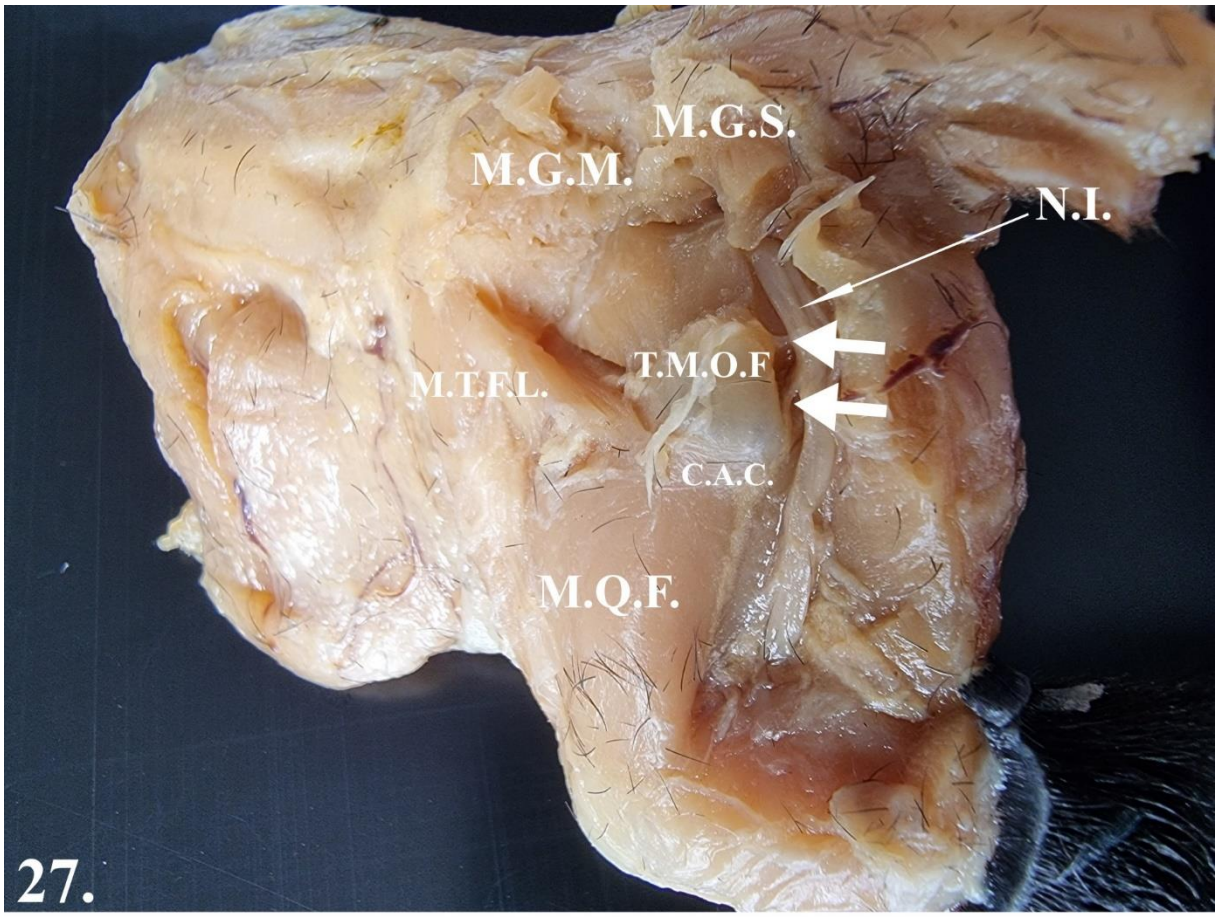


Fot. 26. Staw biodrowy trzydniowego szczenięcia, strona przśrodkowa.
Widoczna gałązka nerwu zasłonowego podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka).
O.S. - kość krzyżowa
N.O. - nerw zasłonowy (strzałka).
C.A.C. - torebka stawu biodrowego.
M.A. - mięsień przywodziciel.
M.G..- mięsień smukły.

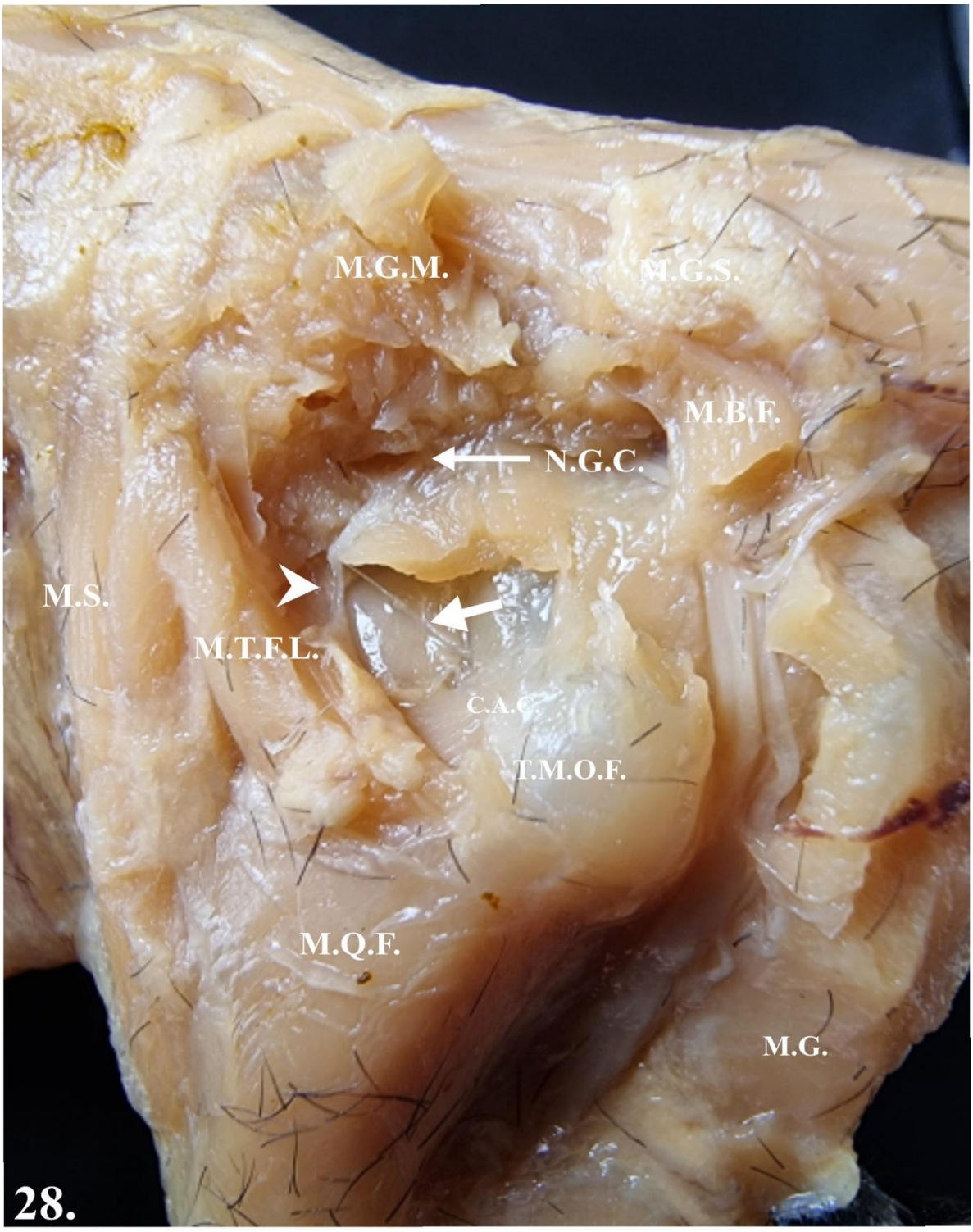
Nerw kulszowy oraz pośladkowy przedni zlokalizowano od strony bocznej. W trakcie preparacji w celu odsłonięcia badanej okolicy usunięto mięsień pośladkowy powierzchowny i środkowy. Nerw kulszowy jest pokaźnych rozmiarów względem wielkości stawu biodrowego

przechodzi nad wcięciem kulszowym większym biegnąc w kierunku doogonowym. Mijając staw biodrowy w jego dogrzbietowo-doogonowej części zakręcał dalej przemieszczając się dobrzusznie wzdłuż linii kończyny aż do okolicy podkolanowej (jego przebieg uwidoczniono usuwając mięsień dwugłowy uda). Na wysokości stawu oddał gałązki do okolicznych struktur głównie mięśni. Gałązki biegnące do stawu były różnej grubości zależnie od preparowanego osobnika. Zaopatrywały boczno-grzebietową część torebki. W tej grupie badanych płodów obserwowano od 1 (u jednego osobnika) do 3 (u dwóch płodów) gałązek nerwowych zaopatrujących torebkę (fot. 27).

Nerw pośladkowy przedni uwidaczniano po usunięciu wspomnianych mięśni pośladkowego powierzchownego i środkowego. Przechodził nad mięśniem pośladkowym głębokim w kierunku dobrzusznym i dalej biegł wchodząc w napinacz powięzi szerokiej (*m. tensor fasciae latae*). Oddawał gałązki zaopatrując mięsień pośladkowy środkowy i głęboki. Nerw przebijając mięsień dawał gałązkę, która dopiero na wysokości stawu wychodząc z mięśnia dochodziła do torebki stawu (fot. 28). Sama gałązka jest dość cienka i w przypadku większości badanych szczeniąt udało się ją odpreparować od mięśnia.



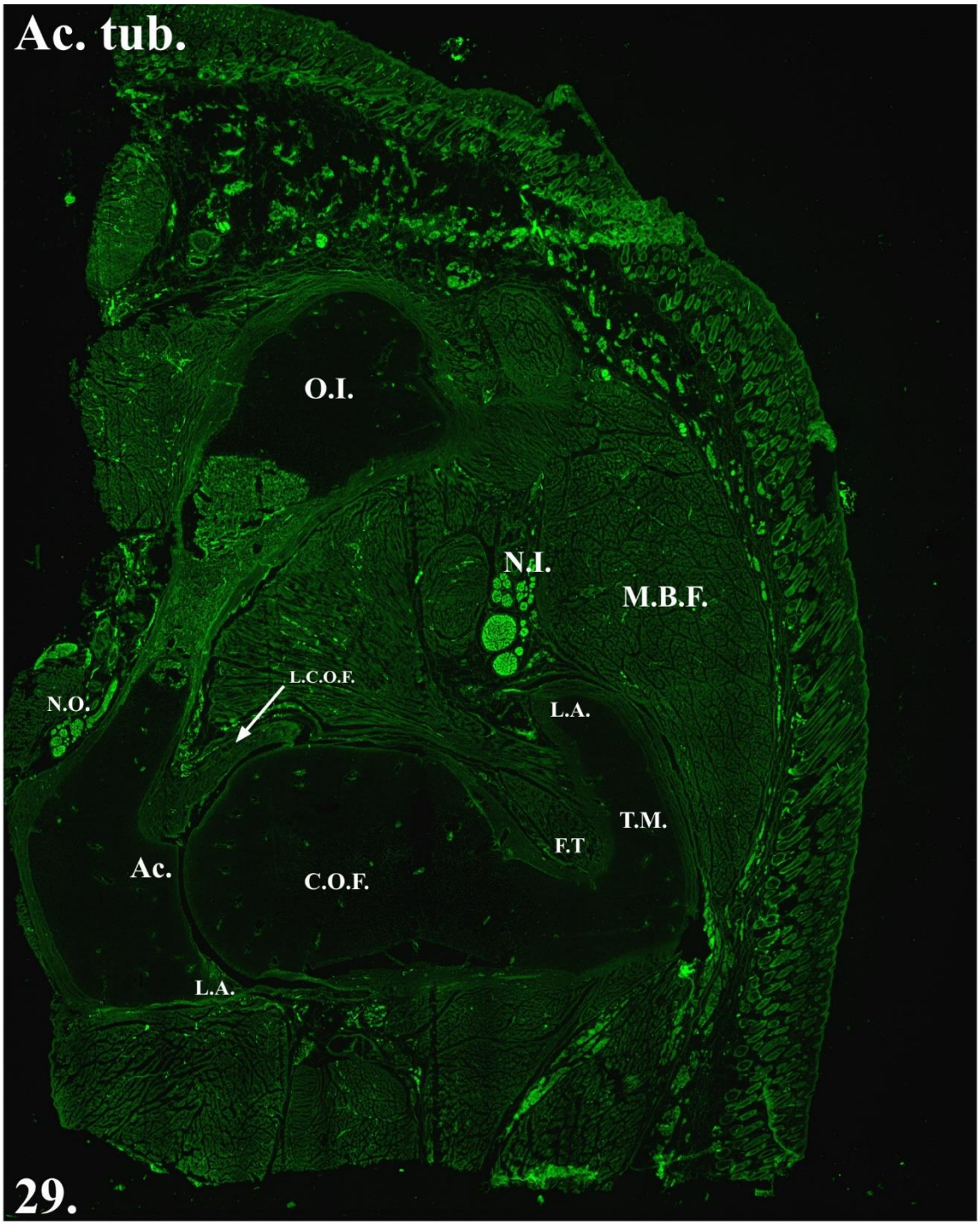
Fot. 27. Staw biodrowy trzydniowego szczenięcia, strona boczna. Usunięto mięsień pośladkowy powierzchowny i dwugłowy uda w celu uwidocznienia nerwu kulszowego (N.I.).
Widoczne gałązki nerwu podążające w okolicę stawu biodrowego (krótkie strzałki).
N.I. - nerw kulszowy.
M.G.S. - mięsień pośladkowy powierzchowny.
M.G.M. - mięsień pośladkowy średni.
M.T.F.L. - mięsień napinacz powięzi szerokiej.
M.Q.F. - mięsień czterogłowy uda.
T.M.O.F. - krętarz większy kości udowej.



Fot. 28. Staw biodrowy 3-dniowego szczenięcia, strona boczna. Mięśnie pośladkowe odpreparowano w celu uwidocznienia nerwu pośladkowego przedniego (N.G.C.). Widoczna gałązka nerwu podążająca w okolicę stawu biodrowego (krótka strzałka). Widoczna również gałązka do mięśnia napinacza powięzi szerokiej (grot strzałki).
N.G.C. -nerw pośladkowy przedni.
M.G.S. - mięsień pośladkowy powierzchowny.
M.G.M. - mięsień pośladkowy średni.
M.T.F.L. - mięsień napinacz powięzi szerokiej.
M.S. mięsień krawiecki.
M.B.F. - mięsień dwugłowy uda.
M.Q.F. - mięsień czterogłowy uda.

Barwienia immunohistochemiczne

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko acetylowanej tubulinie wykazały obecność bardzo licznych włókien nerwowych. Stwierdzono ich obecność w pniach nerwów: kulszowego, zasłonowego, udowego i pośladkowego przedniego. Liczne włókna potwierdzono w wszystkich strukturach otaczających staw, w samej okostnej oraz w okolicznych mięśniach, za wyjątkiem więzadła głowy kości udowej gdzie włókna były nieliczne oraz obrąbka stawowego gdzie nie stwierdzono obecności włókien nerwowych (fot. 29).



Fot. 29. Przekrój przez staw biodrowy trzydniowego szczenięcia. Barwienie z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko acetylowanej tubulinie. Obecne bardzo liczne włókna nerwowe w strukturach stawu.

N.I. - nerw kulszowy.
L.C.O.F. - więzadło głowy kości udowej.
N.O. - nerw zasłonowy.
C.O.F. -głowa kości udowej.
T.M. - krętarz większy.
O.I. - kość biodrowa.
F.T. - dół krętarzowy.
Ac. - panewka miednicy.
M.A. - mięśnie przywodziciele.
L.A. - obrąbek panewki.
M.B.F. - mięsień dwugłowy uda.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw CGRP i SP wykazały obecność licznych włókien w pniach badanych nerwów. W strukturach stawów stwierdzono obecność nielicznych licznych włókien nerwowych immunoreaktywnych dla CGRP, SP oraz licznych CGRP/SP w błonie włóknistej torebki stawowej (fot. 30), pojedynczych włokiem SP- i CGRP-IR oraz nielicznych SP/CGRP-IR w błonie maziowej. W więzadle głowy kości udowej obserwowano pojedyncze włókna SP- lub CGRP-IR oraz nieliczne SP/CGRP-IR. Okostna kości udowej oraz miednicy zaopatrzona jest przez pojedyncze włókna SP+ lub CGRP+ oraz przez liczne nerwy SP/CGRP+. W ścianie naczyń krwionośnych obecnych w bezpośrednim sąsiedztwie stawu jak również w obrębie torebki stawowej stwierdzono nieliczne włókna nerwowe immunoreaktywne dla SP, CGRP i SP/CGRP.

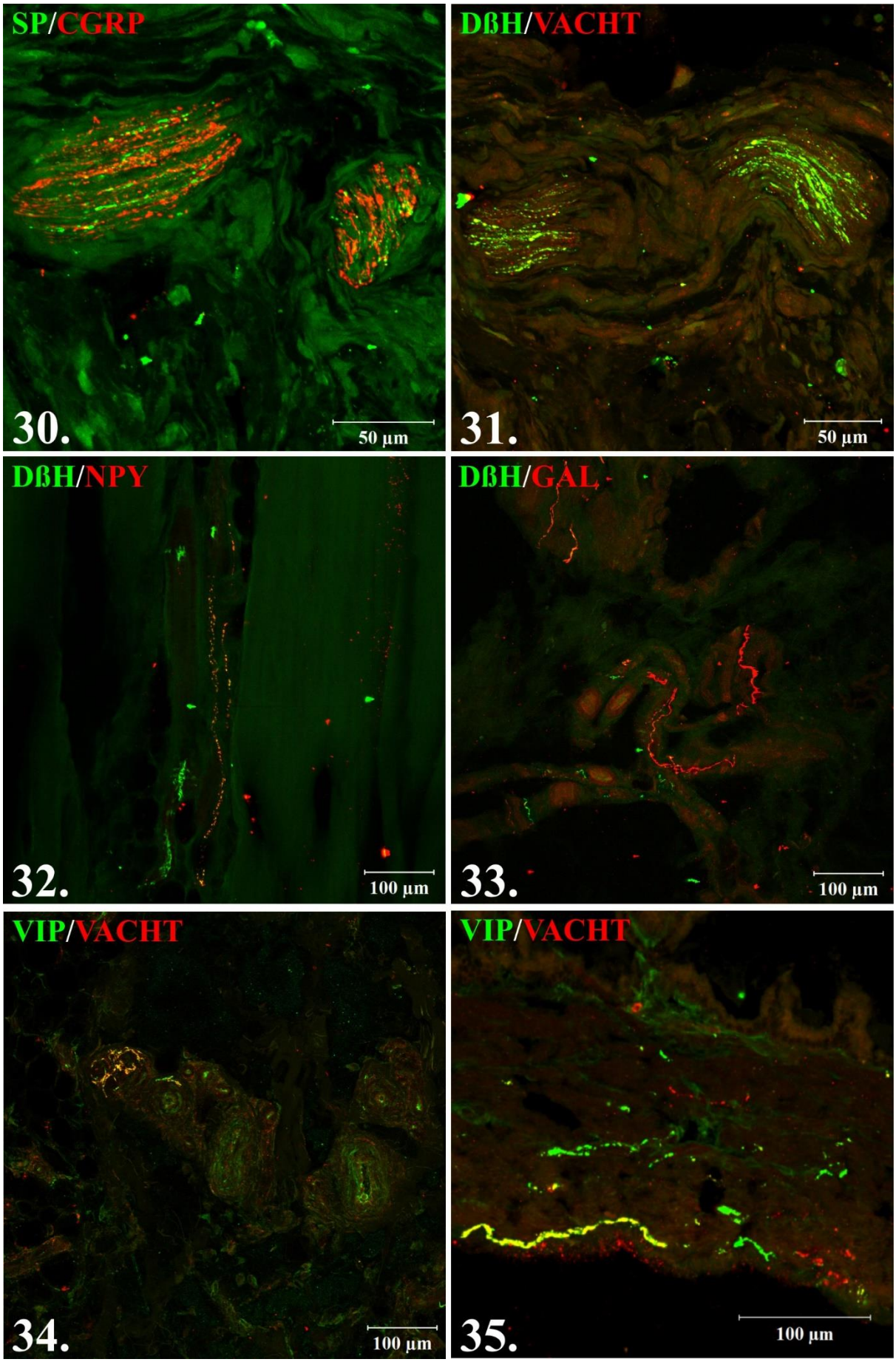
Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw DβH i VAChT wykazały obecność dość licznych włókien nerwowych. Wykazano obecność immunoreaktywnych włókien nerwowych DβH-IR oraz VAChT-IR. Włókna nerwowe obserwowano na terenie pni badanych nerwów udowego, kulszowego, pośladkowego przedniego oraz zasłonowego. Nieliczne włókna DβH+ i VAChT+ stwierdzono w błonie włóknistej (fot. 31) a pojedyncze tylko w błonie maziowej torebki stawowej stawu biodrowego. W okostnej kości udowej i miednicznej stwierdzono obecność nielicznych włókien DβH+ i pojedynczych VAChT+. W naczyniach krwionośnych w okolicy stawu biodrowego i torebki obserwowano obecność licznych immunoreaktywnych dla DβH i VAChT włókien nerwowych.

Barwienia z użyciem przeciwciał przeciwko NPY i DβH wykazały obecność dość włókien immunoreaktywnych dla wszystkich badanych substancji. Ich obecność stwierdzono w nerwach zaopatrujących staw oraz strukturach otaczających staw. Stwierdzono obecność pojedynczych włókien zawierających NPY, DβH i NPY/DβH błonie włóknistej torebki stawu biodrowego (fot. 32), podczas gdy w błonie maziowej i więzadle głowy kości udowej obecne są pojedyncze włókna NPY i NPY/DβH-immunoreaktywne. W okostnej kości udowej i

miednicznej obserwowano nieliczne włókna DβH– i NPY-IR oraz pojedyncze włókna NPY/ DβH-IR. Liczne DβH-IR włókna nerwowe występowały w obrębie naczyń krwionośnych okolicy stawu biodrowego podczas gdy włókna NPY+ i NPY/ DβH-IR + były nieliczne.

Barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw DβH i GAL wykazały obecność włókien nerwowych DβH-IR, GAL-IR oraz DβH/GAL-IR wewnątrz włókien nerwów kulszowego, udowego, zasłonowego oraz pośladkowego przedniego. W błonie włóknistej torebki stawu biodrowego stwierdzono obecność pojedynczych włókien immunoreaktywnych dla DβH, GAL i GAL/DβH. W błonie maziowej i więzadle głowy kości udowej obecne były włókna immunoreaktywne dla GAL (fot. 33). W okostnej kości udowej obserwowano nieliczne włókna immunoreaktywne dla DβH/GAL oraz pojedyncze GAL-IR. W naczyniach krwionośnych obecnych w okolicy stawu oraz w obrębie torebki obserwowano włókna liczne włókna DβH-IR i nieliczne Gal- i GAL/ DβH-IR.

Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw VIP i VAChT obecność immunoreaktywnych włókien nerwowych w obrębie nerwów zaopatrujących staw biodrowy: kulszowego, udowego, zasłonowego oraz pośladkowego przedniego. Pojedyncze włókna VIP+, VAChT+ oraz VIP/VAChT+ stwierdzono w okostnej kości, błonie włóknistej (fot. 34) i maziowej stawu biodrowego (fot. 35) (nieco więcej włókien VIP+ znaleziono w błonie maziowej). W więzadle głowy kości udowej wykazano obecność włókien VIP-IR. Naczynia zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie stawu i w torebce wykazały obecność licznych włókien VACHT+ i nielicznych VACHT/VIP+ i VIP+.


SP/CGRP
30.
50 µm
DßH/VACHT
31.
50 µm
DßH/NPY
32.
100 µm
DßH/GAL
33.
100 µm
VIP/VACHT
34.
100 µm
VIP/VACHT
35.
100 µm

Fot. 30. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko SP/CGRP.

Fot. 31. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/VACHT.

Fot. 32. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/NPY.

Fot. 33. Błona maziowa torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko DßH/GAL.

Fot. 34. Błona włóknista torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko VIP/VACHT

Fot. 35. Błona maziowa torebki stawu biodrowego. Barwienie z użyciem przeciwciał przeciwko VIP/VACHT.

5. Dyskusja

Unerwienie torebki stawu biodrowego jest obiektem wielu badań zarówno u ludzi (Barnett 2021; Laumonerie i wsp. 2021) jak i u zwierząt (Birnbaum i wsp. 1997; Dee 1969; Dee 1969; Dudek i wsp. 2013; Dudek i wsp. 2017; Fearnside i Black 1999; Huang i wsp. 2012; McDougall i wsp.2006; Nakajima i wsp. 2008a,b; Nakajima i wsp. 2015; Ohtori i wsp. 2003; Rankin i Diesem 1977 Saxler i wsp. 2005, 2007; Schmaedecke i wsp. 2008; Siebenrock i wsp. 2000; Sienkiewicz i wsp. 2018a,b; Staszyk i Gasse 2002; Watkins i Li, 2006; Willick i wsp. 1998). Ma to związek z schorzeniami tego stawu takimi jak: dysplazja stawu biodrowego, choroba Legg Calve Perthesa, osteoarthritis, osteochondroza. Schorzenia te są przyczyną nie tylko problemów związanych z poruszaniem się, ale są źródłem silnego bólu i dyskomfortu. Dotyczą one wielu gatunków zwierząt lecz najczęściej spotka się je u psów. Chore zwierzęta zaczynają wykazywać objawy kulawizny, braku ochoty do spacerów, nawet spaczonego łaknienia (Fry i Clark, 1992; Morgan i wsp. 2000; Beale 2005). Powoduje to znaczne obniżenie komfortu życia zwierząt. W skrajnych przypadkach doprowadza wyniszczenia, znacznego ubytku masy mięśniowej i nawet całkowitej niemożności poruszania się. W takich przypadkach nierzadko może zapaść decyzja o eutanazji. Choroby stawu biodrowego są schorzeniami postępującymi z czasem stan zwierząt ulega pogorszeniu. Stan zapalny toczący się w obrębie stawu powoduje jego ciągłą przebudowę (nawet przechodzenia jednej choroby w drugą), która jest procesem nieodwracalnym zmienia całą strukturę pracy i funkcjonowania stawu (Anderson 2020; Ytrehus i wsp. 2007; Bieżyński i wsp. 2012).

Niniejsze badania wykazały, że staw biodrowy jest zaopatrzony przez następujące nerwy: kulszowy, pośladkowy przedni, zasłonowy i udowy. Dostępne przeprowadzone badania potwierdzają te wyniki, jednak literatura w tym temacie nie zawsze jest spójna. W niektórych podręcznikach wymieniany jest tylko nerw kulszowy jako zaopatrujący czuciowo torebkę stawu biodrowego (Bolk i wsp. 1938; Dobberstein i Hoffmann 1964; Ellenberger i Baum 1977;

Sobociński 1982; Frick 1983; Kobryń i Kobryńczuk 2004). U psa, owcy, konia i królika jednoznacznie potwierdzono udział tych samych nerwów w zaopatrzeniu stawu biodrowego (Huang i wsp.2012; Sienkiewicz i wsp. 2018; Rankin i Diesem 1977; A Dudek i wsp. 2013). Badanie przeprowadzone na szczurach (Nakajima i wsp. 2008) potwierdziło udział nerwu kulszowego, pośladkowego przedniego i udowego w zaopatrzeniu czuciowym stawu biodrowego. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają udział nerwu kulszowego w unerwieniu stawu biodrowego psa. Stwierdzono również wzrost liczby odgałęzień tego nerwu zaopatrujących staw biodrowy wraz z wiekiem płodów. W badaniach przeprowadzonych na kotach (Dee 1969) udział nerwu zasłonowego w unerwieniu stawu biodrowego nie został potwierdzony u większości badanych zwierząt (zaobserwowano go tylko u 2 osobników). Nieco inny wynik uzyskano w badaniach przeprowadzonych na psach (Kinzel i wsp. 1998) gdzie nie wykazano udziału nerwu zasłonowego w unerwieniu stawu biodrowego. Jest to bardzo zaskakujące, ponieważ w niniejszej pracy stwierdzono z cała pewnością obecność gałązek stawowych pochodzących od nerwu zasłonowego. Wyniki badań unerwienia stawu biodrowego są często rozbieżne, a jedno z badań wykluczało udział nerwu udowego (Birnbaum i wsp. 1997), co nie znalazło potwierdzenia w wynikach niniejszej pracy, gdyż stwierdzono obecność gałązek nerwu udowego zaopatrujących staw biodrowy. Biorąc pod uwagę znaczne różnice w uzyskanych wynikach, nasuwa się wniosek, że ilość włókien nerwowych oraz ilość gałązek zaopatrujących staw biodrowych jest kwestią nie tylko gatunkową, ale również osobniczą co w swojej pracy postulował również Schmaedecke i wsp. (2008). U ludzi ze względu na różnice anatomiczne przebieg nerwów nieco różni się topograficznie. Mimo to badania potwierdzają udział przedstawionych nerwów (lub ich odpowiedników) w unerwieniu stawu w tym: nerwu udowego, zasłonowego, kulszowego i pośladkowego powierzchownego (odpowiednik pośladkowego przedniego) (Barnett 2021; Laumonerie i wsp. 2021). Dodatkowo

u ludzi wykazano udział innych nerwów w zaopatrzeniu stawu takich jak: nerw zasłonowy dodatkowy, nerw czworogłowy uda czy pośladkowy dolny.

W niniejszej pracy wykazano, że ogólna ilość włókien nerwowych wzrasta wraz rozwojem szczeniąt. W bardzo wczesnej ciąży (grupa I) płody nie posiadają kończyn, a jedynie same zawiązki więc na tym etapie nie rozwinęło się jeszcze unerwienie. W badaniu morfologicznym nie uwidoczniono żadnych nerwów w tej okolicy. W barwieniu z wykorzystaniem acetylowanej tubuliny zauważalne są jednak grube pęczki włókien nerwowych w okolicy zawiązków kończyn. Włókna te odchodzą od rdzenia kręgowego. Dopiero w wieku 5 tygodni (grupa II) płody są rozwinięte w sposób umożliwiający prześledzenie przebiegu nerwów. Posiadają rozwinięte kończyny wraz z stawem biodrowym. W badaniu preparacyjnym włókna są słabe, cienkie nawet lekko transparentne. Pomimo tych cech same nerwy są już praktycznie w pełni rozwinięte i ich ułożenie anatomicznie odpowiada temu występującemu u dorosłych osobników. U płodów III grupy (8 tygodni życia płodowego) zwiększa się grubość włókien nerwowych, ich wytrzymałość. Zauważalne stają coraz liczniejsze gałęzie doprowadzające unerwienie do okolicznych struktur samego stawu jak i jego otoczenia. W grupie IV rozwój nerwów postępuje. Same nerwy nie wykazują większych różnic morfologicznej w porównaniu do grupy III. Widoczna jest za to zmiana w ilości gałązek nerwowych zaopatrujących struktury stawu. W odniesieniu do badanej torebki stawu biodrowego w grupie IV (szczenięta w 3 dobie życia) widoczne były nawet po 3 gałązki stawowe odchodzące od jednego nerwu (głównie kulszowego) czego nie stwierdzano u młodszych zwierząt. W grupie tej zarówno główne pnie nerwowe jak i ich gałęzie stawowe są już rozwinięte i przypominają te opisywane u zwierząt dorosłych w innych publikacjach (Huang i wsp. 2013). Wzrost wielkości badanych zwierząt wpływa bezpośrednio na wielkość badanych struktur, można więc wnioskować, że z powodu bardzo niewielkich rozmiarów i

transparentności obecność niektórych gałęzi stawowych u zwierząt II grupy mogła zostać niedostrzeżona.

W trakcie rozwoju w życiu płodowym ilość substancji biologicznie aktywnych rośnie. W wszystkich grupach już na wczesnym etapie rozwoju ilość włókien nerwowych SP+, CGRP+ oraz SP/CGRP+ jest znacząca, ale w każdej kolejnej grupie zagęszczenie i ilość włókien immunoreaktywnych zwiększa się. W badaniach przeprowadzonych na szczurach (Nakajima i wsp. 2008a) wstrzyknięto do stawu biodrowego znacznik fluorescencyjny w postaci roztworu fluoro-gold (FG). Po 7 dniach pobrano materiał w postaci rdzenia kręgowego do oznaczenia komórek odpowiadających za unerwienie stawu. Wykazano że ilość komórek wykazujących immunoreaktywność dla CGRP wynosiła 35%. Z kolei w badaniach na owcach przy użyciu wstecznego markera w postaci fast-blue (FB) przedstawiono że ilość komórek CGRP+ wynosiła 80,7%, pośród których 43% zawierało również SP, SP-pozytywnych było 56,4%. Takie same populacje włókien nerwowych stwierdzono w strukturach stawu biodrowego. Oba te neuropeptydy są mediatorami bólu (Lembeck i wsp. 1981; White i Helme, 1985; Walsh i wsp. 1993; Marshall i wsp. 1994; Chakrabarti i wsp. 2020) a u ludzi w chorobach wywołujących stan zapalny stawu potwierdzono wzrost ich ilości (Saxler i wsp. 2007; Lisowska, 2007). W badaniach stężenia SP w surowicy u ludzi (Lisowska i wsp. 2015) zauważalny jest jej wzrost zarówno w chorobie zwyrodnieniowej stawów i reumatoidalnej chorobie stawów. Udowodniono, że podawanie CGRP dostawowo zwiększa jego sensytyzację i wzmaga procesy zapalne. Podawanie blokerów dla receptorów tego neuropeptydu może z kolei może być przydatne w zmniejszeniu stanów zapalnych u pacjentów z przewlekłymi chorobami zwyrodnieniowymi (Walsh i wsp. 2015). W niniejszej pracy stwierdzono stopniowy wzrost ilości włókien immunoreaktywnych dla SP, CGRP i SP/CGRP wraz z wiekiem badanych zwierząt. Obie te substancje są odpowiedzialne za transmisję czuciową. Włókna czuciowe były najliczniejsze w błonie włóknistej torebki stawowej ale też obecne są w błonie maziowej,

więzadle głowy kości udowej i okostnej. Wzrost ilości włókien świadczyć może o wzroście wrażliwości struktur stawu na bodźce czuciowe a tym samym na jego prawidłowe funkcjonowanie w życiu postnatalnym.

NPY jako białko o właściwościach modulujących pracę układu nerwowego jest obiektem wielu badań. W badaniach wykorzystujących wyhodowane komórki z rdzenia kręgowego myszy (Hiruma i wsp. 2002), ujawniły inhibitorowe (hamujące) funkcje NPY. Działał on hamująco na wstępujące i zstępujące impulsy nerwowe. Z kolei u szczurów (badania również prowadzone na hodowlach komórek z rdzenia kręgowego) NPY skutecznie hamowało wydzielanie SP (uwalnianego przez depolaryzajcę) z komórek zwojowych rdzenia (Walker i wsp. 1988). Potwierdza to działania modulujące NPY na układ nerwowy. U ludzi (Alstergren i wsp. 1996) sprawdzono ilość substancji podobnej do NPY (NPY-LI) w surowicy i płynie pobranym stawowym w trakcie dostawowej sterydoterapii u pacjentów z zapaleniem stawu skroniowo żuchwowego. Zauważono spadek NPY-LI u pacjentów z specyficznymi zapaleniami połączony z poprawą objawów klinicznych. W innym badaniu zauważono wzrost poziomu NPY u pacjentów z zwyrodnieniem stawu kolanowego w stosunku do grupy kontrolnej (Wang i wsp. 2014). W naszych badaniach zauważono wyraźny wzrost ilości NPY-IR włókien nerwowych w strukturach stawu biodrowego w trakcie rozwoju szczeniąt. Immunoreaktywność dla NPY poza nerwami znajdującymi się w torebce stawowej, obserwowano w stosunkowo dużej ilości w naczyniach krwionośnych zaopatrujących sruktury stawu. W badaniach prowadzanych na owcach potwierdzono obecność NPY w neuronach czuciowych oraz autonomicznych (Dudek i wsp. 2017: Sienkiewicz i wsp. 2018a). Wydaje się więc usprawiedliwione stwierdzanie, że neurony te stanowią źródło włókien zawierających ten neuroprzekaźnik i neuromodulator. Włókna nerwowe zawierające NPY oraz NPY i DβH zlokalizowane w strukturach naczyniowych badanego stawu z całą pewnością włączone są w regulacje przepływu krwi co ma ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania stawu.

Włókna NPY-ergiczne obecne w warstwie włóknistej torebki jak też w okostnej czy więzadle głowy kości udowej prawdopodobnie odpowiedzialne są za transmisję czuciową, natomiast te, które są zlokalizowane w błonie maziowej mogą mieć wpływ na produkcję mazi a tym samym na prawidłowe funkcjonowanie stawu.

W niniejszej pracy stwierdzono wzrost ilości struktur immunoreaktywnych dla DβH wraz z wiekiem badanych zwierząt. Bardzo liczne włókna DβH+ stwierdzono obrębie naczyń krwionośnych. Włókna te stanowiły znaczącą większość nerwów obecnych w ścianie naczyń krwionośnych. W przetoczonych wcześniej badaniach (Sienkiewicz i wsp. 2018a) potwierdzono obecność DβH w neuronach układu autonomicznego co pozwala wnioskować, że neurony te są źródłem unerwienia adrenergicznego przede wszystkim naczyń krwionośnych zaopatrujących staw. U ludzi występuje bardzo rzadka choroba charakteryzująca się niedoborem tego enzymu (Senard i Rouet, 2006; Robertson i wsp. 1991), gdzie wraz z wiekiem rozwijają się objawy tego schorzenia. Ze względu na dużą rolę jaką enzym pełni w naczyniach krwionośnych, przy jego niedoborze pojawiają się zaburzenia krążeniu. U chorych w obrębie stawów stwierdzono ich nadmierne zginanie i nadmierną mobilność u 60% chorych (Garland i wsp. 2019). DβH jest enzymem, którego niedobór pełni rolę nie tylko przy zaburzeniach krążenia, ale bierze udział w mechanizmie rozwoju wielu innych chorób, w tym neurologicznych takich jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera (Gonzalez-Lopez i Vrana 2019). W trakcie rozwoju badanych zwierząt obserwowano stopniowy wzrost ilości włokiem adrenergicznych w strukturach stawu, największy w naczyniach krwionośnych. Lokalizacja bardzo licznych DβH-IR włókien w ścianach naczyń krwionośnych wskazuje na ich zaangażowanie w przepływ krwi. Włókna te często zawierały też NPY i GAL, które to substancje mogą wpływać modulująco na działanie katecholamin na mięśniówkę gładka naczyń krwionośnych.

Włókna nerwowe wykazujące obecność VAChT w strukturach stawu badanych zwierząt stwierdzono przede wszystkim w naczyniach krwionośnych. Znany jest udział tej komponenty autonomicznego układu nerwowego w przebiegu niektórych chorób jak np. osteoartritis (Lauwers i wsp. 2021; Courties i wsp. 2017). Włókna te mogą pochodzić nie tylko z neuronów przywspółczulnych autonomicznego układu nerwowego ale również z neuronów czuciowych zaopatrujących struktury stawu biodrowego (Dudek i wsp. 2017). Co ciekawe u człowieka zbadano ekspresję genów różnych neurotransmiterów przenoszących cholinę i acetylocholinę u pacjentów z rematoidalnym albo zwyrodnieniowym zapaleniu stawów. W badaniach nad mRNA komórek pobranych z błony maziowej i chrząstce stawu biodrowego u tych pacjentów wykazało brak ekspresji genów kodujących transferazę acetylocholiny (Beckmann i wsp. 2015). Zmiany ilości acetylocholiny, zarówno spadku jak i wzrostu, zostały zaobserwowane w przebiegu wielu chorób u ludzi (Prado i wsp. 2013). W niniejszej pracy obserwowano wzrost ilości włókien nerwowych zawierających VACHT szczególnie w naczyniach krwionośnych zaopatrujących staw biodrowy. Wskazuje to na bezpośrednie zaangażowanie tych włókien w regulację przepływu krwi co ma duże znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu stawu. Przypuszczalnie zburzenia w krążeniu w obrębie kości udowej, a szczególnie jej głowy, mogą być przyczyną choroby Legg-Calvé-Perthesa, tak więc prawidłowy rozwój naczyń i ich unerwienia jest istotny i w tym aspekcie.

Ilość włókien nerwowych zawierających galaninę u nowonarodzonych szczeniąt była niezbyt liczna niemniej jednak obserwowano wzrost ich ilości wraz z wiekiem zwierząt. Galaninergiczne neurony zaopatrujące struktury stawu biodrowego stwierdzono w zwojach rdzeniowych i antonomicznych owcy (Dudek i wsp. 2017; Sienkiewicz i wsp. 2018a). Niemal połowa komórek czuciowych zaopatrujących torebkę stawu biodrowego zawierała galaninę (Dudek i wsp 2017) podczas gdy galaninergiczne neurony współczulne zostały wykazane tylko w zwoju krezkowym tylnym (Sienkiewicz i wsp. 2018a) U szczurów jej obecność stwierdzono

nie tylko w tkankach i nerwach otaczających staw, ale również w szpiku i okostnej (Qinyang i. wsp. 2005). W badaniach u tego samego gatunku (Calzà 2000) wywołano eksperymentalnie zapalenie wielostawowe i sprawdzano poziom galaniny w zwojach czuciowych rdzenia kręgowego. Potwierdzono wzrost poziomu galaniny nie tylko w fazie ostrej, ale również utrzymujący się jej podwyższony poziom w fazie przewlekłej. W innej pracy (Heppelmann i wsp. 2000) również wykonanej na szczurach udowodniono, że podanie galaniny u zwierząt z wywołanym eksperymentalnie zapaleniem stawu kolanowego powoduje zmniejszenie reaktywności na ból tych zwierząt przy manipulacjach stawem. Potwierdzili tym samym, że galanina ma duży wpływ na obniżenie odczuwania bólu i zmniejszenie stanu zapalnego w chorych stawach. W samym układzie nerwowym pełni funkcję neuroprotekcyjną, zarówno w neuronach układu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (Wynick i wsp. 2001; Hökfelt i wsp. 1987; Podlasz i wsp. 2012). Niniejsze badania wykazały stopniowy wzrost ilości galaninergicznych włókien nerwowych w strukturach stawu. Włókna te pojawiły się początkowo tylko w błonie włóknistej i naczyniach a następnie w innych strukturach stawu, między innymi w błonie maziowej. Świadczyć to może o szerokiej funkcji tego neuropeptydu poczynając do transmisji czuciowej poprzez regulację przepływu krwi a na produkcji mazi stawowej kończąc.

VIP pełni wiele funkcji regulacyjnych w wielu układach i narządach. W niniejszych badaniach również stwierdzono jej obecność w włóknach nerwowych zaopatrujących staw. Ilość włókien VIP+ wzrasta wraz z wiekiem badanych zwierząt. W badaniach przeprowadzonych na owcach potwierdzono obecność VIP-pozytywnych neuronów czuciowych (A. Dudek i wsp. 2017) zaopatrujących torebkę stawu biodrowego. Rola VIP w stawie jest celem wielu badań. Ze względu na modulowanie procesem stanu zapalnego uważa się że stawowi ważnych czynnik w leczeniu takich chorób jak osteoarthritis (OA). W pracy przeglądowej (Jiang i wsp. 2016) wykazano, że uzyskane do tej pory rezultaty potrafią być

wobec siebie sprzeczne. W jednych udowodniono, że obniżenie poziomu VIP doprowadza do produkcji cytokin prozapalnych, tym samym zwiększając szansę na rozwój OA. Inne z kolei pokazują iż nadmierne nagromadzenie tej substancji w stawie może również się do tego przyczynić. W artykule tym zaznaczono również że duża ilość VIP znajduje się na terenie nie tylko nerwów czuciowych i przywspółczulnych, ale w dużej ilości jest obserwowana w błonie maziowej oraz płynie stawowym. Ten wniosek potwierdza nasze wyniki gdzie najliczniejsze włókna VIP+ obserwowano w błonie maziowej stawu biodrowego. W badaniu przeprowadzonym na szczurach (McDougall i wsp. 2006) potwierdzono że podanie zwierzętom VIP powoduje zwiększone uczucie bólu (przeczulicę) nawet u osobników zdrowych. W badaniach przeprowadzonych na myszach (Delgado i wsp. 2001) wskazano, że VIP może być przydatny w leczeniu bólu związanego z zapaleniami stawów. W badaniach eksperymentalnych VIP wykazał działanie obniżające poziom czynników zapalnych i autoimmunologicznych przyczyniających się do wywołania reumatoidalnego zapalenia stawu (RA) oraz spowodował zauważalne zmniejszenie opuchlizn. Podobne wnioski uzyskano w innym badaniu (Firestein 2001). W innej pracy (Villanueva-Romero 2018) analizowano i potwierdzono przeciwzapalne działanie VIP. Niniejsze badania wykazały stopniowe zwiększanie się ilości VIP-pozytywnych włókien nerwowych w strukturach stawu, często współwystępował we włóknach cholinergicznych. Włókna te pojawiły się początkowo tylko w błonie włóknistej i maziowej oraz naczyniach gdzie były najliczniejsze. Lokalizacja tych włókien oraz ich możliwe pochodzenie wskazuje na ich funkcję: transmisja czuciowa (włókna w błonie włóknistej, więzadle głowy kości udowej i okostnej) regulację przepływu krwi (włókna w naczyniach) czy tez wpływ na produkcję mazi stawowej (włókna w błonie maziowej).

6. Wnioski

I. Badania przepowadzone na najmłodszych płodach wykazały, że na tak wczesnym etap rozwoju zarodek nie posiada jeszcze rozwiniętych struktur stawu biodrowego. Dopiero starsze płody i zwierzęta po urodzeniu miały rozwinięty staw biodrowy wraz z unerwieniem. Stwierdzono wzrost grubości i objętości głównych pni nerwów zaopatrujących torebkę stawu biodrowego wraz z rozwojem płodów. W grupie II liczba gałązek nerwowych prowadzących bezpośrednio do stawu była niewielka. W kolejnych grupach ich ilość rosła. W grupie IV unerwienie nie odbiegało od opisanego we wcześniejszych publikacjach u dorosłych osobników .

II. Barwienia immunochistochmiczne wykonane przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko acetylowanej tubulinie, która jest markerowi włókien nerwowych pozwoliły na wizualizację wszystkich nerwów w strukturach stawu biodrowego i okolicznych tkankach. Wykazana stopniowy wzrost wraz z wiekiem ogólnej ilości włókien nerwowych obecnych w strukturach stawu. Wzrost ten dotyczył wszystkich badanych struktur a mianowicie: błony włóknistej i maziowej torebki stawu biodrowego więzadła głowy kości udowej, okostnej kości tworzących staw oraz naczyń krwionośnych zaopatrujących badaną strukturę. Nie stwierdzono immunoreaktywnych włkien na terenie obrąbka panewkowego.

III. Barwienia immunohistocheiczne pozwoliły na wykazanie obecności włókien nerwowych immunoreaktywnych dla wszystkich badanych substancji a mianowicie dla: SP, CGRP, DβH, VAChT, GAL, NPY i VIP.

IV. Stwierdzono stopniowy wzrost liczby włókien immunoreaktywnych dla badanych substancji wraz z wiekiem badanych zwierząt.

V. Najliczniejsze były włókna immunreaktywne dla SP i CGRP zaopatrujące torebkę stawu biodrowego. Wnioskować należy, że mają one charakter czuciowy.

VI. Liczne były również włókna adrenergiczne i cholinergiczne obecne w ścianach naczyń krwionośnych, co sugeruje ich zaangażowanie w regulację przepływu krwi w badanej strukturze.

VII. W błonie maziowej torebki stawowej obserwowano włókna immunoreaktywne dla VIP, GAL, NPY współwystępujące czasami z innymi substancjami biologicznie aktywnymi (VIP/VACHT, GAL/DßH, NPY/ DßH). Prawdopodobnie ta subpopulacja włókien nerwowych włączona jest w proces wytwarzania mazi stawowej.

7. Streszczenie

Staw biodrowy jest jednym z najbardziej obciążonych urazami i chorobami stawem. Są one często przyczyną bólu, kulawizn i dyskomfortu. Najczęściej spotykanymi chorobami są: osteoarthritis, dysplazja stawu biodrowego, osteochondroza, choroba Legg Calve Perthesa. Niezależnie czy czynnikami wywołującymi te schorzenia są: urazy, pierwotne choroby czy czynniki genetyczne, każde z nich prowadzi do zniszczeń w obrębie chrząstek, torebki stawowej i okolicznych struktur, co prowadzi w konsekwencji do kulawizn i nawet braku możliwości przemieszczania się.

Celem niniejszej pracy jest zbadanie przebiegu i rozwoju nerwów, zaopatrujących staw biodrowy w trakcie życia płodowego oraz tuż po urodzeniu, zbadanie w tym okresie kolejności pojawiania substancji biologicznie aktywnych się oraz zmian w ilości włókien nerwowych zawierających te substancje w elementach stawu biodrowego raz otaczających ją strukturach.

Badania przeprowadzono na zwierzętach 4 grup wiekowych. Psy pozyskano przez owariohisterektomię aborcyjną ciężarnych suk i eutanazję ślepych miotów. Grupa obejmowała płody: I grupę (n=10) – 3-tygodniowe, II grupa (n=10) - 5 tygodni życia płodowego, III grupa (n=10) –8 tygodni życia płodowego i grupa IV (n=10) 3 dniowe szczenięta. Wykonano badania morfologiczne oraz barwienia immunohistochemiczne. Barwienia wykonano na uzyskanych skrawkach z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko: AccTub, SP, CGRP, DβH, VAChT, VIP, GAL, NPY.

Stwierdzono, że staw biodrowy jest zaopatrzony przez następujące nerwy: zasłonowy, kulszowy, pośladkowy przedni, i udowy. Na wczesnym etapie rozwoju w grupie I płody nie posiadały jeszcze kończyn, a jedynie ich zawiązki. Stwierdzono jedynie pęczek włókien nerwowych, które na późniejszym etapie dopiero przy rozwiniętym stawie tworzą odpowiednie nerwy. Dopiero w grupie II (płody 5-cio tygodniowe) płody posiadają wykształcone kończyny,

co umożliwia identyfikację nerwów i ich dokładniejsze zbadanie. Wraz z wiekiem ilość włókien nerwowych ulega zwiększeniu, a same nerwy stają się grubsze i mniej transparentne. Również wraz z wiekiem zwiększa się unerwienie okolicznych struktur otaczających staw. W grupie IV unerwienie było najlepiej rozwinięte, z największą liczbą gałęzi nerwowych. Pod tym względem nie odbiegało ono od unerwienia dorosłych zwierząt.

Barwienia z użyciem acetylowanej tubuliny wykazały stopniowy wzrost ilości włókien nerwowych. Immunoreaktywne włókna obserwowano we wszystkich strukturach stawu oraz głównych pniach nerwowych. Barwienia z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko SP, CGRP, DβH, VAChT, GAL, NPY i VIP pozwoliły na określenie ilości i charakteru włókien nerwowych zaopatrujących rozwijający się staw biodrowy.

W badaniu stwierdzono rosnącą wraz z wiekiem badanych zwierząt ilość włókien SP, CGRP i SP/CGRP pozytywnych w głównych pniach nerwów i strukturach stawu, szczególnie w torebce stawowej. Podobnie, obserwowano stopniowy wzrost ilości immunoreaktywnych struktur nerwowych dla pozostałych badanych substancji. Ich lokalizacja wskazywać może na potencjalną ich funkcję. Nerwy zlokalizowane w ścianach naczyń są włączone w regulację przepływu krwi, znajdowane w błonie włóknistej są prawdopodobnie włóknami czuciowymi, a te obecne w błonie maziowej torebki prawdopodobnie są zaangażowane w regulację wytwarzania mazi stawowej. Do tej pory nie przeprowadzono badań nad rozwojem unerwienia stawu biodrowego u psa. Uzyskane wyniki badań mogą przyczynić się do ułatwienia diagnostyki, leczenia chorób stawu biodrowego i stanowić mogą podstawę do dalszych badań o charakterze klinicznym.

7. Abstract

The hip joint is one of the joints most exposed to injuries and diseases. They are often the cause of pain, lameness and discomfort. The most common diseases are: osteoarthritis, hip dysplasia, osteochondrosis, Legg Calve Perthes disease. Regardless of whether the factors causing these diseases are: injuries, primary diseases or genetic factors, each of them leads to damage within the cartilage, joint capsule and surrounding structures, which in turn leads to lameness and even inability to move.

The aim of this study is to examine the course and development of nerves supplying the hip joint during fetal life and just after birth, to examine the order in which biologically active substances appear and changes in the number of nerve fibers containing these substances in the elements of the hip joint and in the surrounding structures.

The research was carried out on animals of 4 age groups. The dogs were obtained by abortion ovariohysterectomy of pregnant bitches and euthanasia of blind litters. The group included fetuses: group I (n=10) - 3 weeks old fetuses, group II (n=10) - 5 weeks old fetuses, group III (n=10) -8 weeks old fetuses and group IV (n=10) 3 day old puppies. Morphological examinations and immunohistochemical staining were performed. Stainings were performed on the sections with antibodies against: AccTub, SP, CGRP, DβH, VAChT, VIP, GAL, NPY.

The hip joint was found to be supplied by the following nerves: obturator, sciatic, anterior gluteus, and femoral. At an early stage of development in group I, the fetuses did not yet have limbs, only their buds. Only a bundle of nerve fibers was found, which at a later stage form the appropriate nerves. In group II (5-week-old fetuses) the fetuses have developed limbs, which makes it possible to identify the nerves and examine them more thoroughly. With age, the number of nerve fibers increases, and the nerves themselves become thicker and less transparent. Also with age, the innervation of the surrounding structures surrounding the joint

increases. In group IV, the innervation was the best developed, with the largest number of nerve branches. In that regard, it did not differ from the innervation of adult animals.

Staining with acetylated tubulin showed a gradual increase in the number of nerve fibers. Immunoreactive fibers were observed in all joint structures and in major nerve trunks. Staining with antibodies against SP, CGRP, DβH, VAChT, GAL, NPY and VIP allowed to determine the amount and nature of the nerve fibers supplying the developing hip joint.

The this study we found an increasing number of SP, CGRP and SP/CGRP positive fibers in the main nerve trunks and joint structures, especially in the joint capsule, with the age of the examined animals. Similarly, a gradual increase in the amount of immunoreactive nerve structures was observed for the remaining studied substances. Their localization may indicate their potential function. The nerves located in the vessel walls are involved in the regulation of blood flow, those found in the fibrous membrane are probably sensory fibers, and those present in the synovium of the capsule are probably involved in the regulation of synovial fluid production. Until now, no studies have been conducted on the development of the innervation of the hip joint in the dog. The obtained test results may contribute to facilitating the diagnosis and treatment of diseases of the hip joint and may be the basis for further clinical research.

Literatura:

1. Ackermann PW, Finn A, Ahmed M. Sensory neuropeptidergic pattern in tendon, ligament and joint capsule. A study in the rat. Neuroreport. 1999 Jul 13;10(10):2055-60. doi: 10.1097/00001756-199907130-00012. PMID: 10424674.
2. Ackermann PW, Li J, Finn A, Ahmed M, Kreicbergs A. Autonomic innervation of tendons, ligaments and joint capsules. A morphologic and quantitative study in the rat. J Orthop Res. 2001 May;19(3):372-8. doi: 10.1016/S0736-0266(00)90029-9. PMID: 11398848.
3. Aguado E, Goyenvalle E. Legg Calvé Perthes disease in the dog. Morphologie. 2021 Jun;105(349):143-147. doi: 10.1016/j.morpho.2020.11.011. Epub 2020 Dec 26. PMID: 33376048.
4. Alves JC, Santos A, Jorge P, Lavrador C, Carreira LM. Clinical and diagnostic imaging findings in police working dogs referred for hip osteoarthritis. BMC Vet Res. 2020 Nov 7;16(1):425. doi: 10.1186/s12917-020-02647-2. PMID: 33160336; PMCID: PMC7648415.
5. Anderson A. Treatment of hip dysplasia. J Small Anim Pract. 2011 Apr;52(4):182-9. doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01049.x. PMID: 21906059.
6. Anderson KL, Zulch H, O'Neill DG, Meeson RL, Collins LM. Risk Factors for Canine Osteoarthritis and Its Predisposing Arthropathies: A Systematic Review. Front Vet Sci. 2020 Apr 28;7:220. doi: 10.3389/fvets.2020.00220. PMID: 32411739; PMCID: PMC7198754.
7. Aoki Y, Takahashi Y, Ohtori S, Moriya H, Takahashi K. Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review. Life Sci. 2004 Apr 9;74(21):2627-42. doi: 10.1016/j.lfs.2004.01.008. PMID: 15041445.
8. Arciszewski M, Zacharko-Siembida A. (2008) ‘Układ Nerwowy Jelitowy’, Novae Res. Gdynia.
9. Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B. Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. J Comp Neurol. 1997 Feb 24;378(4):454-67. PMID: 9034903.

10. Ascenzi A, Bonucci E, Bocciarelli DS. An electron microscope study on primary periosteal bone. J Ultrastruct Res. 1967 Jun;18(5):605-18. doi: 10.1016/s0022-5320(67)80207-7. PMID: 4961158.

11. Barnett JJG, Shakeri S, Agur AMR. Overview of the Innervation of the Hip Joint. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2021 Nov;32(4):745-755. doi: 10.1016/j.pmr.2021.05.009. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34593140.

12. Beale BS. Orthopedic problems in geriatric dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2005 May;35(3):655-74. doi: 10.1016/j.cvsm.2005.01.001. PMID: 15833564.

13. Beckmann J, Schubert J, Morhenn HG, Grau V, Schnettler R, Lips KS. Expression of choline and acetylcholine transporters in synovial tissue and cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Cell Tissue Res. 2015 Feb;359(2):465-477. doi: 10.1007/s00441-014-2036-0. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25418136; PMCID: PMC4320306.

14. Bieżyński J, Skrzypczak P, Piatek A, Kościółek N, Drozdzyńska M. Assessment of treatment of Osteochondrosis dissecans (OCD) of shoulder joint in dogs--the results of two years of experience. Pol J Vet Sci. 2012;15(2):285-90. doi: 10.2478/v10181-011-0146-0. PMID: 22844706.

15. Birnbaum K, Prescher A, Hessler S, Heller KD. The sensory innervation of the hip joint--an anatomical study. Surg Radiol Anat. 1997;19(6):371-5. doi: 10.1007/BF01628504. PMID: 9479711.

16. Bjurholm A, Kreicbergs A, Ahmed M, Schultzberg M. Noradrenergic and peptidergic nerves in the synovial membrane of the Sprague-Dawley rat. Arthritis Rheum. 1990 Jun;33(6):859-65. doi: 10.1002/art.1780330613. PMID: 1973038.

17. Bolk L., Göppert E., Kallius E., Lubosch W. Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. 1938, Berlin Wien Urban und Schwarzenberg.

18. Botz B, Kemény Á, Brunner SM, Sternberg F, Csepregi J, Mócsai A, Pintér E, McDougall JJ, Kofler B, Helyes Z. Lack of Galanin 3 Receptor Aggravates Murine Autoimmune Arthritis. J Mol Neurosci. 2016 Jun;59(2):260-9. doi: 10.1007/s12031-016-0732-9. Epub 2016 Mar 3. PMID: 26941032; PMCID: PMC4884566.

19. Bowker RM, Abhold RH, Caron JP, Sonea IM, Vex KB, Kotyk R. Neuropeptidergic innervation of equine synovial joints. Am. J. Vet. Res. 1993a: 54, 1831–1839.

20. Bowker RM, Linder K. Van Wulfen KK, Sonea I.M. Anatomy of the distal interphalangeal joint of the mature horse: relationships with navicular suspensory ligaments, sensory nerves and neurovascular bundle. Equine Vet. J. 1997: 29, 126–135.

21. Bowker RM, Abhold RH, Caron JP, Sonea IM, Vex KB, Kotyk R. Neuropeptidergic innervation of equine synovial joints. Am. J. Vet. Res. 1993a: 54, 1831– 1839.

22. Bowker RM, Linder K, Van Wulfen KK, Sonea IM. Anatomy of the distal interphalangeal joint of the mature horse: relationships with navicular suspensory ligaments, sensory nerves and neurovascular bundle. Equine Vet. J. 1997: 29, 126– 135.

23. Bowker RM, Sonea IM, Vex KB, Caron JP. Substance P innervation of equine synovial membranes: joint differences and neural and nonneural receptor localizations. Neurosci. Lett. 1993b: 164, 76– 80.

24. Buma P. Innervation of the patella. An immunohistochemical study in mice. Acta Orthop. Scand. 1994: 65, 80– 86.

25. Calzà L, Pozza M, Arletti R, Manzini E, Hökfelt T. Long-lasting regulation of galanin, opioid, and other peptides in dorsal root ganglia and spinal cord during experimental polyarthritis. Exp Neurol. 2000 Aug;164(2):333-43. doi: 10.1006/exnr.2000.7442. PMID: 10915572.

26. Caron, J. P., R. M. Bowker, R. H. Abhold, D. S. Toppin, I. M. Sonea, and K. B. Vex, 1992: Substance P in the synovial membrane and fluid of the equine middle carpal joint. Equine Vet. J. 24, 364– 366.

27. Dee R. Structure and function of hip joint innervation. Ann R Coll Surg Engl. 1969 Dec;45(6):357-74. PMID: 5359432; PMCID: PMC2387679.

28. Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. Nat Med. 2001 May;7(5):563-8. doi: 10.1038/87887. PMID: 11329057.

29. Dobberstein J. Hoffmann G. Lehrbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. 1964, Leipzig Hirzel.

30. Dudek A, Chrószcz A, Janeczek M, Sienkiewicz W, Kaleczyc J. Sources of sensory innervation of the hip joint capsule in the rabbit - a retrograde tracing study. Anat Histol Embryol. 2013 Dec;42(6):403-9. doi: 10.1111/ahe.12028. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23406258.

31. Dudek A, Sienkiewicz W, Chrószcz A, Janeczek M, Kaleczyc J. Chemical Coding of Sensory Neurons Supplying the Hip Joint Capsule in the Sheep. Anat Histol Embryol. 2017 Apr;46(2):121-131. doi: 10.1111/ahe.12241. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27353745.

32. Elfvin LG, Holmberg K, Johansson J, Aldskogius H. The innervation of the synovium of the knee joint in the guinea pig: an immunohistochemical and ultrastructural study. Anat Embryol (Berl). 1998 Apr;197(4):293-303. doi: 10.1007/s004290050139. PMID: 9565322.

33. Ellenberger W. Baum H.: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. 1977, Heidelberg New York Springer.

34. Evans HE, Sack WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. Zentralbl Veterinarmed C. 1973 Mar;2(1):11-45. doi: 10.1111/j.1439-0264.1973.tb00253.x. PMID: 4745140.

35. Fahrenkrug J, Emson PC. Vasoactive intestinal polypeptide: functional aspects. Br Med Bull. 1982 Sep;38(3):265-70. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071771. PMID: 6129023.

36. Fahrenkrug J. VIP and autonomic neurotransmission. Pharmacol Ther. 1989;41(3):515-34. doi: 10.1016/0163-7258(89)90129-0. PMID: 2541454.

37. Fahrenkrug J. VIP and PACAP. Results Probl Cell Differ. 2010;50:221-34. doi: 10.1007/400_2009_24. PMID: 19859678.

38. Fearnside S. M. Black A. P. Delayed onset of sciatic neuropathy following coxofemoral foint fracture. 1999, Aust. Vet. Pract. 29, 63 – 69.

39. Firestein GS. VIP: a very important protein in arthritis. Nat Med. 2001 May;7(5):537-8. doi: 10.1038/87859. PMID: 11329051.

40. Frick H. Anatomie der Wirbeltiere. 1983, Hamburg Parey,

41. Fry TR, Clark DM. Canine hip dysplasia: clinical signs and physical diagnosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1992 May;22(3):551-8. doi: 10.1016/s0195-5616(92)50055-9. PMID: 1604772.

42. Gajda M, Litwin JA, Tabarowski Z, Zagólski O, Cichocki T, Timmermans JP, Adriaensen D. Development of rat tibia innervation: colocalization of autonomic nerve fiber markers with growth-associated protein 43. Cells Tissues Organs. 2010;191(6):489-99. doi: 10.1159/000276591. Epub 2010 Jan 14. PMID: 20090303.

43. Gasse H., Engelke E., Waibl H. Zur Innervation der Hueftgelekkapsel beim Hund 1996, Kleintierpraxis 41, 883 – 886

44. Gatenholm B, Brittberg M. Neuropeptides: important regulators of joint homeostasis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2019 Mar;27(3):942-949. doi: 10.1007/s00167-018-5074-4. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30039292.

45. Golub D.M., Bronovitskaia. G.M. Development of the human hip joint and its innervation. 1981, Arkhiv Anatomii, Gistologii i Embriologii, 80(5):47-56

46. Grönblad M, Korkala O, Konttinen YT, Kuokkanen H, Liesi P. Immunoreactive neuropeptides in nerves in ligamentous tissue. An experimental neuroimmunohistochemical study. Clin Orthop Relat Res. 1991 Apr;(265):291-6. PMID: 1706972.

47. Hanesch U, Heppelmann B, Schmidt RF. Quantification of cat's articular afferents containing calcitonin gene-related peptide or substance P innervating normal and acutely inflamed knee joints. Neurosci. Lett. 1997: 233, 105–108.

48. Hanesch U, Heppelmann B, Schmidt RF. Somatostatin-like immunoreactivity in primary afferents of the medial articular nerve and colocalization with substance P in the cat. J. Comp. Neurol. 1995: 354, 345–352.

49. Hanesch U, Heppelmann B, Schmidt RF. Substance P- and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in primary afferent neurons of the cat's knee joint. Neuroscience. 1991;45(1):185-93. doi: 10.1016/0306-4522(91)90114-4. PMID: 1721692.

50. Hanesch U, Pfrommer U, Grubb BD, Heppelmann B, Schaible HG. The proportion of CGRP-immunoreactive and SP-mRNA containing dorsal root ganglion cells is

increased by a unilateral inflammation of the ankle joint of the rat. Regul. Pept. 1993a: 46, 202–203.

51. Hanesch U, Pfrommer U, Grubb BD, Schaible HG. Acute and chronic phases of unilateral inflammation in rat's ankle are associated with an increase in the proportion of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive dorsal root ganglion cells. Eur. J. Neurosci. 1993b: 5, 154–161.

52. Harrison S, Geppetti P. Substance p. Int J Biochem Cell Biol. 2001 Jun;33(6):555-76. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00031-0. PMID: 11378438.

53. Heppelmann B, Just S, Pawlak M. Galanin influences the mechanosensitivity of sensory endings in the rat knee joint. Eur J Neurosci. 2000 May;12(5):1567-72. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00045.x. PMID: 10792434.

54. Heppelmann B, Shahbazian Z, Hanesch U. Quantitative examination of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibres in the cat knee joint capsule. Anat. Embryol. (Berl.) 1997: 195, 525– 530.

55. Hermanson J.W., de Lahunta A., Howard E. Evans H.E. Miller and Evans' Anatomy of the Dog. Elsevier 2019, 1004 pages ISBN: 9780323546010

56. Hodges DL, McGuire TJ, Kumar VN. Diagnosis of hip pain, an anatomic approach. Orthop Rev. 1987 Feb;16(2):109-13. PMID: 3453961.

57. Holmlund A, Ekblom A, Hansson P, Lind J, Lundeberg T, Theodorsson E. Concentrations of neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid of the human temporomandibular joint. A correlation with symptoms, signs and arthroscopic findings. Int J Oral Maxillofac Surg. 1991 Aug;20(4):228-31. doi: 10.1016/s0901-5027(05)80181-x. PMID: 1719105.

58. Huang CH, Hou SM, Yeh LS. The innervation of canine hip joint capsule: an anatomic study. Anat Histol Embryol. 2013 Dec;42(6):425-31. doi: 10.1111/ahe.12033. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23410229.

59. Ishiguro H, Kim KT, Joh TH, Kim KS. Neuron-specific expression of the human dopamine beta-hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region. J Biol Chem. 1993 Aug 25;268(24):17987-94. PMID: 7688735.

60. Jiang W, Wang H, Li YS, Luo W. Role of vasoactive intestinal peptide in osteoarthritis. J Biomed Sci. 2016 Aug 23;23(1):63. doi: 10.1186/s12929-016-0280-1. PMID: 27553659; PMCID: PMC4995623.

61. Kaderly RE, Anderson BG, Anderson WD. Intracapsular and intraosseous vascular supply to the mature dog's coxofemoral joint. Am J Vet Res. 1983 Oct;44(10):1805-12. PMID: 6357001.

62. Kaderly RE, Anderson WD, Anderson BG. Extraosseous vascular supply to the mature dog's coxofemoral joint. Am J Vet Res. 1982 Jul;43(7):1208-14. PMID: 7103203.

63. Karahan S, Kincaid SA, Baird AN, Kammermann JR. Distribution of beta-endorphin and substance P in the shoulder joint of the dog before and after a low impact exercise programme. Anat Histol Embryol. 2002 Apr;31(2):72-7. doi: 10.1046/j.1439-0264.2002.00361.x. PMID: 12047242.

64. Kido MA, Kiyoshima T, Kondo T, Ayasaka N, Moroi R, Terada Y, Tanaka T. Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. J Dent Res. 1993 Mar;72(3):592-8. doi: 10.1177/00220345930720030701. PMID: 7680675.

65. Kido MA, Zhang JQ, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T. Topography and distribution of sympathetic nerve fibers in the rat temporomandibular joint: immunocytochemistry and ultrastructure. Anat Embryol (Berl). 2001 May;203(5):357-66. doi: 10.1007/s004290100163. PMID: 11411310.

66. Kinzel S, Fasselt R, Prescher A, Selzer C, Graf von Keyserlingk D, Küpper W. Die sensible Innervation der Capsula articularis coxae beim Hund [Sensory innervation of the hip joint capsule in dogs]. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 1998 Sep;26(5):330-5. German. PMID: 9931993.

67. Kobryń H., Kobryńczuk F., Krysiak K. Anatomia zwierząt. Tom 1. Aparat ruchowy. 2012, wydanie V, PWN

68. Kürtül İ., Cevik A., Bozkurt E., Dursun N. Blood supply to the hip joint with emphasis on intraarticular space on the head of the femur in dog. Indian Veterinary Journal 2003, 80: 795- 799

69. Kuzawińska O., Lis K.,Cessak G., Bałkowiec-Iskra E. Znaczenie CGRP w patogenezie i leczeniu migreny. Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii 2015, 31 (2), 127–140. DOI: http://dx.medra.org/10.17393/fpn.2015.10.001

70. Larsson J, Ekblom A, Henriksson K, Lundeberg T, Theodorsson E. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 1991;20(5):326-35. doi: 10.3109/03009749109096808. PMID: 1947895.

71. Laumonerie P, Dalmas Y, Tibbo ME, Robert S, Durant T, Caste T, Vialla T, Tiercelin J, Gracia G, Chaynes P. Sensory Innervation of the Hip Joint and Referred Pain: A Systematic Review of the Literature. Pain Med. 2021 May 21;22(5):1149-1157. doi: 10.1093/pm/pnab061. PMID: 33565587.

72. Lauwers M, Courties A, Sellam J, Wen C. The cholinergic system in joint health and osteoarthritis: a narrative-review. Osteoarthritis Cartilage. 2021 May;29(5):643-653. doi: 10.1016/j.joca.2021.02.005. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33609692.

73. Lisowska B, Lisowski A, Siewruk K. Substance P and Chronic Pain in Patients with Chronic Inflammation of Connective Tissue. PLoS One. 2015 Oct 7;10(10):e0139206. doi: 10.1371/journal.pone.0139206. PMID: 26444559; PMCID: PMC4622041.

74. Lisowska B. Rola i znaczenie substancji P. 2007, Geriatria; 1: 18-21.

75. Lisowska B. Rola substancji P w reumatoidalnym zapaleniu stawów', Reumatologia 2007; 45: 5: 290-293

76. Lunam CA, Gentle MJ. Substance P immunoreactive nerve fibres in the domestic chick ankle joint before and after acute urate arthritis. Neurosci Lett. 2004 Jan 9;354(2):87-90. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00575-5. PMID: 14698445.

77. Lutnicki W. Zarys osteologii zwierząt domowych. 2016, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, ISBN: 9788372591760

78. Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ, Terry JM, Revell PA, Ibrahim NB, Blake DR, Polak JM. Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. Neuroscience. 1990;37(1):143-53. doi: 10.1016/0306-4522(90)90199-e. PMID: 1700840.

79. Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. Arthritis Rheum. 1990 Jan;33(1):87-90. doi: 10.1002/art.1780330111. PMID: 1689161.

80. Marshall, KW, Theriault E, Homonko D. A. Distribution of substance P and calcitonin gene related peptide immunoreactivity in the normal feline knee. J. Rheumatol. 1994: 21, 883– 889.

81. McDougall JJ, Watkins L, Li Z. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. Pain. 2006 Jul;123(1-2):98-105. doi: 10.1016/j.pain.2006.02.015. Epub 2006 Mar 27. PMID: 16564620.

82. Mickelson MR, McCurnin DM, Awbrey BJ, Maynard JA, Martin RK. Legg-Calvé-Perthes disease in dogs: a comparison to human Legg-Culvé-Perthes disease. Clin Orthop Relat Res. 1981 Jun;(157):287-300. PMID: 7249458.

83. Milsom A. Galanin. in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier Inc. 2011, pp. 1–6. doi: 10.1016/B978-008055232-3.61800-8.

84. Morgan J.P, Wind A., Davidson A.P Hereditary bone and joint diseases in the dog : osteochondroses, hip dysplasia, elbow dysplasia. Hannover : Schlütersche. 2000, 313 pages, ISBN : 9783877065488, ISBN : 3877065481.

85. Murata Y, Takahashi K, Ohtori S, Moriya H. Innervation of the sacroiliac joint in rats by calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibers and dorsal root ganglion neurons. Clin Anat. 2007 Jan;20(1):82-8. doi: 10.1002/ca.20277. PMID: 16506235.

86. Nakajima T, Ohtori S, Inoue G, Koshi T, Yamamoto S, Nakamura J, Takahashi K, Harada Y. The characteristics of dorsal-root ganglia and sensory innervation of the hip in rats. J Bone Joint Surg Br. 2008a: Feb;90(2):254-7. doi: 10.1302/0301-620X.90B2.19808. PMID: 18256100.

87. Nakajima T, Ohtori S, Nakamura J, Suzuki T, Aoki Y, Watanabe A, Takazawa M, Takahashi K. Inflammatory pain-related traits of sensory DRG neurons innervating the hip joints. J Orthop Sci. 2017 Mar;22(2):325-329. doi: 10.1016/j.jos.2016.12.001. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28025021.

88. Nakajima T, Ohtori S, Yamamoto S, Takahashi K, Harada Y. Differences in innervation and innervated neurons between hip and inguinal skin. Clin Orthop Relat Res. 2008b:

Oct;466(10):2527-32. doi: 10.1007/s11999-008-0432-z. Epub 2008 Aug 14. PMID: 18704614; PMCID: PMC2584300.

89. Ohlerth S, Geiser B, Flückiger M, Geissbühler U. Prevalence of Canine Hip Dysplasia in Switzerland Between 1995 and 2016-A Retrospective Study in 5 Common Large Breeds. Front Vet Sci. 2019 Oct 24;6:378. doi: 10.3389/fvets.2019.00378. PMID: 31709271; PMCID: PMC6821640.

90. Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive neurons with dichotomizing axons projecting to the lumbar muscle and knee in rats. Eur Spine J. 2003 Dec;12(6):576-80. doi: 10.1007/s00586-003-0573-4. Epub 2003 Nov 4. PMID: 14598130; PMCID: PMC3467985.

91. Prado VF, Roy A, Kolisnyk B, Gros R, Prado MA. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. Biochem J. 2013 Mar 1;450(2):265-74. doi: 10.1042/BJ20121662. PMID: 23410039.

92. Qinyang W, Hultenby K, Adlan E, Lindgren JU. Galanin in adjuvant arthritis in the rat. J Rheumatol. 2004 Feb;31(2):302-7. PMID: 14760801.

93. Qinyang W, Lindgren UJ, Hultenby K. Distribution of galanin in bone and joint tissues. Anat Embryol (Berl). 2005 Feb;209(3):227-31. doi: 10.1007/s00429-004-0444-8. Epub 2004 Dec 23. PMID: 15616823.

94. Rankin JS, Diesem CD. Innervation of the equine hip and stifle joint capsules. J Am Vet Med Assoc. 1976 Sep 15;169(6):614-9. PMID: 965281.

95. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2014 Oct;94(4):1099-142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013. PMID: 25287861; PMCID: PMC4187032.

96. Saxler G, Löer F, Skumavc M, Pförtner J, Hanesch U. Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. Eur J Pain. 2007 Jan;11(1):67-74. doi: 10.1016/j.ejpain.2005.12.011. Epub 2006 Feb 7. PMID: 16460974.

97. Schachner ER, Lopez MJ. Diagnosis, prevention, and management of canine hip dysplasia: a review. Vet Med (Auckl). 2015 May 19;6:181-192. doi: 10.2147/VMRR.S53266. PMID: 30101105; PMCID: PMC6070021.

98. Schmaedecke A, Saut JP, Ferrigno CR. A quantitative analysis of the nerve fibres of the acetabular periosteum of dogs. Vet Comp Orthop Traumatol. 2008;21(5):413-7. PMID: 19011704.

99. Senard JM, Rouet P. Dopamine beta-hydroxylase deficiency. Orphanet J Rare Dis. 2006 Mar 30;1:7. doi: 10.1186/1750-1172-1-7. PMID: 16722595; PMCID: PMC1459119.

100. Shimizu S, Kido MA, Kiyoshima T, Tanaka T. Postnatal development of substance P-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactive nerve fibres in the synovial membrane of the rat temporomandibular joint. Arch Oral Biol. 1996 Aug-Sep;41(8-9):749-59. doi: 10.1016/s0003-9969(96)00067-2. PMID: 9022912.

101. Siebenrock KA, Rösler KM, Gonzalez E, Ganz R. Intraoperative electromyography of the superior gluteal nerve during lateral approach to the hip for arthroplasty: a prospective study of 12 patients. J Arthroplasty. 2000 Oct;15(7):867-70. doi: 10.1054/arth.2000.8099. PMID: 11061446.

102. Sienkiewicz W, Dudek A, Chroszcz A, Janeczek M, Kaleczyc J. Distribution and immunohistochemical properties of autonomic neurons supplying the ovine hip joint capsule. Veterinarni Medicina. 2018 63, (06): 261–270, doi: 10.17221/61/2017-VETMED

103. Sienkiewicz W, Dudek A, Czaja K, Janeczek M, Chrószcz A, Kaleczyc J. Efficacy of lateral- versus medial-approach hip joint capsule denervation as surgical treatments of the hip joint pain; a neuronal tract tracing study in the sheep. PLoS One. 2018 Jan 12;13(1):e0190052. doi: 10.1371/journal.pone.0190052. PMID: 29329303; PMCID: PMC5766125.

104. Sisask G, Bjurholm A, Ahmed M, Kreicbergs A. The development of autonomic innervation in bone and joints of the rat. J Auton Nerv Syst. 1996 Jun 10;59(1-2):27-33. doi: 10.1016/0165-1838(95)00139-5. PMID: 8816362.

105. Śliwińska-Mossoń M, Borowiecka K, Milnerowicz H. Neuropeptydy Y, YY i PP oraz ich znaczenie kliniczne [Neuropeptides Y, YY, PP and their clinical significance]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2013 Jul 18;67:631-6. Polish. doi: 10.5604/17322693.1058890. PMID: 24018426.

106. Snijdelaar DG, Dirksen R, Slappendel R, Crul BJ. Substance P. Eur J Pain. 2000;4(2):121-35. doi: 10.1053/eujp.2000.0171. PMID: 10957694.

107. Staszyk C., Gasse H. Zur Innervation der Gelenkkapsel beim Hund‘ Kleintierpraxis. 2002, 47: 11 – 17.

108. Syrcle J. Hip Dysplasia: Clinical Signs and Physical Examination Findings. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2017 Jul;47(4):769-775. doi: 10.1016/j.cvsm.2017.02.001. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28389035.

109. Tahmasebi-Sarvestani A, Tedman R, Goss AN. Distribution and coexistence of neuropeptides in nerve fibres in the temporomandibular joint of late gestation fetal sheep. J Anat. 1997 Aug;191 (Pt 2)(Pt 2):245-57. doi: 10.1046/j.1469-7580.1997.19120245.x. PMID: 9306200; PMCID: PMC1467676.

110. Tamura R, Hanesch U, Schmidt RF, Kumazawa T, Mizumura K. Examination of colocalization of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactivity in the knee joint of the dog. Neurosci. Lett. 1998: 254, 53– 56.

111. Thak MA, Hun-Young Yoon HY, Jeong SW. Early Stage Legg-Calve-Perthes Disease in a Dog: Clinical, Surgical, Radiological, Computed Tomography and Histological Findings. J Vet Clin 2013;30:366-370. https://orcid.org/0000-0002-2462-1181

112. Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F. Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. Anat Embryol (Berl). 1998 Apr;197(4):273-82. doi: 10.1007/s004290050137. PMID: 9565320.

113. Villanueva-Romero R, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Pérez-García S, Seoane IV, Martínez C, Gomariz RP, Juarranz Y. The Anti-Inflammatory Mediator, Vasoactive Intestinal Peptide, Modulates the Differentiation and Function of Th Subsets in Rheumatoid Arthritis. J Immunol Res. 2018 Aug 1;2018:6043710. doi: 10.1155/2018/6043710. PMID: 30155495; PMCID: PMC6092975.

114. Walsh DA, Mapp PI, Kelly S. Calcitonin gene-related peptide in the joint: contributions to pain and inflammation. Br J Clin Pharmacol. 2015 Nov;80(5):965-78. doi: 10.1111/bcp.12669. Epub 2015 Jul 22. PMID: 25923821; PMCID: PMC4631170.

115. Wang H, Zhang X, He JY, Zheng XF, Li D, Li Z, Zhu JF, Shen C, Cai GQ, Chen XD. Increasing expression of substance P and calcitonin gene-related peptide in

synovial tissue and fluid contribute to the progress of arthritis in developmental dysplasia of the hip. Arthritis Res Ther. 2015 Jan 12;17(1):4. doi: 10.1186/s13075-014-0513-1. PMID: 25578529; PMCID: PMC4320827.

116. Weinshenker D. 'Dopamine Beta-Hydroxylase', xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference 2007, Pages 1-15, doi: 10.1016/B978-008055232-3.60505-7.

117. Willick SE, Margherita AJ, Carter GT. Isolated superior gluteal nerve injury: two case reports. Muscle Nerve. 1998 Jul;21(7):951-3. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199807)21:7<951::aid-mus17>3.0.co;2-t. PMID: 9626259.

118. Witonski D, Wagrowska-Danielewicz M. Distribution of substance-P nerve fibers in the knee joint in patients with anterior knee pain syndrome. A preliminary report. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 1999: 7, 177– 183.

119. Wojtys EM, Beaman DN, Glover RA, Janda D. Innervation of the human knee joint by substance-P fibers. Arthroscopy 1990: 6, 254– 263.

120. Yoshida H, Fujita S, Nishida M, Iizuka T. The expression of substance P in human temporomandibular joint samples: an immunohistochemical study. J. Oral Rehabil. 1999: 26, 338– 344.

121. Yoshida N, Nishiyama K, Tonosaki Y, Kikuchi S, Sugiura Y. Sympathetic and sensory innervation of the rat shoulder joint: a WGA-HRP tracing and CGRP immunohistochemical study. Anat. Embryol. (Berl.) 1995: 191, 465– 469.

122. Ytrehus B, Carlson CS, Ekman S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. Vet Pathol. 2007 Jul;44(4):429-48. doi: 10.1354/vp.44-4-429. PMID: 17606505.