

УДК 617.731–001.32:617.761–092.9

## Структурні зміни краніальної частини зорового нерва при травматичному пошкодженні його орбітальної частини в експерименті

Н. М. Мойсеєнко<sup>1</sup>, канд. мед. наук, О. Я. Жураківська<sup>1</sup>, докт. мед. наук, професор,  
Г. М. Леськів<sup>2</sup>, лікар-офтальмолог

<sup>1</sup> ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; Івано-Франківськ (Україна)

<sup>2</sup> Рогатинська центральна районна лікарня; м. Рогатин, Івано-Франківська обл. (Україна)

E-mail: natalymoyseenko@ukr.net

**Ключевые слова:** травматическая оптическая нейропатия, морфометрическая экспертиза, нарушения аксотока, отек миелиновой оболочки.

**Ключові слова:** травматична оптична нейропатія, морфометрична експертиза, порушення аксолеку, набряк мієлінової оболонки.

**Введение.** Влияние компрессионных факторов на формирование вторичных дегенеративных факторов анте- и ретроградной частей зрительного нерва при травматических повреждениях изучено недостаточно.

**Цель исследования** состояла в том, чтобы уточнить морфологические особенности травматических антеградных повреждений в эксперименте.

**Материал и методы.** Моделирование травматических повреждений зрительного нерва было выполнено на 11 кроликах массой 3,5–4,0 кг. Контрольная группа включала 12 здоровых кроликов. Использована морфометрическая экспертиза краниальной части зрительного нерва обоих глаз травмированных (на 14-й день после травмы) и контрольных животных.

**Результаты.** Установлена периаксональная дегенерация краниальной части зрительного нерва, которая проявлялась нарушением аксолеку вдоль осевых цилиндров вследствие отека миелиновой оболочки.

**Выводы.** Структурные изменения краниальной части зрительного нерва, подтвержденные свето-ультраструктурными исследованиями и данными морфометрии, возникают на фоне нарушения гемодинамики нерва и могут служить основой для дальнейших исследований патогенеза и разработки тактики лечения травматичной оптической нейропатии в эксперименте.

## Structural changes of the cranial part of the optic nerve in traumatic injury of its orbital part in experiment

Moyseyenko N. M.<sup>1</sup>, Zhurakivsky A. Y.<sup>1</sup>, Leskiv G. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ivano-Frankivsk National Medical University; Ivano-Frankivsk (Ukraine)

<sup>2</sup> Rohatyn central district hospital; Rohatyn, Ivano-Frankivsk region (Ukraine)

**Key words:** traumatic optic neuropathy, morphometric examination, violation of axon's flow, swelling of the myelin sheath.

*The role of compression factors on the formation of secondary degenerative factors and anti- and retrograde parts of the optic nerve in traumatic injuries insufficiently studied.*

*The aim of the study was to clarify the morphological features of traumatic antehand injuries experiment.*

**Material and methods.** The simulation of traumatic injury of the optic nerve was performed on 11 rabbits weighing 3.5–4.0 kg. The control group included 12 healthy rabbits. There were used cranial morphometric examinations of the optic nerve in both eyes injured (on day 14 after injury) and control animals.

**Results.** The study found periaxonal degeneration of cranial optic nerve, that was manifested violation of axon's flow the progress axial cylinders that arise as a result of swelling of myelin sheath.

**Conclusions.** Thus, structural changes of the optic nerve cranial confirmed light and ultra structural studies, data morphometry and there to the damage hemodynamic nerve may serve as a basis for further studies of the pathogenesis and development of treatment strategy traumatic optic neuropathy in the experiment.

**Вступ.** Первинні ушкодження нервової тканини зорового нерва, які виникають при частковому пошкодженні центральної системи, вперше описані Garcia-Valenzuela з співавторами в 1994 році [7]. Пізніше були описані вторинні дегенеративні процеси, які при цьому виникають у неушкоджен-

них ділянках нерва [12], що призводить в подальшому до розвитку стійких функціональних розладів [6].

© Н. М. Мойсеєнко, О. Я. Жураківська, Г. М. Леськів, 2014

Роль компресійних факторів у формуванні вторинних дегенеративних факторів анте- та ретроградної частин зорового нерва при травматичних ушкодженнях вивчена недостатньо. Існує декілька експериментальних моделей подібних досліджень. Jiang Y. в 2007 році запропонував модель травматичного ушкодження зорового нерва в зоні каналу за допомогою хірургічних інструментів. В результаті стиснення виникає дегенерація нервової тканини у вигляді набряку в уражених нервових волокнах, який спостерігався починаючи з 3 дня [11]. Feng Dong-Fu (2010) для ушкодження зорового нерва затискав його за допомогою аневризматичних кліпсів і при цьому виявив ретроградну загибель гангліонарних клітин сітківки [5].

Таким чином, морфологічні прояви уражень проксимального і дистального відділів іпсі- та контрлатеральної сторони зорового шляху залишаються не до кінця зрозумілими, а тому потребують уточнень.

**Мета** уточнити морфологічні особливості антеградних травматичних ушкоджень зорового нерва в експерименті.

### Матеріал і методи

Для розробки експериментальної моделі було використано 11 статевозрілих кроликів самців, масою 3,5–4 кг породи радянська шиншила. Контрольну групу становили 12 кроликів.

Операція проводилась в умовах операційної віварію кафедрі анатомії людини Івано-Франківського національного університету із дотриманням правил асептики. Утримання тварин та виведення їх із експерименту виконувалося у відповідності до «Вимог біоетики Хельсінкської декларації про етичне регулювання медичних досліджень» [11].

Після загального (Сидазин 1,5 в/м) та місцевого знеболення (2 % Лідокаїну 0.5 мл підшкірно), антисептичної обробки операційного поля, в ділянці зовнішньої третини надбровної дуги правого ока виконували розріз шкіри, тупе розшарування м'яких тканин, розріз окістя орбітального відростку лобної кістки та тупе відсепарування зорового нерва. Нерв взято хірургічним затискачем біля верхівки орбіти і позаду м'язової воронки. Защемлення зорового нерва тривало 10 хвилин з одночасним його розтягненням і ротацією очного яблука. Рану було зашито.

Основною клінічною ознакою ефективності пошкодження зорового нерва було порушення прямої реакції зіниці на світло (рис. 1), яка виникала вже через 30 хвилин і зберігалась патологічною протягом всього терміну спостереження (2 тижні).

Через 2 тижні тварини були виведені із експерименту за допомогою гільйотини. Для морфологічного дослідження взято краніальну частину зорових нервів обох очей. В якості контролю використовували відповідні структури контрольної групи.

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки матеріалу фіксували у 2 % розчині чотириокису осмію, проводили та контрастували за загально прийнятим методом. Вивчення матеріалу виконували на електронному мікроскопі ПЕМ-125 К, при прискорюючій напрузі 75 кВ, з наступним фотографуванням при збільшеннях від 1200 до



**Рис. 1.** Стан прямої зіничної реакції на стороні ураження у кролика через 30 хвилин після експериментального защемлення правого зорового нерва

25000 разів. Напівтонкі зрізи, товщиною 1 мкм, фарбували 1 % розчином метиленової синьки. Напівтонкі зрізи вивчали під світловим мікроскопом МС 300 (ТХР) та фотографували за допомогою Digital camera for microscope DCM 900 із розширенням 1200x1600.

Для об'єктивної оцінки стану нервових волокон зорового нерва кролика нами було проведено морфометричне дослідження електронограм. Негативи електронограм сканували, переводячи в позитив, та зберігали в аналогічному форматі. Морфометрію здійснювали на вказаних препаратах за допомогою програмного забезпечення NIH USA «Image J» в ручному режимі із урахуванням збільшень.

Проводили вимірювання мієлінових оболонок, аксонів, та волокон в цілому. Індекс «g» визначали по формулі:  $g = a/d$ , де  $a$  — площа аксона,  $d$  — площа цілого мієлінового волокна. Товщину мієлінової оболонки визначали по формулі:  $l = D - d$ , де  $l$  — товщина мієліну,  $D$  — середній діаметр волокна,  $d$  — середній діаметр його аксона. Комп'ютерне опрацювання даних проводилося за допомогою статистичного пакету Stat.Soft.Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 6.

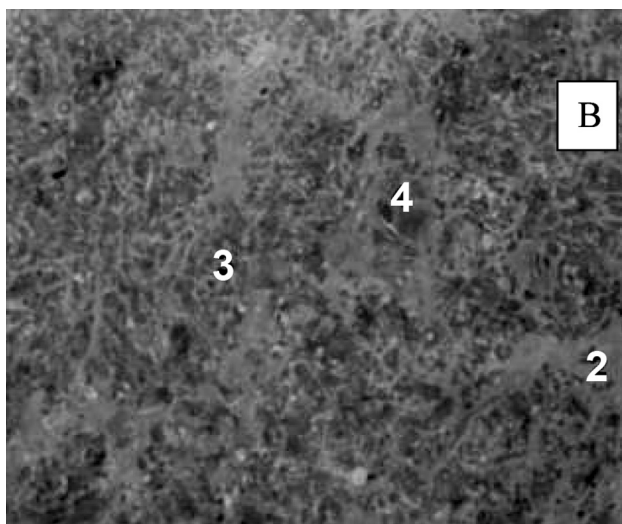
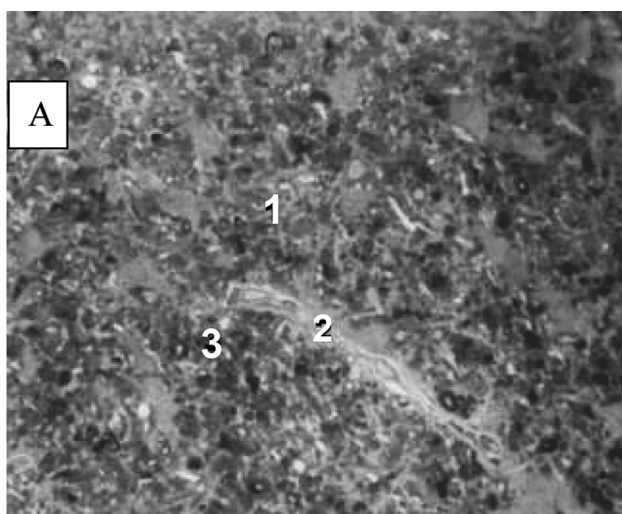
### Результати та їх обговорення

За результатами дослідження внутрішньочерепної частини зорового нерва кроликів контрольної групи виявлено його збережену правильну структуру. Ззовні нерв був покритий щільно-волокнистою сполучнотканинною оболонкою — епіневрієм (vagina interna). Проникаючи в товщу зорового нерва, сполучна тканина поділяла його на пучки, а також формувала пери- та ендоневрії. На поперечних зрізах зорового нерва виявляли овальної форми пучки. В епіневрії, периневрії та ендоневрії знаходиться велика кількість кровоносних судин, що вказує на добру васкуляризацію даного нерва.

В той же час у експериментальних тварин на світлооптичному рівні спостерігалися виражені набряково-деструктивні зміни оболонок мієлінових нервових волокон (МНВ), що призводили до зменшення осьових циліндрів, які в окремих нервових волокнах не виявлялися, а мієлінова оболонка

(МО) таких волокон займала практично всю його площу (рис. 2 А). Визначалися поодинокі МНВ із ознаками анізохромії, часткового розволокнення та руйнування мієлінової оболонки. Поряд з цим відмічалася незначна частина МНВ із збереженою структурою. В ендо- та периневрії спостерігалися розростання сполучної тканини за рахунок новоутворених колагенових волокон (рис. 2 Б).

За даними морфометричного аналізу, у контрольній групі площа осьового циліндра становить  $(1,28 \pm 0,34)$  мкм<sup>2</sup>, площа нервового волокна —  $(2,28 \pm 0,55)$  мкм<sup>2</sup>, товщина мієлінової оболонки —  $(0,43 \pm 0,04)$  мкм. В експериментальній групі площа осьового циліндра була статистично незначуще зменшеною до  $(0,73 \pm 0,14)$  мкм<sup>2</sup> ( $p=0,1097$ ),



**Рис. 2.** Внутрішньочерепна частина зорового нерва кролика через 2 тижні після експериментального защемлення. Напівтонкий зріз, забарвлений 1 % розчином метиленового синього (А) і поліхромним барвником (В). Збільшення  $\times 400$ .

Примітка: 1 — зменшення осьового циліндра нервові волокна, 2 — периневрій з (4) новоутворених колагенових волокон, 3 — руйнування мієлінової оболонки

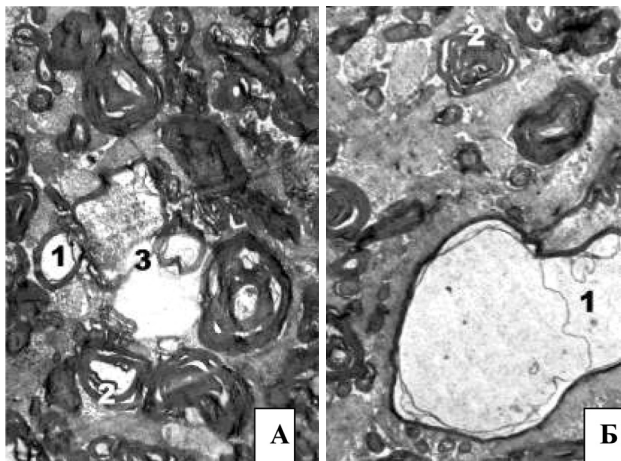
відмічалось достовірне збільшення площі МНВ до  $(6,79 \pm 1,32)$  мкм<sup>2</sup> ( $p=0,0164$ ) за рахунок збільшення товщини мієлінової оболонки до  $(2,11 \pm 0,46)$  мкм ( $p=0,0013$ ), що вказувало на набряк останньої.

Індекс «g» в контрольній групі збільшується відповідно до зростання діаметра волокна і становить в інтактних тварин  $0,52 \pm 0,03$ , що відповідає нормі [1, 2]. В експериментальній групі індекс g зменшувався до  $0,16 \pm 0,05$  ( $p=0,0012$ ), що є також свідченням набряку МО, виникнення якого ми пов'язуємо як із імовірною реакцією морфологічних елементів шванівських клітин, так і з порушенням гемодинаміки нерва.

На електроннограмах зорового нерва в контрольній групі мієлінові оболонки нервових волокон мали темне, насичене забарвлення, а аксони і ендоневрій переважно світлого відтінку. На поперечних зрізах нервові волокна мали вигляд кілець неправильної форми з плавними краями і світлим центром. Осьові циліндри містили мітохондрії, нейрофіламенти, агранулярну ендоплазматичну сітку, міхурці. Мієлінова оболонка представлена шарами плазматичної мембрани (мієліном) нейролеммоцита. В місцях нодусів (простір між двома сусідніми нейролеммоцитами, які оточують одне волокно) аксон непокритий мієліном. На периферії кожного нейролеммоцита, який формує мієлін, утворюється здуття, в якому розміщуються ядро цієї клітини та органели, що його оточують. В мієлінових волокнах за рахунок накручування цитоплазматичної мембрани на осьовий циліндр утворюється два мезаксона: внутрішній та зовнішній. В ендоневральній сполучній тканині зустрічаються поодинокі макрофаги, фібробласти та тучні клітини.

В експериментальній групі відмічалися виражені морфологічні зміни правого зорового нерва, що спостерігаються і під час електронної мікроскопії (рис. 3). Аксиоплазма волокон була з вираженим набряком МО низької електронної щільності, вакуолізована. В ній практично були відсутні мітохондрії, а ті, що залишились, набрякли з просвітленням матриксом, деформованими і частково зруйнованими кристами. Зустрічалися поодинокі мікротрубочки та нейрофіламенти. Ламели мієліну часто розташовуються хаотично, віддаляються одна від одної, набувають хвилястого ходу. Вищеперераховані зміни інтерпретуються за даними літератури, як порушення аксоходу по ходу осьових циліндрів [3, 8, 12], яке виникає внаслідок набряку МО та може трактуватися як періаксональна дегенерація.

В цитоплазмі нейролеммоцитів містилося багато лізосом, аутофагосом, продуктів розпаду мієліну, дрібні та крупні вакуолі. Спостерігається каріопікноз їх ядер, відбувається фрагментація гранулярної ендоплазматичної сітки та апарату Гольджі. Прослідковувався набряк ендоневрію, в якому візуалізується багато фібробластів та колагенових волокон.

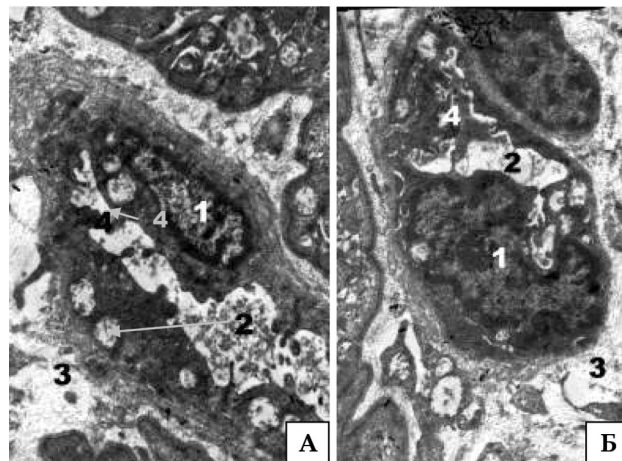


**Рис. 3.** Внутрішньочерепна частина правого зорового нерва кролика через 2 тижні після експериментального защемлення. Зб.: А) 12000, Б) 4800.

Примітка: 1 — набряк аксолеми нервового волокна, 2 — розшарування ламел мієліну, 3 — демієлінізація нервових волокон.

Часто зустрічалися МНВ з явищами демієлінізації (рис. 3 Б), характерними проявами якої була глибока дезорганізація мієлінової оболонки і відокремлення фрагментів мієліну, які вільно лежать у аксоплазмі або цитоплазмі нейролеммоцита. Такі зміни деякі автори трактують як мезаксонотомію в умовах порушеного енергетичного і білкового обміну [2, 4, 13]. При цьому нейролеммоцити позбавляються метаболічної носії шляхом перетворення пластинок мієліну на їхні цитоплазматичні включення, що в майбутньому можна розглядати як реакцію адаптації, спрямовану на забезпечення умов для регенерації нервових волокон.

Такі зміни МНВ відбувалися на тлі порушення мікроциркуляції. Найбільш виражені зміни спостерігалися в капілярах (рис. 4). Цитоплазма ендотеліоцитів була гомогенізована з дрібними і крупними вакуолями, мітохондрії з просвітленим матриксом та зруйнованими кристами. Ядра неправильної форми за рахунок значних інвагінацій ядерної оболонки. Відмічалось розширення та часткове руйнування структур гранулярної ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі. Люмінальна поверхня ендотеліоцитів утворювала численні випинання в просвіт судини, що в подальшому призводить до порушення їх цілісності та явищ мікроклазмотозу. Базальна мембрана потовщувалася та розшаровувалася. Спостерігалася вакуольна



**Рис. 4.** Мікроциркуляторні порушення внутрішньочерепної частини правого зорового нерва кролика через 2 тижні після експериментального защемлення. Прекапіляр (А) і Капіляр (Б). Зб.: х8000.

Примітка: 1 — Цитоплазма ендотеліоцитів гомогенізована з дрібними і крупними вакуолями (2), мітохондрії з просвітленим матриксом та зруйнованими кристами ядро ендотеліоцита 3 — перикапілярний набряк, 4 — мікроклазмотоз.

дистрофія перичитів. Дані зміни, разом із втратою щільності контактів між ендотеліоцитами, сприяють виходу за межі судин формених елементів крові та призводять до утворення вазогенного набряку нерва. У навколосудинних сполучнотканинних прошарках нами виявлено збільшення кількості активних фіброblastів, колагенових волокон.

**Заключення.** Таким чином, за результатами дослідження морфологічних змін травматичного пошкодження орбітальної частини зорового нерва в експерименті, на 14 добу встановлено периаксональну дегенерацію його краніальної частини, яка проявлялася порушенням аксотоку за ходом осевих циліндрів, що виникало внаслідок набряку мієлінової оболонки.

### Висновки

Отже, структурні зміни краніальної частини зорового нерва, які підтверджені світло-ультраструктурними дослідженнями, даними морфометрії і виникають на тлі порушення гемодинаміки нерва, можуть служити основою для подальших досліджень патогенезу і розробки тактики лікування травматичної оптичної нейропатії в експерименті.

### Література

1. Левицький В. А. Гісто — ультраструктура лицевого нерва в нормі і в умовах експериментальної нейропатії / В. А. Левицький, Н. І. Шовкова // Вісник морфології. — 2009. — № 1. — С. 38–43.
2. Периферійний нерв (нейро-судинно-десмальні взаємовідношення в нормі та патології) / [С. Б. Герашенко, О. І. Дельцова, А. К. Коломійцев, Ю. Б. Чайковський] — Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. — 342 с.

3. **Пивнева Т. А.** Механизмы процесса демиелинизации и его моделирование / Т. А. Пивнева, Е. В. Колотушкина, Н. А. Мельник // *Нейрофизиология*. — 1999. — Т. 31, № 6. — С. 497–509.
4. Характеристика структурних змін мієлінових нервових волокон за умов де мієлінізації та ремієлінізації у центральній нервовій системі (ЦНС) // *Карповські читання: Матеріали II Всеукраїнської наук. морфологічної конф. (Дніпропетровськ, 12–15 квітня 2005 р.)*. / Під ред. професора І. В. Твердохліба. — Дніпропетровськ: Пороги, 2005. — 93 с.
5. **Feng Dong-Fu.** Standardizing optic nerve crushes with an aneurysm clip. / Feng Dong-Fu, Chen Er-Tao, Li Xue-Yuan Liu Yong, Wang Yang // *Neurological Research*. — 2010. — Vol. 32. — № 5. — P. 476–481.
6. **Fitzgerald M.** Early events of secondary degeneration after partial optic nerve transection: an immunohistochemical study. / Fitzgerald M., Bartlett C. A., Harvey A. R., Dunlop S. A. // *J. Neurotrauma*. — 2010. — Vol. 27. — P. 439–452.
7. **Garcia-Valenzuela E.** Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy / Garcia-Valenzuela E., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z., Sharma S. C. // *J. Neurobiol.* — 1994. — Vol. 25. — P. 431–438.
8. Guanosine prevents thermal hyperalgesia in a rat model of peripheral mononeuropathy / A. P. Schmidt, L. Paniz, C. Schallenger, [et al.] // *J Pain*. — 2009. — № 4. — P. 1007–1011.
9. **Jiang Y.** Observation of neural electrophysiology and morphology in traumatic optic neuropathy in cat model / Jiang Y., Li N., Zhang N. K., Dong P., Liu L. X. // *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. — 2007. — Vol. 42(7). — P. 520–525.
10. **Levkovitch-Verbin H.** A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. / Levkovitch-Verbin H., Quigley H. A., Martin K. R., Zack D. J., Pease M. E., Valenta D. F. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2003. — Vol. 44. — P. 3388–3393.
11. **Norman H. J.** Requirements of bioethics of Helsinki declaration about ethical regulation of medical researches / H. J. Norman // *Хроніка БОЗ*. — 1985. Т. 39, № 3. — С. 3–9.
12. **Sarikcioglu L.** Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat / L. Sarikcioglu, B. M. Demirel, A. Utuk // *Folia Morphol (Warsz)*. — 2009. — V. 68, № 1. — P. 1–7.
13. **Yang Q.** Effects of qichu fujin recipe on regeneration and repair of injured sciatic nerve in rats / Q. Yang, Y. S. Zhang // *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. — 2009. — V. 7, № 9. — P. 848–854.

Поступила 06.10.2014

### Література

1. **Levytskyi VA, Shovkova NI.** Histoultrastructure of facial nerve in normal and under experimental neuropathy. *Visnyk morfologii*. 2009;1:38–43. Ukrainian.
2. **Gerashchenko SB, Deltsova OI, Kolomiitsev AK, Chaikovskii YuB.** Peripheral nerve (neuro-vascular desmal relationship in health and disease). Ternopil:Ukrmedkniga; 2005. 342 p.
3. **Pivneva TA, Kolotushkina EV, Melnik NA.** The mechanisms of the process of demyelination and its modeling. *Neirofiziologiya*. 1999;31(6):497–509. Russian.
4. Characteristics of structural changes in myelin nerve fibers in conditions of myelination and re-myelination in the central nervous system. *Karpov Readings: Proceedings of II All-Ukrainian scientific morphological conference, Dnipropetrovsk, 12–15 April 2005*. Dnipropetrovsk: Porogy; 2005. 93 p.
5. **Feng Dong-Fu, Chen Er-Tao, Li Xue-Yuan Liu Yong, Wang Yang.** Standardizing optic nerve crushes with an aneurysm clip. *Neurological Research*. 2010;32(5):476–81.
6. **Fitzgerald M, Bartlett CA, Harvey AR, Dunlop SA.** Early events of secondary degeneration after partial optic nerve transection: an immunohistochemical study. *J. Neurotrauma*. 2010;27:439–52.
7. **Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC.** Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J. Neurobiol*. 1994;25: 431–8.
8. **Schmidt AP, Paniz L, Schallenger C et al.** Guanosine prevents thermal hyperalgesia in a rat model of peripheral mononeuropathy *J Pain*. 2009;4:1007–11.
9. **Jiang Y, Li N, Zhang NK, Dong P, Liu LX.** Observation of neural electrophysiology and morphology in traumatic optic neuropathy in cat model. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2007;42(7):520–5.
10. **Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Zack DJ, Pease M E, Valenta DF.** A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2003;44:3388–93.
11. **Norman HJ.** Requirements of bioethics of Helsinki declaration about ethical regulation of medical research. *WHO Chronicles*. 1985;39(3):3–9.
12. **Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A.** Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2009;68(1):1–7.
13. **Yang Q, Zhang YS.** Effects of qichu fujin recipe on regeneration and repair of injured sciatic nerve in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2009;7(9):848–54.