

Експериментальні дослідження

УДК: 617.731/732-001.4-003.93-085-091.8

Морфофункціональні аспекти відновних процесів зорового нерва при травматичному ушкодженні під впливом високих доз кортикостероїдів

Н. М. Мойсеєнко, канд. мед. наук

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», кафедра отоларингології та офтальмології

E-mail: natalymoyseenko@ukr.net

Ключові слова: травматичне ушкодження зорового нерва, регенераторні процеси, ремієлізація, високі дози кортикостероїдів, амплітуда зінічної реакції.

Ключевые слова: травматическое повреждение зрительного нерва, регенераторные процессы, ремиелинизация, высокие дозы кортикостероидов, амплитуда зрачковой реакции.

Введение. Поиск условий, способствующих активации регенераторных процессов и восстановления функций зрительного нерва при травматических повреждениях, актуален.

Цель — изучить морфофункциональные аспекты восстановительных процессов зрительного нерва после травматического повреждения под воздействием высоких доз кортикостероидов.

Материал и методы. Было использовано 24 половозрелых кролика, из них 12 — группа травмированных без лечения и 12 — на вторые сутки после травмы проводилось лечение с применением введения метилпреднизолона. Проводили морфологическое исследование на 14 сутки и функциональное (амплитуда зрачковой реакции) на 14 сутки и через 1 месяц.

Результат. После использования высоких доз кортикостероидов во внутрочерепной части зрительного нерва на 14 сутки выявлены улучшение микроциркуляции, уменьшение отека и ремиелинизация нервных волокон. При этом через месяц увеличилась амплитуда зрачковой реакции.

Выводы. Установлено, что при травматическом повреждении применение высоких доз кортикостероидов способствует возникновению не только морфологических, но и функциональных признаков активации восстановительных процессов зрительного нерва.

Вступ. Десятиліттями ведуться пошуки можливостей регенерації зорового нерва. Вважається, що в нормі гангліонарні клітини сітківки не здатні регенерувати після ушкодження зоровий нерв. Зокрема, до 2004 року вважалося, що дисбаланс між запальними і протизапальними факторами у пошкоджені зоровому нерві протидіє його відновленню [14].

Проте подальші дослідження виявили цілий ряд факторів, які могли б його забезпечити. Так, за даними Н. В. Іванової, регенеративні процеси в оці відбуваються в три етапи: альтерації, змін мікроциркуляції і проліферації [2]. Шляхом застосування інгібіторів апоптозу та факторів росту вдалося зменшити загибель гангліонарних клітин сітківки після ушкодження зорового нерва [10, 15].

Найбільш ефективним способом прямої нейропротекції при травматичних ураженнях зорового нерва вважається застосування глюкокортикоїдів, які у високих дозах (30 мг/кг маси) сприяють виробленню власного захисного фактора гангліонарними клітинами, що забезпечує їх виживання [11]. Тому застосування високих доз кортикостероїдів вважається стандартом лікування травматичної оптичної нейропатії.

Якщо з'ясування морфологічних основ регенераторних процесів зорового нерва хоч і залишаються дискусійними, проте мають наукове обґрунтування, то функціонування відновлених волокон все ще залишається сумнівним і потребує більш детального вивчення.

Мета — вивчити морфофункціональні аспекти відновних процесів зорового нерва після травматичного ушкодження під впливом високих доз кортикостероїдів.

Матеріал і методи

В якості експериментальної моделі було використано 24 статевозрілих кроликів самців, масою 3,5–4 кг породи радянська шиншила, яким в умовах операції здійснювалось пошкодження зорового нерва [4]. З них 12 тварин не отримували лікування (група травмовані), а іншим 12 на другу добу після травми проводилось лікування (група ліковані) із застосуванням в/м введення метилпреднізолону в дозі 30 мг/кг маси впродовж 3 днів, далі доза поступово зменшувалась. Контрольну групу становило 12 кроликів.

Через 2 тижні частину тварин (по 6) з обох груп було виведено із експерименту за допомогою гільйотини. Для

морфологічного підтвердження пошкоджень за допомогою світлового і електронного мікроскопів використовували крихітну частину зорових нервів обох очей. В якості контролю служили відповідні структури контрольної групи.

Операція і морфологічні дослідження проводились [4] в умовах операційної віварію кафедри анатомії людини Івано-Франківського національного університету із дотриманням правил асептики. Утримання тварин та виведення їх із експерименту виконувалось у відповідності до «Вимог біоетики Хельсинкської декларації про етичне регулювання медичних досліджень».

Визначали частоту серцевих скорочень та амплітуду зинічних реакцій (різницю між діаметром зиніці, виміряним за допомогою лінійки в горизонтальному меридіані між 3 і 9 годинами, при сутінковому освітленні і під час прямого засвітлення ліхтариком із лампочкою потужністю 5 Вт) на 14 добу (всі тварини) і через 1 місяць (по 6 тварин з експериментальних груп) після травми.

Комп'ютерне опрацювання даних проводилося за допомогою статистичного пакету Stat. Soft. Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 6.

Результати

За даними морфологічного дослідження на світлооптичному рівні внутрішньочерепної частини зорового нерва кроликів групи травмовані, на 14 добу (рис. 1) спостерігалися виражені набряково-деструктивні зміни оболонки 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 площу волокна. В ендо- та периневрії спостерігалися розростання сполучної тканини за рахунок новоутворених колагенових волокон.

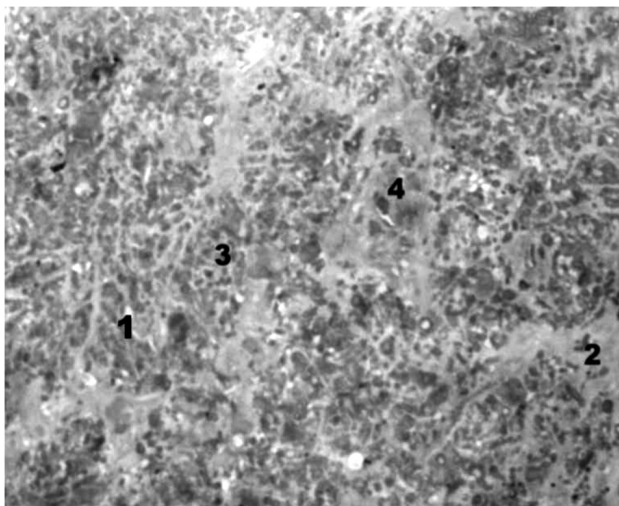


Рис. 1. Стан внутрішньочерепної частини правого зорового нерва у кролика на 14 добу після травматичного ушкодження. Напівтонкі зрізи, забарвлені поліхромним барвником. Зб.: x400 Примітка: 1 — деструктивні зміни, 2 — набрякові зміни, 3 — зменшення площі осьового циліндру, 4 — новоутворена сполучна тканина.

В той же час після лікування (рис. 2) виявлено зменшення набряку ендоневральної сполучної тканини. МНВ набували округлу або овальну та неправильну зірчасту і полігональну форму. В одних МНВ зовнішній і внутрішній контури МО були концентричні, у інших — внутрішні шари мієліну формували випинання різної форми і висоти, що свідчить про збереження дегенеративних змін в цих МНВ [7].

За даними морфометрії, у групі ліковані порівняно з групою травмовані, у внутрішньочерепній частині правого зорового нерва відмічається зменшення площі МНВ ($p=0,006972$) при статистично значущому збільшенні індексу g ($p=0,000423$), що вказує на активні процеси ремієлінізації цих волокон.

На електронограмах зорового нерва в групі без лікування (рис. 3) аксоплазма волокон була з вираженим набряком МО низької електронної щільності, вакуолізована. В ній практично були відсутні мітохондрії, а ті що залишилися — набрякли з просвітленим матриксом, деформованими і частково зруйнованими кристами. Ламели мієліну часто розташовуються хаотично, віддаляються одна від одної, набувають хвилястого ходу. Все це, за даними літератури, може свідчити про порушення аксолеку по ходу осьових циліндрів [6, 16, 17], яке виникає внаслідок набряку МО та може трактуватися як периаksonальна дегенерація. Часто зустрічалися МНВ з явищами демієлінізації, характерними проявами якої була глибока дезорганізація мієлінової оболонки і відокремлення фрагментів мієліну, які вільно лежать в аксоплазмі або цитоплазмі нейролеммоцита, що вказує на порушення енергетичного і білкового обміну [5, 8, 19].

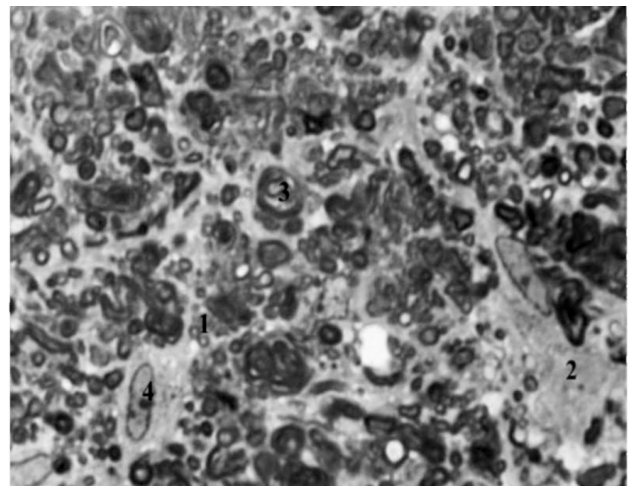


Рис. 2. Стан внутрішньочерепної частини правого зорового нерва у кролика на 14 добу після травматичного ушкодження з використанням високих доз кортикостероїдів. Напівтонкі зрізи, забарвлені поліхромним барвником. Зб.: x1000. Примітка: 1 — новоутворені МНВ, 2 — новоутворені колагенові волокна, 3 деструктивно змінені МНВ, 4 — ядра фібробластів, 5 — реактивні зміни.

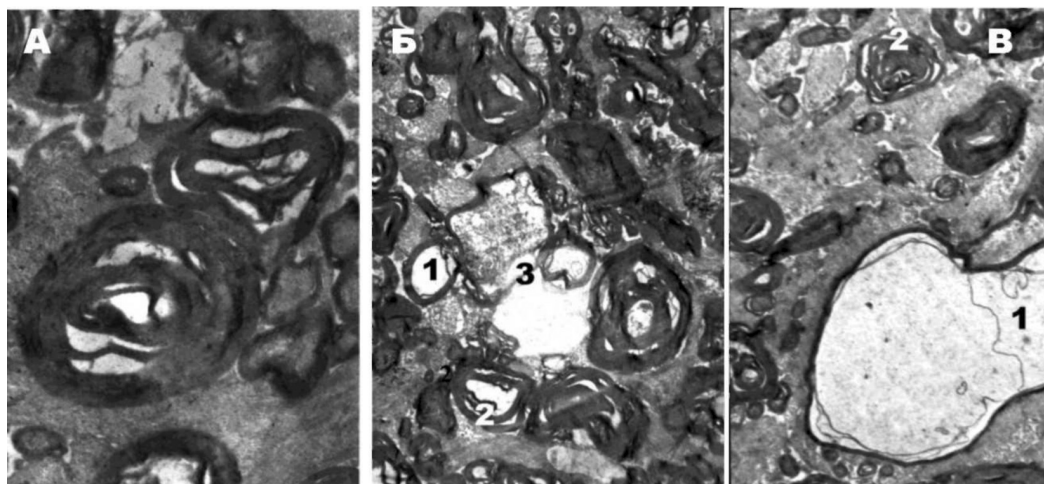


Рис. 3. Ультраструктурні зміни внутрішньочерепної частини зорового нерва у кролика на 14 добу після травматичного пошкодження без лікування. Зб.: А — $\times 12000$, Б, В — $\times 4800$. Примітка: 1 — набряк нервового волокна, 2 — розшарування МО, 3 — демієлінізація нервового волокна, 4 — вакуолізація МО.

У тварин групи ліковані виявлялися МНВ, МО яких складалася тільки із декількох ламелів мієліну, що були чітко упорядкованими (рис. 4 А). В аксоплазмі таких МНВ містилися молоді видовжені мітохондрії з щільним матриксом і упорядкованими кристами, помірна кількість чітко структурованих мікротрубочок і нейрофіламентів, що свідчить про відновлення їх остову та провідності [12]. В цитоплазмі нейролемоцитів виявлялося велике ядро з дисперсно розсіяним хроматином та чіткою нуклеоломою із неглибокими інвагінаціями, молоді мітохондрії та чітко упорядковані цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, на поверхні яких розташовувалася велика кількість рибосом. Такі морфологічні ознаки є свідченням активних енергозабезпечуючих та біосинтетичних процесів, які відбуваються в нейролемоцитах [7].

Такі зміни морфологічної будови в групі ліковані відбувалися на тлі відновлення мікроциркуляції. Капіляри ендоневрію були округлої форми з округлим або овальним просвітом. Ядра ендотеліоцитів набули видовжену форму з маргінально розташованим хроматином (рис. 5). В ендотеліоцитах цитоплазма була підвищеної електронно-оптичної щільності і містила молоді мітохондрії, поодинокі мікропіноцитозні пухирці. Це є молоді ендотеліоцити [10].

Щодо функціональної активності, то за даними знічних реакцій, в групі травмовані відмічалась повна відсутність прямої реакції на світло на стороні ураження (амплітуда становила 0 мм) (рис. 6). Натомість, в групі ліковані через 1 місяць після травми відмічалось недостовірне збільшення амплітуди знічної реакції до $(1 \pm 0,5)$ мм, що свідчить про активацію аферентної ланки зорового шляху, а

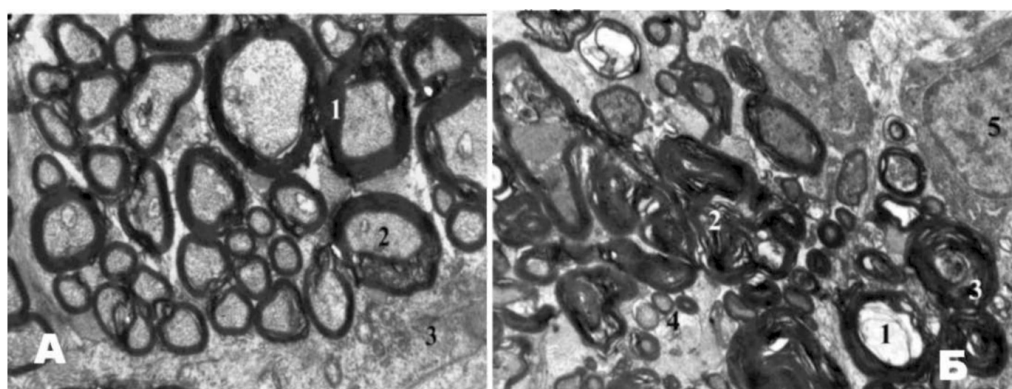


Рис. 4. Відновні (А) та деструктивні (Б) процеси в МНВ внутрішньочерепної частини правого зорового нерва кролика при травматичному ушкодженні на 14 добу лікування. Зб.: $\times 6400$. Примітка: А: 1 — МНВ з упорядкованою МО, 2 — новоутворені мікротрубочки і нейрофіламенти в аксоплазмі МНВ, 3 — цитоплазма нейролемоцита з молодими мітохондріями та чітко упорядковані цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки. Б: 1 — набряк аксолеми нервового волокна, 2 — розшарування ламел мієліну, 3 — набряк мієлінової оболонки, 4 — МНВ з збереженою ультраструктурою, 5 -ядро нейролемоцита.

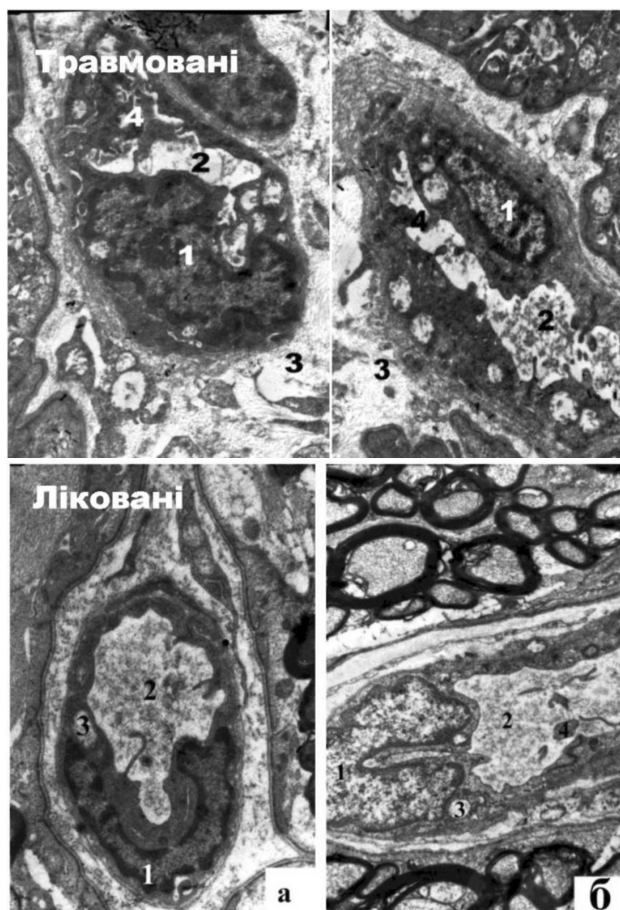


Рис. 5. Гемодинаміка внутрішньочерепної частини правого зорового нерва при травматичному ушкодженні на 14 добу. Зб.: Травмовані — х8000, Ліковані — х6400. Примітка: а — капіляр, б- прекапіляр, 1 — ядра ендотеліоцитів видовженої форми з маргінально розташованим хроматином, 2 — про-світ капіляра, 3 — вакуолі в цитоплазмі ендотеліоцита, 4 — явища мікроклазматозу.

також, можливо, і про часткове відновлення функціональної здатності нервових волокон (рис. 7).

Таким чином, на 14 добу після використання високих доз кортикостероїдів у внутрішньочерепній частині зорового нерва виявлено покращення мікроциркуляції, зменшення набряку та ремієлінізацію нервових волокон. При цьому через місяць збільшилась амплітуда зіничної реакції, що свідчить про відновлення функціональної активності зорового нерва.

Проте, незважаючи на прямий нейропротекторний вплив високих доз кортикостероїдів, даний спосіб лікування має виражену негативну дію в зв'язку з його високою токсичністю та смертністю експериментальних тварин обох груп в терміни до 1 місяця.

Висновок. Отже встановлено, що при травматичному ушкодженні зорового нерва застосування високих доз кортикостероїдів сприяє виникненню не тільки морфологічних, але і функціональних ознак активації відновних процесів у зоровому нерві.

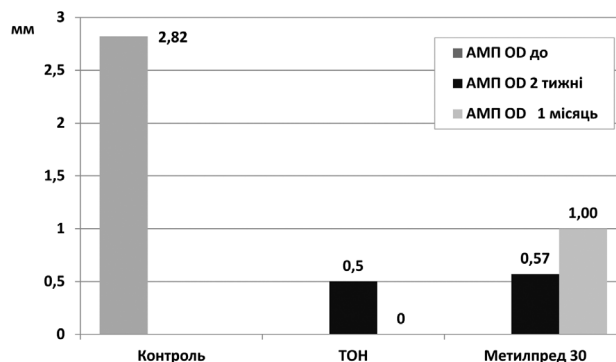


Рис. 7. Динаміка зіничних реакцій після травми оптичного нерва і при застосуванні високих доз кортикостероїдів у кроликів



Рис. 6. Стан прямої зіничної реакції у кролика при травматичному ураженні правого зорового нерва без і через 1 місяць після лікування

Література

1. **Абдулаев М. С.** Нервы в истории анатомии, их миелоархитектоника. Восходящая дегенерация нервов. Вегетативная природа нейрона / М. С. Абдулаев — Баку: Нурлан, 2002. — 140 с.
2. **Иванова Н. В.** Патогенетическая роль половых стероидных гормонов и фибронектина при посттравматическом репаративном процессе в глазу и эффективность коррекции их нарушений : дисс. ... доктора. мед. наук. : 14.01.18 / Иванова Нанули Викторовна. — Симферополь, 2004. — 409 с.
3. **Левицкий В. А.** Дегенерація та репаративна регенерація нервових волокон сідничого нерва в умовах лазерного опромінення / В. А. Левицкий, О. М. Юрах, Г. Ю. Юрах // Галицький лікарський вісник. — 2009. — № 1. — С. 49–52.
4. **Мойсеєнко Н. М.** Структурні зміни краніальної частини зорового нерва при травматичному пошкодженні його орбітальної частини в експерименті. / Мойсеєнко Н. М., Жураківська О. Я., Леськів Г. М. // Офтальмол. журн. — 2014. — № 6. — С. 101–105.
5. 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.
6. **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.
7. Сосудистый эндотелий / Под ред. В. В. Куприянова, И. И. Бобрика, Я. Л. Караганова // К.: Здоров'я, 1986. — 286 с.
8. Характеристика структурних змін мієлінових нервових волокон за умов демієлінізації та ремієлінізації у центральній нервовій системі (ЦНС) // Карповські читання: Матеріали II Всеукраїнської наукової морфологічної конференції (Дніпропетровськ, 12–15 квітня 2005 р.). / Під ред. професора І. В. Твердохліба. — Дніпропетровськ: Пороги, 2005. — 93 с.
9. **Bove L.** A pilot study on the relation between cisplatin neuropathy and vitamin E. / Bove L. Picardo M., Maresca V. [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer. Res. — 2001. — Vol. 20, № 2. — P. 277–280.
10. **Doris Weibel.** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve / Doris Weibel., Georg W. Kreutzberg., Martin E. Schwab. // Brain Res. — 1995. — Vol. 679. — P. 249–254.
11. **Guy J. Ben Simon.** Traumatic Brain Injury Induced Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells to Optic Nerve Crush / Guy J. Ben Simon. // Journal of Neurotrauma. — 2006. — Vol. 23(7). — P. 1072–1082.
12. **Helwig B. G.** Aging alters regulation of visceral sympathetic nerve responses to acute hypothermia / B. G. Helwig, S. Parimi, C. K. Ganta, [et al.] // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. — 2006. — № 291 (3). — P. 573–579.
13. **Li Y.** Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: differential responsiveness to carbohydrates and cAMP. / Li Y., Irwin N., Yin Y., Lanser M., Benowitz L. I. // J. Neurosci. — 2003. — Vol. 23. — P. 7830–7838.
14. **Marcus Ohlsson.** Complement Activation following Optic Nerve Crush in the Adult Rat / Marcus Ohlsson // Journal of Neurotrauma. — 2004. — Vol. 20. — Iss. 9. — P. 895–904.
15. **Meyerfranke A.** Characterization of the signalling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture / Meyerfranke A., Kaplan M. R., Pfrieger F. W. // Neuron. — 1995. — Vol. 15. — P. 805–819.
16. **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.
17. **Schmidt A. P.** 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.
18. **Shin R. H.** Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits: a comparison of commercially available conduits / Shin R. H., Friedrich P. F., Crum B. A., [et al.] // J Bone Joint Surg Am. — 2009. — V. 91, № 9. — P. 2194–2204.
19. **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 20.05.2015