

УДК 616.833-003.93:57.012.4:616.441-008.66

Рудюк Т.Я., Стченко Л.О., Храпай О.В., Ковальчук О.І., Раскалей В.Б.

Особливості структурної організації ушкодженого сідничого нерва за умов гіпотиреозу на ранніх термінах після пошкодження

Кафедра гістології та ембріології (зав. каф. - член-кор. НАМН України, проф. Ю.Б.Чайковський)

Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ)

Резюме. Робота присвячена вивченю ультраструктурних змін у сідничому нерві гіпотиреоїдних шурів через 2 і 3 тижні після стандартного його перетину. Встановлено, що після нанесення стандартної травми за умов гіпотиреозу через 2 тижні у дистальному відрізку сідничного нерва із великою затримкою у часі розпочиналися дегенераційні зміни. Затримка дегенерації призвела до більш пізнього розвитку регенерації у сідничому нерві шурів з гіпотиреозом, перші прояви якої з'явились лише через 3 тижні після перетину. Okрім відставання етапів відновлення ушкодженого нерва виявлені ознаки патологічного порушення мієлінізації з наступним руйнуванням аберантних новоутворених волокон.

Ключові слова: гіпотиреоз, ретроградна дегенерація, овоїдна дегенерація, електронна мікроскопія.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Робота є фрагментом держбюджетної теми Інституту проблем патології НМУ імені О.О.Богомольця: "Вплив вродженого та набутого гіпотиреозу на стан центральної та периферичної нервової системи шурів та можливість його фармакологічної корекції", № державної реєстрації 0109U001804.

За останні десятиріччя частота випадків діагностованого гіпотиреозу значно зросла серед населення України [1]. Враховуючи те, що тиреоїдні гормони є регуляторами метаболічних процесів у всіх органах і тканинах організму, їх дефіцит ініціює порушення функціонування організму в цілому [2, 3]. Це й забезпечує велику клінічну симптоматику стану гіпотиреозу. Особливим і недостатньо вивченим є вплив тиреоїдних гормонів на стан периферичної нервової системи. Це дуже актуально за умов високого травматизму населення, особливо у великих містах. Поетапний розвиток процесів відновлення уражених периферичних нервів при гіпотиреозі, згідно з даними літератури, вивчений недостатньо [4, 5, 6]. Тому процес регенерації пошкодженого нерва за умов гіпотиреозу є актуальну темою для вивчення.

Метою роботи було вивчення особливостей процесів дета регенерації нервового стовбура за умов гіпотиреозу.

Матеріал і методи дослідження

Експериментальні спостереження були проведені на 15 білих шурах вагою 150-200 г. Всіх тварин, що були використані в роботі, утримували у стандартних умовах віварію (в одному приміщенні, на стандартному брикетованому харчуванні) [7].

Експериментальні тварини були розподілені на 3 групи (табл.1). Перша група (I) – „псевдооперовані” тварин (5 шурів), показники будови яких були використані для оцінки відновлення травмованих нервів. Тваринам II і III груп була проведена тиреоїдектомія [8]. Через 100 діб після тиреоїдектомії тваринам II і III

Таблиця 1. Дани кількісних параметрів регенерації в дистальній ділянці сідничого нерва шура в різні терміни після пошкодження за умов гіпотиреозу

| Група тварин | Щільність розподілу нервових ($1/\text{мм}^2$) | Об'ємна щільність неушкоджених нервових (%) | Об'ємна щільність ушкоджених нервових волокон (%) | Об'ємна щільність овоїдів дегенерації (%) |
|----------------------|--|---|---|---|
| Контроль | 10006±80 | | | |
| 2тижні ГТ+перетин | 5400±112* | 19,7 | 27 | 0 |
| 2 тижні перетин | 2000±52* | 20,75 | 0 | 2 |
| 3тижні ГТ+перетин | 3000±63* | 35 | 0 | 7 |
| 3 тижні перетин | 1050±23* | 10 | 0 | 4 |

Примітка: *- Різниця достовірна ($p<0,05$) по відношенню до контрольної групи спостережень

груп була відтворена експериментальна модель стандартної травми сідничого нерва.

Матеріалом для дослідження були дистальні відрізки (дистальні післяопераційні невроми) ушкодженого сідничого нерва через 2 і 3 тижні після відтворення моделі травми периферичного нерва. Для світлооптичної мікроскопії препарати готовували згідно зі стандартною методикою [9, 10]. Були визначені такі показники: щільність розподілу нервових волокон в дистальній ділянці відносно місця пошкодження.

Для аналізу результатів використовували також напівтонкі поперечні та поздовжні зрізи нервів, виготовлені на ультратомі LKB і забарвлені толуїдиновим синім. Визначали такі величини: кількість овоїдів дегенерації нервових волокон в одиниці об'єму нерва, об'єм овоїдів дегенерації нервових волокон в одиниці об'єму нерва та розміри овоїдів дегенерації нервових волокон.

Для електронномікроскопічного дослідження препарати готовували за загальноприйнятою методикою [11]. Потім їх вивчали та фотографували в електронному мікроскопі ЭМВ 125К.

Результати дослідження та їх обговорення

Через 2 тижні після відтворення стандартної моделі травми сідничого нерва у гіпотиреоїдних шурів в дистальному відрізку цього нерва на світловому рівні виявлені ознаки подразнення та початкової стадії ретроградної дегенерації. Проявами даних процесів були: нерівномірність забарвлення і набряк нервових волокон, нерівність і нечіткість їх контурів, розволокнення мієлінових оболонок, хвильистість направку ходу волокон, нерівномірність розподілу волокон (Рис. 1А.).

Морфометрична оцінка стану дистального відрізу нервового волокна показала, що щільність розподілу нервових волокон цієї ділянки нерва складала $5400 \pm 112/\text{мм}^2$, що перевищувало подібний показник у шурів з гіпотиреозом цього терміну після перетину (табл.1). На поперечних та поздовжніх напівтонких зрізах виявлено також, що поряд із структурованими, неушкодженими нервовими волокнами, наявні були набряклі, з розшарованою мієліновою оболонкою і зруйнованим основним циліндром, проте із збереженим контуром, мієлінові волокна (рис. 1Б.), середня площа яких ($104,5 \pm 36 \text{ мкм}^2$) значно перевищувала розмір середньої площині неушкоджених мієлінових волокон ($66 \pm 34 \text{ мкм}^2$) (табл.2). В полі зору відсутні були овоїди дегенерації. Непомітні були також і тяжкі нейролемоцитів, так звані блюнгнерівські стрічки, які мали б торувати шлях новоутвореним нервовим волокнам. Все вищевказане свідчило на користь ретроградної дегенерації, яка проте значно затримувалась у своєму розвитку, перебуваючи зовсім на початкових етапах, у порівнянні з морфологічними проявами у негіпотиреоїдних шурів цього терміну перетину.

Електронномікроскопічно в полі зору виявлені зруйновані мієлінові волокна з набряклою, делямінованою мієліновою оболонкою, збільшеною в об'ємі настільки, що вона зайняла місце основних циліндрів (Рис.2А.).

Подекуди траплялись дегенеруючі мієлінові волокна з вираженою делямінацією мієлінової оболонки і ділянками ущільнення і просвітлення. Така дислігементація, ймовірно, була проявом підготовчого етапу до наступної фрагментації й фагоцитозу мієлінової оболонки пошкодженого нервового волокна (Рис.2Б.). Особливу увагу слід звернути на прилеглий нейролемоцит, ущільнена цитоплазма якого містила розширені цистерни ЕПС і водночас – багато вакуолей. Це було, на нашу думку, проявом зміни функціональної спеціалізації шванівської клітини з мієліноутворення на фагоцитоз (Рис.2А.).

Інтерстиційний простір був розширений і заповнений

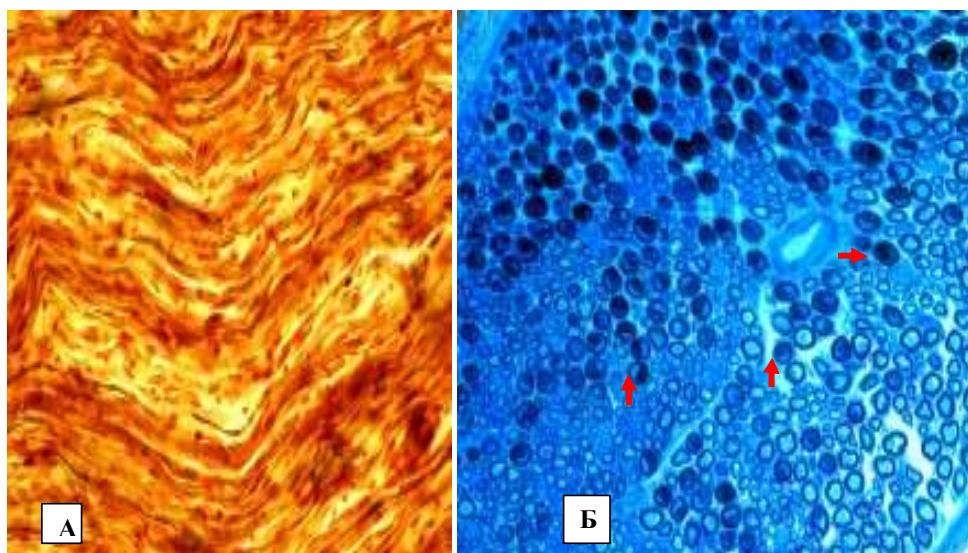


Рис. 1. Дистальний відрізок сідничого нерва щура після відтворення стандартної моделі травми периферичного нерва за умов гіпотиреозу. А - 2 тижні після пошкодження. Мікрофотографія. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. В – 2 тижні після пошкодження. Ушкоджені мієлінові волокна (↑). Мікрофотографія. Напівтонкі зрізи. Забарвлення толуїдиновим синім. Збільшення: об. 20, ок. 10

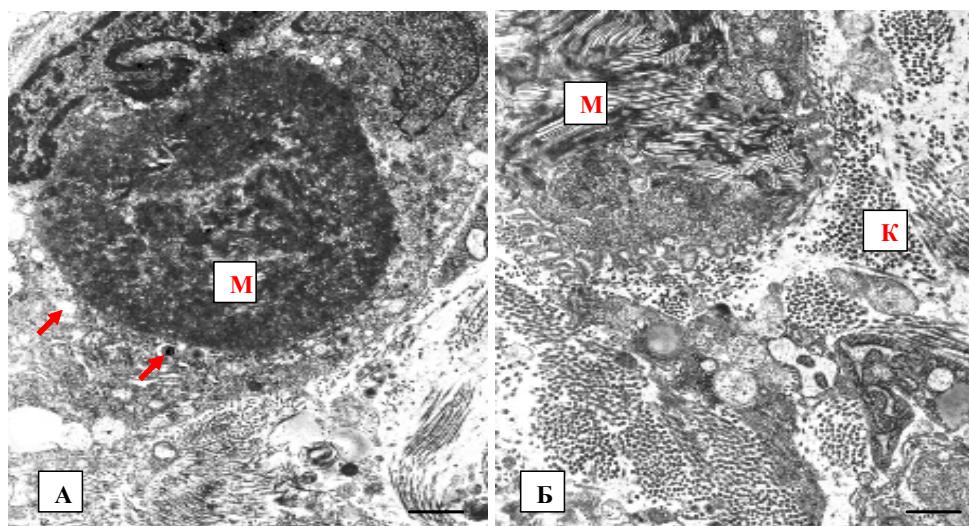


Рис. 2. Дистальний відрізок сідничого нерва щура через 2 тижні після відтворення стандартної моделі травми периферичного нерва за умов гіпотиреозу. А - Дегенеративно змінене мієлінове волокно М. Вакуолі в цитоплазмі нейролемоцита (↑). Б - Дегенеративно змінене мієлінове волокно М, колагенові волокна в інтерстиційному просторі К. Електронна мікрофотографія. Збільшення: х16000

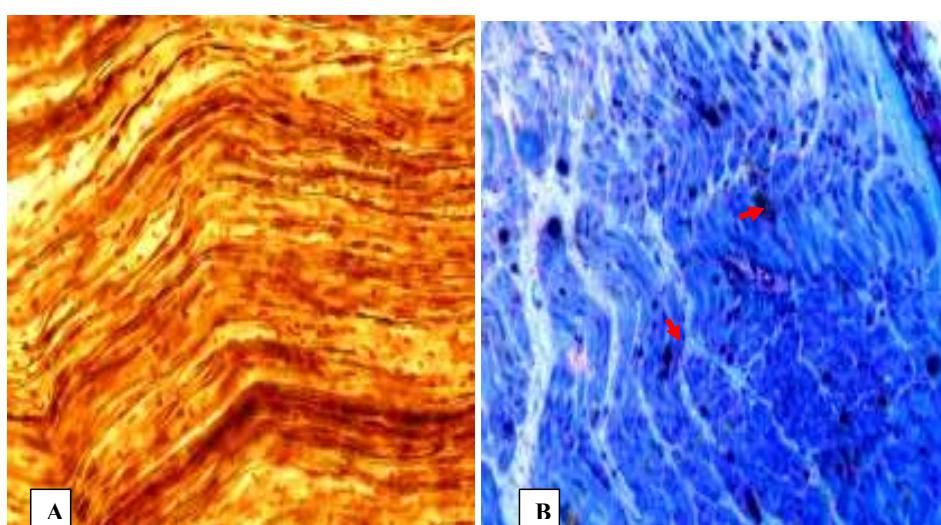


Рис.3. Дистальний відрізок сідничого нерва щура після відтворення стандартної моделі травми периферичного нерва за умов гіпотиреозу. А - 3 тижні після пошкодження. Мікрофотографія. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. В – 3 тижні після пошкодження. Овіди дегенерації нервових волокон (↑). Мікрофотографія. Напівтонкі зрізи. Забарвлення толуїдиновим синім. Збільшення: об. 20, ок. 10

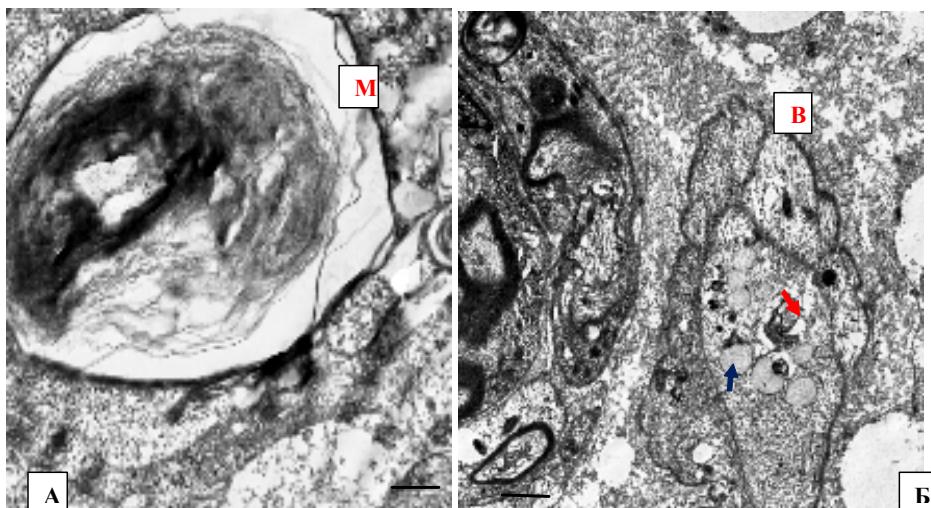


Рис. 4. Дистальний відрізок сідничого нерва щура через 3 тижні після відтворення стандартної моделі травми периферичного нерва за умов гіпотиреозу. А - залишки мієлінової оболонки М в цитоплазмі нейролемоцита. Б - Новоутворені безмієлінові волокна В. Вакуолізовани фрагменти мієлінової оболонки (→) і ліпідні включення (↑) в цитоплазмі нейролемоцита. Електронна мікрофотографія. Збільшення: х16000

пучками колагенових волокон і клітинним детритом (Рис.2Б.). Відсутні новоутворені волокна, як мієлінові, так і безмієлінові. Процеси дегенерації, судячи із стану нейролемоцитів, мієлінової оболонки травмованих волокон і відсутності овоїдів дегенерації, дещо відстають від групи контроля, а регенерація ще не почалась.

Дослідження морфологічні зміни у дистальному відділі сідничого нерва, який зазнав стандартної травми за умов гіпотиреозу, через 3 тижні слід відзначити наростання у ньому набряку і розволокнення, збільшення інтерстиційного простору і нерівномірності розподілу нервових волокон у фрагменті, зростання кількості клітинних елементів (Рис.3А.). Виявляється виражений поліморфізм, мозаїчність і нерівномірність забарвлення нервових волокон. Трапляється деструктуровані ділянки нерва, представлені за будовою лише клітинним детритом, перемежовані тяжами нейролемоцитів і пучками волокон сполучної тканини.

Морфометрично виявлено, що щільність розподілу нервових волокон цієї ділянки нерва складала $3000 \pm 63/\text{мм}^2$, що значно, перевищувало подібний показник щурів без гіпотиреозу цього терміну після травмування (табл. 1.). Об'ємна частка нервових волокон даної ділянки склала 35%, а овоїдів дегенерації - 7% (табл. 2.), хоча в попередньому терміні вони були взагалі відсутні (Рис.1В.), а у щурів без гіпотиреозу складали відповідно 10% і 4%. Середня площа неушкодженого волокна зросла, порівняно з показниками попереднього терміну, до $133 \pm 63 \text{ мкм}^2$ (табл. 2.), що свідчило про настання регенеративних процесів, хоча й на тлі затримки розвитку дегенерації.

Таблиця 2. Дані кількісних параметрів регенерації в дистальній ділянці сідничого нерва щура в різні терміни після пошкодження за умов гіпотиреозу

| Група тварин | Середня площа неукодженого нервового волокна (мкм^2) | Середня площа ушкодженого нервового волокна (мкм^2) | Середня площа овоїда дегенерації (мкм^2) |
|--------------------|---|--|---|
| псевдооперовані | 120 ± 54 | | |
| 2 тижні ГТ+перетин | $66 \pm 34^*$ | $104,5 \pm 36^*$ | - |
| 2 тижні перетин | $41,6 \pm 33,5^*$ | - | $89,8 \pm 24,2^*$ |
| 3 тижні ГТ+перетин | $133 \pm 63^*$ | - | $51,5 \pm 29^*$ |
| 3 тижні перетин | $78,8 \pm 33^*$ | - | $135,7 \pm 93^*$ |

Примітка: *- Різниця достовірна ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи спостережень

Дослідження поперечних та поздовжніх напівтонких зрізів виявило сформовані овоїди дегенерації, які були хаотично розташовані і мали різні розміри. Чітко визначалось збільшення інтерстиційного простору за рахунок розростання сполучної тканини і набряку, переважно у центральній частині нерва (Рис.3В.).

Електронномікроскопічно виявлені овоїди дегенерації у вигляді залишків мієлінових оболонок, розволокнених і стонінних, фагоцитованих нейролемоцитами. Цитоплазма шваннівських клітин була вакуолізована, містила лізосоми у різному стані їх активності і різних розмірів (Рис.4А.). Але наявність великих фагоцитованих залишків нервових волокон, яких ще не торкнувся процес фрагментації на тлі дрібних вакуолей, свідчив про пригальмованість процесів утилізації волокон пошкодженого нерва (Рис.4Б.). В цей термін після перетину нейролемоцити мали б жвавіше розчищати простір від клітинного детриту для реканалізації. Але в даному випадку процес відновлення нерва відбувався за умов гіпотиреозу, тому мав певні особливості.

Попри помітну затримку розвитку дегенерації, яка завчасно мала створювати умови для подальшого настання регенеративних процесів, ці процеси все ж розпочалися. Основним проявом регенерації, звісно ж, було новоутворення нервових волокон. Оскільки безмієлінові волокна в плані їх створення є менш затратними і за будовою – менш складні, порівняно з мієліновими, то їх утворювались вони першими. Новоутворені безмієлінові волокна розташовувались кластерно, але кількість волокон у кластерах і кількість самих кластерів була меншою, аніж у щурів без гіпотиреозу з 3-тижневим терміном перерізки нерва. Аксоплазма безмієлінових волокон містила електроннощільні включення, секреторні пухирці, подекуди траплялись досить великі вакуолі, видовжені мітохондрії без ознак деструкції, нейрофібрили і була затемненою, ущільненою (Рис.4Б.). Аксолема подекуди мала нечіткі й нерівні, дещо розмиті контури, що свідчило про набряк її окремих ділянок.

Наступним важливим проявом регенерації пошкодженого нерва було новоутворення мієлінових волокон. В полі зору траплялися новоутворені мієлінові волокна, переважно середнього і дрібного діаметра. Мієлінова оболонка тонка, набрякла, неоднорідна, з поперемінним розташуванням гіпер- та гіпохромних ділянок. Виявлено місця відходження аксолеми від мієлінової оболонки, які відрізнялися за розмірами від невеликих щілиноподібних проміжків до розширень великих об'ємів у периаксональному просторі. Аксолема містила секреторні вакуолі, електроннощільні включення, набряклі мітохондрії і мала нерівномірну щільність (більшу щільність вона мала на периферії аксона). Подекуди аксолема новоутвореного мієлінового волокна містила фрагменти мієлінової оболонки.

Інтерстиційний простір був розширений і містив грубі пучки колагенових волокон.

Висновки

У тварин, яким була відтворена стандартна травма сідничого нерва за умов гіпотиреозу, в дистальному його відрізку спостерігались прояви дегенерації, які були значно уповільнені у своєму розвитку, порівняно з тваринами без гіпотиреозу. Відставання розгортання картини дегенерації

проявляється у відсутності овоїдів дегенерації через 2 тижні після травмування нерва шурів з гіпотиреозом. Ці утворення у них з'являлися лише через 3 тижні після перетину нерва.

Література

1. Войчулене Ю.С. Епідеміологічне дослідження захворюваності на хвороби щитоподібної залози в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, Автогрф. дис. ... канд. мед. наук/ Буковинський державний медичний університет. – Чернівці, 2009. – 35с.
2. Джанашія П.Х. Гипотиреоз и артериальная гипертензия: нерешенные вопросы патогенеза, диагностики и фармакотерапии / П. Х. Джанашія, Г. Б. Селиванова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2004. - №3. - С. 125-132.
3. Перцова Т.О. Стан ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у хворих на гіпотиреоз та артеріальну гіпертензію / Т.О. Перцова, О.М. Кулікова // Ендокринологія. - 2004.-№1. - С.97-100.
4. Erapand R.M. In: *Neuronal and glial proteins: structure, function and clinical application*. Oxford Univ. Ress. ,1988. - 231-265p.
5. Facci P. A continuous sheet of glial cell membrane / P. Facci, P. Cavatorta, L. Cristofolini // Biophys J. - 2000- № 78 (3). - P. 1413-1419.
6. Holton T. Vertebrate myelin / T. Holton, T.R. Ioerger, J.A. // D Biol. Crystallogr. -2000. - № 56 (Pt 6). - P. 722-734.
7. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1974. – 304 с.
8. Патент на винахід № 27821 Держпатент України. Спосіб моделювання гіпотиреозу у шурів: Патент на винахід № 27821 Україна. Стеченко Л. О., Петренко В. А., Бик П. Л., Кузян В. Р., Кутирива Т. П. (Україна).- Заявлено 12.11.2007;Опубл. 14.12.2007 //Бюль. № 2.-7c.
9. Коломийцев А.К. Быстрый метод импрегнации азотно-кислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для целлюидиновых и парафиновых срезов /А.К. Коломийцев, Ю.Б. Чайковский Т.Л. Терещенко// Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.- 1981.- №8.- С. 93 - 96
10. Мінцер О.П., Вороненко Ю.В., Власов В.В. Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині: Навч.посіб. –

К.: Вища школа, 2003. – 350 с.

11. Карупу В. Я. Электронная микроскопия. – К.: Вища школа. Головное изд-во, 1984. – 208 с.

Рудюк Т.Я., Стеченко Л.А., Храпай А.В., Ковалчук А.И., Ракалей В.Б.

Особенности структурной организации поврежденного седалищного нерва в условиях гипотиреоза

Резюме. Работа посвящена изучению ультраструктурных изменений в седалищном нерве гипотиреоидных крыс через 2 и 3 недели после его стандартной перерезки. Установлено, что после нанесения стандартной травмы условия гипотиреоза через 2 недели в дистальном отделе седалищного нерва с большой задержкой начинаются дегенерационные изменения. Задержка дегенерации привела к более позднему наступлению регенерационных изменений в гипотиреоидном нерве, первые проявления которой появились лишь через 3 недели после его травмирования. Кроме отставания во времени этапов восстановления поврежденного нерва выявлены признаки патологического нарушения миелинизации с последующим разрушением аберантных новообразованных нервных волокон.

Ключевые слова: гипотиреоз, ретроградная дегенерация, овоиды дегенерации, электронная микроскопия.

T.Ya. Rudruk, L.A. Stechenko, A.V. Khrapay, A.I. Kovalchuk, V.B. Raskalej

Peculiarities of Ultrastructural Organisation of Injured Sciatic Nerve in case of Hypothyroidism

Summary. This study deals with the ultrastructural changes in the sciatic nerve in 2 and 3 weeks after injury. Processes of secondary degeneration appeared slowly in distal stump of the transected sciatic nerve in 2 weeks after injury. The first manifestation of regeneration was formation of Bungner bands in 3 weeks after injury.

Key words: hypothyroidism, retrograd degeneration, degeneration ovoids, electron microscopy.

Надійшла 01.03.2013 року.

УДК 591.481.1:616-005.4:616.831.3

Савчук О.І., Скибо Г.Г.

Моделювання ішемічного інсульту в шурів в різні періоди реперфузії

Відділ цитології (зав. – проф. Г.Г.Скибо) Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України м. Київ

Резюме. У роботі проведені морфометричні дослідження ішемізованої ділянки мозку шурів при різних періодах реперфузії при моделювання ішемічного інсульту. Виявлено, що найбільший об'єм ішемізованої ділянки спостерігається у тварин з періодом реперфузії 72 години.

Ключові слова: ішемічний інсульт, фокальна церебральна ішемія, монофіламентна оклюзія.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Ішемічний інсульт (ІІ) є однією з найважливіших причин захворюваності, інвалідизації та смертності населення у розвинених країнах [1]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), щорічно від інсульту помирає близько 5 млн. людей (1 випадок на 1000 населення) [1]. Враховуючи те, що лише близько 20 % осіб, що перенесли інсульт, повертаються до попередньої праці, стає зрозумілим, яке соціальне та економічне значення має ця проблема як для хворого та його родини, так і для держави в цілому [2].

Упровадження в клінічну практику новітніх медикаментозних та інтервенційних технологій є тривалим процесом, для якого важливим є отримання статистично достовірних даних. Розкриття патофізіологічних механізмів, що лежать

в основі загибелі клітин у ділянці інфаркту мозку, є необхідною умовою для розробки нових засобів та терапевтичних методів при ІІ.

Моделювання ішемічного ушкодження головного мозку є незамінним етапом для апробації методів лікування хворих з ІІ. Основою для визначення механізмів клітинної загибелі нейрональної репарації *in vivo* виступають моделі ІІ.

Для дослідження механізмів клітинної нейрональної альтерациї та репарації використовують близько 10 моделей ІІ, які варіюють за подібністю до ІІ у людини. Проте, найпоширеніша модель фокальної церебральної ішемії – це ендоварскулярна оклюзія середньої мозкової артерії (СМА), яка передбачає введення монофіламентної нитки у просвіт внутрішньої сонної артерії, що блокує кров оплив у СМА [4]. Ця модель характеризується розвитком відтворюваних вогнищ інфаркту в басейні СМА, а також дає змогу дослідникам вивчати ефекти реперфузії на еволюцію зони ішемічного ушкодження. Монофіламентну оклюзію СМА, вперше здійснену J. Koizumi (1986), використовують в багатьох лабораторіях у різних модифікаціях. Вона рекомендована SFES (Society for Experimental Stroke) для проведення