

УДК 616.833.15–091.934–003.93–085:615.357].001.4

## Ремієлінізація зони входу трійчастого нерва під впливом аплікації прогестерону в експерименті

Чомоляк Ю.Ю.

Ужгородський національний університет

Представлені результати експериментального дослідження ремієлінізації корінця трійчастого нерва (ТН) з використанням оригінальної моделі локальної токсичної демієлінізації. Відновлення мієлінової оболонки оцінювали за допомогою світлової, електронної мікроскопії, а також імуногістохімічних методів. При аплікації 2,5% розчину прогестерону на демієлінізовану ділянку ТН відзначене достовірне прискорення відновлення мієлінової оболонки.

**Ключові слова:** невралгія трійчастого нерва, патогенез, стискання нерва судиною, нейроваскулярний конфлікт, ремієлінізація, експеримент.

**Вступ.** Мікроваскулярна декомпресія ТН є методом вибору хірургічного лікування за його невралгії. Розроблений у 60-ті роки минулого століття Р. Jannetta метод передбачає встановлення інертного матеріалу між корінцем ТН, частіше між зоною його входу та судиною, яка стискає цю зону. Незважаючи на абсолютну відсутність больового синдрому через 2 тиж після виконання операції більш ніж у 82% пацієнтів, через 10 років цей ефект спостерігають тільки у 63,5% [5].

За даними численних морфологічних та електрофізіологічних досліджень ТН ключовою ланкою у патогенезі есенціальної невралгії ТН є локальна демієлінізація ділянки його корінця, яка контактує з близько розташованою судиною [1]. Зрозуміло, що наведені ранні післяопераційні результати не пов'язані з ремієлінізацією декомпресованих ділянок ТН. Проте, ці результати, на нашу думку, були б більш стійкими за умови повноцінної ремієлінізації. Адже, результати мікроваскулярної декомпресії ТН у хворих з розсіяним склерозом за недостатньої ремієлінізації набагато гірші в порівнянні з такими у пацієнтів без первинно-демієлінізуючих захворювань [6]. Недостатня (абератна) ремієлінізація, яку інколи спостерігають у препаратах ТН, отриманих після ризотомії, не забезпечує ізоляцію аксонів його корінця після декомпресії і може спричинити рецидиви захворювання [4].

На нашу думку, ефективність мікроваскулярної декомпресії при невралгії ТН можна підвищити шляхом покращання ремієлінізації ділянки нейроваскулярного конфлікту.

Одним з ефектів прогестерону за його впливу на периферійну нервову систему є стимуляція утворення мієлінової оболонки [2, 3], що доведено як *in vitro*, так *in vivo*. Крім того, прогестерон є ефективним стимулятором відновлення мієлінової оболонки пошкодженого нерва. За даними електронної мікроскопії прогестерон-індукована мієлінова оболонка не відрізнялась від такої в інших ділянках нерва. На думку деяких авторів [3], прогестерон, швидше за все, не ініціює процес ремієлінізації, а стимулює його. Незважаючи на очевидний стимулювальний вплив прогестерону на процес ремієлінізації, клінічне використання гормону для покращання регенерації мієлінової оболонки не вивчене.

**Метою** дослідження є визначення стимулювального впливу аплікації 0,1мл 2,5% розчину прогестерону на ремієлінізацію зони входу ТН в експерименті на гвінейських свинках.

**Матеріали і методи дослідження.** План та зміст експериментального дослідження розроблені від-

повідно до українських (наказ МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. «Про заходи з подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин») та міжнародних (Правила проведення робіт з використанням лабораторних тварин, 1977; GLP, 1981; Конвенція Ради Європи про охорону хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях, 1986; Principles and Practice in Ethical Review of Animal Experiments Across Europe, FELASA Report, 2005) стандартів, схвалені етичною комісією Ужгородського національного університету.

Для дослідження використовували статовозрілих гвінейських свинок (*Cavia porcellus*) обох статей масою тіла 200–350 г. Тварини виведені у віварію Ужгородського національного університету. Загальна кількість тварин — 20 за однакової кількості самиць та самців. До групи порівняння включені 10 тварин обох статей.

Для знеболювання використовували 5% розчин кетаміну (Кетамін, Фармак) об'ємом 0,2 мл, який готували під час експерименту і вводили внутрішньом'язово у стегнову ділянку. При необхідності введення повторювали з розрахунку 10 мг кетаміну на 1 год наркозу. Перед розрізом шкіри здійснювали пошарову інфільтрацію ділянки розрізу 2% розчином лідокаїну (Лідокаїн-Дарниця, Україна).

Застосований оригінальний хірургічний доступ до корінця ТН через середню черепну ямку (патент №25050 від 25 липня 2007 р.). Ділянку попереду вушної раковини праворуч після гоління обробляли 70% етиловим спиртом (Спирт етиловий 70%, Дніпропетровська ФФ). Під час експерименту використовували стерильні матеріали та інструменти. Після інфільтрації операційного поля виконували дугоподібний розріз м'яких тканин у правій скронево-тім'яній ділянці навколо вушної раковини. Пошарово розрізали шкіру, підшкірний прошарок, скронева м'яз. Гемостаз здійснювали шляхом тампонування ділянки кровотечі ватними турундами. За допомогою распаторів відділяли м'язи відтім'яної кістки до скроневої лінії.

Для подальших маніпуляцій використовували операційний мікроскоп Carl Zeiss OPMI з збільшенням в 14 разів (Carl Zeiss, Німеччина) та мікроінструменти (Aescular, Німеччина). Трепанцію черепа виконували за допомогою мінідрелі та стоматологічних борів (Татарстанський ЦНТІ, Росія). Тверду оболонку головного мозку розрізали по краю трепанційного вікна паралельно скроневої лінії. Поверхню мозку зволожували ізотонічним розчином натрію

хлориду та вкривали ватними смужками. Після зміщення за допомогою мікрошпателя скронево-потиличної частки медіально проводили аспірацію спинномозкової рідини для полегшення ретракції мозку. Під максимальним збільшенням мікроскопа візуалізували намет мозочка, його вирізку та екстрадуально розташований трійчастий вузол. Для доступу до корінця ТН розрізали намет мозочка мікроскальпелем. В окремих спостереженнях для візуалізації корінця ТН та ділянки його входу у стовбур мозку було достатньо вирізки намету мозочка.

Вплив розчину прогестерону на ремієлінізацію корінця ТН вивчали шляхом хронічного експерименту з використанням власної моделі локальної токсичної демієлінізації 0,1% розчином етидію броміду (висновок про видачу деклараційного патенту, рєсєтраційний номер заявки: u 2007 10235, дата подання заявки: 14.09.2007). На 14-ту добу після встановлення прокладки з 0,1% розчином етидію броміду тварин оперували повторно. Під час операції виявляли прокладку з волокнистого тєфлону та вводили в її товщу 2,5% розчин прогестерону об'ємом 0,1 мл (дослідна група) або нейтральну сезамову олію об'ємом 0,1 мл (контрольна група). Операційну рану зашивали пошарово наглухо. Через 29 діб з моменту індукції демієлінізації (тобто, на 15-ту добу після аплікації прогестерону) тварини дослідної групи і групи порівняння виведені з експерименту. Препарати корінців ТН разом з прилеглими ділянками стовбура мозку та трійчастого вузла досліджували з використанням морфологічних та імуногістохімічних методик.

Після втручання тварин утримували у дерев'яних клітках по 3 особи на одній статі. У клітки потрапляло сонячне світло, підлога вистелена тирсою. Температура повітря становила 19–21°C, відносна вологість — 70–80%. У приміщенні забезпечувалась вентиляція з 10-разовою зміною повітря кожної години. Кожна тварина мала номер та мітку. Доступ до води та корму був вільним. Воду подавали у засоби для смокання. Раціон віварію включав гранульований комбікорм, кашу з м'ясом, сир, хліб та овочі, зокрема, моркву, капусту. Раціон не змінювали протягом всього періоду експерименту. Використовували посуд з нержавіючої сталі.

**Результати та їх обговорення.** Морфологічні дослідження включали світлову та електронну мікроскопію, проведені також імуногістохімічні дослідження. В ділянці впливу на 29-ту добу від початку експерименту без додаткового впливу спостєрігали поновлення типової гістоархітекєтоники корінця ТН. Проте, відзначали дистрофічні зміни аксонів з вогнищевим порушенням цілісності мієлінової оболонки (*рис. 1 кольорової вкладки*), а також щільні мієлінові утворення, які у вигляді краплеподібних включень безладно розташовані в товщі нервового волокна. Визначали великі осміюфільні аксони з напливами нейроплазми, значно виражений інтерстиціальний та периваскулярний набряк (*рис. 2 кольорової вкладки*), в деяких судинах виявляли пристінкові тромби. Відзначене збільшення діаметра осьових циліндрів, поряд з зменшенням діаметра мієлінової оболонки, відносно такого у контролі. Нейролемоцити в основному, були з ознаками морфофункціональної активності, про це свідчила поява в ядрі, заповненому єухроматином, одного великого щільного ядра. Крім того, за даними специфічної імуногістохімічної реакції для визначення проліферативної активності (виявлення

клітин в усіх фазах мієотичного поділу) виявленє нерівномірне й незначне збільшення кількості таких клітин. Індекс мічення специфічним антитілом (ІМ Кі-67) нейролемоцитів становив  $(0,8-1,4) \pm 0,7\%$ . Під час електронмікроскопічного дослідження в цитоплазмі спостєрігали збільшення кількості фіксованих та вільних рибосом, полісомних розеток, а також появу молодих форм мієохондрій (*рис. 3 кольорової вкладки*). Проте, в нервових волокнах утримувалися ознаки фокальних деструктивних змін мієліну й виражені ознаки набряку пери- та ендоневрію. У тварин без додаткової корекції спостєрігали нерівномірність набряку та збереження дистрофічних змін в тканині корінця. Поряд з ділянками, які містять численні клітини і судини, виявляли ділянки з невеликою кількістю клітин і капілярів, пучками колагенових волокон. При імунофєнотипуванні (ІМ Кі-67) виявлено значну проліферативну активність клітин стінки судин (з боку периневрального простору), проте, судинний малюнок дуже нерівномірний, — визначали безсудинні зони.

Під час дослідження зразків нервової тканини після додаткового фармакологічного впливу на корінець ТН встановлено, що гістоархітекєтоника нервових волокон набула фізіологічних співвідношень і на момент дослідження практично відновлена. Спостєрігали значну гієрплазію нейролемоцитів, які оточували осьові циліндри, значне дифузне збільшення їх кількості з вірогідним зростанням їх проліферативного потенціалу та утворенням «клаєтерів» (*рис. 4–6 кольорової вкладки*). ІМ Кі-67 нейролемоцитів становив  $(4,2-5,1) \pm 0,05\%$ . В осьових циліндрах збільшена кількість мієохондрій, переважно молодих форм. В периневральному просторі спостєрігали регенеровані безмієлінові волокна, включені по декілька в цитоплазмі нейролемоцитів.

У сполучній тканині відзначено невелику кількість фіброблаєтів та лаєроцитів. У порівнянні з групою без додаткового впливу суттєво збільшена кількість макрофагів, фіброблаєтів, більшість з яких характеризуються високою функціональною активністю.

Таким чином, в динаміці ремієлінізуючого процесу на тлі корекції з використанням прогестерону тканина корінця ТН і стовбура мозку характеризується зменшенням ступеня демієлінізації, кількості олігодєндрогліоцитів, що гинуть, у вогнищах ураження, покращанням морфофункціонального стану елементів корінця та мозку, зокрема, внаслідок зменшення набряку, нормалізації проникності гематоєнцефалічного та гематонєврального бар'єрів, пристосовно-компєнсаторних механізмів у клітинних елементах (активізація білосинтезуючих функцій) і, як наслідок, активної проліферації нейролемоцитів та клітин стінки судин. За даними морфометричного дослідження встановлено активацію синтезуючої функції олігодєндрогліоцитів, стимуляцію проліферації нейролемоцитів, припинення процесів деструкції та залучення репаративно-регенераторних процесів в ресинтезі мієлінових оболонок корінця (*див. таблицю*).

**Висновки.** 1. Мієцеве використання 0,1 мл 2,5% розчину прогестерону не впливає на життєдіяльність статевозрілих гвінейських свинок протягом 15 діб після експерименту.

2. За даними морфологічних досліджень (світлова та електронна мікроскопія, імуногістохімія) не вста-

**Таблиця. Зміни співвідношення площі осевих циліндрів та мієлінового нервового волокна**

Умови досліджу	Структура	Співвідношення площі осевого циліндра і мієлінової оболонки (M±m)
Контроль	Стовбур	0,37±0,006
	Корінець	0,38±0,007*
Демієлінізація	Стовбур	0,62±0,01*
	Корінець	1,39±0,07
Ремієлінізація без прогестерону	Стовбур	0,43±0,007*
	Корінець	0,54±0,01*
Ремієлінізація з розчином прогестерону	Стовбур	0,37±0,009Δ
	Корінець	0,37±0,01Δ

*Примітка.* Різниця показників достовірна у порівнянні з такими: \* — у контролі; Δ — при ремієлінізації без прогестерону.

новлено системне пошкодження тканини головного мозку тварин на тлі аплікації прогестерону.

3. За місцевого застосування прогестерону достовірно зменшується співвідношення площі осевого циліндра і мієлінового нервового волокна у тварин дослідної групи тканин у порівнянні з такими у контролі.

4. Застосування 2,5% розчину прогестерону сприяє достовірному прискоренню ремієлінізації корінця ТН в експериментальних тварин.

#### Список літератури

- Hilton et al. Pathological findings associated with trigeminal neuralgia caused by vascular compression // *Neurosurgery*. — 1994. — V.35, N2. — P.299–303.
- Koenig H.L., Gong W.H., Pelissier P. Role of progesterone in peripheral nerve repair // *Reviews of Reproduction*. — 2000. — V.5. — P.189–199.
- Koenig H.L., Schumacher M., Ferzaz B. et al. Progesterone

synthesis and myelin formation by schwann cells // *Science*. — 1995. — V.268. — P.1500–1502.

- Love S., Coakham H.B. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis // *Brain*. — 2001. — V.124, N12. — P.2347–2360.
- Lovely T., Jannetta P. Microvascular decompression for trigeminal neuralgia. Surgical technique long-term results // *Neurosurg. Clin. N. Am.* — 1997. — V.8, N1. — P.11–29.
- Resnick D., Jannetta P., Lunsford D. Microvascular decompression for trigeminal neuralgia in patients with multiple sclerosis // *Surg. Neurol.* — 1996. — V.46. — P.358–362.

#### Ремієлінізація зони входу трійничного нерва под впливом аплікації прогестерона в експерименте Чомоляк Ю.Ю.

Представлены результаты экспериментального исследования ремиелинизации корешка тройничного нерва с использованием оригинальной модели локальной токсической демиелинизации. Восстановление миелиновой оболочки оценивали с помощью световой и электронной микроскопии, а также иммуногистохимических методов. При аплікації 2,5% раствора прогестерона на демиелинизированный участок нерва отмечено достоверное ускорение восстановления миелиновой оболочки.

#### Influence of progesterone application on trigeminal nerve root-entry zone remyelination in experiment Chomolyak Yu.Yu.

The results of trigeminal nerve root-entry zone remyelination experimental study are presented. Original experimental model of trigeminal nerve root focal toxic demyelination was used. The assessment of trigeminal nerve root remyelination was done using electron microscopy and immunohistochemistry. It is identified, that local progesterone application at demyelination part of trigeminal nerve increased remyelination.

#### Комментарий

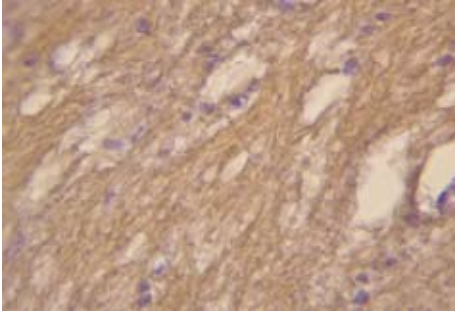
к статье Ю.Ю. Чомоляка «Ремієлінізація зони входу трійчастого нерва під впливом аплікації прогестерону в експерименті»

На основании многолетних дискуссий по проблемам патогенеза эссенциальной невралгии тройничного нерва (ТН) создана доминирующая теория, согласно которой одним из основных факторов возникновения этого заболевания является демиелинизация участка, контактирующего с кровеносным сосудом. Поэтому, несмотря на высокую эффективность микровазкулярной декомпрессии ТН, возможности патогенетически обоснованного лечения этой патологии не исчерпаны, а исследования, посвященные ее изучению, актуальны. В исследованиях последних лет установлено, что регенерация периферических нервных волокон активизируется под влиянием прогестерона. Аналог прогестерона синтезируется в нервной системе и, будучи, нейростероидом, влияет на ремиелинизацию. Изучение местного применения прогестерона во время микровазкулярной декомпрессии ТН, без сомнения, является перспективным направлением научной работы.

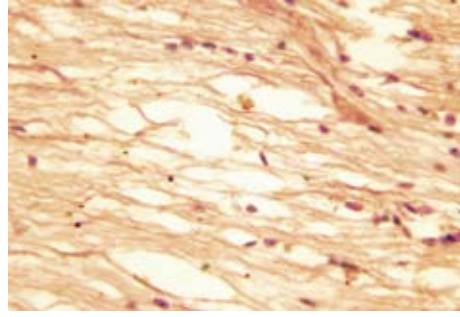
Автором уделено значительное внимание экспериментальному моделированию процессов де- и ремиелинизации. Результаты местного использования прогестерона во время микрохирургического вмешательства в эксперименте дали возможность обосновать целесообразность проведения и направление будущих исследований. С использованием разработанной автором экспериментальной модели сегментарной демиелинизации корешка ТН гвинейской свинки изучено влияние различных факторов на ремиелинизацию. На основании морфологических (в т.ч. иммуногистохимических) методов исследования автору удалось установить влияние прогестерона на ремиелинизацию корешка ТН. Аплікація 2,5% раствора прогестерона на демиелинизированный участок активно влияет на восстановление миелиновой оболочки. Подтверждение стимулирующего влияния 2,5% раствора прогестерона на ремиелинизацию ТН в эксперименте даст возможность начать фундаментальное исследование по обоснованию использования этого гормона у больных с невралгией ТН во время выполнения хирургического вмешательства.

А.Т. Носов, профессор  
руководитель лаборатории электронной микроскопии  
Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины

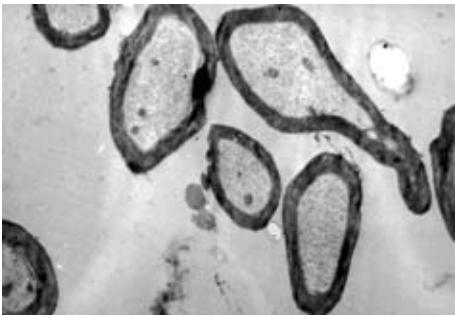
*До статті Чомоляка Ю.Ю. «Ремієлінізація зони входу трійчастого нерва під впливом аплікації прогестерону в експерименті»*



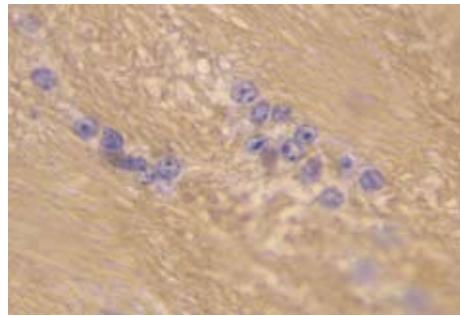
*Рис. 1.* Мікрофото. 29-та доба. Ремієлінізація без додаткового впливу. Зона корінця ТН. Виражений набряк ендоневрію з розширенням ендоневральних просторів, мієлінових оболонок, набряк аксонів. Фокальна демієлінізація (колосоподібні структури). Забарвлення суданом III. 36.×400.



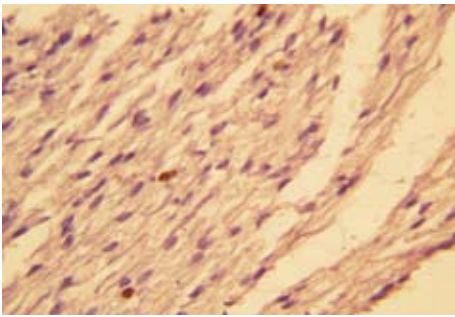
*Рис. 2.* Мікрофото. 29-та доба. Ремієлінізація без додаткового впливу. Корінець ТН. Імунонегативна реакція при імунофенотипуванні з антитілами Ki-67. Збережений набряк. Імунофенотипування з антитілами Ki-67. 36.×400.



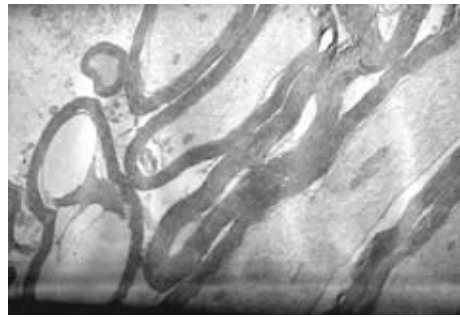
*Рис. 3.* Електронограма. 29-та доба. Ремієлінізація без додаткового впливу. Стовбур мозку. Набряк тканини, розширення міжаксональних просторів. Тонкі (відносно контролю) осміюфільні мієлінові оболонки навколо окремих аксонів. Поява дрібних осміюфільних мітохондрій за своєю просторовою орієнтацією структур аксоплазми. 36.×8000.



*Рис. 4.* Мікрофото. 29-та доба. Ремієлінізація з додатковим впливом. Корінець ТН. Значне збільшення кількості нейролемоцитів, розташування їх ланцюжками — утворення кластерів (5–7 клітин). В ядрах нейролемоцитів чітко контуруються численні ядрця. Забарвлення суданом III. 36.×800.



*Рис. 5.* Мікрофото. 29-та доба. Ремієлінізація з додатковим впливом. Корінець ТН. Збільшення кількості нейролемоцитів. Імунопозитивні проліферуючі нейролемоцити. Імунофенотипування з Ki-67. 36.×400.



*Рис. 6.* Електронограма. 29-та доба. Ремієлінізація з додатковим впливом. Корінець ТН. Впорядкованість мієлінових оболонок, поява дрібних осміюфільних мітохондрій, своєрідна просторова орієнтація структур аксоплазми. 36.×8000.