

STEREOLOŠKA ANALIZA NERNVIH ĆELIJA EKSTRAOKULARNIH MOTORNIH JEDARA

STEREOLOGICAL ANALYSIS OF NEURONS OF EXTRAOCULAR MOTOR NUCLEI

Igor Sladojević, Zdenka Krivokuća, Tatjana Bućma, Vesna Gajanin

Sažetak. Neuroni ekstraokularnih motornih jedara (*nucleus nervi oculomotorii principalis*, *nucleus nervi trochlearis* et *nucleus nervi abducentis*) su zaobljeni multipolarni, rjeđe fuziformni ili ovalni motoneuroni, bljedog jedra i nepravilno raspoređenih Nisslovih tjelašaca. Cilj rada je da se odrede stereološki parametri neurona ekstraokularnih motornih jedara (volumenska i površinska gustina, i apsolutni broj po mm^2 površine). Istraživanje je obavljeno na 30 moždanih stabala čovjeka, oba pola, bez dijagnostikovanih neuroloških oboljenja, stratificiranim prikupljanjem uzoraka u transverznoj ravni. Semiserijski parafinski rezovi (debljine $0,3 \mu\text{m}$) su bojeni Mallory metodom. Uz korišćenje mikroskopa na histološkim presjecima su identifikovana ekstraokularna motorna jedra i pomoću digitalne kamere slikano je intermitentno svako drugo vidno polje pod uvećanjem 400x. Dobijene slike su analizirane pomoću programa ImageJ, verzija 1.42e (National Institutes of Health, Bethesda, USA) uz korišćenje testnog sistema A 100. Statistička analiza je obavljena uz upotrebu programa SPSS (verzija 16.0) uz nivo značajnosti razlike od 5%. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postojala je u volumenskoj i površinskoj gustini, i apsolutnom broju neurona po mm^2 površine između *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi trochlearis*. Između *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi abducentis* statistički značajna razlika postoji u volumenskoj gustini, dok se između *nc.nervi trochlearis* i *nc.nervi abducentis* razlika pronalazi u vrijednosti površinske gustine i apsolutnog broja neurona po mm^2 površine.

Cljučne riječi: Neuroni, Ekstraokularna motorna jedra, Stereologija

Uvod

Ekstraokularna motorna jedra (*nucleus nervi oculomotorii principalis*, *nucleus nervi trochlearis* et *nucleus nervi abducentis*) pripadaju nizu opštih somatskih eferentnih jedara [1] i sadrže motoneurone i internuklearne neurone, koji su dio kruga koji koordiniše očne pokrete [2]. Opisujući motoneurone koji grade ova jedra, Olszewski i Baxter [3] navode da su oni, iako slični onima u ostalim somatomotornim nukleusima, manji i svjetlije obojeni, a Nisslove granule su manje i nepravilno položene.

Motoneuroni u *nucleus nervi oculomotorii principalis* su multipolarni, rjeđe fuziformni i ovalni neuroni sa bljedim jedrom [4,5], nepravilno

orjentisani i kompaktnije raspoređeni u kaudalnoj trećini jedra.

Nucleus nervi trochlearis gradi 3 do 40 nepravilno raspoređenih multipolarnih neurona [3] srednje veličine [6], čiji je broj na pojedinim presjecima varijabilan [7]. Neuroni u ovom jedru gotovo po pravilu formiraju male grupe, a uočava se i heterogenost oblika ćelija sa dominacijom poligonalnog izgleda [7].

U *nucleus nervi abducentis* se nalazi populacija neurona heterogene veličine i oblika perikariona (poli-gonalni, ovalni, vretenasti i okrugli neuroni), a na bazi karakteristika arborizacije dendrita, na Golgi-Cox bojenom materijalu su identifikovana dva tipa nernvih ćelija: multipolarne i fuziformne [8].

Cilj rada bio je da se odrede stereološki parametri neurona ekstraokularnih motornih jedara (volumenska gustina, površinska gustina, i apsolutni broj po mm² površine).

Materijal i metode

Ispitivanje je obavljeno na 30 mozgova odraslih lica oba pola (11 žena i 19 muškaraca), starosti od 21 do 83 godine života (prosječna starost 57,07 godina), koji su umrli bez dijagnostikovanih neuroloških oboljenja. Materijal je prikupljen u Službi za patološku anatomiju Opšte bolnice u Doboju i u Zavodu za patologiju Kliničkog centra u Banjoj Luci. Uobičajenom obdukcijom tehnikom mozgovu su vađeni iz kranijalne duplje, a zatim potapani u 10% rastvor formalina, gdje su fiksirani.

Glavni ciljevi stereološke analize su da se iz presjeka odrede trodimenzionalni oblici, zapremine i zapreminski odnosi, površine i površinsko-zapreminski odnosi, veličina raspodjele čestica, broj čestica u jedinici zapremine i dužine zakrivljenih linearnih elemenata [9].

Za izvođenje stereološke analize bilo je potrebno napraviti histološke preparate ispitivanih struktura. Da bi došli do uzoraka ekstraokularnih motornih jedara, nakon fiksacije su odvajani moždano stablo od prednjeg mozga, presjecanjem moždanih masa u nivou zadnje ivice bradavičastih tijela (*corpora mamillaria hypothalami*) i malog mozga, presjecanjem krakova malog mozga (*pedunculi cerebellares superior, medius et inferior*). Potom su moždana stabla rezana u tri stratuma u transverzalnoj ravni (debljine 3 mm: stratificirano prikupljanje uzoraka), i to prema kaudalno od nivoa:

1. sredine gornjih kvržica mezencefalona (*nucleus nervi oculomotorii principalis*),
2. kaudalne granice gornjih kolikula mezencefalona (*nucleus nervi trochlearis*) i
3. donje ivice facijalnih kvržica (*nucleus nervi abducentis*) [10].

Od dobijenih stratuma pravljene su semiserijski rezovi (za *nucleus nervi oculomotorii principalis* i *nucleus nervi abducentis*: 5, 10, ..., 100; za *nucleus nervi trochlearis*: 5, 10, ..., 120, debljine 0,3 μm, koji su bojeni Mallory metodom. Referentni prostor istraživanja u svim slučajevima su bila ekstraokularna motorna jedra, a proučavana faza nervne ćelije.

Fotografije objekata istraživanja su slikane pomoću kamere "Leica" EC3 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany), RGB formata, 24-bitne, rezolucije 2.048 x 1.536 piksela, pri povećanju 400x svjetlosnog mikroskopa "Leica" DM 1000 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany). Pri izboru uzoraka korišćeno je svako drugo polje, a veličina uzoraka, tj. potreban broj mjerenja za svaku varijablu i za svaku grupu određivan je prema De Hoffovoj formuli [11]:

$$n=(200/y \cdot s/\bar{x})^2$$

n - broj polja koje treba analizirati;

\bar{x} - aritmetička sredina orijentacijskog uzorka;

s - standardna devijacija orijentacijskog uzorka;

y - dopušteno odstupanje od rezultata aritmetičke sredine.

Za stereološku analizu korišćen je program ImageJ, verzija 1.42e (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Prije analize urađena je specijalna kalibracija pomoću objektnog mikrometra, a potom su određeni parametri testnog sistema A 100 na osnovu kojih je, uz pomoć opcije "mreža" (*engl. grid*) formiran mrežasti test sistem A 100 (tabela 1).

Tabela 1. Osnovni parametri testnog sistema

Parametar	A 100 (objektiv 40x)
Pt	100
d	0,020386 mm
Lt	4,0772 mm
At	0,04156 mm ²

Pt - broj tačaka testnog sistema;

d - dužina jedne linije testnog sistema;

Lt - dužina testnih linija;

At - površina testnog područja;

$$Lt=P_t \cdot d \cdot 2 \quad At=P_t \cdot d^2$$

Nakon postavljanja mrežastog testnog sistema, slika je analizirana uz pomoć alatke za brojanje ćelija. Za analizu neurona korišćene su sljedeće stereološke varijable: volumenska gustina, površinska gustina i apsolutni broj po mm² površine. Za pomenuta ispitivanja upotrebene su konvencionalne stereološke procedure [12-14]. Broj ispitanih testnih polja za svako ispitivano jedro je prikazan u tabeli 2.

Za izračunavanje volumenske gustine (V_v), koja pokazuje koliki dio ukupnog prostora pripada proučavanoj fazi, korišćena je formula [11]:

$$V_v=P_f/P_t \text{ (mm}^0\text{)}$$

P_f - broj pogodaka testnih tačaka koje padaju na proučavanu fazu;

P_t - ukupan broj tačaka unutar referentnog sistema A-100.

Tabela 2. Broj ispitanih testnih polja za svaku ispitivanu strukturu

Nukleus	Broj ispitanih testnih polja
<i>Nc.nervi oculomotorii principalis</i>	2.060
<i>Nc.nervi trochlearis</i>	2.354
<i>Nc.nervi abducentis</i>	2.080

Drugi ispitivani parametar, površinska gustina (Sv), ukazuje kolika je veličina neke određene unutrašnje ili spoljašnje površine u jedinici zapremine. Određivana je na osnovu formule [9,11]:

$$Sv=2 \cdot If/Lt \text{ (mm}^{-1}\text{)}$$

If - broj presjeka ocrta ispitivane faze sa testnim linijama;
Lt - ukupna dužina testnih linija.

Apsolutni broj neurona po mm² površine (Nf) izračunavan je pomoću formule:

$$Nf=N/At$$

N - broj neurona unutar testnog sistema;
At - površina testnog sistema.

Statistička analiza dobijenih rezultata je urađena pomoću programa SPSS, verzija 16.0. Upotrebom Studentovog *t*-testa poređene su međusobno vrijednosti ispitivanih stereoloških parametara neurona ekstraokularnih motornih jedara. Statistička značajnost je ispitivana za nivo značajnosti razlike od 5%.

Rezultati

Najveću vrijednost volumenske gustine imali su neuroni u *nc.nervi oculomotorii principalis*, potom u *nc.nervi abducentis*, a najmanja vrijednost je uočena kod neurona u *nc.nervi trochlearis* (tabela 3).

Tabela 3. Vrijednosti volumenske gustine (Vv) nervnih ćelija ekstraokularnih motornih jedara

Vv nervnih ćelija	$\bar{x} \pm SE \text{ (mm}^0\text{)}$
<i>Nc.nervi oculomotorii principalis</i>	0,05829 ± 0,00094
<i>Nc.nervi trochlearis</i>	0,04720 ± 0,00350
<i>Nc.nervi abducentis</i>	0,05159 ± 0,00127

Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji između volumenskih gustina neurona u *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi trochlearis*, kao i između volumenskih gustina neurona *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi abducentis*.

Slično volumenskoj, i površinska gustina neurona je bila najveća u *nc.nervi oculomotorii principalis*, potom u *nc.nervi abducentis*, a najmanja u *nc.nervi trochlearis* (tabela 4).

Tabela 4. Vrijednosti površinske gustine (Sv) nervnih ćelija ekstraokularnih motornih jedara

Sv nervnih ćelija	$\bar{x} \pm SE \text{ (mm}^{-1}\text{)}$
<i>Nc.nervi oculomotorii principalis</i>	10,16710 ± 0,24879
<i>Nc.nervi trochlearis</i>	8,51018 ± 0,28525
<i>Nc.nervi abducentis</i>	9,53421 ± 0,24501

Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji između površinskih gustina neurona *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi trochlearis*, odnosno između *nc.nervi trochlearis* i *nc.nervi abducentis*.

I treći određivani parametar, apsolutni broj neurona po mm², pokazao je iste odnose među neuronima ekstraokularnih motornih jedara, odnosno najveća vrijednost je zabilježena kod *nc.nervi oculomotorii principalis*, potom kod *nc.nervi abducentis*, dok se najmanji broj neurona nalazi u *nc.nervi trochlearis* (tabela 5).

Tabela 5. Vrijednosti apsolutnog broja (Nf) neurona ekstraokularnih motornih jedara po mm²

Apsolutni broj neurona (Nf) po mm ²	$\bar{x} \pm SE$
<i>Nc.nervi oculomotorii principalis</i>	103,3047 ± 3,3061
<i>Nc.nervi trochlearis</i>	86,9429 ± 2,9671
<i>Nc.nervi abducentis</i>	95,1506 ± 2,1781

Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postoji u apsolutnom broju neurona po mm² između *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi trochlearis*, odnosno između *nc.nervi trochlearis* i *nc.nervi abducentis*.

Rasprava

U dostupnoj literaturi malo je podataka o kvantifikaciji histoloških elemenata ekstraokularnih motornih jedara. Oni se uglavnom odnose na dimenzije ispitivanih jedara i ćelija koje ih grade [3-6], dok se stereološki podaci ne nalaze. S druge strane, opisana su brojna oboljenja koja izazivaju promjene na ćelijama ekstraokularnih motornih jedara, što dovodi do određenih kliničkih simptoma [15-28].

U ovdje prikazanom istraživanju proučavani su stereološki parametri nervnih ćelija ekstraokularnih motornih jedara. Vrijednosti sva tri ispitivana parametra: volumenske gustine, površinske gustine i apsolutnog broja neurona po mm², bile su najveće kod *nc.nervi oculomotorii principalis*, nešto manje kod *nc.nervi abducentis*, a najmanje kod *nc.nervi trochlearis*. Poređenje vrijednosti dobijenih stereoloških parametara je pokazalo da postoji statistički značajna razlika u volumenskoj gustini, površinskoj gustini i apsolutnom broju neurona po mm² između *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi trochlearis*. Rezultati istraživanja Marinkovića i saradnika [5] su pokazala da je prosječna veličina ćelije u *nc.nervi oculomotorii principalis* 40 x 26 µm, dok prosječna veličina neurona u *nc.nervi trochlearis* iznosi 30,7 x 21,2 µm [7]. Cayala i saradnici [6] navode da *nc.nervi oculomotorii principalis* sadrži veći broj neurona u odnosu na *nc.nervi trochlearis*. Navedeno potvrđuju i rezultati ovdje prikazanog istraživanja. Detaljnije analize *nc.nervi trochlearis* su pokazale da se u ovom jedru, prosječnih dimenzija 0,7 x 0,5 mm nalazi od 21,7 do 22,7 neurona [7], što je manje u odnosu na ovdje prikazane rezultate. Veći, gušći i brojniji neuroni u *nc.nervi oculomotorii principalis* mogli bi biti posljedica toga, što ovo jedro inervise najveći broj mišića (svi ekstraokularni mišići, osim *musculus rectus lateralis* i *musculus obliquus superior* i *musculus levator palpebrae superioris*) [29]. Neuroni *nc.nervi oculomotorii principalis* i *nc.nervi abducentis* su se statistički značajno razlikovali u volumenskoj gustini. Između nervnih ćelija *nc.nervi trochlearis* i *nc.nervi abducentis* razlika se pronalazi u vrijednostima površinske gustine i apsolutnog broja neurona po mm². Moguće objašnjenje za razliku u apsolutnom broju nervnih ćelija je da, osim motoneurona, u jedru *n.abducens* postoje još dvije populacije neurona: internuklearni neuroni [30,31] i neuroni paramedijanog trakta [32].

Zaključak

Postoje kvantitativne razlike u nervnim ćelijama ekstraokularnih motoneurona.

Nucleus nervi oculomotorii principalis ima najveće i najgušće raspoređene neurone, dok su neuroni *nucleus nervi abducentis* nešto manjih dimenzija.

Nervne ćelije *nucleus nervi trochlearis* su najmanje po broju i dimenzijama među neuronima ekstraokularnih motornih jedara.

Literatura

1. Krmpotić Nemanic J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada, 2004: 477-81.
2. Kiernan JA, Barr ML. Barr's The Human Nervous system: An Anatomical Viewpoint. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 125.
3. Olszewski J, Baxter D. Cytoarchitecture of the Human Brain Stem. Basel: Karger, 1982: 82, 93-5.
4. Donzelli R, Marinkovic S, Brigante L, Nikodijevic I, Maiuri F, de Divitiis O. The oculomotor nuclear complex in humans. Microanatomy and clinical significance. Surg Radiol Anat. 1998; 20: 7-12.
5. Marinković S, Marinković Z, Filipović B. The oculomotor nuclear complex in humans. Microanatomy and clinical significance. Neurologija. 1989; 38: 135-46.
6. Cajal SRy, Pasik P, Pasik T. Texture of the nervous system of man and the vertebrates. New York: Springer, 2000: 193, 547.
7. Marinković S, Đorđević Z, Puškaš L, Milisavljević M, Stanković G. Jedro trochlearnog živca čoveka. Acta Medica Medianae 1990; 3: 79-87.
8. Bianchi R, Rodella L, Rezzani R, Gioia M. Cytoarchitecture of the abducens nucleus of man: a Nissl and Golgi study. Acta Anat (Basel). 1996; 157: 210-6.
9. Gudović R, Matavulj M, Stefanović N, Lozanov Crvenković Z. Osnovi stereologije. Folia Anatomica 1994; 21/22: 1-25.
10. Haines DE, Lancon JA. Neuroanatomy: An atlas of structures, sections and systems. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 137.
11. Kališnik M. Temelji stereologije. Acta Stereologica 1985; 4 (Suppl. 1): S1-148.
12. Bogataj M, Kališnik M. Matematične osnove stereologije. Stereol Jugosl. 1978; 1: 157-68.
13. Čepar D. Statistično izvrednotenje stereoloških meritev z računalnikom. Stereol Jugosl. 1978; 1: 207-30.
14. Durst Živković B. Stereologija u Jugoslaviji. Stereol Jugosl. 1980; 2: 117-27.
15. Sargent JC. Nuclear and infranuclear ocular motility disorders. In: Miller NR, Newman NJ, editors. Walsh & Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 973-1016.
16. Hejtmancik JF, Fitz Gibbon EJ, Caruso RC. Extraocular motor nuclei. In: Conn MP, editor.

- Neuroscience in medicine. New York: Humana Press, 2008: 556-69.
17. Işıkay CT, Yücesan C, Yücemem N, Culcuoglu A, Mutluer N. Isolated nuclear oculomotor nerve syndrome due to mesencephalic hematoma. *Acta Neurol Belg.* 2000; 100: 248-51.
 18. Wray SH. Neuro-ophthalmologic diseases. In: Rosenberg RN, editor. *The clinical neurosciences.* New York: Churchill Livingstone, 1983; 824.
 19. Martin TJ, Corbett JJ, Babikian PV, Crawford SC, Currier RD. Bilateral ptosis due to mesencephalic lesions with relative preservation of ocular motility. *J Neuroophthalmol.* 1996; 16: 258-63.
 20. Chou TM, Demer JL. Isolated inferior rectus palsy caused by a metastasis to the oculomotor nucleus. *Am J Ophthalmol.* 1998; 126: 737-40.
 21. Martin PJ, Chang HM, Wityk R, Caplan LR. Midbrain infarction: associations and aetiologies in the New England Medical Center Posterior Circulation Registry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; 64: 392-5.
 22. Caplan LR, Zervas NT. Survival with permanent midbrain dysfunction after surgical treatment of traumatic subdural hematoma: the clinical picture of a Duret hemorrhage? *Ann Neurol.* 1977; 1: 587-9.
 23. Pratt DV, Orenga-Nania S, Horowitz BL, Oram O. Magnetic resonance imaging findings in a patient with nuclear oculomotor palsy. *Arch Ophthalmol.* 1995; 113: 141-2.
 24. Thömke F. Brainstem diseases causing isolated ocular motor nerve palsies. *Neuro-Ophthalmol.* 2004; 28: 53-67.
 25. Coppeto JM, Lessell S. Cryptogenic unilateral paralysis of the superior oblique muscle. *Arch Ophthalmol.* 1978; 96: 275-7.
 26. Moncayo J, Bogousslavsky J. Vertebro-basilar syndromes causing oculo-motor disorders. *Curr Opin Neurol.* 2003; 16: 45-50.
 27. Miller NR, Biousse V, Hwang T, Patel S, Newman NJ, Zee DS. Isolated acquired unilateral horizontal gaze paresis from a putative lesion of the abducens nucleus. *J Neuroophthalmol.* 2002; 22: 204-7.
 28. Riordan-Eva P, Foyt WF. Neuro-ophthalmology. In: Riordan-Eva P, Whitcher JP, editors. *Vaughan & Asbury's General Ophthalmology.* New York: McGraw-Hill, 2007: 259-303.
 29. Carpenter MB, Sutin J. *Human Neuroanatomy.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1983: 415, 427.
 30. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Fergusson MWJ. *Gray's anatomy.* London: Churchill Livingstone, 1995: 1227-30, 1240-41.
 31. Ehrenhaus MP. Abducens nerve palsy. Dostupno na: <http://www.emedicine.com/oph/topic158.htm>. Last updated: October 9, 2003.
 32. Koutcherov Y, Huang XF, Halliday G, Paxinos G. Organization of human brain stem nuclei. In: Paxinos G, Mai JK, editors. *The Human Nervous System.* San Diego: Elsevier; 2004: 273-321.

Summary. *Neurons of extraocular motor nuclei (nucleus nervi oculomotorii principalis, nucleus nervi trochlearis et nucleus nervi abducentis) are rounded multipolar, rarely fusiform or oval motoneurons, with pale nucleus and irregularly placed Nissl bodies. The aim of the work was to establish stereological parameters of the extraocular motor nuclei neurons (volume and surface density, and absolute number per mm²). The research was performed on 30 human brainstems, of both males and females, without diagnosed neurological diseases, by stratified collection of samples in transversal plane. Semiserial paraffin cuts (0.3 µm thick) were stained by the Mallory method. By means of a microscope, extraocular motor nuclei were identified on the histological cuts and every second visual field was photographed intermittently with digital camera, under the 400x magnification. Obtained photographs were analyzed by means of the ImageJ software, version 1.42e (National Institutes of Health, Bethesda, USA), using the A 100 test system. Statistical analysis was performed by using SPSS program (version 16.0) with the difference significance level of 5%. Statistically significant difference (p<0.05) existed in volume and surface density and absolute number of neurons per mm² between nc.nervi oculomotorii principalis and nc.nervi trochlearis. Between the nc.nervi oculomotorii principalis and nc.nervi abducentis, a statistically significant difference existed in volume density, while between the nc.nervi trochlearis and nc.nervi abducentis, the difference was found in the surface density value and absolute number of neurons per mm².*

Key words: *Neurons, Extraocular motor nuclei, Stereology*

Igor Sladojević, Zdenka Krivokuća, Tatjana Bućma, Vesna Gajanin,

Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci