

УДК: 616.831+617.735 – 002: 616 – 001.28

П. Федірко<sup>1</sup>✉, М. Пильмане<sup>2</sup>, Т. Бабенко<sup>1</sup>, В. Конопечка<sup>2</sup><sup>1</sup>Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, м. Київ, 04050, Україна<sup>2</sup>Інститут анатомії та антропології Ризького університету Страдзінша, вул. Дзірчієма 16, Рига, LV 1007, Латвія

## ГОЛОВНИЙ МОЗОК ТА ОРГАН ЗОРУ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МІШЕНІ ДЛЯ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ. ЧАСТИНА IV – РОЗЛАДИ БІНОКУЛЯРНОГО ЗОРУ ПЛОДА, СПРИЧИНЕНІ РАДІАЦІЙНИМ ВПЛИВОМ IN UTERO: ПІЛОТНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ. ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ЗМІНИ НЕОПРОМІНЕНИХ М'ЯЗІВ ОЧНОГО ЯБЛУКА ПРИ КОСООКОСТІ. МОЖЛИВИЙ МЕХАНІЗМ РОЗВИТКУ КОСОКОСТІ В ОСІБ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ПРЕНАТАЛЬНОГО ОПРОМІНЕННЯ

Косоокість – вагома причина зниження функціональних можливостей органа зору і погіршення якості життя пацієнтів. Можливий механізм патогенезу косоокості включає орбітальні фактори і зміни нервової системи. Повідомлення про порушення бінокулярного зору у радіаційно опромінені особи нечисленні. Функції зовнішніх м'язів очного яблука можуть бути порушені внаслідок зміни координаційного процесу підкіркових нервових структур і внаслідок зміни метаболізму. Для з'ясування можливого патогенезу розладів бінокулярного зору у осіб, які зазнали опромінення, необхідні ретельні дослідження.

**Мета:** оцінити особливості розвитку косоокості та порушень бінокулярного зору в осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання у внутрішньоутробному періоді; дослідити зміни у розподілі та появі міозину, дистрофіну та колагену IV між неопроміненими особами з бінокулярним зором та особами, що страждають на косоокість.

**Матеріали та методи.** Обстежено 583 особи, які отримали внутрішньоутробне опромінення внаслідок Чорнобильської катастрофи; їхній середній вік на момент обстеження становив  $(11,3 \pm 0,1)$  років. Групу порівняння склали 808 осіб, мешканців м. Києва. Паралельно було досліджено 15 зразків м'язів очного яблука неопромінених осіб, з яких 10 осіб страждали на косоокість і 5 належали до контрольної групи. Для оцінки морфологічної структури використовували забарвлення гематоксилін-еозином. Для виявлення міозину, дистрофіну та колагену IV застосували біотин-авідиновий (biotin-avidin (ІМН)) імуногістохімічний метод. Для оцінки зовнішнього вигляду імунореактивних структур та їх локального розподілу використовували напівкількісний метод градування.

**Результати.** У групі внутрішньоутробно опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи осіб виявлено підвищену, у зіставленні з групою порівняння, частоту розбіжної косоокості ( $p = 0,04190$ ) та гетерофорії ( $p = 0,002603$ ). Відносний ризик гетерофорії склав 5,08 (1,42–18,13). У неопромінених м'язах очного яблука, уражених косоокістю, спостерігалось зниження рівня дистрофіну, міозину та колагену IV позитивних структур порівняно з контрольною групою.

**Висновки.** Виявлені зміни вказують на підвищену ймовірність розвитку косоокості в осіб, які зазнали внутрішньоутробного опромінення. М'язи очного яблука, уражені косоокістю у неопромінених осіб, характеризуються зниженням імуногістохімічних структур міозину, дистрофіну та колагену IV. Якісні морфологічні зміни в скелетних поперечносмугастих м'язових волокнах, зміни структурної організації, вказують на можливу м'язову дистрофію. Таким чином, наявність дистрофічних процесів у м'язах очного яблука може відігравати істотну роль

✉ Федірко Павло Андрійович, e-mail: eye-rad@ukr.net

у морфопатогенезі косоокості. Для уточнення розвитку порушень бінокулярного зору та методів їх корекції необхідні подальші морфологічні дослідження. Ці дослідження будуть особливо важливі для населення, яке зазнало впливу радіації.

**Ключові слова:** внутрішньоутробне опромінення, іонізуюче випромінювання, косоокість, м'язи очного яблука, гістохімічні дослідження, патогенез.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2022. Вип. 27. С. 412–422. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-412-422*

P. Fedirko<sup>1</sup>✉, M. Pilmane<sup>2</sup>, T. F. Babenko<sup>1</sup>, V. Konopecka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka St., Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradins University, 16 Dzirciema St., Riga, LV 1007, Latvia

## BRAIN AND EYE AS POTENTIAL TARGETS FOR IONIZING RADIATION IMPACT. PART IV – FETAL RADIATION-INDUCED BINOCULAR VISION DISORDERS: A PILOT STUDY. IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES OF NON-IRRADIATED EYEBALL MUSCLES AFFECTED BY STRABISMUS. EVIDENCE OF A POSSIBLE MECHANISM OF THE STRABISMUS DEVELOPMENT IN PERSONS EXPOSED TO FETAL RADIATION

Strabismus is a significant cause of a decrease in the functional capabilities of the organ of vision, additionally, it leads to the deteriorating quality of life. Orbital factors and nervous system changes may play an important role in strabismus pathogenesis. There are few reports on binocular vision disorders in radiation-exposed persons. Functions of the external eyeball muscles might be disturbed based on the changed coordination process of subcortical nerve structures and due to altered metabolism. A carefully conducted research is necessary to clarify the possible pathogenesis of binocular vision disorders in radiation-exposed persons.

**Objective:** to assess the peculiarities of the development of strabismus and binocular vision disorders in people who were exposed to ionizing radiation *in utero*; to investigate the changes in distribution and appearance of myosin, dystrophin, and collagen IV between non-irradiated persons with normal binocular vision and patients with strabismus.

**Materials and methods.** 583 persons, irradiated in utero because of the Chernobyl disaster were examined (at the time of examination average age was  $11.3 \pm 0.1$  years). The control group – 808 people – Kyiv residents. Overall, 15 non-irradiated eyeball muscle samples were examined. 10 were from strabismus patients and 5 were controls. To evaluate morphological structure haematoxylin and eosin staining were used. For the detection of myosin, dystrophin, and collagen IV biotin-avidin (IMH) immunohistochemistry method was performed. Semi-quantitative grading method was used for the evaluation of immunoreactive structure appearance and local distribution.

**Results.** An increased frequency of divergent strabismus ( $p = 0.04190$ ) and heterophoria ( $p = 0.002603$ ) was found in the group exposed to prenatal (fetal) radiation because of the Chernobyl disaster compared to the control group. The relative risk of heterophoria was 5.08 (1.42 – 18.13). A decrease in dystrophin, myosin, and collagen IV positive structures was observed in non-irradiated strabismus-affected eyeball muscles compared to the control group.

**Conclusions.** Detected changes indicate an increased probability in the development of strabismus in persons who had been exposed to fetal radiation. Non-irradiated strabismus-affected eyeball muscles are characterized by diminished myosin, dystrophin, and collagen IV immunohistochemical structures. Additionally, determined qualitative morphological changes in skeletal striated muscle fibers lead to the changed structural organization, indicating

✉ Pavlo Fedirko, e-mail: eye-rad@ukr.net

possible muscular dystrophy. Thereby, the presence of dystrophic processes in the eyeball muscles may play a significant role in the morphopatogenesis of strabismus. Further morphological studies are necessary to clarify the development of binocular vision disorder and the methods of their correction. These studies would be especially important to populations that were exposed to radiation.

**Key words:** irradiated in utero, ionizing radiation, strabismus, eyeball muscles, immunohistochemical studies, pathogenesis.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2022;27:412-422. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-422-422*

## ВСТУП

У даному циклі робіт, присвячених офтальмологічним і церебральним ефектам впливу іонізуючого випромінювання, не можна оминати можливі проблеми бінокулярного зору в осіб, які зазнали радіаційного впливу. Забезпечення співдружного руху очей – одна з важливих функцій нервової системи, а співдружний рух очей є передумовою наявності бінокулярного зору. Косоокість – вагома причина зниження функціональних можливостей органа зору і погіршення якості життя пацієнтів [1].

Повідомлення про порушення бінокулярного зору у радіаційно опромінених осіб нечисленні [2–4], незважаючи на те, що опромінення сприяє появі як офтальмологічних, так і неврологічних порушень [5, 6]. Для вивчення розладів співдружного руху очей в осіб, які зазнали дії іонізуючої радіації, важливо не тільки провести епідеміологічні дослідження, але й визначити можливі механізми розвитку таких розладів. Відомо, що розвиток косоокості вивчено недостатньо, що ускладнює вдосконалення методів його профілактики та лікування [1].

Поява після радіаційного впливу змін координації підкоркових нервових структур і порушення метаболізму можуть змінити необхідний баланс зовнішніх м'язів ока [1] і, як наслідок, порушити функції зовнішніх м'язів очного яблука. Для визначення напрямків пошуку можливих механізмів розвитку змін бінокулярного зору у радіаційно опромінених осіб необхідні ретельні дослідження. Вивчити зміни співдружного руху очей, на відміну від багатьох інших різновидів патології ока [4, 7–9], з очевидних причин [10] можливо тільки в групах осіб, опромінених інтравітреально [11, 12], або у мешканців радіаційно забруднених територій, що зазнали найбільшого радіаційного впливу [13–15]. При цьому, попри меншу чисельність груп опромінених *in utero* в порівнянні з мешканцями радіаційно забруднених територій [16–20], імовірність виявлення будь-яких патологічних змін в цій групі вища, зважаючи на підвищену чутливість ембріона і плоду до дії

## INTRODUCTION

In this cycle of works devoted to the ophthalmological and cerebral effects of ionizing radiation exposure, one cannot ignore the increased risks and possible complications of binocular vision disorders in persons radiation exposed *in utero*. One of the most important functions of the nervous system is to ensure proper joint movement of the eyes, which is a prerequisite for binocular vision. Strabismus can cause a significant decrease in the organ of vision functional capabilities and worsened quality of life in patients [1].

There are few reports on binocular vision disorders in radiation-exposed persons [2–4]. Exposure to radiation influences both – ophthalmological and neurological disorders [5, 6]. To study eye movement disorders in people exposed to ionizing radiation, it is important not only to conduct epidemiological studies but also to determine the possible mechanisms of the development of such disorders, for instance, immunohistochemical changes in eyeball muscles. The complete pathogenesis of strabismus has not been studied enough that complicates the improvement of prevention and treatment techniques [1].

The necessary balance of external eye muscle regulation [1] may be disturbed after radiation exposure. Functions of the external eyeball muscles may be disturbed based on the changed coordination process of subcortical nerve structures and due to altered metabolism. Therefore, carefully conducted research is needed to clarify the direction of possible pathogenesis of binocular vision disorders in radiation-exposed persons. It is possible to study changes in joint movements of eyes in groups irradiated *in utero* [11, 12] and/or in residents of radiation-contaminated areas that have experienced the greatest radiation exposure [13–15]. Due to the increased sensitivity of the embryo and fetus to the action of ionizing radiation [21] the possibility to detect any pathological eye changes is higher in persons exposed to fetal radiation compared to residents of radiation-contaminated territories [16–20]. Importantly a large dose load difference and the diverse

іонізуючого випромінювання [21], велику різницю в дозовому навантаженні у мешканців забруднених територій і на можливу дію хімічних факторів на розвиток мешканців цих територій [13–15, 22].

Відомо, що радіаційний вплив порушує функцію внутрішньоочних м'язів [23], спричиняє дисфункцію епітелію і відповідні порушення метаболізму тканин у дітей, які зазнають радіаційного впливу [24]. Крім того, для початку важливо дослідити морфологічні та імуногістохімічні зміни в неопромінених м'язах очного яблука, уражених косоокістю, які можуть допомогти уточнити морфопатогенез косоокості. Міозин і дистрофін є білковими волокнами, які дозволяють оцінювати якість поперечносмугастих волокон скелета. Колаген IV є важливою складовою базальної мембрани і може бути використаний для оцінки можливих змін у цій структурі [25–27].

Оскільки око та додатки є найбільш чутливими до дії іонізуючого випромінювання у внутрішньоутробному періоді, для дослідження були використані дані офтальмологічного обстеження групи осіб, опромінених внутрішньоутробно в перший період Чорнобильської катастрофи. Дослідження було проведено з метою оцінки перспективності вивчення проблеми і визначення напрямів подальшої роботи.

## МЕТА

Оцінити особливості розвитку косоокості та порушень бінокулярного зору в осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання у внутрішньоутробному періоді; дослідити зміни у розподілі та появі міозину, дистрофіну та колагену IV між неопроміненими особами з бінокулярним зором та особами, що страждають на косоокість.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Обстежено 583 особи, які отримали внутрішньоутробне опромінення внаслідок Чорнобильської катастрофи; їхній середній вік на момент обстеження становив  $(11,3 \pm 0,1)$  років. У групу відібрано осіб, народжених між 26.04.1986 р. і 26.02.1987 р., від жінок, вагітних на момент Чорнобильської катастрофи. Під час подальшої вагітності матері проживали в радіоактивно «чистих» регіонах та в зоні посиленого радіоекологічного контролю (4-й зоні). Групу порівняння склали 808 осіб, жителі Києва.

Офтальмологічне обстеження проводили за уніфікованим протоколом з використанням основних сучасних методів дослідження стану органа зору та зорових функцій. Проводили збір анамнезу, зовнішній огляд ока і огляд за допомогою бічного освітлення,

possible effect of chemical factors have been noticed in residents of radiation-polluted territories [13–15, 22].

Radiation exposure is widely known to disrupt the function of intraocular muscles [23], to cause epithelial dysfunction, and to alter corresponding tissue metabolism leading to disorders, especially in children who have been exposed to radiation [24]. Additionally, it is essential to investigate morphological and immunohistochemical changes, at first, in non-irradiated strabismus-affected eyeball muscles, which could reveal strabismus morphopatogenesis. Myosin and dystrophin are protein filaments that can be used for the quality evaluation of skeletal striated muscle fibers. Collagen IV is a significant part of the basement membrane and may be used to estimate possible changes in this structure [25–27].

The ophthalmological examination of data of persons irradiated in utero during the first period of the Chernobyl disaster were used for the study since the eye and its appendages are the most sensitive to the ionizing radiation action in the fetal period. This research was conducted to assess the prospects for studying the problem and to determine directions for further work.

## OBJECTIVE

The purpose of the study: to assess the peculiarities of the development of strabismus and binocular vision disorders in persons who were exposed to ionizing radiation *in utero*; to investigate the changes in distribution and appearance of myosin, dystrophin, and collagen IV between non-irradiated persons with normal binocular vision and strabismus patients.

## MATERIALS AND METHODS

583 persons who received radiation in utero because of the Chernobyl disaster were examined. At the time of examination, their average age was  $(11.3 \pm 0.1)$  years. People born between 04/26/1986 and 02/26/1987 from women who were pregnant during the Chernobyl disaster were selected for the patient group. The next part of pregnancy of their mothers took place in radioactively «clean» regions or in the zone of enhanced radioecological control (the 4<sup>th</sup> zone). The control group consisted of 808 people who were residents of Kyiv.

Ophthalmological examination was carried out according to a unified protocol. Main methods of researching the condition of the organ of vision and visual functions were used: anamnesis was collected;

визначення гостроти зору, здійснювали дослідження рефракції (після двократної інстиляції 1,0 % розчину тропікаміду) на авторефрактометрі. Кут косоокості визначали за положенням світлового рефлексу на рогівці за Гіршбергом; порушення м'язового тону виявляли за установчими рухами при виконанні «тесту прикриття». Досліджували бінокулярну та монокулярну рухливість очних яблук у 8 напрямках. Характер бінокулярного зору визначали за допомогою приладу ЦТ-2. Дослідження внутрішньоочного тиску виконували за допомогою автоматичного пневмотонометра. Біомікроскопію виконували на щілинній лампі Zeiss за загальноприйнятою методикою, огляд повік, кон'юнктиви, рогівки, кришталіка й скловидного тіла здійснювали при максимально розширених зіницях.

Проводили офтальмоскопію в прямому і зворотньому вигляді, фотографування очного дна на фундус-камері VISUKAM lite Digital Camera фірми Zeiss у стандартних умовах. Проведення інших, додаткових обстежень було передбачено при виявленні патології.

Також було досліджено 15 зразків м'язів очного яблука неопромінених осіб – 9 жінок і 6 чоловіків. З них 10 пацієнтів мали косоокість і 5 зразків – контрольних. Матеріали фіксували протягом 24 годин 2 % формальдегідом і 0,2 % лимонною кислотою в 0,1 М фосфатному буфері. Парафінування було проведено після 12-годинного застосування буфера Tyrode. Після цього зрізи товщиною чотири мікрметри вирізали та забарвлювали гематоксиліном-еозином, для оцінки морфологічних структур.

Для виявлення міозину, дистрофіну і колагену IV застосовували біотин-авідиновий (biotin-avidin (IMH)) імуногістохімічний метод. Були використані антитіла для визначення колагену IV (520369A, diluted 1:30, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), міозину (ab7784, diluted 1:150, Abcam Cambridge, UK) і дистрофіну (ab15277, diluted 1:100, Abcam Cambridge, UK). Імунореактивні структури оцінювали в скелетній поперечносмугастій м'язовій тканині у п'яти випадкових полях зору на збільшенні  $\times 400$  за допомогою світлової мікроскопії (Leica DC 300F, Leica Biosystems Richmond, Richmond, VA, USA).

Для оцінки зовнішнього вигляду і локального розподілу імунореактивних структур використовували напівкількісний метод класифікації [28, 29]. Для аналізу зображень використовували програмне забезпечення Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, США). Для проведення статистичного аналізу даних використовували аналіз ризиків.

external examination of the eye and examination with the help of side lighting were conducted; visual acuity was determined. A refraction study was carried out (after 2-fold instillation of 1.0 % tropicamide solution) on an autorefractometer. The angle of strabismus was determined by the position of the light reflex on the cornea according to Hirshberg. A violation of muscle tone was detected by establishing movements during the performance of the «cover test». Binocular and monocular mobility of the eyeballs in 8 directions were studied. The nature of binocular vision was determined using the CT-2 device. Intraocular pressure was measured using an automatic pneumotonometer. Biomicroscopy was performed using a slit lamp (Zeiss) according to the generally accepted method, the eyelids, conjunctiva, cornea, lens, and vitreous were examined with maximally dilated pupils.

Ophthalmoscopy was carried out in forward and reverse view; the fundus was photographed with a Zeiss VISUKAM lite Digital Camera using standard conditions. Additional examinations was foreseen when pathology was detected.

Overall, 15 non-irradiated eyeball muscle samples were examined – 9 females and 6 males were included. Of which 10 were from strabismus patients and 5 were controls. Tissue materials were fixed using 24h with 2 % formaldehyde and 0.2 % citric acid in 0.1 M phosphate. Paraffin embedding was conducted after 12h long Tyrode's buffer application. Afterward, four-micrometre-thick sections were cut and stained with haematoxylin and eosin, which were used to evaluate morphological structures.

To detect myosin, dystrophin, and collagen IV biotin-avidin (IMH) immunohistochemistry method was performed. More precisely, for the detection of Collagen IV (520369A, diluted 1:30, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), Myosin (ab7784, diluted 1 : 150, Abcam Cambridge, UK), and Dystrophin (ab15277, diluted 1:100, Abcam Cambridge, UK) antibodies were used. Immunoreactive structures were evaluated in skeletal striated muscle tissue in five random visual fields at  $\times 400$  using light microscopy (Leica DC 300F, Leica Biosystems Richmond, Richmond, VA, USA).

Semi-quantitative grading method was used for the evaluation of immunoreactive structures appearance and local distribution, which detected negative to abundant positive immunoreactive structures [28, 29]. Image-Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) was used to perform image analysis.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У групі внутрішньоутробно опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи осіб виявлено підвищену, у зіставленні з групою порівняння, частоту розбіжної косоокості ( $p = 0,04190$ ) та гетерофорії ( $p = 0,002603$ ), див. табл. 1.

Відносний ризик гетерофорії склав 5,08 (1,42–18,13). Виявлені зміни свідчать про збільшення ймовірності розвитку цих типів порушення біокулярного зору в осіб, які зазнали внутрішньоутробного опромінення. У даний час патогенез цих станів складний і недостатньо вивчений. Тим не менш, як орбітальні, так і неврологічні зміни можуть бути важливими для їх розвитку.

При дослідженні тканин скелетних поперечно-смугастих м'язів у неопромінених пацієнтів з косоокістю були помічені різного розміру та новоутворені волокна скелетних поперечно-смугастих м'язів. Крім того, спостерігалось збільшення проліферації сполучної тканини (рис. 1, А і В).

Для визначення можливого значення змін дистрофіну, міозину і колагену IV в розвитку косоокості проведено порівняння імунореактивних структур м'язів очного яблука неопромінених пацієнтів з косоокістю і пацієнтів контрольної групи. Усі досліджувані маркери показали зменшення позитивних структур у групі пацієнтів, порівняно з контрольною групою (рис. 2, С, D, E та F).

Морфологічні та імуногістохімічні зміни м'язів очного яблука, уражених косоокістю, свідчать на користь того, що структурні зміни м'язів очного яблука мають значення для розвитку розладів біокулярного зору. Отримані дані підтверджують концепцію про те, що наявність дистрофічних процесів у м'язах очного яблука може відігравати значну роль у морфогенезі косоокості. Ми можемо констатувати необхідність подальших морфологічних досліджень.

### Таблиця 1

Поширеність окремих порушень співдружного руху очей при первинному обстеженні

**Table 1**

**Results of the association of polymorphic variants of cytokine genes with PCM risk (logistic regression method)**

Порушення співдружного руху очей Violation of joint movement of the eyes	Код за МКХ-X Code according to ICD-X	Поширеність захворювань, на 1 000 осіб Prevalence of diseases	
		група дослідження <sup>1</sup> study group <sup>1</sup>	група порівняння comparison group
Розбіжна косоокість / Divergent strabismus	H 50.1	6,9 ± 3,43 <sup>2</sup>	1,24 ± 1,24 <sup>2</sup>
Гетерофорія / Heterophoria	H 50.5	18,9 ± 5,64 <sup>2</sup>	3,71 ± 2,14 <sup>2</sup>

Примітки. <sup>1</sup>Група внутрішньоутробно опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи осіб; <sup>2</sup>різниця статистично значуща,  $p < 0,05$ .  
Notes. <sup>1</sup>Group radiation exposed in utero because of the Chernobyl disaster; <sup>2</sup>statistically significant values were considered  $p$  values  $< 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

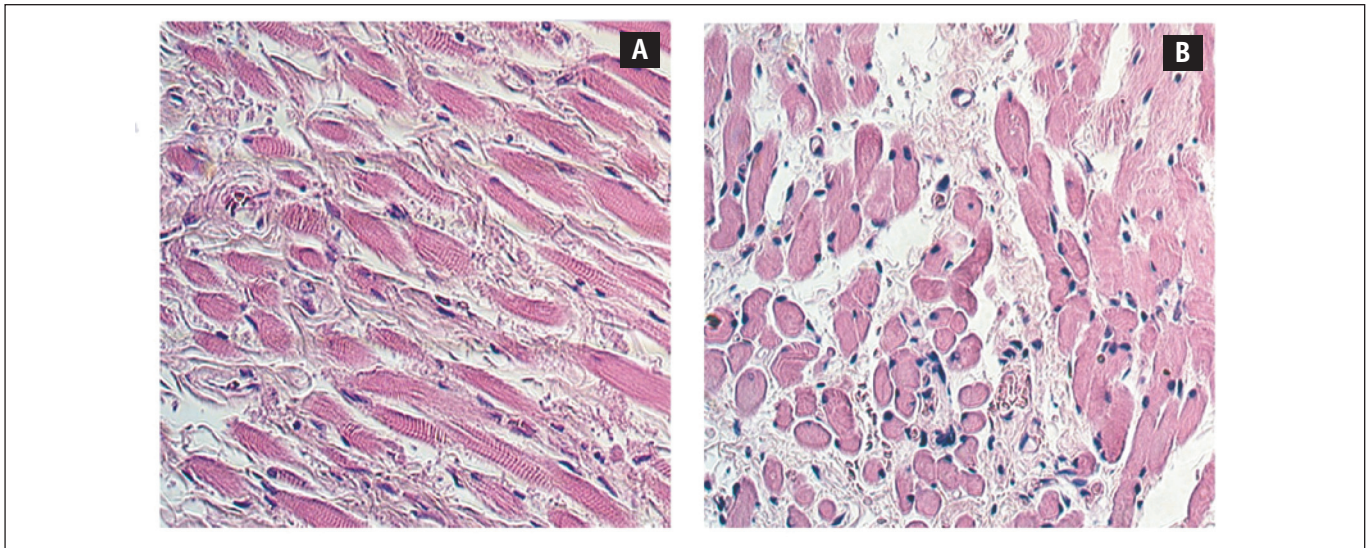
An increased frequency of divergent strabismus ( $p = 0.04190$ ) and heterophoria ( $p = 0.002603$ ) was found in the group exposed to fetal radiation because of the Chernobyl disaster, compared to the control group, see Table 1.

The relative risk of heterophoria was 5.08 (1.42–18.13). Thus, detected changes indicate an increased probability of divergent strabismus and heterophoria development in persons who were irradiated in utero. Currently, the pathogenesis of these conditions is complex and poorly understood. Nevertheless, both orbital and neurological changes may be important for their development.

Having examined the skeletal striated muscle tissues from non-irradiated patients with strabismus, differently sized and newly formed skeletal striated muscle fibers were noticed. Additionally, an increase in proliferation of connective tissue was observed (Fig. 1, A and B).

The comparison of immunoreactive structures between non-irradiated patient strabismus-affected eyeball muscles and the control group was performed to determine the possible involvement of dystrophin, myosin, and collagen IV in the development of strabismus. All examined markers showed a decrease in positive structures in the patient group compared to the controls (Figure 2C, D, E, and F).

Theoretically, morphological and immunohistochemical changes in strabismus-affected eyeball muscles are in favour of an argument that structural changes in eyeball muscles can lead to binocular vision disorders. This research supports the concept that the presence of dystrophic processes in the eyeball muscles may play a significant role in the morphogenesis of strabismus. Further morphological studies are needed.



**Рисунок 1. А – контроль, В – пацієнт.**

А – жодних морфологічних змін у скелетній поперечносмугастій м'язовій тканині контрольної групи не виявлено. Гематоксилін-еозин,  $\times 250$ .

В – скелетні смугасті м'язові волокна різного розміру, новоутворені волокна. Гематоксилін-еозин,  $\times 250$ .

**Figure 1. A – control, B – patient.**

A – no morphological changes were found in skeletal striated muscle tissue of the control group. Haematoxylin and eosin,  $\times 250$ .

B – note differently sized and newly formed skeletal striated muscle fibers. Haematoxylin and eosin,  $\times 250$ .

## ВИСНОВКИ

Частота розбіжної косоокості та гетерофорії була вищою в осіб, які зазнали внутрішньоутробного опромінення внаслідок Чорнобильської катастрофи, порівняно з контрольною групою. При цьому відносний ризик наявності гетерофорії склав 5,082 (1,424–18,13). Виявлені зміни вказують на підвищену ймовірність розвитку косоокості в осіб, які зазнали внутрішньоутробного опромінення.

М'язи очного яблука, уражені косоокістю в неопромінених осіб, характеризуються зниженням імуногістохімічних структур міозину, дистрофіну та колагену IV. Крім того, виявлено якісні морфологічні зміни в скелетних поперечносмугастих м'язових волокнах, зміни структурної організації, що вказує на можливу м'язову дистрофію.

Таким чином, наявність дистрофічних процесів у м'язах очного яблука може відігравати істотну роль у морфопатогенезі косоокості. Для уточнення розвитку порушень бінокулярного зору та методів їх корекції необхідні подальші морфологічні дослідження. Ці дослідження будуть особливо важливі для населення, яке зазнало впливу радіації.

## Конфлікт інтересів

Автори не розголошують конфіденційну інформацію та не мають жодної приналежності або фінансової зацікавленості в будь-якій організації, яка могла б створити конфлікт інтересів.

## CONCLUSIONS

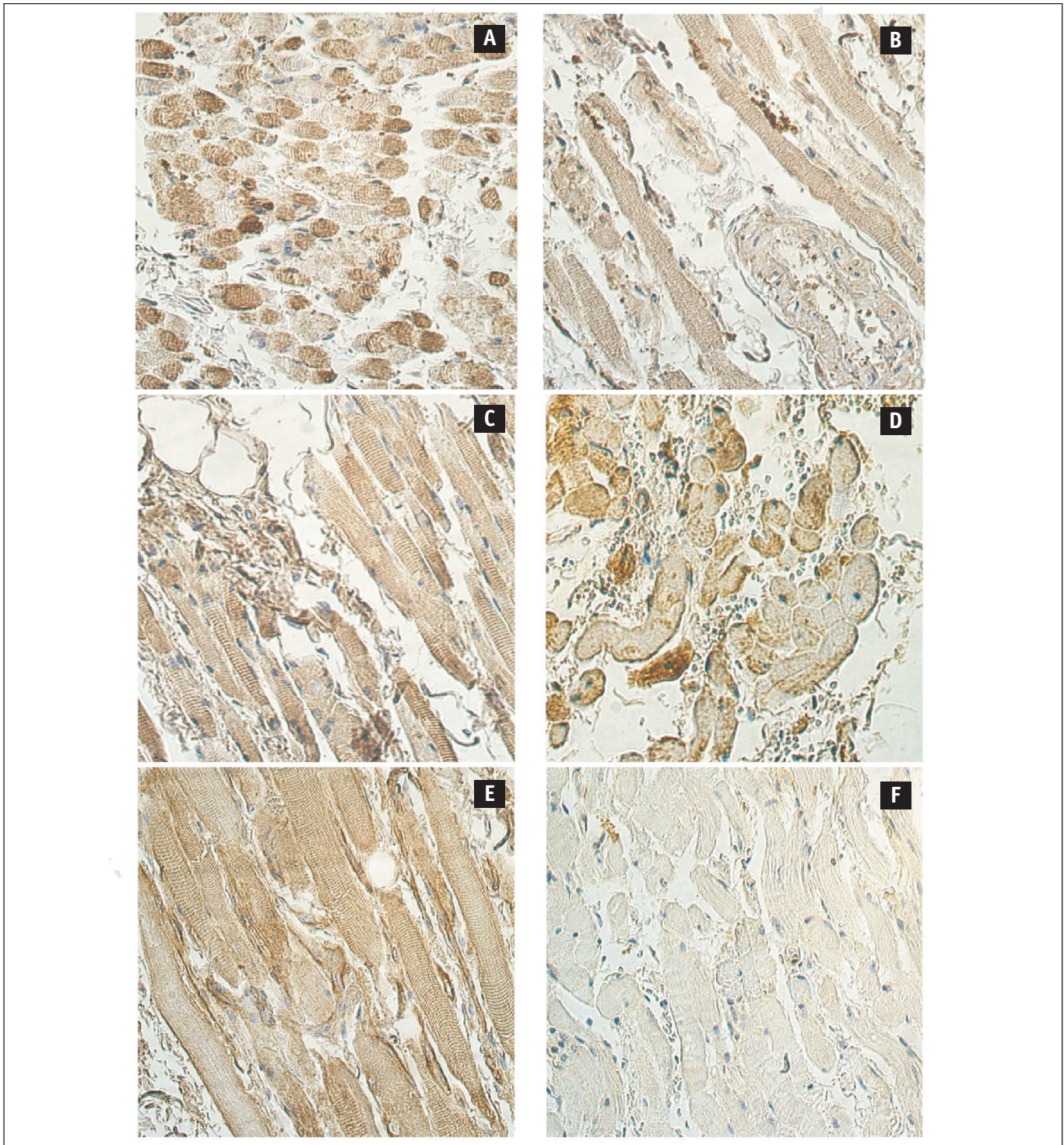
The frequency of divergent strabismus and heterophoria was found higher in persons who were radiation exposed in utero because of the Chernobyl disaster, compared to the control group. Notably, the relative risk of the presence of heterophoria was 5.082 (1.424–18.13). Detected changes indicate an increased probability in the development of strabismus in persons who had been exposed to fetal radiation.

Non-irradiated strabismus-affected eyeball muscles are characterized by diminished myosin, dystrophin, and collagen IV immunohistochemical structures. Additionally, determined qualitative morphological changes in skeletal striated muscle fibers lead to the changed structural organization, indicating possible muscular dystrophy.

Thereby, the presence of dystrophic processes in the eyeball muscles may play a significant role in the morphopatogenesis of strabismus. Further morphological studies are necessary to clarify the development of binocular vision disorder and the methods of their correction. These studies would be especially important to populations that were exposed to radiation.

## Conflicts of interest statement

The authors disclose no confidential information and have no affiliation or financial interest in any organization that could create a conflict of interest.



**Рисунок 2. А, С, Е – контроль, В, D, F – пацієнт.**

A – сильно забарвлені дистрофінпозитивні структури. Дистрофін, × 250.

B – у групі пацієнтів було виявлено зниження кількості позитивних структур дистрофіну. Дистрофін, × 250.

C – у контрольній групі міозин сильно забарвлює імуногістохімічні позитивні структури. міозин; × 250.

D – зменшення позитивних структур міозину в групі пацієнтів. міозин; × 250.

E – колаген IV позитивні структури в контрольній групі. Колаген IV, × 250.

F – у м'язах очного яблука, уражених косоокістю, майже не було виявлено позитивних структур колагену IV. Колаген IV, × 250.

**Figure 2. A, C, E – control, B, D, F – patient.**

A – pay attention to highly stained dystrophin positive structures. Dystrophin, × 250.

B – in the patient group decreased amount of dystrophin positive structures were found. Dystrophin, × 250.

C – in the control group myosin highly stains immunohistochemical positive structures. Myosin, × 250.

D – note diminished myosin positive structures in the patient group. Myosin; × 250.

E – note the collagen IV positive structures in the control group. Collagen IV, × 250.

F – almost no positive collagen IV structures were found in the strabismus-affected eyeball muscles. Collagen IV, × 250.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сердюченко В. І. Використання призми в офтальмології: огляд. Частина 2. Застосування призми при гетерофорії, ністагмі та розладах зорової нервової системи. *Офтальмол. журн.* 2022. № 2. С. 48–53. doi: 10.31288/oftalmolzh202224853.
2. Сердюченко В. І., Ностопирьова О. І. Віддалені спостереження за станом органа зору школярів, які постійно мешкають в радіоактивно забрудненому районі. *Офтальмол. журн.* 2006. № 3 (II). С. 152–155.
3. Бабенко Т. Ф. Зорова система дітей, опромінених внутрішньоутробно внаслідок Чорнобильської катастрофи (період спостереження 1992-2004 рр.). *Матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 25-річчю Чорнобильської трагедії «Екзо- та ендекологічні аспекти здоров'я людини»* (8–9 квіт. 2011 р., м. Ужгород). Ужгород, 2011. С. 74–77.
4. Fedirko P., Babenko T., Garkava N., Dorichevska R., Serdyuchenko V., Nostopiriova O. 17.1. Eye: clinic, diagnostics, regularities and risks for development of eye pathology in Chernobyl catastrophe victims. In: *Health effects of the Chernobyl accident – thirty years aftermath* / ed. by D. Bazyka, V. Sushko, A. Chumak et al. Kyiv: DIA, 2016. P. 407–431.
5. Radiation-induced cerebro-ophthalmic effects in humans / K. N. Loganovsky, D. Marazziti, P. A. Fedirko et al. *Life*. 2020. Vol. 10, no. 4. P. 41. doi: 10.3390/life10040041.
6. Головний мозок та орган зору як потенційні мішені для впливу іонізуючого випромінювання. Частина I. Цереброофтальмологічні ефекти опромінення в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС / К. М. Логановський, П. А. Федірко, К. В. Куц та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2020. Вип. 25. С. 90–129. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-90-129.
7. Пасечнікова Н. В., Федірко П. А., Бабенко Т. Ф. Випадок радіаційної катаракти, виявлений через 29 років після радіаційного впливу. *Офтальмол. журн.* 2020. № 6. С. 61–63. doi: 10.31288/oftalmolzh202066163.
8. Морфометричні параметри макулярної зони сітківки у реконвалесцентів гострої променевої хвороби (у віддаленому періоді) / П. А. Федірко, Т. Ф. Бабенко, О. О. Колосинська та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2018. Вип. 23. С. 481–489. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-481-489.
9. Clinical types of cataracts in a long-term period after acute radiation sickness / P. A. Fedirko, T. F. Babenko, O. O. Kolosynska et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Vol. 24. P. 493–502.
10. Сердюченко В. І., Ностопирева Е. І. Рефрактогенез у школьників, проживаючих на радіаційно забрудненій території. Одеса: Астропринт, 2015. 104 с.
11. Головний мозок та орган зору як потенційні мішені для впливу іонізуючого випромінювання: частина II. Цереброофтальмологічні ефекти радіаційного опромінення у дітей та осіб, опромінених внутрішньоутробно / Логановський К. М., / П. А. Федірко, К. В. Куц, Д. Мараззіті та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2021. Вип. 26. С. 57–97. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-57-97.

## REFERENCES

1. Serdiuchenko VI. [Use of prisms in ophthalmology: an overview. Part 2. Application of prisms in heterophoria, nystagmus and disorders of the visual nervous system]. *Ophthalmol. J.* 2022;2:48-53. doi: 10.31288/oftalmolzh202224853. Ukrainian.
2. Serdyuchenko VI, Nostopiryova OI. [Remote observations of the condition of the eye of schoolchildren who live in a radioactively contaminated area]. *Ophthalmol J.* 2006;(3):152-155. Ukrainian.
3. Babenko T. F. [Visual system of children irradiated in utero as a result of the Chernobyl disaster (observation period 1992-2004)] In: *Exo- and endoecological aspects of human health: materials of the International. science and practice conf., dedicate on the 25<sup>th</sup> anniversary of the Chernobyl tragedy*, April 8-9. 2011; Uzhhorod. Uzhhorod; 2011. p. 74-77. Ukrainian.
4. Fedirko P, Babenko T, Garkava N, Dorichevska R, Serdyuchenko V, Nostopiriova O. Eye: clinic, diagnostics, regularities and risks for development of eye pathology in Chernobyl catastrophe victims. In: *Bazyka D, Sushko V, Chumak A, et al. Health effects of the Chernobyl accident – thirty years aftermath*. Kyiv: DIA; 2016. p. 407-431.
5. Loganovsky KN, Marazziti D, Fedirko PA, Kuts KV, Antypchuk KY, Perchuk IV, et al. Radiation-induced cerebro-ophthalmic effects in humans. *Life*. 2020;10(4):41. doi: 10.3390/life10040041
6. Loganovsky KN, Fedirko PA, Kuts KV, Marazziti D, Antypchuk KYu, Perchuk IV, et al. Brain and eye as potential targets for ionizing radiation impact. Part I. The consequences of irradiation of the participants of the liquidation of the Chernobyl accident. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2020;25:90-129. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-90-129.
7. Pasechnikova NV, Fedirko PA, Babenko TF. [A case of radiation cataracts, revealed by 29 years after radiation impact]. *Ophthalmol J.* 2020;(6):61-63. doi: 10.31288/oftalmolzh202066163. Ukrainian.
8. Fedirko PA, Babenko TF, Kolosynska OO, Dorichevska RYU, Garkava NA, Grek LV, et al. Morphometric parameters of the macular zone of the retina in convalescents from acute radiation sickness (in the remote period). *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2018;23:481-489. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-481-489.
9. Fedirko PA, Babenko TF, Kolosynska OO, Dorichevska RE, Garkava NA, Sushko VO. Clinical types of cataracts in a long-term period after acute radiation sickness. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2019;24:493-502. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-493-502.
10. Serdyuchenko VI, Nostopyreva EI. [Refractogenesis in schoolchildren living in a radiation-contaminated territory] Odesa: Astroprint; 2015. 104 p. Russian.
11. Loganovsky KM, Fedirko PA, Kuts KV, Marazziti D, Antypchuk KYu, Perchuk IV, et al. The brain and the organ of vision as potential targets for the impact of ionizing radiation: part II. Cerebro-ophthalmological effects of radiation exposure in children and persons irradiated in utero. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2021;26:57-97. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-57-97.
12. Babenko TF, Loganovsky KM, Loganovska TK, Medvedovska NV, Kolosynska OO, Garkava NA, et al. The brain and the organ of

12. Головний мозок та орган зору як потенційні мішені для впливу іонізуючого випромінювання: частина III – особливості морфометричних параметрів сітчастої оболонки та амплітуда і латентність ранніх компонентів зорових викликаних потенціалів у опромінених внутрішньоутробно осіб / Т. Ф. Бабенко, К. М. Логановський, Т. К. Логановська та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2021. Вип. 26. С. 284–296. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-284-296.
13. Peculiarities of internal radiation doses due to  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  intake in population from Zhytomyr oblast in a late period after the Chernobyl NPP accident / V. V. Vasylenko, M. Y. Tsigankov, S. Y. Nechaev et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2013. Vol. 18. P. 59–69.
14. Results of comprehensive radiological and hygienic monitoring in some settlements of radiologically contaminated areas in Rivne region in 2017 / V. V. Vasylenko, S. Y. Nechaev, M. Y. Tsigankov et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2018. Vol. 23. P. 139–152. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-139-152.
15. Impact of the Rivne NPP activity on natural and social environment of the control area / Prylypko V. A., Morozova M. M., Bondarenko, I. V. et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Vol. 24. P. 249–264.
16. Василенко В. В., Нечаєв С. Ю., Циганков М. Я. та ін. Основні чинники формування внутрішнього опромінення населення радіоактивно забруднених територій на поточному етапі аварії на ЧАЕС (на прикладі Київської області). *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2015. Вип. 20. С. 147–156.
17. Базика Д. А., Сушко В. О., Чумак А. А., та ін. Результати роботи ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» у 2019 році. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2020. Вип. 25. С. 10–17. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-10-17.
18. Morbidity rates in the NPP surveillance zone and radiologically contaminated areas / V. A. Prylypko, M. M. Morozova, O. O. Petrychenko et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2018. Vol. 23. P. 188–199. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-188-199.
19. Gunko N. V., Korotkova N. V. Variability of population gender and age composition in areas with the most intensive radiological contamination in Ukraine. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2018. Vol. 23. P. 153–163. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-153-163.
20. Gunko N. V., Korotkova N. V., Zasoba Y. Y. Analysis of population size and composition in areas with the most intensive radiological contamination in Ukraine at different times. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019. Vol. 24. P. 109–120.
21. Heiervang K, Mednick S, Sundet K, Rund B. The Chernobyl accident and cognitive functioning: a study of norwegian adolescents exposed in utero. *Developmental Neuropsychology*. 2010. Vol. 35, no. 6. P. 643–655.
22. Zarins J, Pilmane M, Sidhoma E, Salma I, Locs J. The role of strontium enriched hydroxyapatite and tricalcium phosphate biomaterials in osteoporotic bone regeneration. *Symmetry*. 2019. Vol. 11, no. 2. P. 229. <https://doi.org/10.3390/sym11020229>.
23. Sergienko N., Fedirko P. Accommodative function of eyes in persons exposed to ionizing radiation. *Ophthal. Res.*, 2002; 34 (4): 192–194.
- vision as potential targets for the influence of ionizing radiation: part III – peculiarities of the morphometric parameters of the retina and the amplitude and latency of early components of visual evoked potentials in individuals irradiated in utero. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2021;26:284-296. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-284-296.
13. Vasylenko W, Tsigankov MY, Nechaev SY, et al. Peculiarities of internal radiation doses due to  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  intake in population from Zhytomyr region in a late period after the Chernobyl NPP accident et al. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2013;18:59-69.
14. Vasylenko W, Nechaev SY, Tsigankov, et al. Results of comprehensive radiological and hygienic monitoring in some settlements of radiologically contaminated areas in Rivne region in 2017. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2018;23:139-152. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-139-152.
15. Prylypko VA, Morozova MM, Bondarenko, IV et al. Impact of the rivne npp activity on natural and social environment of the control area. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019;24:249-264.
16. Vasylenko W, Nechaev SY, Tsigankov MY, et al. Main internal dose-forming factors for inhabitants of contaminated regions at current phase of the Chernobyl nuclear power plant accident (Kyiv region as an example). *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2015;20:147-156
17. Bazyka D., Sushko V., Chumak A., et al. State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» – research activities and scientific advance in 2019. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2020;25:10-17. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-10-17/
18. Prylypko VA, Morozova MM, Petrychenko OO, Ozerova YY, Kotsubinskij OV Morbidity rates in the NPP surveillance zone and radiologically contaminated areas. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2018;23:188-199. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-188-199.
19. Gunko NV, Korotkova NV Variability of population gender and age composition in areas with the most intensive radiological contamination in Ukraine. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2018; 23:153-163. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-153-163.
20. Gunko NV, Korotkova NV, Zasoba YY. Analysis of population size and composition in areas with the most intensive radiological contamination in Ukraine at different times. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019;24:109-120.
21. Heiervang K, Mednick S, Sundet K, Rund B. The Chernobyl accident and cognitive functioning: A study of Norwegian adolescents exposed in utero. *Developmental Neuropsychology*. 2010;35(6):643-655.
22. Zarins J, Pilmane M, Sidhoma E, Salma I, Locs J. The role of strontium enriched hydroxyapatite and tricalcium phosphate biomaterials in osteoporotic bone regeneration. *Symmetry*. 2019;11(2):229. doi: 10.3390/sym11020229.
23. Sergienko NM, Fedirko P. Accommodative function of eyes in persons exposed to ionizing radiation. *Ophthal. Res.* 2002;34 (4):192-194.

24. Степанова Є. І., Березовський В. Я., Колпаков І. Є., Кондрашова В. Г., Литвинець О. М. Ендотелійзалежна реакція судин та вегетативний гомеостаз у дітей, які проживають на радіоактивно забруднених територіях. *Лікарська справа*. 2013. № 2. С. 32–38.
25. Gao Q. Q., McNally E. M. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Compr. Physiol.* 2015. Vol. 5, no. 3. P. 1223–1239. doi: 10.1002/cphy.c140048.
26. Masters T. A., Kendrick-Jones J., Buss F. Myosins: domain organisation, motor properties, physiological roles and cellular functions. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2017. Vol. 235. P. 77–122. doi: 10.1007/164\_2016\_2.
27. Poschl E., Schlotzer-Schrehardt U., Brachvogel B., Saito K., Ninomiya Y., Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 2004. Vol. 131, no. 7. P. 1619–1628. doi: 10.1242/dev.01037.
28. Vitenberga Z., Pilmane M., Babjoniseva A. An insight into COPD morphopathogenesis: chronic inflammation, remodeling, and antimicrobial defense. *Medicina (Kaunas)*. 2019. Vol. 55, no. 8. P. 496. doi: 10.3390/medicina55080496
29. Goida J., Pilmane M. Characterization of macrophages and TNF- $\alpha$  in cleft affected lip tissue. *Cosmetics*. 2021. Vol. 8, no. 2. P. 42. doi: 10.3390/cosmetics8020042.
24. Stepanova YI, Berezovskij VYa, Kolpakov IYe, Kondrashova VG, Lytvynets OM. [Endothelium dependent vascular reaction and vegetative homeostasis in children living in radioactively contaminated areas]. *Likars'ka sprava*. 2013;(2):32-38. Ukrainian.
25. Gao QQ, McNally EM. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Compr. Physiol.* 2015; 5(3):1223-1239. doi: 10.1002/cphy.c140048.
26. Masters TA, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosins: domain organisation, motor properties, physiological roles and cellular functions. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2017;235:77-122. doi: 10.1007/164\_2016\_2.
27. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 2004;131(7): 1619-1628. doi: 10.1242/dev.01037.
28. Vitenberga Z, Pilmane M, Babjoniseva A. An insight into COPD morphopathogenesis: chronic inflammation, remodeling, and antimicrobial defense. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(8):496. doi: 10.3390/medicina55080496
29. Goida J, Pilmane M. Characterization of macrophages and TNF- $\alpha$  in cleft affected lip tissue. *Cosmetics*. 2021;8(2):42. doi: 10.3390/cosmetics8020042.

## ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

**Федірко Павло Андрійович** – доктор медичних наук, професор, директор Інституту радіаційної гігієни і епідеміології, керівник лабораторії радіаційно індукованих захворювань ока, Інститут радіаційної гігієни та епідеміології, ННЦРМ, м. Київ, Україна, ORCID: 0000-0003-2175-966

**Пілмане Мара** – доктор медичних наук, професор, директор Інституту Анатомії та Антропології, керівник відділу морфології, Ризький університет Страдзінша, Рига, Латвія, ORCID: 0000-0001-9804-4666

**Бабенко Тетяна Федорівна** – кандидат медичних наук, учений секретар Інституту радіаційної гігієни і епідеміології, старший науковий співробітник лабораторії радіаційно індукованих захворювань ока, Інститут радіаційної гігієни та епідеміології, ННЦРМ, м. Київ, Україна, ORCID: 0000-0002-5704-2709

**Конопецька Віта** – Інститут анатомії та антропології, Ризький університет Страдзінша, Рига, Латвія, ORCID: 0000-0002-9632-4821

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Pavlo A. Fedirko** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Institute of Radiation Hygiene and Epidemiology, Head of the Laboratory of Radiation Induced Eye Diseases, Institute of Radiation Hygiene and Epidemiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0003-2175-966

**Mara Pilmane** – Doctor of Habil. Med., Professor, Director of the Institute of Anatomy and Anthropology, Head of the Department of Morphology, Riga Stradins University, Riga, Latvia, ORCID: 0000-0001-9804-4666

**Tetyana F. Babenko** – MD, PhD, Academic Secretary of the Institute of Radiation Hygiene and Epidemiology, Leading Scientist of Laboratory of Radiation Induced Eyes Diseases, Institute of Radiation Hygiene and Epidemiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0002-5704-2709

**Vita Konopetska** – MD, Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradins University, Riga, Latvia, ORCID: 0000-0002-9632-4821

Стаття надійшла до редакції 11.10.2022

Received: 11.10.2022