

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛЛОГЕННОЙ ТКАНИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ФЕТАЛЬНОГО МОЗГА И ТКАНИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ УШИБА ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Р. Р. Новиков, А. А. Шмелева, В. В. Васлович

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца МЗ Украины,
Институт нейрохирургии имени А. П. Ромоданова НАМН Украины, г. Киев

APPLICATION OF ALLOGENIC TISSUE OF THE FETAL BRAIN CORTEX AND THE OLFATORY BULB TISSUE FOR TREATMENT OF THE BRAIN CONTUSION IN RATS

R. R. Novikov, A. A. Shmeleva, V. V. Vaslovich

Bogomolets National Medical University,
Romodanov Institute of Neurosurgery, Kyiv

Реферат

В эксперименте изучено влияние трансплантации аллогенной ткани больших полушарий фетального головного мозга (ГМ) и ткани обонятельной луковицы (ТОЛ) на течение процессов заживления после ушиба ГМ. Исследование проведено на беспородных крысах—самцах, у животных 1—й группы в 1—е сутки после открытой проникающей локальной травмы ГМ осуществляли трансплантацию в сформированный дефект ткани ГМ фрагмента аллогенной фетальной нервной ткани (ФНТ); 2—й группы — в 1—е сутки после травмы ГМ в сформированный дефект вводили фрагмент аллогенной ТОЛ; 3—й группы (контроль) наносили открытую проникающую локальную травму ГМ без последующей трансплантации тканей. Влияние ФНТ проявлялось более активным участием глиальных клеток в процессе заживления, ТОЛ — выразительно активировала процессы образования новых сосудов, преимущественно со стороны травмированного ГМ. Выбранная экспериментальная модель позволяет изучать возможности использования нейрогенных тканей в лечении ушиба ГМ, определить тактику терапии.

Ключевые слова: ушиб головного мозга; лечение; аллогенная фетальная нервная ткань; ткань обонятельной луковицы; эксперимент.

Abstract

Impact of the allogenic tissue transplantation of the fetal cerebral large hemispheres and the olfactory bulb tissue (OBT) on the healing processes after the brain contusion was studied in experiment. The investigation was performed on mongrel male rats: in laboratory animals of the first group in the first day after open penetrating local cerebral trauma (OPLCT) the allogenic fetal nervous tissue fragment was transplanted into the formatted tissue defect; for the second group — in the first day after cerebral trauma the allogenic OBT fragment was transplanted into the formatted tissue defect; and for the third group (control) — the OPLCT was done without further transplantation of tissues. The impact of the allogenic fetal nervous tissue transplantation was demonstrated by more active participation of glial cells during the healing process course, and the OBT transplantation was followed by activation of neoangiogenesis processes, mainly in the injured brain. The experimental simulation choosed permits to study the possibilities of application of neurogenic tissues in the brain contusion treatment, and to determine the therapy tactics.

Keywords: the brain contusion; treatment; allogenic fetal nervous tissue; the tissue of olfactory bulb; experiment.

Анализ накопленного в настоящее время экспериментального и клинического материала свидетельствует об актуальности проблемы лечения ушиба ГМ в связи с увеличением травматизма, частоты инвалидизации, осложнений течения черепно—мозговой травмы, необходимости поиска новых подходов к ее решению [1]. Одной из стратегий терапии ушиба ГМ является применение аллогенных стволовых клеток (СТ), поскольку репаративные процессы с участием собственных СТ в ГМ ограничены, а использова-

ние аллогенной ФНТ и ТОЛ позволяет расширить представления о новых нейрогенных источниках в участках поврежденного ГМ [2].

Изучено влияние трансплантации аллогенной ФНТ и ТОЛ на течение процессов заживления в ГМ после его ушиба в эксперименте на крысах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте использовали половозрелых беспородных крыс—самцов массой тела 250 — 300 г, в

возрасте в среднем 5,5 мес, из выводка вивария Института нейрохирургии. Манипуляции на животных осуществляли в соответствии с существующими нормами биоэтики. Сформированы группы животных: "ТФНТ" — животные, которым в 1—е сутки после открытой проникающей локальной травмы ГМ осуществляли трансплантацию в сформированный дефект фрагмента аллогенной ФНТ 18 сут гестации (n = 5); "ТТОЛ" — животные, которым в 1—е сутки после открытой проникающей локальной травмы ГМ выполня-

ли трансплантацию в сформированный дефект фрагмента аллогенной ТОЛ ($n = 5$); "контроль" (К) — животным наносили открытую проникающую локальную травму ГМ через сформированное трепанационное окно без трансплантации ткани ($n = 5$).

Хирургическое вмешательство осуществляли под общим обезболиванием, путем внутрибрюшинного введения смеси растворов ксилазина ("Sedazin", Biowet, Польша) из расчета 15 мг/кг массы тела и кетамина ("Calypsol", Gedeon Rihter, Венгрия) из расчета 70 мг/кг массы тела животного. После удаления шерстистого покрова головы, дезинфекции кожи 5% спиртовым раствором йода в конвексительной части черепа кожу и подлежащие ткани разрезали параллельно сагитальному шву, стоматологическим бором накладывали фрезевое отверстие в точке, которая в передне—заднем направлении являлась центральной частью условной линии, проведенной через центр лобно—носового шва впереди и лобно—теменного — кзади. Расстояние от лобно—теменного и лобно—носового швов до фрезевого отверстия 4,5 мм, от сагитального — 3 мм. Фрезевое отверстие расширяли путем резекции чешуи лобной кости до размеров $1 \times 0,5$ см. Твердую оболочку ГМ вскрывали дугообразно. С использованием операционного микроскопа ($\times 12$; Carl Zeiss, Германия) визуализировали пре— и постцентральные извилины коры правого полушария большого мозга, специальным устройством (согнутая на конце игла, длина перпендикулярного к оси плеча 2,5 мм) в центре трепанационного окна наносили травму, формируя зону поражения размерами $2 \times 2,2 \times 2$ мм в задне—лобно—теменной области, в проекции первичной двигательной зоны [3]. Проводили тщательный гемостаз.

ТОЛ выделяли у половозрелых самок крыс белой беспородной линии в возрасте 5,5 мес сразу после эвтаназии путем передозировки смеси приведенных наркотических средств. В стерильных условиях материал максимально очищали от со-

судистой оболочки, измельчали до фрагментов размерами 3×2 мм. Аллогенную ФНТ выделяли от эмбрионов на 18—е сутки гестации, формировали фрагменты размерами 3×2 мм, которые до момента трансплантации сохраняли в изотоническом растворе натрия хлорида при температуре 37°C .

Трансплантацию фрагментов ткани осуществляли в сформированное ложе (период от взятия трансплантата до его трансплантации в мозг реципиента не более 30 мин).

Апоневроз и кожу зашивали послойно полиамидными хирургическими нитками. Участок раны обрабатывали 5% спиртовым раствором йода. Животных в течение 2 — 4 ч содержали при температуре воздуха $30 - 33^\circ\text{C}$, в дальнейшем — в специальных клетках по 3 — 6 особей в каждой при средней температуре $21 - 24^\circ\text{C}$, при условии постоянного вентилирования помещения [4].

Материал для гистологического исследования отбирали после выведения животных из эксперимента на 7—е, 14—е сутки путем передозировки наркотических препаратов. ГМ извлекали и переносили в 20% раствор нейтрального формалина. Фрагменты ткани в течение 1 сут выдерживали в этиловом спирте возрастающей концентрации (70%, 96%, 96%), хлороформе (в течение 24 ч), затем — в хлороформе и парафине, заливали в парафин, из блоков готовили срезы толщиной 5 — 10 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, железным гематок-

силином, тионином. Гистологические препараты изучали с помощью светооптического микроскопа Axsiophot (OPTON, Германия) с последующей аналоговой фоторегистрацией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Травма у животных всех групп представлена зоной повреждения в постцентральной области, с неровными краями, разрывом мягких оболочек ГМ, очагами кровоизлияний, деструкцией ткани. Отек и набухание ткани ГМ и мягкой оболочки ГМ отмечали через 24 — 26 ч после травмы. По данным гистологических исследований ткани ГМ, в очагах ушиба обнаружены изменения, проявлявшиеся нарушением морфологических характеристик нейронов, глиальных клеток и соединительнотканых элементов, структуры мягкой оболочки ГМ. Выраженность процесса была одинаковой направленности во всех группах. Общая реакция клеток глии на повреждение проявлялась набуханием клеток, частичным их распадом. В нервных клетках отмечали хроматолиз, вакуолизацию и пикноз. Морфологическая картина мозаичная, с появлением зон разрежения ткани ГМ, выраженного перифокального отека. Наблюдался участок отслоения, разрыхления и утолщения мягких оболочек ГМ.

Ишемические изменения в нервных клетках проявлялись их неравномерной, узловатой формой, вытянутостью, укрупнением глыбок суб-

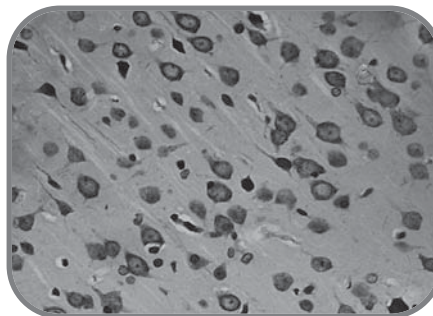


Рис. 1.
Микрофото.
Морфофункциональное состояние нейронов.
Окраска по Нисслю. Ув. $\times 800$.

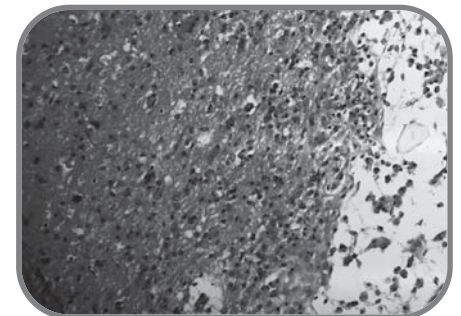


Рис. 2.
Микрофото.
ФНТ.
Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. $\times 400$.

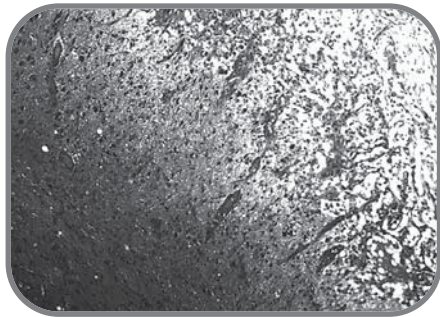


Рис. 3.
Микрофото.
ТОЛ.
Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. ×400.

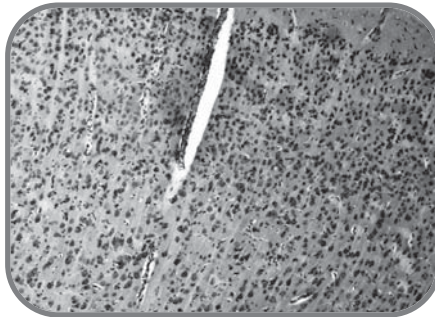


Рис. 4.
Микрофото.
Линейная трещина ткани ГМ на 7-е сутки.
Окраска железным гематоксилином.
Ув. ×400.

станции Ниссля. Некоторые нейроны уменьшены с фрагментацией верхушечных отростков, извитостью (рис.1).

Через 7 сут в углублении дефекта ткани ГМ выявляли фиксацию фрагмента как ФНТ, так и ТОЛ, в виде массивных, различных размеров, округлой формы нейробластов (рис. 2, 3).

Появление макрофагов вблизи зон трансплантации, сохранение признаков перифокального отека на расстоянии, а также единичные

участки разрежения ткани характерны для 14—х суток. Вместе с тем, в зоне ТОЛ выявляли крупные морморфные клетки, очаги активации глии, сосудистый компонент, с сохранением отека на расстоянии от зоны ушиба.

В некоторых наблюдениях сохранялись зоны повреждения в виде тонких, линейных трещин, вокруг которых располагались точечные кровоизлияния (рис. 4).

В зоне дефекта, заполненной ФНТ, выявлены многочисленные

клетки небольших размеров, с темным ядром, макрофаги, соединительная ткань.

Таким образом, при применении ФНТ и ТОЛ в процессе заживления очагов травмы установлена определенная специфика взаимоотношений ткани трансплантата и ГМ. Проявлением компенсаторных реакций были гипертрофия отдельных нейронов, укрупнение глыбок базофильного вещества в цитоплазме, наличие крупного светлого ядра, округленного, с утолщенной ядерной мембраной, гипертрофированное ядрышко. Влияние ФНТ проявлялось более активным участием глиальных клеток в процессе заживления, в то время как ТОЛ выражено активировала процессы образования новых сосудов, преимущественно со стороны травмированного ГМ.

Выбранная экспериментальная модель позволяет изучать возможный нейрогенный, репарационный ответ ткани ГМ при его ушибе, что имеет потенциальное клиническое значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Педаченко ЕГ, Шлапак ИП, Гук АП, Пилипенко МН. Черепно—мозговая травма: современные принципы неотложной помощи. Учеб.—метод. пособие. Киев: Випол; 2009. 216 с.
2. Корочкин ЛИ, Ревещин АВ, Охотин ВЕ. Нейрональные стволовые клетки и их значение в восстановительных процессах в нервной системе. Морфология. 2005;127(3):7—16.
3. Ноздрачев АД, Полякова ЕЛ. Анатомия крысы (Лабораторные животные). СПб.: Лань; 2001. 464 с.
4. Енглезі АП. Комплексний вплив фізичних чинників сумісно з фармакологічними та біологічними засобами лікування на головний мозок при його вогнищевому травматичному пошкодженні (експериментальне дослідження) [автореферат]. Київ; 2010. 36 с.

