

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ САМЦІВ ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР ПРИ МОДЕЛЬОВАНОМУ ІШЕМІЧНОМУ ЕМБОЛІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ

**В.І. Цимбалюк¹, В.В. Колесник¹, І.І. Торяник², О.А. Омельченко³,
А.С. Забірник³, С.Г. Панібратцева³**

¹ ДУ "Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМНУ"

Відділення відновної нейрохірургії (зав. - д-р мед. наук В.І. Цимбалюк)

² ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ"

³ Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

Реферат

Мета. Вивчити ультрамікроскопічні зміни у головного мозку щурів лінії Вістар при модельованому ішемічному емболічному інсульті.

Матеріал і методи. Матеріалом дослідження стали інтактні самці щурів лінії Вістар 3-х місячного віку (n=252) та особини з модельованим ішемічним інсультом, за якими спостерігали протягом 28 діб. Ультрамікроскопічне дослідження проводили традиційно. Шматочки головного мозку видаляли, промивали, фіксували у 2%-му глутаровому альдегіді, піддавали постфіксації у 1%-му оксиді осмію, зневоднювали. Ультратонкі зрізи контрастували, аналізували у електронному мікроскопі ("Олутрис", Японія); фотографували цифровою камерою "Canon EOS-3000".

Результати й обговорення. Встановлено, що протягом 1-ї-17-ї діб спостереження відбувався виразний структурно-функціональний регрес нейроцитів та ендотелію мікросудин головного мозку. Останній пов'язували із розвитком тромбозу, змінами трофіки, розвитком деструкції, некрозу. Характерними морфологічними ознаками вважали зміни у ядерно-цитоплазматичному співвідношенні клітин, розвиток патологічної зернистості, вакуолізацію цитоплазми, гіперхроматоз, каріопікноз, нерозподіл хроматину, появу та позначене збільшення чисельності мегакаріоцитів у кровоносному руслі.

Висновки. Ультрамікроскопічні зміни у корі головного мозку самців щурів лінії Вістар носили фазний характер; залежали від строків дебюту модельованого ішемічного емболічного інсульту; полягали у деструкції ендотеліоцитів, глії, ядерно-цитоплазматичних компонентів нейронів, формуванні у зонах ушкоджень гліальних кист, гліо-сполученотканинних рубців.

Ключові слова: електронно-мікроскопічне дослідження, головний мозок, самці щурів лінії Вістар, модельований ішемічний емболічний інсульт

Abstract

ELECTRON MICROSCOPIC INVESTIGATIONS OF WISTAR MALE RAT BRAINS IN A MODEL OF ISCHAEMIC EMBOLIC STROKE

V.I. TSCHIMBALIUK¹, V.V. KOLESNIK¹, I.I. TORIANIK², O.A. OMELCHENKO³, A.S. ZABIRNIK³,

S.G. PANIBRATCHEVA³

¹ S.E. "Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of UNAMS"

² S.E. "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of UNAMS"

³ Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Aim. To study ultramicroscopic changes in the brain of Wistar rats in a model of ischaemic embolic stroke.

Methods. Three-month-old, intact male Wistar rats (n=252) as a model of ischaemic stroke were observed for 28 days. Ultramicroscopic examination was carried out in the traditional way. Portions of the brain were removed, washed, fixed in 2% glutaric aldehyde, subjected to postfixation in 1% osmium oxide, and dehydrated. Ultrafine sections were contrasted, analysed under an electron microscope, and photographed with a digital camera.

Results. It was found that a pronounced structural-functional regression of neurocytes and endothelium of cerebral microvessels took place during days 1-17. The regression was attributed to development of thrombosis, trophic changes, development of destruction, and necrosis. Characteristic morphological signs consisted of changes in the nucleus/cytoplasm ratio of cells, development of pathological granularity, vacuolization of cytoplasm, hyperchromatosis, karyopyknosis, redistribution of chromatin, and appearance of a markedly increased number of megakaryocytes in the bloodstream.

Conclusions. Ultramicroscopic changes in the cerebral cortex of male Wistar rats were of a phasic character and depended on the terms of the start of the ischaemic embolic stroke. They consisted of destruction of endotheliocytes, glia, and nucleocytoplasmic components of neurons, and formation of glial cysts and glia-connective tissue scars in the areas of the lesion.

Keywords: electronic microscopy, brain, male Wistar rats, ischaemic embolic stroke model
e Wistar rats, modelled ischaemic embolic stroke

Вступ

На сьогодні ішемічний інсульт розцінюється фахівцями як загрозлива проблема сучасної неврології. В Україні за даними Держкомстату від нього страждає понад 110-130 тисяч населення [1, 2]. У дослідників сформувалося ставлення до інсуль-

ту як до невідкладного стану з рівнем летальності більшим, ніж у переважної чисельності типів раку. Із огляду на це, запорукою успішної інтервенції інсульту вважають його раннє розпізнання [3]. У розв'язанні цієї проблеми певне місце відводиться використанню арсеналу високотехнологічних засобів діагностики (електронна мікроскопія), що надають остаточної відповіді стосовно характеру ушкоджень, їхньої глибини, відновних резервів, строків реалізації останніх [4]. Впровадження ультрамікроскопічної діагностики змін у разі інсульту сприяє конкретизації структурно-функціональних критеріїв захворювання, виявленню його первинних ознак. Врахування цих факторів - запорука високої вірогідності ефективного впливу на ішемічний процес [5, 6]. Оскільки дані питання певною мірою залишаються поза увагою фахівців [7], актуальність дослідження ультрамікроскопічних змін при модельованому ішемічному емболічному інсульті, не викликає жодного сумніву.

Матеріал і методи

Матеріалом дослідження стали інтактні самці щурів лінії Вістар 3-х місячного віку ($n=252$) та особи з модельованим ішемічним інсультом [6, 8], за якими спостерігали протягом 28 діб. Тварин виводили із експерименту шляхом передозування кетамінового наркозу із розрахунку 250 мг на кг ваги тварини. Метод електронної трансмісійної мікроскопії використовувався для виявлення та вивчення ультраструктурних змін у двомірній системі координат. Шматочки головного мозку, судин об'ємом 0,1 см. куб. видаляли, промивали у проточній воді. Отриманий матеріал фіксували у 2%-му глутаровому альдегіді на фосфатному буфері ($pH=7,3-7,4$). За цим фрагменти піддавали постфіксації у 1%-му оксиді осмію на фосфатному буфері ($pH=7,3-7,4$), зневоднювали у спиртах, ацетоні, заливали в епон-аралдит. Ультратонкі зрізи, товщиною 40-50 нм, виготовляли на ультратомі (Reicherdt-Jung (Австрія), контрастували ураніл-ацетатом, цитратом свинцю, аналізували ($\times 6000$; $\times 8000$; $\times 10000$; $\times 15600$; $\times 16800$; $\times 20400$) у електронному мікроскопі ("Olympus", Японія). Аналіз результатів дослідження проводили у порівняльному аспекті (у залежності від експозиційних строків спостереження). Фотографування виконували за допомогою цифрової камери "Canon EOS-3000".

Результати й обговорення

Електронно-мікроскопічне дослідження кори головного мозку щурів лінії Вістар контрольної групи цілком відповідали статеві-віковій нормі лабораторних тварин зазначеної лінії, вогнища запалень, кальцинозу, крововиливів не спостерігали. Із огляду на останнє, морфологічна характеристика зразків препаратів у даній групі не деталізували.

Ультрамікроскопічне дослідження за умов модельованого ішемічного інсульту продемонструвало наявність змін, що носили фазний характер, залежали від експозиційних строків експериментального періоду [9], стосувались ультраструктури нейроцитів, гліальних елементів та мікросудин. Найбільш виразні зміни у будові структур головного мозку лінійних щурів, які характеризували першу добу спостереження, пов'язували із дебютом некротичних процесів. Останні позначались наявністю нейроцитів з ознаками ушкоджень: вакуолізація, пікноз ядер, ектопія ядерця, вакуолізація цитоплазми, збільшення лізосомальних включень, гіперхромність. Геометричність зовнішньої будови ушкоджених нейронів повторювали ядра та ядерця останніх, що характеризувались гіперхромністю та гомогенністю структури, завдяки чому зливалися із цитоплазмою, повністю втрачаючи з нею межу (рис. 1). Дифузно зосереджені ушкоджені нейроцити реєстрували у декількох зонах іпсілатеральних

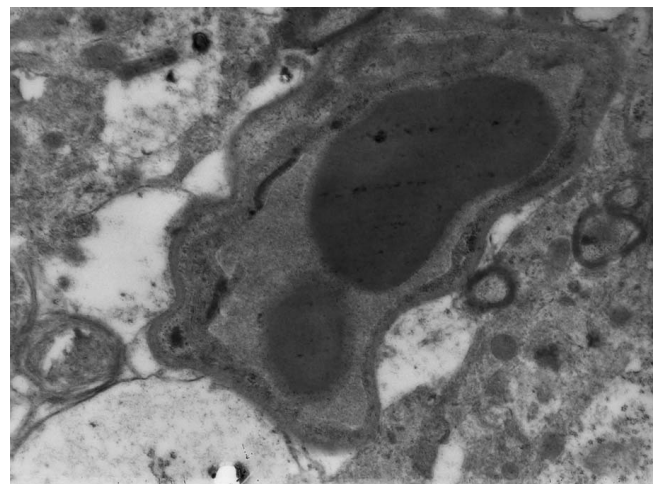


Рис. 1

Ділянка головного мозку самця щура лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, перша доба спостереження). Еритроцитарні клітини у отворі капіляра. Деструкція стінки капіляра. Периваскулярний набряк. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: $\times 15600$

півкуль головного мозку. Контралатеральна півкуля нараховувала лише поодинокі ушкоджені клітини. В ультраструктурі капілярів (у зазначений період) виявляли первинні ознаки ушкодження стінок зі змінами розмірів отворів мікросудин. Циркулюючу популяцію еритроцитів доповнювали мегакаріоцити, доки що поодинокі тромбоцитарні пластини.

Третя доба спостереження позначалась посиленням деструктивних процесів у нейронах. Відзначали клітини з ознаками хроматолізу (зникнення цитоплазматичних включень, розчинення мембранних структур, деструкція ендоплазматичного ретикулуму, заміщенням цистерн групами дискретних бульб). Відмічались поява вакуоль, зникнення рибосом. Цей період дослідження характеризувався більшою виразністю ультрамікроскопічних змін, що відбувались у структурі капілярів. Дистрофія клітин, які утворювали їхні стінки супроводжувалась процесами накопичення лізосомальних включень, ліпофусцинових гранул, розпадом мітохондрій. У внутрішньому шарі відмічали розростання та гіперплазію ендотелію. Характерними для цієї доби стали набряк астроцитарних відростків, поява скупчень гліальних клітин. Деструктивно-дегенеративні процеси носили розповсюджений характер, передували некрозу. В ділянках зосередження патологічно змінених капілярів спостерігали клітини

тінні (каріоцитолізіс). За цим чітко прослідковувалась залежність змін елементів одного ланцюга: нейронит- капіляр- глія [10] (рис. 2). Сьома доба спостереження у групі тварин з модельованим ішемічним інсультом демонструвала незначне пригальмовування руйнівних процесів. Некротичні зони видавались неоднорідними, "мозаїчними". На тлі руйнацій цитоархітектонічної організації кори (відсутність диференціації першого та другого шару), спостерігали великі зони розм'якшення некротичних вогнищ, в центрі яких зосереджувались аморфні маси загиблої тканини. Утилізація детриту реєстрували лише у незначних фрагментах ушкоджених областей головного мозку. На межі кори та прилеглих до неї оболонок спостерігали скупчення фіброblastоподібних клітин (результати розростання ушкоджених мозкових оболонок). Некротичні ділянки оточували скупчення лейкоцитів. Процеси руйнації ініціювали розвиток запальних реакцій (лейко-лімфоцитарна інфільтрація). У безпосередній близькості до них реєстрували ділянки астроцитів. Відзначався обережний старт організації деструктивних вогнищ, який супроводжували проліферація фіброастроцитів, новоутворення мікросудин та колагенових волокон [11, 12] (рис. 3). У отворах капілярів-стабілізований цитологічний спектр (еритроцити, лейкоцитарні клітини). Чисельність тромбоцитів суттєво змен-

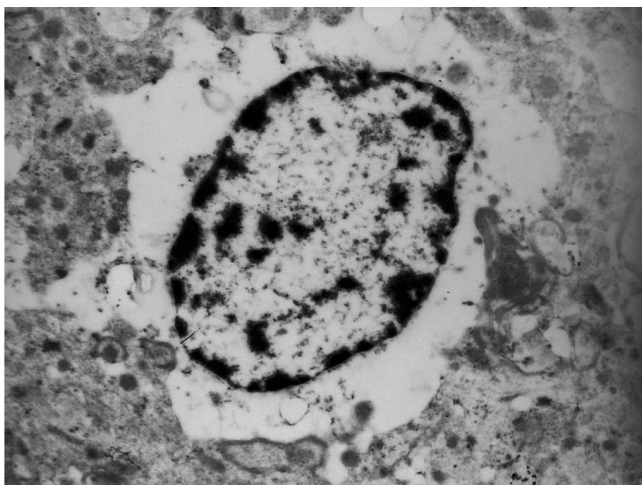


Рис. 2

Ділянка головного мозку самця щура лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, третя доба спостереження).

Нейронит з ознаками лізису та деструкції цитоплазматичної мембрани, клітинних органел.

Перинуклеарний набряк. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: x 8000

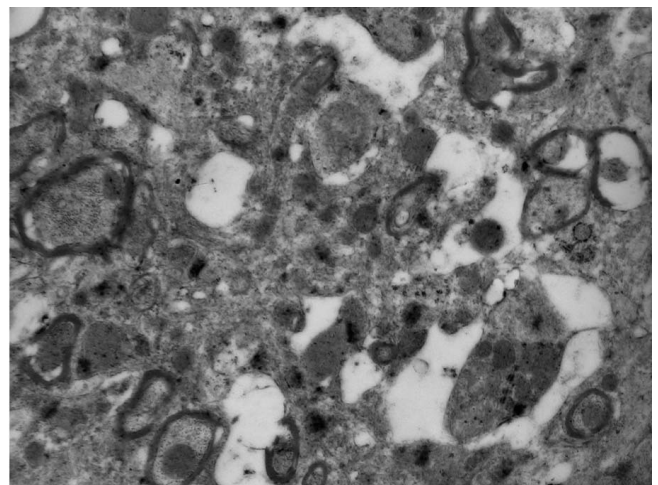


Рис. 3

Ділянка головного мозку самця щура лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, сьома доба спостереження).

Глибчастий розпад речовини головного мозку.

Кистоподібні порожнини. Деструкція мієлінових та безмієлінових нервових волокон. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: x 8000

шена, мегакаріоцити-поодинокі.

На чотирнадцяту добу спостереження відзначали інтенсифікацію процесів, пов'язаних із утилізацією клітинного детриту та організацією деструктивних вогнищ. Зазначені процеси супроводжували формування лікворно-гліальних кист, утворення гліальних рубців. У зонах колишніх вогнищ некрозів - різні за величинами та розмірами порожнини з наявними оболонками, утвореними одним-декількома шарами гліальних клітин. Рубці, що формувались із кількох упорядкованих шарів астроцитів, у разі розповсюдженості ушкоджень набували ознак змішаного типу (гліо-сполученотканинного). У крайових із ушкодженими зонах спостерігали ріст капілярів. Ознаки деструкції мієлінових та без мієлінових нервових волокон залишались збереженими (рис. 4). Отвори мікросудин чітко визначені. Цитологічний спектр крові представлений еритроцитарними формами, лейкоцитами. Осередки тромбоутворення поодинокі. Мегакаріоцити в полі зору зразків (електронні мікрофіші) не спостерігались. На сімнадцяту добу експерименту зміни у тканині півкуль головного мозку видавались схожими до тих, що реєструвались у попередній дослідний період. Зростали процеси, пов'язані із утилізацією клітинного детриту та організацією деструктивних вогнищ. Утворення лікворно-гліальних кист, гліальних рубців тривало. На місцях колишніх вогнищ некрозів з'являлись різні за величинами та розмірами порожнини з наявними оболонками, що долучали декілька шарів гліальних клітин. Гліальні рубці за умов розповсюдженості ушкоджень набували ознак змішаного типу (гліо-сполученотканинний). Мікросудини позначені. Цитологічний спектр циркулюючої крові ставий.

Двадцять перша доба спостереження знаменувала завершення процесів формування гліального рубця, структурного оформлення лікворно-гліальних кист. Гліальний рубець містив 3-5, подекуди 5-7 шарів клітин, з чіткою диференціацією, відокремлений від оточуючої тканини. Кисти, різні за формою, великі за розмірами, зосереджені на ділянках колишніх некрозів. Нейроцити з ознаками гомогенізації цитоплазми, пікнозом, каріорексисом. Явища гліозу виразні, розповсюджені (кора субкортикальні центри); слугували своєрідним підтвердженням щодо механізмів

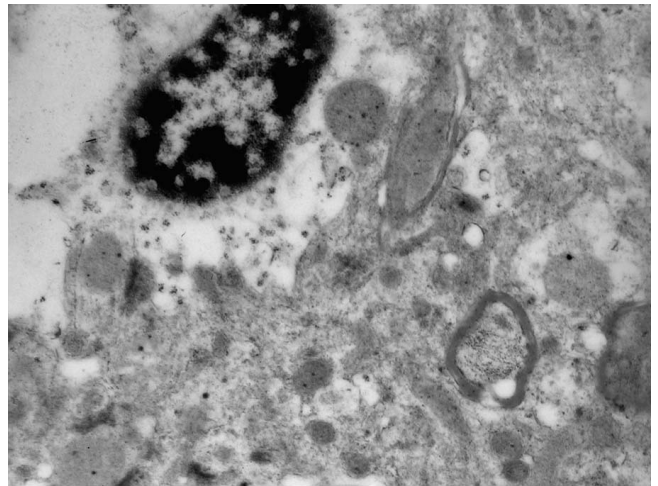


Рис. 4

Ділянка головного мозку самця щура лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, чотирнадцята доба спостереження). Глибокий розпад речовини головного мозку. Деструкція мієлінових та безмієлінових нервових волокон. Гіперконденсація хроматину клітинного ядра. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: x 8000

спорідненості формування останніх у нервовій тканині [14]. Двадцять восьма доба експерименту свідчила на користь остаточного завершення процесів формування гліального рубця, лікворно-гліальних кист та утилізації клітинного детриту.

Висновки

Ультраматроскопічні зміни у корі головному мозку самців щурів лінії Вістар носили фазний характер; залежали від строків дебюту модельованого ішемічного емболічного інсульту (перша-двадцять восьма доба спостереження); полягали у деструкції ендотеліоцитів, глії, ядерно-цитоплазматичних компонентів нейронів, (вакуолізація цитоплазми, гіперхроматоз, пікноз, каріорексис з подальшим некрозом), формуванні у зонах ушкоджень гліальних кист, гліо-сполученотканинних рубців.

Література

1. Vilenskiy B.S. Stroke- modern state of this problem. Neurologicheskii zshurnal 2008; 2: 4-10. Russian: Виленский Б.С. Инсульт-современное состояние проблемы. Неврологический журнал 2008; 2: 4-10).
2. Mischenko T.S., Zdesenko O.V., Kolenko O.I. et al. Epidemiology of cerebral stroke in Ukraine Ukrainskiy visnyk psichonevrologij 2005; 13,1: 23-28. Ukrainian: (Мищенко Т.С., Здесенко І.В., Коленко О.І. та ін. Епідеміологія мозкового інсульту в Україні. Український вісник психоневрології 2005;13, 1: 23-28).
3. American Heart Association [American Heart Association

- / Heart Disease and Stroke Statistics.] [Электронный ресурс]. - Update, Dallas TX, 2007. - P. 36-41. Режим доступа: <http://www.americanheart.org/statistics>.
4. Andriessen T. M. J. C. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury / T. M. J. C. Andriessen, B. Jacobs, P. E. Vos // J. Cell. Mol. Med. - 2010. - Vol. 14, N 10. - P. 2381-2392.
 5. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change / G. Tyson, G. Teasdale, D. Graham, J. Mc Culloch // Ann. Neurol. - 2004. - Vol. 15. - P. - 559-567.
 6. Kolesnik V. V. Experimental thromboembolic stroke in Wistar rats as the pathophysiological model variant of acute blood microcirculation disorders for the ischemic type. Patologija 2011; 1: 56-59. Ukrainian: (Колесник В.В. Експериментальний тромбоемболічний інсульт у щурів лінії Вістар як варіант патофізіологічної моделі гострих порушень мікроциркуляції за ішемічним типом. Патологія 2011;1: 56-59).
 7. Mohr J.M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / J.M. Mohr, D.W. Choi, J.C. Grotta. - Philadelphia: Livingstone, 2004. - p.1245-8.
 8. Nozdrachov A.D., Poliakov E.L.; in edit. by acad. A.D. Nozdrachov. Rat Anatomy: (laboratory animals). StP.: Lan' 2001: 464. Russian: (Ноздрачев А.Д. Поляков Е. Л.; под ред. акад. А.Д. Ноздрачева. Анатомия крысы: (лабораторные животные). Спб.: Лань; 2001: 464).
 9. Arushunian E.B. Chronobiological particularity of stroke and protective role of epiphysal melatonin. Bukovinskiy medichniy visnyk 2009; 4: 10-16 Ukrainian: (Арушанян Э.Б. Хронобиологические особенности инсульта и защитная роль эпифизарного мелатонина. Буковинський медичний вісник 2009;4:10-16).
 10. Tschimbaliuk V.I., Kolesnik V. V., Torianik I.I. Ischemia as a starting mechanism of micro and ultrastructural changes in the chain of neurocytes-capillary-glya. Ukrajiniski neyrochirurgichniy zshurnal 2010; 3: 65. Russian: (Цымбалюк В.И., Колесник В.В., Торьяник И.И. Ишемия как пусковой механизм микро и ультраструктурных изменений в цепи нейроцит-капилляр-глия. Український нейрохірургічний журнал 2010;3:65).
 11. Jablonska A. Stroke induced brain changes: implications for stem cell trans-plantation/A.Jablonska, B.Lukomska// Acta Neurobiol. Exp.-2011.-Vol.71.-P.74-85.
 12. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats /Y. Taguchi, S. Takashima, E. Sasahara // Archives of Histology and Cytology. - 2004. - Vol. 67, № 3. - P. 253-261.
 13. Xiong Y., Mahood A., Choop M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function follow injinjury // Curr. Opin Investig. Drugs.-2010.-Vol.-11.-P.298-308.