

Ключевые слова: супраоптичне ядро, гіпоталамус, крыси линии Вистар, морфо-гистохимическое состояние.

Стаття надійшла до редакції 07.05.2014 р.

Ганчева Ольга Викторовна (Hancheva Olga Viktorovna) - д. мед. н., профессор кафедри патологической физиологии Запорожского государственного медицинского университета; +38 0612 34-35-61; gancheva_olga@mail.ru

© Торяник І.І., Колесник В.В.*

УДК: 616.33-413-005.1-005.4-085

Торяник І.І., Колесник В.В.*

ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України" (вул. Пушкінська, 14-16, м.Харків, 61057, Україна); *ДУ "Інститут нейрохірургії ім. А.П.Ромоданова НАМН України" (вул. Мануїльського 32, м.Київ, 04050, Україна)

МОРФОЛОГІЧНИЙ ДИЗАЙН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Резюме. Стаття присвячена вивченню морфологічних особливостей розвитку експериментального емболічного ішемічного інсульту у щурів лінії Вистар. Авторами мікроскопічно, ультрамікроскопічно, із залученням резервів люмінесцентної мікроскопії доведена наявність характерних структурних ознак ішемічного інсульту (гліо-сполучнотканинного рубця, гліальних кист), що виникли внаслідок введення штучних емболів на функціонуючому кровотоці. Приведена морфометрична оцінка отриманих в експерименті змін. Підсумки досліджень узагальнюються панорамним ілюстративним матеріалом.

Ключові слова: експериментальний емболічний ішемічний інсульт, морфологічні зміни, світлооптичне, трансмісійне електронно-мікроскопічне дослідження.

Вступ

Ішемічний інсульт (інфаркт мозку) - гострий розлад мозкового кровообігу з ураженням речовини мозку, порушенням його функції внаслідок погіршення або припинення кровопостачання [Виленский, 2008]. На думку фахівців, інсульт залишається невідкладним станом з більш високою смертністю, ніж при онкологічних захворюваннях [Зозуля, Мошенська, 2009]. За експертними даними, у світі щорічно виявляється 15 млн випадків захворювань на інсульт, 5 млн із яких завершуються летально. Епідеміологічна ситуація з інсульту свідчить на користь того, що переважна більшість смертей, обумовлених згаданою патологією, відбувається у хворих, за віком молодших 70-75 років. Саме цей факт забезпечив інсульту, як причині летальності, другу за значенням позицію серед захворювань у світі [Kennedy, Lees, 2009]. Зазначена проблема, безсумнівно, потребує термінового розв'язання, успішною запорукою якого стає рання та якісна клініко-морфологічна діагностика інсульту. Застосування арсеналу високотехнологічних засобів діагностики надає конкретної відповіді стосовно етіотропної терапії інсульту, способів та строків її виконання [Цимбалюк та ін., 2010]. Врахування останніх факторів сприяє високій вірогідності здійснення ефективного впливу на ділянки ішемічних процесів у корі, відновлення охоплених деструкцією, некрозом зон мозку [Торяник, Колесник, 2010; Sahota, Savitz, 2011]. Саме ці питання, як свідчить проведений аналіз літератури, залишились поза увагою хірургів та нейротрансплантологів [Andriessen et al., 2010]. На сьогодні актуальною залишається проблема вибору найбільш дієвих способів введення клітинних суспензій в організм [Jablonska, Lukomska, 2011; Liman, Endres, 2013]. Фахівцями не досягнута однаковість у розв'язанні питань

доцільності та ефективності лікування ішемічного інсульту. Спеціалісти обговорюють переваги у виборі між його малоінвазивними та травматичними способами [Zhao, Rempe, 2010]. На теперішній час відсутній однозначний погляд, щодо стартових строків терапії. Недостатньо вивченими є найближчі та віддалені наслідки [Moran et al., 2012]. Відкритим залишається питання щодо механізмів лікувального впливу на інсульт. Зважаючи на все зазначене вище, дослідження морфологічних аспектів ішемічного емболічного інсульту в експерименті на самцях щурів лінії Вистар, є актуальним.

Мета дослідження: вивчити морфологічні особливості перебігу експериментального ішемічного емболічного інсульту у щурів лінії Вистар.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження послуговували самці щурів лінії Вистар (n=254), 3-х місячного віку, вагою 160-175 г, інтактні та з модельованим ішемічним інсультом, які утримувались у стандартних умовах виварію. Задля створення моделі ішемічного інсульту у експериментальних тварин застосовували емболію колатеральних гілок загальної сонної артерії правої півкулі головного мозку [Торяник, Колесник, 2010]. Щурів наркотизували кетаміном інтраперитоніально: із розрахунку 125 мг на кг ваги тварини. Емболізацію колатеральних судин проводили за рахунок завісу сульфату барію (ІІ). Спостереження проводили впродовж перших 1, 3, 7, 14, 17, 21 та 28 діб. Тварин виводили з експерименту шляхом надання надмірної дози наркозу та наступної декапітації.

Гістологічні препарати виготовляли за традиційною схемою. Шматочки головного мозку тварин фіксували

у 12% розчині формаліну на фосфатному буфері (рН=7,0-7,2), зневоднювали у батареї спиртів зростаючої концентрації. З парафінових блоків виготовляли зрізи, які забарвлювали у залежності від мети та завдань роботи (гематоксиліном-еозином, залізним гематоксиліном за Рего, імпрегнацією азотно-кислим сріблом за Кахалем). Морфологічні зміни аналізували із використанням світлооптичного мікроскопу ЛОМО (x100; x200; x300; x400).

Для електронної трансмісійної мікроскопії шматочки головного мозку, судин об'ємом 0,1 см. куб. видаляли, промивали. Матеріал фіксували у 2% глутаровому альдегіді на фосфатному буфері (рН=7,3-7,4). Потім фрагменти піддавали постфіксації у 1% оксиді осмію на фосфатному буфері (рН=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 (x6000; x8000; x10000; x15600; x16800; x20400) за допомогою електронного мікроскопа ("Olympus", Японія). Фотографували, використовуючи цифрову камеру "Canon EOS - 3000". Ідентичні показники піддавали узагальненню; статистичну обробку здійснювали, користуючись загально відомим пакетом програм "Statistica".

Результати. Обговорення

Структура головного мозку щурів групи інтактного контролю. У результаті проведеного комплексного дослідження було встановлено, що структура кори та білої речовини півкуль головного мозку в групі щурів інтактного контролю відповідала структурно-функціональним показникам статево-вікової норми (рис. 1, 2). Шари неокортексу чітко диференційовані, цілісні. Волокна білої речовини без ознак ушкоджень. Судини відповідним чином контрастовані, їхні стінки структуровані, без ознак десквамації, дефектів, емболів, тромбозу, стазів. Ультраматроскопічно реєстрували нейрцити з чітко контрастованими ядром, ядерцем, компонентами цитоплазми. Каріорексис, пікноз - відсутні.

Структура головного мозку групи щурів з модельованим ішемічним інсультом. Модельований ішемічний інсульт, який було отримано в експерименті у самців щурів лінії Вістар носив фазний характер [Колесник, 2011]. За патогенезом цілком відповідав природному прототипу, та був пов'язаний зі строками відтермінованості свого дебюту [Колесник, 2013]. На 1 добу спостереження відмічали наявність "штучних" емболів, утворених частками завису барію (II), порушення цілісності стінок капілярів, їхнє розшарування. Останнє сприяло розвитку ішемії. Пов'язаний з нею розлад трофічних процесів призводив до деструкції кори з її подальшою руйнацією [Xiong et al., 2010]. Третя доба експерименту позначалась посиленням інфільтрації, формуванням некротичних вогнищ (червоні та змішані інфаркти), тромбозу судин, стазу (в отворах судин - чисельні еритроцитарні тромби, подекуди мегакаріоцити в стані секвестрації. Виявляли нейрцити з ознаками деструкції цитоплазматичних компонентів, каріорексисом і появою еухроматину. Саме в цей період вперше відмічали появу астроцитів, перших лікворно-гліальних кист. На 7 добу спостереження тривало утворення колагенових волокон, лікворно-гліальних кист, кистоподібних порожнин, з'являлись фібробласти (рис. 3). Еритроцитарні тромби зберігались. В отворах судин реєстрували поодинокі мегакаріоцити. Мала місце дистрофія стінок капілярів з виразною вакуолізацією базальної мембрани, розшаруванням. На 14 добу реєстрували збільшення чисельності кистоподібних порожнин, генералізацію вогнищ некрозів, посилення інфільтрації, проліферативних процесів, хроматоліз нейрцитів; 17 та 28 доба експерименту знаменували завершення процесів фор-

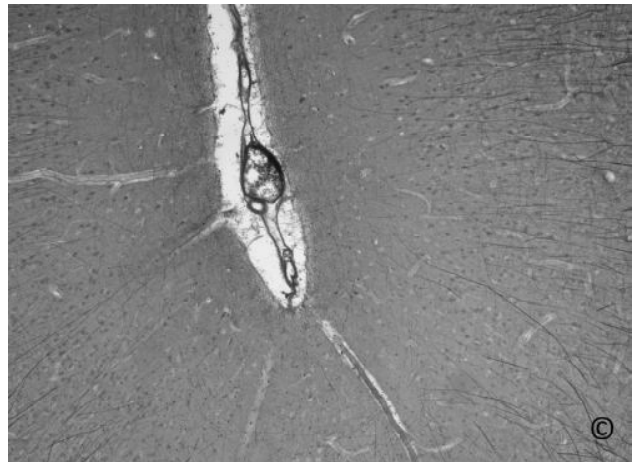


Рис. 1. Кора правої півкулі головного мозку самця щурів лінії Вістар 3-місячного віку (група порівняльного контролю, 1 доба спостереження). Імпрегнація азотно-кислим сріблом за Кахалем. x100.

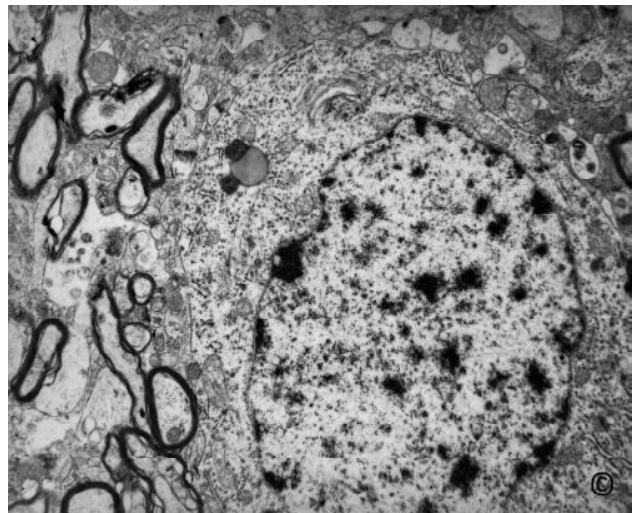


Рис. 2. Головний мозок самця щура лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин інтактного контролю, перша доба спостереження). Коркова речовина. Нейроцит. Мієлінові волокна (ліворуч від клітини). Контрастування за Рейнольдсом. x6000.

роцитарні тромби, подекуди мегакаріоцити в стані секвестрації. Виявляли нейрцити з ознаками деструкції цитоплазматичних компонентів, каріорексисом і появою еухроматину. Саме в цей період вперше відмічали появу астроцитів, перших лікворно-гліальних кист. На 7 добу спостереження тривало утворення колагенових волокон, лікворно-гліальних кист, кистоподібних порожнин, з'являлись фібробласти (рис. 3). Еритроцитарні тромби зберігались. В отворах судин реєстрували поодинокі мегакаріоцити. Мала місце дистрофія стінок капілярів з виразною вакуолізацією базальної мембрани, розшаруванням. На 14 добу реєстрували збільшення чисельності кистоподібних порожнин, генералізацію вогнищ некрозів, посилення інфільтрації, проліферативних процесів, хроматоліз нейрцитів; 17 та 28 доба експерименту знаменували завершення процесів фор-

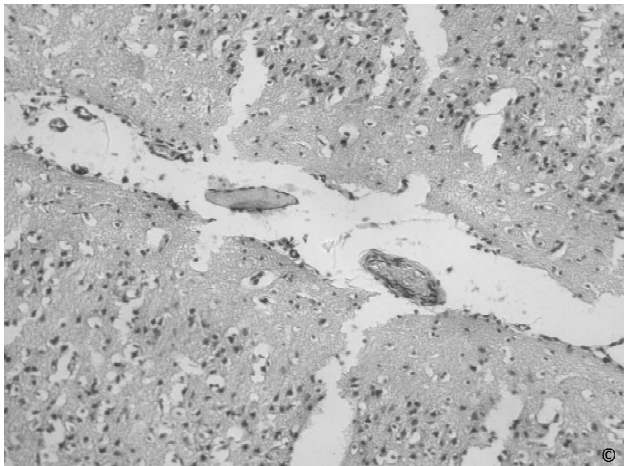


Рис. 3. Кора правої півкулі головного мозку самця щурів лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом. 7 доба спостереження). Гематоксилін-еозин. x300.

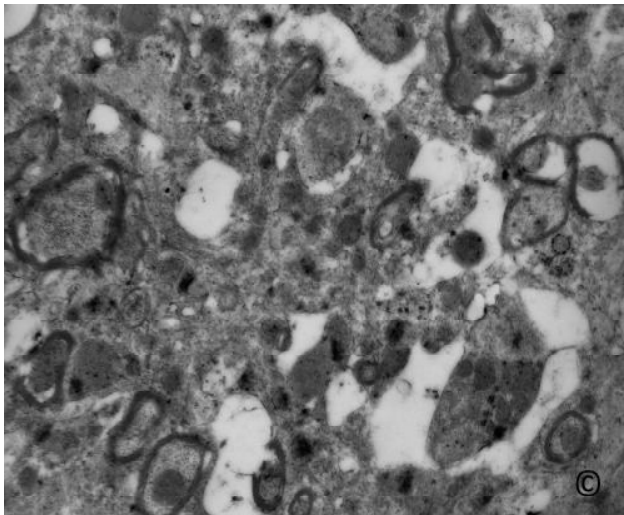


Рис. 4. Ділянка головного мозку самця щура лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, 7 доба спостереження). Глибчастий розпад речовини головного мозку. Кистоподібні порожнини. Контрастування за Рейнольдсом. x8000.

мування гліо-сполучнотканинних рубців, лікворно-гліальних кист, організацію некротичних вогнищ, очищення тканини головного мозку від клітинного детриту (фагоцитоз) (рис. 6).

Ультрамікроскопічний аналіз ділянок кори головного мозку щурів лінії Вістар за умов модельованого ішемічного емболічного інсульту показала наявність змін, що залежали від строків відтермінації експериментального періоду. Вони стосувались, головним чином, ультрамікроскопічної будови нейронів, гліальних елементів та мікросудин. Найбільш виразні зміни були отримані у тварин експериментальної групи, котрих виводили з експерименту на 1 добу спостереження. Останні пов'язувались з дебютом некротичних процесів та позначались: вакуолізацією, пікнозом ядер, ектопією ядерця,

вакуолізацією цитоплазми, збільшенням лізосомальних включень, гіперхромністю. Зовнішні контури ушкоджених клітин повторювали ядра, ядерця, які характеризувались гіперхромністю та гомогенністю структури, завдяки чому в окремих випадках нібито зливались із цитоплазмою, втрачали межу. На електронно-мікроскопічних фішах судин виявляли первинні ознаки ушкодження стінок зі змінами розмірів отворів, набряком ендотеліоцитів, послабленням їхніх взаємних контактів. Циркуючу 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), деструкцією ендоплазматичного ретикулу, заміщенням цистерн групами дискретних бульб). Відмічались поява вакуоль та 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 та розпадом мітохондрій. У внутрішньому шарі відмічали розростання та гіперплазію ендотелію. Характерними для цієї доби були набряк астроцитарних відростків, поява гліальних клітин. Відбувалось посилення деструктивно-дегенеративних процесів, що передували некрозу. На ділянках зосередження патологічно змінених капілярів спостерігали клітини-тіні (каріоцитолізис), що відповідало змінам елементів одного ланцюга: нейроцит - капіляр - глія (рис. 2).

Сьома доба спостереження у групі тварин з модельованим ішемічним інсультом свідчила на користь незначного зниження темпів руйнівних процесів. Некротичні зони видавались неоднорідними, "мозаїчними" ("феномен шахівниці"). На тлі руйнацій цитоархітектонічної організації кори (відсутність диференціації першого та другого шару), спостерігали великі зони розм'якнення некротичних вогнищ з глибчастим розпадом речовини мозку (рис. 4). Утилізацію детриту реєстрували лише у незначних фрагментах ушкоджених областей головного мозку. На межі кори та прилеглих до неї оболонок спостерігали скупчення фібробластоподібних 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. В отворах капілярів реєстрували стабілізований цитологічний спектр (еритроцити, лейкоцитарні клітини). Чисельність тромбоцитів суттєво зменшена, мегакаріоцити-поодинокі.

Чотирнадцята доба знаменувала прискорене видалення елементів клітинного детриту та організацію деструктивних вогнищ. Зазначені процеси супроводжували формування лікворно-гліальних кист, утворен-

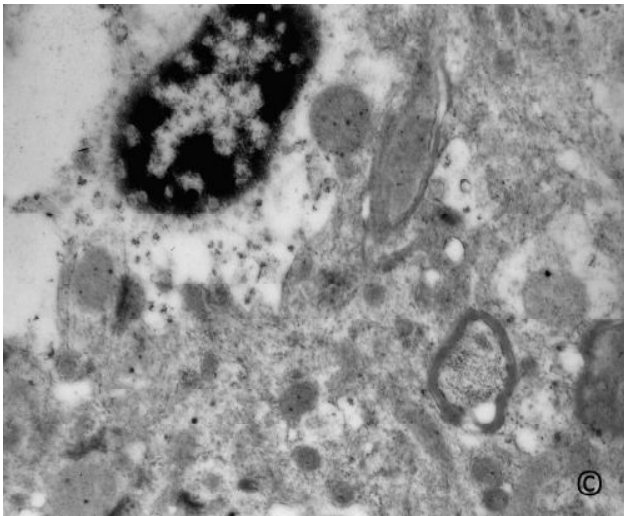


Рис. 5. Ділянка головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, 14 доба спостереження). Деструкція мієлінових та безмієлінових нервових волокон. Гіперконденсація хроматину клітинного ядра. Контрастування за Рейнольдсом. x8000.

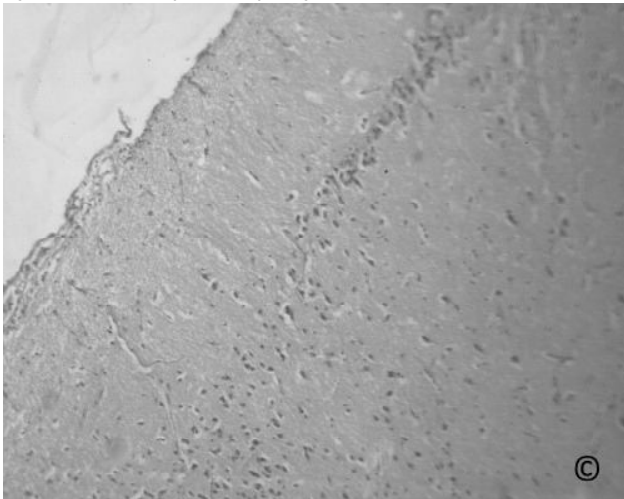


Рис. 6. Кора правої півкулі головного мозку самця щурів лінії Вістар 3-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, 21 доба спостереження). Гематоксилін-езин. x300.

ня гліальних рубців. У зонах колишніх вогнищ некрозів виявляли поліморфні порожнини з наявними оболонками, утвореними одним-декількома шарами гліальних клітин. Рубці набували ознак змішаного типу (гліо-сполучнотканинного). У крайових із ушкодженими зонах спостерігався інтенсивний ріст капілярів, що цілком узгоджувалось з даними літератури [Darland et al., 2011]. Залишались наявними ознаки деструкції мієлінових та безмієлінових нервових волокон (рис. 5). Отвори мікросудин були чітко визначеними. Цитологічний

спектр крові представлений еритроцитарними формами, лейкоцитами, подекуди тромбоцитами. Мегакаріоцити, що у попередні періоди спостереження чітко зосереджувались у полі зору зразків, на тепер взагалі не спостерігались.

На 17 добу експерименту зміни у тканині півкулі головного мозку видавались схожими до тих, що реєструвались у попередній дослідний період. Зростали процеси, пов'язані з утилізацією клітинного детриту та організацією деструктивних вогнищ. Тривало утворення лікворно-гліальних кист і гліальних рубців. Двадцять перша доба спостереження знаменувала завершення процесів формування гліального рубця (містив 3 - 5 шарів клітин) та лікворно-гліальних кист, зосереджених на ділянках колишніх некрозів. Нейроцити з ознаками гомогенізації цитоплазми, пікнозом, каріорексисом. Явища гліозу виразні, розповсюджені (кора субкортикальні центри); слугували своєрідним підтвердженням щодо механізмів спорідненості формування останніх у нервовій тканині.

Двадцять восьма доба експерименту свідчила про остаточне завершення процесів формування гліального рубця, лікворно-гліальних кист, утилізації клітинного детриту.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Спосіб емболізації колатеральних судин частками завсі сульфату барію (II) в умовах функціонуючого кровообігу призводить до гарантованого вимкнення магістрального і колатерального кровообігу у відповідній півкулі головного мозку щурів і розвитку типових ушкоджень, характерних для емболічного ішемічного інсульту.

2. Модельований емболічний ішемічний інсульт носить фазний характер, за патогенезом відповідає природному прототипу та залежить від строків відтермінованості вихідних змін.

3. Морфологічна картина, що супроводжує модельований ішемічний інсульт, характеризується появою у кровотоці мегакаріоцитів, тромбоцитів, "штучних" тромбів, формуванням вогнищ "розм'якнення" (1 доба експерименту); астроцитів, лікворно-гліальних кист (3 доба); утворенням колагенових волокон, гліо-сполучнотканинних рубців (7-17 доба), розвитком фагоцитозу (3-21 доба).

Перспективи подальших розробок полягають у розширенні спектру морфологічних критеріїв діагностики та прогнозу розвитку експериментального ішемічного емболічного інсульту, визначенні наближених та віддалених наслідків гострої ішемії за умов модельованої емболії.

Список літератури

- Виленский Б.С. Инсульт - современное состояние проблемы /Б.С.Виленский //Неврологический журнал. - 2008. - №2. - С.4-10.
- Зозуля І.С. Гострий період ішемічного інсульту: сучасний погляд на проблему /І.С.Зозуля, О.П.Мошенська //Укр. мед. часопис. - 2009. - №4. - С.67-73.

- Колесник В.В. Експериментальний тромбоемболічний інсульт у щурів лінії вистар як варіант патофізіологічної моделі гострих порушень мікроциркуляції за ішемічним типом / В.В.Колесник //Патологія.- 2011.- Т.8.- С.56-59.
- Колесник В.В. Хронологія деструктивно-дегенеративних і воспалительних процесів при експериментальному інсульті головного мозку у крыс лінії вистар /В.В.Колесник //Проблеми екології та мед.- 2013.- Т.17, №5-6.- С.24-28.
- Пат. 5380 Україна, МПК G 09 B23/28 (2006.01) Спосіб моделювання гострого ішемічного церебрального інсульту у щурів /Цимбалюк В.І., Колесник В.В., Микулинський Ю.Ю., Забірник А.С., Панібратцева С.Г.; власник Харківська медична академія післядипломної освіти (ХМА-ПО).- № у 2010 02736; заявл. 11.03.10; опубл. 27.09.10, Бюл. № 18.
- Торяник І.І. Унифіцирований похідний к созданию модели ишемического инсульта головного мозга в эксперименте на крысах линии Вистар / И.И.Торяник, В.В.Колесник //Акт. пробл. сучасної мед.- 2010.- №4.- С.155-159.
- Andriessen T.M. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury /T.M.Andriessen, B.Jacobs, P.E.Vos / /J. Cell. Mol. Med.- 2010.- Vol.14, №10.- P.2381-2392.
- Kennedy R. Stroke: success for acute treatment /R.Kennedy, K.R.Lees //The Lancet Neurology.- 2009.- Vol.8.- P.2-4.
- Liman T.G. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration /T.G.Liman, M.Endres / /Cerebrovascular Disease.- 2012.- Vol.33.- P.492-499.
- Moran C. Cerebral small vessel disease: a review of clinical, radiological, and histopathological phenotypes / C.Moran, G.P.Thanh, V.K.Srikanth. / /International J. of Stroke.- 2012.- Vol.7.- P.36-46.
- Jablonska A. Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation /A.Jablonska, B.Lukomska // Acta Neurobiol. Exp.- 2011.- Vol.71.- P.74-85.
- Sahota P. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery /P.Sahota, S.I.Savitz / /Neurotherapeutics.- 2011.- Vol.8.- P.434-451.
- Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform regulation of early forebrain development /D.C.Darland, J.T.Cain, M.A.Berosik [et al.] //Developmental Biology.- 2011.- Vol.358.- P.9-22.
- Xiong Y. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function follow ing injury /Y.Xiong, A.Mahood, M.Choop //Curr. Opin. Investig. Drugs.- 2010.- Vol.11.- P.298-308.
- Zhao Y. Targeting astricytes for stroke therapy /Y.Zhao, D.A.Rempe // Neurotherapeutic.- 2010.- Vol.7.- P.439-451.

Торяник І.І., Колесник В.В.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Резюме. Стаття посвящена изучению морфологических особенностей развития экспериментального эмболического ишемического инсульта у крыс линии Вистар. Авторами микроскопически, электронно-микроскопически с привлечением резервов люминесцентной микроскопии доказано наличие характерных структурных признаков ишемического инсульта (глио-соединительнотканного рубца, глиальных кист), которые возникли вследствие введения искусственных эмболов на функционирующем кровотоке. Приведена морфологическая оценка полученных в эксперименте изменений. Итоги исследований обобщены панорамным иллюстративным материалом.

Ключевые слова: экспериментальный эмболический ишемический инсульт, морфологические изменения, светлооптическое, трансмиссивное электронно-микроскопическое исследование.

Torianik I.I., Kolesnik V.V.

MORPHOLOGICAL DESIGN OF EXPERIMENTAL ISCHAEMIC STROKE

Summary. The article is devoted to the study of morphological peculiarities in the development of experimental embolic ischaemic stroke in Wistar rats. Microscopically, ultramicroscopically and with engagement of luminescence microscopy reserves the authors prove the presence of typical structural signs of ischaemic stroke (glial-connective tissue scarring, glial cysts), which result from injections of artificial emboli into the functioning blood flow. The changes, got during the experiment, are morphometrically estimated. The outcomes of researches are generalized with panoramic illustrations.

Key words: experimental embolic ischaemic stroke; morphological changes; light optical, transmission electron microscopy study.

Стаття надійшла до редакції 12 травня 2014 р.

Торяник Інна Іванівна - к. мед. н., провідний наук. співробітник ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова НАМН України"; +38 057 738-11-68; kamysh_in@ukr.net

Колесник Володимир Володимирович - аспірант ДУ "Інститут нейрохірургії ім. Ромоданова АМН України"; +38 057 343-12-16; Kolesnik.neuros@mail.ru

© Петрик І.О., Ходаківський О.А.

УДК: 611.12:616.12-008:547.756

Петрик І.О.¹, Ходаківський О.А.²

¹Вінницький обласний наркологічний диспансер "Соціотерапія" (вул. Пархоменка 13, м.Вінниця, 21034, Україна); ²Кафедра фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ОЦІНКА ЗАХИСНОЇ ДІЇ НА МІОКАРД НОВИХ ПОХІДНИХ 3,2'-СПІРО-ПІРРОЛО-2-ОКСІНДОЛУ В УМОВАХ ГОСТРОЇ КАРДІАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Резюме. У досліджах на щурах встановлено, що похідним похідним 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу сполукам з лабораторними шифрами R-86 та R-108 притаманна кардіопротекторна дія, що проявилась надвох моделях гострої кардіальної ішемії