

UDC 616.12:611.018.835:611.89:611.013.395**The CHAIN of HISTOGENETIC PROCESSES ATYPICAL MYOSYTES SINOATRIAL NODE in the EMBRYONIC HUMAN HEART**

Silkina Yu.V.

Summary. Embryonic and fetal human hearts have been investigated on 5-7 week of gestation. Immunohistochemical and lectinohistochemical markers were used: NF, α -SMA, MSA, Ki-67 (LabVision, (DakoCytomation), PNA, WGA, HPA (Lektinotest). Proliferation activity of nodes myosytes dominate untill 8 week gestation. Migration activity atypical myosytes is minimal; they development out of multipotential myocardial cells. The procedure histogenetic processes is: a proliferation – a differentiation – formation of special contacts.

Key words: conductive system, sinoatrial node, human embryonic heart.

Стаття надійшла 12.05.2010 р.

УДК 616.8-022+619:576.535

I. I. Торяник, В. В. Колесник*

МІКРОСКОПІЧНІ ОЗНАКИ ЯК ДОКАЗОВИЙ ІНСТРУМЕНТ У ФАКТАХ ФОРМУВАННЯ ТА РОЗВИТКУ МОДЕЛЬОВАНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України» (м. Харків)*****ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України» (м. Київ)**

Представлена робота являє собою фрагмент науково-дослідницької тематики: «Розробка технології отримання аутоклітин різних типів біологічних тканин із стромальних клітин кісткового мозку і застосування їх для лікування захворювань різного генезу за допомогою аутотрансплантації», номер держреєстрації 0106 U003995.

Вступ. На думку фахівців, інсульт являє собою невідкладний стан з більш високою летальністю, ніж переважна чисельність типів раку [6]. Ось чому зрозумілою запорукою успіху інтервенції останнього є раннє розпізнання, діагностика та адекватне клінічному перебігу лікування. «Ланки ланцюга спасіння», що інтерпретується у широких неврологічних колах як найбільш оптимальна тактика, включають п'ятькомпонентів, серед яких провідне місце посідають методи: верифікація (нейровізуалізація) та відповідна нано-технологічна терапія [6,7]. Однією із новаторських вважають технологію використання клітин стромальних компонентів, рекомбінантних тканевих активаторів з метою інтервенції та превентивної захворювань неврального генезу. На сьогодні відомі західні та вітчизняні нейрохірургічні школи

завважують до свого арсеналу сучасні високотехнологічні експериментальні методи дослідження та лікування ішемічного інсульту [3,4,12]. Переважна більшість із них стосуються, як правило, створення адекватних і доступних моделей на тваринах в умовах подальших перспектив застосування новітніх засобів лікування [9]. Проте, кожна із експериментальних моделей якою б конструктивною вона, з точки зору дослідника, не видавалась, вимагає певного обґрунтування. Результати моделювання у тварин (лабораторні щури) захисту білої речовини, глії чи субкортикальних нейронів логічно екстраполюються на цільову популяцію хворих з первинним інсультом [5,10]. Тому створення експериментальної моделі інсульту у тварин вимагає залучення об'єктивних морфологічних методів оцінки (характеру оклюзії середньої мозкової артерії, базальних гангліїв, білої речовини) [11]. Окремими авторами зауважується, що майже всі нейропротектори справляють свою дію безпосередньо на рецептори або шляхом внутрішньонейрональних механізмів. Відношення останніх до глії чи білої речовини невідоме, проте можливе шляхом застосування гістологічних методів

дослідження. Методи цитологічної оцінки цілісності аксонів вимагають подальшої розробки.

До теперішнього часу відсутні дані (*in vivo*) щодо підтримки спроможності лікарських засобів запобіганню впливу ішемії безпосередньо на білу речовину головного мозку [11]. За даними дослідників, не має апріорних причин чекати на ефективність нейропротекторних засобів за умов широкого спектру клінічних синдромів інсульту: логічнішим кроком було б обмежене включення у досліді хворих із інсультами, що викликають ішемію кори і вимагають корекцій та змін клінічної та рентгенологічної оцінки досліджень [7]. Одним із найдієвіших та доказових інструментів у доведенні фактів формування та розвитку ішемічних інсультів в експерименті також вважають мікроскопічні ознаки [1,2,13]. Отже, вивчення останніх є важливою дослідницькою проблемою, що беззаперечно прольє світло на перспективи створення ефективної базової моделі інсульту в експерименті.

Метою роботи було вивчити провідні мікроскопічні ознаки за умов розвитку модельованого ішемічного інсульту в експерименті на самцях щурів лінії Вістар.

Об'єкт і методи дослідження. Моделювання ішемічного інсульту відбувалось за стандартних умов віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. Ромоданова АМН України», Київ у ранкові години доби. У якості експериментальних тварин застосовували самців щурів лінії Вістар, 6-ти місячного віку, ($n=45$) з належною реєстраційною документацією від ветеринарної служби. З ранку, напередодні проведення оперативного втручання, годування тварин виключалось. Кожну із груп особин (контроль, експеримент) оглядав ветеринарний лікар. Останнім також здійснювався контроль життєдіяльності лінійних щурів упродовж усього терміну дослідження (14 діб). Тварин виводили із експерименту шляхом кетамінового наркозу на 1-шу, 3, 7, 14 доби; піддавали декапітації, характеризували макроскопічні зміни у мозку та його оболонках, проводили мікроскопічний (гістологічний) аналіз мікроструктур останніх, систематизували отримані дані.

Власне об'єктом дослідження стали шматочки головного мозку (5х5 мм), окремі ділянки мозкових судин самців лінійних щурів. За для повноцінного виконання мікроскопічного (гістологічного) аналізу структурних змін у органах експериментальних тварин матеріал фіксували у 12% розчині формаліну на фосфатному буфері ($pH=7,0-7,2$), при температурі $t = 18-20$ С у склокерамічному посуді із щільно притертими корками. Далі

зневоднювали методом проведення матеріалу через батареї етилових спиртів підвищеної концентрації від 30 до абсолютного спирту включно, заливали у смоли (парафін, целодин за потребами завдання). З парафінових, целодінових блоків виготовляли серії гістологічних зрізів, товщиною 10-15 мкм. Препарати різали за допомогою санного мікротому в одній із трьох взаємно перпендикулярних площин (фронтальній, горизонтальній, сагітальній), що надавало змогу більш ретельно вивчити будову речовини головного мозку, мікросудин останнього, співвідношення окремих структур (цито-, мієлоархитектоніку, локальні вогнища клітинних популяцій). Отримані зрізи забарвлювали у відповідності до ідеї та мети експерименту, завдань та головної стратегії пошуку (гематоксилін-еозин, імпрегнували сріблом).

Мікроскопічний аналіз матеріалу проводили із застосуванням оптичної системи мікроскопу ЛОМО (x300; x600; x1350). Дослідженню піддавали сіру, білу речовину головного мозку тварин, мікросудини та їхні сплетіння. У порівняльному аспекті характеризували контрольні зразки із експериментальними, де особливої уваги надавали вивченню феноменів інфільтрації, білих, червоних, змішаних інфарктів, діapedезу еритроцитів, розм'якнення тканини мозку, набряків, некрозів. Конкретизації належали зміни у мікросудинному руслі. Обов'язковій констатації піддавали факти наявності чи відсутності стазу, тромбозу, змін агрегатних властивостей еритроцитів, сладжування останніх. У разі виявлення схожих морфологічних ознак статистичну оцінку останніх проводили сумарно. Узагальнені результати зводили до уніфікованої схеми, за якою будували висновки.

Результати досліджень та їх обговорення. Оглядом-порівняльним макроскопічним дослідженням зразків нативних препаратів головного мозку та його оболонок у щурів контрольної та експериментальної груп надало перші істотні результати та зорієнтувало у виборі подальшої стратегії. Детальний аналіз макроструктурних особливостей головного мозку тварин, що належали до контрольної групи, свідчив на користь відповідності останніх статево-віковим показникам функціональної норми. Сіра та біла речовини залишалися чітко диференційованими, без вогнищ інфарктів та некрозів. Проте, у секційному матеріалі, взятому від особин експериментальної групи, структурні критерії ішемічного інсульту були чітко позначені, реєструвались *ad oculi* (ділянки «розм'якнення» тканини, ознаки появи білих, червоних, змішаних інфарктів, набряку).

Ретельний мікроскопічний аналіз сірої та білої речовини головного мозку, його мікросудин, оболонки у зразках від тварин контрольної групи не викликав жодної підозри відносно мінімальних структурних ознак наявності ішемічного інсульту. Шари сірої та білої речовини добре позначені на препаратах, незалежно від характеру їхнього забарвлення (гематоксилін-еозин, імпрегнація сріблом). Власне кора чітко диференційована, її структура не свідчила на користь змін. Шари (молекулярний, зовнішній зернистий, пірамідних клітин), які адекватно виявлялись у разі забарвлення гематоксилін-еозином, співпадали із тими, що були позначені на імпрегнованих препаратах. Базовим компонентом кори залишалися тіла нейронів та пов'язані з ними клітини глії (ставали більш помітними на великому збільшенні). Ядра нейронів практично «розкидані» в межах зрізів. Їхня цитоплазма в окремих випадках виявлялася недостатньо виразною. Капіляри, що розташовувались уздовж препарату, були представлені як у вигляді продовгуватих щілин, так і овальної форми отворів. Нейропіль, що видавався світло-сірого, блакитно-сірого кольору (гематоксилін-еозин) та насиченого сірого забарвлення (імпрегнація сріблом) справляв враження безструктурної субстанції, яка утворювала основу сірої речовини. Стінки великих та магістральних судин головного мозку – без ознак ушкодження, явища стазів, тромбозів відсутні. Оболонки цілісні, без геморагій, кальцинозу.

На відміну від вищезазначеного, аналіз зразків препаратів, взятих від тварин експериментальної групи встановив, що одними із найбільш характерних діагностичних критеріїв розвитку ішемічного інсульту ставали інфаркти, які за своєю структурою відповідали типовим вогнищевим некрозам мозку. На думку фахівців, клінічно вагомою причиною розвитку останніх могла бути недостатність кровопостачання, яку, в першу чергу, пов'язували із атеросклеротичними процесами та грубою патологією екстракраніальних відділів сонних, хребцевих артерій мозкових оболонки [10]. Деякими вченими визначено, що процесам, ініціюючим та прискорюючим атерогенез, сприяло локальне ушкодження цілісності ендотелію та його проникливості [1,2]. Реакція у відповідь на ушкодження - цю думку обґрунтовано підтримують харківські дослідники Фалько О.В. та співавтори - морфологічно ілюструвалася масивними накопиченнями тромбоцитів в місцях ушкодження ендотелію, руйнуванням тромбоцитарних клітин з виходом «тромбоцитарного фактору росту», який сприяв проліферації гладких м'язових клітин з подальшим їх переро-

дженням [3]. Тотальна оклюзія судин також цілком можлива як наслідок тромбоемболії, тромбозу, облітеруючих процесів або, як у нашому випадку, - у результаті експериментального стиснення судин. Із науково-літературних джерел відомо, що інфаркти спроможні до формування наразі вираженої дії механічних, фізичних чинників (перегинань, стиснень тощо) та факторів хімічної природи; психофізіологічного походження (підвищення, коливання артеріального тиску, крововтрати). Отже, їхнє моделювання в експерименті на сьогодні не складає доволі серйозної задачі. Проте наслідки відтворення останнього у дослідницьких цілях, як виявилось, носили неоднозначний характер. По-перше, розміри уражень завжди залежали від рівня ушкодження судин та виявляли різну локалізацію. З урахуванням найбільш типового розташування (*locus morbi*): басейн середньої мозкової артерії, реєстрували ділянки морфологічних змін у моторних зонах. У разі перетину артерій на *basis cerebri* та їхніх гілок, коли перерозподіл кровотоку неможливий, розміри інфарктів відповідали ділянці васкуляризації ушкодженої судини. І, навпаки, за умов тромбоемболічних явищ, тромбозів каротид, хребцевих артерій, інфаркт не зачіпав весь басейн у цілому. Стенози екстракраніальних відділів магістральних артерій призводили до інфарктів у корі, саме ділянок склепінь їхніх дистальних гілок.

За інтенсивністю діapedезу еритроцитів у паравазальний простір (геморагійним компонентом) підпорядковувались на характерні групи. Першу із них, найбільш типову, складала білі інфаркти, що були розповсюджені як сірою, так і білою речовиною, переважно скроневі, тім'яної області. Мікроскопічно тканина на місці формування останніх видавалась порохнявою, крихкою, дірчастою, із блідим, майже прозорим забарвленням (гематоксилін-еозином). Так звані червоні геморагічні інфаркти реєструвались лише у сірій речовині кори мозку. Вони відрізнялись схильністю до генералізацій та формування великих вогнищевих ділянок. Зазначені зони зосереджувались поблизу мікросудин головного мозку, виявляли тенденцію до злиття. Саме там діагностувалась переважна більшість випадків діapedезних крововиливів у паравазальний простір, позначався набряк, некробіотичні зміни гліальних компонентів, ішемія. Звертали на себе увагу зміни ендотелію судин, що могли бути пов'язаними із гетерогенністю останнього та його спроможності до десквамації за певних умов постнатального онтогенезу [1,3,8]. Згадані феномени провокували інтенсивну мі-

грацію лейкоцитів, «розплавлення» некротизованої тканини, процеси «розм'якнення» структур на ушкоджених ділянках (1-2 доба експерименту). Третя доба позначалась появою астроцитів, вираженою організацією вогнищ, утворених проліферуючими астроцитарними клітинами та організацією мікросудин. Активне формування колагенових волокон (7-14 доба експерименту), сприяло утворенню гліомезодермальних, у разі незначних за своїми розмірами зон ушкоджень та сполучнотканинних рубців, кист, за умов наявності великих ділянок деструкції. Аналіз окремих препаратів головного мозку щурів однак не надав можливості гістологічної реєстрації тотального некрозу, зон генералізації вогнищ «розм'якнення», організації повноцінного рубця. Мікроскопічно на цьому тлі виявляли загибель нейроцитів кори (фаза неповного некрозу) із замісним астрогліозом.

Висновки.

1. Найбільш доступним доказовим інструментом у фактах формування та розвитку модельованого ішемічного інсульту в експерименті залишилися мікроскопічні (гістологічні) методи дослідження. За для досягнення демонстративності останніх рекомендовано засоби забарвлення використовувати у порівняльному аспекті (гематоксилін-еозин; імпрегнація сріблом).

2. Провідними мікроскопічними критеріями розвитку ішемічного інсульту стали факти виникнення вогнищевих інфарктів мозку (білих, червоних, змішаних), що за своєю природою являли некрози та були спричинені недостатністю кровопостачання у відповідних ділянках сірої речовини.

3. Розвиток експериментального модельованого інсульту носив виразний фазний характер (1, 3 доба дослідження) та позначався на заключних етапах появою астроцитів, організацією вогнищ проліферації, мікросудин, колагенових волокон, формуванням гліомезодермальних, сполучнотканинних рубців, кист.

Перспективи подальших досліджень полягають у створенні адекватної моделі іше-

мічного інсульту на тваринах (самцях щурів лінії Вістар) в експерименті з метою подальшого застосування останньої у дослідженнях з вивчення перспектив використання стовбурових клітин у відновній нейрохірургії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кондаков И.И. Морфологические маркеры дисфункции эндотелия при экспериментальном атеросклерозе / И.И.Кондаков // Кровообіг та гомеостаз.- 2005.- № 3-4.- С. 94- 96.
2. Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе : [исследование СССР/ ред. Чазов Е.И., Смирнов В.Н. АМН СССР.] .- М.: Медицина, 1983.- 208 с.
3. Фалько О.В. Экспресс- диагностика морфологических особенностей эндотелия аорты кроликов при экспериментальном атеросклерозе /О.В. Фалько, В.В. Волина, О.В. Липина, О.С. Прокопюк, И.И. Кондаков // Світ медицини та біології.- 2009.- № 3.- С. 164-169.
4. Anderson C. S. Intensive blood pressure reduction in acute cerebral haemorrhage trial (INTERACT): a randomized pilot trial / Anderson C. S., Huang Y., Wang J. G. // The Lancet Neurology. - 2008. - № 7. - P. 391- 399.
5. Bland S. Forced overuse of the contralateral forelimb increases infarct volume and impairs functional outcome following mild transient cerebral ischemia in rats // Bland S., Strong R., Aronovski J., Grotta J., Shallert T. // Neurology.- 1999.- № 52 (suppl. 2).- P. A564. Abstract.
6. Davis S. M. Early recognition and diagnosis of stroke / Davis S. M. // International Journal of Stroke. - 2006. - Vol. 1, suppl. 1. - P. 3- 46.
7. Davis S. M. Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplaner Imaging Thrombolytic Evaluation Trail (EPITHET): a placebocontrolled randomized trial / Davis S. M., Donnan G. A., Parsons M. W. // The Lancet Neurology. - 2008. - № 7. - P. 299- 309.
8. James C. Grotta. Acute stroke therapy at the millennium: Consummating the marriage between the laboratory and bedside. The Feinberg Lecture / James C. Grotta // Stroke. - 1999. - № 30. - P. 1722- 1728.
9. Kennedy R. Lees. Stroke: success for acute treatment / Kennedy R. Lees. //The Lancet Neurology. - 2009. - № 8(1).- P. 2-4.
10. Maikos J.T. Mechanical properties of dura mater from the rat brain and spinal cord / Maikos J.T., Elias R.A., Shreiber D.I., // J. Neurotrauma.- 2008.- Jan; 25(1).- P. 38-51 .
11. Muir K. W. Neuroprotection for acute stroke. Macking clinical trials work / Muir K.W., Grosset D.G. // Stroke. - 1999. - № 30.- P. 180- 182.
12. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt- PA Stroke- Study Group, Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke //Neurolog. English J. Medicine. - 1995. - № 333. - P. 1581- 87.
13. Wahtgren N. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study // Wahtgren N., Ahmed N., Davalos A. // The Lancet Neurology. - 2007. - № 369.- P. 275.

УДК 616.8-022+619:576.535

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ КАК ДОКАЗАТЕЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ В ФАКТАХ ФОРМИРОВАНИЯ И РАЗВИТИЯ МОДЕЛИРОВАННОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Торяник И. И., Колесник В. В.

Резюме. Авторами в эксперименте на животных- самцах крыс линии Вистар, 6-ти месячного возраста (n=45) изучены микроскопические признаки моделированного ишемического инсульта, Установлено, что наиболее весомым инструментом в доказательной базе формирования и развития является образование инфарктов (белых, красных, смешанный), по при-

роде,- очаговых некрозов мозга, обусловленных недостаточностью кровообращения. Проанализирован фазовый характер организации структурно- функциональных изменений в подверженных ишемии участках мозга (в зависимости от сроков (сутки) исследования), состояние микроциркуляторного русла, эритроцитарного звена.

Ключевые слова: моделированный ишемический инсульт, микроскопические изменения, очаговый инфаркт мозга (белый, красный, смешанный), самцы крыс линии Вистар.

UDC 616.8- 022+ 619: 576.535

MICROSCOPIC CHANGES as an ARGUMENTAL INSTRUMENT in a FACTS of the FORMATION and GENESIS of the EXPERIMENTAL SIMALATED ISCHEMIC INSULT (STROKE)

Torianik Inna I. , Kolesnik Vladimir V.

Summary. In the experiments on the animals- the Wistar rat's male, 6-th month age's (n= 45) authors were studied the microscopical signs of the simalated ischemic insult (stroke). Were been established, that a more weighty instrument's in the argumental base of the formation and genesis is an organization of the infartion (white, red, mixed),- in their nature,- focal cerebral necrosis. Phase disposition (character) of the organization of the structural and functional changes in the ischemic cerebral section (in the data of the investigation dependens, in days), microcirculatory blood channel state, erythrocytic link.

Key words: simalated ischemic insult, microscopic changes, focal cerebral infarction (white, red, mixed), Wistar rats male.

Стаття надійшла 19.04.2010 р.