

УДК 616.441-008.64-053-06:616.831:57.012.4.:57.084/.085

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ВРОЖДЕННЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Петренко В.А., Стеченко Л.А., Куфтырева Т.П., Чухрай С.Н., Довгань Р.С.

**Резюме.** Методом электронной микроскопии исследованы 7, 45 и 100 суточные интактные крысы и крысы, которым моделировали состояние врожденного гипотиреоза (ВГТ). Установлено, что при развитии ВГТ морфо-функциональные изменения в коре головного мозга отмечаются уже у ювенильных (7 суточных) крыс. Это проявляется наличием мало дифференцированных нейронов, которые не разошлись послойно, и свидетельствует о задержке стратификации и клеточной дифференциации. С увеличением срока наблюдений до 45 суток изменения в структурах головного мозга приобретают большую выразительность. Для нейронов характерно появление клеток, измененных по темному типу, что является признаком проапоптозных изменений. На поздних этапах развития ВГТ (100 суток) в головном мозге на фоне количественного уменьшения их структурных компонентов выражены адаптационные процессы.

**Ключевые слова:** головной мозг, крысы, врожденный гипотиреоз, электронная микроскопия

UDC 616.441-008.64-053-06:616.831:57.012.4.:57.084/.085

## ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF RAT BRAIN WITH CONGENITAL HYPOTHYROIDISM IN AGING ASPECT

Petrenko V., Stechenko L., Kuftyreva T., Chuhray S., Dovhan R.

**Summary.** The method of electron microscopy study 7, 45 and 100 daily intact rats and rats that modeled the condition of congenital hypothyroidism (CHT). Established that the development CHT morpho-functional changes in the cerebral cortex appear already in the juvenile (7 day old) rats. It shows the presence of differentiated neurons was not dispersed layer with, and shows a delay of stratification and cell differentiation. With increasing observation period to 45 days the changes in brain structures become more expressive. For the typical appearance of neuronal cells, modified by a dark type, which is a manifestation proapoptoznyh changes. At later stages of development CHT (100 days) in the brain against the background of the quantitative decrease in their structural components expressed adaptive processes.

**Key words:** brain, rats, congenital hypothyroidism, electron microscopy.

Стаття надійшла 31.03.2011 р.

УДК 616.126.3 – 089.844

М.В. Петрова

## ДЕВИТАЛИЗАЦИЯ ТКАНЕЙ КСЕНОЛОГИЧНЫХ СЕРДЕЧНЫХ КЛАПАНОВ С СОХРАНЕНИЕМ ИХ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ

Государственное учреждение «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака Национальной академии медицинских наук Украины» (г. Донецк)

Исследование выполнено в рамках плановой научно-исследовательской работы «Изучить возможности биомодификации артериальных ксенографтов в эксперименте» (№ госрегистрации 0111U 002052).

**Вступление.** Ежегодно в мире проводится около 275 000 операций по протезированию сердечных клапанов. В качестве одного из наиболее перспективных материалов для сердечно-сосудистой хирургии врожденных и приобретенных пороков сердца рассматриваются биологические трансплантаты на основе ксенологичного материала (ксенографты). В отличие от механических клапанов они позволяют избежать антикоагулянтной терапии и обладают потенциалом к ремоделированию в организме реципиента, что особенно важно в тех случаях, когда необходимо обеспечить не только поддержание и обновление структуры трансплантата, но и его рост [6].

В последние годы активно разрабатываются методы обработки трансплантатов, обеспечивающие гибель клеток донора. Считается, что такой подход будет способствовать уменьшению иммунного ответа и повышению долговечности трансплантатов клапанов сердца [2, 3, 5, 7]. Увеличение долговечности и самообновление графта также зависят от того, насколько быстро тканеобразующие клетки реципиента проникнут в матрикс донорского клапана, образуют там популяцию и приступят к созданию собственного матрикса [2]. Максимального сокращения необходимого для этого времени можно добиться при условии заселения трансплантата аутоклетками реципиента еще на стадии культивирования.

Используемые в мировой практике методы девитализации клапанов можно разделить на две основные группы: с использованием веществ, вызывающих некроз и методы, нацеленные на индуцирование апоптотической гибели клеток [2]. Некрозиндуцирующие методы позволяют достичь эффекта девитализации за относительно

непродолжительный период времени. Однако существует риск некоторого повреждения матрикса под действием лизосомальных ферментов, что, в дальнейшем, может привести к кальцификации ткани. Исходя из этого, мы предположили, что предпочтительней будет использование веществ, инициирующих апоптотическую гибель клеточной составляющей трансплантата.

**Цель исследования.** Девитализирование ксеногенных графтов сердечных клапанов, а также последующая оценка их адгезивности для клеточного материала.

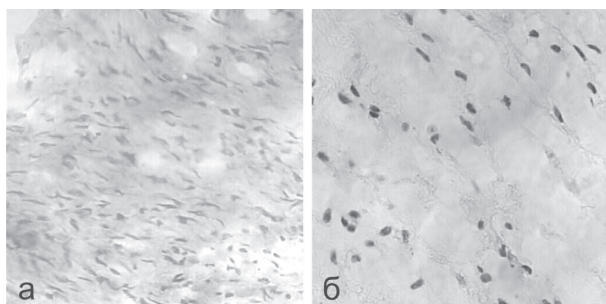
**Объект и методы исследования.** Исследование проводили с использованием сердечных клапанов 6-месячных свиней. Образцы, принимавшие участие в исследованиях, были подвержены воздействию апоптоз-вызывающего раствора в течение 2-х суток. В качестве такового использовался раствор ЭДТА (Sigma, США) в концентрации 10 мМ. По истечении заданного времени экспозиции образцы тщательно отмывались в среде с содержанием солей в концентрации близкой к физиологической. С целью проверки запуска апоптоза часть образцов подвергалась гистологическому анализу (окраска гематоксилин-эозином).

С целью оценки сохранения адгезивных свойств, девитализированные графты инкубировали с фетальными фибробластами человека, выделенными и культивированными в соответствии с общепринятой методикой [4]. Перед инкубацией культура фибробластов была окрашена витальным флуоресцентным красителем PKH 67 Green (Sigma, США) и ресуспендирована в культуральной среде. Степень адгезивности девитализированной ткани сердечных клапанов оценивалась на 5-е сутки инкубации с использованием флуоресцентного микроскопа.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Апоптоз имеет свои отличительные морфологические признаки, как на светоптическом, так и на ультраструктурном

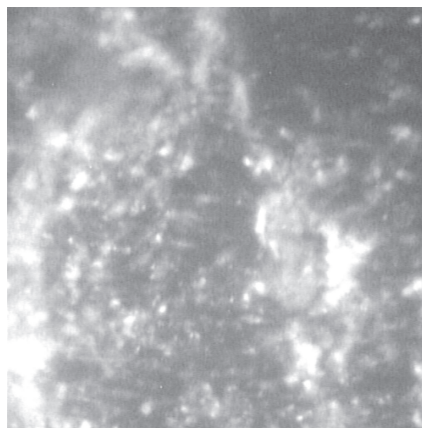
уровне. При окраске гематоксилином и эозином апоптоз определяется в единичных клетках или небольших группах клеток. Апоптотические клетки выглядят как округлые или овальные скопления интенсивно эозинофильной цитоплазмы с плотными фрагментами ядерного хроматина [7].

Согласно результатам проведенного гистологического анализа, в образцах, прошедших обработку раствором ЭДТА, наблюдаются перечисленные выше морфологические признаки апоптоза (рис. 1). Уменьшается общее количество клеток; у большинства из них выражены морфологические изменения в ядрах (кариопикноз, кариорексис). Все эти изменения свидетельствуют об успешной инициации апоптоза. Клетки же контрольных (интактных) образцов, напротив, имеют нормальную морфологию, характерную для фибробластов: вытянутые веретенообразной формы клетки с овальным ядром.



**Рис. 1. Гистологический анализ морфологии клеток ксенографта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение Ч 400 (окуляр-10, объектив-40).**  
а) контрольный (интактный) образец;  
б) экспериментальный образец, подвергавшийся обработке раствором ЭДТА в течение 2-х суток с последующей отмывкой.

Основу экстрацеллюлярного матрикса графтов составляют эластиновые и коллагеновые волокна. Фибробласты, как известно, представляют собой основную клеточную форму соединительной ткани, которая синтезирует фибриллярные белки (коллаген, эластин и другие). Поэтому, взаимосвязь наличия фибробластов в строме графта и степени, а также скорости его дальнейшей реконструкции является очевидной. Именно этим фактом



**Рис. 2. Флуоресцентный анализ адгезивных свойств внеклеточного матрикса обработанных ксеногенных графтов (5-е сутки инкубации с фибробластами). Увеличение Ч 400 (окуляр-10, объектив-40).**

было обусловлено наше стремление оценить адгезивные возможности графтов, прошедших обработку.

Во время флуоресцентного анализа будущих трансплантатов наблюдалось ярко выраженное свечение адгезированных на соединительнотканном матриксе клеток в лучах синие-фиолетового спектра (рис. 2), что свидетельствует о сохранении внеклеточным матриксом адгезивных свойств и его пригодности, в дальнейшем, для заселения тканеобразующими аутоклетками реципиента.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что раствор ЭДТА, в выбранной нами концентрации (10 мМ), а также схема обработки графтов являются эффективными с точки зрения девитализации. Инициация апоптоза прошла успешно. После обработки девитализирующим раствором соединительнотканый матрикс графта сохраняет адгезивность и, следовательно, пригоден для дальнейшего заселения клетками с целью ревитализации.

**Перспективы дальнейших исследований.** Планируется проведение доклинических испытаний с целью оценки пригодности физических параметров полученных девитализированных клапанов для гемодинамической коррекции *in vivo*, а также эффективность их заселения со временем клетками организма реципиента.

## Список литературы

1. Подавление кальцификации трансплантатов клапанов сердца путем их девитализации. / В.С. Акатов, Н.И. Фесенко, В.В. Соловьев [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.V, №1. – С.41 – 46.
2. Криосохраненные аллогraftы в реконструктивной хирургии пороков аортального клапана / Л. А. Бокерия, Р. М. Муратов, И. И. Скопин [и др.]. – М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. – 282 с.
3. Райс Р.Х. Биологические эффекты токсических соединений: курс лекций / Р.Х. Райс, Л.Ф. Гуляева. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2003. – 208с.
4. Влияние факторов культивирования на жизнеспособность фетальных фибробластов человека. / А.Г. Попандопуло, Д.Ю. Игнатов, И.О. Слипченко [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2003. – Т.4, №2. – с.323 – 325.
5. Снижение кальцификации бесклеточных трансплантатов клапанов сердца путем внедрения в них перед имплантацией изогенных гладкомышечных клеток. / В.С. Акатов, Н.И. Рындина, В.В. Соловьев [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – №4. – С. 64 – 67.
6. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro / S.P. Hoerstrup, R. Sodian, S. Daebritz [et al.] // Circulation. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 44 – 49.
7. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits / G. Steinhoff, U. Stock, N. Karim [et al.] // Circulation. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 50 – 55.

УДК 616.126.3 – 089.844

## ДЕВІТАЛІЗАЦІЯ ТКАНИН КСЕНОЛОГІЧНИХ СЕРЦЕВИХ КЛАПАНІВ ІЗ ЗБЕРЕЖЕННЯМ ЇХНІХ АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Петрова М.В.

**Резюме.** Проведено дослідження з отримання девіталізованого сполучнотканинного матриксу клапанів серця з метою виготовлення біомодифікованих серцево-судинних трансплантатів. У якості девіталізуючого використовувався 10мМ розчин ЕДТА. Отримані графти зберігають фізіологічну адгезивність, а отже, є придатними для заселення клітинами з метою подальшої ревіталізації.

**Ключові слова:** графт, апоптоз, девіталізація, адгезія, ревіталізація.

УДК 616.126.3 – 089.844

**ДЕВИТАЛИЗАЦІЯ ТКАНЕЙ КСЕНОЛОГИЧНИХ СЕРДЕЧНИХ КЛАПАНОВ С СОХРАНЕНИЕМ ИХ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ**

Петрова М.В.

**Резюме.** Проведены исследования по получению девитализированного соединительнотканного матрикса сердечных клапанов с целью создания биомодифицированных сердечно-сосудистых трансплантатов. В качестве девитализирующего использован 10мМ раствор ЭДТА. Полученные графты сохраняют физиологическую адгезивность и, следовательно, пригодны для заселения клетками с целью дальнейшей их ревитализации.

**Ключевые слова:** графт, апоптоз, девитализация, адгезия, ревитализация.

UDC 616.126.3 – 089.844

**DECELLULARIZATION OF XENOGENIC HEART VALVES TISSUE WITH PRESERVING THEIR ADHESION**

Petrova M.V.

**Summary.** This research was aimed to produce biomodified cardiovascular graft by decellularisation of heart valve connective tissue matrix. To achieve decellularisation 10 mM EDTA solution was used. Derived grafts preserve their physiological adhesion. Thus, they are suitable for cell colonization and recellularization.

**Key words:** graft, apoptosis, decellularization, adhesion, recellularization.

Стаття надійшла 29.03.2011 р.

УДК 616.13.002.2-004.6:611.441

І.І. Пискун, Г.Я. Костюк

**УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ**

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова (м. Вінниця)

**Зв'язок роботи з науковими темами і планами:** робота є фрагментом теми комплексної науково-дослідницької роботи Вінницького національного медичного університету ім.М.І. Пирогова «Морфофункціональний стан кровоносного русла та клітинних елементів органів і тканин при експериментальному атеросклерозі в умовах генної терапії» (№ держреєстрації 0108U001484).

**Вступ.** За даними сесії Європейського регіонального комітету ВООЗ у 2010 році 85% випадків смерті у Європейському регіоні викликані неінфекційними хворобами, основні з яких: захворювання серцево-судинної системи і рак. Тільки в США і Європі протягом ХХ століття від наслідків атеросклерозу померло близько 360 млн. людей. У Європі серцево-судинні захворювання являються причиною смерті у 38% чоловіків і 44% жінок віком до 75 років, а в найближчі 30 років очікується збільшення смертності, яка обумовлена ішемічною хворобою серця і мозковим інсультом, на 25-30% [1]. Україна посідає провідні місця за показниками по смертності від захворювань серця і судин в Європі [2].

Серцево-судинна система дуже чутлива до тироїдного гормону. В тироїдній дисфункції давно розпізнають широкий спектр кардіальних змін [4]. Гіпотиреозидизм часто асоціюється із гіперхолестеринемією і сприяє підвищеному ризику розвитку атеросклерозу [3]. Високі прокоагуляційні фактори сприяють претромботичному стану і можуть впливати на прогресування атеросклерозу через активацію гемостатичних механізмів і утворення тромбіну [5]. Генна терапія вважається альтернативою класичної терапії медикаментами кардіоваскулярних захворювань [6].

**Метою роботи** було дослідження ультраструктурних змін щитоподібної залози при експериментальному атеросклерозі і його генній корекції.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведено на білих лабораторних статевозрілих щурах-самцях з вихідною масою тіла 150-200 грамів. Вивчали п'ять груп тварин: перша група- інтактні щури; друга група - щури, яким вводили 4(6)Метил-2-тиоурацил в дозі 12 мг/кг протягом 30 днів; тваринам 3, 4 та 5 груп протягом 30 днів створювали модель атеросклерозу шляхом згодовування щурам холестеролу в дозі 0,5 г/кг з соняшниковою олією і додатково 4(6)Метил-2-тиоурацилу. Тваринам 4 групи з профілактичною метою вводили ген апоЕ по 50 мкг ДНК на тварину внутрішньом'язево [7] одноразово в перший день дослідження, а щурам п'ятої групи із лікувальною метою

ген апоЕ вводили в тій же самій дозі, але на 15 добу експерименту, коли навантаження холестеринем викликало розвиток вираженої дисліппротеїнемії. В кінці досліду всіх щурів виводили з експерименту шляхом передозування ефірного наркозу. Для електронномікроскопічного дослідження шматочки щитоподібної залози забирали і фіксували 2,5% розчином глютарового альдегіду на фосфатному буфері (рН 7,4), дофіксували в 1% розчином осмію. Заливали в суміш епоксидних смол (Епон 812). Зрізи виготовляли на ультрамікромомі УМТП7. Ультраструктурне дослідження проводили на мікроскопі ПЕМ 125К.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Важливим для подальшого вивчення морфологічних змін щитоподібної залози в експерименті є встановлення ультраструктурної організації тироцитів і кровоносних капілярів в нормі. Електронномікроскопічні дослідження щитоподібної залози інтактних тварин показали, що клітинний компонент фолікулів – тироцит має специфічні ознаки ультраструктурної організації, які пов'язані з його ендокринною функцією (рис. 1).

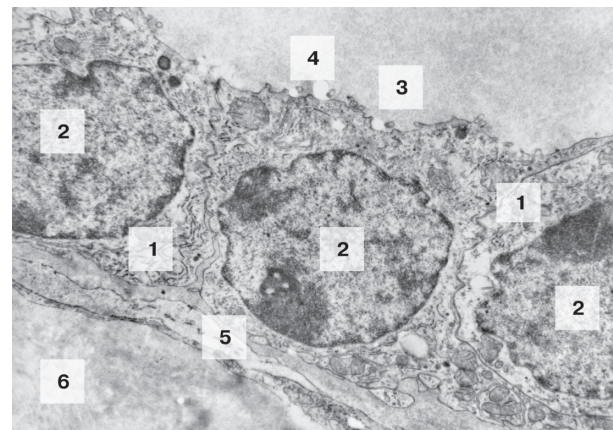


Рис. 1. Фрагмент стінки фолікула щитоподібної залози інтактних щурів: тироцити низькопризматичної форми (1) з округлими ядрами (2), мікроворсинками (3) та резорбційними вакуолями (4) на апікальній поверхні; вузька базальна мембрана (5); просвіт капіляра (6). x 8000.