

pathologic personality formations have been described in the given contingent of patients as well as main stress factors that influence the development of nosogenic reactions and pathologic personality formations. On the basis of a clinical psychopathologic study of a representative group (100 people) manifestations of phenomenological characteristics have been described, clinical typology of nosogenic reactions and pathological characteristics in the development of a personality in the group of patients has been suggested. The main stressors, affecting nosogenic reactions development and pathologic development of a personality, have been revealed. The prevalence of hypernosognostic neurotic (anxiety-phobic, hypochondriac, narcissistic) and affective (astheno-depressing and depressing hypochondriac) nosogenic reactions is found. Socio-psychological, premorbid and somatogenic factors influence the development of mental disorders and these factors interaction defines the main psychopathologic syndrome.

Key words: nosogenic reactions, urolithiasis, coping with chronic disease, psychosomatics, psychopathology, pathologic personality formation.

Danylo Halytsky National Medical University (Lviv),
«Almaz» Health Resort (Truskavets, Lviv Region)

Рецензент – доц. Н.С. Карвацька

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 4 (68). – P. 163-168

Надійшла до редакції 09.09.2013 року

© О.О. Фільц, О.І. Мироненко, Х.Р. Богута, О.С. Фітькало, Р.В. Кечур, М.Й. Данилко, 2013

УДК 616831-005.1-005.4

*В.І. Цимбалюк, * В.В. Колесник, * А.С. Забірник**, І.І. Торяник ****

ЗАСТОСУВАННЯ БІОДЕГРАДУЮЧОГО СУБСТРАТУ ДЛЯ ІНТРАКРАНІАЛЬНОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АВТОЛОГІЧНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПРИ МОДЕЛЬОВАНОМУ ЦЕРЕБРАЛЬНОМУ ІШЕМІЧНОМУ ЕМБОЛІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ У ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України», м. Київ*
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, ТОВ «Вірола», м. Харків**
ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України», м. Харків***

Резюме. У роботі представлені дані щодо створення та застосування біодеградуючого субстрату для трансплантації аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин (АМСК) при церебральному ішемічному емболічному інсульті в експерименті на щурах лінії Вістар. Пояснено, що структура біодеградуючого субстрату пластична, має фібринову природу, не спричиняє змін у будові АМСК, нейронів, глії, мікросудин.

Зазначається, що цей факт забезпечує ефективну, термінову, зручну трансплантацію клітин до ішемічного/інфарктного вогнища в інтракраніальний спосіб.

Ключові слова: біодеградуючий субстрат, аутологічні мезенхімальні стовбурові клітини, трансплантація, модельований церебральний ішемічний емболічний інсульт, самці щурів лінії Вістар.

Вступ. Останнім часом великого значення в неврології та нейрохірургії набуває застосування клітинної трансплантації [2, 6, 9]. Найбільш вживаним матеріалом є стовбурові клітини (зокрема, мезенхімальні аутологічні). Їхня ефективність у стимуляції відновних реакцій, що відбуваються на тлі деструктивно-дегенеративних процесів некрозу? безсумнівна [1, 12, 13]. Однак механізми реалізації цілої низки ефектів, найбільш сприйнятні способи уведення останніх, специфіка вибору експозиційних строків на сьогоднішній день вивчені недостатньо [3, 11]. Потребують подальшого вдосконалення процедурні моменти трансплантації клітин *in vivo* [4, 8]. Триває пошук найбільш оптимальних (комплементарних по відношенню до стовбурових клітин і тканин реципієнта, простих у виготовленні, доступних за ціною) біологічних субстанцій – носіїв клітинного матеріалу.

Мета дослідження. В експерименті на щурах лінії Вістар вивчити ефективність застосування біодеградуючого субстрату для інтракраніального способу трансплантації аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин (АМСК) при церебральному ішемічному емболічному інсульті.

Матеріал і методи. Матеріалом експериментального дослідження послуговували самці щурів лінії Вістар (n=62), 3-місячного віку, масою тіла 160-175 г, що утримувалися за стандартних умов виварію. З метою отримання моделі церебрального ішемічного інсульту в піддослідних тварин застосовували емболію колатеральних гілок загальної сонної артерії в одній із півкуль головного мозку [4]. Щурів наркотизували кетаміном інтраперитоніально: із розрахунку 125 мг на кг маси тіла тварини. Заявлений спосіб отримання моделі ішемічного інсульту шляхом емболізації колатеральних судин частками зависі сульфату барію

(II) надавав гарантованого вимкнення магістрального та колатерального кровопостачання відповідної півкулі головного мозку. Вищезазначені заходи стосувалися тварин, що увійшли до групи з модельованим церебральним ішемічним емболічним інсультом (n=20) та групи лінійних щурів (n=20), із застосуванням інтракраніального способу трансплантації автологічних стовбурових мезенхімальних клітин [5]. Третю групу (n=12) складали псевдооперовані особини. Четверта група (n=10) утворювалась інтактними (контрольними) щурами. Тварин виводили із експерименту шляхом передозування кетамінового наркозу на першу, третю, чотирнадцяту доби дослідження.

Постмортально досліджували сіру та білу речовини головного мозку, його оболонки, судини. Шматочки органів фіксували 24 години у 12 % розчині формаліну на фосфатному буфері (рН=7,0-7,2) при t=18-20⁰С. Зневоднювали методом проведення матеріалу через систему розчинів етилових спиртів, заливали у смоли. Препарати різали за допомогою санного мікротома. Отримані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозинном, імпрегнацією сріблом. Для мікроскопічного аналізу матеріалу застосовували оптичну систему мікроскопа ЛОМО (x200; x400; x 600; x1350). Результати чітко фіксували у стандартні картки морфологічного дослідження. Статистичну обробку отриманих цифрових даних проводили із застосуванням пакета програм «Statistica».

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті дослідження встановлено, що трансплантація АМСК інтракраніальним способом із застосуванням біодеградуючого субстрату виявилась ефективною. Сам субстрат був доволі пластичним, не спричиняв змін у структурі АМСК, нейронів кори головного мозку, клітин глії, мікросудин.

Характеристика біодеградуючого субстрату. За його основу взято сформований у стерильних умовах фібриновий конгломерат (фібринова плівка) бажаної форми та об'єму. Процес отримання останнього базувався на класичних фізіологічних механізмах. Враховуючи той факт, що

фібрин є основною структурною складовою тромбу, його отримували із розчиненого в плазмі крові попередника-фібриногену шляхом взаємодії останнього із ферментом-тромбіном. Процес нараховував декілька стадій. На першій стадії в результаті протеолітичної дії тромбіну на фібриноген отримували «активованій фібриноген». Наступна стадія утворення фібрину полягала в утворенні згустку крові. З цією метою у стерильну скляну пробірку (V=10 мл), фірми Sigma відбирали 1 мл крові дослідної тварини, додавали 0,5 мл тромбіну та утримували в термостаті при температурі 37⁰ С протягом 6 годин, за цим центрифугували (5000 обертів/хв). У разі наявності клінічних ознак інсульту використовували умови природного згортання крові. Перетворення фібриногену у фібрин супроводжувалося утворенням двох типів згустків: розчинних та нерозчинних у 1% розчині монохлороцетової кислоти; залежно від умов середовища: мутні (грубі) та прозорі (тонкі) згустки. У роботі застосовували фібринову плівку центрифугату, що містила нерозчинні, мутні (грубі) згустки. Зазначені переваги пояснювались: можливостями формування останніх без додаткових затрат, у природних умовах організму тварини та здатністю грубих згустків до легкого віджиму від плазми крові, швидкої ретракції, міцністю. Отриману фібринову плівку обережно здимали з поверхні рідини, вносили до ємностей із культурального середовища (КС) та застосовували в подальшому як матеріал для утримання АМСК на поверхню головного мозку в разі інтракраніального способу уведення останніх [3, 6].

Морфологічний аналіз ефективності застосування біодеградуючого субстрату як матеріалу, що забезпечував фіксацію та доставку АМСК до locus morbi проводили на 3-14-ту доби експерименту, відтерміноване спостереження відбувалося за методологічним алгоритмом [7]. На 3-тю добу після інтракраніального уведення АМСК на зрізах, що стосувалися правої півкулі, виявлені ознаки постішемічної мультифокальної енцефалопатії. На поверхні півкулі зосереджена багаточисельна група малодиференційованих клі-

Таблиця

Співвідношення морфометричних показників та їх статистичних параметрів у експериментальних групах тварин упродовж різного експозиційного періоду

Морфометричні показники	Статистичні параметри (мм ³ /15 мм ²)								
	Інтактний контроль			Ішемічний інсульт			Ішемічний інсульт та інтракраніальне уведення АМСК		
Експозиційний період	3-тя доба	7-ма доба	14-та доба	3-тя доба	7-ма доба	14-та доба	3-тя доба	7-ма доба	14-та доба
Кількість судин	32,0± 1,1	32,1± 1,1	32,1± 1,1	16,5± 1,1	9,8± 0,7	11,4± 1,1	20,1± 1,2	22,0± 1,2	26,2± 1,2
Об'єм гліальних кіст	-	-	-	11,3± 0,7	19,0± 1,1	26,2± 1,3	14,0± 1,1	12,0± 1,1	9,8± 0,7
Об'єм сполучнотканинного рубця	-	-	-	10,4± 0,9	14,3± 0,9	17,1± 1,1	8,7± 0,7	10,1± 0,9	11,2± 1,1

тин, у вигляді конуса, що заходить у білу речовину головного мозку. Клітини мали круглу форму, велике ядро та малооб'ємну цитоплазму. На відміченому тлі змін чітко визначалися малі за розміром, обмуровані судини, що були оточені псевдокістами. Аналіз кріостатних зрізів продемонстрував наявність груп люмінесцентно виразних клітин, зосереджених навколо центральних ділянок псевдокіст. На 7-му добу спостереження у тварин реєстрували (гістологічні препарати, забарвлені гематоксилином та еозином) пласт стовбурових клітин (дорсолатеральна поверхня правої півкулі, від першого-другого шару кори вглибину). Морфологічний аналіз виявлених клітин свідчив на користь ядерного поліморфізму стовбурових клітин. Дослідження препаратів кори головного мозку засобами люмінесцентної мікроскопії продемонструвало дифузний характер світіння, «ланцюжки» люмофільних клітин (були добре помітні на збільшенні: $\times 600$, $\times 1350$). Вочевидь визначені люмофільні структури являли собою клітини та їх відростки [10]. Щільні синаптичні контакти, що формувались у разі застосування трансплантації АМСК інтракраніальним способом та були зафіксовані при морфологічному аналізі препаратів за умов великого збільшення, свідчили на користь синаптогенезу [14]. Через два тижні після інтракраніального уведення АМСК спостерігалось подальше їхнє проникнення в товщу ураженої ішемією ділянки кори мозку. Показники, що стосувалися кількості кровеносних судин становили $26,2 \pm 1,2$; об'єм гліальних кіст поступово знижувався, сформованого гліосполучнотканинного рубця зростає. Морфометричні дані, що відповідали дослідженим показникам за умов ішемічного інсульту (кількість мікросудин у полі зору, об'єм гліальних кіст, гліосполучнотканинного рубця) вірогідно відрізнялись, майже в 1,2-1,5, у деяких спостереженнях – в 1,8 рази (розбіжності вірогідні при $p > 0,05$) від експериментальних (інтракраніальне уведення АМСК). Гістологічні та морфометричні показники інтактного контролю чітко відповідали даним статеві-вікової норми, свідчили на користь відсутності гліальних кіст, гліосполучнотканинного рубця, наявності розгалуженої системи мікросудин. Детальні числові викладки щодо статистичних показників представлені в таблиці.

Висновок

Отриманий біодеградуєчий субстрат мав фібринову природу, виявився пластичним, добре адсорбував на собі клітинний матеріал (АМСК), характеризувався високим ретракційним потенціалом, стрімкою розчинністю у біологічному середовищі/рідині (спинномозкова, кров, лімфа), забезпечував безпосередню доставку клітин до locus morbi в ураженій півкулі.

Перспективи подальших досліджень полягають у застосуванні біодеградуєчого субстрату як

зручного матеріалу для трансплантації клітин (у тому числі АМСК) оперативним шляхом *in vivo*.

Література

1. Активация экспрессии мозгового нейротрофического фактора в зоне имплантации аллогенных и ксеногенных стволовых (прогениторных) клеток нервной ткани у крыс с ишемическим корковым инсультом / В.П. Чехонин, С.В. Лебедев, А.И. Волков [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 4. – С. 195-198.
2. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте / И.Б. Соколова, Н.Н. Зинькова, А.А. Библибина [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – № 4. – С. 54-62.
3. Колесник В.В. Сравнительная картина морфологических изменений в веществе головного мозга крыс линии Вистар с моделированным ишемическим инсультом и различными способами введения аутологических мезенхимальных стволовых клеток / В.В. Колесник // Укр. мед. альманах. – 2012. – № 5. – С. 131-133.
4. 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 (ХМАПО) – № u 2010 02736; заявл. 11.03. 10; опубл. 27.09. 10, Бюл. № 18.
5. Пат. 79143 Україна, МПК G 09 B23/28(2006.01). Спосіб лікування модельованого ішемічного інсульту головного мозку у щурів/ Колесник В.В., Забірник А.С., Цимбалюк В.І., Омельченко О.А., Панібратцева С.Г., Торяник І.І.; власник Харківська медична академія післядипломної освіти (ХМАПО). – № u 2012 12474; заявл. 01.11.12; опубл. 10. 04. 2013, Бюл. № 7.
6. Стволовые клетки: проблемы контроля, безопасности, разработки и применения / Н. Бунятян, А. Яворский, В. Ряженев [и др.] // Врач. – 2009. – № 6. – С. 2-5.
7. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток / Н.Н. Зинькова, Е.Г. Гилерович, И.Б. Соколова [и др.] // Цитология. – 2007. – № 7. – С. 566-575.
8. Торяник И.И. Унифицированный подход к созданию модели ишемического инсульта головного мозга в эксперименте на крысах линии Вистар / И.И. Торяник, В.В. Колесник // Актуал. пробл. сучасної мед. – 2010. – № 4. – С. 155-159.
9. Цымбалюк В.И. Нейрогенные стволовые клетки: между прошлым и будущим / В.И. Цымбалюк, В.В. Медведев // Лекарь. – 2008. – № 7. – С. 36-42.
10. Barkho B.Z. Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications / B.Z. Barkho, X. Zhao // Cell Res. Ther. – 2011. – Vol. 6. – P. 327-338.
11. Clinical studies in stem cells transplantation for stroke: a review / A. Bersano, E. Ballabio, S. Lanfrancini [et al.] // Current Vascular Pharmacology. – 2010. – Vol. 8. – P. 29-34.
12. Maikos J.T. Mechanical properties of dura mater from the rat brain and spinal cord / J.T. Maikos, R.A. Elias, D.I. Shreiber // Neurotrauma. – 2008. – Vol. 25. – P. 38-51.
13. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells / Y. Li, J. Chen, L. Wang [et al.] // Neurology. – 2001. – Vol. 56. – P. 1666-1672.
14. Xiong Y. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function follow injinjury / Y. Xiong, A. Mahood, M. Choop // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2010. – Vol. 11. – P. 298-308.

**ПРИМЕНЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА ДЛЯ ИНТРАКРАНИАЛЬНОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧЕСКИХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ПРИ МОДЕЛИРОВАННОМ ЦЕРЕБРАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ
ЭМБОЛИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР**

В.И. Цымбалюк, В.В. Колесник*, А.С. Забирник**, И.И. Торяник****

Резюме. В работе представлены данные, касающиеся создания, использования биodeградирующего субстрата для трансплантации аутологических мезенхимальных стволовых клеток (АМСК) при церебральном ишемическом эмболическом инсульте в эксперименте на крысах линии Вистар. Поясняется, что структура биodeградирующего субстрата пластична, имеет фибриновую природу, не вызывает изменений в строении АМСК, нейронов, глии, микрососудов. Указывается, что этот факт обеспечивает эффективную, быструю, удобную трансплантацию клеток к ишемическому/инфарктному очагу интракраниальным способом.

Ключевые слова: биodeградирующий субстрат, аутологические мезенхимальные стволовые клетки (АМСК), трансплантация, моделированный церебральный ишемический эмболический инсульт, самцы крысы линии Вистар.

**USE OF BIODEGRADABLE SUBSTRATE FOR AN INTRACRANIAL TRANSPLANTATION
OF THE AUTOLOGICAL MESENCHYMAL STEM CELLS (AMSC) WHILE SIMULATING
CEREBRAL ISCHEMIC EMBOLIC STROKE IN WISTAR RATS**

V.I. Tsybaliuk, V.V. Kolesnyk*, A.S. Zahirnyk**, I.I. Torianyk****

Abstract. The article presents data about production and use of biodegradable substrate for transplantation of autological mesenchymal stem cells (AMSC) in cerebral ischemic embolic stroke during an experiment with Wistar rats. It has been explained that the structure of a biodegradable substrate is flexible and fibrinous by nature; it does not evoke any changes in the AMSC, neurons, glial cells and micro vessels structure. This fact provides an effective, fast, comfortable cell transplantation to ischemic/infarctical focus by means of an intracranial method.

Key words: biodegradable substrate, autological mesenchymal stem cells (AMSC), transplantation, simulated cerebral ischemic embolic stroke, male Wistar rats.

SU "A. P. Romodanov Institute of Neurosurgery of AMS of Ukraine" (Kyiv)

V.N. Karazin Kharkiv National University, LTD "Virola" (Kharkiv)

SU "I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of AMS of Ukraine" (Kharkiv)

Рецензент – проф. В.М. Пашковський

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 4 (68). – P. 168-171

Надійшла до редакції 21.10.2013 року