УДК 616-018:616-005.8 – 611.08 – 57.084.1

МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ МОДИФІКОВАНОЇ ЕНДОВАСКУЛЯРНОЇ МОДЕЛІ ФОКАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТКАНИННОЇ ПРОАНГІОГЕННОЇ ТЕРАПІЇ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Є.С. ЯРМОЛЮК[1,2], С.І. САВОСЬКО[2], Л.П. СТАЙНО[1], О.І. ТРОЯН[2]

[1] ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ
[2] Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

Мета роботи *— довести можливість використання модифікованої експериментальної моделі ішемічного інсульту для доклінічних випробувань проангіогенної тканинної й клітинної терапії шляхом аналізу морфологічних змін у ділянці ішемічного ушкодження головного мозку.*

Матеріали та методи. *Проведено морфологічний аналіз зони ішемічного ушкодження головного мозку 16 білих безпородних самців щурів в умовах моделювання перманентної ендоваскулярної оклюзії середньої мозкової артерії (ОСМА, n = 6) та після інтрацеребральної трансплантації алогенної ембріональної нервової тканини на 2-гу добу після ОСМА (n = 5) та автотрансплантації кісткового мозку (n = 5) на 1-, 3-, 7-, 14-, 21- і 28-му добу після індукції фокальної церебральної ішемії. ОСМА здійснювали за допомогою введення монофіламентної нитки із силіконовим кінчиком (Doccol Corp., США) у просвіт внутрішньої сонної артерії до блокування СМА з одночасним виключенням колатерального кровотоку.*

Результати. *Ендоваскулярна оклюзія СМА за допомогою модифікованої методики призводила до формування чітко окресленої зони інфаркту (ЗІ) мозку, навколо якої визначалася зона пенумбри, яка в подальшому трансформувалася в періінфарктну зону (ПІЗ). ЗІ та ПІЗ у контрольній групі характеризувалися розвитком некротичних і вторинних нейродегенеративних змін, які на 28-му добу спостереження призводили до формування гліального рубця і ліквор них кіст. У групах із тканинною трансплантацією в ПІЗ, починаючи із 7-ї доби, відзначено активацію репаративних процесів, насамперед ангіогенезу, які обмежували поширення ЗІ, зменшували вираженість запальної реакції й сприяли швидкому регресу дистрофічних змін нейронів та глії.*

Висновки. *Запропонована ендоваскулярна методика дає змогу ефективно моделювати фокальну церебральну ішемію з чітко визначеними гістологічними змінами, які характеризуються відповідною динамікою. Це дає змогу на доклінічній стадії досліджувати ефекти тканинної проангіогенної терапії, зокрема трансплантації ембріональної нервової тканини та кісткового мозку для лікування ішемічного інсульту.*

Ключові слова: експериментальна модель, оклюзія середньої мозкової артерії, силіконовий монофіламент, постінсультний ангіогенез.

Частка ішемічного інсульту (ІІ) становить 80–87 % у структурі цереброваскулярної патології. Він залишається однією з провідних причин смертності та інвалідності населення в світі. Так, за даними Національного інституту здоров'я США, у 2010 р. у світі налічувалося 33 млн пацієнтів, які перенесли інсульт. Він був другою за частотою після захворювань серця причиною смерті населення (11,13 % від усіх випадків смерті) [9]. Незважаючи на стрімкий розвиток новітніх медичних технологій, значна частка пацієнтів після перенесеного інсульту залишається зі стійким неврологічним дефіцитом, який значно ускладнює їх соціальну реадаптацію і часто є резистентним до сучасних методів реабілітації. У зв'язку з цим важливого значення набуває пошук методів і засобів лікування, ефективних за межами терапевтичного вікна.

Принципово новим підходом до лікування пацієнтів з ІІ є застосування регенеративних технологій, спрямованих на замісну репарацію або активацію ендогенних репаративних механізмів у ділянці ішемічного ушкодження головного мозку [14, 17]. Існують два напрями такого лікування: фармакологічний і клітинний (тканинний). Перший передбачає використання ендогенних або синтетичних засобів, які безпосередньо активують відновні механізми мозку, зокрема, фактори росту. Другий напрям пов'язаний з використанням різних джерел клітинного матеріалу, які зазвичай містять стовбурові або прогеніторні клітини [3, 4]. Найбільш доступними та вивченими в Україні в економічному та морально-етичному аспекті є ембріональна нервова тканина (ЕНТ) і кістковий мозок (КМ) [1]. Ефективність клітинних технологій підтверджена великою кількістю експериментальних даних, що дало підставу для їх клінічної апробації. Утім, незважаючи на популярність цього напряму досліджень, про що свідчить кількість клінічних випробувань (23, з них 13 активних (https://www.clinicaltrials.gov)), клінічна ефективність залишається непереконливою [13, 18]. Серед основних причин незадовільних результатів — відсутність уніфікованих підходів до експериментального моделювання ІІ та оцінки результатів досліджень з використанням регенеративних технологій, а також недостатність знань про роль окремих механізмів репарації головного мозку після ішемічного ушкодження [14, 16].

На сьогодні одним із провідних відновних механізмів після ішемічного ушкодження головного мозку вважають ангіогенез, який є універсальною відповіддю організму на ішемію будь-якого органа чи тканини [5, 7, 12]. Найбільшу кількість експериментальних досліджень, які підтверджують теорію індукованого постінсультного ангіогенезу, проведено з використанням клітинних технологій [1, 5]. Незважаючи на існування великої кількості експериментальних моделей, у літературі відсутні дані щодо порівняльної динаміки розвитку морфологічних змін при використанні найдоступніших джерел клітинного матеріалу для активації ангіогенезу в зоні інфаркту мозку [8]. З огляду на це, а також на етіопатогенетичну гетерогенність ІІ в людини, актуальною є розробка оптимальної експериментальної моделі, яка б на доклінічній стадії дала змогу достовірно оцінювати ефективність проангіогенної терапії ІІ. Важливе значення для підтвердження ефективності та відтворюваності моделі ІІ має також визначення структурних змін мікроциркуляторного русла періінфарктної зони (ПІЗ) головного мозку в умовах фокальної церебральної ішемії, яка є штучним експериментальним аналогом ІІ в лабораторних тварин.

Мета роботи — довести можливість використання модифікованої експериментальної моделі ішемічного інсульту для доклінічних випробувань проангіогенної тканинної і клітинної терапії шляхом аналізу морфологічних змін у ділянці ішемічного ушкодження головного мозку.

Матеріали та методи

З огляду на більшу частоту виникнення ІІ в людини в басейні внутрішньої сонної (ВСА) або середньої мозкової артерії (СМА), при

Ярмолюк Євгеній Сергійович
лікар-нейрохірург
відділення невідкладної судинної нейрохірургії з рентгеноопераційною
ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України»,
Адреса: 04050, м. Київ, вул. Мурашка, 5, кв. 21
Тел. роб.: (044) 483-12-53
Тел. моб.: (066) 451-10-43
E-mail: i.iarmoliuk@ukr.net, semper_tiro@mail.ru

експериментальному моделюванні у гризунів (щурів і мишей) найчастіше використовують оклюзію СМА (ОСМА) або її гілок [8]. Щури є зручним об'єктом для проведення дослідів з ІІ завдяки подібності загальної будови судинної системи їх головного мозку до такої у людини, зручності утримання та розведення, відносній простоті експериментальних маніпуляцій, невеликій вартості особин, а також відсутності суворих морально-етичних застережень щодо їх використання з дослідницькою метою [16].

У дослідженні використано 16 білих безпородних щурів-самців чистої лінії з масою тіла 280–320 г, віком 3–4 міс. Тварин розподілили на три експериментальні групи: 1) контрольну (n = 6) — з оклюзією правої СМА (ОСМА), 2) дослідну № 1 (n = 5) — з інтрацеребральною трансплантацією ЕНТ на 2-гу добу після ОСМА (ТЕНТ), 3) дослідну № 2 (n = 5) — з інтрацеребральною автотрансплантацією кісткового мозку (ТКМ) на 2-гу добу після ОСМА. Одну вагітну самку щурів (15–16-та доба гестації) було використано для одержання ЕНТ. Усі досліди проводили згідно з «Правилами виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених МОЗ України.

Модель фокальної церебральної ішемії (ФЦІ). Для індукції ФЦІ застосовано модифіковану нами методику перманентної ендоваскулярної монофіламентної оклюзії правої СМА з блокуванням колатералей, включаючи контралатеральну ВСА (рис. 1) [4]. Це дало змогу виключити можливість реперфузії та об'єктивно оцінити патоморфологічні ефекти ТЕНТ і ТКМ з огляду їх впливу на ангіогенез у ПІЗ.

Суспензію ЕНТ одержували зі щурячих ембріонів на 15–16-ту добу гестації за описаною в попередній публікації методикою [1]. У 5,0 мл суспензії ЕНТ концентрація живих клітин досягала близько 10 тис. /мкл.

Одержання суспензії КМ. Суспензію клітин КМ отримували з діафізів стегнових кісток тварин дослідної групи № 2 безпосередньо перед трансплантацією за описаною в літературі методикою [4]. У 100 мкл суспензії КМ містилося близько 5 млн живих клітин.

Інтрацеребральну тканинну трансплантацію здійснювали за описаною в попередній публікації методикою [1].

Морфологічні дослідження проводили з використанням світлооптичної мікроскопії на 1- (контрольна група), 3-, 7-, 14-, 21- і 28-му добу після ОСМА (контрольна і дослідна групи). Під інтраперитонеальним наркозом виконували декапітацію щурів. Головний мозок фіксували у 10 % розчині формаліну на 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4). Із фіксованих зразків виготовляли фронтальні зрізи товщиною 4–5 мм, зневоднювали у висхідних концентраціях етанолу і заливали у парафін за стандатною методикою. Парафінові зрізи товщиною 6–8 мкм фарбували гематоксиліном та еозином, пікрофуксином, а також за методом Ніссля (реагенти виробництва *Bio-Optica*, Італія). Мікрофотографії одержували та аналізували за допомогою мікроскопа *Olympus BX 51*.

Результати

ОСМА в щурів викликала різко виражені морфологічні зміни цито- та ангіоархітектоніки кори мозку і підкіркових структур іпсилатеральної півкулі мозку, які характеризувалися певною динамікою у різні терміни спостереження. Наслідком ФЦІ було формування

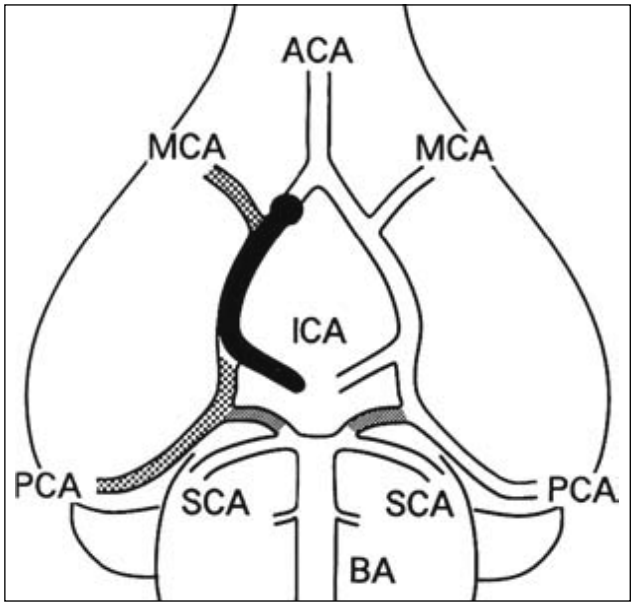


Рис. 1. *Схема розташування оклюдера у просвіті внутрішньої сонної артерії:*
ICA — внутрішня сонна артерія;
ACA — передня мозкова артерія;
MCA — середня мозкова артерія;
PCA — задня мозкова артерія;
SCA — верхня мозочкова артерія;
BA — основна артерія

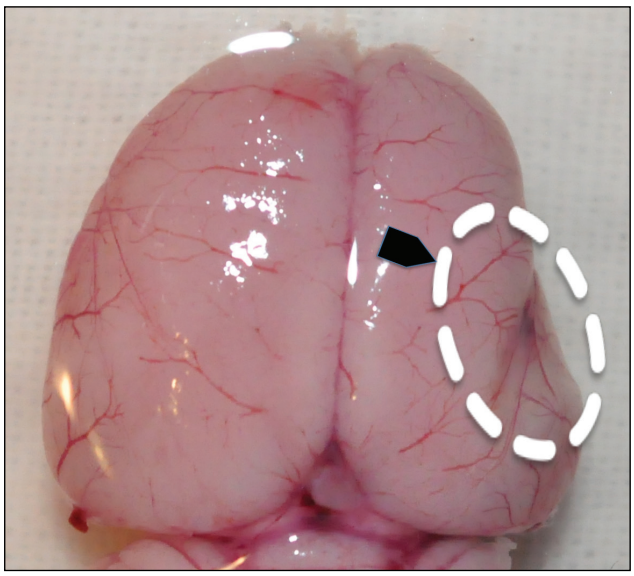


Рис. 2. *Макропрепарат головного мозку щура після ОСМА (21-ша доба). Білою пунктирною лінією позначена зона інфаркту мозку, чорною стрілкою — ділянка введення голки для інтрацеребральної трансплантації. Помітна виражена атрофія кори мозку ураженої півкулі*

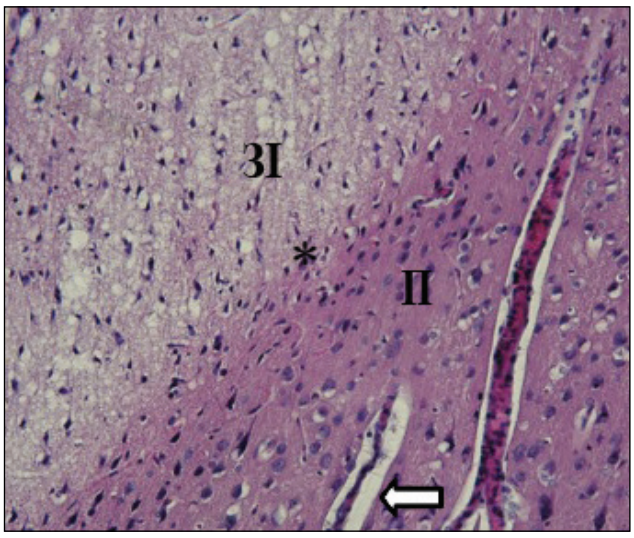


Рис. 3. *Права півкуля великого мозку щурів з ОСМА (1-ша доба спостереження). Демаркаційна лінія на межі з періінфарктною зоною (*). Некроз клітин мозку, перицелюлярний і периваскулярний набряк (стрілка): П — зона пенумбри; ЗІ — зона інфаркту мозку. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Зб. ×200*

значної зони інфаркту мозку, яка охоплювала соматосенсорну і, частково, моторну кору, смугасте тіло, внутрішню капсулу, поширювалася до бічного шлуночка, досягала мозолистого тіла і сектора СА 2/3 гіпокампа (рис. 2). Так, на 1-шу добу після ОСМА у зазначених ділянках можна було виділити сформовану зону некрозу, перифокальну (періінфарктну) зону, яка відповідає пенумбрі, та умовно інтактну тканину мозку (рис. 3). Іпсилатеральна півкуля була збільшена в об'ємі порівняно з контралатеральною внаслідок її набряку.

На 3-тю добу після ОСМА дистрофічно змінені нейрони були переважно гіперхромними. Унаслідок гострого набухання клітини збільшувалися в розмірах. Відзначено вакуолізацію цитоплазми та ядра нейронів, апоптоз гліоцитів (рис. 4, А). У перифокальній зоні спостерігалися обмежені скупчення лейкоцитів, що свідчило про початок запальної реакції.

На 1-шу добу як після ТЕНТ, так і після ТКМ (3-тя доба після ОСМА) навколо ділянки ін'єкції візуалізувалися трансплантовані клітини, оточені невеликою зоною травматичного некрозу та набряку мозку (рис. 4, Б).

На 7-му добу після ОСМА в ураженій півкулі мозку щурів контрольної групи відзначено зменшення набряку тканини мозку в ПІЗ, а у вогнищі некрозу — перифокальну інфільтрацію лейкоцитами і макрофагами, які починають формувати своєрідну демаркаційну зону — «лейкоцитарний вал» (рис. 5).

Збільшувалася кількість апоптичних нейронів у полі зору неокортекса і стріатума, а також у секторі СА3 гіпокампа іпсилатеральної півкулі, що свідчило про розвиток вторинних дистрофічних і нейродегенеративних процесів на тлі прогресування ішемії.

На 7-му добу спостереження після ОСМА в обох групах із трансплантацією виявлено регрес набряку тканини мозку, що морфологічно виявлялося зменшенням ступеня дистрофічних змін тканини мозку в перифокальній зоні кори головного мозку та смугастого тіла.

У зоні трансплантації ЕНТ і кісткового мозку виявлено утворення клітинних асоціацій, формування міжклітинних контактів, ознаки міграції трансплантованих клітин. Морфологічних ознак апоптозу не спостерігали. В ПІЗ при ТКМ виявлено збільшення просвіту неушкоджених капілярів. Навколо зони інтрацеребральної ін'єкції спостерігали обмежену міграцію малодиференційованих клітин і появу новоутворених мікросудин навколо зони їх локалізації (рис. 6). На 14-ту добу в перифокальній зоні зафіксовано ознаки

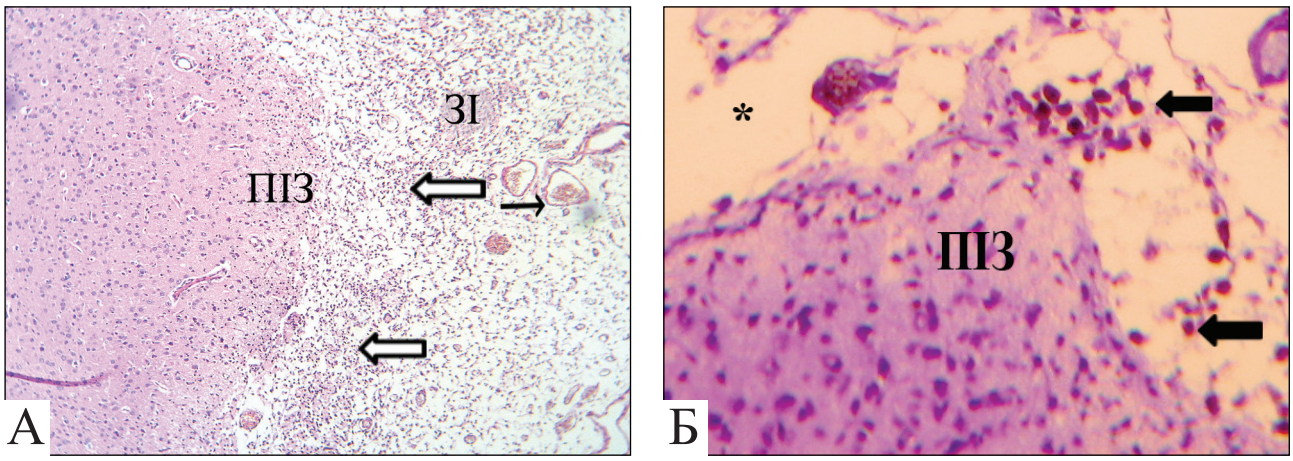
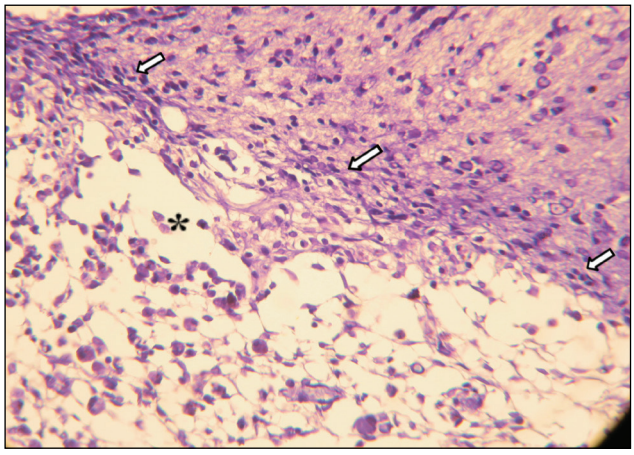


Рис. 4. *Зона інфаркту мозку (ЗІ) і періінфарктна зона (ПІЗ) головного мозку щурів на 3-тю добу після ОСМА (А) і на 1-шу добу після ТКМ (Б). Корональний зріз 2,2 мм дозаду від брегми: А — спостерігається відмежування інтактних тканин мозку від некротичних мас, початкова інфільтрація ЗІ клітинами запалення (білі стрілки) із ушкоджених мікросудин (чорна стрілка). Об.10, ок.10; Б — на межі ПІЗ та ЗІ мозку (*) помітні скупчення трансплантованих клітин (чорні стрілки). Об. 20, ок. 10*



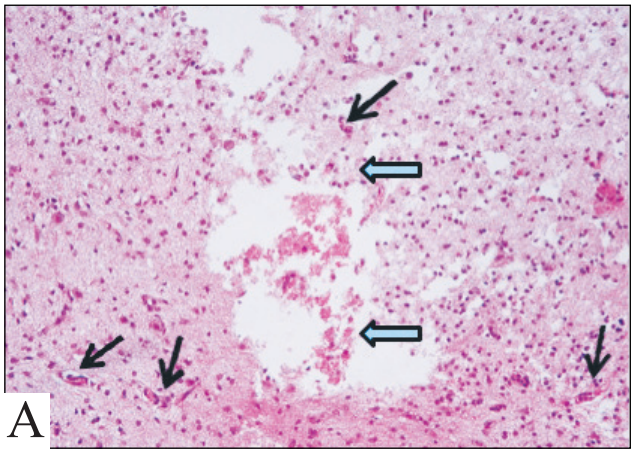


Рис. 5. *Права півкуля головного мозку щура після ОСМА (7-ма доба спостереження). Корональний зріз 2,2 мм дозаду від брегми. Формування «лейкоцитарного валу» (білі стрілки) на межі з ділянкою інфаркту мозку (*). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10*

очищення ділянки інфаркту мозку від некротичних мас і початок формування гліального рубця (рис. 7).

Цитоархітектоніка неокортекса перифокальної зони характеризувалася відсутністю чіткої стратифікації нейронів, здебільшого I–IV шарів. У віддалених від зони ішемії ділянках іпсилатеральної півкулі спостерігали дифузно уражені апоптичні нейрони і гліоцити.

На 14-ту добу після ОСМА (12-та доба після ТЕНТ і ТКМ) трансплантовані клітини характеризувалися вираженою синтетичною активністю. У ділянці ін'єкції встановлено

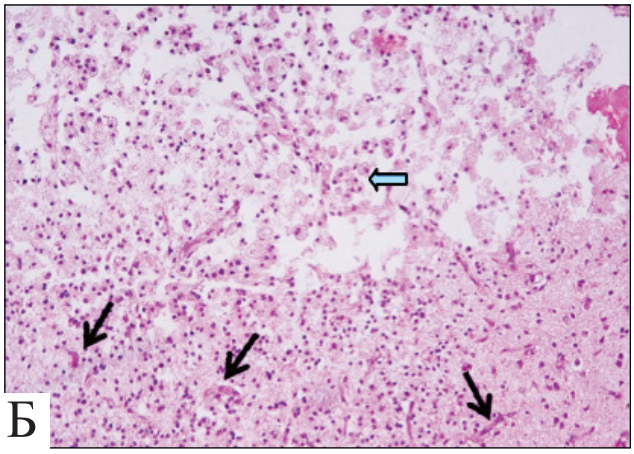


Рис. 6. *Ділянка введення ТКМ (7-ма доба після ОСМА). Ознаки неоангіогенезу у вигляді появи новоутворених мікросудин (чорні стрілки), реєструються недиференційовані клітини трансплантату (А) і макрофаги (Б) (блакитні стрілки). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10*

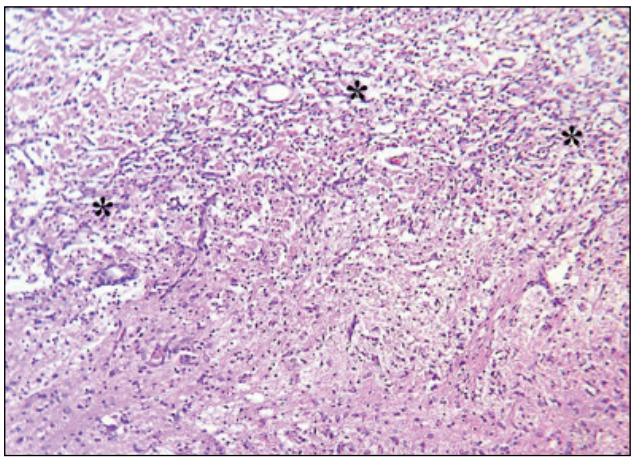
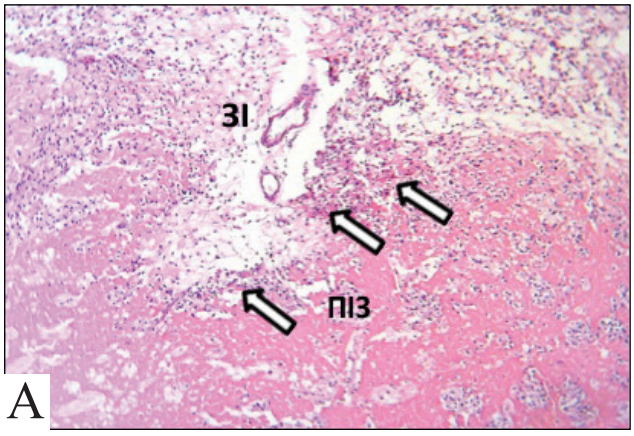


Рис. 7. *Формування гліального рубця в ділянці некрозу після ОСМА (*) (14-та доба спостереження). Корональний зріз 2,2 мм дозаду від брегми. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10*



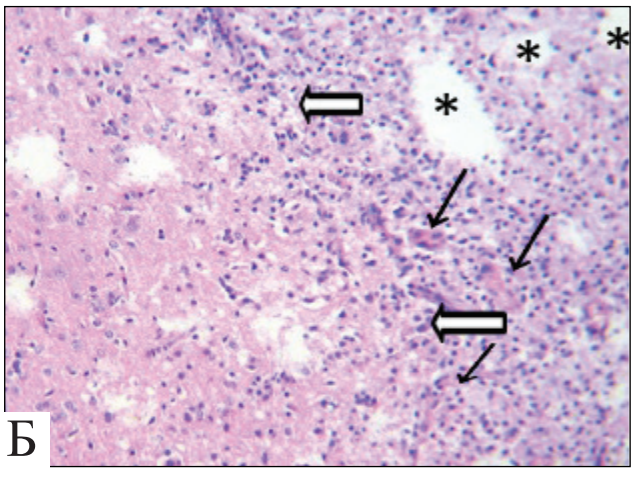


Рис. 8. *Ознаки неоангіогенезу (чорні стрілки) і формування демаркаційної лінії (білі стрілки) у ПІЗ щурів навколо ЗІ мозку у щурів на 12-ту добу після ТЕНТ (А) і ТКМ (Б) (14-та доба після ОСМА). Ознаки формування лікворної кісти на місці ЗІ (*). Забарвлення: гематоксилін-еозин. А — об. 20, ок. 10; Б — об. 40, ок. 10*

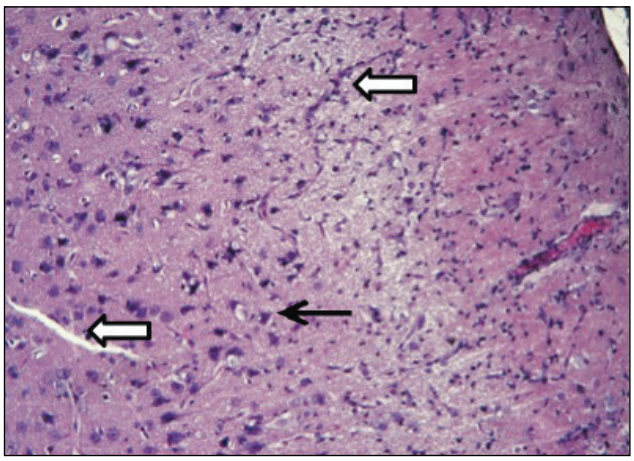


Рис. 9. *ПІЗ правої півкулі головного мозку щурів після ОСМА (21-ша доба спостереження). Дистрофічні зміни нейронів (чорні стрілки), апоптоз гліоцитів, ангіонекроз (білі стрілки). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10*

формування демаркаційної зони на межі з некротизованою тканиною, ознаки міграції макрофагів та окремих трансплантованих клітин, збільшення довжини гемокапілярів у проекції зрізу та відновлення діаметра функціонально активних і структурно інтактних капілярів (рис. 8).

На 21-шу добу після ОСМА в контрольній групі відзначено подальше формування гліального рубця, реакцію клітин макрофагальної системи в ПІЗ. В неокортексі була різко порушена диференціація шарів нейронів, чітко реєструвалися лише V–VI шари (рис. 9).

На 19-ту добу після тканинної трансплантації (21-ша доба після ОСМА) у ПІЗ великого мозку щурів виявлено ознаки формування гліального рубця та лікворних кіст на місці некротичної тканини. У ПІЗ після тканинної трансплантації виявлено велику кількість новоутворених судин, особливо в групі тварин із ТКМ і гліальні асоціації, що свідчить про активацію репаративних процесів (рис. 10).

На 28-му добу після ОСМА в головному мозку тварин контрольної групи завершувалося формування гліального рубця. Очищення зони інфаркту від некротичних тканин призводило до формування кістозної порожнини, заповненої ліквором. У віддалених від ЗІ мозку ділянках кори та підкіркових структур іпсилатеральної півкулі зафіксовано значну кількість апоптичних нейронів і гліоцитів,

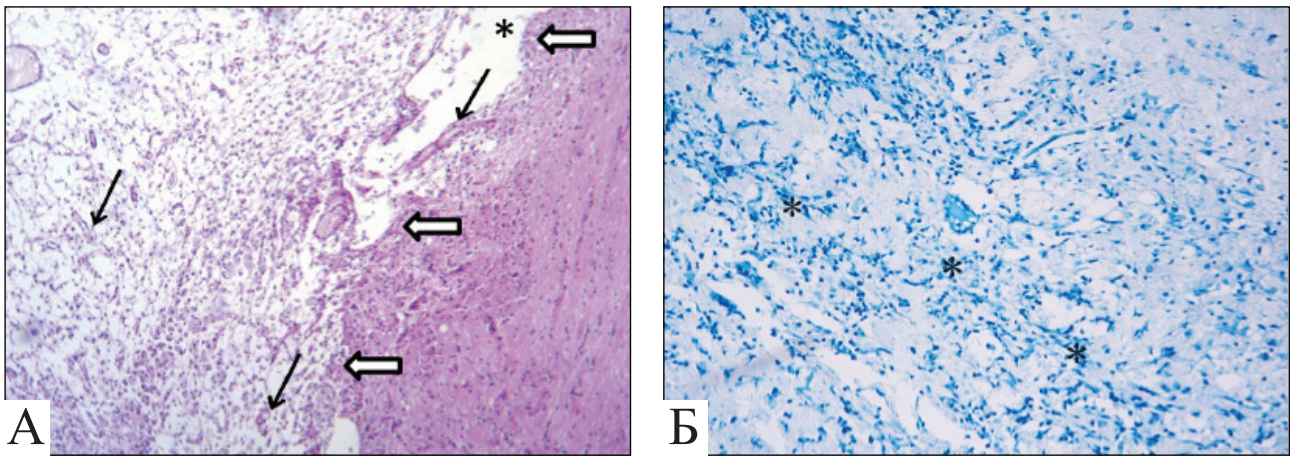


Рис. 10. *Репаративні процеси в ПІЗ головного мозку на 19-ту добу після ТКМ (А) і ТЕНТ (Б). Гліальний рубець (білі стрілки), гліальні асоціації (*), новоутворені судини (чорні стрілки). Забарвлення: А — гематоксилін-еозин; Б — за Нісслем. Об. 20, ок. 10*

ушкоджених судин з облітерованим просвітом (рис. 11).

На 26-ту добу після ТЕНТ (28-ма доба після ОСМА) у ПІЗ продовжували реєструвати асоціації недиференційованих клітин трансплантату. Їх розміри істотно відрізнялися в окремих групах клітин, що свідчило про різний ступінь диференціації (рис. 12). Нейрони неокортексу характеризувалися відновленням форми та розміру, збільшенням площі перикаріону.

На 26-ту добу після ТКМ у ділянці інтрацеребральної ін'єкції спостерігали елімінацію трасплантованих клітин (див. рис. 12, Б). У ПІЗ відзначено збільшення середнього діаметра мікросудин, виражене кровонаповнення капілярів, що свідчило про їх функціональну гемодинамічну активність.

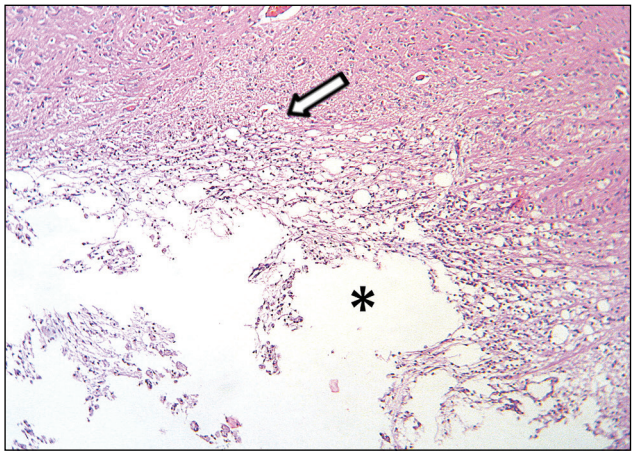


Рис. 11. *Іпсилатеральна півкуля головного мозку щура з ОСМА. Корональний зріз 2,2 мм дозаду від брегми. Лікворна кіста (*), гліальний рубець (стрілка). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10*

Обговорення

Тканинна трансплантація, спрямована на активацію ангіогенезу в зоні ішемічного ушкодження головного мозку в щурів, зумовленого застосуванням модифікованої методики моделювання ОСМА, спричинила низку патоморфологічних змін у тканинах головного мозку, які характеризувалися чіткою стадійністю розвитку. ТЕНТ і ТКМ призводили до прискорення формування гліального рубця та активації репаративних процесів у ПІЗ (збереження форми та структури нейронів, адаптивної перебудови мікроциркуляторного русла та ангіогенезу). Нейросудинна репарація була активнішою в групі тварин з ТКМ.

Одержані дані свідчать про ефективність постійної оклюзії СМА та колатералей за допомогою модифікованої методики. Аналіз зазначених морфологічних змін узгоджується з даними щодо еволюції зони ішемічного ушкодження внаслідок клітинної терапії. Так, Н.Н. Павличенко (2009) досліджено зміни тканин мозку при використанні методики транскраніальної оклюзії СМА [3]. Продемонстровано послідовність тканинних реакцій у період з 1-ї доби до 6-го тижня після внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку. Так, неоваскуляризацію в ПІЗ встановлено на 14-ту добу, а остаточне формування гліального рубця — через 6 тиж після ОСМА. J. Garcia зі співавт. (1993) довели, що пік нейросудинного ушкодження та експансії зони ішемії припадає на 3-тю добу після інтралюмінальної ОСМА, що

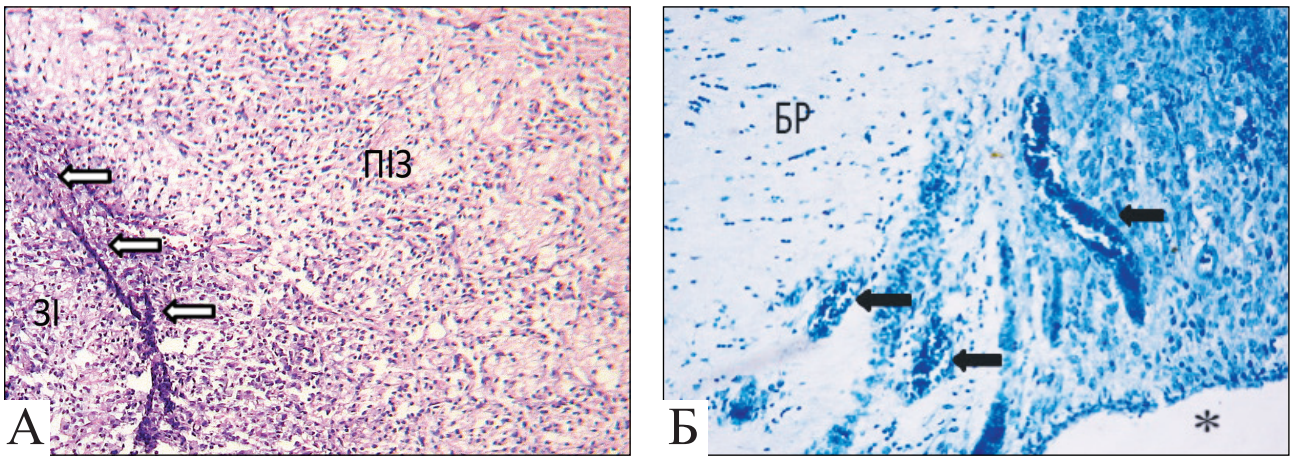


Рис. 12. *Перифокальна ділянка кори правої півкулі головного мозку щурів на 26-ту добу після ТЕНТ (А) і ТКМ (Б, 28-ма доба після ОСМА). Гліальний рубець, чітка демаркаційна лінія (білі стрілки) між ЗІ мозку і ПІЗ. Виражене кровонаповнення новоутворених мікросудин (чорні стрілки), збереження структури білої речовини (БР). Постінфарктна лікворна кіста (*). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10*

збігається з нашими даними. H. Mewezawa зі співавт. за допомогою радіоавтографічного визначення мозкового кровотоку показали, що при ендоваскулярній методиці моделювання в 1-шу добу після ОСМА в неокортексі та медіальних відділах смугастого тіла щурів реєструється зона мінімальної перфузії, яка відповідає пенумбрі. Остання протягом 1–3 діб може набувати характеристик інтактної тканини після відновлення перфузії або перетворюватися на зону некрозу. Гістологічно зона пенумбри відповідає ділянці тканини мозку, де нейрони і гліоцити зазнають початкових дистрофічних змін. За даними багатьох дослідників, саме пенумбра — перифокальна, або періінфарктна, зона у віддалений період інсульту є осередком нейросудинної репарації після ФЦІ [6, 10, 11]. Згідно з одержаними нами даними, вже на 7-му добу після ОСМА і на 5-ту добу після тканинної трансплантації в ПІЗ формуються новоутворені судини. Ангіогенез спряє відновленню перфузії ПІЗ і гальмує розвиток апоптозу та вторинних нейродегенеративних змін, а також вторинно стимулює ендогенний нейрогенез, що підтверджено іншими авторами [1, 7, 12].

Недоліком існуючих транскраніальних та ендоваскулярних методик є використання різних монофіламентів, тимчасовість оклюзії або наявність залишкового колатерального кровотоку, що призводить до широкої варіабельності розміру зони ішемії і, відповідно, періінфарктної зони [8]. Згідно з рекомендаціями експертів Товариства експериментального інсульту *(Society for Experimental Stroke (SFES))* перевагу при моделюванні ОСМА слід віддавати комерційно виготовленим монофіламентам-оклюдерам (*Doccol Corp.*, США), які дають змогу знизити варіабельність показників і підвищити стандартизацію експериментальних процедур [16].

Таким чином, модифікація ендоваскулярної оклюзії СМА дає змогу успішно відтворити в експериментальних тварин зону ішемічного ушкодження, яка характеризується наявністю чітко окресленої зони пенумбри, або ПІЗ. Остання є джерелом ендогенних репаративних процесів, зокрема ангіогенезу, та мішенню для тканинної й клітинної терапії, спрямованої на їх активацію.

Висновки

Аналіз динаміки морфологічних змін ділянки ішемічного ушкодження головного мозку при експериментальному ІІ, спричиненому оклюзією СМА за допомогою модифікованої ендоваскулярної методики, у різні терміни спостереження, підтверджує її ефективність для вивчення ефектів тканинної проангіогенної терапії, зокрема трансплантації ембріональної нервової тканини та кісткового мозку. Запропоновану методику можна використовувати для моделювання ФЦІ у щурів з метою розробки та визначення ефективності регенеративних технологій для лікування ІІ на доклінічній стадії.

Список літератури

1. Ангіогенний і нейропротекторний вплив тканинної трансплантації при експериментальному ішемічному інсульті / Є.С. Ярмолюк, Л.П. Стайно, О.В. Савчук [та ін.] // Науковий вісник Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. — 2015. — Т. 40, № 3–4. — С. 36–51.
2. Павличенко Н.Н. Влияние трансплантации мезенхимных стволовых клеток на течение экспериментального инсульта у крыс. — Дис. … канд. биол. наук: 03.00.25/ Павличенко Наталья Николаевна — СПб, 2008. — 180 с.
3. Патент 46029 Україна, МПК A61B17/00. Спосіб прижиттєвого забору клітин кісткового мозку щурів із стегнової кістки / Н.Я. Гридіна, В.В. Медведєв, О.В. Серкіз [та ін.]; заявник і патентовласник ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України». — № 200904829; заявл. 23.02.2009; опубл. 10.12.2009, бюл. № 23. — 2 с.
4. Цимбалюк В.І. Модифікована модель експериментального ішемічного інсульту в щурів з використанням монофіламентів із силіконовим покриттям / В.І. Цимбалюк, Є.С. Ярмолюк // Укр. неврол. жур. — 2012. — № 4. — С. 97–105.
5. Цимбалюк В.І. Церебральний ангіогенез при ішемічному інсульті: функціональна роль і перспективи клінічного використання / В.І. Цимбалюк, Є.С. Ярмолюк // Науковий вісник Національного медичного університету. — 2012. — Т. 37, № 2. — С. 32–37.
6. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra — revision of a concept / T. Back // Cellular and Molecular Neurobiology. — Vol. 18, N 6. — 1998. — P. 621–638.
7. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke / K. Arai, G. Jin, D. Navaratha [et al.] // FEBS Journal. — 2009. — Vol. 276. — P. 4644–4652.
8. Comparison of different intravascular thread occlusion models for experimental stroke in rats / J. Woitzik, U.C. Schneider, C. Thomé [et al.] // J. Neurosci. Methods. — 2006. — Vol. 151, N 2. — P. 224–231.
9. Heart disease and stroke statistics — 2015 update: a report from the American Heart Association / D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A.S. Go [et al.] // Circulation. — 2015. — Vol. 131. — P. 29–322.
10. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke / A. Popp, N. Jaenisch, O.W. Witte [et al.] // PLoS ONE. — 2009. — Vol. 4, № 3. — P. 4764–4774.
11. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat / H. Memezawa, H. Minasawa, M.-L. Smith [et al.]// Exp. Brain Res. — 1992. — Vol. 89. — P. 67.
12. Liman T.G. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration / T.G. Liman, M. Endres // Cerebrovasc. Dis. — 2012. — Vol. 33. — P. 492–499.
13. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke / Q. Vu, K. Xie, M. Eckert [et al.] // Neurology. — 2014. — Vol. 82, N 14. — P. 1277–1286.
14. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke / T.M. Woodruff, J. Thundyil, S.-C. Tang [et al.] // Molecular Neurodegeneration. — 2011. — Vol. 6, N 11. — P. 1–19.
15. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat / J.H. Garcia, Y. Yoshida, H. Chen [et al.] // American Journal of Pathology. — 1993. — Vol. 142, N 2. — P. 623–635.
16. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition) / S. Liu, G. Zhen, B.P. Meloni [et al.] // J. Exp. Stroke. Transl. Med. — 2009. — Vol. 2, N 2. — P. 2–27.
17. Stem cell-based therapies for ischemic stroke / L. Hao, Z. Zou, H. Tian [et al.] // BioMed. Research International. — 2014. — Vol. 2014. — P. 1–17.
18. The rise of cell therapy trials for stroke: review of published and registered studies / P.H. Rosado-de-Castro, P.M. Pimenthel-Coelho, L.M. Barbosa da Fonseca [et al.] // Stem cells and development. — 2013. — Vol. 22, N 15. — P. 2095–3012.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЭНДОВАСКУЛЯРНОЙ МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТКАНЕВОЙ ПРОАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Е.С. ЯРМОЛЮК[1,2], С.И. САВОСЬКО[2], Л.П. СТАЙНО[1], А.И. ТРОЯН[2]

[1] ГУ «Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», г. Киев
[2] Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев

Цель работы — доказать возможность использования модифицированной экспериментальной модели ишемического инсульта для доклинических испытаний проангиогенной тканевой и клеточной терапии путем анализа морфологических изменений в области ишемического повреждения головного мозга.

Материалы и методы. Проведен морфологический анализ зоны ишемического повреждения головного мозга 16 белых беспородных самцов крыс в условиях моделирования перманентной эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА, n = 6) и после интрацеребральной аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани на 2-е сутки после ОСМА (n = 5) и аутотрансплантации костного мозга (n = 5) на 1-, 3-, 7-, 14-, 21- и 28-е сутки после индукции фокальной церебральной ишемии. ОСМА осуществляли с помощью введения монофиламентной нити с силиконовым кончиком (*Doccol Corp.*, США) в просвет внутренней сонной артерии до блокирования СМА с одновременным выключением коллатерального кровотока.

Результаты. Эндоваскулярная окклюзия СМА с помощью модифицированной методики приводила к формированию четко очерченной зоны инфаркта (ЗИ) мозга, вокруг которой определялась зона пенумбры, которая в дальнейшем трансформировалась в периинфарктную зону (ПИЗ). ЗИ и ПИЗ в контрольной группе характеризовались развитием некротических и вторичных нейродегенеративных изменений, которые на 28-е сутки наблюдения приводили к формированию глиального рубця и ликворных кист. В группах с тканевой трансплантацией в ПИЗ, начиная с 7-х суток, отмечена активация репаративных процессов, прежде всего ангиогенеза, которые ограничивали распространение ЗИ, уменьшали выраженность воспалительной реакции и способствовали быстрому регрессу дистрофических изменений нейронов и глии.

Выводы. Предложенная эндоваскулярная методика позволяет эффективно моделировать фокальную церебральную ишемию с четко определяемыми гистологическими изменениями, которые характеризуются соответствующей динамикой во времени. Это позволяет на доклинической стадии исследовать эффекты тканевой проангиогенной терапии, в частности трансплантации эмбриональной нервной ткани и костного мозга для лечения ишемического инсульта.

Ключевые слова: экспериментальная модель, окклюзия средней мозговой артерии, силиконовый монофиламент, постинсультный ангиогенез.

MORPHOLOGIC ANALYSIS OF THE MODIFIED ENDOVASCULAR MODEL OF THE FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA FOR THE STUDY OF EFFICACY OF TISSUE PROANGIOGENIC THERAPY FOR EXPERIMENTAL STROKE

E.S. IARMOLIUK[1,2], S.I. SAVOSKO[2], L.P. STAYNO[1], O.I. TROYAN[2]

[1] SO «Institute of Neurosurgery named after A.P. Romodanov NAMS of Ukraine», Kyiv
[2] National Medical University named after O.O. Bogomolets, Kyiv

Objective — to prove the feasibility of use of the modified experimental stroke model for preclinical studies of proangiogenic tissue and cell therapy based on morphologuc analysis of brain ischemic lesion.

Materials and methods. Morphologic analysis of the cerebral ischemic lesion was carried out on 16 white male rats after permanent endovascular middle cerebral artery occlusion (MCAO, n = 6) and after intracerebral transplantation of allogenic embryonic nervous tissue on the 2nd day post-MCAO (n = 5) and autotransplantation of bone marrow (n = 5) on 1, 3, 7, 14, 21 and 28 day after focal cerebral ischemia. MCAO was induced by insertion of the monofilament thread with a silicone tip *(Doccol Corp., USA)* into the lumen of internal carotid artery until it blocked the middle cerebral artery along with the parallel blocking of collateral blood supply.

Results. The endovascular middle cerebral artrey occlusion with the use of the modified method resulted in a well circumscribed zone of cerebral infarction (ZI) with penumbra on its periphery, which further transformed into ischemic boundary zone (IBZ). ZI and IBZ in the control group were characterized by necrotic and secondary neurodegenerative changes, that were replaced by the glial scar and liquor cyst on the day 28 after occlusion. However tissue transplantaion into IBZ, in the experimenatl groups, starting on the 7th day, activated reparative mechanisms, including angiogenesis, that restricted the ZI expansion, decreased inflammation and promoted the rapid regression of neuronal and glial dystrophic changes.

Conclusions. The proposed endovascular technique allows for effecive focal cerebral ischemia modeling with well delineated histologic changes, that have the respective time dynamics. This could be used on the preclinical stage to study the effects of tissue proangiogenic therapy, namely embryonic nervous tissue and bone marrow transplantation for the treatment of ischemic stroke.

Key words: experimental model, middle cerebral artery occlusion, silicone monofilament, post-stroke angiogenesis.