

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Колесник В.В.

УДК: 616.12-094/002.331:616.24

ХРОНОЛОГІЯ ДЕСТРУКТИВНО-ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ТА ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНСУЛЬТІ У ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР*

Колесник В.В.

ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України». м. Київ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова НАМН України». м. Харків

Материалом исследования стали интактные самцы крыс линии Вистар 3-х месячного возраста (n=84) и особи с моделированным ишемическим инсультом (n=84), за которыми наблюдали на протяжении 28 суток. Микроскопическое исследование проводили традиционно. Кусочки головного мозга извлекали, промывали, фиксировали в 12%-м формальдегиде, поддавали постфиксации, обезвоживали. Срезы окрашивали, анализировали в микроскопе; фотографировали цифровой камерой «Canon EOS-3000». Было установлено, что на протяжении 1-х-17-х суток наблюдения осуществлялся выраженный структурно-функциональный регрес нейроцитов, эндотелия микрососудов головного мозга. Последний связывали из развитием тромбоза, изменениями трофики, развитием деструкции, некроза. Характерными морфологическими признаками считали дегенерацию, развитие воспалительных процессов. Таким образом, микроскопические изменения в коре головного мозга самцов крыс линии Вистар носили фазный характер; зависели от сроков дебюта моделированного ишемического эмболического инсульта; состояли в деструкции эндотелиоцитов, глии, ядерно-цитоплазматических компонентов нейронов, формировании очагов воспаления.

Ключевые слова: деструкция, дегенерация, воспаление, самцы крыс линии Вистар, моделированный ишемический эмболический инсульт.

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 № 0106 U003995.

З точки зору вітчизняних та зарубіжних дослідників, інсульт на теперішній час являє собою серйозну проблему як оперативної, так і консервативної неврології [2,4]. Статистика ВООЗ вказує на факти щорічної захворюваності на інсульт 16 мільйонів людей, 5 мільйонів із яких помирають. В Україні зазначені показники досягають 110-130 тисяч людей. Не дивлячись на сучасні методи нейровізуалізації, окремі аспекти розвитку інсульту залишаються недостатньо вивченими. Потребують подальшої розробки принципи структурно-функціонального дослідження хронології інсультного процесу, окремі аспекти патогенезу, клінічного перебігу хвороби, морфогенезу відтермінованого періоду [8]. Беззаперечним допоміжним фактором у цьому можуть стати експериментальні розробки з питань хронології етіопатогенезу ішемічного інсульту (розвиток та послідовність дегенеративно-деструк-

тивних, запальних реакцій), в яких суттєва роль відводиться лабораторним тваринам (лінійним щурам, мишам, кролям, тощо) [6]. Можливість надійного проведення екстраполяції моделі, короткий термін спостережень відносно життєвого циклу тварин сприяє детальному аналізу отриманих результатів, подальшому впровадженню останніх в клінічну практику. Отже, вивчення хронології дегенеративно-деструктивних, запальних реакцій при експериментальному інсульті у щурів видається актуальним.

Мета вивчити хронологію деструктивно-дегенеративних та запальних процесів при експериментальному інсульті у щурів лінії Вистар

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження стали 3-х місячні самці щурів лінії Вистар контрольної (n=84) та експеримент-

* Цитування при атестації кадрів: Колесник В.В. Хронологія деструктивно-дегенеративних та запальних процесів при експериментальному інсульті у щурів лінії Вистар // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 24–28

тальної (модельований церебральний ішемічний емболічний інсульт) груп (n=84). Створення моделі інсульту відбувалось у чіткій відповідності до відпрацьованої схеми-алгоритму [1]. Тварин утримували в типових металевих клітинах із сухою тирсовою (сосна, береза) підстилкою, за стандартних умов клімат-контролю віварію (t= 18-24° С, вологість 50-70 %, освітлення-60 лк). Екструдований корм та воду видавали ad libitum 30- 32 г 2 рази на добу. Щурів виводили із експерименту шляхом передозування кетамінового наркозу (у відповідності до Європейської конвенції по захисту хребтових тварин, що використовуються з експериментальною метою - Страсбург, 1986). Пост-мортально досліджували шматочки головного мозку, його судин (розміром 0,5 куб. см) контрольних та експериментальних самців. Фіксували у 12 %-му розчині формаліну на фосфатному буфері (рН=7,0-7,2), при t⁰ =18-20°С, зневоднювали спиртами зростаючої концентрації, заливали у парафін/целоїдин. Із блоків виготовляли зрізи товщиною 10-15 мкм (мікромом МК-25, Росія), останні забарвлювали гематоксиліном та еозином, імпрегнували азотно-кислим сріблом. Гістологічне дослідження проводили за традиційною схемою, поетапно (на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту, 17-ту, 21-шу, 28-му добу експерименту). Для мікроскопічного аналізу матеріалу застосовували світлооптичну систему мікроскопу Lieca (Німеччина): x 300; x 600.

Результати та їх обговорення

Морфологічне дослідження препаратів головного мозку контрольної групи щурів продемонструвало цілісність його цито та мієлоархітектоники. Мікроструктура кори, підкоркових центрів виразна, без ушкоджень пошарової будови. Судини без наявності дефектів, крововиливів, параваскулярного набряку. У цілому, структура дослідженого зразка препарату відповідала показникам статево-вікової норми для тварин відповідної лабораторної лінії.

Результати морфологічного аналізу секційного матеріалу, взятого від особин експериментальної групи з модельованим ішемічним інсультом, продемонстрували наявність властивих для ішемії розладів. Останні носили фазний характер та залежали від строків відтермінованості дебюту інсультного процесу, глибини ушкодження, величини його ділянок. У зв'язку із вище зазначеним спостереження проводили послідовно, з урахуванням критичних періодів розвитку ознак ішемії та її природного безмедикаментозного усунення.

У гістологічних препаратах, отриманих від тварин із групи з модельованим ішемічним інсультом спостерігали (перша доба спостереження) ділянки некрозу, що розповсюджувались на кору півкуль великого мозку. Зони тканини, що розташовувались поруч із ушкодженими, утримували лейкоцитарні інфільтрати, видавались більш контрастними. Одними із найбільш характерних діагностичних критеріїв розвитку ішемічного інсульту ставали інфаркти, які за своєю структурою відповідали типовим вогнищевим некрозам мозку. Розвиток ішемії та пов'язаний із нею розлад трофічних процесів призводили до руйнації кори з утворенням сітчастої структури головного мозку. Вона залишалась збереженою протягом першої доби постінсультного періоду, поступово замінюючись у наступний строк спостереження на повноцінні ділянки деструкції.

Останні утримували останки клітинного пулу із руйнованих нейроцитів. Їхні ядра характеризувались гомогенністю та гіперхромністю, схильністю до повторення форми клітини (витягнута, різка). 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). Звертали на себе увагу зміни ендотелію судин, що були пов'язані із гетерогенністю останнього та його спроможністю до десквамації за умов постнатального онтогенезу [7]. Згадані феномени провокували у подальшому інтенсивну міграцію лейкоцитів, «розплавлення» некротизованої тканини, «розм'якнення» структур у ушкоджених ділянках. Ці процеси додавали свого внеску у патогенез ішемічного розладу, що розвивався на тлі масштабної емболії. На мікрофотографіях світло-сіра за кольором речовина емболів, розташовуючись повздовж ушкодженого внутрішнього шару стінки, цілком заповнювала собою отвір судини, збільшувала його, тиснула на оточуючі структури. З часом у досліджених зонах розвивались дефекти шарів стінки, запалення, набряк. Останнє, у подальшому, можливо, сприяло тканьовій ізоляції судин та майбутнього розвитку тканьової гіпоксії. Зазначені факти сприяли появі додаткових причин щодо посилення структурних змін у судинній стінці. Останнє, безперечно, підсилювало розвиток ішемії. [10,11].

Третя доба експерименту позначалась посиленням інфільтрації різними клітинними елементами, головним чином, лімфоцитами, невеликою кількістю макрофагів та еозинофілів. Некротичні вогнища були повністю сформовані, носили розповсюджений характер. За інтенсивністю діapedезу еритроцитів у паравазальний простір (геморагічним компонентом) останні підпорядковувались на характерні групи. Першу із них, найбільш типову, складали білі інфаркти, що були розповсюджені як сірою, так і білою речовиною, переважно скроневої, тім'яної областей, зовнішньої капсули. Мікроскопічно тканина на місці формування останніх видавалася порохнявою, крихкою, дірчастою, із блідим, майже прозорим забарвленням (гематоксиліном-еозином). Іншу групу складали інфаркти змішаного типу, малочисельні, діагностовані лише на деяких гістологічних препаратах. Так звані, червоні геморагічні інфаркти, реєструвались у окремих ділянках (наближених до мікросудин, капілярів та їх розгалужень) сірої речовини мозку. Вони відрізнялись схильністю до генералізацій та формування великих ділянок вогнищ. У згаданих вище ділянках діагностували діapedез еритроцитарних клітин у паравазальний простір, набряк, некробіотичні зміни гліальних компонентів, ішемію [7]. Ендотеліальні клітини характеризувались ознаками гіперхромності ядра, зсувом останнього у напрямку одного із полюсів клітини, появою гетерохроматину. На відміну від препаратів контрольної групи, контакти між клітинами в судинах секцій від тварин експериментальної групи, були ослаблені, у поверхневому шарі формувалися щілини [5]. Периваскулярний набряк, який виникав у результаті підвищеної проникливості, призводив до певної ізоляції окремих судин від оточуючих тканин з наступним розвитком тканьової гіпоксії. Таким чином,

утворювались додаткові причини, що погіршували будову судинної стінки [10]. У безпосередній близькості від ушкодженої ділянки зосереджувались тромбоцитарні пластини та окремі мегакаріоцитами з ознаками секвестрації. В більш віддаленому діапазоні спостереження відмічались помітні деструктивно-дегенеративні зміни стінок судин, десквамація клітин поверхневого шару. На окремих препаратах відмічений ангіоспазм, стази та, як наслідок, виражений периваскулярний набряк. Речовина головного мозку у вогнищах набряку піддавалась помітному некрозу (від локальних ділянок з чітко відміченою межею до фрагментів з ознаками генералізації). Очевидно, що саме останні факти сприяли розвитку клінічної картини гіпоксії у щурів, вираженому ацидозу. Відмічена патогенетична картина розвитку ішемічного інсульту, не виключено, сприяла посиленню судинної мозкової недостатності, яка підсилювалася блокуванням мозкового кровообігу [9]. Зміни адгезивних властивостей еритроцитів, вірогідні зміни в системі згортання крові призводили до появи мікротромбів (рис. 1) у судинах, сприяли порушенню трофіки оточуючої тканини, розвитку мікробіотичних процесів.

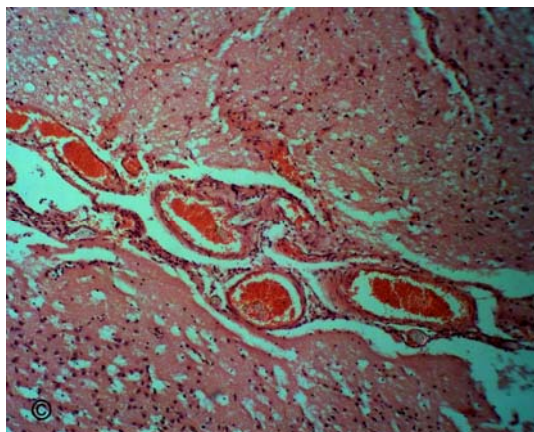


Рис. 1. Еритроцитарні тромби мікросудин головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, третя доба спостереження). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: x 300.

Одним із найбільш яскравих прикладів стали тромбози церебральних судин вертебро-базиллярного басейну, фронто-парієтального кута, підкоркових вузлів правої гемісфери. Оклюзія магістральних судин створювала умови для подальшого (сьома доба спостереження) ушкодження тканини півкуль головного мозку. Зазначений період спостереження знаменувався появою астроцитів, їх проліферуючих форм. Через тиждень після розвитку модельованого інсульту спостерігалось формування великої зони розм'якшення некротичного вогнища. На межі ділянки некрозу в корі відмічались чисельні скупчення лейкоцитів-лейкоцитарний вал. У окремих зонах між некротичним вогнищем та сусідньою з ним ділянкою починала формуватись структурована межа. Між осередком некрозу та нервовою тканиною реєстрували активацію астроцитів. Клітини розташовувались на деякій відстані одне від одного, без чіткого упорядкування. На межі відносно інтактною до ішемічних розладів тканини та ушкоджень відмічали велику кількість судин різного діаметру. Навколо останніх мали місце вогнища запальних процесів, інфільтративних явищ (нейт-

рофіли), що розповсюджувались щерть до зон локалізації мигдалевидного, хвостатого ядер. У окремих випадках ще спостерігались тромбози, дефекти шарів стінок судин, паравазальні крововиливи (рис. 2) не встановлювались. Зазначений період дослідження знаменувався початком процесів активного формування колагенових волокон, що у свою чергу, сприяло утворенню гліомезодермальних, у разі незначних за своїми розмірами зон ушкоджень та сполученотканинних рубців, кист,-за умов наявності великих ділянок деструкції. Модельовані ішемічні інсульти, що спостерігались у згадані строки, супроводжувались розвитком цілої низки судинних реакцій. В першу чергу, вони були пов'язані з феноменами деформації клітин, які формували шари судинної стінки. З іншого боку, велику роль відігравали зміни поверхневої архітекτονіки еритроцитів як клітин циркулюючої ланки системи гемопоєзу. В основі кожного із випадків лежали фізико-хімічні перебудови мембранних ліпідів, білків, а також, пов'язані із ними електричні властивості, іона проникливість клітинної мембрани.

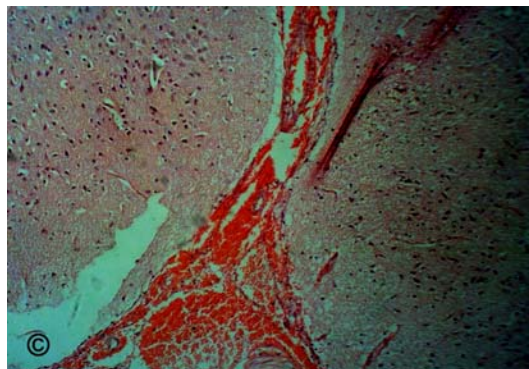


Рис. 2. Права півкуля головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, сьома доба спостереження). Еритроцитарні тромби мікросудин, паравазальні крововиливи. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: x 300.

На чотирнадцяту добу спостереження очищення кори великого мозку від некротичних мас спостерігалось на усій площі ушкодженої області. В цей період ще спостерігались ознаки запальних (рис. 3) реакцій (інфільтрація у переважній більшості нейтрофілами та макрофагами). На місці вогнищ колишніх некротів формувались повноцінні лікворно-гліальні кисти. Між ділянками ушкодженої та інтактною тканини продовжувалось формування гліального рубця. Останній утворювався за участю декількох шарів астроцитів. У разі розвитку об'ємних ділянок некротів, коли патологічний процес стосувався не лише кори півкуль головного мозку, але й субкортикальних структур, на межі ушкодження спостерігалась поява значної кількості капілярів, клітин сполученої тканини, гліальних клітин. Тобто, за умов об'ємних ушкоджень формувався змішаний гліо-сполученотканинний рубець. У сусідніх із ішемізованою зоною, як і у випадках, що реєстрували на ранніх етапах, спостерігали малочисельні, дифузні розосереджені ушкоджені нейроти. У розташованих поруч із ділянками некрозу зонах визначали порушення структури кори, у окремих випадках відсутність першого та другого шарів. Пошук ділянок з ознаками клітинної проліферації виявився не задовільним.

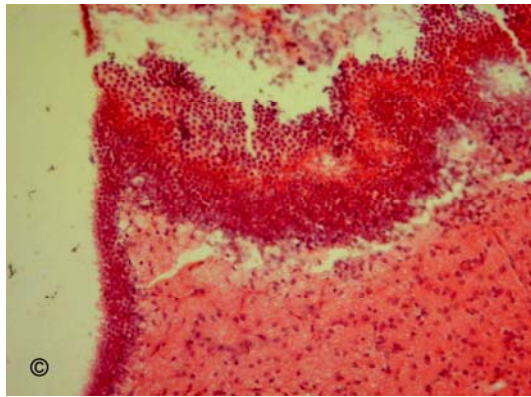


Рис. 3. Права півкуля головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, чотирнадцята доба спостереження). Розповсюджені вогнища інфільтрації. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: x 300.

На сімнадцяту добу спостереження зміни у структурі півкуль головного мозку щурів з модельованим ішемічним інсультом нагадували ушкодження, що були зареєстровані у попередні строки дослідження (чотирнадцята доба). Мікроскопічно останні мало різнились між собою. Продовжувалось формування гліального рубця. На місці вогнищ колишніх некрозів відзначали повноцінні лікворно-гліальні кисти. Мікросудини півкуль головного мозку характеризувались чіткою будовою, відсутністю грубих дефектів стінок (рис. 4). Процеси усунення клітинного детриту тривали, поступово наближуючись до свого фіналу. Факти проліферації клітин встановлено не було.

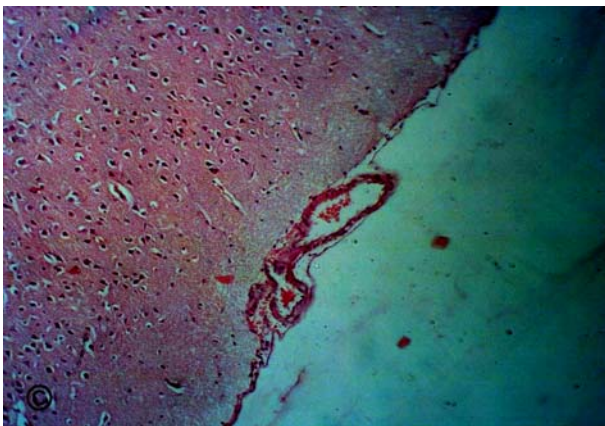


Рис. 4. Півкуля головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, сімнадцята доба спостереження). Отвір мікросудини. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: x 300.

Через три тижні потому (двадцять перша доба спостереження) морфологічна картина змін у півкулях головного мозку щурів зводилась до тотального розповсюдження та завершення процесів очищення від некротичних мас. На цей період в окремих ділянках ще виявляли інфільтрацію ушкоджених зон мозку нейтрофілами та макрофагами, однак, зазначені явища носили поодинокий характер. У місцях некротичних вогнищ спостерігались лікворно-гліальні кисти. Процес формування останніх йшов до свого завершення (їхні фрагменти були цілком вкриті оболонкою, що утворювалась переважним чином гліальними клітин). Між ушкодженою та не розруйнованою тканинами великого мозку зберігався гліальний рубець. Знов

сформований рубець долучав до свого складу астроцити, що розташовувались пошарово, послідовно (в три-чотири шари). Як і у попередній період спостереження (чотирнадцята доба) за умов масштабних, глибоких ушкоджень (коли руйнування стосувалось субкортикальних центрів) на межі останніх йшов розвиток капілярів. Поруч із ними концентрувались гліальні, сполученотканинні клітини (утворювався гліо-сполученотканинний рубець). У межових з ішемізованою зоною, як і у попередні строки спостерігали дифузне розосередження ушкоджених форм нейроцитів. У прилеглих до колишніх ділянок некрозу зонах кори відзначалось певні порушення пошарової структури останньої. На гістологічних препаратах мікросудини мали вигляд цілісних структур.

На четвертому тижні (двадцять восьма доба) спостереження був повністю завершений процес очищення тканини від клітинного детриту. На місцях вогнищ некрозів спостерігались гліо-сполученотканинні рубці та повноцінні лікворні кисти. Визначним моментом даного терміну спостереження виявились особливості структури сусідньої з ушкодженою зоною ділянок, де переважна більшість нейронів виявилась неушкодженою. У віддалених від зони колишнього некрозу ділянках реєстрували поодинокі гіперхромні неушкоджені нейрони.

Висновки: розвиток ішемічного інсульту у лінійних щурів позначався виразною хронобіологічністю (1-ша-28 доба експерименту), що чітко залежала від давності термінів початку процесу, супроводжувалась дистрофією нейроцитів, їхніх відростків, ушкодженнями цитоплазматичних елементів, структури ядра. На тлі зазначених змін активно розвивались проліферативні та інфільтративні реакції.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні хронобіологічних закономірностей розвитку експериментального церебрального ішемічного (емболічного) інсульту у самців щурів лінії Вістар та подальшій екстраполяції отриманих результатів у клінічну практику.

Література

1. Торяник И.И. Унифицированный подход к созданию модели ишемического инсульта головного мозга в эксперименте на крысах линии Вистар / И.И. Торяник, В.В. Колесник // Актуальні проблеми сучасної медицини. - 2010. - № 4. - С. 155-159.
2. American Heart Association [American Heart Association / Heart Disease and Stroke Statistics.] [Electronic resurs]. - Update, Dallas TX, 2007. - P. 36-41. <http://www.americanheart.org/statistics>.
3. 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, N 10. — P. 2381—92.
4. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells / T. Mimura, M. Dezawa, H. Kanno, I. Yamamoto // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. - 2005. - Vol. 64, Issue 12. - P.1108-1117.
5. Bell R.D., Winkler E.A., Sagare A.P. [at al.] Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype on the adult brain and during brain aging // Neuron. - 2010. - Vol. 68. - P. 409-427.
6. Durukan A. Ischemic Stroke in Mice and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. - 2009. - Vol. 573. - P. 95-114.
7. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change / G. Tyson, G. Teasdale, D. Graham, J. Mc Culloch // Ann. Neurol. - 2004. - Vol. 15. - P. - 559-567.

8. Hossniann K.A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke / K.A. Hossmann // Cellular and Molecular Neurobiology. - 2006. - Vol. 26, Issue 7-8. - P.1057-1083.
9. Mohr J.M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / J.M. Mohr, D.W. Choi, J.C. Grotta. - Philadelphia: Livingstone, 2004. - 1616 p.
10. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats / Y. Taguchi, S. Takashima, E. Sasahara // Archives of Histology and Cytology. - 2004. - Vol. 67, № 3. - P. 253-261.
11. Wahtgren N. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe implementation of Thrombolysis in Stroke- Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study // N. Wahtgren, N. Ahmed, A. Davalos // The Lancet Neurology. - 2007. - Vol. 369. - P. 275.

English version: CHRONOLOGY OF DESTRUCTIVE AND DEGENERATIVE INFLAMMATION PROCESSES IN WISTAR RATS WITH EXPERIMENTAL BRAIN STROKE*

Kolesnyk V. V.

SI A. P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Kyiv

SI I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Kharkiv

Three-month-old intact male Wistar rats (n= 84) and animals with modeled ischemic stroke (n= 84), observed during 28 days, served as material for this research. Microscopic examination was carried out in a traditional way. Bits of the brain were removed, washed, fixed in 12 % formaldehyde, subjected to postfixation and dehydrated. Sections were contrasted, analyzed under a microscope and photographed with a digital camera "Canon EOS-3000". It was found that a pronounced structural-functional regression of neurocytes and endothelium of cerebral microvessels took place during days 1–17 of the observation. The above regression was attributed to development of thrombosis, trophic changes, development of destruction and necrosis. Degeneration and development of inflammation were considered characteristic morphological features. Thus, microscopic changes in the cerebral cortex of male Wistar rats were of a phase character; depended upon terms of the début of modeled ischemic embolic stroke; consisted in destruction of endotheliocytes, glia and nucleocytoplasmic components of neurons and formation of inflammatory foci.

Key words: destruction, degeneration, inflammation, male Wistar rats, modeled ischemic embolic stroke.

This work is a part of the research: "Development of technology for obtaining autocytes of various types of biological tissue from the bone marrow stromal cells and their use for the treatment of diseases of various origins using autotransplantation", No. 0106 U003995.

Introduction

From the point of view of domestic and foreign researchers, stroke at the present time is a major issue both of the operative and conservative neurology [2, 4]. WHO statistics indicate the annual incidence of stroke is 16 million people, 5 million of whom die. In Ukraine, these values reach 110–130 thousand people. Despite modern imaging techniques, certain aspects of stroke remain poorly understood. The principles of structural and functional studies of chronology of the stroke process, as well as certain aspects of the pathogenesis, clinical disease and morphogenesis of the delayed period demand further development [8]. Undoubtedly, an auxiliary factor in reaching this goal may become experimental investigations on the chronology of the pathogenesis of ischemic stroke (development and consistency of degenerative and destructive, inflammatory reactions) in which a substantial part is to be played by laboratory animals (linear rats, mice, rabbits, etc.) [6]. The ability to conduct a reliable extrapolation model as well as a relatively short period of the observation of the life cycle of animals contribute to a detailed analysis of the results and their further implementation in clinical practice. Thus, the study of the chronology of degenerative-destructive and inflammatory reactions in rats with experimental stroke appears to be important.

Purpose

To study the chronology of destructive-degenerative and inflammatory processes in Wistar rats with experimental stroke.

Material and methods of research

The material for the study were three-month-old male Wistar rats of the control (n=84) and experimental (modeled cerebral embolic ischemic stroke; n=84) groups. Modeling of a stroke took place in strict accordance with the established pattern-algorithm [1]. The animals were housed in standard metal cages with dry sawdust (pine, birch) litter, under standard conditions of vivarium climate control (t=18–24° C, humidity 50–70%, luminance 60 lx). Extruded feed and water were given ad libitum 30–32 g, 2 times a day. Rats were taken out of the experiment by an overdose of ketamine anesthesia (according to the European Convention for the Protection of vertebral animals used for experimental purposes, Strasbourg, 1986). Slices of the brain and its vessels (size 0.5 cu. cm) of control and experimental males were researched post mortem. For this purpose, the slices were fixed in 12 % solution of formalin on phosphate buffer (pH=7,0–7,2), with t⁰=18–20°C, dehydrated with alcohols of increasing concentration and embedded in paraffin/celloidin. From the blocks, cuts were made 10–15 microns thick (microtome MK-25, Russia); the latter were dyed with hema-

* To cite this English version: Kolesnyk V. V. Chronology of destructive and degenerative inflammation processes in Wistar rats with experimental brain stroke - // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 28 -31.

toxylin and eosin, and impregnated with nitrogen acid silver. Histological studies were performed in the traditional way, on the stage-by-stage basis (on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 17th, 21st and 28th day of the experiment). For microscopic analysis of the material, light-optical system of Lieca microscope (Germany) was used: x 300; x 600.

Results and discussion

Morphological study of the brain specimens of the rats from the control group demonstrated the integrity of its cyto- and myeloarchitectonics. The microstructure of the cortex and subcortical centers is pronounced, layered structure undamaged. Vessels show no defects, hemorrhage, or paravascular edema. In general, the structure of the examined sample of the specimens met the indicators of gender and age norms for animals of the corresponding laboratory line.

The results of the morphological analysis of sectioned material taken from the animals of the experimental group with modeled ischemic stroke showed the presence of disorders characteristic for ischemic disease. The latter being of phase character were dependent on the nature and timing of the debut of the stroke process, depth and area of damage. Due to the above mentioned, observation was performed sequentially, based on critical periods of development of signs of ischemia and its natural non-medication removal.

In histological specimens obtained from the animals from a group of modelled ischemic stroke, areas of necrosis were observed (the first day of the observation) distributed on the cortex of the cerebral hemispheres. Areas of tissue located next to the injuries contained leukocyte infiltrates and appeared more contrasting. One of the most distinctive diagnostic criteria of ischemic stroke were heart attacks, which in their structure meet the typical focal necroses of the brain. Development of ischemia and the associated disorder trophic processes led to the destruction of the cortex with formation of a network structure of the brain. It remained intact during the first day of the post-stroke period, gradually replaced by fully developed destruction areas in course of further observation. The areas held the remains of the cell pool of the destroyed neurocytes. Their nuclei were characterized by homogeneity and hyperchromy, as well as a tendency to repeat the cell shape (elongated, sharp). Analysis of individual specimens of rat brains, however, did not provide opportunity for histological registration of total necrosis, generalization areas of "softening" foci, and formation of full-scale scar. Against this background, the death of neurocytes cortex (phase of partial necrosis) was discovered by microscopy. Attention was paid to changes in the endothelium of blood vessels, which were related to the endothelium's heterogeneity and its capacity of desquamation under the conditions of postnatal ontogeny [7]. These phenomena provoked further intensive migration of leukocytes, "melting" of necrotized tissue, "softening" of the structures in damaged areas. These processes have added their contribution to the pathogenesis of ischemic disorder that developed against the backdrop of massive embolism. In micrographs, the light gray substance of the emboli, placing themselves along the damaged inner layer of the wall, filled the vessel outlet completely, increased it, and pressed on surrounding structures. Over time, in the surveyed areas defects of wall layers devel-

oped, accompanied by inflammation and swelling. The latter may have contributed to vascular isolation and future development of tissue hypoxia. These facts led to the emergence of additional reasons to strengthen the structural changes in the vascular wall. The latter, of course, contributed to the development of ischemia [10, 11].

On the third day of the experiment, the increasing infiltration of various cellular elements, mainly lymphocytes, a small number of macrophages and eosinophils was detected. Necrotic foci, fully formed, were distributed in nature. Erythrocytes were distributed into typical groups according to the intensity of diapedesis into the parabasal space (hemorrhagic component). The first and most typical group consisted of white infarctions distributed as gray and white matter of mainly temporal and parietal areas and external capsule. Microscopically, the tissue formation at the site of the latter's formation appeared crumbly, fragile, friable, with pale, almost transparent coloration (hematoxylin-eosin). The other group consisted of mixed type infarctions, numerically small, diagnosed only on some histological specimens. The so-called red hemorrhagic infarctions were registered in certain areas (close to the microvessels, capillaries and their branches) of gray matter of the brain. They differ by a tendency to generalization and formation of large foci. In the abovementioned areas, diapedesis of erythrocyte cells into the parabasal space, edema, necrobiotic changes in glial components, and ischemia were diagnosed [7]. Endothelial cells were characterized by signs of nuclear hyperchromy, the shift of the nucleus towards one of the poles of the cell, the appearance of heterochromatin. Unlike the specimens from the control group, the contacts between cells in the vessels of the animals of the experimental group were attenuated, with cracks formed in the surface layer [5]. The perivascular edema which occurred as a result of hypersensitivity led to certain isolation of individual vessels from surrounding tissue with subsequent development of tissue hypoxia. Thus, the additional reasons were formed that worsened the structure of the vascular wall [10]. In the vicinity of the damaged area, concentration of thrombocyte plates and individual megakaryocytes with signs of sequestration was detected. In the medium to long observation range, notable destructive-degenerative changes in the vessel walls and desquamation of the surface layer cell were registered. In some specimens, angiospasm, stasis and the consequent pronounced perivascular edema were detected. The substance of brain edema in the centers subjected to pronounced necrosis (from local areas with clearly marked boundary to fragments with signs of generalization). It is obvious that these facts led to the development of the clinical picture hypoxia and marked acidosis in rats. It is possible that the recorded pathogenetic picture of ischemic stroke contributed to the cerebral vascular insufficiency, which is reinforced by blocking of cerebral blood flow [9]. Changes in adhesive properties of erythrocytes and possible changes in the blood coagulation system led to the emergence of microthrombs (Fig. 1) in vessels, contributing to violation of the surrounding tissue's trophics and development of microbiotic processes.

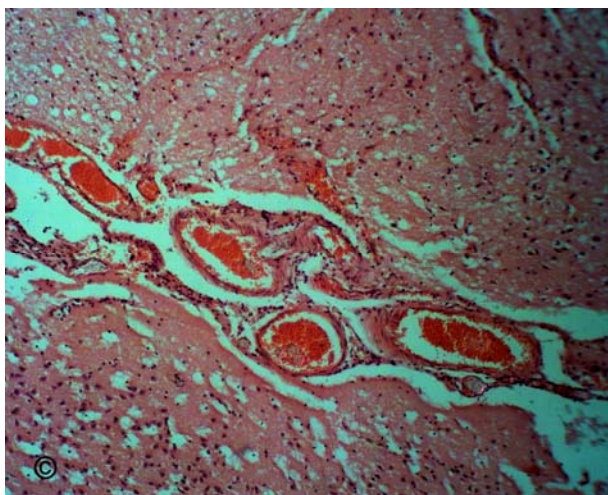


Fig. 1. Red thrombuses of brain microvessels in Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 3rd day of observation). Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

One of the most striking examples was cerebral vascular thromboses of the vertebral-basilar basin, parietal front corner, subcortical sites of the right hemisphere. Occlusion of major vessels created conditions for further (day 7 of the observation) tissue damage of the cerebral hemispheres. The above observation period was marked by the appearance of astrocytes and their proliferating forms. A week after the modeled stroke, the formation of a large area of the necrotic focus softening was observed. In the border area of necrosis in the cortex, numerous accumulations of leukocytes (leukocyte shaft) were recorded. In some areas between the necrotic focus and neighboring area, a structured limit started taking shape. Activation of astrocytes was recorded between the site of the necrosis and nervous tissue. The cells were located at some distance from each other, without a clear arrangement. On the verge of tissue relatively intact to ischemic disorders and injuries a large number of vessels of different diameters was noted. Around the latter, there were foci of inflammation — infiltrative events (neutrophils) which proliferated in the zones of localization of almond-shaped and caudate nuclei. In some cases, thromboses and defects in the layers of vessel walls were observed while paravasal hemorrhages (Fig. 2) were not established. The above study period was marked by the beginning of the process of active formation of collagen fibers, which in turn contributed to appearance of small in size gliomezodermal damage zones and conjunctive tissue scars and cysts, subject to the availability of large areas of destruction. Modeled ischemic strokes that were observed in the mentioned period, accompanied by the development of a number of vascular responses. First of all, they were connected with the phenomenon of deformation of cells that form the layers of the vessel wall. On the other hand, the major role was played by changes in the surface architectonics of erythrocytes as cells of a circulating link of the hematopoiesis system. At the heart of each of the cases lay physicochemical reorganization of membrane lipids, proteins, and the connected electrical properties, as ion penetration of the cell membrane.

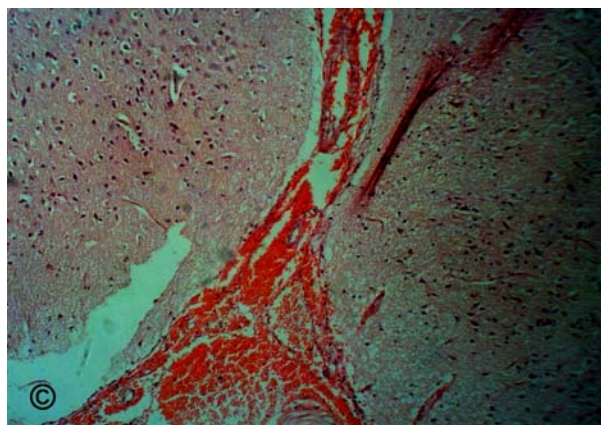


Fig. 2. Right cerebral hemisphere in male Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 7th day of observation). Red thrombuses of brain microvessels, paravasal hemorrhages. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

On day 14 of the observation, the cerebral cortex's cleaning of the necrotic masses was seen throughout the whole damaged area. During this period, signs of inflammation reactions (Fig. 3) were still observed (infiltration in most cases by neutrophils and macrophages). In the former foci of necrosis, full-sized liquor-gliar cysts were observed. Between areas of damaged and intact tissue, formation of glial scar continued. The latter was formed with multiple layers of astrocytes. In the case of appearance of bulk areas of necrosis, when the pathological process concerned not only the cerebral cortex but also subcortical structures, the appearance of a large number of capillaries, conjunctive tissue and glial cells on the border of the damaged area was observed. That is, in terms of mass lesions, mixed glial and conjunctive tissue scar was formed. In the areas neighboring with the ischemic zone, just as in the cases recorded in the early stages, numerically small, diffusely scattered and damaged neurocytes were detected. In the zones located next to the areas of necrosis, damaged cortex structure and, in some cases, lack of the first and second layers were observed. Search for the areas with signs of cell proliferation did not bring any results.

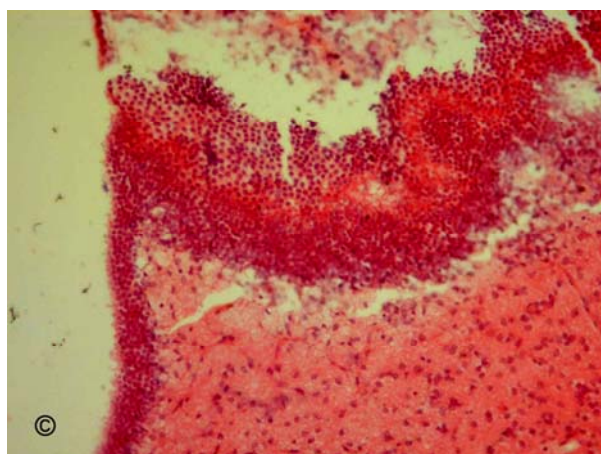


Fig. 3. Right cerebral hemisphere in male Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 14th day of observation). The widespread focal points of infiltration. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

On day 17 of the observation, changes in the structure of the cerebral hemispheres of rats with modeled ischemic stroke resembled injuries reported in the previ-

ous study periods (day 14). Microscopically, the last few differed among themselves. Formation of glial scar continued. In the former foci of necrosis, full-sized liquor-glial cysts were observed. Microvessels of the cerebral hemispheres were characterized by a clear structure and absence of gross defects in walls (Fig. 4). The processes of elimination of the cellular detritus continued, gradually attaining their final stage. No facts of cell proliferation were established.



Fig. 4. Cerebral hemisphere in male Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 17th day of observation). Lumen of microvessels. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

Three weeks later (21st day of the observation), the morphological pattern of changes in the cerebral hemispheres of rats was limited to total distribution and completion of the processes of purification from necrotic masses. During this period, some areas still showed infiltration of the damaged areas of the brain by neutrophils and macrophages; however, these events were isolated in nature. In areas of necrotic foci, liquor-glial cysts were observed. The formation of the latter was in its final phase (their fragments were completely covered with coating formed mostly by glial cells). Between the injured and undamaged tissues of the brain, a glial scar remained. The newly formed scar absorbed astrocytes were located in layers sequentially (three to four layers). As in the previous observation period (day 14) under conditions of large, deep injuries (when destruction concerned subcortical centers), the development of capillaries occurred at the border of the injuries. Next to them, glial and connective tissue cells concentrated, forming a glial and connective tissue scar. At the boundary of the ischemic zone, as in previous periods, diffuse dispersal of damaged forms of neurocytes was observed. In the areas of the cortex close to the former zones of necrosis, certain violations of the latter's layered structure were noted. Microvessels in histological specimens had the appearance of complete structures.

On the fourth week (28th day of the observation) the process of cleaning fabrics from cellular detritus was fully completed. At the local foci of necrosis, glio-conjunctive scars and fully developed liquor cysts were observed. A highlight of the observation period was discovering the

characteristic features of the structure next to the damaged zone areas, where the vast majority of neurons appeared intact. In areas not contiguous with the former zone of necrosis, isolated hyperchromic intact neurons were recorded.

Conclusions: the development of ischemic stroke in linear rats was characteristic of distinct chronobiology (days 1–28 of the experiment), which was clearly dependent on the timing of the prescription process, accompanied by degeneration of neurocytes, their processes, damage to cytoplasmic elements and the structure of the nucleus. Amid these changes proliferative and infiltrative reactions developed actively.

Prospects for future research are to explore the chronobiological patterns of development of experimental cerebral ischemic (embolic) stroke in male Wistar rats and the subsequent implementation of the results into clinical practice.

References

1. Toryanik I.I. Unifizirovannyi pochod k sozdaniyu modeli ishemičeskogo insulta golovnogo mozga v eksperimente na krysach linii Vistar / I.I. Toryanik, V.V. Kolesnik // Aktual'ni problemi suchasnoi medycini. - 2010. - № 4. - S. 155-159.
2. American Heart Association [American Heart Association / Heart Disease and Stroke Statistics] [Electronic resource]. — Update, Dallas TX, 2007. — P. 36—41. <http://www.americanheart.org/statistics>
3. 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. — No. 10. — P. 2381—2392.
4. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells / T. Mimura, M. Dezawa, H. Kanno, I. Yamamoto // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. — 2005. — Vol. 64, Issue 12. — P. 1108—1117.
5. Bell, R. D.; Winkler, E. A.; Sagare, A. P. [et al.] Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype on the adult brain and during brain aging // Neuron. — 2010. — Vol. 68. — P. 409—427.
6. Durukan, A. Ischemic Stroke in Mice and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. — 2009. — Vol. 573. — P. 95—114.
7. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change / G. Tyson, G. Teasdale, D. Graham, J. Mc Culloch // Ann. Neurol. — 2004. — Vol. 15. — P. — 559—567.
8. Hossniann, K. A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke / K. A. Hossmann // Cellular and Molecular Neurobiology. — 2006. — Vol. 26, Issue 7—8. — P. 1057—1083.
9. Mohr J. M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / J. M. Mohr, D.W. Choi, J. C. Grotta. — Philadelphia: Livingstone, 2004. — 1616 p.
10. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats / Y. Taguchi, S. Takashima, E. Sasahara // Archives of Histology and Cytology. — 2004. — Vol. 67. — No. 3. — P. 253—261.
11. Wahtgren N. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the safe implementation of thrombolysis in stroke-monitoring study (SITS-MOST): an observational study // N. Wahtgren, N. Ahmed, A. Davalos // The Lancet Neurology. — 2007. — Vol. 369. — P. 275.

Матеріал надійшов до редакції 2.12.2013