

УДК 616831-005.1-005.4-085:616.831

©В. І. Цимбалюк¹, В. В. Колесник¹, І. І. Торяник²ДУ "Інститут нейрохірургії імені А. П. Ромоданова АМН України"¹, м. КиївДУ "Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова АМН України"², м. Харків

МІКРО- ТА УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МОДЕЛІ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА ЙОГО ТЕРАПІЇ АВТОЛОГІЧНИМИ СТОВБУРОВИМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ У ЩУРИВ ЛІНІЇ ВІСТАР

МІКРО- ТА УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МОДЕЛІ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА ЙОГО ТЕРАПІЇ АВТОЛОГІЧНИМИ СТОВБУРОВИМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ У ЩУРИВ ЛІНІЇ ВІСТАР – У роботі представлено результати щодо вивчення мікро- та ультрамікроскопічних змін при експериментальному інсульті як варіанті моделі гострого порушення мікроциркуляції за ішемічним типом. Матеріалом дослідження стали щури-самці лінії Вістар у віці 3–6 місяців масою 160–175 г, кількість – 60 особин (n= 62). Мету досліджу досягали шляхом емболізації колатеральних судин частками сульфату барію (125 мг/кг), що надавало гарантованого вимкнення магістрального та колатерального кровообігу правої гемісфери головного мозку та стандартні ураження головного мозку, схожі із тими, що виникали у людини у разі розвитку традиційної клінічної патології. Результати оцінювали за характером виявлених мікро- та ультрамікроскопічних змін (гострі розлади мікроциркуляції, тромбози, ішемія, білі, червоні, змішані інфаркти, вогнищеві некрози мозку). Резюмуючи досягнуте, відмітимо ефективність проведеного експерименту та оптимістичні перспективи застосування екстраполятивних даних та аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин у якості фундамента для подальшої апробації новаторських методів оперативної інтервенції ішемічного інсульту.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ И УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА И ЕГО ТЕРАПИИ АУТОЛОГИЧЕСКИМИ СТЕВЛОВЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ У КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР – В работе представлены результаты изучения микро- и ультрамикроскопических изменений при экспериментальном инсульте как варианте модели острого нарушения микроциркуляции по ишемическом типе. Материалом исследования стали крысы-самцы линии Вистар в возрасте 3–6 месяцев весом 160–175 г, количество – 60 особей (n=62). Цель опыта достигалась путем эмболизации коллатеральных сосудов частицами взвеси сульфата бария (125 мг/кг), что давало гарантированное выключение магистрального и коллатерального кровоснабжения соответствующего полушария головного мозга и стандартные повреждения головного мозга, сходные с таковыми у человека в случае развития традиционной клинической патологии. Результаты оценивали по характеру выявленных микро- и ультрамикроскопических изменений (острые расстройства микроциркуляции, тромбозы, ишемия, белые, красные, смешанные инфаркты, очаговые некрозы мозга). Резюмируя достигнутое, отметим эффективность проведенного эксперимента и оптимистические перспективы использования экстраполятивных данных и аутологических стволовых мезенхимальных клеток в качестве фундамента для дальнейшего апробирования новаторских методов оперативной интервенции ишемического тромбоемболического инсульта.

MICROSCOPIC AND ULTRAMICROSCOPIC EVALUATION OF THE MODEL EFFICIENCY OF ISCHEMIC STROKE AND ITS THERAPY BY AUTOLOGOUS TRUNK MESENCHYMAL CELLS IN WISTAR RATS – The results of the microscopic and ultramicroscopic changes of the experimental ischemic stroke as the model variant for the ischemic type of the acute blood microcirculation disorders are presented in this work. The examinational material were Wistar male rats aged 3-6 months

(n= 62), and weighed 160–175 g. The aim of the experiment was achieved by the embolization means of the basic and collateral blood vessels of the sulfate barium suspension (125 mg/kg), which let to guaranteed turning off the basic and collateral blood circulation of the right cerebral hemisphere and standard cerebral damages, that similar with the such in a human in a case of the development of a traditional clinic pathology. The results are evaluated to character of the micro- and ultramicroscopical changes (acute blood microcirculation disorders, thrombosis, white, red, mixed infarcts, focal cerebral necrosis). Sum upping, of capable of the achievement, we are noting the carried out experiment's efficiency and the using optimistic perspective of the extrapolative data and autologic mesenchymal stem-cells in the capacity as a foundation for the further of the newest methods of the ischemic stroke surgical intervention.

Ключові слова: експериментальний ішемічний інсульт, інбредні щури-самці лінії Вістар, мікроскопічні та ультрамікроскопічні зміни, інфаркт, тромбоз, аутологічні стовбурові мезенхімальні клітини.

Ключевые слова: экспериментальный ишемический инсульт, инбредные крысы-самцы линии Вистар, микроскопические и ультрамикроскопические изменения, инфаркт, тромбоз, аутологические стволовые мезенхимальные клетки.

Key words: experimental ischemic stroke, male Wistar rats, microscopic and ultramicroscopic changes, infarctus, thrombosis, autologic mesenchymal stem-cells.

ВСТУП На даний час у доступній науково-методичній літературі відсутні дані щодо порівняльного мікро- та ультрамікроскопічного аналізу результатів усунення наслідків ішемічного інсульту. Однак проблема ефективної терапії зазначеної хвороби існує і становить собою гостру проблему сучасної хірургічної неврології та відновної нейрохірургії. Особливого поширення питання терапії інсульту набувають у разі, коли мова йде про застосування аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин [1, 2, 14]. Зазначений засіб лікування ішемічного інсульту вже не один рік спонукає до життя жваві та суперечливі дискусії серед відомих фахівців у сфері нейрохірургії [6, 9, 13]. До сьогодні остаточно невідомо наслідків застосування клітинної терапії, побічних ефектів, віддалених результатів [4, 5, 10]. Прояснити ці факти, на наш погляд, можливо завдяки ретельній мікро- та ультрамікроскопічній оцінці структурно-функціональних змін у тканинах головного мозку, що зазнав впливу ішемії та наступних некротичних процесів. Оптимізувати дослідження найбільш конструктивно спроможен експеримент, центральною фігурою в якому можуть бути лінійні тварини, зокрема щури лінії Вістар, на яких добре відпрацьована патофізіологічна більшість дослідницьких нюансів [8]. Зважаючи на все вищезазначене та доцільність створення експериментальної моделі ішемічного інсульту з перспективою терапії ос-

таннього аутологічними стовбуровими мезенхімальними клітинами [7], й було запроваджене зазначене дослідження. Метою роботи стало оцінити ефективність моделі ішемічного інсульту та його подальшої терапії аутологічними стовбуровими мезенхімальними клітинами у щурів лінії Вістар в експерименті.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Матеріалом експериментального дослідження послуговували інбредні щури-самці лінії Вістар (n=62) 3–6-ти місячного віку масою 160–175 г, яких утримували на стандартних умовах віварію. З метою отримання стандартизованої моделі ішемічного інсульту в піддослідних тварин застосовували емболію колатеральних гілок загальної сонної артерії в одній із півкуль головного мозку. Щурів наркотизували кетаміном інтраперитонеально: із розрахунку 125 мг/кг маси тварини. Цей спосіб отримання моделі ішемічного інсульту шляхом емболізації колатеральних судин частками завису сульфату барію надавав гарантованого вимкнення магістрального та колатерального кровопостачання відповідної півкулі головного мозку [3, 7]. Вищезазначені заходи стосувались тварин, що склали групу експериментальної екстраполяції (n=20) та групи лінійних щурів (n=20), яких лікували із застосуванням аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин. Третю групу (n=12) склали псевдооперовані особини. Четверту групу (n=10) утворили інтактні (контрольні) щури. Тварин виводили із експерименту шляхом передозування кетамінового наркозу на 1-шу, 3-ю, 14-ту доби дослідження.

Постмортально досліджували сіру та білу речовини головного мозку, його оболонки, судини. Шматочки органів фіксували 24 год у 12 % розчині формаліну на фосфатному буфері (pH=7,0–7,2) при t⁰=18–20 °C. Зневоднювали методом проведення матеріалу через систему розчинів етилових спиртів, заливали у смоли. Препарати різали за допомогою санного мікротому. Отримані зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозинном, робили імпрегнацію сріблом). Для мікроскопічного аналізу матеріалу застосовували оптичну систему мікроскопа ЛОМО (x200; x400; x1500). Результати чітко фіксували у стандартні картки морфологічного дослідження. Метод електронної трансмісійної мікроскопії використовували для виявлення ультраструктурних змін. Шматочки головного мозку, його оболонки, судин видаляли, промивали у проточній воді, витримуючи на пластикових інагрегатних сітківках. Матеріал фіксували у 2 % глутаровому альдегіді на фосфатному буферному розчині (pH=7,3–7,4), піддавали постфіксації у 1 % оксиді осмію на фосфатному буферному розчині (pH=7,3–7,4), зневоднювали у спиртах, заливали в епон-аралдит. Ультратонкі зрізи виготовляли за допомогою ультратому, контрастували ураніл-ацетоном, цитратом свинцю, аналізували в електронному мікроскопі ("Olympus", Японія).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Ретельний мікроскопічний та ультрамікроскопічний аналіз сірої та білої речовини головного мозку, його мікросудин, оболонки у зразках від тварин контрольної та псевдооперованої груп не викликав жодної підозри відносно мінімальних структурних ознак наявності ішемічного інсульту. Шари сірої та білої речовини в обох спостереженнях (від 1-ї дослідної доби до 14-ї) були добре позначені на мікропрепаратах.

Кора чітко диференційована, контрастна, виразна, її структура без ознак порушення, цілісна. Базовим компонентом кори залишались тіла нейроцитів. Ядра нейронів щільно та досить однорідно розповсюджені в межах зрізів. Цитоплазма нервових клітин позначали виразно. Мікрокапіляри були представлені у вигляді подовгуватих, витягнутих, овальної форми отворів. Шари стінок великих та магістральних судин головного мозку чітко окреслені, без ознак пошкоджень, пенетрацій, дефектів диференціації. Ендотеліоцити внутрішньої оболонки на мікро- та ультрамікроскопічних препаратах виявляли нормальну структуру цитоплазми з виразним ендоплазматичним ретикулолом, мітохондріями. Явища стазів, тромбозів у судинах відсутні. Оболонки головного мозку цілісні, без геморагій, кальцинозу. На відміну від вищезазначеного, аналіз зразків препаратів, взятих від тварин експериментальної групи (з екстрапольованим інсультом) встановив, що одними із найхарактерніших діагностичних критеріїв розвитку ішемічного інсульту ставали інфаркти, які за своїм характером відповідали типовим вогнищевим некрозам мозку. Однією із клінічно вагомих причин розвитку останніх була недостатність кровопостачання, яку, перш за все, пов'язували із атеросклеротичними процесами та грубою патологією екстракраніальних відділів сонних, хребцевих артерій. Моделювання ішемічного інсульту мозку в експерименті не складало доволі серйозного завдання, оскільки тотальна оклюзія судин цілком можливо сприяла цілій низці чинників, у тому числі, і штучного стиснення судин. Проте наслідки відтворення останнього у дослідницьких цілях, як виявилось, мали неоднозначний характер. По-перше, розміри уражень завжди залежали від рівня пошкодження судин та мікротопографії останніх. З іншого боку, умови розвитку тромбоемболічних явищ регламентували об'єм уволікання у процес судинного басейну. За інтенсивністю діapedезу еритроцитів у паравазальний простір (геморагійний компонент) інфаркти поділяли на характерні групи. Першу із них, найтипівішу, складали сірі інфаркти, що були розповсюджені як сірою, так і білою речовиною, переважно скроневої, тім'яної ділянок [2, 8, 12]. До іншої відносили червоні інфаркти, які супроводжувались активним виходом еритроцитів за межі судинної стінки на тлі зміни ендотелію судин. Звертали на себе увагу зміни ендотелію судин, що могли бути пов'язаними із гетерогенністю останнього та його спроможності до десквамації за певних умов постнатального онтогенезу. Згадані феномени прооклювали інтенсивну міграцію лейкоцитів, "розплавлення" некротизованої тканини, процеси "розм'яккання" структур на пошкоджених ділянках (1–2 доба експерименту). Третя доба позначалася появою астроцитів, вираженою організацією вогнищ, утворених проліферуючими астроцитарними клітинами та організацією мікросудин. Активне формування колагенових волокон (7–14 доба експерименту), сприяло утворенню гліомезодермальних, у разі незначних за своїми розмірами зон пошкоджень та сполучнотканинних рубців, кіст, за умов наявності великих ділянок деструкції. Мікроскопічно та субмікроскопічно на цьому тлі виявляли загибель нейроцитів кори (фаза неповного некрозу) із замісним астрогліозом.

Модельовані ішемічні інсульти, що спостерігали в експериментальних тварин, проявлялись як у ранні, так і пізні строки та супроводжувалися розвитком цілої низки судинних реакцій. У першу чергу, вони були пов'язані з феноменами деформації клітин, які формували шари судинної стінки. З іншого боку, велику роль відігравали зміни поверхневої архітекtonіки еритроцитів як клітин циркулюючої ланки системи гемопоезу. В основі кожного із випадків лежали фізико-хімічні перебудови мембранних ліпідів, білків, а також пов'язані із ними електричні властивості, іонна проникливість клітинної мембрани [2]. Ендотеліальні клітини характеризувались ознаками гіперхромності ядра. Переваскулярний набряк, який виникав у результаті підвищеної проникливості, призводив до певної ізоляції окремих судин від навколишніх тканин з наступним розвитком тканинної гіпоксії. Таким чином, утворювались додаткові причини, що погіршували структурні зміни у судинній стінці. В ендотеліальних клітинах відмічали ознаки посилення гідратації, поступового зростання внутрішньоклітинного набряку, аж до розплавлення ламінарного краю цитоплазматичних мембран, яке вказувало на підхід рідини із підендотеліального простору. Одним із найяскравіших стали тромбози церебральних судин вертебро-базиллярного басейну, фронто-парієтального кута, підкоркових вузлів правої гемісфери. Оклюзія магістральних судин: дуги аорти, підключичної артерії, хребцевої та сонної артерій; емболії ставали наявними причинами ішемічного розм'яккання речовини головного мозку. Ці процеси призводили до різкого розширення отворів судин (на гістологічних зрізах вони виглядали зіяючими, утримували чисельні, чітко організовані еритроцитарні тромби, які щільно контактували з ендотеліальним шаром клітин). У безпосередній близькості від пошкодженої ділянки зосереджувались тромбоцитарні пластини та окремі мегакаріюцити з ознаками секвестрації. У більш віддаленому діапазоні спостереження відмічали помітні деструктивно-дегенеративні зміни стінок судин, десквамація клітин поверхневого шару. На окремих препаратах відмічено ангіоспазм, стази та, як наслідок, виражений периваскулярний набряк. Речовина головного мозку у вогнищах з набряком піддавали помітному некрозу (від локальних ділянок з чітко відміченими межами 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 кровотоку. Зміни адгезивних властивостей еритроцитів, вирогідні зміни в системі згортання крові призводили до появи мікротромбів у судинах, сприяли порушенню трофіки навколишньої тканини, розвитку мікробіотичних процесів. Можна було б припустити, що гіперагрегація еритроцитів сприяла різкому збільшенню вмісту в крові вільних еритроцитарних агрегатів-мікротромбів. На мікропрепаратах було добре помітно, що саме мікротромби (з еритроцитів, що мали зміни поверхневої архітекtonіки) у ряді випадків призводили до повної або часткової блокади кровопостачання в окремих ділянках мікроциркуляторного русла, змен-

шенню кількості функціонуючих капілярів та артеріоло-венулярних анастомозів, що викликало склеротичні зміни навколишніх тканинних структур.

Застосування клітинної терапії, друга експериментальна група (автологічних стовбурових мезенхімальних клітин), призводило до помітної позитивації процесу. Зони некротичних змін вже на першу- третю добу зменшувались у своїх розмірах. Нервові клітини характеризувались цілісністю, наявністю чітких диференціальних детермінант. Ядра розташовувались у центрі клітин, мали позначену мікро- та ультрамікроскопічну мембрану, що не втрачала власних меж. Нечисельні глибокі гетерохроматину чітко визначали на електронних мікрофотографіях, характеризувались контрастністю. Цитоплазма залишалась електронно-прозорою, ознак пошкодження не містила. Отвори мікросудин в окремих випадках з ознаками запусівання, переважна більшість утримувала лише нормоцити та малочисельні сладжі. В полі зору лише в декількох випадках були зареєстровані тромбоцитарні пластини, що розташовували у безпосередній близькості від еритроцитів, проте "не склеювали" останніх, як це спостерігали у препаратах від тварин із екстраполятивним ішемічним інсультом [13]. Явищ мікровезикуляції, десквамації ендотеліального шару судин відмічено у зазначеній групі тварин не було. На чотирнадцяту добу експерименту спостерігали лише поодинокі факти паравазального набряку (що пояснювали остаточною фінальною реакцією на процеси запалення, які у нашому випадку цілком можна розглядати як реакції захисної реакції). Крововиливи у паравазальний простір були відсутніми.

ВИСНОВКИ Мікро- та ультрамікроскопічними методами була встановлена наявність типових ознак ішемічного інсульту в тканині головного мозку щурів лінії Вістар експериментальної групи. До останніх відносили некрози, вогнища сірих та червоних інфарктів, стази, тромбози.

Застосування автологічних стовбурових мезенхімальних клітин за умов розвитку модельованого ішемічного інсульту призводило до усунення ознак розвитку ішемії, та тромбоемболічних процесів з подальшим відновленням структури мікроциркуляторного русла, в окремих випадках суттєво запобігало останнім.

Представлена робота являє собою фрагмент науково-дослідницької тематики: "Розробка технології отримання автоклітин різних типів біологічних тканин із стромальних клітин кісткового мозку і застосування їх для лікування захворювань різного генезу за допомогою автотрансплантації", номер № 0106U003995;2010-2012 р.р.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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 [др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 4. – С. 195–198.
2. Виленский Б. С. Инсульт – современное состояние проблемы / Б. С. Виленский // Неврологический журнал. – 2008. – № 2. – С. 4–10.
3. Ноздрачев А. Д. Анатомия крысы: (лабораторные живот-

- ные) / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков; под ред. акад. А. Д. Ноздрачева. – СПб. : Лань, 2001. – 464 с.
4. Применение мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс / В. И. Скворцова, Л. В. Тубский, Р. Т. Таирова [др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 1. – С. 14–20.
5. Пуповинная кровь: перспективы применения стволовых клеток / В. И. Цымбалюк, Н. Я. Жилка, В. П. Кидонь, Н. М. Баханцова // Здоров'я України. – 2007. – № 9. – С. 74.
6. Смоланка В. І. Нейрохірургічна допомога при інсульті / В. І. Смоланка // Практична ангіологія. – 2008. – № 3. – С. 24–27.
7. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток / Н. Н. Зинькова, Е. Г. Гилерович, И. Б. Соколова [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 // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2010. – Т. 10, випуск 4(32). – С. 155–159.
9. Цымбалюк В. Стволовые клетки нервной ткани – надежда современной неврологии и нейрохирургии / В. Цымбалюк, В. Медведев // Doctor. – 2004. – № 4. – С. 9–13.
10. Brodcrick J. P. Treatment of acute ischemic stroke: Part 1: recanalization strategies / J. P. Broderick, W. Hacke // Circulation. – 2002. – Vol. 106, Issue 12. – P. 1563–1569.
11. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis / J. Chen, Yi Li, L. Wang [et al.] // Brain Res. – 2004. – Vol. 1005. – P. 21–28.
12. Durukan A. Ischemic Stroke in Mice and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. – 2009. – Vol. 573. – P. 95–114.
13. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on cognitive function in rats with ischaemic stroke / I. Sokolova, O. Fedotova, N. Zinkova [et al.] // Bull Exp. Biol. Med. – 2006. – Vol. 2. – P. 511–514.
14. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells / Y. Li, J. Chen, C.L. Zhang [et al.] // Glia. – 2005. – Vol. 49, Issue 3. – P. 407–417.

Отримано 08.12.11