УДК 616.832-004.2:611-018.46(048.8)

© В.І. Цимбалюк, В.В. Колесник, І.І. Торяник, 2012.

МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ОБ'ЄМУ ДЕФЕКТУ РЕЧОВИНИ ТА СУДИН ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР ПРИ ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ ТА ПОДАЛЬШІЙ КЛІТИННІЙ ТЕРАПІЇ

[1]В.І. Цимбалюк, [1]В.В. Колесник, [2]І.І. Торяник

[1]ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМН України», відділення відновної нейрохірургії (керівник – акад. В.І. Цимбалюк), м. Київ;[2]ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», лабораторія нових та маловивчених інфекцій (керівник – д-р мед.н, ст. наук. співроб. С.І. Похил), м. Харків.

MORPHOMETRIC ANALISIS OF THE HEMISPHERIUM CEREBRAL SUBSTENCE AND BLOOD VESSELS DEFECTS VOLUM IN WISTAR RATS WITH ISCHEMIC STROKE AND CELL THERAPY

V.I. Tschymbaluk, V.V. Kolesnik, I.I. Torianik

SUMMARY

Much effort has been made in neurosurgery for mesenchimal stem cell types with high therapeutic potentials for repair of damaged neural tissue. This work is focused on analyzing and the morphometric mark of the cerebral substence and blood vessels defects volum with ischemic stroke and cell therapy. It has been shown that mesenchimal stem cell have a strong pro- angiogenic, endothelial cell proliferational potentials. In addition (with morphometric methodes) has been proved, that systemic local injections of mesenchimal stem cell to Wistar's rats with ischemic stroke stimulates recovery of injured tissue and blood vessels flow.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОБЪЕМА ДЕФЕКТА ВЕЩЕСТВА И СОСУДОВ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ И ДАЛЬНЕЙШЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

В.И. Цымбалюк, В.В. Колесник, И.И. Торяник

РЕЗЮМЕ

Огромное значение в нейрохирургии имеет применение мезенхимальных стволовых клеток с высоким терапевтическим потенциалом для репарации повреждений нервной ткани. Данная работа сфокусирована на анализ и морфометрическую оценку объема повреждений вещества мозга, его кровеносных сосудов при ишемическом инсульте и дальнейшей клеточной терапии. В ней показано, что мезенхимальные стволовые клетки обладают мощным про- ангиогенным, эндотелиоцитарным пролиферативным потенциалами. В исследовании доказано морфометрическими методами, что систематическое локальное введение мезенхимальных стволовых клеток крысам линии Вистар с ишемическим инсультом стимулирует восстановление поврежденной ткани и рост кровеносных сосудов.

Ключові слова: об'єм дефекту, речовина головного мозку, церебральні кровоносні судини, ішемічний інсульт, щури лінії Вістар, мезенхімальні стовбурові клітини.

Насьогодні експериментальні дослідження сучасних методів лікування ішемічного інсульту вигідно випереджають клінічні спостереження [3]. Завдяки цьому розроблені та апробовані методики виділення мезенхімальних стовбурових клітин, їхнього культивування, збереження властивостей та нарощування in vitro до необхідної кількості. Лабораторні досліди надали змогу розв'язати надто важливі, з точки зору сучасної патологічної фізіології, питання стосовно впливу клітинної терапії на перебіг запальної реакції у зоні тканьового ушкодження [6, 7]. Експериментальним шляхом було встановлено якісний спектр факторів, що стимулюють, регулюють, гальмують запальні процеси. In vivo доведена позитивність динаміки відновлення структур головного мозку, поведінкового та неврологічного статусів тварин, які відігравали роль живих моделей (кролики, щури лінії Вістар, лабораторні миші) [5, 8, 10]. Проте, лише якісні показники впливу мезенхімальних стовбурових клітин не спроможні задовольнити зростаючі потреби сучасної експериментальної науки. Фахівці намагаються спиратись на кількісні дані, що більш ґрунтовно характеризують результати, надають можливості висловлюватись на користь їхньої ймовірності. Велику роль у вирішенні зазначеної проблеми відіграють морфометричні методи [1, 13]. Їхня оцінка площини, об'єму ушкодженої та інтактної тканини залишається доступним, ґрунтовним елементом у доказовій базі позитивності використання нових методів терапії ішемічного інсульту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом дослідження стали самці щурів лінії Вістар (n= 75), 3-х-6-ти місячного віку, масою 160-175 г. Тварин утримували за стандартних умов («клімат - контроль») віварію Харківської медичної академії післядипломної освіти (ХМАПО) Міністерства охорони здоров'я України (МОЗ) (температура повітря становила 18° -24° С°, з урахуванням

пойкілотермності особин; відносна вологість не перевищувала рівень у 50-70%; норма штучного освітлення підтримувалась на цифрі 60 лк з 12-ти годинним циклом). Вся популяція піддослідних тварин розподілялась на 4-ри експериментальних групи. Першу із них складали контрольні особини. До другої відносили псевдооперованих самців. До третьої групи надходили лінійні щури з модельованим експериментальним інсультом. Четверта формувалась тваринами, що на тлі модельованого ішемічного інсульту отримували клітинну терапію (аутологічні мезенхімальні стовбурові клітини) трьома відпрацьованими способами (субокціпітально, транскраніально, внутрішньовенно).

Постмортально досліджували шматочки головного мозку, судин (розміром 0,5х 0,5см) контрольних та експериментальних самців щурів лінії Вістар. Секційний матеріал ретельно промивали у проточній воді. Фіксували 24 години у 12 %-му розчині формаліну на фосфатному буфері (pH=7,0-7,2), при t^0 =18-20^0 C^o. Далі зневоднювали методом проведення матеріалу через систему розчинів етилових спиртів від 30^0 до абсолютного спирту включно, заливали у смоли. З парафінових/ целоїдинових блоків виготовляли серії гістологічних зрізів. Отримані зрізи забарвлювали гематоксиліном еозином. Гістологічне дослідження речовини головного мозку, судин проводили за традиційною схемою. Для мікроскопічного аналізу матеріалу застосовували світлооптичну систему мікроскопу Біолам П2-1, ЛОМО (Росія) та Lieca (Німеччина) (х300; х600; х1350). Співставлення контрольних зразків із клінічними проводили у порівняльному аспекті.

Об'єм ушкоджень головного мозку визначали наступним чином. Користуючись стандартними гістологічними методами із залитих у блоки шматочків головного мозку інбредних самців щурів лінії Вістар виготовлювали серійні зрізи. За для об'єктивізації отриманих даних до вибірки залучали матеріал від шести піддослідних тварин. Цілісне зображення площинного зрізу отримували за допомогою сканера Epson. Площини іпсілатеральної ($S_{іпс.}$) та конрлатеральної ($S_{контр.}$) півкуль визначали на кожному із 15 зрізів. Обєм ушкодження тканини мозку ($V_{поверхні}$) розраховували за формулою $V_{поверхні}=\sum_n(S_{контр}-S_{іпс.})$х L, де$\sum_n$ – сума площин ушкоджень мозкової тканини на n зрізах,L-товщина 15 зрізів, що дорівнює 105 мкм. Отримані кількісні дані були статистично оброблені із залученням ресурсів програми Statistica (Stat Soft Inc). Підрахунок судин проводили на зрізах, забарвлених антитілами проти vWF, у межовій по відношенню до ушкоджень зоні, симетричних їй ділянках неушкодженої півкулі та у віддалених від ушкоджень зонах М1-М2 (за даними атласу «The Rat Brain in stereotaxic coordinates») обох півкуль через 2 тижні після емболії колатеральних гілок загальної сонної артерії. У кожній із зазначених ділянок випадково відбирали 10 варіантів визначення поля зору мікроскопічно (Lieca, Німеччина) за умов збільшення (х40) та виготовляли фотографії із залученням резервів фотокамери DFC 100 Lieca (Німеччина). Підраховували кількість судин у кожному полі зору. Отримані дані аналізували за допомогою програми Statistica (Stat Soft Inc) [2;4;13].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За для об'активізації результатів започаткованого дослідження порівняння даних, отриманих у контролі, групі псевдо оперованих тварин з модельованим ішемічним інсультом та застосуванням клітинної терапії, використовували морфометрічні підходи у дослідженні судинних змін у напівкулях головного мозку самців щурів лінії Вістар [1]. За цим аналізу піддавали ділянки напівкуль головного мозку тварин, що відповідали за станом статево-віковій нормі піддослідних (з формованими кистами та гліальноз'єднанотканьовими рубцями) [9]. Реєстрували також кількість судин у відповідній напівкулі, у межі ділянок ушкоджених некрозом, з деструктивно-дегенеративними змінами (дорзо-латеральні зони на півкуль головного мозку) [12]. У результаті морфометричного дослідження правої півкулі головного мозку самців щурів лінії Вістар Кіото у віці 3-х-6-ти місяців було встановлено, що чисельність судин у тварин інтактної контрольної групи, псевдооперованих, з модельованим ішемічним інсультом та заподіяною клітинною терапією була різною. Контрольна інтактна група характеризувалася у середньому 16.1±0.5 у полі зору розміром 15 мкм/2. У тій же напівкулі групи псевдоопериваних тварин кількість судин складала 9.7±0.7. Група щурів з модельованим ішемічним інсультом в середньому мала 9.7±0.7 судин у полі зору. Кількість судин, що нараховувалися у групі клітинної терапії складала відповідно 20.2±1.1. Об'єм ділянки головного мозку тварин, що були ушкоджені формуванням гліозоз'єднанотканьового рубця та окремою кистою, як результат оклюзії, складав 29±1.3 мм3. У групі тварин з модельованим ішемічним інсультом та наступною клітинною терапією зазначені показники досягали 24±1.1 мм3. У групі інтактного контролю та псевдооперованих тварин за зрозумілих причин данні показники не визначались. Таким чином об'єм ушкодження мозку у групі клітинної терапії був в 1.2 меншим, ніж у тварин з наявним модельованим ішемічним інсультом (розбіжності ймовірні при p>0.05). Для уточнення результатів морфометричних досліджень у відповідності до анатомічних даних, які стосувалися анатомії головного мозку щурів (поля М1-М2 по атласу «The Rat in stereotaxic coordinates» використовували порівняльні результати щодо визначення кількості судин у ділянках, віддалених від зони некрозу (первинна та вторинна моторна кора

правої напівкулі) [11;13]. Обстеженню підлягали групи тварин з модельованим ішемічним інсультом та клітинною терапією, застосованою на фоні останнього. Результати практично ідентичними і складали 14.0±0.7, 14.2±2.0. Сумарні результати за загальною чисельністю судин у групі тварин з клітиною терапією значно перевищували аналогічні показники у групі тварин з модельованим ішемічним інсультом, де мезенхімальні стовбурові клітини не застосовувались.

ВИСНОВКИ

У представленому дослідженні морфометрично доведено, що застосування мезенхімальних стовбурових клітин на тлі ішемічного інсульту призводило до зменшення об'єму ушкодженої речовини мозку та активізації ангіогенезу у ділянках, наближених до зони некрозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 384 с.

2. Богуславский Д.Д. Методика количественной оценки реабилитационного потенциала у инвалидов вследствие мозгового инсульта / Д.Д. Богуславский / / Український вісник психоневрології. - 2005. - № 4. - С.11-14.

3. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте / И.Б. Соколова, Н.Н. Зинькова, А.А. Билибина, П.В. Кругляков, Е.Г. Гилерович, Д.Г. Полынцев, В.А. Отеллин // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2007. - № 4. - С. 54-62.

4. Павличенко Н.Н. Влияние трансплантации мезенхимных стволовых клеток на течение экспериментального инсульта у крыс: автореферат дис. канд. біолог. наук: спец. 03.00.25 «Гистология, цитология, клеточная биология» / Н.Н. Павличенко. - СПб., 2008. - 16 с.

5. Торяник И.И. Структурно-функциональные особенности сосудов головного мозга линейных крыс при моделированном ишемическом инсульте / И.И. Торяник, В.В. Колесник // Світ медицини та біології. - 2010. - № 3. - С.83-86.

6. Застосування стовбурових клітин у лікуванні запально-дегенеративних уражень ЦНС / В.І. Цимбалюк, М.І. Лисячий, О.В. Маркова, Л.Д. Пічкур // Трансплантологія. - 2005. - № 2. - С. 73-79.

7. Колесник В.В. Експериментальний тромбоемболічний інсульт у щурів лінії Вістар як варіант патофізіологічної моделі гострих порушень мікроциркуляції за ішемічним типом / В.В. Колесник // Патологія. -2011.- № 1. - С. 56-59.

8. Цимбалюк В.И. Мікро та ультрамікроскопічна оцінка ефективності моделі ішемічного інсульту та його терапії автологічними мезенхімальними клітинами у щурів лінії Вістар/В.І. Цимбалюк,В.В. Колесник, І.І. Торяник //Вісник наукових досліджень.- 2012.- №1.- С. 86-89.

9. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the in-farct boundary in adult rats / R. Zhang, Z. Zhang, L. Wang et al. // J. Cerebral Blood Flow Metabolism. - 2004. - Vol. 24. - P. 441- 448.

10. Chang Y.C. Regenerative therapy for stroke / Y.C. Chang, W.C. Shyu, S.Z. Un, H. Li // Cell Transplantation. - 2007. - Vol. 16, Issue2. - P. 171-181.

11. Durukan A. Ischemic Stroke in Mace and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. - 2009. - Vol. 573. - P. 95-114.

12. Mohr J.M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / J.M. Mohr, D.W. Choi, J.C. Grotta. - Philadelphia: Livingstone, 2004. - 1616 p.

13. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, Ch. Watson - New York. Academic Press, 1998. - 474 p.