

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ТКАНИН ЗОРОВОГО НЕРВА ЩУРІВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ПЛАЦЕНТИ

О.С.Якушко, В.І.Шепітько, В.М.Коваль

Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. – проф. В.І.Шепітько) Української медичної стоматологічної академії, м. Полтава

Резюме. Досліджено вплив підшкірної трансплантації кріоконсервованої плаценти на стан зорового нерва щурів. Установлено, що трансплантація кріоконсервованої плаценти призводить до повнокров'я судин, не викликаючи патологічних змін.

Ключові слова: кріоконсервована плацента, трансплантація, зоровий нерв.

В останнє десятиріччя значна увага приділяється розробці нових методів лікування з використанням продуктів фетоплацентарного комплексу [1, 2]. Досягнення біології та медицини показали, що клітинна і тканинна терапія набагато ефективніша, ніж трансплантація органів. Перспективним у цьому напрямку є використання плацентарної тканини [3]. Плацента (Пц) у великій концентрації містить гормони, поліпептиди, що відносять до ростових факторів, мікроелементи, вітаміни, ферменти, ембріональні білки [4, 5]. Це дає змогу використовувати її у лікувальній практиці як активатор репаративних процесів, стимулятор росту, імуномодулятор. Використання низькотемпературного консервування робить застосування фетоплацентарних препаратів зручним за рахунок створення тканинних банків і накопичення запасів трансплантованого матеріалу, дозволяє провести відповідні дослідження для гарантування безпеки реципієнта. Кріоконсервування тканин сприяє сповільненню обмінних процесів у них і збереженню їх у біологічно активному стані [6, 7]. До теперішнього часу в літературі відсутні дані щодо впливу трансплантації кріоконсервованої Пц на структурні елементи зорового нерва (ЗН).

Мета дослідження. Вивчити морфофункціональні особливості ЗН щурів у нормі та при трансплантації кріоконсервованої Пц. Робота є фрагментом НДР "Розробка нових кріобіологічних технологій, використання кріоконсервованих ембріональних клітин, тканин людини та тварин у медицині" (№ 0199U000323).

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження виконане на 30 статевозрілих щурах-самцях лінії "Вістар", що перебували при кімнатній температурі на звичайному лабораторному раціоні. Матеріалом дослідження була ретробульбарна частина ЗН щурів. Перша група тварин – контрольна (5 щурів); другій групі (25 щурів) одноразово підшкірно трансплантовано кріоконсервовану Пц розмірами 0,5x0,5x0,5 см. Оперативні втручання виконували під кетаміновим наркозом з дотриманням правил асептики та антисептики. Евтаназію тварин проводили шляхом передозування наркозу на 2-гу, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту доби експерименту. Матеріал фіксували в 2,5 % розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері упродовж доби при температурі +4°C, після відмивання у фосфатному буфері обробляли відповідно до правил, прийнятих в електронній мікроскопії, поміщали в ЕПОН-812 (В.Я.Карупу, 1984). Напівтонкі зрізи виготовляли на ультрамікромомі УМТП-7 і фарбували розчином толудідинового синього та поліхромним методом (барвник Маллорі та розчин основного фуксину). Дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа "Carl Zeiss" та окуляр-мікрометра МОВ-1-15х. Розрахунок об'ємів клітин та ядер проводили за методом К.Ташке (1980) з використанням формули:

$$V = \frac{\pi}{6} LB^2,$$

де V – об'єм клітини або ядра, L – довжина клітини або ядра, B – ширина клітини або ядра.

Мікрофотографування здійснювали за допомогою мікроскопа фірми "BIOREX" з адаптованим пакетом програм для фотографування. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Excell [8].

Результати дослідження та їх обговорення. Установлено, що ретробульбарна частина ЗН шурів вкрита трьома мозковими оболонками: твердою, павутинною та м'якою. Тверда оболонка утворена щільною волокнистою сполучною тканиною, що містить щільно розташовані колагенові волокна, фіброцити, поодинокі макрофаги, тучні клітини, лімфоцити. Павутинна оболонка являє собою тонкий шар спеціалізованих арахноїдальних клітин. Між павутинною та м'якою оболонками ЗН видно субарахноїдальний простір. М'яка мозкова оболонка утворена пухкою сполучною тканиною, яка містить значну кількість фіброblastів, колагенових та еластичних волокон, ззовні вкрита шаром мезотеліальних клітин, а зсередини – клітинами глії. Від м'якої оболонки всередину нерва відходили сполучнотканинні перетинки, між пучками колагенових волокон яких проходять кровоносні судини. Перетинки розмежовували нервові волокна на пучки. Товщина сполучнотканинних прошарків становила $3,7 \pm 0,3$ мкм. Нервові волокна були різного калібру, вкриті мієліновою оболонкою, утвореною олігодендроцитами. Ці клітини неправильної форми, мали округлі ядра темного кольору, об'ємом $54,5 \pm 6,1$ мкм³, з невеликою кількістю цитоплазми навколо них. Індекс Гертвіга становив $0,29 \pm 0,02$. Біля м'якої мозкової оболонки та навколо кровоносних судин нами виявлені клітини з великими світлими ядрами овальної форми, з чітко окресленою ядерною мембраною та невеликими зернами розсіяного хроматину – астроцити. Об'єм ядер становив $115,6 \pm 4,8$ мкм³, індекс Гертвіга – $0,31 \pm 0,02$. Спостерігалися у невеликій кількості клітини мікроглії.

При підшкірній трансплантації кріоконсервованої Пц на 2-гу добу у твердій мозковій оболонці відмічалось збільшення кількості макрофагів, тучних клітин, лімфоцитів. Кількість останніх була максимальною. Колагенові та еластичні волокна незмінні, товщина самої оболонки не відрізнялася від контролю. Спостерігалася реакція судин гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) твердої оболонки на введення фетоплацентарної тканини у вигляді незначно-

го розширення артеріол, капілярів та венул. Трабекули павутинної оболонки незмінні. Нами відмічено збільшення кровонаповнення судин м'якої мозкової оболонки ЗН у вигляді розширення артеріол, капілярів та венул. Морфологічна структура самої оболонки у тварин експериментальної групи на 2-гу добу не відрізнялася від контролю. За рахунок виходу рідкої частини крові у сполучну тканину збільшилася товщина сполучнотканинних перетинок всередині нерва – з $3,7 \pm 0,3$ мкм в контрольній групі тварин до $4,6 \pm 0,2$ мкм ($p < 0,05$) в основній. Самі волокна ЗН не змінені. Астроцити мали світлу цитоплазму, світлі овальної форми ядра з чітко окресленою мембраною, об'ємом $61,9 \pm 8,4$ мкм³, що в 1,8 раза ($p < 0,001$) менший за контроль. Спостерігалось вірогідне зменшення індексу Гертвіга у 1,5 раза ($p < 0,001$). Ядра олігодендроцитів були менші за ядра астроцитів, темного кольору, округлої форми, з невеликою кількістю цитоплазми навколо них, об'ємом $33,07 \pm 4,3$ мкм³, що у 1,6 раза ($p < 0,01$) менший за контроль. Індекс Гертвіга становив $0,19 \pm 0,02$ проти $0,29 \pm 0,02$ у контрольній групі ($p < 0,001$). Зросла кількість клітин мікроглії.

На 7-му добу експерименту у сполучній тканині твердої мозкової оболонки ЗН спостерігалось підвищення кількості макрофагів, тучних клітин; кількість останніх досягла свого максимального значення. Більшість тучних клітин дегранульована. Судини ГМЦР розширені, повнокровні. В цей час відмічалось також збільшення кровонаповнення судин м'якої мозкової оболонки, що досягло свого максимального значення. Товщина сполучнотканинних прошарків, що відходили від оболонки, становила $5,2 \pm 0,3$ мкм, що в 1,4 раза більше за контроль ($p < 0,001$). При дослідженні клітин глії на світлооптичному рівні не виявлено змін їх структурних компонентів, але відмічалось зменшення об'єму ядер та відповідно індексу Гертвіга. Розміри клітин та їх ядер суттєво не відрізнялися від таких на 2-гу добу експерименту. Так, об'єм ядер астроцитів становив $65,2 \pm 8,4$ мкм³, індекс Гертвіга $0,23 \pm 0,02$, об'єм ядер олігодендроцитів – $33,06 \pm 4,5$ мкм³, індекс Гертвіга – $0,17 \pm 0,02$. Продовжувала зростати чисельність клітин мікроглії. Нервові волокна без змін, вкриті мієліновою оболонкою (рис. 1).

На 14-ту добу експерименту спостерігається поступове відновлення клітинного складу

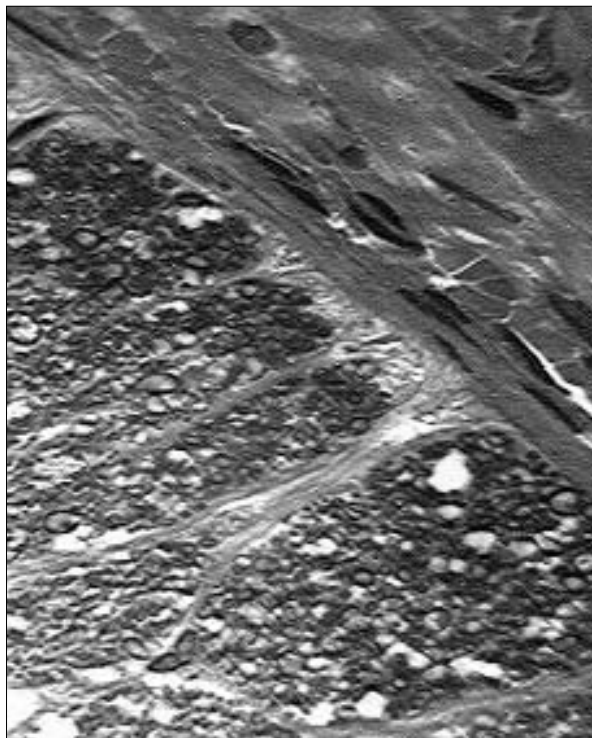


Рис. 1. Оболонки, нервові волокна та клітини глії зорового нерва щура на 7-му добу експерименту. Мікропрепарат. Забарвлення толуїдиновим синім. Об. 100^х, ок. 10^х.



Рис. 2. Нервові волокна та клітини глії зорового нерва щура на 30-ту добу експерименту. Мікропрепарат. Забарвлення толуїдиновим синім. Об. 100^х, ок. 10^х.

сполучної тканини твердої оболонки ЗН, а також тенденція до зменшення числа лімфоцитів, тучних клітин та макрофагів. Судини ГМЦР твердої та м'якої оболонок ЗН ще розширені, але відмічається поступова нормалізація кровообігу, що виражається зменшенням діаметра просвіту артерійол, капілярів та венул. Відновлення кровообігу призвело до зменшення набряку сполучнотканинних перетинок ЗН. Відмічалось підвищення функціональної активності клітин глії, що виразилося поступовим відновленням об'єму ядер, збільшенням індексу Гертвіга, але розміри ядер ще суттєво відрізнялися від контролю. Відповідно об'єм ядер астроцитів становив $86,4 \pm 6,3$ мкм³ ($p < 0,001$), індекс Гертвіга – $0,23 \pm 0,03$ ($p < 0,05$), об'єм ядер олігодендроцитів – $41,6 \pm 3,2$ мкм³ ($p < 0,05$), індекс Гертвіга – $0,19 \pm 0,02$ ($p < 0,001$). Структура нервових волокон не змінена. Відбувалося поступове зменшення кількості клітин мікроглії.

На 21-шу добу відбувається відновлення структурно-функціональних компонентів ЗН. Оболонки нерва без змін, спостерігається тенденція до нормалізації числа лімфоцитів, макрофагів та тучних клітин сполучної тканини, зменшення повнокров'я судин ГМЦР та віднов-

лення їх діаметра. Товщина прошарків сполучної тканини становила $3,1 \pm 0,1$ мкм, що статистично не відрізнялося від контролю. Відновлювалася функція клітин глії. Астроцити мали світлі ядра овальної форми з розсіяним хроматином. Об'єм ядра становив $119,8 \pm 10,4$ мкм³, що не відрізнявся від контролю. Збільшився об'єм ядра олігодендроцитів до $50,53 \pm 6,35$ мкм³ та індекс Гертвіга до $0,25 \pm 0,02$, що відповідав варіанту норми. Нервові волокна овальної форми, вкриті мієліновою оболонкою. На 30-ту добу нами виявлено відновлення всіх структурних компонентів ЗН (рис. 2).

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Підшкірна трансплантація кріоконсервованої плаценти (Пц) не викликає патологічних змін з боку структурно-функціональних компонентів зорового нерва (ЗН) шурів, проте спостерігається збільшення кровонаповнення та перфузії судин гемомікроциркуляторного русла з максимальними значеннями на 7-му добу експерименту. 2. Реакція клітин глії на тканину Пц характеризується зменшенням об'єму ядер клітин та індексу Гертвіга, які нормалізуються до 21-ї доби. 3. Дослідження впливу трансплантації кріоконсервованої Пц на стан

ЗН в нормі відкриває перспективи подальшого вивчення терапевтичних властивостей фетальних тканин при офтальмологічних захворюваннях запального генезу.

Література

1. *Можливість трансплантації тканин при лікуванні дистрофічних захворювань сітківки та зорового нерва* / Г.Д.Жабосдов, В.І.Цимбалюк, Г.С.Бондарева [та ін.] // *Трансплантол.* – 2000. – Т. 1, № 1. – С. 180-181.
2. *Трансплантація продуктів ембриофетоплацентарного комплексу в оториноларингології: перші результати та перспективи* / А.С.Журавлев, Е.В.Пуцина, М.В.Калашник, Альмаши Зияд // *Ж. вуш., нос. та горл. хвороб* – 2003. – № 3. – С. 27-31.
3. *Використання кріоконсервованої плаценти в лікувальній практиці* / В.І.Грищенко, О.С.Прокопюк, В.І.Шенітько [та ін.] // *Трансплантол.* – 2002. – Т. 3, № 2. – С. 32-37.
4. *Плацента – источник биологически активных веществ* / Р.П.Морозова, Е.П.Козулина, И.А.Николенко [и др.] // *Укр. біохім. ж.* – 1999. – Т. 71, № 4. – С. 21-29.
5. *Шенітько В.І. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої плаценти і вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів: дис. на здобуття наук. ступеня д. мед. н.: 14.01.35 / В.І.Шенітько. – Харків, 2004. – 326 с.*
6. *Грищенко В.І. Фундаментальні дослідження і нові біотехнології одержання клітинних і тканинних алотрансплантатів* / В.І.Грищенко // *Трансплантол.* – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 12-15.
7. *Sumida S. Transfusion and transplantation of cryopreserved cells and tissues* / S.Sumida // *Cell tissue banking.* – 2006. – № 7. – P. 265-305.
8. *Ланач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excell* / Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. – К.: Морион, 2000. – 320 с.

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ТКАНЕЙ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПЛАЦЕНТЫ

Резюме. Исследовано влияние подкожной трансплантации криоконсервированной плаценты на состояние зрительного нерва крыс. Установлено, что трансплантация криоконсервированной плаценты приводит к полнокровию сосудов, не вызывая патологических изменений.

Ключевые слова: криоконсервированная плацента, трансплантация, зрительный нерв.

CHARACTERISTIC OF THE STRUCTURAL COMPONENTS OF THE TISSUES OF THE OPTIC NERVE OF RATS DURING TRANSPLANTING CRYOPRESERVED PLACENTA

Abstract. The influence of subcutaneous transplantation of cryopreserved placenta on the state of the optic nerve of rats has been studied. It has been established that the transplantation of cryopreserved placenta results in the plethora of vessels without causing pathological changes.

Key words: cryopreserved placenta, transplantation, optic nerve.

Ukrainian Medical Stomatological Academy (Poltava)

Надійшла 26.02.2010 р.

Рецензент – проф. К.С.Волков (Тернопіль)