

## Реферати

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРЕХОДНОГО ЭПИТЕЛИЯ  
МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС В НОРМЕ ПО  
РЕЗУЛЬТАТАМ МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО И  
КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗОВ**

**Токарук Н. С.**

Используя для кластерного анализа агломеративный иерархический метод и итерационный метод k-средних, в клеточном составе переходного эпителия мочевого пузыря выделены четыре кластера и определены морфометрические показатели каждого из них. Установлено, что наименьшую долю занимают уротелиоциты кластера 1 (10,96%), а клетки кластеров 2, 3 и 4 соответственно составляют 39,47, 34,21 и 15,35%. Клетки кластера 1 – это маленькие по размерам базальные клетки, которые являются низко дифференцированными, на что указывает их высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Они выполняют роль камбиальных коммитированных клеток, которые пролиферируют и восстанавливают клеточный состав уротелия. Кластер 4 образован наиболее крупными уротелиоцитами, имеющими самое низкое ядерно-цитоплазматическое отношение. Это высоко дифференцированные поверхностные зонтичные клетки, которые собственно и образуют уротелиальный барьер. Кластеры 2 и 3 формируются клетками промежуточного слоя переходного эпителия. Из них, клетки кластера 2 это умеренно дифференцированные клетки и характеризуют начальный этап дифференциации уротелиоцитов, а клетки кластера 3 являются высоко дифференцированными клетками и характеризуют терминальное дифференцирование. Установлено также, что клеточный состав кластеров 1 и 4, а также 2 и 3 находятся в определенном функциональном равновесии. Полученная кластерная структура характеризует популяцию уротелиоцитов переходного эпителия мочевого пузыря годовых самцов крыс в норме.

**Ключевые слова:** кластерный анализ, морфометрия, переходной эпителий, мочевого пузыря.

Статья надійшла 3.11.2014 р.

**CHARACTERIZATION OF TRANSITIONAL  
EPITHELIUM IN THE NORMAL RAT  
BLADDER USING THE MORPHOMETRIC  
AND CLUSTER ANALYSIS**

**Tokaruk N. S.**

For cluster analysis we used agglomerative hierarchical method and iterative method of k-means. In cellular composition of transitional epithelium four clusters and their morphometric parameters were determined. Cluster 1 takes the smallest share (10.96%), and cell clusters 2, 3 and 4 are respectively 39.47%, 34.21% and 15.35%. Cluster 1 contains the smallest undifferentiated basal cells with high nuclear cytoplasmic ratio (NCR). They act as cambial committed cells that proliferate and regenerate cellular composition of the urothelium. Cluster 4 contains major superficial urothelial cells with the lowest NCR. They are highly differentiated umbrella cells that actually form an urothelial barrier. Clusters 2 and 3 are formed by intermediate layer cells of the transitional epithelium. Cells from cluster 2 are moderately differentiated. They characterize the initial stage of urothelial cells differentiation. Cells from cluster 3 are highly differentiated. They characterize terminal differentiation. It was also determined that the cellular structure of clusters 1 and 4, 2 and 3 are in a particular functional equilibrium. The resulting cluster structure characterizes the urothelial cells population in transitional epithelium of the normal (annual, male) rat bladder.

**Key words:** cluster analysis, morphometric analysis, transitional epithelium, urinary bladder.

Рецензент Масловський С.Ю.

УДК 611-018.82:612-616.419

**І. І. Горняк, \*В. В. Колесник**

**ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків, \*ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Роговського НАМН України», м. Київ**

**ТРЕКІНГ АУТОЛОГІЧНИХ СТОВБУРОВИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН ПРИ  
ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ У ЩУРІВ**

Автори статті аналізують можливості та перспективи застосування трекінгу аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин (АСМК) у дослідженні ефективності заподіяної ними клітинної трансплантації у експерименті. За для останнього використовували самців щурів лінії Вістар 3-х місячного віку з модельованим ішемічним емболічним інсультом (на функціонуючому кровообізі), яким дозовано на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту доби захворювання внутрішньовенно, інтракраніально, субокципітально вводили суспензію АСМК. Спостереження проводили протягом 28-ми діб. Аналіз результатів відтворювали, застосовуючи арсенал і ресурси сучасної люмінесцентної мікроскопії. Реєстрація відновних процесів (репаративно-регенераторних реакцій) відбувалась з урахуванням ступеня рухомості зонального накопичення люмінесцентного барвника РКН 26 та подальшими змінами інтенсивності свічіння, контрастності отриманих препаратів. Резюмуючи все викладене вище, автори зауважують, що трекінг АСМК є показником ефективності проведеної трансплантації; головною умовою для його реалізації залишається наявність ушкоджень органічного субстрату одного із існуючих на сьогодні типів тканин (у нашому випадку, -нервова); якісне визначення АСМК можливе лише за рахунок детекції останніх шляхом забарвлення прижиттєвим барвником РКН 26 та наступного світлооптичного аналізу препаратів.

**Ключові слова:** аутологічні стовбурові мезенхімальні клітини, ішемічний інсульт, самці щурів, люмінесцентна мікроскопія.

*Робота є фрагментом НДР «Розробка технології отримання аутоклітин різних типів біологічних тканин із стромальних клітин кісткового мозку і застосування їх для лікування захворювань різного генезу за допомогою аутоотрансплантації», номер № 0106U003995 (2013-2015р.р.).*

Три останні десятиріччя ознаменовані широким запровадженням у клінічну практику новаторських нано технологій, пов'язаних із удосконаленням методичних підходів у лікуванні хронічної та вікової патології, підвищенням якості наданої терапії (у тому числі, відновної), скороченням термінів перебування у стаціонарі та пролонгацією позитивних ефектів від заходів,

заподіяних з метою подальшого збільшення тривалості життя [1, 2, 6, 12]. Одним із таких новаторських методів лікування є клітинна терапія, що все активніше відстоює власні позиції у сучасному медичному мегасоціумі [14, 17]. Клітинна трансплантація на сьогодні застосовується у естетичній галузі (омоложення), медицині катастроф (травми), геронтології (хвороби Паркінсона, Альцгеймера) [9, 15]. Вона-невід'ємна складова заходів, вживаних відновною медициною (наслідки інсультів, інфарктів), трансплантологією [8].

Не втрачає актуальності проблема отримання клітинного субстрату (донорські органи, їх походження, рівень постмитотичного розподілу клітин, генерації). Велику зацікавленість у спеціалістів профільної галузі викликають питання, що стосуються можливостей та перспектив первинної детекції стовбурових клітин, запрограмованої індукції диференціювання, якості фенотипування отриманих популяцій (не лише *in vitro*, але й *in vivo*) [7, 10]. Тривають жваві дискусії щодо причин (сигнали/спонукання) цілеспрямованої доставки матеріалу у зони ушкоджень або відсутність згаданого феномену на тлі наявності інтактних об'єктів [9]. Враховуючи все викладене вище, вивчення трекінгу аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин (АСМК) видається актуальним та своєчасним.

**Метою** роботи було з'ясувати патогенетичні механізми впливу трансплантованих клітин на органи-реципієнти, напрямки розосередження/розподілу останніх у тканинах (трекінг), відсотки виживання [18].

**Матеріал та методи дослідження.** Матеріалом експериментального дослідження були самці щурів лінії Вістар ( $\Sigma=48$ ), 3-х місячного віку, масою 160-175 г з належною документацією від ветеринарної служби України, представленою у відповідній реєстраційній формі. Тварин утримували за стандартних умов клімат-контролю віварію Харківської медичної академії післядипломної освіти (ХМАПО) МОЗ України. Експериментально відтворювали модель ішемічного інсульту (максимально наближену до природного феномену та екстраполятивно співвідносно до останнього у людини [3]). Аутологічні стовбурові мезенхімальні клітини (АСМК) отримували згідно із відпрацьованим стандартом. Їхню трансплантацію проводили трьома способами (внутрішньовенний, інтракраніальний, субокципітальний) [4]. Спостереження вели 28 діб з поступовим виведенням тварин із дослідів (передозування амфітамінового наркозу) на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту, 17-ту, 21-шу, 28-му доби. Отримані результати узагальнювали та співставляли з інтактним контролем (n=12).

Забарвлення аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин барвником РКН 26. Прижиттєвий барвник РКН 26 застосовували з метою вивчення довготривалого трекінгу АСМК самців щурів лінії Вістар (другий-третій пересів культури) [4, 8]. Їх вирощували до щільного моношару (90% конфлюентності), потім знімали з чашок Петрі розчином трипсина та забарвлювали у відповідності до протоколу компанії-виробника РКН 26 (Sigma, США). Забарвлені АСМК центрифугували при 300g протягом 10 хвилин. Отриманий осад два рази промивали ФСБ та суспендували. Ефективність забарвлення АСМК оцінювали у флуоресцентному мікроскопі Inverso-TC100 (Medline Scientific Limited, UK). 2. Визначення мічених аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин у тканинах головного мозку самців щурів лінії Вістар.

Детекцію мічених АСМК у структурах півкуль головного мозку самців щурів лінії Вістар проводили гістологічно за допомогою флуоресцентного мікроскопу Leica (Німеччина) [Джесон]. Секційний матеріал (шматочки головного мозку, розміром 0,5 куб. см, контрольних та експериментальних щурів видаляли, відокремлювали, у відповідності до стандартного алгоритму виконували проводку, заливку [5]). Зрізи товщиною 7 мкм із первинних блоків виготовляли стандартно на криостатному мікротомі Bright (Великобританія). Препарати промивали з додаванням робочого розчину DAB+ (Dako). Утворення забарвленого продукту гістохімічної реакції контролювали під мікроскопом, гальмували та зупиняли за рахунок відмивки у дистильованій воді. Поява характерного фону свідчила на користь завершення процедури. Отримані гістологічні зрізи забарвлювали толуїдиновим синім за Ніслем, астровим синім, специфічним кислим гліальним протеїном фібрин (GFAP). Експозиція складала одну-дві хвилини. Температура повітря дорівнювала кімнатній. Надалі фарбу змивали струменем дистильованої води протягом однієї-двох хвилин. Диференціація матеріалу проводилась у 960 етанолу, зневоднення виконувалось двома послідовними порціями абсолютного етанолу. Просвітлення препаратів відбувалося послідовно трьома порціями ортоксилолу (2-3 хвилини у кожному реагенті). За цим матеріал заключали у пермаунт, або канадський бальзам та аналізували (x 120; x 300; x 400; x 600) за допомогою мікроскопу Leica (Німеччина).

За для виявлення первинних антитіл застосовували набір Envision+ (ДАКО, Данія). Інкубовані зрізи промивали у ФСБ три рази протягом десяти хвилин, наносили необхідну кількість розчину із набору Envision+. Процедуру повторювали у вологих камерах за кімнатною температурою з експозицією в 30 хвилин. За цим розчини змивали, зрізи ретельно промивали ФСБ та наносили робочий розчин DAB+ (ДАКО, Данія). Утворення забарвленого продукту гістохімічної реакції контролювали мікроскопічно, гальмували промивкою дистильованою водою. Кожен із трьох зрізів на склі забарвлювали за Ніслем, специфічним кислим гліалним протеїном фібрин (GFAP), нейроспецифічним протеїном до нейрофіламенту 200 kDa+16 kDa та до бета-III-тубуліну у відповідності до згаданої вище стандартної методики. Препарати диференціювали у 960 етанолі, зневоднювали двома порціями абсолютного етанолу, просвітляли трьома порціями ортоксилолу, витримуючи 2-3 хвилини у кожному із реагентів. За цим отримані препарати заливали у пермаунт, канадський бальзам та аналізували (x 120; x 300; x 400; x 600) за допомогою мікроскопу Leica (Німеччина).

Детекція люмінесцентно (флуоресцентно) мічених АСМК у тканинах півкуль головного мозку самців щурів лінії Вістар 3-х місячного віку проводилась за допомогою люмінесцентного мікроскопу (Leica (Німеччина)). На гістологічних препаратах зрізів товщиною 5-7 мкм, виготовлених на кріостатному кріотомі Bright (Великобританія). У подальшому застосовували традиційну методику виготовлення препаратів з відмовкою останніх робочим розчином DAB+ (ДАКО, Данія). Контроль гістохімічної реакції проводився шляхом утворення забарвленого продукту. Гальмування та зупинка останньої відбувалися відмивкою у дистильованій воді. Отримані гістологічні зрізи забарвлювали толуїдиновим синім за Ніслем. Диференціація матеріалу (960 етанол), зневоднення (дві послідовні порції абсолютного етанолу) та просвітлення препаратів (ортоксилол) виконували за стандартними методиками. Заливка препаратів відбувалась із застосуванням канадського бальзаму. Аналіз препаратів (x 200; x 400; x 600; x 1000) проводили за допомогою мікроскопу Leica (Німеччина).

**Результати дослідження та їх обговорення.** У результаті дослідження специфіки розподілу мічених барвником РКН 26 клітин у тканинах головного мозку самців щурів лінії Вістар було встановлено залежність останньої від вихідного стану органу [7, 9]. Група інтактних тварин відіграла роль порівняльного контролю.

За результатами люмінесцентної мікроскопії на зрізах препаратів головного мозку самців щурів лінії Вістар із групи інтактного контролю спостерігали гомогенне, однорідне, розповсюджене забарвлення у повздовж всієї площини зрізу (червоного, синього, темно-зеленого кольорів у залежності від типу барвника). Інтенсивність забарвлення, його щільність ідентичні протягом всього періоду експерименту (1-ша- 28-ма доба спостереження). Випадків втрати інтенсивності забарвлення, його змін, гіперхромності, ділянок просвітлення, накопичення яскравих брилок, осередків напівтіні, тощо не визначали. Ретельний пошук вогнищ нейродиференціювання (перша-сьома доба) не призвів до позитивних результатів. Клітини інтактного головного мозку у разі трансплантації АСМК були не здатні до індукції останніх навіть у віддалений період спостереження (чотирнадцять-двадцять восьма доба). Подальше (сьома-двадцять восьма доба експерименту) морфологічне дослідження кори головного мозку, його білої речовини, капілярів у зонах, прилеглих до ділянки оперативного втручання відмічало незначну гліалну реакцію та мізерну кількість ушкоджених нейронів. Як результат (у відтерміновані періоди: сьома-двадцять восьма доба) спостерігали активацію захисних реакцій з усуненням наслідків клітинного розпаду.

Дослідження зразків препаратів від тварин із групи ішемічного інсульту продемонструвало дефекти забарвлення у ділянках судин з наявними емболами (1-ша-3-тя доба експерименту) на тлі гомогенних зон речовини головного мозку. Сьома-двадцять восьма доба спостереження визначались відносною сталістю морфологічної картини. Ділянки, які продовжували утримувати емболи чи їхні фрагменти містили дефекти люмінесценції, оточуюча тканина виявлялась однорідною, яскраво забарвленою у червоній чи синій кольори. Найбільш інформативними видались зразки препаратів з апробованою трансплантацією АСМК.

Трансплантація АСМК тваринам з модельованим ішемічним інсультом відбувалась кожної із запланованих (перша, третя, сьома, чотирнадцять-двадцять восьма) діб експерименту (рис. 1). Цей вибір зумовлювався науково-теоретичним і практичним сенсом експерименту, його задачами та алгоритмом, що були спрямовані на пошук найбільш оптимальних строків застосування АСМК та екстраполяцію зазначених результатів у клініці [12, 16]. Однак, наявність цілої низки феноменів, які довели відсутність науково-теоретичного сенсу дослідження першої доби

внутрішньовенного, субокципітального введення АСМК (інфільтрація, запізнита доставка АСМК у *locus morbi*) спричинили початок експериментальних проб для згаданих способів лише на третю добу спостережень. Наведені вище факти використовували, у тому числі, як об'єктивний доказ на користь підвищеної проникливості гематоенцефалічного бар'єру, гарантованого розосередження АСМК у церебральному кровообігу та речовині головного мозку [1, 2]. З іншого боку, за таких умов з'являлась можливість детального відстеження у динаміці стратегії репаративно-регенеративних змін, визначення морфологічних критеріїв прогнозу структурно-функціонального відновлення як у найближчій, так і у віддаленій періоди [8, 11]. Окрім зазначеного, вибір третьої, сьомої, чотирнадцятої-двадцять восьмої діб зумовлювався зниженням рівня показників післяопераційної загибелі тварин. Попередній аналіз гістологічних зрізів мозку продемонстрував наявність АСМК лише на третю добу трансплантації. Таким чином, введення АСМК у ранні строки носило не лише контролюючий характер, але дослідницький сенс.

На третю добу трансплантації АСМК тваринам з модельованим ішемічним інсультом у корковій речовині півкуль головного мозку на тлі організованих вогнищ некрозу спостерігали посилення лімфо-гранулоцитарної та макрофагальної інфільтрації. Навколо судин (у зв'язку з підвищенням проникливості стінок останніх) реєструвались чисельні скупчення лейкоцитів, еозинофілів та макрофагів, що утворювали своєрідні периваскулярні муфти. Незначна кількість світлих полігональної форми клітин поодинокі зосереджувалась повздовж периметру останніх. Внутрішньовене, субокципітальне введення АСМК призводило до їхнього осередкування у мікроциркуляторному руслі мозку, венозних синусах. У разі інтракраніального введення картину доповнювали гомо та гетерогенні скупчення клітин із характерним забарвленням-свіченням на поверхні кори парацентральної закрутки мозку (рис.2, рис. 3).

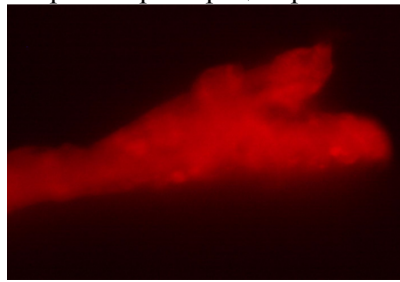


Рис. 1. Кора головного мозку самця шурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом та інтракраніальним способом введення АСМК, перша доба спостереження). Щільні гомогенні скупчення АСМК. Люмінесцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 600.

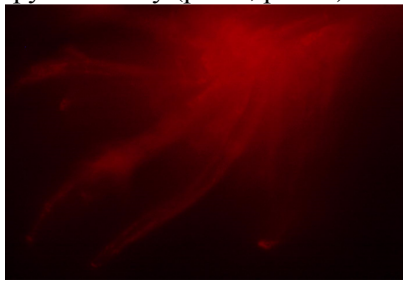


Рис. 2. Коркова речовина головного мозку самця шурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом та субокципітальним способом введення АСМК, третя доба спостереження). Люмінесцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 1000.

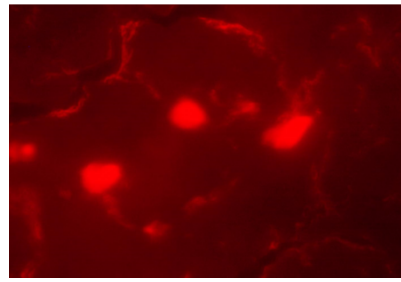


Рис. 3. Головний мозок самця шурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом та інтракраніальним способом введення АСМК, третя доба спостереження). Гетерогенне розосередження АСМК. Люмінесцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 400.

На сьому добу трансплантації АСМК (інтракраніальне введення) відмічалось розм'якнення некротичних вогнищ, виразна ілімінація тканьового детриту (генералізація відповідних осередків). Цей факт вигідно відрізняв зазначений строк дослідження з відповідним у групі тварин з модельованим ішемічним інсультом, де усунення наслідків деструкції відбувались повільно, локально. На секційних препаратах реєструвались великі ділянки майже повного очищення тканини від клітинного детриту. Спостерігались чисельні факти фагоцитозів. Субокципітальне, внутрішньовене введення АСМК у згадані строки однозначно сприяли локалізації некротичних вогнищ, проте, динаміка останніх відрізнялась торпідністю. Процеси формування гліальних рубців у цей період лише розпочинались, супроводжуючись активацією клітин астроглії. Спостерігався неоангіогенез. Субепіндімна зона у даний дослідний період (внутрішньовене введення) з ознаками активації проліферативних процесів (рис. 4, рис. 5).

На чотирнадцяту добу дослідження (інтракраніальне введення АСМК) ілімінація продуктів клітинного розпаду практично повністю завершена. Ділянки колишніх ушкоджень з ознаками (порівняно з групами внутрішньовенного та субокципітального введення АСМК) маловиразних інфільтративних процесів. Клітинний субстрат останніх збіднілий (макрофаги, подекуди лейкоцити). У зонах некрозу завершуються процеси формування гліальних рубців та лікворно-гліальних кист. Кисти-поліморфні, утримують виразний щільний та суцільний шар вистилки (майже не характерний для випадків з ішемічним інсультом). У зоні, що сусідня ушкодженій, спостерігаються поодинокі гіперхромні нейрони. Їхня чисельність значно менша, ніж та, що у групі з ішемічним інсультом. Кількість гіперхромних розруйнованих нейронів прогресивно зменшується за умов віддалення від зони ішемії (рис. 7).

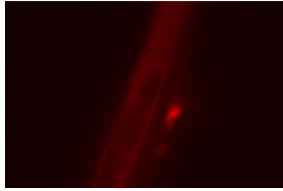


Рис. 4. Головний мозок самця щурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з ішемічним інсультом та внутрішньовенним способом введенням АМСК, сьома доба спостереження). Зосередження люмінесцентного пласти повздож мікросудини з дефектом стінки. Люмінесцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 600.

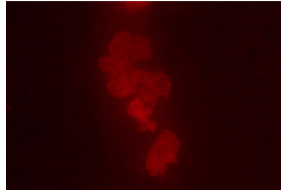


Рис. 5. Головний мозок самця щурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним ін-сультом та субокципітальним способом введення АМСК, сьома доба спостереження). Скупчення АМСК у зонах деструктивних вогнищ. Люмі-несцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 600.

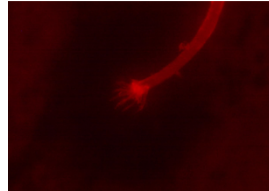


Рис. 6. Головний мозок самця щурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом та інтракраніальним способом введення АМСК, чотирнадцята доба спостереження). Люмінесцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 400.

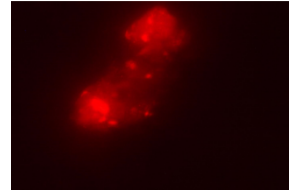


Рис. 7. Головний мозок самця щурів лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним ін-сультом та внутрішньовенним способом введення АМСК, сімнадцята доба спостереження). Люмінесцентна мікроскопія. Кріостатний зріз. Зб.: x 400.

На сімнадцяту добу експерименту змінами, що свідчили на користь очищення речовини головного мозку від клітинного детриту, тривають. У разі застосування внутрішньовенного та субокципітального введення клітин спостерігали факти інфільтрації ушкоджених ділянок мозку. В окремих ділянках починалось/тривало утворення лікворно-гліальних кист (формувався оболонка, накопичувався ліквор). За умов застосування інтракраніального введення вогнища інфільтративних процесів поодинокі лікворно-гліальні кисти цілісні за структурою. У разі застосування внутрішньовенного та субокципітального введення між ушкодженою та сусідньою з нею ділянкою тривало утворення гліального рубця. Препарати від тварин, яким застосували інтракраніальне введення, демонстрували цілковиту структурну оформленість останнього. Будова рубця долучала 3-5 шарів астроцитів, у разі внутрішньовенного та субокципітального введення чисельність останніх виявлялась меншою (2-3 клітинних шари).

До двадцять першої доби спостереження процес очищення тканини півкуль головного мозку від клітинного детриту завершився остаточно, інтракраніальне введення клітин). На місцях колишніх вогнищ некрозу спостерігали цілком сформовані лікворно-гліальні кисти та гліо-сполученотканинні рубці. Осередків, щоб утримували щільні скупчення чи дифузні популяції розруйнованих нейронів на зазначений період не відзначалось. У зонах, прилеглих до ушкодженої, переважна більшість нервових клітин мали цілісну структуру, без руйнацій мембранного апарату, цитоплазматичних включень, вакуолізації. Будова кори за умов застосування внутрішньовенного та субокципітального засобів введення АМСК залишалась стабільною (порівняно із попереднім періодом спостереження). У субепіндимній зоні реєстрували скупчення клітин неправильної форми, що чітко забарвлювались за Ніслем. Проліферативні процеси у згаданий період експерименту у зазначених ділянках півкуль виявлені не були.

За умов інтракраніального введення клітин у двотижневий постінсультний період процеси формування гліального рубця та лікворно-гліальних кист були цілком завершені. Сформований між ушкодженою ділянкою та сусідньою із нею тканиною рубець нараховував 3-5, 5-7 рядів клітин. Порожнини кист за власними величинами різнились між собою. У разі застосування внутрішньовенного та субокципітального введення у тканині півкуль головного мозку реєстрували порожнини великих розмірів.

### Висновки

1. Трекінг АМСК є показником ефективності проведеної трансплантації.
2. Головною умовою для його реалізації залишається наявність ушкоджень органічного субстрату одного із існуючих на сьогодні типів тканин (у нашому випадку - нервова).
3. Якісне визначення АМСК можливе лише за рахунок детекції останніх шляхом забарвлення прижиттєвим флуорохромним барвником РКН 26 та наступного світлооптичного аналізу препаратів.

*Перспективи подальших досліджень* полягають у застосуванні знань, що стосуються трекінга АМСК, для подальшого удосконалення способів та прийомів здійснення клітинної терапії, конкретизації мікрофотографічного оточення клітин за умов *in vivo*, постмитотичної долі останніх.

### Список літератури

1. Brodskij I. V. Primenenie mezenhimal'nyh stvolovyh kletok dlja vosstanovlenija struktury i funkcii povrezhdennyh tkanej i organov / I. V. Brodskij, S. A. Brjanceva, O. N. Zhapparova [i dr.] // Jefferentnaja i fiziko-himicheskaja medicina. - 2011. - № 1. - S. 4-10.

2. Zozulja I.S. Nejiroprotekturna terapija mozgovogo insul'tu / I.S. Zozulja // *Medicina neotloznych sostojanij*. - 2007. - № 5. - S. 117-119.
3. Pat. 5380 Ukraïna, MPK G 09 V23/28 (2006.01) Sposib modeljuvannja gostrogo ishemičnogo cerebral'nogo insul'tu u shhuriv / Cimbaljuk V.I., Kolesnik V.V., Mikulinskij Ju.Ju., Zabirnik A.S., Panibratceva S.G.; vlasnik Harkivs'ka medicna akademija pisljadiplomnoï osviti (HMAPO).- № u 2010 02736; zajavl. 11.03. 10; opubl. 27.09. 10, Bjul. № 18.
4. Torjanik I. I. Unificirovannyj pohod k sozdaniju modeli ishemičeskogo insul'ta golovnogo mozga v jeksperimente na kryсах linii Vistar / I. I. Torjanik, V. V. Kolesnik // *Aktual'ni problemi suchasnoï medicini*. - 2010. - № 4. - S. 155-159.
5. Torjanik I. I. Morfologičnij dizajn eksperimental'nogo ishemičnogo insul'tu / I. I. Torjanik, V. V. Kolesnik // *Visnik morfologiji*. - 2014.-№2, T.20.-S.255-259.
6. Barkho B. Z. Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications / B. Z. Barkho, X. Zhao // *Cell Res. Ther.* - 2011. - Vol.6. - R. 327-338.
7. Castro R. F. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo / R. F. Castro, K. A. Jackson, M. A. Goodell [et al.] // *Science*. - 2002. - Vol. 297. - 1299 r.
8. England T. Primenenie stvolovyh kletok dlja uluchshenija vosstanovlenija posle insul'ta: obzor / T. England, P. Martin, P.M.W. Bath // *Stroke (perevod)*. - 2010. - T.1, Vyp. 2. - S. 51-62.
9. Ghashghaei H. T. Neuronal migralion in the adull brain: are we there yet? / H. T. Ghashghaei, C. Lai, E. S. Anton // *Nature Reviews Neuroscience*. - 2007. - Vol. 8, Issue 2. - P. 141-151.
10. Jung K. H. Identification of neuronal outgrowth cells from peripheral blood of stroke patients / K. H. Jung, K. Chu, S.T. Lee // *Ann. Neurol.* - 2008. - Vol. 63. - R.312-322.
11. Jablonska A. Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation / A. Jablonska, B. Lukomska // *Acta Neurobiol. Exp.* - 2011. - Vol. 71. - R. 74-85.
13. Lindvall O. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? / O Lindvall, Z. Kokaia // *Stroke*. - 2011. - Vol. 42. - R. 2369-2375.
14. Lalu M. M. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (Safe Cell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials / M.M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese [et al.] // *Plos one*. - 2012. - Vol. 7. - P. 475- 479.
15. Liman T.G. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration / T.G. Liman, M. Endres // *Cerebrovasc. Dis.* - 2012. - Vol.33. - R.492-499.
16. Miller R. H. Translating stem cell therapies to the clinic / R.H. Miller, L. Bai // *Neurosci. Lett.* - 2012, Vol. 519. - R.87-92.
17. Sahota P. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery / P. Sahota, S.I. Savitz // *Neurotherapeutics*. - 2011. - Vol. 8. - R. 434-51.
18. Smith H. K The potential of stem cell therapy for stroke: is PISCES the sign? / H. K. Smith, F.N. Gavins // *FASEB J.* - 2012. - Vol. 26. - R. 2239-2252.

## Реферати

### ТРЕКИНГ АУТОЛОГИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У КРЫС

Торяник И. И., Колесник В. В.

Авторы статьи анализируют возможности и перспективы использования трекинга аутологических стволовых мезенхимальных клеток (АСМК) в исследовании эффективности предпринятой по отношению к ним клеточной терапии в эксперименте. Для этого применяли самцов крыс линии Вистар 3-х месячного возраста с моделированным ишемическим эмболическим инсультом (на функционирующем кровотоке), которым дозировано на 1-е 3-и, 7-е, 14-е сутки заболевания внутривенно, интракраниально, субокципитально вводили суспензию АСМК. Наблюдение проводили в продолжение 28-ми суток. Анализ результатов осуществляли, используя арсенал и ресурсы современной люминесцентной микроскопии. Регистрация восстановительных процессов (репаративно-регенераторных реакций) происходила с учетом степени подвижности зонального накопления люминесцентного красителя РКН 26 и дальших изменений интенсивности свечения, контрастности полученных препаратов. Резюмируя все изложенное выше, авторы указывают на то, что трекинг АСМК является показателем эффективности проведенной трансплантации; главным условием для его реализации остается наличие повреждений органического субстрата одного из существующих на сегодняшний день типов ткани (в нашем случае, -нервная); качественное определение АСМК возможно лишь за счет детекции последних путем окраски прижизненным красителем РКН 26 и последующего светооптического анализа препаратов.

**Ключевые слова:** аутологические стволовые мезенхимальные клетки, ишемический инсульт, самцы крыс, люминесцентная микроскопия.

### AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELL TRACKING IN THE PRESENCE OF ISCHEMIC STROKE IN RATS

Torianik I. I., Kolesnik V. V.

The authours of the article analyse the possibilities and prospects of autologous mesenchymal stem cell tracking usage (AMSC) in the study of effectiveness taken as related to cell therapy in the experiment. To accomplish this three month old male Wistar line rats with simulated ischemic embolic stroke (under functional blood flow) were used. On the 1-st, 3-rd, 7-th, 14-th days of disease endovenous, intracranial, suboccipital AMSC suspension was injected to them. The attendance was pursued for 28 days. The analysis of the results was performed using the range and resources of modern luminescent microscopy. The registration of the reactivation processes (reparative and regenerative reactions) took place considering the rate of zonal congestion mobility of luminescent PKH 26 dye and further changes of glow intensity, in-touch capabilities of taken medication. Summing up, the authors emphathise that AMSC tracking is the indicator of the effectiveness of the transplantation undertaken; the main condition for its realisation is the presence of organic matter injuries in one of existing types of tissue (in our case, nerve tissue); qualitative AMSC definition is possible only by means of their detection by PKH 26 vital stain dying and further light-optical analysis of medications.

**Key words:** autologous mesenchymal stem cell, ischemic stroke, male rats, luminescent microscopy.

Статья надійшла 30.12.2014 р.

Рецензент Цимбалюк В.І.