

<https://doi.org/10.35339/msz.2019.85.04.03>

УДК 616.831.002.54-095:611.47

*В.С. Личко*

*Медичний інститут Сумського державного університету*

### МІСЦЕ НЕЙРОТРОФІЧНОЇ ТЕРАПІЇ В КОНЦЕПЦІЇ СТИМУЛЯЦІЇ ВТОРИННОГО АНГІОГЕНЕЗУ ПРИ ГОСТРІЙ ФОКАЛЬНІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ

Вивчали особливості змін структурно-функціональних характеристик мозкової тканини 60 безпородних щурів-самців лінії Wistar під час моделювання гострої фокальної церебральної ішемії (ГФЦІ) у динаміці лікування кріоконсервованою сироваткою кордової крові (КСКК) людини. Проводили електронне й оптичне мікроскопічне дослідження сенсомоторної ділянки кори головного мозку. Усіх тварин було розподілено на три групи по 20 щурів у кожній: перша (контроль) – інтактні щури без травматизації й лікування; друга – тварини після моделювання ГФЦІ без лікування; третя – щури після моделювання ГФЦІ, яким вводили КСКК. Матеріал для морфологічного дослідження забирали після введення розчину КСКК тваринам із моделлю ГФЦІ через 12, 24, 72 год та 7 днів від початку експерименту. Середня площа периваскулярних просторів, яка є показником вазогенного набряку, у щурів групи 2 перевищувала таку в групі 1 у 45 разів, а в щурів групи 3, що отримували КСКК, – у 37 разів. Середня площа перицелюлярних просторів, що вказує на ступінь цитотоксичного набряку, у тварин групи 2 на 7-му добу після ГФЦІ майже у 23 рази перевищувала таку групи 1. Даний показник у щурів групи 3 був збільшений у 20 разів відносно такого в щурів групи 2. На тлі використання даного препарату спостерігались ознаки реактивних змін ендотеліоцитів у вигляді збільшення кількості рибосом і полісом у цитоплазмі, зменшення ступеня периваскулярного набряку тканини мозку на 21,4 %. Площа поверхні ендотеліальних клітин у зоні ГФЦІ на 7-му добу експерименту у тварин, які додатково отримували КСКК, становила  $(1483,00 \pm 26,48)$  мкм<sup>2</sup>, що свідчить про позитивний протизапальний ефект препарату. На 7-му добу експерименту в щурів групи 3 за допомогою оптичної мікроскопії виявлено збільшення щільності церебральних капілярів порівняно з такою в щурів групи 2, що вказує на стимуляцію відновлення ультраструктури пошкоджених капілярів, збільшення їхньої щільності, утворення нових капілярів під дією компонентів КСКК.

**Ключові слова:** ендотеліальна клітина, ангіогенез, ішемія, патологія, сироватка, запалення.

#### **Вступ**

Компенсаторні властивості будь-якої тканини при пошкодженні направлені насамперед на посилення кровопостачання завдяки перерозподілу кровотоку та розвитку так званої альтернативної мережі капілярів [1].

Особливе місце в сучасній інсультології посідає проблема утворення нових кровоносних судин у зонах пошкодження мозкової тканини, що зветься вторинним ангіогенезом. Поява нових церебральних капілярів відбувається шляхом відростання від уже сформо-

ваних судин із подальшим формуванням колатералей для компенсації розладів кровопостачання [2]. Зазначений механізм є компенсаторним і має покращувати метаболічний стан нейронів та клітин нейроглії, прискорюючи регенеративні зміни в пошкодженій мозковій тканині [3, 4].

Окрім порушення цілісності стінки церебральних капілярів у зоні гострої фокальної церебральної ішемії (ГФЦІ) відбувається пошкодження елементів мембранорецепторного комплексу клітин і дезорганізація ендотеліальних шарів [5].

Ще зовсім недавно основним показником активності ангиогенезу в патологічних вогнищах була лише мікроскопічна оцінка щільності судин у тканині, але за останні десятиріччя в результаті дослідження молекулярних механізмів даного процесу було виявлено групу регуляторних проангіогенних чинників, що можуть стимулювати формування нових судин усередині вогнища ураження [6].

Як стимулятори вторинного ангиогенезу можуть бути найрізноманітніші впливи: гіпоксія; накопичення метаболітів; запалення; деякі неорганічні речовини (мурашина кислота, кремній тощо); вазоактивні речовини (оксид азоту); кініни; активатор плазміногену; гепарин; фібрин; субстанції, що продукуються нейтрофілами, макрофагами, лімфоцитами й іншими клітинами; некротизуючий вплив; фактори росту й ін. [7, 8].

Особливо потужними низькомолекулярними стимуляторами даного процесу є ангиогенний фактор плаценти, що походить з ішемізованих тканин. Відкрито безліч стимуляторів ангиогенезу пептидної природи, так званих факторів росту: мозковий нейротрофічний (brain-derived neurotrophic factor), гліальний нейротрофічний (glial cell-derived neurotrophic factor); фактор росту фібробластів (fibroblast growth factor); трансформуючий (transforming growth factor, TGF); фактор росту судинного ендотелію (vascular endothelial growth factor, VEGF); гемопоетичні [9].

Стимуляторами ангиогенезу також вважають деякі цитокіни, наприклад, фактор некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) у низьких дозах, інтерлейкін-8 (ІЛ-8), ферменти (ангіогенін, ангіотропін), гормони (естрогени, простагландини, фолістатин, проліферин), олігосахариди (гіалуронан, гангліозиди) [8, 10].

Надпотужну ангиогенну активність має плацента, з якої виділено значну кількість проангіогенних факторів. Крім того, вони містяться у тканинах мозку, особливо сильний проангіогенний вплив демонструє екстракт із мозкової тканини відразу після народження [11].

Сьогодні механізми ангиогенезу добре вивчені під час різноманітних онкологічних захворювань [12], проте щодо механізмів формування колатерального кровообігу в перинекротичній зоні під час ГФЦІ даних практично немає. Особливо це стосується його регуляції та можливостей фармакологічної стимуляції.

У результаті в лікувальній тактиці гострого періоду ішемічного інсульту не приділяється достатньої уваги методам медикаментозної стимуляції вторинного ангиогенезу в зоні ураження, які однозначно могли б позитивно впливати на вихід захворювання. З цих позицій у межах даного дослідження особливий інтерес представляє вивчення впливу нейротрофічної терапії на формування нових судин [13, 14].

Одним із таких препаратів є кріоконсервована сироватка кордової крові (КСКК) людини під назвою «Кріоцелл-кріокорд», що містить набір біологічно активних речовин, таких як опіодні пептиди, гемопоетини, ферменти, фактори росту, адаптогени, репродуктивні імуномодулятори та вітаміни. Препарат було розроблено та виготовлено в ДП МНЦ кріобіології і кріомедицини НАН, МОЗ, АМН України (Харків).

**Метою дослідження** є комплексне вивчення особливостей змін структурно-функціональних характеристик мозкової тканини дослідних тварин під час моделювання гострої фокальної церебральної ішемії в динаміці лікування кріоконсервованою сироваткою кордової крові.

#### **Матеріал і методи**

Дослідження було проведено на 60 безпородних щурах-самцях лінії Wistar масою (200 $\pm$ 20) г. Експерименти проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», ухвалених V Національним конгресом із біоетики (Київ, 2013) і погоджених із положенням «IV Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (ETS 123, Страсбург, 1986), та рекомен-

дацій комісії з питань дотримання біоетики під час проведення експериментальних і клінічних досліджень Медичного інституту Сумського державного університету.

Після анестезії моделювали ГФЦІ шляхом ін'єкції суспензії сульфату барію («Істок-Плюс», Україна) у стерильному 0,9%-вому фізіологічному розчині у пропорції 1:3 у праву сонну артерію через розріз м'яких тканин на шиї в кількості 0,1–0,3 мл.

З огляду на те, що лікування має починатися якомога раніше від появи перших симптомів ГФЦІ, КСКК починали вводити протягом перших годин з моменту початку експерименту внутрішньочеревно по 0,1 мл/кг. Дозу препарату розраховували з урахуванням коефіцієнтів активності метаболізму, як описано в роботі О.В. Стефанова [15].

Зважаючи на те, що максимальний ступінь перичелюлярного набряку припадає на 3-тю–7-му доби, а явища вторинного ангіогенезу спостерігаються вже на 3-тю–4-ту доби [16], подальші введення препарату виконували на 2-гу–4-ту доби з моменту моделювання ГФЦІ.

Усіх тварин було розподілено на три групи: перша (контроль) – інтактні щури без травматизації й лікування; друга – тварини після моделювання ГФЦІ без лікування; третя – щури після моделювання ГФЦІ, яким вводили КСКК. Кожна група складалася з 20 тварин.

Матеріал для морфологічного дослідження забирали після введення розчину КСКК тваринам із моделлю ГФЦІ через 12, 24, 72 год та 7 діб від початку експерименту.

Для електронно-мікроскопічного дослідження виділяли сенсомоторну ділянку (СМД) кори головного мозку (поля Fpa і Fpp) за стереотаксичним атласом мозку дорослого щура [17]. Ультроструктуру досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К з прискорюючою напругою 75 кВ, що був забезпечений системою зйомки й аналізу зображення CAI-01A (SELMi, Україна) на основі CCD-камери DX-2 і пакета програм (KARPA, Німеччина). Оптичну мікроскопію проводили на мікроскопі Optica B-382PLi-ALC 40x–1600x Bino Infinity (Autolight, Італія). Мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли за допомогою програми Nikon View 5 (Nikon, Японія).

Для вивчення змін морфометричних параметрів тканини мозку в динаміці в кожній тварини порівнювали аналогічні ділянки на боці модельованої ГФЦІ та інтактної гемісфери. Для верифікації ступеня неврологічних порушень, що були викликані моделюванням ГФЦІ в щурів, використовували метод оцінювання неврологічного дефіциту за шкалою інсульту (stroke-index) McGraw [18] із модифікаціями [19].

### Результати та їх обговорення

Через 24 год після початку експерименту при оцінюванні неврологічних відхилень у 100,0 % щурів із модельованою ГФЦІ спостерігались неврологічні порушення у вигляді млявості, сповільненості рухів, слабкості кінцівок, птозу, тоді як у групі інтактних щурів цих порушень не відмічено.

Через 24 год після операції завдяки введенню КСКК трохи знижувалась вираженість неврологічних порушень. Про це свідчить наявність легких порушень у 58 % тварин групи 3. У щурів групи 2 без лікування також відмічалась тенденція до зниження ступеня неврологічного дефіциту, але трохи меншою мірою, ніж у групі 3, а результати даної динаміки не досягали достовірних значень відносно таких у тварин групи 1 ( $p > 0,05$ ).

Через 96 год спостереження було відмічено поліпшення стану тварин обох груп після моделювання ГФЦІ, але завдяки додатковому введенню КСКК підвищувало ефективність стандартного лікування. За весь період спостереження в інтактних щурів не спостерігалось загибелі щурів. У групі 2 протягом перших двадцяти чотирьох годин загинуло 10 % тварин і до 96-ї години даний показник не змінився. Введення КСКК протягом 4 діб після моделювання ГФЦІ практично повністю попереджало загибель тварин.

Методологічною основою морфологічного дослідження СМД кори головного мозку щурів був гістологічний підхід. Було показано, що порушення гемостазу структурно проявлялися на всіх рівнях капілярної мережі СМД кори. При цьому зміни зачіпали і стінку капілярів, зокрема ендотеліальні шари, базальну мембрану, перичити, а також судинні ніжки астроцитів.

Під час електронно-мікроскопічного дослідження в тканині мозку тварин групи 2 через 4 доби після моделювання ГФЦІ порівня-

но з групою 1 звертали на себе увагу мікрровирости й аркадоподібні елементи ендотелію, які утворилися в результаті його локального відшарування.

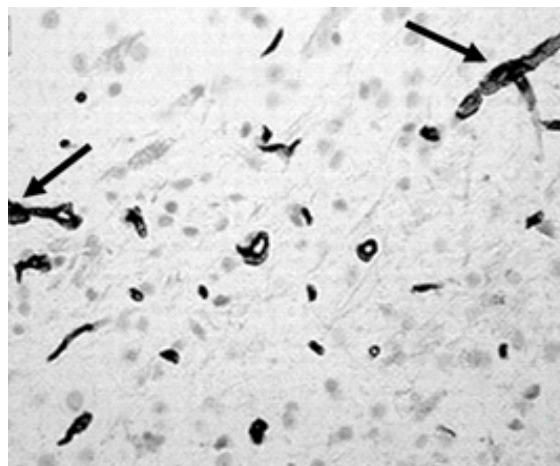
За результатами дослідження, лікування щурів із модельованою ГФЦІ за допомогою препарату КСКК на 7-му добу приводить до зменшення площі периваскулярного набряку на 21,4 %, тоді як у групі 2 цей показник зменшувався всього на 12,7 %.

Середня площа периваскулярних просторів, яка є показником вазогенного набряку, у щурів групи 2 в 45 разів перевищувала таку в щурів групи 1, а в щурів групи 3, що отримували КСКК, даний показник був перевищений у 37 разів. Середня площа перицелюлярних просторів, що вказує на ступінь цитотоксичного набряку, у тварин групи 2 на 7-му добу після ГФЦІ майже у 23 рази перевищувала результати групи 1. Даний показник у щурів групи 3 був збільшений у 20 разів порівняно з таким у тварин групи 2.

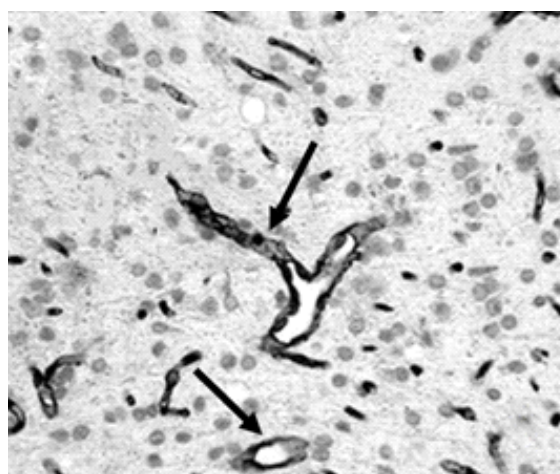
На 7-му добу експерименту в щурів групи 3 спостерігалась тенденція до збільшення щільності церебральних капілярів відносно такої в інтактних тварин та тварин групи 2. Отже, лікування тварин із модельованою ГФЦІ препаратом КСКК деякою мірою стимулювало відновлення ультраструктури пошкоджених капілярів, збільшення їхньої щільності, а також утворення нових капілярів, що було підтверджено за допомогою оптичної мікроскопії (рисунки) [20].

Особливо це було характерно для капілярів, у яких зберігалась базальна мембрана із ніжками перицитів. На даному каркасі поступово з'являвся новий шар ендотелію, що заміщував утрачені ендотеліальні клітини. Зазвичай новостворений капіляр мав розщеплену базальну мембрану.

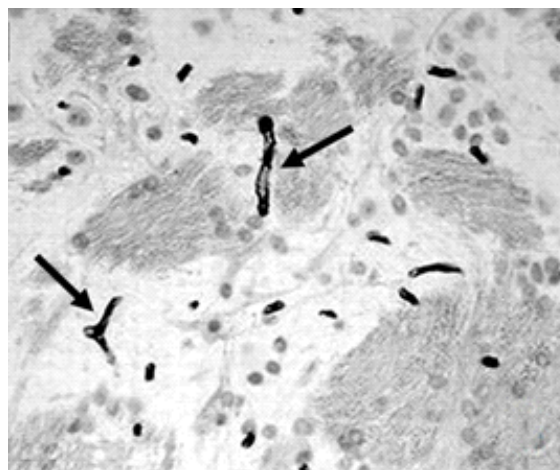
Крім того, при використанні препарату КСКК зменшувалися прояви і навіть зникали такі ознаки виснаження репаративних можливостей, як скорочення робочого просвіту судин, накопичення залишкових тілець у цитоплазмі ендотеліальних клітин, проліферація периваскулярної астроглії, накопичення в ній ліпідів, вторинних лізосом і фібрилярних структур, атрофія ендотеліальних клітин. У цілому ультраструктура судинної стінки виглядала більш збереженою, а пошкодження базальної мембрани не були такими глибокими.



а



б



в

Мікрофотографія III шару СМД кори головного мозку щура групи 2 на 7-му добу після ГФЦІ (а), групи 3 із включенням до схеми лікування КСКК (б) та контрольної групи 1 (в).

Церебральні капіляри – чорна стрілка; забарвлення гематоксилином і еозином

У матеріалі, що був узятий у тварин групи 3, реєстрували новоутворені судини, периваскулярний простір яких зовсім не відрізнявся від нормального. Просвіт судин був прозорим і заповненим плазмою.

Вираженість судинної реакції вже на 7-й день експерименту, щільне розташування капілярів і наявність безлічі анастомозів вказують на активацію колатерального кровообігу в перинекротичній зоні в щурів групи 3 (рисунк, б).

У результаті дослідження були отримані дані про те, що за умов експериментальної ГФЦІ вражається як клітинна складова СМД кори, так і її судинна система, що й зумовлює складну неврологічну симптоматику захворювання.

Ми вважаємо, що виявлені в ході експерименту зміни є спеціальним адаптативно-протосувальним механізмом під час ГФЦІ, що запускається одразу після припинення церебрального кровотоку. Гостра гіпоксія є вкрай потужним стимулятором компенсаторного ангіогенезу, що значно впливає на можливості посилення нейропластичності мозкової тканини та визначає вихід захворювання. Але дані природні механізми не в змозі відновити ті втрати та катастрофічні зміни в тканині мозку, що миттєво розгортаються вже в перші хвилини гострої гіпоксії.

На нашу думку, одним із можливих механізмів даних змін може бути активація репаративних процесів у тканині мозку за участі ряду біологічно активних речовин, що містяться в КСКК, оскільки введення її приводить до значно більш активної стимуляції механізмів відновлення тканини мозку порівняно з такою у тварин контрольної групи. Ймовірно, це відбувається завдяки стимулюючому впливу на процеси ангіогенезу в ході ГФЦІ факторів росту, що можуть прискорювати мітогенез, хемотаксис та диференціювання клітин [21, 22].

Результати дослідження вказують на стимулюючий вплив КСКК на процеси ангіогенезу в ішемізованій тканині мозку. Про це свідчить більш швидке відновлення ультраструктури пошкоджених капілярів, загальної їх щільності та утворення нових капілярів. При цьому стимуляторами ангіогенезу можуть бути VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, які в значних кількостях є в кордовій крові [23].

Крім того, стимулюванню ангіогенезу може сприяти імуномодуюча дія КСКК, що реалізується завдяки наявності у препараті протизапальних цитокінів, таких як ІЛ-4, ІЛ-8, ІЛ-10 та TGF- $\beta$  [24]. Нещодавно були опубліковані результати дослідження, які свідчили про те, що мікро-РНК-містки екзосоми, отримані з сироватки кордової крові, значною мірою сприяють проліферації ендотеліоцитів людини, а також їхній міграції й утворенню трубочкоподібних структур *in vitro* [25].

Таким чином, за результатами дослідження, КСКК може бути ефективним препаратом для лікування пошкоджень мозкової тканини, які спричинені ГФЦІ.

### Висновки

1. Після моделювання гострої фокальної церебральної ішемії на тлі використання кріоконсервованої сироватки кордової крові людини спостерігались ознаки реактивних змін ендотеліоцитів у вигляді збільшення кількості рибосом і полісом у цитоплазмі, зменшення ступеня периваскулярного набряку тканини мозку на 21,4 %.

2. Площа поверхні ендотеліальних клітин у зоні гострої фокальної церебральної ішемії на 7-му добу експерименту у тварин групи 2 становила  $(1483,00 \pm 26,48)$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно більше, ніж у щурів груп 1 і 3, на 54,1 та 31,6 % відповідно. Зменшення даного показника під дією кріоконсервованої сироватки кордової крові людини може свідчити про позитивний протизапальний ефект препарату.

3. На 7-му добу експерименту в щурів групи 3 за допомогою оптичної мікроскопії було виявлено збільшення щільності церебральних капілярів відносно показника в щурів групи 2, що вказує на стимуляцію відновлення ультраструктури пошкоджених капілярів, збільшення їхньої щільності, утворення нових капілярів під дією компонентів кріоконсервованої сироватки кордової крові людини.

### Перспективність дослідження

Результати експерименту стимулюють до подальшого вивчення дії обраного імунобіологічного препарату в гострому періоді ішемічного інсульту в людей. Перспективу являють поглиблення знань про склад компонентів кріоконсервованої сироватки кордової крові людини і їхніх нових властивостей.

**Список літератури**

1. *Fujioka T.* Blood vessels as a scaffold for neuronal migration / T. Fujioka, N. Kaneko, K. Sawamoto // *Neurochem. Int.* – 2019. – Vol. 126. – P. 69–73.
2. PDGF-BB regulates splitting angiogenesis in skeletal muscle by limiting VEGF-induced endothelial proliferation / R. Gianni-Barrera, A. Butschkau, A. Uccelli [et al.] // *Angiogenesis.* – 2018. – Vol. 21, № 4. – P. 883–900.
3. *Buschmann I.* The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis) / I. Buschmann, W. Schaper // *Journal of Pathology.* – 2000. – Vol. 190, № 3. – P. 338–342.
4. Specific activation of insulin-like growth factor-1 receptor by ginsenoside Rg5 promotes angiogenesis and vasorelaxation / Y. L. Cho, S. M. Hur, J. Y. Kim [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2015. – Vol. 290, № 1. – P. 467–477.
5. Focal cerebral ischemia-reperfusion induces the Nrf2 downstream target PPAR gamma in mouse cerebrovascular endothelium / K. Farrell-Dillon, S. J. Chapple, A. Alfieri [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2016. – Vol. 96. – P. S30–S31.
6. *Carmeliet P.* Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis / P. Carmeliet, R. K. Jain // *Nature.* – 2011. – Vol. 473, № 7347. – P. 298–307.
7. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo / N. Jetten, S. Verbruggen, M. J. Gijbels [et al.] // *Angiogenesis.* – 2014. – Vol. 17, № 1. – P. 109–118.
8. *Owen J. L.* Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis / J. L. Owen, M. Mohammadzadeh // *Frontiers in Physiology.* – 2013. – Vol. 4. – P. 24–35.
9. VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions / D. Q. Guo, Q. Y. Wang, C. Li [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 44. – P. 77020–77027.
10. Tumor necrosis factor-alpha-activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis / Y. W. Kwon, S. C. Heo, G. O. Jeong [et al.] // *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease.* – 2013. – Vol. 1832, № 12. – P. 2136–2144.
11. *Demir R.* Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta / R. Demir, Y. Seval, B. Huppertz // *Acta Histochemica.* – 2007. – Vol. 109, № 4. – P. 257–265.
12. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention / A. Albini, F. Tosetti, R. Benelli, D. M. Noonan // *Cancer Research.* – 2005. – Vol. 65, № 23. – P. 10637–10641.
13. *Foldvari M.* The intricacies of neurotrophic factor therapy for retinal ganglion cell rescue in glaucoma: a case for gene therapy / M. Foldvari, D. W. Chen // *Neural Regeneration Research.* – 2016. – Vol. 11, № 6. – P. 875–877.
14. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside / X. F. Liu, R. D. Ye, T. Yan [et al.] // *Progress in Neurobiology.* – 2014. – Vol. 115. – P. 92–115.
15. Доклинические исследования лекарственных средств (методические рекомендации) / [под ред. чл.-кор. АМН Украины О. В. Стефанова]. – К. : Авицена, 2001. – 528 с.
16. *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. – Т. 1. – С. 56–59.
17. Стереотаксический атлас мозга крысы (фронтальные сечения) / [под ред. А. Ю. Буданцева]. – Пушино : Аналитическая микроскопия, 2002.
18. *McGraw C. P.* Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils / C. P. McGraw // *Arch. Neurol.* – 1977. – Vol. 34, № 6. – P. 334–346.
19. *Ohno K.* Regional cerebral blood flow and stroke index after left carotid artery ligation in the conscious gerbil / K. Ohno, U. Ito, Y. Inaba // *Brain Res.* – 1984. – Vol. 297, № 1. – P. 151–157.
20. *Личко В. С.* Вплив кріоконсервованої сироватки кордової крові на репаративні процеси у тканині мозку щурів із гострою фокальною церебральною ішемією / В. С. Личко, В. О. Малахов, О. М. Сукач // *Проблеми кріобіології і кріомедицини.* – 2019. – Т. 29, № 3. – С. 277–290. – DOI : <https://doi.org/10.15407/cryo29.03.277>. – Режим доступу до журн. : <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/1554>.
21. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice / J. M. Castellano, K. I. Mosher, R. J. Abbey [et al.] // *Nature.* – 2017. – Vol. 544, № 7651. – P. 488–492. – DOI : 10.1038/nature22067.

22. Comparison of growth factor and interleukin content of adult peripheral blood and cord blood serum eye drops for cornea and ocular surface diseases / M. Buzzi, P. Versura, B. Grigolo [et al.] // *Transfusion and Apheresis Science*. – 2018. – Vol. 57, № 4. – P. 549–555.
23. Human umbilical cord mesenchymal stem cells preserve adult newborn neurons and reduce neurological injury after cerebral ischemia by reducing the number of hypertrophic microglia/macrophages / W. Lin, Y. C. Hsuan, M. T. Lin [et al.] // *Cell Transplant*. – 2017. – Vol. 26, № 11. – P. 1798–1810.
24. Endothelial progenitor cells for ischemic stroke: update on basic research and application / S. H. Liao, C. X. Luo, B. Z. Cao [et al.] // *Stem Cells International*. – 2017. – Vol. 12. – P. 1–12.
25. Maternal and umbilical cord serum-derived exosomes enhance endothelial cell proliferation and migration / L. Y. Jia, X. Y. Zhou, X. J. Huang [et al.] // *Faseb Journal*. – 2018. – Vol. 32, № 8. – P. 4534–4543.

### References

1. Fujioka T., Kaneko N., Sawamoto K. (2019). Blood vessels as a scaffold for neuronal migration. *Neurochem Int.*, vol. 126, pp. 69–73.
2. Gianni-Barrera R., Butschkau A., Uccelli A., Certelli A., Valente P., Bartolomeo M. et al. (2018). PDGF-BB regulates splitting angiogenesis in skeletal muscle by limiting VEGF-induced endothelial proliferation. *Angiogenesis*, vol. 21, № 4, pp. 883–900.
3. Buschmann I., Schaper W. (2000). The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *Journal of Pathology*, vol. 190, № 3, pp. 338–342.
4. Cho Y.L., Hur S.M., Kim J.Y., Kim J.H., Lee D.K., Choe J. et al. (2015). Specific activation of insulin-like growth factor-1 receptor by ginsenoside Rg5 promotes angiogenesis and vasorelaxation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, № 1, pp. 467–477.
5. Farrell-Dillon K., Chapple S.J., Alfieri A., Srivastava S., Duchon M. et al. (2016). Focal cerebral ischemia-reperfusion induces the Nrf2 downstream target PPAR gamma in mouse cerebrovascular endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 96, pp. S30–S31.
6. Carmeliet P., Jain R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, vol. 473, № 7347, pp. 298–307.
7. Jetten N., Verbruggen S., Gijbels M.J., Post M.J., De Winther M.P.J. et al. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*, vol. 17, № 1, pp. 109–118.
8. Owen J.L., Mohamadzadeh M. (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Frontiers in Physiology*, vol. 4, pp. 24–35.
9. Guo D.Q., Wang Q.Y., Li C., Wang Y., Chen X. (2017). VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions. *Oncotarget*, vol. 8, № 44, pp. 77020–77027.
10. Kwon Y.W., Heo S.C., Jeong G.O., Yoon J.W., Mo W.M., Lee M.J. et al. (2013). Tumor necrosis factor-alpha-activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, vol. 1832, № 12, pp. 2136–2144.
11. Demir R., Seval Y., Huppertz B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochemica*, vol. 109, № 4, pp. 257–265.
12. Albin A., Tosetti F., Benelli R., Noonan D.M. (2005). Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Research*, vol. 65, № 23, pp. 10637–10641.
13. Foldvari M., Chen D.W. (2016). The intricacies of neurotrophic factor therapy for retinal ganglion cell rescue in glaucoma: a case for gene therapy. *Neural Regeneration Research*, vol. 11, № 6, pp. 875–877.
14. Liu X.F., Ye R.D., Yan T., Yu S.P., Wei L., Xu G.L. et al. (2014). Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside. *Progress in Neurobiology*, vol. 115, pp. 92–115.
15. Stefanov O.V. (Eds.). (2001). *Doklinicheskie issledovaniia lekarstvennykh sredstv (metodicheskie rekomendatsii) [Preclinical studies of drugs (guidelines)]*. Kyiv: Avitsena, 528 p. [in Russian].
16. Kolesnyk V.V. (2011). Eksperymentalnyi tromboembolichnyi insult u shchuriv linii Vistar yak variant patofiziologichnoi modeli hostrykh porushen mikrotsyrkuliatsii za ishemichnym typtom

[Experimental thromboembolic stroke in Wistar rats as a variant of the pathophysiological model of acute microcirculation disorders by ischemic type]. *Patolohiia – Patology*, vol. 1, pp. 56–59 [in Ukrainian].

17. Budantsev A. Yu. (Eds.). (2002). *Stereotaksicheskii atlas mozha krysy (frontalnyie secheniia) [Stereotaxic atlas of the rat brain (frontal sections)]*. Pushchino: Analiticheskaiia mikroskopiia. [in Russian].

18. McGraw C.P. (1977). Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils. *Arch. Neurol.*, vol. 34, № 6, pp. 334–346.

19. Ohno K., Ito U., Inaba Y. (1984). Regional cerebral blood flow and stroke index after left carotid artery ligation in the conscious gerbil. *Brain Res.*, vol. 297, № 1, pp. 151–157.

20. Lychko V.S., Malakhov V.O., Sukach O.M. (2019). Vplyv kriokonservovanoi syrovatky kordovoi krvi na reparatyvni protsesy u tkanyni mozku shchuriv iz hostroiu fokalnoiu tserebralnoiu ishemieiu [Influence of cryopreserved cord blood serum on reparative processes in rat brain tissue with acute focal cerebral ischemia]. *Проблеми кріобіології і кріомедицини – Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, vol. 29, № 3, pp. 277–290, DOI <https://doi.org/10.15407/cryo29.03.277>. Retrieved from <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/1554> [in Ukrainian].

21. Castellano J.M., Mosher K.I., Abbey R.J., McBride A.A., James M.L., Berdnik D. et al. (2017). Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*, vol. 544, № 7651, pp. 488–492, DOI 10.1038/nature22067.

22. Buzzi M., Versura P., Grigolo B., Cavallo C., Terzi A., Pellegrini M. et al. (2018). Comparison of growth factor and interleukin content of adult peripheral blood and cord blood serum eye drops for cornea and ocular surface diseases. *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 57, № 4, pp. 549–555.

23. Lin W., Hsuan Y.C., Lin M.T., Kuo T.W., Lin C.H., Su Y.C. et al. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells preserve adult newborn neurons and reduce neurological injury after cerebral ischemia by reducing the number of hypertrophic microglia/macrophages. *Cell Transplant.*, vol. 26, № 11, pp. 1798–1810.

24. Liao S.H., Luo C.X., Cao B.Z., Hu H.Q., Wang S.X., Yue H.L. et al. (2017). Endothelial progenitor cells for ischemic stroke: update on basic research and application. *Stem Cells International*, vol. 12, pp. 1–12.

25. Jia L.Y., Zhou X.Y., Huang X.J., Xu X.H., Jia Y.H., Wu Y.T. et al. (2018). Maternal and umbilical cord serum-derived exosomes enhance endothelial cell proliferation and migration. *Faseb Journal*, vol. 32, № 8, pp. 4534–4543.

### **В.С. Лычко**

#### **МЕСТО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В КОНЦЕПЦИИ СТИМУЛЯЦИИ ВТОРИЧНОГО АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ОСТРОЙ ФОКАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ**

Изучали особенности изменений структурно-функциональных характеристик мозговой ткани 60 беспородных крыс-самцов линии Wistar при моделировании острой фокальной церебральной ишемии (ОФЦИ) в динамике лечения криоконсервированной сывороткой кордовой крови (КСКК) человека. Проводили электронное и оптическое микроскопическое исследования сенсомоторной области коры головного мозга. Все животные были разделены на три группы по 20 животных в каждой: первая (контроль) – интактные крысы без травматизации и лечения; вторая – животные после моделирования ОФЦИ без лечения; третья – крысы после моделирования ОФЦИ, которым вводили КСКК. Материал для морфологического исследования забирали после введения раствора КСКК животным с моделью ОФЦИ через 12, 24, 72 ч и 7 дней от начала эксперимента. Средняя площадь периваскулярных пространств, которая является показателем вазогенного отека, у крыс группы 2 в 45 раз превышала таковую в группе 1, а у крыс группы 3, получавших КСКК, – в 37 раз. Средняя площадь перичеллюлярных пространств, указывающая на степень цитотоксического отека, у животных группы 2 на 7-е сутки после ОФЦИ почти в 23 раза превышала результаты группы 1. Данный показатель у крыс группы 3 был увеличен в 20 раз по сравнению с таковым у крыс группы 2. На фоне использования данного препарата наблюдались признаки реактивных изменений эндотелиоцитов в виде увеличения количества рибосом и полисом в цитоплазме, уменьшения степени периваскулярного отека ткани мозга на 21,4 %. Площадь поверхности эндотелиальных клеток в зоне ОФЦИ на 7-е сутки эксперимента у животных, дополнительно получавших КСКК, составляла  $(1483,00 \pm 26,48)$  мкм<sup>2</sup>, что свидетельствует о положительном противовоспалительном эффекте препарата. На 7-е сутки эксперимента у крыс группы 3 с помощью оптической микроскопии было



обнаружено увеличение плотности церебральных капилляров относительно таковой у животных группы 2, что указывает на стимуляцию восстановления ультраструктуры поврежденных капилляров, увеличение их плотности, образование новых капилляров под действием компонентов КСБК.

**Ключевые слова:** эндотелиальная клетка, ангиогенез, ишемия, патология, сыворотка, воспаление.

*V.S. Lychko*

#### THE PLACE OF NEUROTROPHIC THERAPY IN THE CONCEPT OF STIMULATION OF SECONDARY ANGIOGENESIS IN ACUTE FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA

The features of changes in the structural and functional characteristics of brain tissue were studied in 60 outbred male Wistar rats during modelling of acute focal cerebral ischemia (AFCI) in the dynamics of treatment with human cryopreserved cord blood serum (CCBS). Electronic and optical microscopic examination of the sensorimotor area of the cerebral cortex was performed. All animals were divided into three groups: the first (control) group consisted of intact rats without trauma and treatment; the second group consisted of animals after modelling AFCI without treatment; third group consisted of rats after modelling AFCI, which were injected by CCBS. Each group consisted of 20 animals. Material for morphological examination was taken after administration of CCBS solution to animals with the model of AFCI at 12, 24, 72 hours and 7<sup>th</sup> days after the start of the experiment. The average area of perivascular spaces, which is an indicator of vasogenic oedema in rats of group 2 was 45 times higher than in rats of group 1. In contrast, in rats of group 3 with CCBS, this figure was exceeded 37 times. The average area of pericellular spaces, indicating the degree of cytotoxic oedema, in animals of group 2 on the 7<sup>th</sup> day after AFCI was almost 23 times higher than the results of group 1. This figure in rats of group 3 was increased 20 times compared with data in group 2. Against the background of the use of this drug, there were signs of reactive changes in endothelial cells in the form of an increase in the number of ribosomes and polysomes in the cytoplasm, a decrease in the degree of perivascular oedema of brain tissue by 21.4 %. The surface area of endothelial cells in the zone of AFCI on the 7<sup>th</sup> day of the experiment in animals that additionally received CCBS was  $(1483.00 \pm 26.48) \mu\text{m}^2$ , which indicates a positive anti-inflammatory effect of the drug. On the 7<sup>th</sup> day of the experiment in group 3 rats by optical microscopy was found to increase the density of cerebral capillaries compared with group 2, which indicates the stimulation of the restoration of the ultrastructure of damaged capillaries, increase their density, the formation of new capillaries under the components of CCBS.

**Keywords:** endothelial cell, angiogenesis, ischemia, pathology, serum, inflammation.

*Надійшла 18.10.19*

#### Відомості про автора

*Личко Володимир Станіславович* – кандидат медичних наук, доцент кафедри нейрохірургії та неврології Медичного інституту Сумського державного університету.

Адреса: 40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31, Медичний інститут Сумського державного університету.

Тел.: +38(066)255-01-20.

E-mail: volodlychko@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5518-5274>.