

УДК 616.089.843:591.81:591.3:591.88:611 – 018.4: 591.481.1:616-005.4 – 092.9:617.57/58:612.015.36

Ярмольюк Є. С.^{1,2}, Цимбалюк В. І.^{1,2}, Стайно Л. П.², Савчук О. В.³, Дятел М. В.⁴¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна²ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна³Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна⁴Київський міський онкологічний центр, Київ, Україна

e-mail: i.iarmoliuk@ukr.net

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ТА КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ПОСТІШЕМІЧНИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНИЙ АНГІОГЕНЕЗ І ВІДНОВЛЕННЯ МОТОРНИХ ФУНКЦІЙ КІНЦІВОК У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ

РЕЗЮМЕ

Ішемічний інсульт є однією з провідних причин смертності та інвалідизації населення в світі. Незважаючи на прогрес медичних знань і технологій, частота стійких неврологічних порушень у пацієнтів, які перенесли інсульт, залишається високою, а ефективна стратегія відновного лікування все ще перебуває на стадії експериментальної розробки. Відновлення функцій нервової системи після інсульту передбачає активацію ендогенних репаративних процесів, зокрема ангіогенезу, за допомогою засобів регенеративної медицини, включаючи клітинну і тканинну трансплантацію.

МЕТА: вивчити вплив стимульованого шляхом трансплантації суспензії клітин ембріональної нервової тканини і кісткового мозку постінсультного ангіогенезу на відновлення моторних функцій у щурів з експериментальним ішемічним інсультом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. 160 білих безпородних щурів-самців віком 3-4 міс. з масою тіла 280-320 г були поділені на групи: з ізольованою оклюзією середньої мозкової артерії (ОСМА), інтрацеребральною аlogenною трансплантацією суспензії клітин ембріональної нервової тканини (ОСМА + ТСКЕНТ), інтрацеребральною аутологічною трансплантацією суспензії клітин кісткового мозку (ОСМА + ТСККМ) або інфузією фосфат-буферного 0,9% розчину натрію хлориду (ОСМА + ФБР) на 2-у добу після ОСМА. ОСМА здійснювали за допомогою модифікованої методики інтралюмінальної монофіламентної оклюзії із блокуванням колатералей. Об'єм ділянки інфаркту мозку визначали за допомогою фарбування розчином 2,3,5-трифенілтетразолію хлориду (ТТС) на 7-у і 14-у добу ($n = 5$ із кожної групи на кожну добу) після ОСМА, а кількість судин у перинфарктній зоні визначали шляхом імуногістохімічної детекції маркера CD34 на 7-у, 14-у і 28-у добу ($n = 6$ із кожної групи на кожну добу) після ОСМА. Оцінку рухових порушень проводили за допомогою тесту ходіння по бруску з опорами на 1-у, 3-у, 7-у, 14-у, 21-у і 28-у добу після ОСМА ($n = 18$ із кожної групи на кожну добу).

РЕЗУЛЬТАТИ. ТСККМ призводила до збільшення кількості судин в перинфарктній зоні в динаміці, найбільше вираженого на 28-у добу, і до зменшення об'єму ділянки ураження порівняно з іншими експериментальними групами, починаючи з 7-ї доби після ОСМА. ТСКЕНТ і ТСККМ призводили до регресу рухового дефіциту, починаючи з 3-ї і до 28-ї доби після ОСМА. Ступінь моторної асиметрії кінцівок щура негативно корелював із кількістю судин у перинфарктній зоні.

ВИСНОВКИ. Трансплантація суспензії клітин ембріональної нервової тканини і кісткового мозку сприяє регресу рухових порушень у піддослідних тварин з експериментальним ішемічним інсультом завдяки ангіогенному ефекту, який більше виражений при використанні клітин кісткового мозку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оклюзія середньої мозкової артерії, ембріональна нервова тканина, кістковий мозок, ангіогенез, рухові порушення

Актуальність проблеми відновного лікування пацієнтів з ішемічним інсультом (далі – інсульт) і його наслідками є очевидною з точки зору значного соціально-економічного впливу летальності та інвалідизації населення, зумовленого даною патологією [25]. Незважаючи на велике розмаїття існуючих нині методів лікування пацієнтів з інсультом, їх терапевтичний потенціал є обмеженим у часі строком виживання нейронів періинфарктної зони – «пенумбри», які перебувають у стані парабіозу [30]. Сучасні терапевтичні стратегії при інсульті спрямовані на стимуляцію структурно-функціональної репарації цих клітин шляхом відновлення перфузії ушкодженої ділянки мозку та нейтралізації впливу патофізіологічного альтераційного каскаду, спричиненого ішемією.

Втім, попри стрімкий розвиток новітніх медичних технологій, значна частина пацієнтів після перенесеного інсульту залишається зі стійким неврологічним дефіцитом, який значно ускладнює соціальну реадaptaцію таких пацієнтів і часто є резистентним до сучасних методів реабілітації. Навіть у розвинених країнах у гострій стадії інсульту тромболітична реперфузія за допомогою тканинного активатора плазміногену застосовується не більше ніж у 4-7% пацієнтів [30]. Очікуваний терапевтичний ефект нейропротекторних засобів не був переконливо доведений в більшості клінічних досліджень, а використання хірургічних методик ревазуляризації залишається дискусійним питанням. Активация регенеративних процесів у головному мозку, не обмежених гострим періодом інсульту, є принципово новим напрямком лікування пацієнтів із даною патологією [29]. Оскільки одним із ключових репаративних механізмів при ішемічному ураженні головного мозку є ангіогенез, його стимуляція є перспективним методом лікування пацієнтів з інсультом [3, 4]. З цієї метою у клінічних випробуваннях і експериментальних дослідженнях використовуються фактори росту, стовбурові клітини різного походження, засоби генної інженерії та їх поєднання. У численних експериментальних дослідженнях продемонстрований позитивний вплив нейрогенних (НСК) і мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (МСК КМ) на відновлення функцій піддослідних тварин після моделювання інсульту [11, 12, 15]. Разом із тим ефекти клітинної трансплантації при інсульті, зокрема її вплив на ангіогенез, вивчені недостатньо. Існують докази, що міжклітинний матрикс, строма і мікрооточення можуть бути корисними модуляторами функції трансплантованих клітин, зокрема ембріональної (ЕНТ) і фетальної нервової тканини (ФНТ), та сприяють їх інтеграції в головному мозку реципієнта [9, 11]. В той же час кістковий мозок, який є джерелом

МСК, успішно застосовується у вигляді цільної недисоційованої суспензії для стимуляції ангіогенезу при ішемічних ураженнях нижніх кінцівок і міокарда [3, 4]. Беручи до уваги найбільшу доступність в Україні зазначених джерел СК, виникає необхідність дослідження можливості їх застосування з метою ревазуляризації головного мозку при ішемічному інсульті на доклінічній стадії.

У зв'язку з цим важливого значення набуває визначення кількісних параметрів морфологічного відновлення піддослідних тварин після моделювання ішемічного інсульту в експерименті, що в подальшому створить передумови для клінічної апробації даного методу стимуляції постішемічного ангіогенезу.

МЕТА РОБОТИ: встановити вплив постінсультного ангіогенезу, стимульованого шляхом трансплантації суспензії клітин ембріональної нервової тканини і кісткового мозку, на відновлення моторних функцій у щурів з експериментальним ішемічним інсультом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження було проведене на 160 білих безпородних щурах-самцях масою тіла 280-320 г віком 3-4 міс., поділених на 3 експериментальні групи і 12 підгруп.

Група №1 (n = 72) – тварини, які використовувались для порівняльної серійної оцінки неврологічного дефіциту на 1-у, 3-у, 7-у, 14-у, 21-у і 28-у добу спостереження після моделювання інсульту:

1) підгрупа №1 (n = 18) – тваринам цієї групи моделювали оклюзію середньої мозкової артерії (ОСМА) за модифікованою методикою («контрольна» – ОСМА);

2) підгрупа №2 (n = 18) – тваринам на 2-у добу після моделювання ОСМА проводили алотрансплантацію суспензії клітин ембріональної нервової тканини (ОСМА + ТСКЕНТ);

3) підгрупа №3 (n = 18) – тваринам на 2-у добу після моделювання ОСМА проводили аутогенну трансплантацію суспензії клітин кісткового мозку (ОСМА + ТСККМ);

4) підгрупа №4 (n = 18) – тваринам на 2-у добу після моделювання ОСМА проводили інтрацеребральну інфузію фосфат-буферного 0,9% розчину натрію хлориду (ОСМА + ФБР).

Група №2 (n = 40) – тварини, які використовувались для морфометричної оцінки об'єму ділянки інфаркту мозку і виводилися з експерименту на 7-у і 14 добу відповідно:

Таблиця 1. Розподіл експериментальних тварин на групи і підгрупи.

ГРУПИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН (N=160)														
	ГРУПА №1 (N=72) ОЦІНКА РУХОВОЇ АСИМЕТРІЇ						ГРУПА №2 (N=40) ВИЗНАЧЕННЯ ОБ'ЄМУ ДІЛЯНКИ ІНФАРКТУ			ГРУПА №3 (N=72) ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ				
ТЕРМІНИ ДОСЛІДЖЕННЯ, ДОБА														
	1	3	7	14	21	28	7	14		7	14	28		
ПІДГРУПИ (КІЛЬКІСТЬ ТВАРИН)	№1 (ОСМА) n=18	18	18	18	18	18	18*	№5 (ОСМА) n=10	5	5	№9 (ОСМА) n=18	6	6	6
	№2 (ТСКЕНТ) n=18	18	18	18	18	18	18*	№6 (ТСКЕНТ) n=10	5	5	№10 (ТСКЕНТ) n=18	6	6	6
	№3 (ТСККМ) n=18	18	18	18	18	18	18*	№7 (ТСККМ) n=10	5	5	№11 (ТСККМ) n=18	6	6	6
	№4 (ФБР) n=18	18	18	18	18	18	18*	№8 (ФБР) n=10	5	5	№12 (ФБР) n=18	6	6	6

Примітки:

* По 6 тварин із кожної підгрупи (№1-4) на 28-у добу були використані для імуногістохімічного дослідження (загалом – 24 тварини).

1) підгрупа №5 (ОСМА, $n = 10$) – щури з ОСМА, які виводилися з експерименту на 7-у ($n = 5$) і 14-у добу ($n = 5$) після ОСМА;

2) підгрупа №6 (ОСМА + ТСКЕНТ, $n = 10$) – тварини із ТСКЕНТ, які виводилися з експерименту на 7-у ($n = 5$) і 14-у добу ($n = 5$) після ОСМА;

4) підгрупа №7 (ОСМА + ТСККМ, $n = 10$) – тварини, які виводилися з експерименту на 7-у ($n = 5$) і 14-у добу ($n = 5$) після ОСМА;

5) підгрупа №8 (ОСМА + ФБР, $n = 10$) – тварини з інфузією ФБР на 2-у добу після моделювання ОСМА, які виводилися з експерименту на 7-у ($n = 5$) і 14-у добу ($n = 5$) після ОСМА.

Група №3 ($n = 72$) – тварини, які використовувалися для морфометричної оцінки кількості судин в періинфарктній зоні і виводилися з експерименту на 7-у, 14-у і 28-у добу після ОСМА (по 6 тварин із кожної групи на кожну добу, включаючи 24 тварини із підгруп №1-4, які виводилися з експерименту на 28-у добу спостереження):

1) підгрупа №9 (ОСМА, $n = 18$);

2) підгрупа №10 (ОСМА + ТСКЕНТ);

3) підгрупа №11 (ОСМА + ТСККМ, $n = 18$);

4) підгрупа №12 (ОСМА + ФБР, $n = 18$).

11 вагітних самок щурів (15-, 16-й день гестації) було використано для одержання ЕНТ. Усі досліди були схвалені Комісією з питань етики Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця і проводилися в суворій відповідності до чинного нормативного документа «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (Наказ Міністерства освіти і науки, молоді і спорту України №249 від 01.03.2012 р.).

Моделювання ішемічного інсульту. Оскільки аналогом ішемічного інсульту у щурів є фокальна церебральна ішемія (ФЦІ), для її експериментального моделювання була використана модифікація перманентної монофіламентної оклюзії правої середньої мозкової артерії, яка детально описана в попередніх дослідженнях [5, 6]. Під інтраперитонеальним наркозом (седазин – 10 мг/кг і калісол – 75 мг/кг маси тіла) із серединного розрізу м'яких тканин шиї виділяли праву загальну (ЗСА), зовнішню (ЗоСА) та внутрішню сонну (ВСА) артерії. Судини звільняли від сполучної тканини та нервів. Поетапно коагулювали та пересікали гілки ЗоСА і перев'язували крилопіднебінну гілку ВСА. Далі нещільно фіксували лігатуру навколо ЗоСА біля біфуркації ЗСА. На ЗСА і ВСА накладали тимчасові мікросудинні кліпси і пересікали ЗоСА на відстані 1–2 мм від біфуркації ЗСА. За допомогою накладеної лігатури мобілізований проксимальний кінець ЗоСА підтягували і в його просвіт вводили монофіламентний оклюдер 4/0 (*Doscol corp.*, США). Лігатуру на куксі ЗоСА щільно затягували, кліпси знімали і оклюдер вводили інтракраніально до відчуття легкого опору, який свідчив про блокування середньої мозкової артерії. Після цього перев'язували ліву ЗСА. При моделюванні «псевдооклюзії» монофіламент після блокування СМА відразу ж виймали.

Суспензію кісткового мозку (КМ) отримували з діафізу лівої стегнової кістки тварин групи ОСМА + ТСККМ безпосередньо перед трансплантацією за описаною в літературі методикою із незначними модифікаціями [2]. Під інтраперитонеальним наркозом сумішню розчинів калісолу (75 мг/кг) і ксилазину (10 мг/кг) тварин фіксували у стереотаксичному апараті у положенні на животі, шкіру в ділянці лівого стегна розсікали лінійним розрізом, скелетували кістку та виділяли кістковий мозок в об'ємі 3–4 мм³, який поміщали на чашку Петрі із підігрітим до 37 °С 0,9% розчином натрію хлориду. Одержану суспензію кісткового мозку відмивали від форменних елементів крові підігрітим до 37 °С 0,9% розчином натрію хлориду, очищували та подрібнювали за допомогою багаторазового піпетування у пробірці з 0,1 М розчином фосфатного буферу (рН = 7,4) протягом 10 хв і поміщали у флакон з 5 мл даного розчину. З метою отримання суспензії КМ для трансплантації вміст флакону центрифугували при швидкості 2 тис. об/хв протягом 20 хв і відбирали 1 мл центрифугату. У такому вигляді суспензію під час проведення краніотомії утримували в термостаті при температурі 37 °С протягом 30–40 хв.

Суспензію клітин ембріональної нервової тканини отримували зі щурячих ембріонів на 15-, 16-й день гестації шляхом кесарево-го розтину вагітних самок щурів. З рогів матки вилучали ембріони, з яких вилучали невеликі шматочки кори та смугастого тіла головного мозку, які інкубували в сольовому розчині PBS (*Sigma*, США) протягом 15–20 хв при кімнатній температурі, а потім подрібнювали мікроножицями та дисоціювали за допомогою багаторазового піпетування скляними піпетками Пастера з оплавленими кінчиками для запобігання пошкодження клітин. Отриману клітинну суспензію центрифугували при 1000 об/хв, наосад зливали, а осад клітин ресуспендували в поживному середовищі Ігла (*Sigma*, США). Ступінь дисоціації і стан клітин контролювали під мікроскопом. Отриману суспензію клітин до моменту трансплантації тримали в CO₂-інкубаторі (*Nuve*, Туреччина), де постійно підтримувалася температура 37 °С та концентрація 5% CO₂.

Життєздатність клітин і визначення їх концентрації проводили в гемоцитометрі після фарбування клітин 0,2% розчином трипанового синього. Загальна кількість клітин для трансплантації у суспензії ЕНТ досягала $2 \cdot 10^5$ (вміст живих клітин – $68 \pm 3,1\%$), у суспензії КМ – $1 \cdot 10^6$ (вміст живих клітин – $87 \pm 2,9\%$).

Методика інтрацеребральної трансплантації клітин. При виборі терміну проведення інтрацеребральної трансплантації (2-а доба після моделювання ОСМА) ми послуговувалися літературними даними та даними, отриманими у попередніх дослідженнях щодо динаміки відновних процесів у групі ОСМА [5, 6]. Виходячи із даних численних досліджень, ми припускали, що специфічний ефект ТСКЕНТ і ТСККМ проявляється повною мірою на стадії ранньої нейросудинної репарації на 1-, 2-у добу після ФЦІ [2, 9, 16].

Під інтраперитонеальним наркозом сумішню розчинів калісолу (75 мг/кг) і ксилазину (10 мг/кг) тварин фіксували у стереотаксичному апараті СЕЖ-4 у положенні на животі. Із лінійного розрізу шкіри голови оголювали кістки черепа, ідентифікували скелетотопічні орієнтири, накладали фрезевий отвір та за допомогою голки Гамільтона 26 G і автоматичного мікроін'єктора (*Harvard Apparatus*, США) вводили інтрацеребрально зі швидкістю 5 мкл/хв, залежно від умов експерименту, клітинну суспензію (КМ – $1 \cdot 10^6$ клітин в об'ємі 20 мкл, або ЕНТ – $2 \cdot 10^5$ клітин в об'ємі 20 мкл) або ФБР (20 мкл) за такими координатами: 0,3 мм дозду від брегми, 3 мм латерально (праворуч) від середньої лінії, 2,0 мм (кора) і 4,0 мм (стріатум) вглиб від твердої мозкової оболонки відповідно. Таким чином, розчин вводився безпосередньо в періинфарктну зону (ПІЗ), яка відповідала соматосенсорній корі (10 мкл на глибині 2,0 мм) та медіальному каудопутамену (10 мкл на глибині 4,0 мм). Після ін'єкції канюлю залишали на 5 хв у порожнині черепа з метою рівномірного розподілу суспензії та запобігання її витіканню. Потім голку виймали, а фрезевий отвір закривали медичним воском Bone wax (*Ethicon*, США).

Визначення об'єму ділянки інфаркту мозку проводили за допомогою фарбування зрізів мозку розчином 2,3,5-трифеніл-тетразолію хлориду (ТТС) (*Sigma*, США). На 7-у і 14-у добу тварин знеболювали сумішню калісолу (75 мг/кг) і ксилазину (10 мг/кг) внутрішньочеревинно і проводили прижиттєву фіксацію тканин за допомогою транскардіальної перфузії, після чого тварин декапітували. Мозок відмивали у чашці Петрі із фізіологічним розчином і за допомогою вібратора робили 6 коронарних зрізів товщиною 2 мм. Останні поміщали у 2% розчин ТТС на 15 хвилин при температурі 37 °С. Після цього зрізи виймали та викладали на міліметровий папір і сканували за допомогою цифрового фотосканера CanoScan LiDE210 (*Canon*, Японія). Цифрову обробку зображень та планіметричний аналіз розмірів вогнища інфаркту проводили за допомогою програми ImageJ (Національний інститут здоров'я, США, <http://imagej.nih.gov>) за формулою:

$$S_1 = S_{\text{ТТС}} - S_{\text{ІНІ}}$$

де S_1 – коригована площа зони інфаркту, $S_{\text{ТТС}}$ – загальна площа контрлатеральної (інтактної півкулі), $S_{\text{ІНІ}}$ – ділянка інтактної тканини в ураженій півкулі мозку.

Скориговану величину об'єму інфаркту одержували за допомогою формули:

$$V_1 = \sum S_1 \cdot n_1,$$

де S_1 – коригована площа зони інфаркту, n_1 – товщина зрізу, Σ – сума добутоків коригованої площі інфаркту на товщину зрізу (заочно від кількості зрізів).

Остаточну відносну величину об'єму зони ушкодження виражали у відсотках за формулою:

$$V = V_1/V_{N1},$$

де V_1 – коригований об'єм зони інфаркту, V_{N1} – об'єм інтактною півкулі мозку.

Імуногістохімічне дослідження тканин мозку проводилось з використанням маркера CD34 (DAKO, Данія), який експресується на ендотеліоцитах і ендотеліальних прогеніторних клітинах (ЕПК) та гемопоетичних стовбурових клітинах і клітинах-попередниках [14]. Для цього був застосований дво- і трьохкроковий авідин-біотин-метод на зрізах з парафінових блоків товщиною 3–4 мкм. Після депарафінізації і зневоднення з метою блокування ендогенної пероксидази зрізи обробляли 0,3% розчином перекису водню протягом 20 хв, промивали в дистильованій воді і з метою демаскування антигенних детермінант піддавали температурній обробці в буфері з розчином Target Retrieval Solution з рН = 6,0 (DAKO, Данія) на водяній бані протягом 20 хв. Після промивання в TRS тричі по 5 хв наносили первинне мишаче або кроляче антитіло. Інкубацію з первинним антитілом проводили у вологій камері протягом 30–60 хв при кімнатній температурі. Після інкубації з первинними антитілами зрізи промивали в TRS тричі по 5 хв, потім на 30 хв при кімнатній температурі наносили авідин-біотинний комплекс, кон'югований з пероксидазою з використанням LSAB⁺ (DAKO, Данія), або системи детекції EnVision⁺ (DAKO, Данія) протягом 30 хв при кімнатній температурі. Виявлення пероксидазної активності здійснювали за допомогою DAB⁺ (DAKO, Данія). Ядра дофарбовували гематоксиліном.

Підрахунок кількості судин в перинфарктній зоні проводили на 2 мм зрізах мозку (0,3 мм дозад і 3,75 мм латерально від брегми) у 8 полях зору (рис. 1), а відтак визначали середню кількість судин на поле зору на 7-у, 14-у і 28-у добу після ОСМА.

Оцінку неврологічних порушень у піддослідних тварин проводили за допомогою тесту ходіння по бруску з опорами, який звукується в кінці (ledged tapered beam-walking test – LTBWT) на 1-у, 3-у, 7-у, 14-у, 21-у і 28-у добу після моделювання ОСМА в підгрупах №1–4 за описаною в літературі методикою [25]. Наявність опор запобігає виникненню компенсаторних моторних стратегій і допомагає виявити справжній дефіцит. Під час долання твариною відстані враховується кількість зісковзування лап з бруска. Для полегшення оцінки рухових порушень довжина бруска поділяється на 3 відрізки по 45 см, а верхня дошка зафарбовується у чорний колір. Кінцевим пунктом шляху є знайома для щура клітка, яка містить шматочки їжі для заохочення тварини проходити відстань по бруску. Інтактний щур легко навчається ходити по бруску по верхній дошці, рідко використовуючи опори (рис. 2 А). Тварина з ОСМА використовує опору для кроків паретичних кінцівок на відповідному боці бруска (рис. 2 Б). Уражені кінцівки будуть спиратися на опору в широкій частині бруска частіше за інтактні кінцівки і ще частіше по мірі звууження бруска.

Тварин тренували протягом 5 днів, по 5 спроб на кожний день. У післяопераційному періоді реєстрували 5 спроб протягом сесії на кожний день тестування. Кожну спробу записували на касету за допомогою відеокамери й аналізували у повільному режимі для підрахунку зісковзувань лап для кожної кінцівки. Постановка лапи на опору враховується як повне зісковзування, а неповне (половинне) зісковзування – у випадку, якщо кінцівка торкається бічної сторони бруска. Для кожної кінцівки підраховується кількість зісковзувань протягом п'яти спроб, а потім усереднюється, а також підраховується загальна кількість кроків для кожного з відрізків різної складності. Після унілатерального ушкодження, кількість контралатеральних та іпсилатеральних зісковзувань кінцівок на кожному відрізку поділяється на загальну кількість

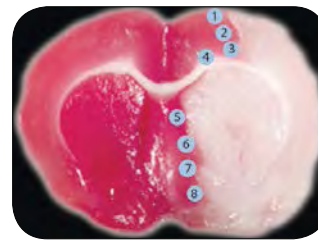


Рис. 1. Фотографія мозку щура на 7-у добу після ОСМА. Забарвлення ТТС. Зона інфаркту має білий колір. Кругами позначені поля зору, які були обрані для кількісної оцінки ангиогенезу в перинфарктній зоні.



Рис. 2. Тест ходіння по бруску з опорами, який звукується в кінці. Загальний вигляд експериментальної кімнати (А). Інтактний щур не використовує опори при проходженні бруска (А), тоді як у щура із ОСМА спостерігається зісковзування уражених кінцівок на опору (Б).

кроків на кожному відрізку шляху. Відсоток асиметрії для кожного з відрізків вираховується шляхом віднімання відсотку іпсилатеральних зісковзувань від контралатеральних зісковзувань на один крок. Більший відсоток означає більш виражене ураження контралатеральної кінцівки. Кінцевий результат асиметрії для передніх (а) і задніх (б) кінцівок розраховували за формулами :

$$a = [\Sigma(x_1/n_1 + x_2/n_2 + x_3/n_3) - \Sigma(y_1/n_1 + y_2/n_2 + y_3/n_3)]/5,$$

$$b = [\Sigma(z_1/m_1 + z_2/m_2 + z_3/m_3) - \Sigma(s_1/t_1 + s_2/t_2 + s_3/t_3)]/5,$$

де $x_1/n_1, x_2/n_2, x_3/n_3$ – кількість зісковзувань, поділених на кількість кроків для кожного відрізка шляху ураженої передньої кінцівки; $y_1/n_1, y_2/n_2, y_3/n_3$ – кількість зісковзувань, поділених на кількість кроків для кожного відрізка шляху інтактною передньої кінцівки; $z_1/m_1, z_2/m_2, z_3/m_3$ – кількість зісковзувань, поділених на кількість кроків для кожного відрізка шляху ураженої задньої кінцівки; $s_1/t_1, s_2/t_2, s_3/t_3$ – кількість зісковзувань, поділених на кількість кроків для кожного відрізка шляху інтактною задньої кінцівки; 5 – кількість спроб.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програм SPSS 20.0 (IBM, США) для операційної системи OS X 10.9.4 (Apple, США) із використанням однофакторного дисперсійного аналізу з функцією повторних вимірювань (one-way repeated measures Analysis of Variance – ANOVA) для порівняння підгруп №1–4 і двофакторного (2-way) дисперсійного аналізу (2-Way ANOVA) – для підгруп №5–8 і №9–12. Аналіз здійснювали за допомогою опції GLM (General Linear Models) та подальшої постпроцесінгової обробки (post-hoc testing) для виявлення різниці між групами за допомогою тестів Bonferroni та Scheffe. Кореляцію морфометричних даних і рухових порушень проводили за допомогою множинного регресійного аналізу. Дані виражали у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, а m – стандартне квадратичне відхилення. Відмінності вважалися статистично вірогідними за умови $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імуногістохімічна детекція маркера CD34 у судинах перинфарктної зони виявила збільшення кількості судин у тварин усіх експериментальних груп з 7-ї по 28-у добу (рис. 3, 4). При цьому на всіх термінах спостерігалася достовірно вища активність ангиогенезу в групах із клітинною трансплантацією порівняно з групами ОСМА і ОСМА + ФБР ($F = 69,21, df = 3, p < 0,001$). При порівнянні узагальненої середньої

кількості судин у групах тварин в динаміці між 7-ю і 14-ю ($p = 0,027$ за Scheffe і $p = 0,022$ за Bonferroni), 14-ю і 28-ю, а також 7-ю і 28-ю добою ($p < 0,001$) також було виявлено істотні відмінності. При цьому найбільша різниця між середньою кількістю судин в групах ОСМА + ТСККМ ($37,9 \pm 3,5$) і ОСМА + ТСКЕНТ ($30,8 \pm 2,6$) відзначалася лише на 28-у добу ($p = 0,026$ за Scheffe і $p = 0,015$ за Bonferroni). Натомість різниця між середніми показниками кількості судин в групах ОСМА (28-а доба – $21,7 \pm 2,0$) і ОСМА + ФБР (28-а доба – $22 \pm 1,7$) виявилася несуттєвою.

Зміни розмірів ділянки інфаркту мозку на 7-у і 14-у добу після моделювання фокальної церебральної ішемії та при різних варіантах трансплантації, включаючи плацебо (0,1 М фосфат-буферний 0,9% розчин натрію хлориду), відображена на **рис. 5**. На 7-у добу після ОСМА у тварин усіх експериментальних груп спостерігалася чітко окреслена зона ішемічного некрозу білого кольору, на відміну від інтактної мозкової речовини, яка фарбувалася ТТС в червоний колір (**рис. 6**). Розчин ТТС у 0,9% розчині натрію хлориду при температурі 37°C є безбарвним, проте у живій тканині мозку під впливом мітохондріальних

дегідрогеназ відновлюється до червоного ліпід-розчинного формазану, в той час як нежива тканина чи ділянка інфаркту залишається незабарвленою [17]. Середній об'єм ділянки ураження, виражений у відсотках порівняно з інтактною півкулею, на 7-у добу після ОСМА (5-а доба після трансплантації в групах із трансплантацією) був достовірно меншим в групі ОСМА + ТСККМ ($32,7 \pm 2,5\%$), ніж в групі з ОСМА ($34,9 \pm 4,1\%$) і ОСМА + ФБР ($35,4 \pm 2,7\%$; $df = 1$, $F = 19,6$, $p < 0,001$). При цьому слід зазначити, що істотної різниці між контрольною групою та групою «плацебо-трансплантації» не було виявлено протягом усього подальшого періоду спостереження ($p = 0,968$ за Scheffe і $p = 1,0$ за Bonferroni). Аналогічна закономірність була виявлена й при порівнянні між собою груп ОСМА + ТСККМ і ОСМА + ТСКЕНТ ($p = 0,429$ за Scheffe і $p = 0,609$ за Bonferroni).

На 14-у добу як у тварин контрольної групи (ОСМА – $34,9 \pm 4,1$), так і в групах ОСМА + ТСКЕНТ ($24,6 \pm 1,9$) і ОСМА + ТСККМ ($28,0 \pm 2,6$), спостерігалось зменшення об'єму ураженої півкулі. При порівнянні середнього узагальненого показника об'єму ділянки інфаркту мозку в усіх експериментальних групах між 7-ю і 14-ю добою виявлена достовірна різниця між термінами спостереження ($p < 0,001$).

За даними LTBWT, руховий дефіцит у щурів проявлявся на 1-у добу після моделювання ОСМА і мав тенденцію до незначного регресу та стабілізації до 28-ї доби спостереження (**рис. 7**). Високодостовірні відмінності середнього показника моторної дисфункції між порівнюваними групами спостерігались вже на 3-у добу (ОСМА + ТСКЕНТ – $66,6 \pm 1,4\%$ при порівнянні з групою ОСМА – $73,4 \pm 1,6\%$, $p < 0,001$ і групою ОСМА + ФБР – $73,1 \pm 1,8$, $p = 0,002$ за Scheffe і Bonferroni; ОСМА + ТСККМ – $59 \pm 2\%$ при порівнянні з групою ОСМА і групою ОСМА + ФБР – $p < 0,001$, $F = 26,97$, $df = 3$). Дана тенденція зберігалася до 28-ї доби спостереження, коли середній показник моторної асиметрії в групі ОСМА склав $53,9 \pm 1,3\%$ порівняно з групами ТСКЕНТ ($36,8 \pm 0,8\%$), і ТСККМ ($21,9 \pm 1\%$, $p < 0,001$).

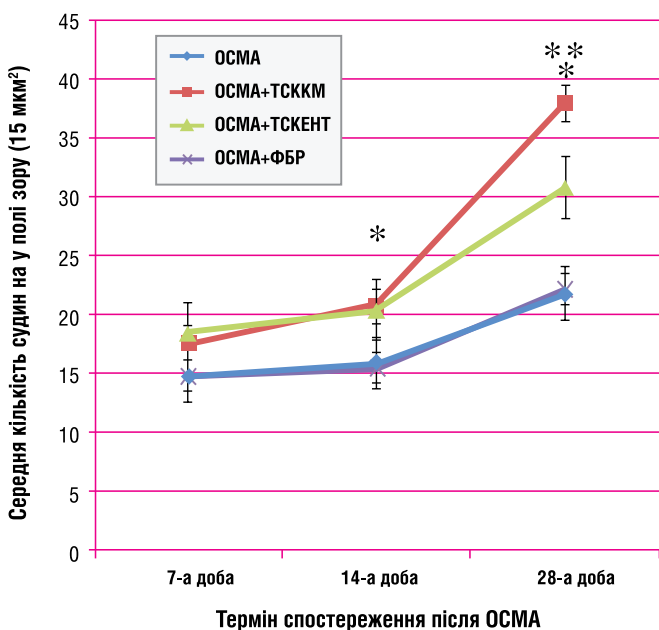
Слід зазначити, що відмінності показників моторної асиметрії між групами ОСМА + ТСККМ і ОСМА + ТСКЕНТ протягом усього періоду спостереження були статистично значущими ($p = 0,004$ за Scheffe і Bonferroni). Темпи відновлення рухової функції протилежних кінцівок при ТСКЕНТ знижувалися, починаючи з 14-ї доби ($40,2 \pm 1,1\%$), тоді як при ТСККМ утримувалася позитивна динаміка з 14-ї ($30,7 \pm 0,9\%$) по 21-у добу ($22,7 \pm 1,1\%$).

Істотних відмінностей у показниках рухової асиметрії щурів контрольної групи та групи з інфузією ФБР не було виявлено ($p = 0,953$ і $1,0$ згідно з корекцією Scheffe і Bonferroni, відповідно).

Дані множинного регресійного аналізу свідчать про наявність сильної негативної кореляції відсотка моторної асиметрії кінцівок щура і кількості судин у перинфарктній зоні (коригований $R^2 = 0,499$; стандартизований $B = -0,561$, $t = 4,6$, $p < 0,0001$) та слабкої позитивної кореляції ($B = 0,294$, $t = 2,4$, $p = 0,021$) даного показника із об'ємом ділянки інфаркту мозку (**рис. 8, 9**).

Результати аналізу динаміки об'єму зони інфаркту і ангиогенезу свідчать про позитивний вплив ТСКЕНТ і ТСККМ на регенерацію

Рис. 3. Динаміка кількості судин за даними імуногістохімічного визначення маркера CD34 у тварин різних експериментальних груп.



Примітки:

* $p < 0,001$ у порівнянні між контрольною групою та групою плацебо-трансплантації, з одного боку, та групами ТСКЕНТ і ТСККМ, з іншого;

** $p < 0,05$ у порівнянні між групами ОСМА і ТСКЕНТ.

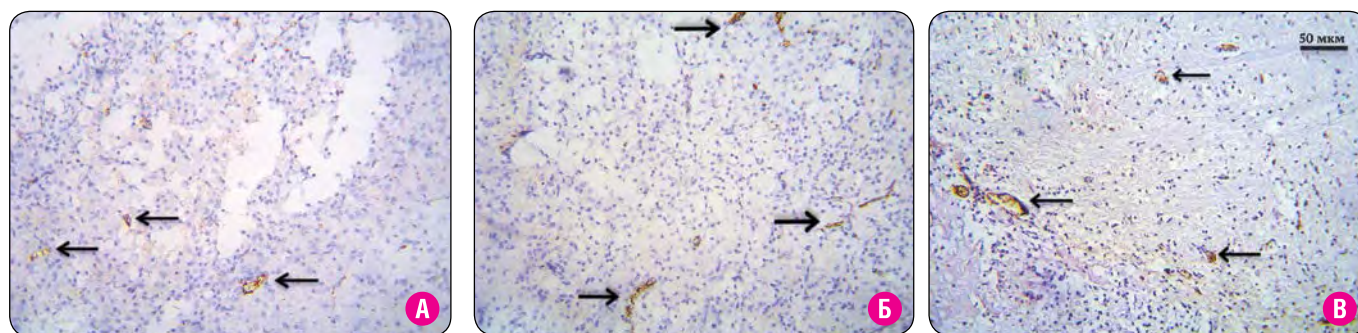


Рис. 4. Мікрофотографія ендотеліоцитів судин перинфарктної зони на 14-у добу після ОСМА: А – контрольна група, Б – ТСКЕНТ, В – ТСККМ. Забарвлення: гематоксилін + імуногістохімічне визначення маркера CD34 (коричневий колір). Стрілками позначені судини із CD34-позитивними клітинами. Масштабна шкала – 50 мкм.

тканин головного мозку в ділянці ішемічного ушкодження мозку. Даний ефект проявлявся вже на 7-у добу спостереження після моделювання ФЦІ і досягав піку на 28-у добу (рис. 3, 5). При цьому саме на 7-у добу після ОСМА відзначалось збільшення темпів відновлення моторної функції кінцівок, а максимальний регрес рухових порушень у групах із ТСКЕНТ і ТСККМ спостерігався також на 28-у добу. Слід також зазначити, що збільшення кількості новоутворених судин у ПІЗ, особливо виражене в групі з ТСККМ, корелювало із позитивною динамікою показника моторної асиметрії кінцівок, що підтверджує вплив ангиогенезу на відновлення неврологічних функцій в експериментальних тварин після ФЦІ (рис. 8). Морфометричний аналіз свідчить про позитивний вплив лише ТСККМ на об'єм ділянки ішемічного ушкодження, на відміну від ТСКЕНТ.

Таким чином, ТСККМ виявилася більш ефективним методом відновного лікування ФЦІ в експерименті завдяки її ангиогенному та, ймовірно, нейропротекторному впливу на клітини ПІЗ, що супроводжувалося збереженням більшого об'єму тканин мозку та регресом моторного дефіциту в піддослідних тварин вже на ранніх термінах спостереження (7-14-а доба після ОСМА).

Одержані нами дані частково підтверджуються даними інших досліджень, в яких вивчався вплив трансплантації НСК або нейрогенних клітин-попередників (НКП) і МСК кісткового мозку на відновлення функцій в піддослідних тварин після ФЦІ [19, 22, 28, 30]. Даний ефект дослідники пов'язують із диференціацією НСК, основним джерелом яких є ембріональна нервова тканина, у зрілі функціонально повноцінні нейрони, які формують синаптичні контакти з нейронами реципієнта [11, 18, 22]. Саме з замісною дією НСК трансплантату деякі автори пов'язують зменшення об'єму ділянки інфаркту мозку після ФЦІ [7, 8]. Окрім міграції та нейрональної диференціації важливу роль у постішемічній регенерації мозку відводять трофічному впливу НСК ембріонального та фетального мозку [1]. Деякі автори вказують також на можливість стимуляції церебрального ангиогенезу в перинфарктній зоні за допомогою людських ембріональних НСК [21]. Втім, питання стосовно повноцінної реституції нейронних мереж за допомогою НСК і нейрональних прекурсорів залишається

дискутабельним. На сьогодні клітини ембріонального (фетального) мозку деякими дослідниками розглядаються здебільшого як засоби нейротрофічного впливу [1, 22].

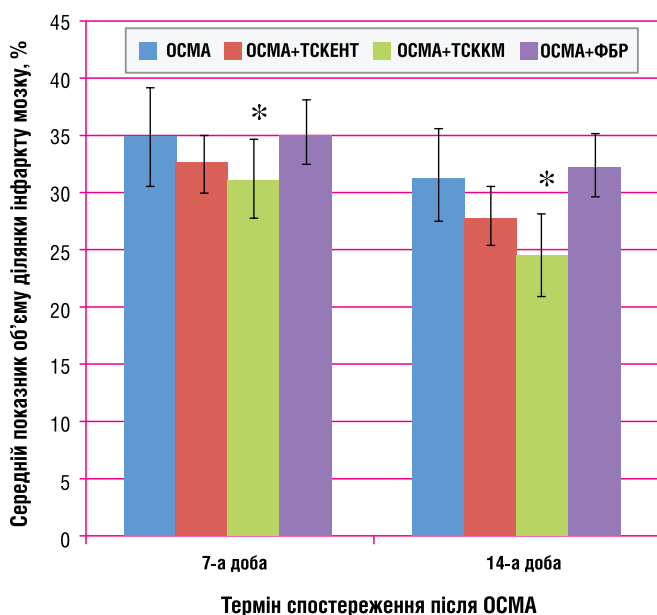
Не існує також достатніх доказів анатомічної інтеграції МСК КМ і їх диференціації у функціонально повноцінні нейрони [12]. Разом з тим деякі автори зазначають, що реконструкція нейронних кіл не завжди є визначальною передумовою для функціонального відновлення [1, 7].

Ймовірно, різна функціональна активність клітин ЕНТ і КМ пояснюється різними механізмами взаємодії СК, строми і міжклітинного матриксу тканин в умовах мікрооточення мозку реципієнта [1, 9].

Основними активними компонентами кісткового мозку є МСК, строма і міжклітинний матрикс [2, 4]. Доведено, що трансплантовані МСК КМ можуть вивільняти розчинні трофічні чинники та цитокіни, які запускають процес ендогенної репарації ушкоджених внаслідок ішемії тканин мозку, а також стимулюють продукцію нейропротекторних і репаративних речовин власними клітинами паренхіми мозку. Продукція трофічних і ростових факторів посилюється за рахунок стимуляції новоутворених судин МСК КМ, що в подальшому активує процеси мозкової пластичності та відновлення неврологічних функцій після інсульту [10]. Окрім МСК безпосередню роль у нейросудинній репарації після ФЦІ бере негемопоетична строма КМ, яка містить стромальні прогенітори з ендотеліоцитарним фенотипом [19, 31]. У відповідь на ішемію або цитокинову стимуляцію збільшується мітотична активність стромальних прогеніторів і ендотеліальних прогеніторних клітин (ЕПК), які запускають процес неоваскуляризації у вогнищі запалення. Існує припущення про безпосередню участь МСК в ангиогенезі, при якому останні виступають у ролі ЕПК [21, 31]. Доведено також, що молекули позаклітинного матриксу кісткового мозку, зокрема ламініни, регулюють проліферацію та диференціацію гемопоетичних стовбурових і прогеніторних клітин [9, 19].

У нашому дослідженні виявлена слабка кореляція змін об'єму ураженої півкулі мозку, визначеного за допомогою фарбування зрізів мозку ТТС, із регресом моторного дефіциту. Позитивний вплив на об'єм ділянки інфаркту був виявлений нами лише при ТСККМ. Проте

Рис. 5. Графік динаміки об'єму зони інфаркту мозку у щурів після ОСМА та різних варіантів інтрацеребральної трансплантації.



Примітки:

* Статистично значущі відмінності між групами ОСМА + ТСККМ і ОСМА ($p = 0,002$ за Scheffe) і ОСМА + ФБР ($p = 0,007$ за Scheffe).

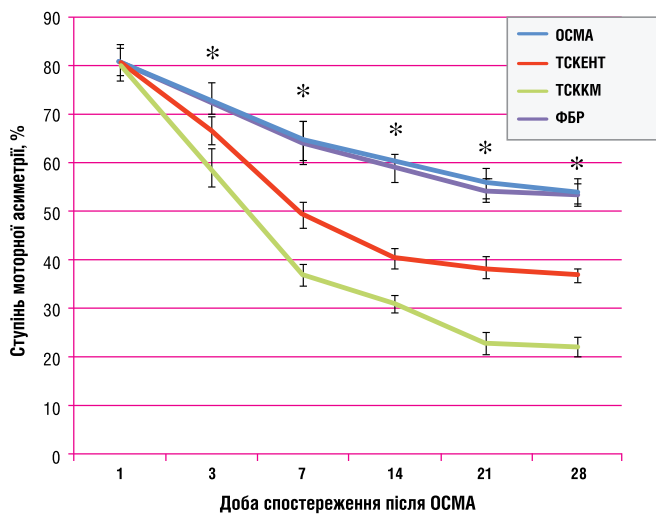
Рис.6. Фото зрізів мозку щурів на 7-у і 14-у добу після моделювання ОСМА, фарбування ТТС.



Примітки:

ТСКЕНТ – група ОСМА + ТСКЕНТ, ТКМ – група ОСМА + ТСККМ, ФБР – група ОСМА + ФБР. Перший ряд по вертикалі – 7-а доба, другий ряд – 14-а доба. Масштабна шкала - 5 мм.

Рис. 7. Графік змін показника моторної асиметрії за даними BWT під впливом інтрацеребральної трансплантації клітин.



Примітки:

* Статистично достовірні відмінності між групами ОСМА і ОСМА + ФБР, з одного боку, і ОСМА + ТСКЕНТ і ОСМА + ТСККМ, з іншого, а також між групами ОСМА + ТСККМ і ОСМА + ТСКЕНТ ($p < 0,001$).

Рис. 8. Графік кореляції активності ангиогенезу та моторної асиметрії за даними множинного регресійного аналізу.

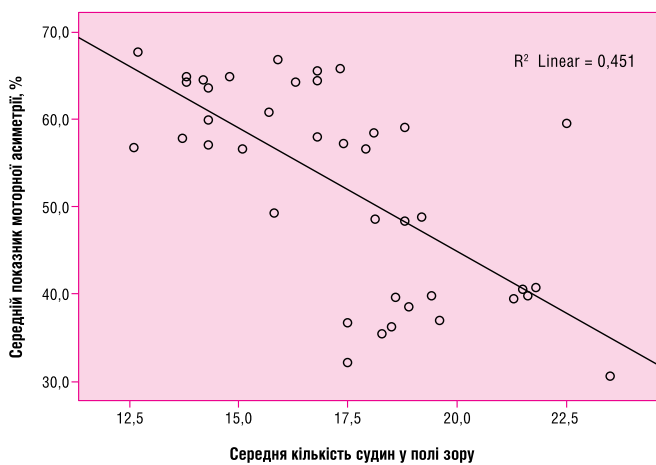
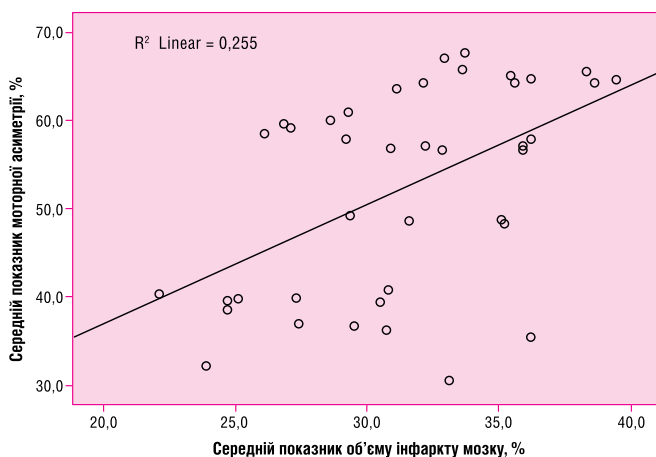


Рис. 9. Графік кореляції величини об'єму ділянки інфаркту мозку та моторної асиметрії за даними множинного регресійного аналізу.



даний ефект залишається предметом дискусій [22, 26]. Так, зокрема Chen J. і співавт. не виявили істотної різниці між об'ємом ділянки ураження в шурів, яким проводили інтрацеребральну трансплантацію суспензії клітин кісткового мозку на 7-у добу після ОСМА, порівняно з контрольною групою на 14-у добу після ОСМА [9]. Натомість у дослідженні Li Y. і співавт. внутрішньовенна трансплантація клітин кісткового мозку через 1 добу після моделювання ФЦІ сприяла значному зменшенню розмірів ділянки інфаркту на 14-у добу після ОСМА, що супроводжувалося також істотним функціональним відновленням у тварин даної групи порівняно з контрольною групою [19]. Подібні результати були одержані також в іншому дослідженні, де інтрацеребральна трансплантація стромальних клітин кісткового мозку проводилася негайно після індукції фокальної кортикальної ішемії [26]. Дані розбіжності можна пояснити застосуванням різних моделей ФЦІ, зокрема транскраніальної оклюзії СМА, що призводить до менших розмірів ділянки ураження, а також тимчасовою оклюзією СМА із подальшою реперфузією [29].

Враховуючи використання нами модифікованої моделі постійної оклюзії СМА, яка призводить до розвитку стабільної, чітко окресленої зони інфаркту мозку, і ранні терміни трансплантації (2-а доба після ОСМА), можна припустити, що позитивний вплив клітин КМ на об'єм ділянки ішемічного ушкодження мозку зумовлений раннім неспецифічним нейропротекторним і антиапоптичним впливом клітин трансплантату із проліферативним потенціалом, що дозволяє запобігти загибелі нейронів ішемічної напівтілі. Це підтверджується даними про зменшення концентрації прозапальних цитокінів та нейроспецифічних білків – маркерів нейродегенерації і збільшення концентрації протизапальних цитокінів при трансплантації МСК КМ [21].

Більшість морфологічних даних, які дозволяють формувувати обгрунтовані припущення щодо механізму дії трансплантованих клітин, одержані у певний фіксований термін спостереження і не розглядалися в динаміці. Натомість дослідниками визнана необхідність проведення серійного довготривалого моніторингу неврологічних порушень у тварин з експериментальним інсультом, оскільки розвиток вторинних дегенеративних і репаративних процесів після ФЦІ в різних анатомічних і функціональних ділянках мозку відбувається в різні терміни після ушкодження [13]. Враховуючи вищезазначене, механізми дії різних засобів і методів клітинної і тканинної трансплантації при ФЦІ повинні розглядатися з точки зору їх диференційованого впливу на просторово-часові параметри репаративних процесів в ураженій зоні, що потребує кореляції функціональних, морфологічних і морфометричних даних [6, 16]. Наші дані вказують на наявність певної залежності між активацією ангиогенезу і покращенням неврологічних функцій у шурів після ОСМА і тканинної трансплантації.

Порівняльний комплексний функціонально-морфологічний аналіз ТСКЕНТ і ТСККМ як засобів клітинної трансплантації різного походження з потенційно різними механізмами дії показав переваги застосування ТСККМ, що пояснюється її переважним ангиогенним впливом, що супроводжувалося регресом рухових порушень у піддослідних тварин.

Доведено, що розвиток колатерального кровопритоку та функціонування новоутворених судин у перифокальній зоні головного мозку після його ішемічного ушкодження має нейропротекторний ефект, сприяє активації нейрогенезу у субвентрикулярній зоні бічних шлуночків і формуванню нових нейрональних мереж завдяки трофічній підтримці у межах так званої «нейросудинної» ніші [20]. У нашому дослідженні з використанням маркера CD34 для імуногістохімічної детекції ендотеліоцитів і ЕПК в новоутворених судинах ангиогенний ефект тканинної трансплантації спостерігався на 7-у добу і досягав максимуму на 28-у добу, що, за деякими даними, відповідає терміну формування стабільної функціонуючої судинної мережі [3,31]. Неоваскуляризація спостерігалася також у контрольній групі з ОСМА та в групі з «плацебо»-трансплантацією.

CD34 є одним із конститутивних маркерів ендотеліальних клітин, який використовується в клінічних дослідженнях ангиогенезу, зокрема

в онкології, поряд із іншими маркерами (vWF, CD31, CD45, CD105 тощо) [14, 24]. Даний маркер експресують також ЕПК, які, за різними даними, беруть активну участь у постінсультному ангіогенезі [20, 31]. Таким чином, визначення експресії CD34 дозволяє ідентифікувати не лише ендотеліоцити, а й ЕПК в стінці новоутворених судин, що у кількісному відношенні свідчить про активність неоангіогенезу.

Слід зазначити, що ангіогенез, стимульований ТКМ, виявився більш вираженим, ніж при ТСКЕНТ, починаючи з 14-ї доби і до кінця терміну спостереження. На нашу думку, це обумовлено потужним трофічним впливом різних клітинних субпопуляцій КМ, передусім стромальних і гемопоетичних стовбурових клітин і мононуклеарних клітин, які секретують ангіогенні фактори росту та ін. [9, 21]. ЕПК кісткового мозку можуть безпосередньо диференціюватися в ендотеліоцити новоутворених судин [31]. Відновлення мікроциркуляції та перфузії в ПІЗ призводить до покращення локального метаболізму в зоні ішемії і тим самим сприяє виживанню клітин пенумбри [20].

Більш виражений функціональний ефект ТСКМ порівняно з ТЕНТ, з найбільшою ймовірністю, спричинений переважною активацією ангіогенезу та синаптогенезу, що призводить до демас-

кування латентних і формування міжнейронних зв'язків моторної модальності [15]. Накопичені дані свідчать, що лікування інсульту за допомогою МСК КМ стимулює утворення нових нейрональних мереж як у іпсилатеральній, так і в контралатеральній півкулях мозку [26]. Показана здатність МСК КМ до зниження рівня інгібіторних глікопротеїнів, що, в свою чергу, полегшує проростання аксонів, а також стимуляції продукції нейротрофічних чинників астроцитами, які беруть активну участь у ремоделюванні білої речовини мозку [19]. Активовані астроцити, в свою чергу, можуть експресувати ангіогенні чинники, які сприяють утворенню нейросудинної «ніші», яка є епіцентром тканинної реорганізації, формування нових синаптичних контактів і хеоматрації ендогенних нейроblastів із СВЗ [20]. Відновлення рухових функцій може бути також пов'язано з ремоделюванням кортико-спінальних шляхів на рівні спинного мозку при експериментальному інсульті за допомогою МСК КМ [26]. Показано також, що синаптогенез значно посилюється в умовах активації ангіогенезу [20, 21]. Сильна кореляція функціонального відновлення із активністю постішемичного церебрального ангіогенезу може свідчити про більш виражений вплив КМ на процеси нейропластичності.

ВИСНОВКИ

Трансплантація кісткового мозку та ембріональної нервової тканини щурів після ОСМА сприяє відновленню рухової функції кінцівок. Темпи і ступінь регресу неврологічного дефіциту виявилися більшими при трансплантації кісткового мозку, що пов'язано зі стимуляцією ангіогенезу в перинфарктній зоні і зменшенням об'єму ураженої півкулі в експериментальних тварин. Одержані дані свідчать про перспективність подальшого вивчення ефектів клітинної трансплантації з метою обґрунтування термінів, засобів і способів трансплантації для подальшого впровадження в клінічну практику.

ЛІТЕРАТУРА

1. Влияние трансплантации нейрогенных стволовых клеток на восстановление функций ЦНС у крыс с инсультом в коре мозга [Текст] / А. И. Волков, С. В. Лебедев, И. В. Викторов и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2010. – №12. – С. 64-72.
2. Патент 46029 Україна, МПК А61В17/00. Спосіб прижиттєвого забору клітин кісткового мозку щурів із стегнової кістки [Текст] / Н. Я. Гридіна, В. В. Медведєв, О. В. Серкіз та ін. // заявник і патентовласник ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України». – №200904829; заявл. 23.02.2009; опубл.10.12.2009, бюл. №23.
3. Киримов В. И. Новые возможности ревааскуляризации конечностей при хронической ишемии: индукция ангиогенеза путем аутогенной трансплантации аспирата костного мозга у больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей [Текст] / В. И. Киримов // Клинічна хірургія. – 2009. – №5. – С. 27-29.
4. Потапов И. В. Стимуляция ангиогенеза как основа репаративного морфогенеза при ишемическом поражении миокарда [Текст] / И. В. Потапов, И. А. Кириллов // Вестник Росс. АМН. – 2007. – №9. – С. 3-8.
5. Цимбалюк В. І. Модифікована модель експериментального ішемічного інсульту в щурів з використанням монофіламентів із силіконовим покриттям [Текст] / В. І. Цимбалюк, Є. С. Ярмолюк // Український неврологічний журнал. – 2012. – №4. – С. 97-105.
6. Ярмолюк Є. С. Динаміка функціональних порушень при різних варіантах тканинної трансплантації з метою активації ангіогенезу на моделі фокальної церебральної ішемії в щурів [Текст] / Є. С. Ярмолюк // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2014. – Т. 82, №3. – С. 123-127.
7. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischemic brain [Text] / R. Andres, N. Horie, W. Slikker, et al. // Brain. – 2011. – Vol. 134. – P. 1777-1789.
8. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats [Text] / C. Buhnmann, A. Scholz, C. Bernreuther, et al. // Brain. – 2006. – Vol. 129. – №12. – P. 3238-3248.
9. Chen J. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat [Text] / J. Chen, M. Chopp // Neuropharmacology. – 2000. – Vol. 39. – P. 711-716.
10. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke [Text] / J.-R. Chen, G.-Y. Cheng, C.-C. Sheu, et al. // J. Anat. – 2008. – Vol. 213. – P. 249-258.
11. Darsalia V. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum [Text] / V. Darsalia, T. Kallur, Z. Kokaia // Eur. J. Neurosci. – 2007. – Vol. 26, №3. – P. 605-614.
12. Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats [Text] / Y. Deng, W. B. Ye, Z. Z. Hu, et al. // Neurol. Res. – 2010. – Vol. 32, №2. – P. 148-156.
13. On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside [Text] / T. Freret, P. Schumann-Bard, M. Boulouard, et al. // Experimental & Translational Stroke Medicine. – 2011. – Vol. 3, №6. – P. 1-5.
14. Garlanda C. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers [Text] / C. Garlanda, E. Dejana // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. – 1997. – Vol. 17. – P. 1193-1202.
15. Effects of intravenous administration of allogeneic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke [Text] / M. Gutiérrez-Fernández, B. Rodríguez-Frutos, J. Ramos-Cejudo, et al. // Stem Cell Research & Therapy. – 2013. – Vol. 4, №11. – P. 1-12.

16. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia [Text] / T. Hayashi, N. Noshita., T. Sugawara, et al. // J. Cereb. Blood Flow&Metab. – 2003. – Vol. 23. – P. 166-180.
17. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts [Text] / K. Isayama, L. H. Pitts, M. C. Nishimura // Stroke. – 1991. – Vol. 22 – P. 1394-1398.
18. Transplantation of human neural precursor cells in matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats [Text] / K. Jin, X.-O. Mao, L. Xe, et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2010. – Vol. 30, №3. – P. 534-544.
19. Are bone marrow regenerative cells ideal seed cells for the treatment of cerebral ischemia? [Text] / Y. Li, X.M. Hua, F. Hua, et al. // Neural. Regen. Res. – Vol. 8, №13. – 2013. – P. 1201-1209.
20. Liman T. G. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration [Text] / T. G. Liman, M. Endres // Cerebrovasc. Dis. – 2012. – Vol. 33. – P. 492-499.
21. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats [Text] / M. Lu, Z. Zhu, M. Chopp, et al. // Circ. Res. – 2003. – Vol. 92. – P. 692-699.
22. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments [Text] / B. Mattsson, J. C. Sorensen., J. Zimmer, et al. // Stroke. – 1997. – Vol. 28. – P. 1225-1232.
23. Heart disease and stroke statistics – 2011 update: a report from the American Heart Association [Text] / V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, et al. // Circulation. – 2011. – Vol. 123. – P. 18-29.
24. Morphometric analysis and immunohistochemical study of angiogenic marker expressions in invasive ductal carcinoma of human breast [Text] / M. D. Sawfat, F. Habib, A. Elayat, et al. // Folia Morphol. (Warsz.). – 2009. – Vol. 68, №3. – P. 144-155.
25. Schallert T. Orienting and placing [Text] / T. Schallert, M. T. Woodlee // Behavior of the laboratory rat: a handbook with tests. – Oxford: Oxford University Press, 2005. – P. 129-140.
26. Restoration of intracortical and thalamocortical circuits after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into the ischemic brain of mice [Text] / M. Song, O. Mohamad, X. Gu, et al. // Cell Transplant. – 2013. – Vol. 22, №4. – P. 15.
27. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats [Text] / M.-J. Tsai, S.-K. Tsai, B.-R.. Hu, et al. // Journal of Biomedical science. – 2014. – Vol. 21, №5. – P. 1-12.
28. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke [Text] / Q. Vu, K. Xie, M. Eckert, et al. // Neurology. – 2014. – Vol. 82, №14. – P. 1277-1286.
29. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke [Text] / T. M. Woodruff, J. Thundyil, S.-C. Tang, et al. // Molecular Neurodegeneration. – 2011. – Vol. 6, №11. – P. 1-19.
30. Human embryonic neural stem cell transplantation increases subventricular zone cell proliferation and promotes peri-infarct angiogenesis after focal cerebral ischemia [Text] / P. Zhang, J. Li, Y. Liu, et al. // Neuropathology. – 2011. – Vol. 31, №4. – P. 384-391.
31. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse [Text] / Z. G. Zhang, L. Zhang, Q. Zhang, et al. // Circ. Res. – 2002. – Vol. 90. – P. 284-288.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 02.11.2015 р.

Прийнята до друку 30.11.2015 р.