

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України”

На правах рукопису

ЯРМОЛЮК ЄВГЕНІЙ СЕРГІЙОВИЧ

УДК 616-089.843:591.88:591.481.1:616-005.4-092.9

**ВПЛИВ ТКАНИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА АНГІОГЕНЕЗ В ДІЛЯНЦІ
ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В
ЕКСПЕРИМЕНТІ**

14.01.05 — нейрохірургія

Дисертація

на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Науковий керівник:

Цимбалюк Віталій Іванович,

доктор медичних наук,

професор, академік НАМН України

Київ — 2016

ЗМІСТ

	Стор.
Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	5
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ ТА РЕПАРАЦІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ І МЕТОДИ ЙОГО ВІДНОВНОГО ЛІКУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	15
1.1. Механізми альтеративних процесів при гострому ішемічному ушкодженні головного мозку	15
1.1.1. Ішемічний “каскад”	15
1.1.2. Патоморфологічні зміни в ділянці інфаркту мозку	16
1.1.3. Роль нейросудинної “одиниці” ішемічному ушкодженні головного мозку	18
1.1.4. Роль мікроциркуляторного русла	20
1.1.5. Постішемічне запалення	21
1.1.6. Імунологічні механізми гострого ішемічного ушкодження головного мозку	23
1.2. Сучасні уявлення про репаративні процеси у тканинах головного мозку при його гострому ішемічному ушкодженні	24
1.2.1. Тканинне ремоделювання	24
1.2.2. Ендогенний нейрогенез	25
1.2.3. Ендогенний ангиогенез і судинне ремоделювання	26
1.3. Експериментальне моделювання ішемічного інсульту у тварин	32
1.4. Методи лікування пацієнтів із ішемічним інсультом у гострому періоді	34
1.4.1. Сучасні медикаментозні, хірургічні і реабілітаційні методи лікування	35
1.4.2. Методи регенеративної медицини у лікуванні гострого ішемічного інсульту	39

1.4.2.1. Нейротрансплантація	39
1.4.2.2. Індукований церебральний ангіогенез	47
Висновки до розділу 1	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	56
2.1. Дизайн дослідження	56
2.2. Методика моделювання експериментального ішемічного інсульту	59
2.3. Методика виділення тканини червоного кісткового мозку	65
2.4. Методика виділення ембріональної нервової тканини	66
2.5. Методика визначення кількості клітин в тканинній суспензії для трансплантації і їх життєздатності	67
2.6. Методика інтрацеребральної тканинної трансплантації	67
2.7. Протокол оцінки неврологічного дефіциту в експериментальних тварин	70
2.8. Методика визначення об'єму ділянки інфаркту мозку	77
2.9. Методики морфологічних досліджень	80
2.10. Статистична обробка даних експериментальних досліджень	82
РОЗДІЛ 3. ДИНАМІКА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОРУШЕНЬ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА ТКАНИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ	84
3.1. Результати оцінки неврологічного статусу тварин за допомогою шкали Bederson J.V. і співавторів	84
3.2. Результати тесту ходіння по бруску з опорами, який звужується в кінці	87
3.3. Результати тесту із клейкою стрічкою	90
3.4. Результати тесту постановки передньої лапи у відповідь на стимуляцію вібрисів	92
Висновки до розділу 3	94
РОЗДІЛ 4. ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ТА ТКАНИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ	96

4.1. Волюетрія ділянки інфаркту мозку експериментальних тварин	96
4.2. Динаміка патоморфологічних змін головного мозку після гострого ішемічного ушкодження та тканинної трансплантації	98
4.2.1. Морфологічні зміни головного мозку у тварин контрольної підгрупи	99
4.2.2. Морфологічні зміни головного мозку у тварин із тканинною трансплантацією	106
4.2.3. Морфологічні зміни головного мозку у тварин із інтрацеребральною інфузією 0,1 М фосфат-буферного 0,9% розчину натрію хлориду	115
4.3. Динаміка ангиогенезу за даними експресії CD34 в судинах перинфарктної зони головного мозку експериментальних тварин	116
Висновки до розділу 4	121
ПІДСУМКИ	126
ВИСНОВКИ	156
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	159
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	160
ДОДАТКИ	192

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

Анг	—	ангіопоетин
АСК	—	адипоцитарні стовбурові клітини
ВВТ	—	внутрішньовенний тромболізис
ВСА	—	внутрішня сонна артерія
ГЕБ	—	гематоенцефалічний бар'єр
ГКС	—	головний комплекс гістосумісності
Г-КСФ	—	гранулоцитарно колонієстимулювальний фактор
ГМК	—	гладенько-м'язові клітини
ГМ-КСФ	—	гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулювальний фактор
ГСК	—	гемопоетичні стовбурові клітини
ГФКБ	—	гліальний фібрилярний кислий білок
ГФЦІ	—	гостра фокальна церебральна ішемія
ЕНТ	—	ембріональна нервова тканина
ЕПК	—	ендотеліальні прогеніторні клітини
ЕПО	—	еритропоетин
ЗІГМ	—	зона інфаркту головного мозку
ЗСА	—	загальна сонна артерія
ЗоСА	—	зовнішня сонна артерія
ІІ	—	інтерлейкін
ІУГМ	—	ішемічне ушкодження головного мозку
ІФБР	—	інфузія фосфат-буферного 0,9% розчину натрію хлориду
ІФН	—	інтерферон
ІФР-1	—	інсуліноподібний фактор росту 1
ІЦА	—	індукований церебральний ангіогенез
МККМ	—	мононуклеарні клітини кісткового мозку
ММП	—	матриксні металопротеїнази

МСК	—	мезенхімальні стовбурові клітини
МСККМ	—	мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку
МЦР	—	мікроциркуляторне русло
НПК	—	нейрогенні прогеніторні клітини
НСК	—	нейрогенні стовбурові клітини
НТ	—	нейротрансплантація
НФМП	—	нейротрофічний фактор мозкового походження
ОСМА	—	оклюзія середньої мозкової артерії
оФРФ	—	основний фактор росту фібробластів
ПГр	—	експериментальна підгрупа
ПІЗ	—	періінфарктна зона
ПКМ	—	позаклітинний матрикс
ПОСМА	—	псевдооклюзія середньої мозкової артерії
ПФР	—	плацентарний фактор росту
РКД	—	рандомізовані контрольовані дослідження
РСЕФР	—	рецептор судинного ендотеліального фактора росту
СВЗ	—	субвентрикулярна зона
СЕФР	—	судинний ендотеліальний фактор росту
СК	—	стовбурові клітини
СККМ	—	стромальні клітини кісткового мозку
СКПК	—	стовбурові клітини пуповинної крові
СМА	—	середня мозкова артерія
ТАП	—	тканинний активатор плазміногену
ТЕНТ	—	трансплантація ембріональної нервової тканини
ТКМ	—	тканина кісткового мозку
ТППЛСВ	—	тест постановки передньої лапи у відповідь на стимуляцію вібрисів
ТКС	—	тест із клейкою стрічкою
ТТ	—	тканинна трансплантація
ТТКМ	—	трансплантація тканини кісткового мозку

ТТХ	—	2,3,5 – трифенітетразолію хлорид
ТФРВ	—	трансформуючий фактор росту В
ТХБЗОК	—	тест ходіння по бруску з опорами, який звужується в кінці
ФНПа	—	фактор некрозу пухлин α
ФНТ	—	фетальна нервова тканина
ФР	—	фактори росту
ФРГ	—	фактор росту гепатоцитів
ФРТП	—	фактор росту тромбоцитарного походження
ФСК-1 α	—	фактор, який походить зі стромальних клітин 1 α
ФФВ	—	фактор фон Віллебрандта
ЦНС	—	центральна нервова система
NO		оксид азоту

ВСТУП

Актуальність теми. Інсульт є важливою медико-соціальною проблемою. Щорічно у світі реєструється 15 млн. випадків інсульту, з них 5 млн. завершуються летально, а 5 млн. — стійкою інвалідністю [1, 2]. В Україні щорічно реєструється близько 110 тис. мозкових інсультів, з яких 40 тис. закінчуються летально [3, 4]. Інсульт в Україні є основною причиною стійкої втрати працездатності — близько 53% [5,6]. Ішемічний інсульт становить 80-87% випадків у структурі гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК), причому 60% ішемічних інсультів мають атеротромботичний генез [7–10].

Хірургічне лікування пацієнтів із ішемічним інсультом у гострому періоді на сьогодні залишається до кінця невирішеною проблемою з огляду на вузькі рамки “терапевтичного” вікна, у межах якого можлива ефективна реканалізація оклюзованої артерії. За сучасними даними, навіть у розвинених країнах світу лише 3–5% пацієнтів з ішемічним інсультом одержують тромболізис [11–13]. У зв’язку з цим виникає необхідність пошуку принципово нових методів лікування, ефективних поза межами терапевтичного “вікна”, які спрямовані не на відновлення прохідності артерії, а на стимуляцію репаративних процесів у ділянці ішемічного ушкодження головного мозку (ІУГМ): нейро-, ангіо- і синаптогенезу [14–18]. У зв’язку з цим, велику увагу привертає можливість непрямой індукції ангіогенезу в зоні ІУГМ за допомогою засобів регенеративної медицини: клітинних і тканинних технологій, молекулярних регуляторів, факторів росту, генних векторів і їх поєднань [19–22].

З огляду на розвиток хірургічних методик церебральної реваскуляризації, активація постішемічного ангіогенезу за допомогою нейротрансплантації (НТ) є перспективною стратегією лікування, спрямованою на структурно-функціональне відновлення тканин мозку після інсульту [23–26]. На початкових етапах розвитку НТ при інсульті найбільше були вивчені лікувальні ефекти ембріональної і фетальної нервової тканини, які в експерименті довели свою безпечність і ефективність [27–29]. Проте на сьогодні одним із найбільш

ефективних засобів трансплантації при інсульті вважаються стромальні (мезенхімальні) стовбурові клітини кісткового мозку [30–32].

Втім, порівняно незначна кількість досліджень присвячена ефектам трансплантації цільної тканини кісткового мозку (ТКМ) при інсульті [33–35]. Разом з тим існують повідомлення про успішне клінічне застосування ауто трансплантації ТКМ при ішемічних ураженнях нижніх кінцівок і міокарда [36–38]. Натомість у літературі відсутні дані щодо порівняльного впливу найбільш досліджених засобів тканинної трансплантації (ТТ) — ембріональної нервової тканини (ЕНТ) та ТКМ — на репаративні процеси у тканинах мозку після інсульту, зокрема, на ангиогенез. Також відсутні переконливі дані щодо більшої ефективності і безпечності трансплантації ізольованих клітин або клітинних культур порівняно з ТТ. При цьому ізоляція та культивування клітин потребує значних фінансово-матеріальних ресурсів [39–40].

Переважає більшість досліджень індукованого церебрального ангиогенезу (ЩА) в умовах клітинної трансплантації при інсульті проводиться на моделях фокальної ішемії-реперфузії у щурів при наявності значної кількості функціональних екстра- й інтракраніальних колатералей, що ускладнює інтерпретацію експериментальних даних [41–43]. Незважаючи на існування значної кількості експериментальних моделей ішемічного інсульту, жодна з них не дозволяє відтворити повний спектр патофізіологічних механізмів даної патології у людини. Зокрема, для визначення морфо-функціональних ефектів і потенційної ефективності ЩА доцільне застосування моделей із менш сприятливими умовами для ендогенної регенерації [44, 45].

Основними проблемами, які, на думку експертів, можуть перешкоджати ефективному впровадженню експериментальних методів лікування ішемічного інсульту в клінічну практику, є відсутність стандартизованих методів оцінки функціональних порушень і поведінкових реакцій у піддослідних тварин, необхідність застосування релевантних експериментальних моделей з огляду на розмаїття патофізіологічних механізмів ІУГМ у людини, відсутність

стандартизованих методів морфологічних досліджень, а також необхідність зіставлення морфологічних даних і неврологічних тестів в динаміці [46, 47].

Таким чином, вивчення ефективності стимульованого ангиогенезу в ділянці ІУГМ в умовах трансплантації ЕНТ і ТКМ в експерименті є актуальним науковим завданням, вирішення якого дозволить створити перспективи застосування даного методу відновного нейрохірургічного лікування пацієнтів із ішемічним інсультом у клінічній практиці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Окремі фрагменти дисертаційної роботи виконані в рамках пошукової науково-дослідної роботи ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України”: “Вивчити вплив ауто трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та факторів росту на перебіг ішемічного ушкодження головного мозку в експерименті”, за № держреєстрації 0115U001989.

Мета дослідження: визначення ефективності стимуляції постінсультного церебрального ангиогенезу за допомогою тканинної трансплантації в експерименті.

Завдання дослідження:

1. Вдосконалити експериментальну модель ішемічного інсульту в щурів.
2. Розробити протокол оцінки неврологічних порушень в експериментальних тварин після моделювання ішемічного інсульту та в умовах ТТ.
3. Провести аналіз кількості судин в ділянці ІУГМ в різні строки після моделювання експериментального ішемічного інсульту та ТТ.
4. Порівняти вплив інтрацеребральної трансплантації алогенної ЕНТ та аутологічної ТКМ на динаміку морфологічних змін в ділянці ІУГМ в різні терміни після моделювання експериментального інсульту та трансплантації.
5. Встановити вплив постішемічного ІЩА на динаміку неврологічних функцій експериментальних тварин при застосуванні різних засобів ТТ.
6. Порівняти ангиогенний потенціал ЕНТ і ТКМ і їх вплив на відновлення неврологічних функцій в експериментальних тварин при трансплантації в ділянку ІУГМ.

Об'єкт дослідження — ангиогенез в ділянці ішемічного ушкодження головного мозку в експерименті.

Предмет дослідження — інтрацеребральна тканинна трансплантація в ділянку ішемічного ушкодження головного мозку в експерименті.

Методи дослідження: 1) експериментальні: моделювання оклюзії середньої мозкової артерії (ОСМА) із виключенням колатералей у щурів — з метою відтворення гострого тромботичного ішемічного інсульту в експерименті; виділення та оцінка кількості живих клітин в трансплантаті — з метою визначення потенційної ефективності тканинної суспензії; інтрацеребральна стереотаксична трансплантація ЕНТ і ТКМ в гострому періоді ішемічного інсульту в експерименті — з метою індукції ангиогенезу безпосередньо в зоні ІУГМ; 2) кількісна оцінка неврологічних порушень в експериментальних тварин в динаміці після моделювання ішемічного інсульту — з метою визначення функціональної ефективності ТТ; 3) морфологічні: світло-оптична мікроскопія, імуногістохімія, морфометрія — з метою оцінки структурних змін у тканинах головного мозку при застосуванні різних засобів ТТ залежно від термінів дослідження; 4) статистичні: встановлення достовірності відмінностей даних у різних експериментальних групах тварин, а також кореляції між кількістю судин у перинфарктній зоні (ПЗ) головного мозку щурів, з одного боку, та ступенем вираженості неврологічних порушень і об'ємом ділянки інфаркту мозку експериментальних тварин, з іншого.

Усі досліди на тваринах 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 та спорту України №249 від 01.03.2012 р.) та згідно з правилами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Наукова новизна одержаних результатів. Модифіковано модель гострого ішемічного інсульту за допомогою ОСМА із виключенням

колатерального кровоплину в щурів, що дає змогу відтворювати патофізіологічні процеси, які спостерігаються при гострому тромботичному інсульті в людини, і оцінювати ефективність постішемичного ПЦА в експерименті.

В роботі розроблено оптимізований протокол оцінки неврологічних порушень в щурів і адаптовано його до експериментальної моделі ішемичного інсульту, що дозволяє проводити кількісну оцінку сенсорних, моторних і рефлекторних функцій піддослідних тварин в динаміці. Встановлено, що динаміка відновлення неврологічних функцій, яка оцінюється на підставі даного протоколу, корелює із динамікою змін розмірів ділянки інфаркту мозку та кількості судин у ПІЗ головного мозку в щурів.

Проведений порівняльний аналіз впливу ТКМ та ЕНТ на репаративний ангиогенез в ділянці ІУГМ в експерименті на щурах. Доведено, що трансплантація ТКМ сприяє швидшому і кращому морфо-функціональному відновленню тканин головного мозку після його ішемичного ушкодження, ніж ЕНТ.

Поглиблені знання про динаміку ангиогенезу в ділянці ІУГМ при інтрацеребральній трансплантації ЕНТ і ТКМ. Достовірно доведений позитивний вплив активації ангиогенезу на відновлення неврологічних функцій в щурів після моделювання експериментального ішемичного інсульту.

Практичне значення отриманих результатів. Удосконалено експериментальну модель тромботичного ішемичного інсульту шляхом постійної ОСМА за допомогою монофіламенту із силіконовим кінчиком та виключенням колатерального кровоплину (патент України на корисну модель №67396 від 27.02.12 р.). Дана модель є релевантною патофізіологічним механізмам ішемичного інсульту в людини і відповідає вимогам для доклінічного дослідження методів лікування ішемичного інсульту, зокрема методів регенеративної медицини, в експерименті.

Результати дисертаційного дослідження впроваджені в роботу лабораторії експериментальної нейрохірургії ДУ “Інститут нейрохірургії ім.

акад. А.П. Ромоданова НАМН України” і відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Експериментально обґрунтовано ефективність способу екзогенної активації постішемичного церебрального ангіогенезу за допомогою аутотрансплантації ТКМ, що є підґрунтям для його подальшого впровадження в клінічну практику.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є власним науковим дослідженням автора. Спільно з науковим керівником д.мед.н., професором, академіком НАМН України В.І. Цимбалюком сформульовані мета та основні завдання дослідження. Автором проаналізовано наукову літературу за темою дисертації, проведено патентно-інформаційний пошук, розроблено дизайн дослідження.

Автором самостійно удосконалено модель експериментального ішемичного інсульту, проведені експериментальні дослідження, реєстрація первинних даних і статистична обробка результатів досліджень, узагальнено одержані результати, сформульовано висновки і практичні рекомендації.

Здобувачем самостійно оформлені та написані всі розділи дисертації.

Автор висловлює щире вдячність за допомогу у виконанні досліджень співробітникам відділу культивування клітин ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України”, кафедри гістології, цитології та ембріології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, відділу цитології Інституту фізіології НАН України і патологоанатомічного відділення Київського міського онкологічного центру.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертації і результати досліджень доповідались та обговорювались на науково-практичній конференції "YouthNanoBiotech-2010. Молодіжний форум з нанобіотехнологій" (Київ, 2010), VI конгресі Південно-Східно-Європейського медичного форуму і XIV з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (Одеса, 2015), IV науковому симпозиумі “Сучасний стан ендovasкулярної нейрохірургії нейрорентгенохірургії в Україні: основні напрямки розвитку” (Харків, 2015),

міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії” (Львів, 2015).

Апробація дисертації відбулася на розширеному засіданні кафедри нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України спільно із вченою радою ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» і кафедрою нейрохірургії Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України 11 грудня 2015 р., протокол №9.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 14 наукових праць, з яких 9 статей (1 одноосібна) — у фахових періодичних виданнях, рекомендованих МОН України, в тому числі 7 — у виданнях, які цитуються у міжнародних наукометричних базах, 1 патент України на корисну модель, 4 тез доповідей на національних і міжнародних конференціях, конгресах, з’їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, 3 розділів власних досліджень, підсумків, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, додатків. Робота викладена на 208 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 37 рисунками. Список використаних літературних джерел містить 280 літературних посилань, з них — 18 — кирилицею, 262 — латиною.

РОЗДІЛ 1

МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ ТА РЕПАРАЦІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ І МЕТОДИ ЙОГО ВІДНОВНОГО ЛІКУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Механізми альтеративних процесів при гострому ішемічному ушкодженні головного мозку

1.1.1. Ішемічний “каскад”

Згідно із сучасними уявленнями, ішемічний інсульт — це епізод неврологічної дисфункції, викликаний фокальним церебральним, спінальним або ретинальним інфарктом [48]. Інфаркт центральної нервової системи (ЦНС) є морфологічним терміном і визначається як загибель клітин внаслідок ішемії, що базується на: 1) патологічних, нейровізуалізаційних або інших об’єктивних доказах фокального ішемічного ушкодження головного, спинного мозку або сітківки ока у визначеному судинному басейні; або 2) клінічних доказах фокального ішемічного ушкодження головного, спинного мозку або сітківки ока, які базуються на симптомах, які утримуються протягом 24 або більше годин або до смерті при виключенні іншої етіології [48]. При цьому ІУГМ є морфологічним наслідком патофізіологічного процесу при ішемічному інсульті, який в багатьох експериментальних дослідженнях описується терміном гострафокальна церебральна ішемія (ГФЦІ) [41, 48]. Остання характеризується послідовністю метаболічних і патобіохімічних порушень внаслідок невідповідності між потребами мозку в кисні та енергетичних субстратах і різким зниженням мозкової перфузії, які об’єднуються терміном «ішемічний каскад»: 1) критичне зниження мозкового кровоплину; 2) іонний дисбаланс і глутаматна "ексайтотоксичність"; 3) внутрішньоклітинне накопичення іонів кальцію; 4) кальцій-опосередкована активація внутрішньоклітинних ферментів (ліпаз, протеаз, нуклеаз); 5) підвищення рівня

синтезу оксиду азоту (NO), синтез вільнорадикальних сполук і розвиток оксидативного стресу; 6) поширення т.зв. кіркової “депресії”; 7) експресія генів “ранньої відповіді”; 8) вторинні альтеративні процеси (запалення, мікросудинні порушення, ушкодження гематоенцефалічного бар’єру (ГЕБ), активація мікроглії, імунні реакції тощо); 9) апоптоз [49–52]. Кінцевим етапом «ішемічного каскаду» є розвиток некрозу тканин мозку, внаслідок якого формується межа між ушкодженою зоною та прилеглими інтактними тканинами [53–55].

Описані процеси характеризуються як послідовними, так і паралельними просторово-часовими взаємовідношеннями, часто є взаємопов’язаними і взаємозалежними. Кожна стадія “ішемічного каскаду” може бути потенційною мішенню для терапевтичного впливу [14, 49].

1.1.2. Патоморфологічні зміни в ділянці інфаркту мозку

Термін “інфаркт ЦНС” спирається на патоморфологічні характеристики ішемічного інсульту. Загальноприйнятими критеріями для ідентифікації гострого незворотнього ішемічного ушкодження (некрозу) нейронів є втрата базофілії цитоплазми, фрагментація клітинного ядра, еозинофілія і втрата структури цитоплазми, каріопікноз [48, 56, 57]. За різними даними, приблизний час між припиненням мозкового кровообігу та вищеописаними гістологічними змінами становить від 6 до 10 год [53–57].

Крім некрозу, другим важливим механізмом клітинної смерті при ІУГМ є апоптоз, морфологічними корелятами якого є утворення внутрішньоядерних мас хроматину і т.зв. “апоптичних тілець” [48, 54]. Вільнорадикальне ушкодження та аутофагоцитоз, які морфологічно характеризуються ущільненням цитоплазми і ядра, вакуолізацією цитоплазми, також є складовими гострого ІУГМ [53].

Клітинні реакції, які запускаються внаслідок незворотнього гострого ІУГМ, характеризуються стереотипною послідовністю, проте без чітко

визначених часових рамок. Загальноприйнятою в літературі є концепція розвитку вогнища ІУГМ, згідно з якою протягом 7 діб відбувається збільшення і “доформовування” зони інфаркту мозку внаслідок прогресування вторинних альтеративних реакцій [53, 54].

Деякі автори на матеріалі експериментальних досліджень із ОСМА виділяють два періоди мікроскопічних і ультраструктурних змін: 1) гострі (до 6 год.): зморщування, деформація мембрани та набряк клітин; 2) відстрочені — (після 12 год.) — каріопікноз, еозинофілія цитоплазми і каріолізис [53–55]. Загалом у перші 48 год. формується ділянка розм’якшення та набряку паренхіми мозку [48, 53]. Останній досягає максимальної величини на 4–5 добу. В некротизованій тканині спостерігаються зруйновані клітини на різних стадіях цитолізу (“клітини-тіні”) [53–57]. У цей період також спостерігається екстравазація і міграція поліморфонуклеарних нейтрофілів в ділянку інфаркту мозку. Ендотелій судин набряклий, відзначається вакуолізація білої речовини. Морфологічно у щурів ці зміни проявляються каріопікнозом, зморщуванням і еозинофілією цитоплазми нейронів, набуттям ними полігональної форми. Нейропіль забарвлюється блідіше, в ньому спостерігаються ділянки периваскулярного набряку [53–55]. Макрофаги, представлені трансформованими моноцитами або резидентними мікрогліоцитами ЦНС, з’являються у вогнищі інфаркту мозку на 5–6 добу і можуть персистувати протягом 4–5 тижнів [53–57]. Неоваскуляризація визначається на 5–10 добу після розвитку нейронального некрозу [53, 58, 59].

При великих за розмірами інфарктах (у строки 6-12 міс. після інсульту) у 90% випадків внаслідок резорбції тканинного детриту формуються кісти, оболонка яких представлена реактивними астроцитами, які характеризуються позитивною реакцією на гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) [48, 57]. Останні разом із мезенхімальними клітинами протягом декількох тижнів беруть участь у формуванні гліо-мезодермального рубця, яке триває від 2–3 тижнів до 2 міс. [54, 60].

Гліо-мезодермальний рубець складається із щільно переплечених відростків астроцитів, об'єднаних міжклітинними контактами й оточених позаклітинним матриксом (ПКМ), який сформований переважно з синтезованих астроглією протеогліканів [61].

На підставі патоморфологічного дослідження 137 випадків інфаркту мозку Н. Мена зі співавторами запропонували таку гістологічну класифікацію періодів розвитку ішемічного інсульту: 1) фаза гострого нейронального ушкодження (1–2 доби); 2) фаза організації із періодами а) гострого запалення (3–37 діб) і б) хронічного запалення (10 днів — 53 роки); 3) фаза резорбції (26 днів — 23 роки) [56].

В процесі розвитку ІУГМ виділяють три окремі зони ураження: 1) інфарктне “ядро” — ділянка критичної перфузії та незворотного ушкодження нейронів; 2) ішемічна «напівтінь» («пенумбра») — ділянка вторинного ушкодження з субкритичною, або «мінімальною», перфузією і високим ризиком розвитку інфаркту; 3) колатеральна ділянка помірної гіперперфузії мозкової тканини з мінімальною вірогідністю розвитку інфаркту [62–65].

Саме за рахунок зони ішемічної “напівтіні” збільшується з часом об'єм ділянки мозкового інфаркту. В підгострій і хронічній стадіях збережені клітинні елементи “напівтіні” можуть виступати активатором ендогенних механізмів пластичності та ремоделювання протягом днів і тижнів з початку інсульту [54, 62].

1.1.3. Роль нейросудинної «одиниці» в ішемічному ушкодженні головного мозку

Для пояснення механізмів міжклітинної взаємодії при ІУГМ група експертів Національного інституту здоров'я США запропонувала концепцію “нейросудинної одиниці” [66–69]. Згідно з нею, в основі функціонування мозку за фізіологічних і патологічних умов лежить інтегрована взаємодія мережі нейронів, глії та ендотелію мозкових судин. Нейронально-судинна комунікація

контролює регіональний мозковий кровоплин і забезпечується за допомогою обміну гуморальних факторів [15, 52, 68].

Окремим прикладом ендотеліально-астроцитарно-матриксної взаємодії у межах нейросудинної одиниці при ІУГМ є порушення функції ГЕБ [70–72]. Підвищення проникності ГЕБ спостерігається протягом перших годин після настання ішемії і може утримуватися до 7 діб [70, 71]. Руйнування міжклітинного матриксу і базальної мембрани за допомогою активованих протеаз, зокрема матриксних металопротеїназ (ММП), призводить до втрати матрикс-клітинної і міжклітинної взаємодії, які підтримують функцію нейронів, та прогресування вазогенного набряку мозку. Встановлено збільшення рівнів ММП як в експериментальних тварин із ГФЦІ, так і в пацієнтів після інсульту [70]. ММП викликають деградацію білків щільних контактів ГЕБ у перші години після інсульту та вторинне “відкриття” ГЕБ при запуску реакцій запалення протягом подальших 24–72 год [52, 78]. На пізніх термінах після інсульту ММП відіграють важливу роль у репаративних процесах, зокрема, ангиогенезі, забезпечуючи ремоделювання ПКМ і розщеплення деяких сигнальних молекул, зокрема, судинного ендотеліального фактора росту (СЕФР) [15, 73]. Як і ММП, більшість ключових регуляторних молекул відіграють дуалістичну роль у патогенезі ІУГМ, беручи участь в альтеративних процесах на ранніх стадіях інсульту та нейросудинній репарації у віддаленому періоді [15, 72, 74, 75].

Астроцити як один із основних елементів нейросудинної “одиниці” відіграють важливу роль у розвитку ІУГМ. Астроцити здатні до проліферації і диференціації (астрогліоз) з експресією ГФКБ, що починається протягом 4 год. в зоні ішемічного “ядра” і триває більше 28 днів у ПІЗ після індукції ГФЦІ в експерименті [15, 61, 75]. Інші дані свідчать про активацію астроцитів через 24 год. після ГФЦІ із піком на 4 добу [50, 67]. Існують докази, що астроцити можуть виконувати антиген-презентувальну функцію за рахунок експресії молекул головного комплексу гістосумісності (ГКС), мати фагоцитарні властивості і продукувати цитокіни, наприклад, інтерлейкін-6 (ІЛ-6), фактор

некрозу пухлин α (ФНПа), ІЛ-1 β , інтерферон- γ (ІФН γ) у відповідь на різноманітні стимули [15, 50, 61]. Астроцити також можуть синтезувати ММП-2, беручи таким чином участь у тканинному ремоделюванні при ІУГМ [61, 67].

Ще один компонент нейросудинної “одиниці”, перицити, можуть активуватися, мігрувати і набувати морфологічних ознак клітин запалення і навіть секретувати прозапальні цитокіни у відповідь на ішемію [15, 67].

Серед гуморальних чинників, які регулюють взаємодію між клітинами нейросудинної “одиниці”, слід виділити позаклітинні везикули — екзосоми, які містять ліпіди, білки і нуклеїнові кислоти [15, 74]. Так, екзосоми ендотеліоцитів можуть містити мікроРНК і ММП, які беруть участь у постішемичному ангіогенезі [15, 76].

Таким чином, координована міжклітинна сигналізація є необхідною передумовою підтримання локального гомеостазу в нейросудинній одиниці.

1.1.4. Роль мікроциркуляторного русла

Мікросудини мозку (судини діаметром менше 100 мкм, включаючи капіляри і їх аферентні і еферентні сполучення) є унікальними за своєю ультраструктурою через тісний зв'язок ендотеліоцитів і клітин крові з нейронами через посередництво астроцитів у межах нейросудинної “одиниці” [69]. Під час пренатального розвитку ЦНС положення мікросудин по відношенню до нейронів формується вздовж ліній ПКМ [67, 69]. Таким чином, відстань між мікросудиною і нейроном є регулярною і добре впорядкованою. При цьому точки розгалуження капілярів, як правило, містяться на відстані близько 30 мкм одна від одної [77]. Перетин капілярів сприяє спрямуванню кровоплину в бік прохідних мікросудин при оклюзії деяких із них. Описана ієрархічна організація мікроциркуляторного русла (МЦР) кори мозку щурів у вигляді низхідних гексагональних мережив мікросудин у поєднанні з вертикальними нейронними модулями [77]. У смугастому тілі організація МЦР є складнішою із численними біфуркаціями капілярів. У білій речовині МЦР

орієнтоване вздовж пучків аксонів. Ці особливості організації МЦР пояснюють локальну різницю мозкового кровоплину у різних ділянках головного мозку. Цілісність мікросудин залежить від відстані відростків астроцитів до ендотелію, оскільки обидва беруть участь у формуванні базальної пластинки і ГЕБ [15, 59].

IУГМ є пусковим чинником змін МЦР, які відповідають концепції “тріади Вірхова”: 1) ушкодження ендотелію із подальшою адгезією і трансміграцією лейкоцитів; 2) активація згортання крові із формуванням фібринових згустків і тромботичною оклюзією мікросудин; 3) зниження локального мозкового кровоплину [78]. Незважаючи на залишковий мозковий кровоплин у зоні “ядра” інфаркту після оклюзії магістральної артерії, протягом кількох хвилин в МЦР розвивається феномен локального “невідновлення кровоплину” [58, 78, 79]. Він є результатом адгезії і накопичення лейкоцитів в просвіті судин, а також взаємодії тканинного фактора і циркулюючого фактора VII з подальшим формуванням мікротромбів і обструкцією мікросудин. Це призводить до зниження експресії матриксних рецепторів (інтегринів) ендотеліоцитами і астроцитами, активації протеаз (ММП-2), зниження реактивності ендотеліоцитів. Розширення прекапілярних артеріол супроводжується експресією SEФР і інтегрини $\alpha_v\beta_3$, які беруть участь в ангиогенезі [20, 21, 59].

1.1.5. Постішемичне запалення

Постішемичне запалення є складним патофізіологічним механізмом, який охоплює низку сигнальних шляхів, зокрема “дзвоноподібних рецепторів” (TLR — toll-like receptor), мітоген-активованих протеїнкіназ, ядерного фактора-каппа В (NF- κ B — nuclear factor-каппа В), включаючи активацію певних генів, медіаторів і цитокінів, а також ефекторних клітин, які, в свою чергу, синергістично та реципрокно взаємодіючи, призводять до збільшення розмірів ділянки інфаркту мозку та прогресування вторинних нейродегенеративних змін

в ПІЗ [80–83]. Окрім генної експресії, важливим регулятором ішемічного “каскаду” є епігенетична модифікація ДНК шляхом метилювання або ацетилювання гістонів [84].

Ішемічний інсульт викликає запуск коагуляційного каскаду, який призводить до збільшення механічної деформації судинної стінки і, як наслідок, деструкції ендотеліальних клітин [75, 78, 82]. Експресія молекул клітинної адгезії (МКА) ендотеліоцитами, сприяє агрегації тромбоцитів і адгезії лейкоцитів, які руйнують ГЕБ і створюють протромботичний стан в МЦР, що поглиблює гіперперфузію і стан “невідновлення” (англ. “no reflow”) кровоплину [70, 72, 78].

Через ушкоджений ГЕБ в ділянку інфаркту мозку мігрують нейтрофіли, які виділяють протеолітичні ферменти, цитокіни та вільно-кисневі радикали, а також можуть спричиняти оклюзію мікросудин [85]. Лімфоцити, які з’являються в зоні ішемічного ушкодження протягом 24 год., також беруть участь у розвитку тканинного ушкодження, переважно шляхом модуляції адгезії лейкоцитів і тромбоцитів на ендотелії мозкових венул [75, 85]. Моноцити мігрують у ділянку ішемічного некрозу головного мозку через 3–5 діб, поглинають продукти деградації нейронів і мієліну і перетворюються на ліпід-навантажені макрофаги на 3–4 тижні після інсульту [85].

Секретовані вищеописаними клітинами в ділянці ІУГМ медіатори запалення беруть безпосередню участь у нейросудинному ушкодженні. Зокрема, ІЛ-1 сприяє розвитку гіпертермії, стимулює синтез арахідонової кислоти і NO, потенціює глутаматну ексайтотоксичність, активацію і адгезію нейтрофілів [74, 75, 80]. ФНПа стимулює експресію МКА на поверхні ендотеліоцитів, атракцію і трансміграцію нейтрофілів, індукує продукцію гострофазних білків і інших прозапальних медіаторів, сприяє ушкодженню ГЕБ [72–74, 80].

Внаслідок вищеописаних процесів ділянка ІУГМ інфільтрується нейтрофілами і клітинами моноцитарно-макрофагального ряду, завершується формування чітко окресленої зони інфаркту головного мозку (ЗІГМ).

1.1.6. Імунологічні механізми гострого ішемічного ушкодження головного мозку

Важливу роль у розвитку запального при ішемічному інсульті відіграють також імунні реакції.

Молекули, які вивільняються із цитозолу ушкоджених або загиблих клітин — т.зв. “молекулярні патерни, асоційовані з небезпекою”, є активаторами мікроглії та периферичних імунних клітин [74, 75, 86]. Активована мікроглія набуває здатності до міграції, фагоцитозу і антиген-презентації молекул ГКС II класу [74, 81, 86]. Постішемічна проліферація мікроглії починається протягом декількох хвилин після моделювання експериментального ішемічного інсульту, досягає піку протягом 48–72 год. і може тривати до кількох тижнів [86]. Активовані клітини мікроглії (1 типу) продукують цитокіни (ФНП α , ІЛ-1 β), хемокіни, фактори росту (ФР), реактивні форми кисню та азоту [15, 86]. Разом з тим, т.зв. “альтернативно” активовані мікрогліоцити 2 типу беруть участь у постішемічній репарації, секретуючи протизапальні цитокіни і нейротрофічні чинники (нейротрофічні фактори гліального і мозкового походження — НФГП і НФМП, відповідно, основний фактор росту фібробластів — оФРФ, інсуліноподібний фактор росту-1 — ІФР-1, трансформуючий фактор росту β — ТФР β , СЕФР) [81, 86].

Джерелом периферичних імунних клітин може виступати селезінка, розміри якої, за даними деяких авторів, зменшуються після інсульту [75, 86]. Кількість мічених спленоцитів знижується в селезінці і зростає в периферичній крові протягом 48 год. після транзиторної ОСМА [86].

Існують докази на користь участі лімфоцитів у розвитку ІУГМ [15, 75, 81, 86]. Наприклад, Т-лімфоцити, сенсibiliзовані до основного білка мієліну і інших білків із антигенним властивостями, можуть виступати медіаторами імунної відповіді проти них після інсульту [86]. Накопичення антиген-презентувальних клітин збігається в часі з лімфоцитарною інфільтрацією і пов'язана з експресією молекул ГКС II класу і ко-стимуляторної молекули

CD80 [75, 81]. Припускають, що НК-клітини або $\gamma\delta$ T-клітини, які не потребують антиген-презентації, спричиняють цитотоксичні ефекти лімфоцитів [86].

Важливу роль у розвитку ІУГМ відіграє ІФН γ , секретований Т-ліфоцитами, НК- і $\gamma\delta$ T-клітинами під впливом ІЛ-12 і ІФН α . ІФН γ є ключовим індуктором системної запальної відповіді, запускає продукцію ІЛ-12 і реактивних форм кисню макрофагами, хемотаксис імунних клітин у вогнище ІУГМ, експресію молекул ГКС і «переключення» ізотипів В-лімфоцитів [74, 80, 86].

1.2. Сучасні уявлення про репаративні процеси у тканинах головного мозку при його ішемічному ушкодженні

1.2.1. Тканинне ремоделювання

Наслідком завершення реакцій запалення в ділянці ІУГМ є тканинна реорганізація, спрямована на відмежування зони ішемії від інтактних тканин і відновлення нормальної цито-та ангіоархітектоніки головного мозку [61, 73, 84]. В ній беруть участь як клітини запалення (мікроглія, макрофаги), так і нейросудинної “ніші” (астроцити, ендотеліоцити). Даний процес координується низкою сигнальних шляхів і охоплює такі реакції, як очищення зони ІУГМ від клітинного детриту, перебудова ПКМ, активація протизапального медіаторного каскаду (ІЛ-10, ТФР β , простагландин E2, галектин-1) і продукція трофічних факторів (ІФР-1, СЕФР, оФРФ) [47, 54]. У перебудові ПКМ беруть участь ММП, матриксні молекули та інтегрини [61, 68–70].

Структурне відновлення ділянки ІУГМ не обмежується тканинним ремоделюванням, а включає також процеси синаптичної пластичності, ремієлінізації провідних шляхів і нейросудинної регенерації (ендогенний нейрогенез і ангіогенез) [76].

Через 3–5 днів після ішемічного інсульту в ділянку ІУГМ мігрують попередники олігодендроцитів, які експресують протеоглікан NG2 і рецептори до фактора росту тромбоцитарного походження (ФРТП) і оФРФ, які секретуються астроцитами і беруть участь у репарації білої речовини мозку [15, 87, 88].

Тканинне ремоделювання в ділянці ІУГМ завершується формуванням гліо-мезодермального рубця. Розростання відростків астроцитів створює механічний і фізіологічний бар'єр, який оточує «ядро» зони інфаркту, сприяючи перебудові кровоплину у ПЗ і спрямовуючи нейронний спраутинг і синаптогенез для формування нових нейронних мереж [61, 69]. Астроцити беруть участь у відновленні ГЕБ, утилізації ексайтотоксичних нейротрансмітерів і продукції нейротрофічних факторів, які забезпечують нейрогенез [15, 61].

1.2.2. Ендогенний нейрогенез

На сьогодні доведений факт існування нейрогенних стовбурових клітин (НСК) і нейрональних прогеніторів у субвентрикулярній зоні (СВЗ), субгранулярному шарі зубчастої закрутки гіпокампа (СГШЗЗ) і нюховій цибулині ссавців і людини [89–91]. НСК здатні до самопідтримання, самооновлення, диференціювання в нейрони, олігодендроцити та астроцити [89–91]. За фізіологічних умов, НСК забезпечують оновлення нервових клітин зубчастої закрутки гіпокампа та нюхової цибулини [89, 90]. Нейросудинна “одиниця” є нішею для НСК і нейрональних прогеніторних клітин (НПК) у головному мозку [15, 67, 69]. Новоутворені незрілі нейрони тісно пов'язані із ремодельованими судинами, вздовж яких відбувається міграція нейробластів у ПЗ [15, 69, 76]. Активовані ендотеліальні клітини секретують фактор, який походить зі стромальних клітин 1 α (ФСК-1 α), який слугує хемоатрактантом для нейробластів, які, в свою чергу, експресують рецептор CXCR4 до ФСК-1 α [76].

ІУГМ ймовірно, за участю НФМП, ФНПа, ІЛ-1 і ТФРβ, запускає проліферацію мітотично активних клітин нейрогенних зон головного мозку, які в подальшому можуть мігрувати в ПЗ, де проявляють фенотип зрілих нейронів і гліальних клітин, експресуючи відповідні маркери та проявляючи відповідні електрофізіологічні властивості [89–94]. Це свідчить про потенційну можливість ендогенного заміщення загиблих популяцій нейронів і гліальних клітин, хоча, на думку багатьох авторів, цей процес відіграє обмежену роль у функціональному відновленні після інсульту [91, 94].

1.2.3. Ендогенний ангіогенез і судинне ремоделювання

Ріст і розвиток судин відбувається шляхом трьох різних процесів: васкулогенезу, ангіогенезу та артеріогенезу [95]. Васкулогенез — це первинний процес утворення судинного русла під час ембріонального розвитку, який характеризується диференціацією плюрипотентних ендотеліальних попередників (ангіобластів) в ендотеліоцити. Ангіогенез — процес новоутворення мікросудин (переважно, капілярів) всередині функціонуючої судинної системи, зумовлений локальною гіпоксією. Артеріогенез — процес розширення та дозрівання передіснуючих колатералей, який виникає за рахунок підвищення сил напруги зсуву, індукованих стенозом або оклюзією магістральної артерії [20, 95].

Під час ембріогенезу ЦНС мезодермальні ангіобласти формують первинне судинне сплетення навколо нервової трубки шляхом васкулогенезу, а подальше галуження новоутворених мікросудин відбувається за допомогою ангіогенезу [20, 95]. Ангіогенез є багатостадійним процесом, який можна умовно поділити на три стадії: 1) підготовка матрикса, проліферація та міграція ендотеліальних клітин, утворення судинних тяжів, 2) стабілізація ендотелію та утворення просвіту судин; 3) утворення функціонуючих судинних мереж і ремоделювання кінцевого судинного комплексу [20, 95].

Фокальний церебральний ангиогенез регулюється за допомогою ангиогенних ФР, медіаторів і локального мікрооточення [20, 95]. Проангіогенними ФР є СЕФР-А, ангиопоетини (Анг), оФРФ, плацентарний фактор росту (ПФР), ІЛ, анти-ангіогенними — ангиостатин, ендостатин, тромбоспондини-1 і -2 [20]. ММП руйнують ПКМ, що може як індукувати, так і гальмувати ангиогенез [95]. Баланс про- і антиангіогенних ФР забезпечує локальний гомеостаз в межах нейросудинної “одиниці”.

Церебральний ангиогенез може спостерігатися у тварин і людини за патологічних умов [20,21,58,59,95,96]. Утворення нових судин відіграє важливу роль у відновленні мозкового кровообігу, а разом з ним — у постачанні кисню і нутрієнтів у ділянці ішемічної «напівтіні» [97, 98]. Припускають, що постішемічний ангиогенез активує процеси нейропластичності і робить внесок у функціональне відновлення після інсульту [98, 99].

Сукупні дані експериментальних досліджень свідчать, що неоваскуляризація після ішемічного інсульту є результатом як артеріо- і ангиогенезу, так і, дещо меншою мірою, васкулогенезу [20,21,58,59,95,96]. Існують переконливі докази, що на ранніх стадіях об'єм крові в головному мозку зростає за рахунок покращення колатерального кровообігу (артеріогенез), тоді як на пізніх стадіях цей процес забезпечується ангио- і васкулогенезом [20,21,95,96].

Залучення колатерального кровообігу може відігравати критичну роль у підтриманні регіонального мозкового кровообігу за умов зниження церебральної перфузії і порушення ауторегуляції, коли нові функціональні судини ще не встигають утворитися [20]. Стан колатералей є незалежним предиктором функціонального наслідку в пацієнтів з ішемічним інсультом і відповіді на терапевтичну або хірургічну реканалізацію судини [100]. Особливо важливими для забезпечення ретроградного колатерального кровообігу в умовах оклюзії магістральної артерії є дрібні міжартеріолярні лептоменінгеальні анастомози [20, 95]. Артеріогенез є механосенситивним процесом, який не залежить від гіпоксії [20]. Поява напруги зсуву і підвищення

концентричної напруги судинної стінки викликає активацію ендотеліоцитів за рахунок механочутливих кальцієвих каналів. Кальцієва сигналізація стимулює синтез NO із подальшою вазодилатацією. Ріст колатералей супроводжується інфільтрацією моноцитів/макрофагів у просвіт судин і периваскулярні простори. Ці клітини секретують ангіогенні ФР: моноцитарний хемоатрактантний білок-1, SEФР, оФРФ, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор (ГМ-КСФ), фактор росту гепатоцитів (ФРГ), ФНП α , ТФР β і ФРТП, які шляхом індукції ММП і їх тканинного інгібітора сприяють ремоделюванню ПКМ і стимулюють проліферацію ендотеліоцитів і гладеньком'язових клітин (ГМК) [20, 95]. У пізній фазі артеріогенезу ГМК змінюють свій фенотип зі скоротливого на синтетично-проліферативний, забезпечуючи подальший ріст і збільшення колатералей [20, 76].

Ангіогенез є багатостадійним регульованим процесом. На першому етапі у відповідь на гіпоксію фактор, індукований гіпоксією-1 (ФІГ-1) стимулює синтез NO, який викликає вазодилатацію, і підвищення експресії SEФР [100]. Останній сприяє підвищенню проникності судин і екстравазації білків плазми крові, які створюють субстрат для міграції ендотеліоцитів та подальшого галуження судин [20, 97]. Наступним етапом ГМК відділяються від дезорганізованого ПКМ, який оточує зрілу судину. Анг-2 може відігравати певну роль у відокремленні перицитів від ендотеліальних клітин, тоді як ММП руйнують молекули ПКМ, послаблюючи тим самим цілісність судини [21, 96]. Після визначення напрямку галуження проліферуючі ендотеліоцити мігрують до віддалених локусів. Даний процес регулює синхронізована активація низки сигнальних молекул, зокрема SEФР, і рецепторів до SEФР 1 і 2 типу (PSEФР-1 і PSEФР-2, відповідно), ПФР. Після формування судинної мережі Анг-1 активує Tie2-рецептори, остаточно стабілізуючи судинну мережу [20,21,58,59,95,96]. В мишей і щурів проліферація ендотеліоцитів на межі інфарктного ядра спостерігається вже через 12–24 год. після ОСМА [79, 101, 102]. Це приводить до підвищення щільності мікросудин у ПІЗ на 3 добу після ОСМА. В той же час у людини ангіогенез у зоні ішемічної «напівтіні»

спостерігається на 3–4 добу після інсульту [101, 102]. Утворені із судинних зачатків нові мікросудини формують постійні зв'язки з інтактними мікросудинами протягом 1 тижня після ішемії [76, 79]. Даний процес регулюється шляхом апоптозу ендотеліальних прогеніторних клітин (ЕПК) [103].

Загалом неоваскуляризація може спостерігатися у терміні 21–28 днів і тривати впродовж декількох тижнів після моделювання експериментального ішемічного інсульту [79, 102, 104, 105]. За матеріалами аутопсій, у пацієнтів з інсультом, померлих від інших причин, в головному мозку була виявлена підвищена щільність судин у ділянці ішемічної “напівтіні”, яка корелювала з тривалішим часом виживання пацієнтів із ішемічним інсультом [99, 101].

Постішемічний ангиогенез регулюється за допомогою низки молекулярних чинників і сигналів, які диференційовано експресуються на різних етапах ангиогенезу. Серед них важливу роль відіграють SEФР і його рецептори (PSEФР-1 і PSEФР-2), система Анг 1-4 і їх рецепторів (Tie-1/-2), ПФР, ФРТП-В і його рецептора (PФРТП-β), нетрини, нейропіліні-1 і -2, оФРФ і ТФРβ, еритропоетин (ЕПО) і синтаза NO [106–110]. Аналіз експресії генів, пов'язаних з ангиогенезом, показав, що 42, 29 і 13 генів були активовані в мозку мишей відповідно через 1 год, на 1 та 21 добу після ГФЦІ [104]. Експресія SEФР і PSEФР2 у гризунів починається протягом перших 3 годин і утримується до 3 доби після експериментального інсульту [104]. У людини, за результатами аутопсій, спостерігається активація SEФР у нейронах, ендотеліоцитах і астроцитах. У пацієнтів рівень SEФР у крові підвищується на 7 добу після інсульту і утримується на даному рівні до 14 доби порівняно з контрольною групою здорових індивідів [111]. Експресія Анг-1 починається на 1 добу і досягає піку на 7 добу після ГФЦІ [109]. В той же час, експресія тромбоспондинів, які відіграють роль у судинній стабілізації, швидко зростає через 1 год. після ішемії, зменшується протягом 24 год. і знову підвищується через 3 доби, що свідчить про “переключення” їхньої ролі від ангиопротекції до судинного ремоделювання [109].

СЕФР відіграє найважливішу роль у васкулогенезі та ангіогенезі як в ембріональному, так і постнатальному періоді, викликаючи підвищення проникності судин і активацію клітин моноцитарно-макрофагального ряду, які секретують різноманітні ангіогенні чинники [106–110]. Поряд із цим, взаємодія СЕФР з його рецептором на поверхні ендотеліоцитів (РСЕФР-2) генерує мітотичні сигнали та фактори виживання клітин [107–110]. За нормальних умов, експресія СЕФР у мозку підтримується на мінімальному рівні. Однак за патологічних умов (ішемія, онкогенез), СЕФР бере участь у порушенні цілісності ГЕБ і зумовлює підвищення проникності ендотелію та розгалуження судин [107–110]. СЕФР є основним медіатором судинної відповіді при інсульті і має двоспрямований вплив: у гострій фазі інсульту СЕФР підвищує проникність ГЕБ, а у віддалений період має ангіогенну та нейрогенну активність [107, 112].

Взаємодія СЕФР та РСЕФР2 ініціює ангіогенез, а Анг-1 і -2 і їх рецептор Tie2 беруть участь у дозріванні, стабілізації та ремоделюванні судин [109]. В тканинах мозку гризунів із ГФЦІ підвищена експресія СЕФР і РСЕФР2, ангіопоетинів і Tie2 триває щонайменше 28 днів [109, 110]. ММП реципрокно взаємодіють із СЕФР, розщеплюючи про-форми матрикс-зв'язаного СЕФР на біологічно активні вільні розчинні форми [110].

Важливу роль у модуляції ангіогенезу у мишей і людини відіграє ТФРβ, який може стимулювати ріст ендотеліальних клітин шляхом активації рецептора ALK1 або інгібувати ангіогенез за допомогою впливу на рецептор ALK5 [106]. Існує припущення, що ТФРβ відіграє роль молекулярного «перемикача», «вмикаючи» одні та «вимикаючи» інші сигнальні чинники [108]. У досліджах на тваринах та при дослідженні аутопсійного матеріалу померлих від ішемічного інсульту було продемонстровано підвищену експресію ТФРβ у головному мозку, яка була тісно пов'язана з ангіогенезом [111].

Ендотеліальна проліферативна активність також була показана у досліджах *in vitro* із використанням оФРФ і ФРТП-В [106]. Помірна імунореактивність до оФРФ була виявлена в ендотеліоцитах проліферуючих капілярів через 2 дні

після моделювання ОСМА у щурів [106, 108]. ФРТП-В є одним із необхідних чинників судинного дозрівання і має пряму дію на міграцію та диференціацію ендотеліальних клітин. Ішемія запускає експресію ланцюгів ФРТП-В у нейронах, макрофагах і мозку щурів, в той час як вміст мРНК ФРТП-В і даного білка підвищується у тканинах мозку пацієнтів, померлих від ішемічного інсульту [111]. Було показано, що ФРТП-В стимулює формування неокапілярів головного мозку у мишей, а також покращує мікроциркуляцію [108].

Важливу роль у підтримці судинного гомеостазу та реакціях постінсультної репарації відіграють ЕПК [113]. У клінічних дослідженнях показано кореляцію між об'ємом і ступенем тяжкості інфаркту та кількістю циркулюючих CD34+ і CD133+ - клітин (маркери ЕПК) [113–115]. Показана здатність циркулюючих ЕПК і ЕПК кісткового мозку мігрувати у ділянки неоваскуляризації та диференціюватися в ендотеліоцити *in situ* [103, 116]. Крім васкулогенезу, ЕПК також здатні секретувати оФРФ і СЕФР, опосередковано стимулюючи ангиогенез [117]. Рівень циркулюючих ЕПК може виступати незалежним прогностичним чинником динаміки неврологічного статусу пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт [113].

Незважаючи на достатню кількість доказів на користь активації ендогенного постінсультного ангиогенезу, залишається остаточно нез'ясованим функціональне значення цих новоутворених судин. Згідно з т.зв. «очисною» гіпотезою, постінсультний ангиогенез у головному мозку є транзиторним процесом, який не бере участі у нейрональній регенерації, а новоутворені судини сприяють лише посиленню макрофагальної інфільтрації, очищенню та видаленню клітинного детриту із зони тканинного некрозу [118]. Тим не менше, сумарні дані свідчать на користь важливої ролі ангиогенезу в постінсультній нейросудинній регенерації [25, 98, 99].

1.3. Експериментальне моделювання ішемічного інсульту в тварин

Моделювання ішемічного інсульту в тварин є необхідною умовою для експериментальної апробації методів відновного лікування. На сьогодні запропонована велика кількість моделей експериментального ішемічного інсульту в лабораторних тварин, з яких рутинно використовується близько 10 [41–44,119]. До моделей ішемічного інсульту дослідники висувають такі вимоги: 1) відповідність альтернативних процесів і патофізіологічних механізмів, зумовлених ГФЦІ, до таких, які спостерігаються в людини; 2) відтворюваність розмірів вогнища ІУГМ; 3) відносно нескладне і мінімально інвазивне технічне виконання; 4) модель повинна бути застосована більш, ніж до одного виду тварин; 5) помірність і пропорційність витрат і зусиль на моделювання [44].

Гризун є вдалим об'єктом для моделювання інсульту завдяки низці причин: 1) анатомічні структури та фізіологічні процеси є добре вивченими та нагадують такі у людини; 2) подібність судинної системи головного мозку до людської; 3) простота розведення і утримання в лабораторних умовах; 4) відносна простота маніпуляцій, в т.ч. хірургічних; 5) невелика вартість і технічна доступність процедур забору, зберігання і дослідження тканин; 6) можливість генетичних маніпуляцій, особливо у мишей; 7) етична прийнятність дослідів, на відміну від великих ссавців [41, 44].

Оскільки ішемічний інсульт часто викликається оклюзією середньої мозкової артерії (СМА) або однієї з її гілок, найкраще для його експериментального моделювання підходять моделі ізольованої ОСМА або її гілок [43]. За тривалістю та вираженістю ішемії, виділяють постійну та тимчасову оклюзію. За механізмом виділяють моделі ендovasкулярної та прямої хірургічної оклюзії, тромбоемболічні моделі, моделі з використанням фізичного (фотохімічний тромбоз) і фармакологічного (ендотелін-індукованого) методів виключення судини з кровоплину [41–44, 119].

Тромбоемболічна модель з використанням аутологічних згустків крові краще відтворює тромбоемболічний інсульт у людини та підходить для

доклінічного тестування тромболітиків. Спонтанна реканалізація та висока варіабельність розмірів ЗІГМ роблять її менш привабливою з точки зору статистичної достовірності одержаних результатів при дослідженні дії нейропротекторних агентів і НТ [41]. В якості емболів використовуються різні хімічні композиції, включаючи мікрочастинки, за допомогою яких моделюють мультифокальне ІУГМ [41, 44].

Фототромботична модель передбачає системну ін'єкцію фотоактивної речовини (найчастіше — Бенгальського рожевого) з подальшою іррадіацією СМА і її гілок на поверхні мозку або через інтактний череп джерелом світла з певною довжиною хвилі [41, 119]. Це викликає фокальну деструкцію ендотелію, активацію та агрегацію тромбоцитів як піальних, так і внутрішньомозкових судин у межах опроміненої ділянки. Ендотелінова модель передбачає аплікацію ендотеліну-1 безпосередньо на СМА або в прилеглі до СМА ділянки кори мозку. Важливими перевагами даних моделей є можливість відтворення інфаркту мозку в будь-якій зоні кори та контролю розмірів і локалізації вогнища ураження [41,42,119]. Проте незначна подібність до патофізіологічних процесів при інсульті у людини, а також недостатній контроль тривалості й вираженості ішемії (ендотелінова модель) роблять їх менш популярними порівняно з моделями монофіламентної та прямої хірургічної ОСМА.

В 1986 р. А. Тамура і співавторами була запропонована модель перманентної ОСМА у щурів шляхом підскроневої краніотомії та коагуляції артерії на поверхні кори мозку, що призводило до розвитку вогнищ інфаркту в корі мозку та смугастому тілі [120]. У подальшому були розроблені методики тимчасової ОСМА з використанням мікрокліпс і лігатур, тандемної оклюзії дистального відділу СМА і обох загальних сонних артерій (ЗСА) (трюхсудинна модель) у різних варіантах (постійна або тимчасова оклюзія) [43]. Ці моделі характеризуються можливістю контролю місця оклюзії СМА (проксимально або дистально) й розмірів зони ушкодження, тривалим виживанням тварин при порівняно невеликих розмірах вогнища ішемії. Істотними недоліками даної

групи моделей є інвазивність і пов'язана з нею залежність від технічних навичок хірурга [43, 44].

На сьогодні найчастіше використовуваною моделлю ішемічного інсульту є ендovasкулярна ОСМА, яка передбачає введення монофіламентної нитки у просвіт внутрішньої сонної артерії (ВСА) до місця відходження передньої мозкової артерії, блокуючи при цьому кровоплин у СМА [43, 119]. Дана модель характеризується розвитком відтворюваних вогнищ інфаркту в корі і смугастому тілі. Важливою її особливістю є відносна простота маніпуляцій і контрольоване відтворення як постійної, так і тимчасової ішемії [44].

З моменту першого опису монофіламентної внутрішньосудинної ОСМА J. Koizumi і співавторами, було запропоновано багато модифікацій цієї методики [121, 122]. Відтворюваність зони ІУГМ залежить від багатьох чинників: діаметра, покриття (силіконове чи полі-L-лізинове), довжини введення нитки, додаткової оклюзії екстракраніальних артерій, коливань фізіологічних параметрів тварини [123–125]. Використання оклюдерів для СМА включає в себе ризик розриву судини з подальшим субарахноїдальним крововиливом, і гіпертермії, пов'язаної з блокуванням гіпоталамічної артерії [41, 43]. Недостатня оклюзія також є недоліком даної моделі. Використання комерційно виготовлених ниток із силіконовим покриттям і контроль кровоплину в басейні СМА за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії дозволяють звести до мінімуму кількість ускладнень і домогтися задовільної відтворюваності вогнищ ІУГМ [44, 124, 125].

1.4. Методи лікування пацієнтів із ішемічним інсультом у гострому періоді

На підставі накопичених знань про патофізіологічні механізми розвитку ІУГМ, численних експериментальних і клінічних досліджень, можна виділити такі основні напрями лікування пацієнтів із ішемічним інсультом: 1) відновлення мозкового кровоплину (реперфузія) шляхом

терапевтичної/хірургічної реканалізації оклюзованої судини або посилення колатерального кровоплину; 2) нейропротекція — підвищення виживання клітин зони ішемічної “напівтіні” шляхом зменшення ушкоджувальної дії ішемічного “каскаду”; 3) нейросудинна регенерація — стимуляція ендогенних репаративних процесів; 4) запобігання вторинним ускладненням (легеневим, тромбоемолічним тощо); 5) реабілітація [11, 14, 17, 126, 127].

У повсякденній клінічній практиці хірургічні методи використовуються з метою реканалізації, реперфузії і реваскуляризації у гострому періоді ішемічного інсульту, здебільшого в рамках “терапевтичного вікна” [11–13, 126]. Медикаментозні методи використовуються рутинно для реперфузії (внутрішньовенний тромболізис – ВВТ) і нейропротекції у гострому періоді, а також для запобігання вторинним ускладненням як в гострому, так і віддаленому періодах інсульту. Медикаментозні і фізичні методи реабілітації, як правило, використовуються у віддаленому періоді інсульту [127]. Разом з тим, новітні методи лікування, спрямовані здебільшого на нейросудинну регенерацію, можуть бути ефективними як у гострому, так і віддаленому періодах інсульту поза межами “терапевтичного вікна” [14, 17, 127]. Переважна більшість цих методів перебувають на стадії експериментальної розробки або клінічної апробації і не застосовуються рутинно в клінічній практиці.

1.4.1. Сучасні медикаментозні, хірургічні і реабілітаційні методи лікування

Єдиним ефективним науково обґрунтованим і клінічно апробованим медикаментозним методом лікування пацієнтів із ішемічним інсультом з метою реперфузії є ВВТ із застосуванням рекомбінантного тканинного активатора плазміногену (ТАП) [11, 13, 126]. Дані перших двох проспективних багатоцентрових рандомізованих контрольованих досліджень (РКД) свідчать про доцільність застосування ТАП в рамках терапевтичного вікна (3–4,5 год.), що дозволяє зменшити ступінь неврологічного дефіциту в пацієнтів протягом

12 міс. від початку лікування порівняно з контрольною групою [129, 130]. Втім, дані постмаркетингових клінічних досліджень свідчать про те, що ВВТ не у всіх пацієнтів приводить до успішної реканалізації артерії або функціонального відновлення [13, 22, 131].

Розвиток нейроендоваскулярних технологій дозволив впровадити в клінічну практику нові засоби і інструменти для безпосереднього внутрішньосудинного доступу до тромбованої ділянки артерії великого калібру. Перші результати клінічних досліджень внутрішньоартеріального тромболізу (ВАТ) за допомогою проурокинази засвідчили ефективність даного методу лікування, який сприяв кращій реканалізації оклюзованої артерії і зниженню ступеня неврологічного дефіциту в пацієнтів [12, 13, 132]. Однак у подальших РКД не було продемонстровано перевагу ВАТ перед ВВТ [133, 134].

Подальша еволюція пристроїв і засобів для нейроінтервенційного лікування інсульту привела до розробки методу механічної тромбектомії (тромбоекстракції), ефективність якого вивчалася в багатьох клінічних дослідженнях [132–137]. Дані мета-аналізів РКД ендovasкулярної тромбектомії із використанням пристроїв II покоління (стент-ретриверів) переконливо свідчать про переваги застосування даного методу лікування в гострому періоді інсульту (до 6 год.): збільшення частоти реканалізації артерій, покращення функціонального статусу пацієнтів і зниження летальності [133, 136]. Попри перспективність і ефективність механічної тромбоекстракції за допомогою стент-ретриверів, даний метод теж не позбавлений недоліків. За різними даними, після тромбектомії у 2–10% випадків спостерігаються симптомні внутрішньомозкові крововиливи, при яких летальність досягає 50% [135, 136]. Більш рідкісними, але потенційно небезпечними ускладненнями при застосуванні стент-ретриверів може бути дистальна емболія, пошкодження судинної стінки і труднощі, зумовлені варіабельною анатомією екстракраніальних судин [13, 136]. Втім, основним істотним недоліком ендovasкулярних методик лікування є їх недоступність для переважної більшості пацієнтів у вузьких рамках “терапевтичного” вікна, що ставить на

порядок денний про пошук альтернативних стратегій лікування ішемічного інсульту в гострому періоді.

Такою стратегією може бути нейропротекція, мішенями якої є ланки ішемічного “каскаду” [14, 16, 17, 138]. Незважаючи на оптимістичні результати численних експериментальних досліджень різноманітних нейропротекторних агентів, жоден з них не виправдав очікувань в пілотних РКД [18, 138]. Ймовірно, це пов’язано зі складністю патофізіологічних механізмів ІУГМ в людини, на відміну від тварин, що диктує необхідність одночасної медикаментозної модуляції багатьох сигнальних шляхів і впливу на різні патогенетичні ланки для досягнення бажаного терапевтичного ефекту [138, 139]. Попри скептицизм дослідників, на сьогодні триває пошук нових методів і засобів нейропротекції. У пілотних клінічних випробуваннях вивчаються ефекти помірної гіпотермії (33°C), інгібітора білка постсинаптичної щільності-95, нових модуляторів кальцієвої сигналізації [140–142].

Реабілітаційні методи лікування пацієнтів із інсультом спрямовані, передусім, на процеси нейропластичності — активацію латентних зв’язків, утворення нових, синаптичних контактів, руйнування патологічних міжнейронних кіл тощо [143]. Оглядовий аналіз 35 РКД у 2009 р. у США показав, що найбільш ефективними підходами до відновлення рухової функції кінцівок виявилися рухова терапія зі спротивом, електроміографічний зворотній зв’язок, уявні вправи із моторним зображенням, і використання роботів [144]. Поліпшення здатності до пересування і рівноваги спостерігалося при повторному виконанні завдання, біологічному зворотному зв’язку, і тренуванні на рухомій платформі. Фітнес і високоінтенсивна фізіотерапія, а також повторне виконання завдання сприяли збільшенню швидкості ходьби. Призми і комп’ютеризовані вправи зі стеженням за рухомими об’єктами, а також вправи із сакадами все частіше застосовуються з метою відновлення зорового розпізнавання в пацієнтів із зоровим ігноруванням і гомонімною геміанопсією. У пацієнтів із дефіцитом уваги і торпідністю мислення добре зарекомендували себе когнітивні і аеробні вправи [144, 145]. Велике розмаїття

реабілітаційних методик, відсутність стандартизованих підходів і алгоритмів лікування з урахуванням строків після інсульту, ступеня неврологічного дефіциту і індивідуальних особливостей пацієнтів, свідчать про необхідність індивідуалізованого підходу до кожного пацієнта з використанням оптимальної комбінації фізичних методів [145].

Окрім власне реабілітації (фізичної терапії), з метою стимуляції процесів нейропластичності при інсульті активно досліджуються такі напрямки, як нейромодуляція, оптогенетика і комп'ютерно-мозковий інтерфейс [17].

Нейромодуляція — сукупність нейрофізіологічних методик, які спрямовані на корекцію балансу між процесами збудження і гальмування в нейрональних мережах [146–148]. Розроблена ціла низка методик і технік для покращення відновлення рухових функцій після інсульту [146–151]. Проте на сьогодні як неінвазивні (транскраніальна магнітна і стимуляція прямим електричним струмом), так і інвазивні методики продемонстрували незначну ефективність у клінічній практиці. Певний оптимізм викликали перші клінічні випробування методу епідуральної електричної стимуляції кори головного мозку, однак подальші дослідження на великій кількості пацієнтів не виявили тривалого позитивного ефекту [149]. Перспективними напрямками нейромодуляції є транскраніальна магнітна стимуляція півкулі мозочка, пряма електрична стимуляція мозочково-таламо-кіркового шляху, стимуляція блукаючого нерва [150, 151].

Оптогенетика — новий метод стимуляції постінсультної пластичності, який передбачає використання певних довжин хвиль світла для точного контролю діяльності окремих нервових клітин, генетично модифікованих для експресії фоточутливих іонних каналів [152]. Групою дослідників в експерименті на мишах із ОСМА фотостимуляція генетично змінених нейронів, які експресували білок каналородопсин 2, приводила до кращого виконання поведінкових тестів, а також підвищеної експресії нейротрофічних чинників у протилежній півкулі мозку [152]. В іншому досліді оптогенетика була успішно використана для посилення ефекту трансплантації НСК [153].

Комп'ютерно-мозковий інтерфейс — експериментальна технологія, призначена передусім для відновлення моторного контролю в пацієнтів із руховими і мовними порушеннями [17, 154]. Принцип дії даної технології полягає у детекції і розшифруванні електричних сигналів з поверхні або глибинних структур головного мозку за допомогою систем зворотного зв'язку і стимуляції інтактних зон мозку для відтворення рухів за допомогою роботизованих систем. Комп'ютерно-мозковий інтерфейс був успішно досліджений на приматах [17]. Значний інтерес викликають системи, базовані на неінвазивному електроцефалографічному моніторингу [154]. Технічна складність і відносна інвазивність даної технології, складність інтерпретації комплексних сигналів мозку є істотними перешкодами на шляху до її клінічного впровадження.

1.4.2. Методи регенеративної медицини у лікуванні гострого ішемічного інсульту

1.4.2.1. Нейротрансплантація

Одним із напрямків регенеративного лікування інсульту є клітинна і тканинна НТ, яка передбачає такі основні стратегії функціонального відновлення: 1) замісна (реконструктивна) — спрямована на доставку клітин як структурного матеріалу для відновлення топології нейрональних мереж; 2) ЩА — використання клітинних технологій для стимуляції росту судин у ПЗ мозку; 3) застосування клітин як паракринних регуляторів пластичних процесів у мозку [17,18,154–156].

В експериментах на тваринах вивчалася дія таких засобів НТ при інсульті як ЕНТ і фетальна нервова тканина (ФНТ), ембріональні стовбурові клітини (СК), фетальні і ембріональні НСК, “дорослі” НСК, мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) різного походження, стромальні клітини кісткового мозку (СККМ), гемопоетичні СК (ГСК), ЕПК, адипоцитарні СК (АСК), СК

пуповинної крові (СКПК), клітини нюхової цибулини, а також ксеногенні й генетично модифіковані клітини [27, 28, 30, 103, 158–161]. Трансплантацію клітинного матеріалу проводили різними шляхами: безпосередньо в ділянку ішемії, в шлуночки мозку і велику потиличну цистерну, внутрішньовенно (в хвостову вену) або внутрішньоартеріально (в сонну артерію) [162–166]. Практично в усіх роботах спостерігалися позитивні результати НТ у вигляді повного або часткового відновлення неврологічних функцій в експериментальних тварин. Багато дослідників виявляли донорські клітини в ішемізованому мозку, де вони розташовувалися переважно навколо зони ІУГМ [28, 154, 167–169]. Також було продемонстровано їх диференціювання у напрямку гліоцитів, нейронів і ендотеліоцитів [154, 167, 169, 170].

Трансплантація ЕНТ і ФНТ як джерела нейрогенних клітин вивчалася в багатьох експериментах на початкових стадіях розробки методів НТ при інсульті [28, 154, 171–174]. Перевагою ЕНТ (ФНТ) є наявність у зародкових тканинах супутніх ФР і ембріонального ПКМ, які підтримують і спрямовують диференціювання нейрональних попередників як трансплантованої тканини, так і тканини пацієнта [28, 29]. У досліджах на моделі експериментального ішемічного інсульту шляхом введення ембола (завись сульфату барію) в ЗСА щурів алотрансплантація ЕНТ в ділянку ІУГМ в ранньому періоді призводила до більш швидкого і повного відновлення неврологічного дефіциту порівняно з контрольною групою [29]. Макроскопічно ділянки трансплантації характеризувалися наявністю інтенсивного росту судин у напрямку ЕНТ, при цьому розміри самого трансплантату поступово зменшувалися протягом 1-3 тижнів після трансплантації [171]. В іншому дослідженні трансплантація кріоконсервованих ембріональних нервових клітин на моделі ОСМА в щурів сприяла корекції імунного статусу піддослідних тварин і мала антиоксидантний ефект [172].

ЕНТ і ФНТ не позбавлені низки істотних недоліків: прогресивне зменшення кількості нейрогенних клітин та обмеження їх прогеніторного потенціалу впродовж онтогенезу, гліальна реакція на трансплантат, а також

морально-етичні аспекти, пов'язані з використанням абортівного матеріалу [173].

Клітини, одержані за допомогою генетичної трансформації чи культивування ембріональних або зрілих тканин, можуть бути готовим і практично необмеженим джерелом клітин, що зменшує етичні перешкоди, пов'язані з одержанням абортівної фетальної тканини. Клінічні випробування нейрогенних клітин, культивованих з лінії тератоми людини (NT2/D1), показали безпечність трансплантації та відсутність онкогенної трансформації пересаджених клітин у пацієнтів з ішемічним інсультом [175]. У деяких пацієнтів спостерігалось покращення пам'яті та просторово-візуальної орієнтації порівняно з контрольною групою. Втім, після проведення II фази клінічних досліджень даної клітинної лінії бажаний результат — відновлення рухової функції — не був досягнутий [175].

У досліджах в якості донорського джерела використовувалися й ксенотрансплантати. Фетальні клітини латерального гангліонарного підвищення свині, трансплантовані в смугасте тіло щурів на 3, 7, 14 чи 28 добу після ОСМА, виживали, диференціювалися в глію і нейрони, а також формували синаптичні контакти з нейронами реципієнта, сприяючи істотному функціональному покращенню [176]. Хоча попереднє клінічне випробування продемонструвало безпечність і принципову здійсненність трансплантації ФНТ свині, в подальшому дослідження було припинене з міркувань безпеки для пацієнтів [175].

Фетальні НСК є мультипотентними клітинами, здатними до самовідтворення і диференціювання в нейро- і гліюцити [176]. Були проведені успішні трансплантації фетальних НСК у мозок щурів після ОСМА [27]. У серії клінічних спостережень 3 пацієнтів із геморагічним і 7 пацієнтів із ішемічним інсультом в басейні СМА було проведено субарахноїдальне введення фетальних ембріональних нервових клітин в терміни від 4 до 24 міс. після початку захворювання [175]. Попри відсутність серйозних побічних ефектів,

функціональні наслідки в порівнянні з ретроспективною групою 11 пацієнтів виявилися суперечливими.

Незважаючи на досягнуті успіхи НТ із застосуванням фетальних тканин, існує багато обмежень, зумовлених як методичними, так і етичними аспектами. Гетерогенність нейросфер і переважання в них гліальних елементів ускладнює одержання чистих популяцій нейрогенних клітин, а імунні реакції можуть спричинити загибель до 90–95% НСК після трансплантації [175, 176].

Беручи до уваги труднощі, пов'язані з використанням ембріональних і фетальних клітин, дослідники частіше використовують СК дорослого організму. Це недиференційовані клітини, присутні у багатьох дорослих тканинах, які характеризуються властивістю диференціюватися у спеціалізовані клітини відповідної тканини, беручи участь у її регенерації [176, 177].

Інтрацеребральне, інтравентрикулярне та інтраартеріальне введення очищених «дорослих» НСК і комітованих НПК на моделі ОСМА призводило до зменшення об'єму зони інфаркту та істотного покращення неврологічних функцій у піддослідних тварин [176–178]. За допомогою методів імуноелектронної мікроскопії було виявлено, що молоді нейрони, нащадки трансплантованих клітин, встановлювали синаптичні контакти з нейронами реципієнтної тканини [54, 185]. За допомогою методів флюоресцентного мічення трансплантованих НСК дослідниками було виявлено, що трансплантація сприяє широкій міграції НСК, в тому числі й у зону ІУГМ, де НСК експресують маркери зрілих нейронів (NeuN) і астроцитів (ГФКБ) [179]. Попередні результати першого клінічного випробування культивованих дорослих людських НСК продемонстрували відсутність побічних ефектів і покращення функціонального статусу в 11 пацієнтів із ішемічним інсультом в терміни 9–24 після трансплантації [158]. Проте залишається відкритим питання про функціональну інтеграцію трансплантованих НСК у нейрональні кола реципієнта. Одержання великої кількості диференційованих нейронів із популяції НСК в культурі дотепер залишається складним завданням [176].

В сучасних дослідженнях основним засобом НТ при інсульті все частіше слугують МСК [31, 32, 176, 180, 181]. Це негемопоетичні мультипотентні клітини, які порівняно легко виділяються з організму, проліферують у культурі та здатні диференціюватися в різних напрямках, а також можуть використовуватися при аутотрансплантації [18, 176]. На даний час МСК виділяються із кісткового мозку, жирової тканини, синовіальної вистилки суглобів, скелетних м'язів, легень, пульпи, молочних зубів і клітин пуповинної крові [32, 176]. МСК здатні диференціюватися в нейрони та глію, а при культивуванні *in vitro* можуть синтезувати їх маркерні білки (β III-тубулін, нестин, NeuN, ГФКБ) [30, 182]. МСК *in vitro* секретують набір факторів, які стимулюють (ІЛ-1, ФНП α), регулюють (ІЛ-11) та пригнічують (ТФР β) процеси запалення [30, 183].

Найбільш доступним і вивченим джерелом МСК є кістковий мозок, де вони відіграють важливу роль у становленні та підтриманні ліній ГСК, продукуючи різноманітні ФР, цитокіни та молекули ПКМ [34, 35, 183]. Окрім МСК і ГСК, кістковий мозок містить також ЕПК і дуже малі ембріонально-подібні СК, які є предметом інтенсивних досліджень у галузі НТ при інсульті [184–186].

В експерименті після обробки трофічними чинниками МСК кісткового мозку (МСККМ) трансплантували у ПЗ мозку щурів через 7 діб після ОСМА [163]. Було показано покращення сенсомоторних і когнітивних функцій у тварин порівняно з контролем при відсутності статистично вірогідних відмінностей в об'ємі ділянки інфаркту мозку. Більшість трансплантованих клітин синтезували маркерні білки нейронів — MAP-2, β III-тубулін, деякі — астроцитів (ГФКБ). Близько 30–45% донорських МСК виживали у мозку протягом 1 міс. після введення [163].

Комбіноване застосування НФМП і суспензії ТКМ через 48 год. після ОСМА призводило до покращення неврологічних функцій у щурів [33]. У дослідях із трансплантацією ТКМ (ТТКМ) самців мишей, мічених зеленим флюоресцентним білком (ЗФБ), самкам після одержання ними летальної дози

опромінення та подальшої ОСМА, було виявлено включення мічених ЗФБ клітин у судини ушкодженої ділянки мозку на 3, 7 і 14 добу, які синтезували маркерні білки ендотелію [35].

Таким чином, МСК можуть циркулювати у кровоносному руслі та мігрувати в ділянку ішемії, що підтверджується дослідами з використанням внутрішньовенного та внутрішньоартеріального шляхів введення [162, 164, 187]. При цьому спостерігалось зниження кількості клітин в стані апоптозу, посилювалася проліферація клітин і ріст аксонів у СВЗ, підвищувалася продукція різноманітних факторів росту (оФРФ, СЕФР, фактор росту нервів — ФРН, і НФМП) в ПЗ, посилювався ріст нових капілярів, а також істотно зменшувалася товщина стінки гліо-мезодермального рубця в ураженій півкулі [187, 188]. Покращення неврологічного статусу тварин при системному введенні МСК відзначалося вже на 7 добу після трансплантації, що, на думку багатьох авторів, можна пояснити не стільки нейрогенним диференціюванням МСК, скільки нейропротекторним впливом [187]. Лише 0,02% з 2 мільйонів інтракаротидно введених МСК фарбувалися позитивно на нейрональні маркери *in situ* [162].

Дані фундаментальних і клінічних досліджень свідчать на користь впровадження трансплантації СККМ і МСККМ у клінічну практику. Результати численних клінічних випробувань довели принципову можливість і безпечність застосування СККМ в пацієнтів із ішемічним інсультом [175, 180, 181]. В деяких дослідженнях було продемонстровано покращення неврологічного статусу пацієнтів за відсутності побічних ефектів НТ [40,189]. В огляді Р.Н. Rosado-de-Castro і співавторами було проаналізовано результати 25 завершених станом на 2013 р. клінічних випробувань НТ при інсульті, в яких взяли участь 1046 пацієнтів [40]. Переважна більшість із них була присвячена трансплантації клітин кісткового мозку. Автори огляду констатують безпечність і здійсненність даного методу лікування, проте через істотні методологічні відмінності їх результати були важко порівнюваними між собою. В одному дослідженні на невеликій групі пацієнтів продемонстровано безпечність і

ефективність внутрішньоартеріального введення МСК пуповинної крові за допомогою мікрокатетера [189]. Результати фази 1/2А досліджень інтрацеребральної трансплантації СККМ в терміни 0,5–5 років після ішемічного інсульту засвідчили безпечність і можливість даного методу лікування, а також позитивний ефект у вигляді часткового регресу неврологічної симптоматики в пацієнтів [190].

Перспективним засобом НТ є також дуже малі ембріонально-подібні СК, які належать до негемопоетичної фракції лейкоцитів (CD45⁻) і схожі за фенотипом на прогеніторні клітини. Їх можна ізолювати з кісткового мозку або пуповинної крові за допомогою детекції таких маркерів, як CD34, CD133, CXCR-4 та ін. [184].

Пуповинна кров є ще одним джерелом мультипотентних СК, які під впливом ФР трансформуються в прогенітори, які експресують нейрональні й гліальні клітинні маркери [161]. Внутрішньовенна інфузія СКПК щурам через 24 години після ОСМА сприяла покращенню поведінкових функцій [169]. Близько 1% цих клітин виживали й мігрували в уражену півкулю, при цьому 2% експресували нейрональні маркери. Ймовірними механізмами позитивного впливу СКПК автори вважають протизапальний, імуномодуляторний, нейротрофічний і ангіогенний (за рахунок вмісту в пуповинній крові CD34⁺-клітин) ефекти [161].

Можливість спрямованого нейронального диференціювання АСК робить їх потенційним засобом для НТ при інсульті [159, 160]. Ін'єкція АСК в бічний шлуночок щура через 1 день після ОСМА спричиняє міграцію трансплантованих клітин в зону ішемії [160]. На 7 добу після інсульту в тварин дослідної групи було відзначене краще відновлення неврологічних функцій порівняно з тваринами контрольної групи.

ГСК — СК дорослого організму, які дають ріст усім типам клітин крові, включаючи мієлоїдну та лімфоїдну лінії і експресують маркер CD34 [176]. Ішемічний інсульт в людини призводить до мобілізації CD34⁺-клітин, максимум якої припадає на 10 добу [113]. При цьому кількість циркулюючих

CD34+-клітин корелює з кращим функціональним наслідком [115]. У більшості досліджень на експериментальних моделях ішемічного інсульту використовували фракцію мононуклеарних клітин кісткового мозку (МККМ), яка, крім ГСК, містить лімфоцити і моноцити, а також МСК і ЕПК [191–193]. В деяких дослідженнях трансплантували лише фракцію CD34+-клітин, субпопуляцію, збагачену ГСК і ЕПК [194]. В одному дослідженні показано, що нейрогенні клітини, культивовані з МККМ пацієнтів з інсультом і трансплантовані в головний мозок щурів з ОСМА, виживали протягом 6 місяців, проявляли нейрональний фенотип і сприяли кращому функціональному відновленню [195]. ГСК можуть брати участь в ангіогенезі за допомогою сигнального шляху ФСК-1 α і його рецептора CXCR-4 [113, 185].

У I фазі клінічного дослідження інтрацеребральне введення аутологічних МККМ 60 пацієнтам через 5–7 днів після інсульту в ділянці базальних гангліїв привело до статистично значущого регресу неврологічної симптоматики протягом 6 міс. від початку інсульту [196]. В інших дослідженнях із інтраартеріальним введенням мічених аутологічних МККМ було показано секвестрацію трансплантованих клітин в легенях і печінці [197]. Подібні результати були одержані також при внутрішньовенному введенні МККМ пацієнтам із ішемічним інсультом у підгострому періоді (більше 7 діб) [185]. У всіх пацієнтів відзначалися судомні напади, контрольовані фармакологічно.

Виходячи з наведених даних, слід відзначити, що для експериментального лікування інсульту використовуються різноманітні типи клітин, які вводяться різними шляхами та в різні терміни після моделювання ішемічного інсульту. У переважній більшості доклінічних досліджень констатовано морфофункціональне відновлення, зумовлене нейропротекторним впливом та активацією репаративних механізмів: синаптичної пластичності, нейро- та ангіогенезу [31, 32, 156]. Натомість залишається дискутабельним питання про замісну дію трансплантованих клітин і їх повноцінну інтеграцію в організм реципієнта.

Найбільшу увагу серед засобів НТ, за даними літератури, присвячено НСК (НПК) і клітинам кісткового мозку (МККМ, СККМ, МСККМ, ЕПК, ГСК) [18, 31, 32, 177]. Механізми їх дії на функціональне відновлення після ІУГМ дещо відмінні. Основними ефектами НСК (НПК), як і ЕНТ (ФНТ) вважають замісний, нейропротекторний, імуномодуляторний, нейротрофічний (відновлення аксонального транспорту) і нейрорегенераторний (нейрогенез, арборизація дендритів і аксональний спраутинг) [18, 177, 198]. Натомість для клітин кісткового мозку не характерний замісний вплив, проте вони індукують ангиогенез і ремоделювання нейросудинної “одиниці” завдяки секреції низки трофічних факторів і регуляторних молекул, зокрема екзосомального транспорту мікро-РНК до нейронів і астроцитів [34, 195, 199, 200]. Втім, порівняльні дані щодо впливу клітин нейронального або кістково-мозкового походження, в літературі відсутні.

Дані мета-аналізів експериментальних досліджень НТ при ГФЦ підтверджують її ефективність в експерименті, проте якість багатьох із них, на думку експертів, є недостатньо високою [31, 32]. В клінічній практиці дані мета-аналізів окремих РКД підтверджують лише принципову можливість і безпечність окремих засобів НТ при інсульті [40, 175]. Попри деякі позитивні результати, клінічна ефективність НТ залишається дискутабельною і потребує підтвердження в багатоцентричних РКД на великій кількості пацієнтів. Незважаючи на це, подальші клінічні випробування НТ при ішемічному інсульті тривають.

1.4.2.2. Індукований церебральний ангиогенез

Однією з найбільш перспективних стратегій відновного лікування ішемічного інсульту на сьогодні вважається ІЦА — спрямована стимуляція росту судин за допомогою фармакологічних засобів, клітинних або тканинних технологій з лікувальною метою [24–26]. Ефективність і перспективність даного напрямку лікування підтверджена експериментальними та клінічними

дослідженнями при ішемічних ураженнях периферичних артерій і міокарда [36–38].

Новоутворені мікросудини є потенційною платформою міграції нейробластів, виділення ФР, які підтримують нейро- і синаптогенез [20]. Клінічні дослідження показали, що ангиогенез після інсульту сприяє відновленню мозкового кровообігу в ПІЗ головного мозку [98, 99].

На сьогодні існує декілька напрямків індукції ангиогенезу, які умовно можна поділити на молекулярний і клітинний [22, 24–26, 106]. Перший передбачає використання різноманітних ФР з метою стимуляції клітин ангиогенного ряду до їх поділу та диференціювання [106]. Другий напрямок полягає у безпосередньому введенні клітин з ангиогенним потенціалом в організм реципієнта [22].

Найбільш дослідженим проангиогенним фактором є СЕФР. У головному мозку він експресується в судинних сплетеннях шлуночків, астроцитах і нейронах [107]. На моделях ішемічного інсульту у гризунів введення СЕФР різними шляхами (інтрацеребрально, інтравентрикулярно) або його продукція генетично модифікованими СК (МСК, НПК) приводила до зменшення розмірів ЗІГМ, покращення неврологічного статусу тварин і індукції ангиогенезу [107, 108, 112]. Цікаво, що при цьому не відзначалося збільшення мозкової перфузії.

Наслідки застосування СЕФР при ГФЦІ істотно залежать від часової послідовності, оскільки раннє введення (1 год.) може спричинити негативний ефект у вигляді посилення набряку головного мозку, тоді як пізнє введення (48 год. після інсульту) не має даного побічного ефекту [107, 112]. У дослідженні із внутрішньошлуночковою інфузією СЕФР на моделі ОСМА в щурів протягом 3 днів, починаючи з 24 год. після моделювання інсульту, було виявлено нейропротекторний, нейро- та ангиогенний ефекти [50]. Важливим механізмом дії СЕФР при ІУГМ є модуляція медіаторів запальної відповіді [107–109]. Вважається, що СЕФР є також медіатором нейропротекторного впливу НСК і НПК при їх трансплантації в ділянку ІУГМ, а також інших ФР [201, 202]. Наприклад, аденовірус-опосередкований трансфер гена гепарин-зв'язаного,

подібного до епідермального, ФР посилює нейрогенез і ангиогенез у щурів після ОСМА, ймовірно, за рахунок стимуляції ГМК секреції СЕФР [106].

До родини СЕФР належить також ПФР, ліганд для РСЕФР-1 і нейропіліну-1, який бере участь у координованій регуляції ангиогенезу і нейрогенезу після інсульту [106, 203].

Внутрішньошлуночкова ін'єкція вірусного вектора ФРГ при ГФЦІ у щурів сприяє зменшенню розмірів ЗІГМ без супутньої індукції набряку мозку завдяки ангиогенній і нейропротекторній дії і пригніченню апоптозу [106].

Ще одним новітнім методом ЩА може бути регуляторний контроль експресії ангиогенних факторів, зокрема СЕФР, за допомогою ФІГ-1 [100, 104].

Гемопоетичні ФР (гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор — Г-КСФ, моноцитарний колонієстимулювальний фактор — М-КСФ, ГМ-КСФ, ФСК-1 α , ЕПО) завдяки мультимодальності ефектів відіграють значну роль у нейросудинній регенерації мозку після ішемічного інсульту і регулюють процеси постішемічного запалення та імунної відповіді [106, 204–206]. Г-КСФ стимулює нейрогенез шляхом активації СЕФР-2, мобілізації ендогенних CD34+-клітин і їх хоумінгу в зону ІУГМ, стимуляції проліферації клітин СГШЗЗ [204, 205]. Г-КСФ сприяє зниженню проникності ГЕБ шляхом модуляції запалення і функції Т-клітин [204]. За даними РКД, було встановлено, що ін'єкції Г-КСФ є безпечними, добре переносяться пацієнтами і можуть навіть сприяти регресу неврологічного дефіциту [205]. Поєднане застосування Г-КСФ і ФСК-1 α сприяє посиленню мобілізації СККМ, підвищенню експресії нейронального маркера NeuN в інтактному мозку і функціональному відновленню в щурів після ОСМА [106]. Інтраперитонеальна інфузія ГМ-КСФ посилює артеріогенез і ремоделювання Вілізієвого кола в щурів на моделі хронічної церебральної ішемії [106, 204]. ГМ-КСФ може також зменшувати ступінь ІУГМ шляхом зниження нейронального апоптозу [106]. ГМ-КСФ також мобілізує ГСК і стимулює їх міграцію у вогнище ІУГМ [204]. Інтраперитонеальне введення рекомбінантного ЕПО через 24 год. після ГФЦІ у щурів прискорює регрес неврологічної симптоматики і викликає підвищення

щільності мікросудин у ПЗ, а також збільшує проліферацію клітин у СВЗ [112]. Окрім цього, введення ЕПО сприяло істотному підвищенню рівнів СЕФР і НФМП [207]. В експериментах було показано, що ЕПО регулює експресію генів апоптозу, зменшує продукцію про-запальних цитокінів і вираженість набряку мозку [206]. Результати завершених клінічних випробувань ЕПО при інсульті в гострому періоді (перші 8 год.) свідчать про його нейропротекторний вплив у вигляді зменшення розмірів ЗІГМ і тенденції до регресу неврологічної симптоматики у пацієнтів [106].

Ще один хемокін, ФСК-1 α , бере участь у міграції ГСК із кісткового мозку до периферичної крові [106, 208]. Його рецептор CXCR-4 експресується у нервовій тканині під час ембріогенезу, а також за патологічних умов, зокрема при інсульті [100, 106]. Інтрацеребральне введення ФСК-1 α щурам із ОСМА вже на 3 добу після індукції ішемії приводить до зменшення розмірів ЗІГМ за рахунок експресії антиапоптотичних білків, прискорює відновлення рухової функції, активує мобілізацію СККМ і їх хоумінг у зону ІУГМ [208]. Підвищення судинної щільності в зоні ІУГМ після введення ФСК-1 α тісно пов'язане із регуляцією експресії СЕФР [106, 208].

Ангіогенні властивості були виявлені і в оФРФ, який також впливає на мітотичну активність прогеніторів у СВЗ [106]. Експресія оФРФ підвищується у зоні ІУГМ [104]. Інтрацеребральна інфузія оФРФ через 2 год. після ОСМА викликає зменшення розмірів ЗІГМ і покращення сенсомоторних функцій у щурів [106]. В іншому дослідженні, інтрацистернальна інфузія оФРФ приводила до посилення аксонального спраутингу, синаптогенезу і проліферації НПК, не впливаючи на розміри ЗІГМ [106]. На моделі одnobічної оклюзії ЗСА у щурів продемонстровано збільшення кількості судин в іпсилатеральній півкулі мозку і збільшення діаметра лептоменінгеальних колатералей [105].

ІФР-1 при його тривалій інфузії за допомогою адено-асоційованого вірусного вектора 1 типу у мишей із постійною ОСМА посилює неоваскуляризацію і локальний мозковий кровоплин у ПЗ [106]. В інших

дослідах було продемонстровано його нейропротекторний і антиапоптичний ефекти, а також стимуляцію нейрогенезу в СВЗ [108].

Накопичені в численних експериментах позитивні дані щодо застосування різноманітних ФР з ангіогенним потенціалом не підтвердилися в клінічних дослідженнях. Доказова база для окремих ФР (Г-КСФ, ЕПО) свідчить лише про безпечність і потенційну можливість їх застосування в пацієнтів з інсультом [106, 108]. Методологічні відмінності (دوزи, час, шлях і тривалість введення ФР) і невелика кількість залучених пацієнтів не дають можливості підтвердити окремі дані щодо позитивного впливу ФР на відновлення неврологічних функцій після інсульту.

В той час як клінічні дослідження ФР при інсульті продовжуються, подальші експериментальні дослідження спрямовані на з'ясування механізмів дії ФР при ГФЦІ.

Мультипотентні ЕСК, МСК, СККМ, ГСК, СКПК, АСК і ЕПК можуть бути потенційними засобами нейрогенезу, реваскуляризації та стабілізації кровоносних судин в зоні ІУГМ [22]. Механізми стимуляції ангіогенезу за допомогою введення СК пов'язують як із безпосереднім вбудовуванням клітин у мікросудини мозку, так і з виділенням ангіогенних ФР [22, 24, 25].

Внутрішньовенне введення ГСК (CD34+) мишам із експериментальним інсультом призводило до посилення неоваскуляризації порівняно з тваринами, яким вводили CD34- клітини [209]. Системне введення кістково-мозкових CD34+ клітин крові після інсульту активує не лише ангіогенез в зоні ішемії, а й забезпечує сприятливе середовище для нейрональної регенерації, стимулюючи секрецію СЕФР, оФРФ і ІФР-1 [22, 209].

МСККМ і СККМ мають потужний ангіогенний потенціал, доведений експериментальними дослідженнями [27, 30, 34, 35, 210–213]. Інтрацеребральна і інтраартеріальна трансплантація СККМ щурам з ОСМА приводять до інтеграції СККМ в новоутворені судини, секретії ними ангіогенних і нейропротекторних чинників (ФРГ, ФРН, НФМП, оФРФ, ІФР-1) в ділянці ІУГМ [210–215]. Дослідження із застосуванням магнітно-резонансної

томографії (МРТ) підтвердили покращення локальної перфузії ПЗ після трансплантації СККМ [157]. Внутрішньовенна інфузія людських СККМ на моделі ГФЦІ у щурів приводила до підвищення експресії СЕФР-2 і РСЕФР-2, ймовірно через посередництво оФРФ, збільшення кількості та щільності новоутворених тонкостінних судин і капілярів, забезпечуючи сприятливе мікросередовище для активації репаративних процесів у головному мозку [187].

ЕПК, подібні за фенотипом до ГСК, також можуть брати участь у неоваскуляризації при інсульті [113–117]. Джерелами ЕПК є кістковий мозок і пуповинна кров. ЕПК мають характеристики, подібні до ембріональних ангіобластів, здатні проліферувати, мігрувати та диференціюватися в клітини ендотеліальної лінії [103, 116, 117]. ЕПК, мобілізовані з кісткового мозку в судинне русло, потрапляють до зони ангіогенезу у відповідь на різні фізіологічні та патологічні стимули, беручи участь у постнатальній неоваскуляризації [117]. Внутрішньоартеріальне введення ЕПК мишам із ОСМА мало позитивний вплив на мозковий кровоплин, розміри ділянки інфаркту та функції ЦНС [216]. Мічені клітини були виявлені в складі новоутворених мікросудин у ПЗ мозку. Дослідження, проведені на статевозрілих мишах із використанням моделі ОСМА, показали, що циркулюючі ЕПК мігрують у вогнище ішемії та роблять внесок у формування мікросудинної структури судинних сплетень шлуночків, що проявлялося підвищенням мозкового кровоплину за даними перфузійно-зваженої МРТ [217]. Автори також припускають, що формування нових судин може відбуватися в результаті проліферації ендотеліоцитів із прилеглих тканин і за рахунок циркулюючих ЕПК. Встановлено, що лише CD34+ ЕПК здатні до диференціації в зрілі ендотеліоцити [103]. Існують також дані про можливість ізоляції ЕПК із кісткового мозку, їх культивування та експансії *ex vivo* із подальшою трансплантацією, результатом якої є посилена неоваскуляризація у зоні ішемічного ушкодження [130]. Цитокін-індукована активація ЕПК у відповідь на дію СЕФР і ГМ-КСФ на моделях ішемії міокарда та нижніх кінцівок є потужним засобом ангіогенезу [106, 204, 205]. Розпочаті і тривають клінічні

випробування можливості і безпечності використання ЕПК у пацієнтів з ішемічним інсультом [40].

НСК також можуть давати початок ендотеліальним клітинам і формувати подібні до судин трубчасті структури *in vitro* [218]. Ембріональні НСК, введені в бічний шлуночок щурів із ОСМА, мігрували в зону ішемії та сприяли росту мікросудин і покращенню перфузії в ПІЗ головного мозку [219, 220]. В іншому дослідженні продемонстровано збільшення кількості лектин-позитивних судин в ПІЗ після внутрішньоартеріального введення НСК мишам з ОСМА [221].

Стимуляція ангиогенезу була продемонстрована і в дослідях із СКПК і АСК [159–161]. Ймовірним механізмом ІЦА автори вважають секрецію цими СК ангиогенних ФР.

Для досягнення індукованого нейро- та ангиогенезу в експерименті використовуються також генно-інженерні технології. Наприклад, трансплантація генетично модифікованих людських МСККМ, які містять ген СЕФР, сприяла зменшенню об'єму ЗІГМ і активації ангиогенезу в зоні ІУГМ, що призвело до швидкого регресу неврологічного дефіциту в піддослідних тварин [222]. Внутрішньовенне введення МСК із аденовірусним вектором гена ПФР сприяє значному зменшенню об'єму зони інфаркту в динаміці, стимулює ангиогенез та сприяє регресу функціонального дефіциту у щурів із ОСМА [203]. Автори припускають, що людські МСК, які продукують ПФР, можуть підтримувати його високий рівень *in vivo* під час критичного постішемічного періоду (3 год. після постійної ОСМА), що робить вагомий внесок у посилення нейропротекції.

Комбінований підхід до лікування ішемічного інсульту в експерименті, який передбачає використання клітин із векторами — носіями генів відповідних ангиогенних чинників як структурного матеріалу та джерела трофічних факторів, має потенційні переваги перед іншими методами регенеративного лікування, які полягають у стабільному пролонгованому вивільненні біологічно активних речовин, що має забезпечити стійке довготривале морфофункціональне відновлення після ІУГМ [182, 223, 224].

Висновки до розділу 1.

1. В нейрорегенераторних зонах головного мозку після ішемічного ушкодження активуються процеси проліферації та міграції НСК, проте їх роль у функціональному відновленні після інсульту залишається до кінця нез'ясованою.

2. Ендогенний постішемічний церебральний ангіогенез є важливим репаративним процесом, спрямованим на активацію метаболічних процесів у ПЗ і забезпечення, певною мірою, компенсації порушених неврологічних функцій.

3. У переважній більшості експериментальних досліджень показаний позитивний вплив НТ і ФР на моделях ішемічного інсульту, тоді як клінічні випробування різних засобів клітинної НТ і ФР довели лише принципову можливість і безпечність їх застосування, проте не продемонстрували переконливих результатів функціонального відновлення на великій кількості пацієнтів із ішемічним інсультом.

4. Для відтворення ішемічного інсульту в експерименті найчастіше використовуються моделі ОСМА у щурів, проте вибір оптимальної методики залежить від багатьох чинників, зокрема, завдань дослідження, очікуваного ефекту та відтворюваних патофізіологічних механізмів ІУГМ.

5. Позитивний вплив різних методів ПЦА за допомогою клітинної і тканинної НТ і ФР в експериментальних дослідженнях оцінюється на підставі регресу неврологічної симптоматики у піддослідних тварин, а з морфологічних позицій — у зменшенні розмірів ділянки інфаркту і збільшенні кількості судин у ПЗ.

6. Нейропротекція, нейропластичність, нейрогенез і ангіогенез розглядаються авторами як основні механізми структурно-функціонального відновлення головного мозку після інсульту при застосуванні різних засобів регенеративної медицини.

7. Широке розмаїття джерел клітинного матеріалу та фармакологічних

засобів, а також їх поєднань, у тому числі з генетичними векторами, відмінність у методиках експериментів (моделі, терміни та шляхи введення клітин, їх кількість) і оцінки їх результатів (неврологічного дефіциту, розмірів ділянки ураження, морфологічних змін тощо) ускладнюють уніфікацію одержаних даних і визначення перспективності їх застосування у клінічних дослідженнях.

8. Активація ендогенних репаративних процесів за допомогою неспецифічного трофічного впливу клітинного матеріалу та ФР розглядається більшістю дослідників як найбільш вірогідна гіпотеза стосовно позитивного ефекту як молекулярних, так і клітинних засобів спрямованої нейросудинної регенерації. Залишається дискусійним питання про можливість диференціації та повноцінної функціональної інтеграції трансплантованих клітин у мозку реципієнта.

10. Стратегія ПЦА за допомогою різних засобів клітинної та тканинної НТ вважається найбільш обґрунтованою і перспективною у відновному лікуванні інсульту.

11. Залишається недослідженим питання про активацію ангиогенезу та його функціональну роль при використанні таких джерел тканинної НТ, таких як ЕНТ і ТКМ.

В зв'язку з цим, вивчення динаміки ангиогенезу та його значення як одного з основних репаративних процесів у головному мозку при трансплантації ЕНТ і ТКМ набуває важливого теоретичного та прикладного значення з точки зору визначення ефективності вищезазначених методів відновного нейрохірургічного лікування інсульту в експерименті та перспективності їх застосування в клінічній практиці.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Дизайн дослідження

Вплив ТТ на ангіогенез у ділянці ІУГМ досліджували на модифікованій моделі ОСМА в лабораторних тварин. В якості останніх були обрані білі лабораторні безпородні щури-самці з масою тіла 280–320 г, середній вік яких складав 3–4 міс., які утримувалися в стандартних умовах у клініці експериментальних тварин ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» і віварії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України. Для проведення дослідів загалом було використано 204 тварини, поділених на 4 експериментальні групи і 17 підгруп (рис. 2.1.1):

1) група 1 (n=84) — тварини, які використовувались для порівняльної серійної оцінки неврологічного дефіциту (підгрупи (ПГр): ПГр1 — “контрольна” (n=18) — тваринам цієї групи моделювали постійну ОСМА праворуч за модифікованою методикою і проводили оцінку неврологічного дефіциту на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу після ОСМА; ПГр2 — „операційний контроль” (n=12) — тваринам даної групи здійснювали всі хірургічні маніпуляції, як і при моделюванні ОСМА, за винятком введення монофіламента у просвіт правої СМА (“псевдооклюзія” — ПОСМА) та стереотаксичну “порожню” (без інфузії) ін’єкцію на 2 добу після псевдооклюзії, після чого проводили оцінку неврологічного дефіциту за шкалою Bederson і співавт. на 1 і 3 добу після ПОСМА (n=6 на кожну добу; ПГр3 (n=18) — тваринам на 2 добу після моделювання ОСМА проводили алотрансплантацію ЕНТ (ТЕНТ) і проводили оцінку неврологічного дефіциту на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу після ОСМА; ПГр4 (n=18) — тваринам на 2 добу після моделювання ОСМА проводили аутоотрансплантацію ТКМ і проводили оцінку неврологічного дефіциту на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу після ОСМА; ПГр5 (n=18) — тваринам на 2 добу після моделювання ОСМА і проводили інтрацеребральну інфузію 0,1 М фосфат-буферного 0,9% розчину натрію хлориду (ІФБР) і проводили оцінку неврологічного дефіциту на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу після ОСМА;

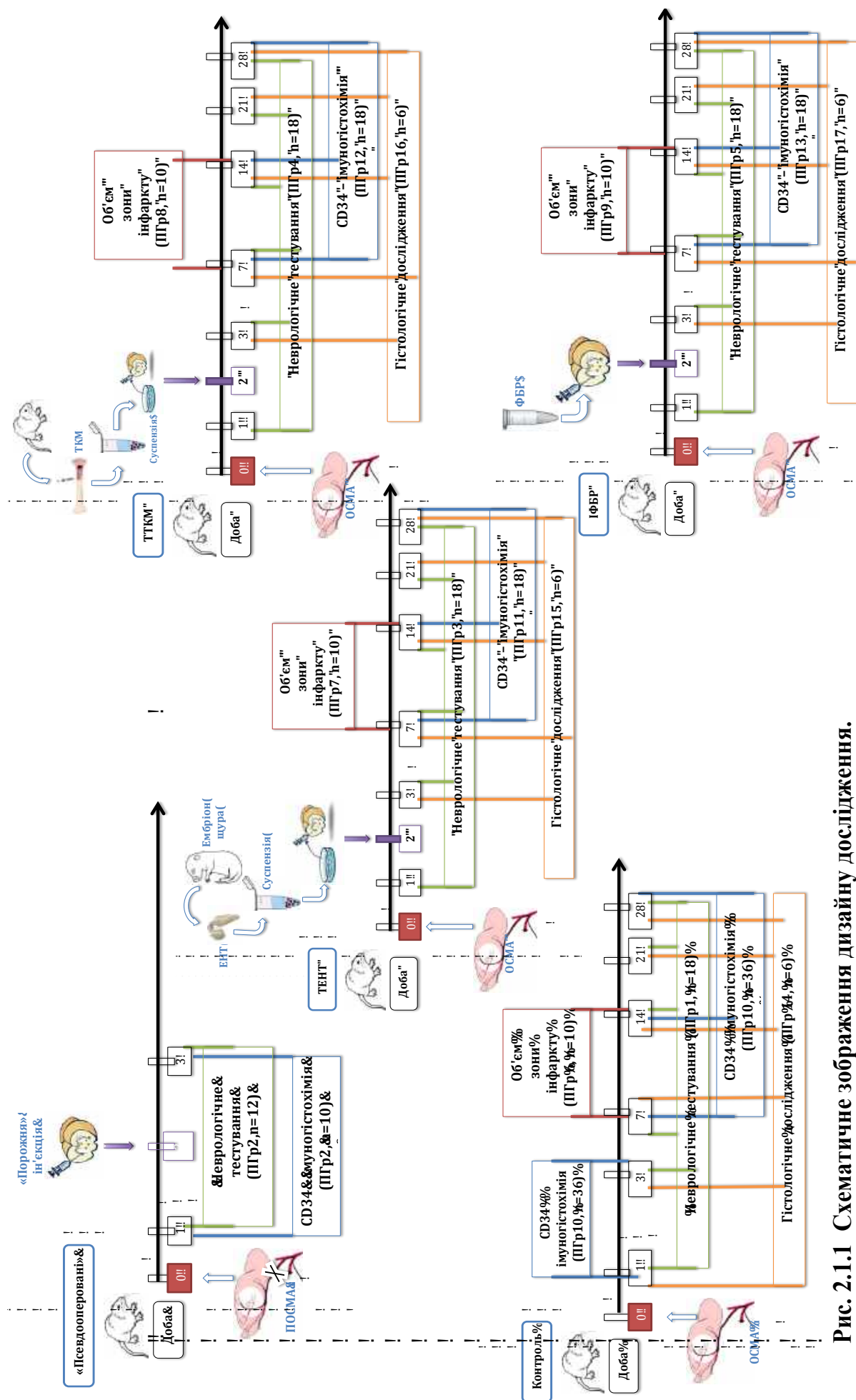


Рис. 2.1.1 Схематичне зображення дизайну дослідження.

Примітка. ЕНТ – ембріональна нервова тканина, ІФБР – інфузія фосфат-буферного розчину натрію хлориду, ОСМА – оклюзія середньої мозкової артерії, ППр – підгрупа, ПОСМА – «псевдооклюзія» середньої мозкової артерії, ТКМ – тканина кісткового мозку, ТЕНТ – трансплантація ембріональної нервової тканини, ТТКМ – трансплантація тканини кісткового мозку, ФБР – фосфат-буферний розчин натрію хлориду.

2) група 2 (n=40) — тварини, які використовувались для морфометричної оцінки об'єму ділянки інфаркту мозку і виводилися з експерименту на 7 (n=5 у кожній підгрупі) і 14 добу (n=5 у кожній підгрупі), відповідно (ПГр6, n=10 — із ОСМА; ПГр7, n=10 — із ТЕНТ на 2 добу після ОСМА; ПГр8, n=10 — із ТТКМ на 2 добу після ОСМА; 5) ПГр9 — із ІФБР на 2 добу після ОСМА;

3) група 3 (n=84) — тварини, які використовувались для оцінки кількості судин в ПЗ головного мозку і виводилися з експерименту на 1,3 (лише з ПГр 1 і 2, n=12) 7, 14 і 28 добу після ОСМА (n=6 на кожен добу; ПГр10 — із ОСМА (n=36, включаючи 6 тварин із ПГр1, які виводилися на 28 добу після моделювання; ПГр11 — із ТЕНТ на 2 добу після ОСМА, n=18 — по 6 тварин на 7, 14 і 28 добу, включаючи 6 тварин із ПГр3, які виводилися на 28 добу після моделювання; ПГр12 — із ТТКМ на 2 добу після ОСМА, n=18 — по 6 тварин на 7, 14 і 28 добу, включаючи 6 тварин із ПГр4, які виводилися на 28 добу після моделювання; ПГр13 — із ІФБР на 2 добу після ОСМА, n=18 — по 6 тварин на 7, 14 і 28 добу, включаючи 6 тварин із ПГр4, які виводилися на 28 добу після моделювання);

4) група 4 (n=24) — тварини, які виводилися з експерименту на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу (n=1 на кожен добу) після ОСМА для проведення гістологічного дослідження (ПГр14 — із ОСМА (n=6, включаючи 1 тварину із ПГр2, яка виводилася на 28 добу після моделювання); ПГр15 — із ТЕНТ на 2 добу після ОСМА (n=6, включаючи 1 тварину із ПГр3, яка виводилася на 28 добу після моделювання); ПГр16 — із ТТКМ на 2 добу після ОСМА (n=6, включаючи 1 тварину із ПГр4, яка виводилася на 28 добу після моделювання); ПГр17 — із ІФБР на 2 добу після ОСМА (n=6, включаючи 1 тварину із ПГр5, яка виводилася на 28 добу після моделювання).

Усі досліді були схвалені Комісією з питань етики Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України і проводилися в суворій відповідності до чинного нормативного документа «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах», затверджених МОЗ України [225].

Тварини утримувались в клініці експериментальних тварин ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» і віварії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України в окремих клітках по 6–7 особин у клітці, при середній температурі повітря в приміщенні 21–24° С, з періодичним вентиляванням, де тварини мали вільний доступ до води та їжі. Догляд за тваринами здійснював досвідчений ветеринар. Протягом першого тижня після моделювання ОСМА щодня проводили заміну тирсової підкладки, далі — 3 рази на тиждень. Тваринам після моделювання ОСМА протягом перших 7 днів давали м'яку їжу в зв'язку з певними труднощами при жуванні внаслідок ішемії жувальної мускулатури в умовах оклюзії гілок зовнішньої сонної артерії (ЗоСА).

Всі експериментальні процедури проводили в лабораторії експериментальної нейрохірургії ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України” в першій половині дня, що узгоджувалося з циркадіанними ритмами тварин.

2.2. Методика експериментального моделювання ішемічного інсульту

Для відтворення патофізіологічних і патоморфологічних характеристик тромботичного ішемічного інсульту в людини, що відповідає кодам класифікації I63.0, I63.3 і I63.5 за Міжнародною класифікацією хвороб 10 перегляду, нами була обрана модель ОСМА за допомогою ендovasкулярного введення монофіламентної нитки із силіконовим покриттям [226]. Ендovasкулярна ОСМА є на сьогодні найпоширенішою моделлю експериментального ішемічного інсульту і передбачає введення монофіламентної нитки у просвіт ВСА до ділянки відгалуження передньої мозкової артерії, блокуючи при цьому кровоплин у СМА [121, 122]. Дана модель характеризується розвитком відтворюваних вогнищ інфаркту мозку в басейні СМА (включаючи лобно-тім'яну кору і латеральний каудопутамен).

Важливою особливістю моделі є відносна простота маніпуляцій і контрольоване відтворення як постійної, так і тимчасової ішемії, що дозволяє дослідникам вивчати ефекти реперфузії на еволюцію зони ІУГМ [43, 44]. Крім того, інтралюмінальна монофіламентна ОСМА добре підходить для вивчення нейропротекторних речовин завдяки наявності достатніх розмірів зони ішемічної «напівтіні» у межах 60–90 хв. оклюзії [41, 44, 47].

Використана нами модифікована модель ОСМА в щурів передбачає використання комерційно виготовлених силіконових монофіламентів (Docol corp., США) для перманентної ОСМА в умовах виключення колатерального кровоплину завдяки блокуванню гілок ЗоСА, крилопіднебінної гілки ВСА та перев'язки контралатеральної ЗСА (рис. 2.2.1–2.2.6).



Рис. 2.2.1. Комерційно виготовлений монофіламент із силіконовим покриттям на кінчику (Docol corp., США).

Рекомендації експертів вказують на необхідність моделювання інсульту у старих щурів (віком 6–12 міс.) з метою наближення патофізіологічних характеристик експериментальної ГФЦІ до інсульту в людини. Проте через загалом високий рівень летальності, який спостерігається в старих щурів при моделюванні ОСМА, і особливості моделі, у наших дослідах були використані молоді щури віком 3–4 міс.

Моделювання здійснювали таким чином. Самці білих безпорідних щурів чистої лінії з масою тіла 280–320 г утримувалися в умовах віварію протягом 12 год. вночі без їжі, проте з вільним доступом до води. Оперативні втручання здійснювали під загальним знеболенням, яке досягалося шляхом внутрішньоочеревинного введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща) з розрахунку 10 мг/кг маси і кетаміну (Calypsol, Гедеон Ріхтер А.О., Будапешт, Угорщина) з розрахунку 75 мг/кг маси.

Щура фіксували на операційному столику у положенні на спині. Після гоління шерсті у ділянці передньої поверхні шиї операційне поле обробляли розчинами антисептиків (бетадин, 70% етиловий спирт) та ізолювали асептично (рис. 2.2.2.А). Шкіру та м'які тканини інфільтрували 0,5% розчином бупівакаїну. Лінійний розріз шкіри довжиною до 3 см проводили по середній лінії від під'язикової кістки до яремної вирізки грудини (рис. 2.2.2.Б).

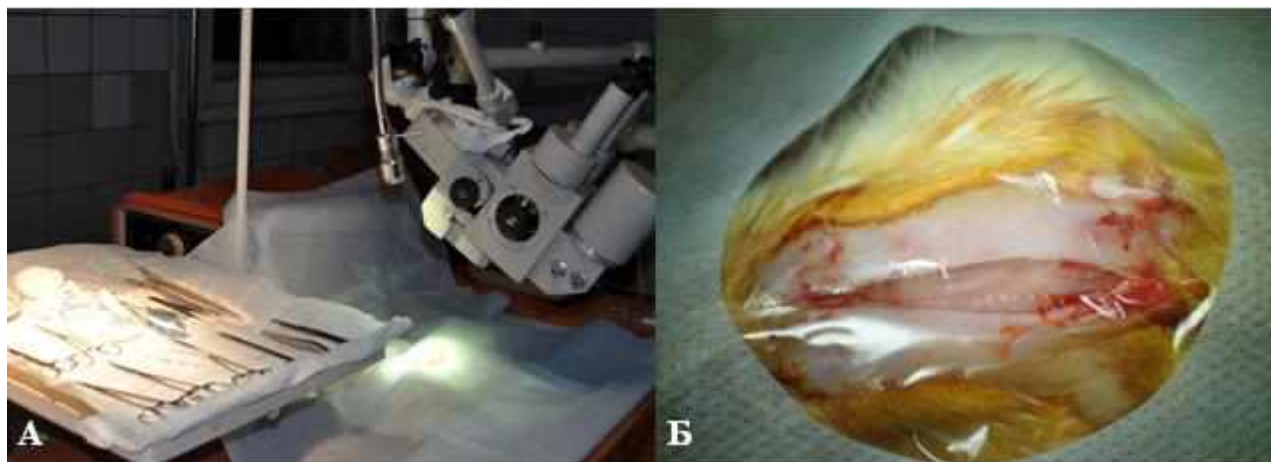


Рис. 2.2.2. Етапи моделювання ОСМА: (А) Підготовка операційного поля; (Б) серединний розріз шкіри.

Шкіру по обидва боки відсепаровували та розводили за допомогою кровоспинних затискачів. Лопатково-під'язиковий м'яз коагулювали та пересікали. Тупим шляхом єдиним блоком виділяли виличкову та щитоподібну залози, які відводили вгору. За допомогою хірургічного мікроскопа під збільшенням $\times 6$ виділяли праву ЗСА, ЗоСА та ВСА. Шляхом гострої дисекції судини звільняли від сполучної тканини та нервів. Блукаючий нерв відділяли від ЗСА та ВСА. ЗСА і ЗоСА перев'язували і відводили за допомогою лігатур (рис. 2.2.3.А). У подальшому виділяли потиличну гілку ЗоСА, останню коагулювали та пересікали. Наступним кроком ізолювали верхню щитоподібну та висхідну глоткову артерії, які також коагулювали та пересікали. ЗоСА виділяли дистально і разом із кінцевими гілками (язикова та верхньощелепна артерія) коагулювали та пересікали. При подальшій дисекції ідентифікували петлю язикоглоткового нерва у ділянці відходження крилопіднебінної артерії

— екстракраніальної гілки ВСА. Останню перев'язували за допомогою поліамідної нитки Ethilon 7/0 (Ethicon, US) біля її відходження. Далі лігатура Ethilon 6/0 (Ethicon, US) нещільно фіксувалася навколо ЗоСА біля біфуркації ЗСА (рис. 2.2.3.Б). Мікросудинну тимчасову кліпсу (ПТО «Медтехника», Казань, Росія) накладали на ВСА (рис. 2.2.4.А).

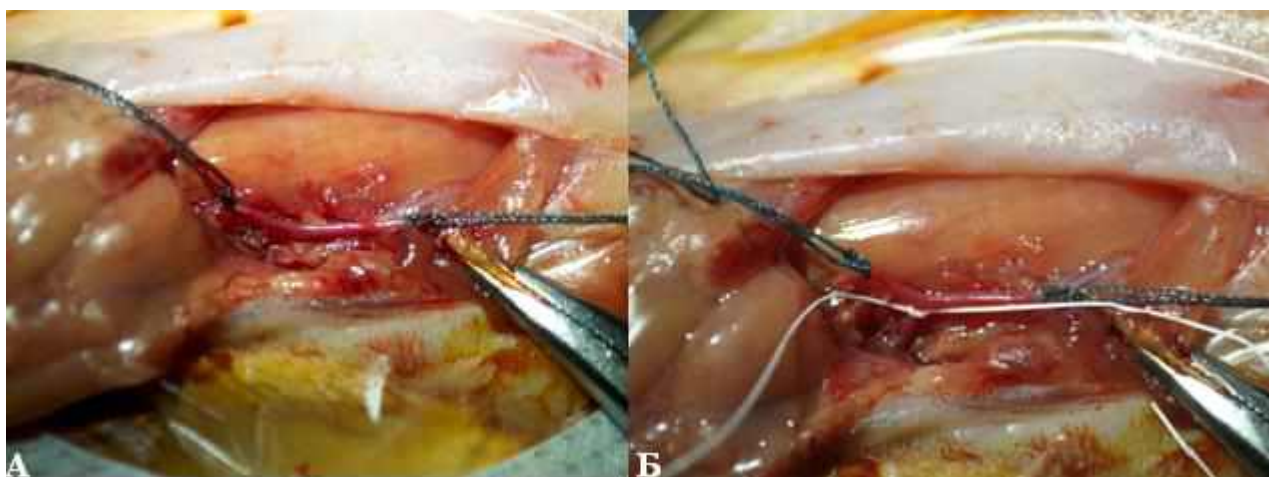


Рис. 2.2.3. Етапи моделювання ОСМА: (А) виділені ЗСА, ЗоСА і ВСА; ЗСА (праворуч) і ЗоСА перев'язані і відведені за допомогою лігатур; (Б) лігатура (білого кольору) нещільно фіксована навколо ВСА в ділянці її відходження від ЗСА.

За допомогою накладеної лігатури мобілізований проксимальний кінець ЗоСА підтягували і надсікали за допомогою мікроножиць, після чого в просвіт ЗоСА вводили монофіламентний оклюдер 4/0 (Docol corp., US) довжиною 3 см із силіконовим покриттям довжиною 5–6 мм і діаметром дистального кінця 0,38 мм та позначкою на відстані 18–20 мм від дистального кінця, нанесеною за допомогою стійкого срібного маркера (рис. 2.2.1 і 2.2.4.Б).

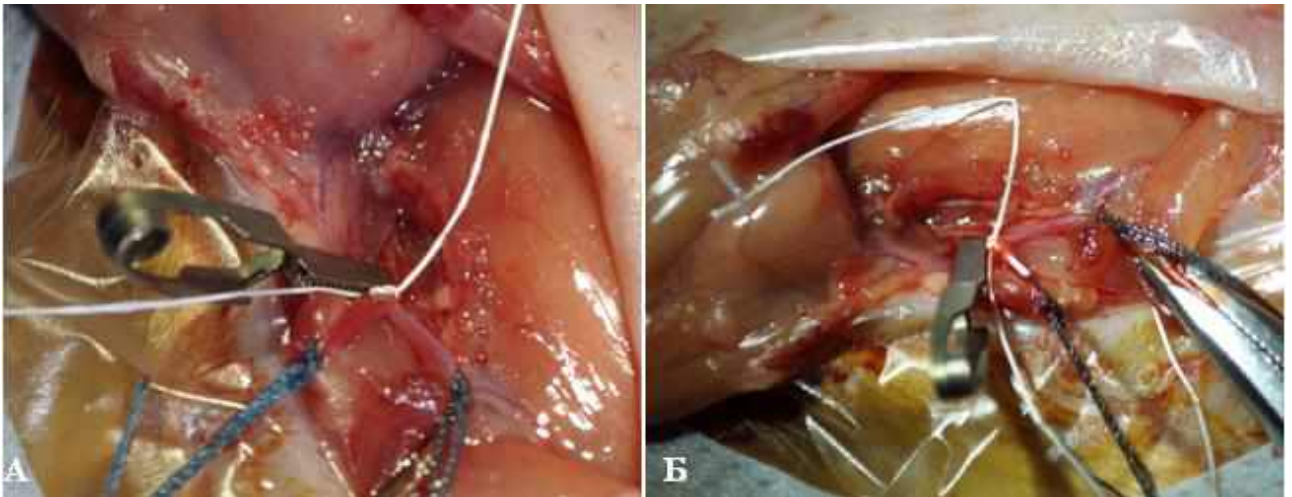


Рис. 2.2.4. Етапи моделювання ОСМА: (А) накладена тимчасова кліпса на ВСА, кукса ЗоСА підтягнута вгору і латерально; (Б) монофіламент введений у просвіт ЗоСА через розріз на її стінці.

Після введення дистального кінця оклюдера у ВСА, лігатуру на куксі ЗоСА щільно затягували, фіксуючи монофіламент у просвіті судини (рис. 2.2.5.А). Кліпси знімали і оклюдер вводили інтракраніально до відчуття легкого опору, що зазвичай виникав при введенні 18–20 мм монофіламента (срібна позначка) і свідчив про його потрапляння у просвіт передньої мозкової артерії та блокування СМА (рис. 2.2.6).

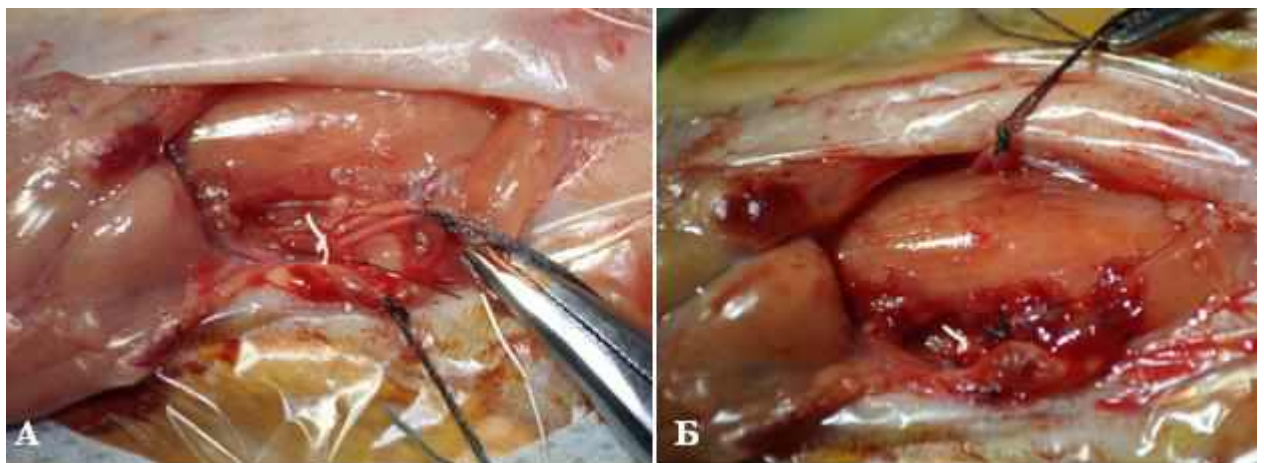


Рис. 2.2.5. Етапи моделювання ОСМА: (А) монофіламент введений через ВСА інтракраніально дистальніше її біфуркації; (Б) перев'язана ліва ЗСА.

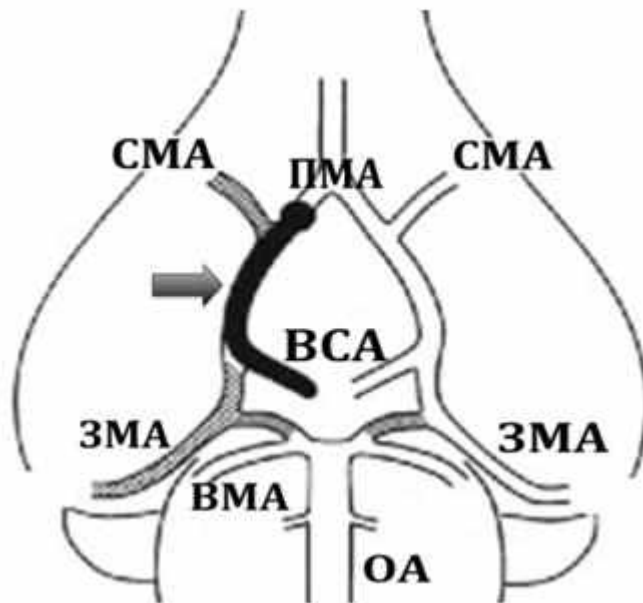


Рис. 2.2.6. Схема розташування оклюдера у просвіті ВСА (дані по **Ф.Ліу і співавт. [43]** зі змінами).

Примітка. ВСА — внутрішня сонна артерія, ПМА — передня мозкова артерія, СМА — середня мозкова артерія, ЗМА — задня мозкова артерія, ВМА — верхня мозочкові артерія, ОА — основна артерія.

Після цього виділяли та перев'язували протилежну (ліву) ЗСА. Кінець оклюдера відсікали і рану зашивали пошарово нитками Vicryl 4/0 (Ethicon, US). Лінію швів обробляли антисептиками. Моделювання ОСМА здійснювали протягом 25–30 хв.

Після проведення вказаних маніпуляцій тварин протягом 2–4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30–33°C) до повного пробудження, що є необхідною вимогою в контексті застосування ксилазину, який може зумовлювати короточасну гіпотермію.

Візуальний контроль повноти оклюзії проводили таким чином: щура утримували за хвіст на відстані 1–2 см від поверхні клітки і спостерігали за передніми кінцівками. В нормі щури симетрично витягують обидві передні кінцівки у напрямку до підлоги. При ОСМА визначається тонічна флексія протилежної (лівої) передньої лапи [227]. Тварин, у яких даний феномен не спостерігався, виключали з дослідження.

2.3. Методика виділення тканини червоного кісткового мозку

Суспензію ТКМ одержували з діяфіза правої стегнової кістки тварин дослідних підгруп 4, 8, 12 і 16 безпосередньо перед трансплантацією за нижченаведеними методиками із незначними модифікаціями [228, 229].

Під інтраперитонеальним наркозом сумішшю розчинів каліпсолю (75 мг/кг) і ксилазину (10 мг/кг) тварин фіксували у стереотаксичному апараті СЕЖ-4 у положенні на животі. Голову тварини виводили в нейтральне положення та іммобілізували за допомогою вушних фіксаторів і носового обмежувача.

Шерсть у ділянці мозкового черепа та правого стегна голили повністю, а шкіру правої стегнової ділянки обробляли двічі розчином бетадину протягом 5 хвилин, а потім 70% розчином етилового спирту. Операційне поле ізолювали за допомогою стерильного покриття. Лінійним розрізом по задній поверхні стегна довжиною до 2 см розсікали шкіру та м'язи. Останні дещо розводили в сторони за допомогою ранорозширювача, оголюючи при цьому діяфіз стегнової кістки на довжині 5 мм. Кістку скелетували, а потім за допомогою стоматологічного бора просвердлювали фрезевий отвір в діяфізі стегнової кістки. За допомогою голки 25G фрезевий отвір розширювали до появи кісткового мозку. За допомогою шприца із канюлею від спінальної голки (Spinocan 18G, BBraun, Німеччина) із тупим кінчиком довжиною 1 см видаляли кістковий мозок в об'ємі 3–4 мм³ і поміщали на чашку Петрі із підігрітим до 37°C 0,9% розчином натрію хлориду. М'які тканини зашивали нитками Vicryl 3/0 (Ethicon, US).

Одержану завесь кісткового мозку відмивали від формених елементів крові підігрітим до 37°C 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 ТКМ 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°C протягом 30–40 хв. Для трансплантації відбирали необхідний об'єм суспензії з розрахунку 20 мкл на 1 тварину, попередньо збовтуючи вміст пробірки. За даними підрахунку у камері Горяєва, у 100 мкл даного розчину містилося близько 5×10^6 клітин кісткового мозку.

2.4. Методика виділення ембріональної нервової тканини

Вагітних самок щурів (15–16 день) знеболювали за допомогою ефіру, після чого проводили декапітацію тварини і її фіксацію на столику у положенні на спині. Шкіру живота голили та обробляли розчинами антисептиків (бетадин, 70% етиловий спирт) і ізолювали асептично. Із серединної лапаротомії широко розкривали черевну порожнину, відсікали роги матки і переносили їх в чашку Петрі зі стерильним 0,9% розчином натрію хлориду. Чашку Петрі у закритому вигляді переносили в стерильний бокс, де з рогів матки вилучали ембріони і переносили їх в нову чашку Петрі зі стерильним сольовим розчином PBS (без іонів Ca та Mg, Sigma). Під хірургічним мікроскопом мозок вилучали з черепної коробки ембріона і за допомогою тонких пінцетів та скальпелів ретельно видаляли мозкові оболонки, а потім вирізали кору головного мозку. Невеликі шматочки кори та смугастого тіла головного мозку інкубували в розчині PBS протягом 15–20 хвилин при кімнатній температурі, а потім подрібнювали мікроножицями та дисоціювали за допомогою багаторазового всмоктування скляними піпетками Пастера з оплавленими кінчиками для запобігання пошкодженню клітин. Отриману тканинну суспензію центрифугували при 1000 об/хв, надосадек зливали, а осад клітин ресуспендували в поживному середовищі Ігла (Sigma). Ступінь дисоціації і стан клітин контролювали під мікроскопом. Отриману тканинну суспензію тримали в CO₂-інкубаторі (Nuve, Туреччина), де постійно підтримується температура 37°C та концентрація 5% CO₂, до моменту трансплантації.

2.5. Методика визначення кількості клітин в тканинній суспензії для трансплантації і їх життєздатності

Для визначення концентрації клітин та підрахунку живих клітин у тканинній суспензії використовували камеру Горяєва і метод забарвлення 0,2% розчином трипанового синього. Для цього суспензію ретельно перемішували, з неї відбирали 0,5 мл і розводили 5 разів 0,2% розчином трипанового синього, після чого інкубували в термостаті при 37°C протягом 3-5 хв. Суспензію знову ретельно перемішували та вводили в камеру Горяєва. Визначення життєздатності клітин у дисоційованій тканинній суспензії ґрунтується на здатності трипанового синього забарвлювати в синій колір тільки загиблі клітини. Підрахунок клітин проводили за формулою:

$$X=N \times S \times 10000, \quad (2.5.1)$$

де X — кількість клітин в 1 см³ суспензії; N — кількість клітин в 25 квадратах; S — кратність розведення суспензії фарбою і 10000 — сталий коефіцієнт.

Процентний вміст живих (незабарвлених) клітин підраховували за формулою:

$$\frac{\text{загальна кількість клітин} - \text{кількість мертвих клітин}}{\text{загальна кількість клітин}} \times 100 \quad (2.5.2)$$

В наших дослідях вміст живих клітин в суспензії ЕНТ досягав 60–71%, ТКМ — 85–90%.

2.6. Методика інтрацеребральної тканинної трансплантації

При виборі терміну проведення інтрацеребральної трансплантації (2 доба після моделювання ОСМА), ми послуговувалися літературними даними та даними, отриманими щодо динаміки відновних процесів у щурів після ОСМА у контрольних підгрупах (ПГр1, ПГр6, ПГр10, ПГр14). Виходячи із даних численних досліджень, ми припускали, що специфічний ефект ТЕНТ і ТТКМ проявлятиметься повною мірою на стадії ранньої нейросудинної репарації і

підвищеної проникності ГЕБ, які виникають в зоні ІУГМ на 1–2 добу після індукції ГФЦІ [14, 15, 67, 70].

Під інтраперитонеальним наркозом сумішшю розчинів каліпсоу (75 мг/кг) і ксилазину (10 мг/кг) тварин фіксували у стереотаксичному апараті СЕЖ-4 у положенні на животі. Голову тварини виводили в нейтральне положення та іммобілізували за допомогою вушних фіксаторів і носового обмежувача (рис. 2.6.1.А).

Шерсть у ділянці мозкового черепа голили повністю, обробляли двічі розчином бетадину протягом 5 хвилин, а потім 70% розчином етилового спирту, після чого ізолювали за допомогою стерильного покриття. Шкіру та окістя розсікали по середній лінії на протязі 2,5 см. Скелетували підлеглу кістку за допомогою дисектора.

М'які тканини розводили за допомогою мікрохірургічного ретрактора. Ідентифікували скелетотопічні орієнтири: сагітальний і вінцевий шви та місце їх перетину (брегма) (рис. 2.6.1.Б).

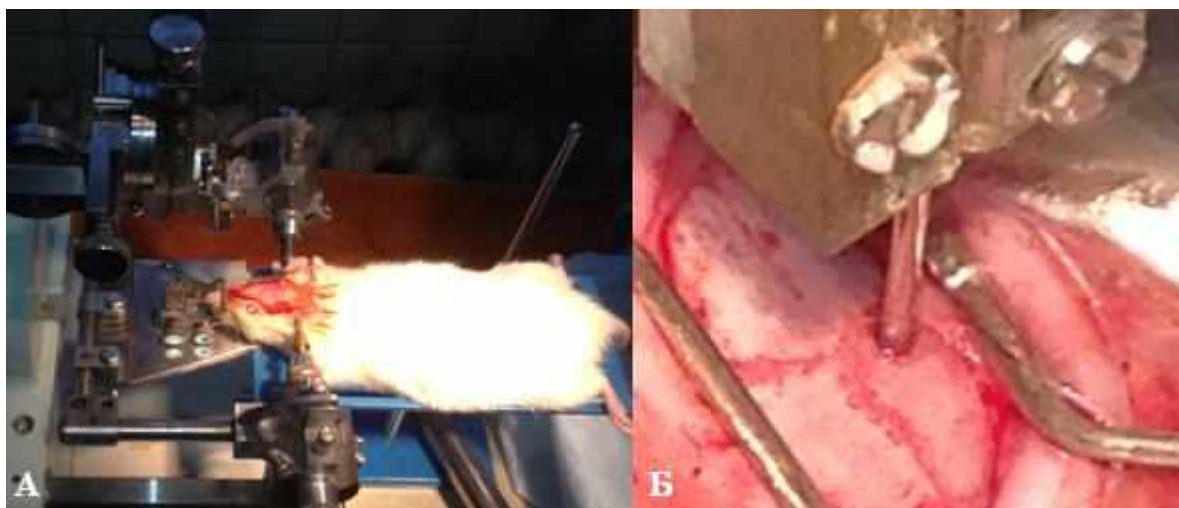


Рис. 2.6.1. Етапи інтрацеребральної стереотаксичної ТТ: (А) щур, зафіксований в стереотаксичному апараті СЕЖ-4 зі стерильним покриттям операційного поля; (Б) розсічені м'які тканини голови, скелетована підлегла кістка, ідентифіковані скелетотопічні орієнтири — брегма, вінцевий і сагітальний шви; накладений фрезевий отвір; голка 26 G введена в мозок щура.

Згідно зі стереотаксичним атласом та за даними попередніх морфологічних досліджень, нами були обрані координати для інтрацеребральної інфузії в ПЗ, яка відповідала соматосенсорній корі та медіальному каудопутамену (медіальні відділи смугастого тіла): 0,3 мм дозадуги від брегми, 3 мм латерально (праворуч) від середньої лінії, 2,0 мм (кора) і 4,0 мм (смугасте тіло) вглиб від твердої мозкової оболонки, відповідно (рис. 2.6.2) [236]. Згідно із зазначеними координатами за допомогою стоматологічного бора накладали фрезевий отвір (рис. 2.6.1.Б).

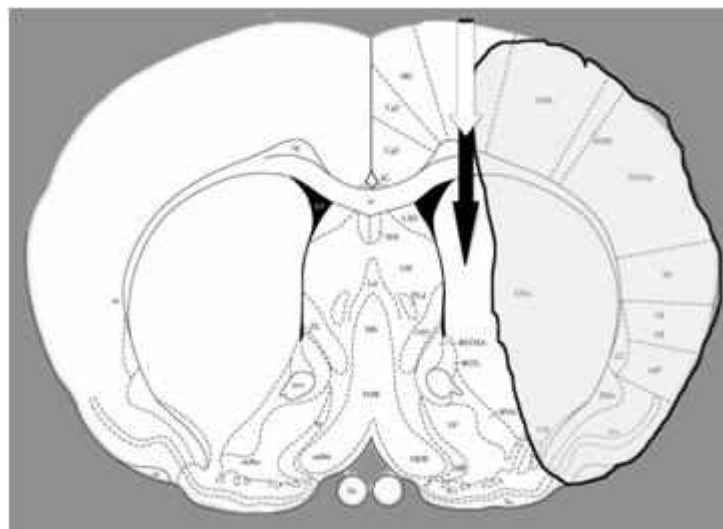


Рис. 2.6.2. Схематичне зображення ділянки інтрацеребральної трансплантації на зрізі мозку згідно зі стереотаксичним атласом (дані за Paxinos G., Watson C. [230, зі змінами]).

Примітка. Білою стрілкою вказана ділянка соматосенсорної кори, чорною — смугасте тіло.

До бічних штанг стереотаксичного апарату приєднували мікроманіпулятор, всередині якого була закріплена голка Гамільтона 26 G (рис. 2.6.1.Б). До останньої приєднували епідуральний катетер 18G (Perifix, B Braun, Німеччина), дистальний кінець якого з'єднували зі шприцем Гамільтона об'ємом 25 мкл, попередньо заповненим тканинною суспензією (залежно від умов експерименту ТКМ — 20 мкл, 1×10^6 клітин, ЕНТ — 20 мкл, 2×10^5 клітин, 0,1 М фосфат-буферний 0,9% розчин натрію хлориду — 20 мкл), зафіксованим в автоматичному мікроін'єкторі (Harvard Apparatus, США).

Тверду мозкову оболонку розтинали за допомогою ін'єкційної голки 26G. Далі зі швидкістю 5 мкл/хв інтрацеребрально вводили тканинну суспензію згідно з вищезгаданими координатами (рис. 2.6.1.Б). 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). М'які тканини зашивали пошарово.

Після операції тварин повертали до їхніх кліток і утримували згідно з умовами, викладеними в п. 2.1.

2.7. Протокол оцінки неврологічного дефіциту в експериментальних тварин

Поведінкові тести є необхідною складовою доклінічних досліджень на експериментальних моделях ішемічного інсульту [231]. Детальна оцінка неврологічних функцій і поведінкових реакцій може потребувати значної сукупності тестів, кожен з яких відповідає певному аспекту поведінки тварини. Оптимальний набір тестів повинен відповідати вимогам і завданням конкретного експерименту й бути чутливими до виду та вираженості дефіциту, передбачуваного після моделювання неврологічного ушкодження. Оскільки наслідками ішемічного інсульту в людини є переважно сенсорні, моторні та когнітивні порушення, експериментальні тести після ГФЦІ у тварин повинні бути спрямовані на кількісну оцінку даних порушень і бути незалежними від компенсаторної поведінки, зумовленої багаторазовим повторюванням процедури та навчанням [232–234].

Враховуючи вищезазначене, нами був розроблений оптимізований протокол оцінки неврологічного дефіциту, який включає тести для оцінки соматосенсорної, моторної і рефлекторної функції. Вираженість неврологічного дефіциту оцінювали у 84 тварин групи 1 (по 18 у ПГр1, ПГр3, ПГр4 і ПГр5 і 12 в ПГр2) на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу після моделювання ОСМА.

За даними літератури, максимально виражені функціональні порушення спостерігаються на кінець 1 доби після індукції ОСМА [227]. Оскільки комплексна оцінка диференційованих сенсомоторних функцій ускладнена в зв'язку з необхідністю адаптації тварин до неврологічного дефіциту і труднощів при харчуванні, обумовленими ішемією жувальної мускулатури внаслідок пересічення ЗоСА, через 1 добу нами була використана шкала Bederson J.B. і співавт. для глобальної оцінки неврологічної симптоматики у щурів. Дана шкала дозволяє оцінити кардинальну ознаку фокальної ішемії — флексію контралатеральної кінцівки та є особливо чутливою до ушкодження смугастого тіла [233].

Оцінку проводили таким чином. Щура обережно піднімали за хвіст на висоту до 1 м над підлогою та спостерігали за передніми кінцівками. Відповідно до даної шкали, інтактний щур симетрично витягує обидві кінцівки у напрямку до горизонтальної поверхні (0 балів). Легкий дефіцит визначається у разі тонічної флексії кінцівки, протилежної стороні ураження (1 бал, рис. 2.7.1.А).

Далі щура поміщали на великий аркуш м'якого, вкритого пластиком лабораторного паперу, який щур може міцно вхопити за допомогою кігтів. Піднімаючи щура за хвіст, наносили легкий латеральний поштовх позаду плеча тварини так, щоб передні лапи щура сковзнули по паперу на кілька сантиметрів. Дану маніпуляцію повторювали кілька разів у різних напрямках. Інтактні щури або щури з легким дефіцитом демонстрували однакову резистентність до поштовху в обох напрямках. При помірній дисфункції спостерігалася знижена резистентність до латерального поштовху (2 бали).

У подальшому щура відпусали та дозволяли йому вільно рухатися і визначали наявність циркумдукції (рис. 2.7.1.Б).

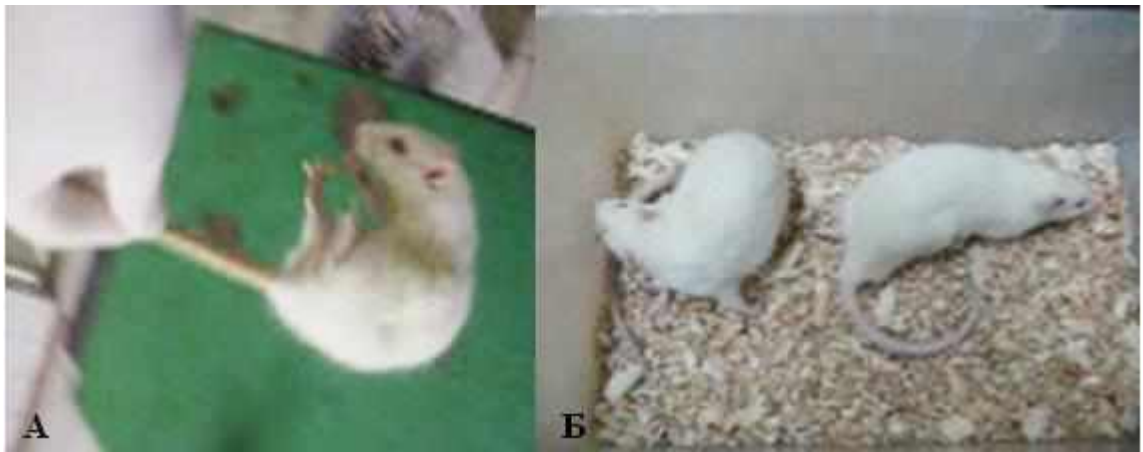


Рис. 2.7.1. Тестування щура в післяопераційному періоді на наявність флексії передньої контралатеральної кінцівки (А) і циркумдукції (Б).

У щурів, які оберталися у паретичний бік, відзначали виражений дефіцит (3 бали). Хоча не у всіх тварини з ОСМА виявляється знижена резистентність до бічного поштовху та циркумдукція, дана шкала дозволяє швидко провести пілотну оцінку сумарного неврологічного дефіциту та виключити з експерименту тварин із неповною ОСМА.

Перед тим, як проводити комплексну оцінку неврологічного дефіциту, тварин приручали та привчали до дослідника.

Соматосенсорну функцію оцінювали за допомогою тесту з клейкою стрічкою (ТКС) [232]. Для цього тварину виймали з клітки та наклеювали адгезивну стрічку зі стандартного лабораторного паперу на дистальну частину передньої лапи, позбавлену шерсті, по колу на 360° таким чином, щоб обидва кінці стрічки виступали та склеювалися один з одним, а передня лапа дещо виступала допереду від сформованої манжетки (рис. 2.7.2.А).

Одразу після наклеювання стрічки тварину поміщали назад до клітки і починали спостереження. Щур використовує свої зуби та, меншою мірою, протилежну (ліву) передню лапу для зняття стрічки (рис. 2.7.2.Б).

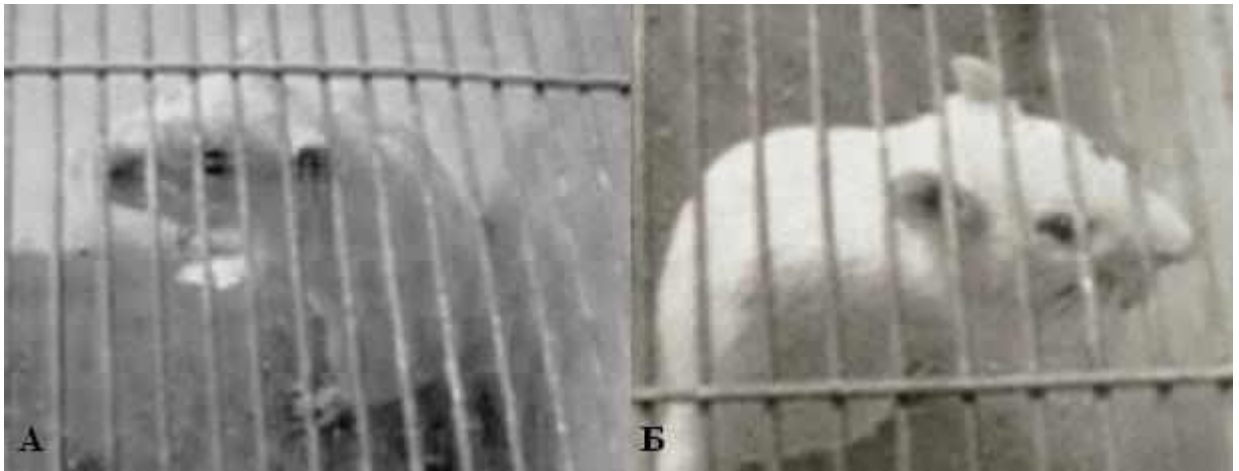


Рис. 2.7.2. Неврологічне тестування щура (ТКС): (А) клейка стрічка обгорнута навколо передньої лапи щура; (Б): тварина використовує зуби та протилежну передню лапу для зняття стрічки.

Перед початком спостереження запускали два таймери: один таймер був включений постійно, а другий — під час спроб тварини видалити стрічку. Кожна спроба тривала 30 с. Шукане співвідношення становить кількість секунд, які тварина реагує на стимул, поділених на 30 с. Даний тест повторювали з протилежною кінцівкою. Кожна сесія складалася з 5 спроб на кожну кінцівку. З 5 спроб обирали два найкращі результати. Після кожного тесту стрічку видаляли за допомогою теплої води та мила.

Остаточний результат виражали у вигляді співвідношення за формулою:

$$x = [(x_1 + x_2)/30]^{-2} / [(y_1 + y_2)/30]^{-2}, \quad (2.7.1)$$

де x — кінцевий результат, x_1 і x_2 — кількість секунд, витрачених твариною на зняття стрічки з ураженої (лівої) кінцівки у найкращих спробах, y_1 і y_2 — кількість секунд, витрачених твариною на зняття стрічки з інтактної (правої) кінцівки, 30 — тривалість спроби (30 с), 2 — дві спроби із найкращим результатом.

При правильному виконанні даний тест чітко відображає фокальний характер ушкодження, демонструючи виражену різницю у балах ураженої та інтактної кінцівок протягом всіх днів спостереження.

Більшість кіркових і підкіркових моделей інсульту у гризунів призводить до порушення принаймні одного із способів локомоції, таких як ходіння,

обертання та плавання. Рухову активність тварин вивчали за допомогою тесту ходіння по спеціально сконструйованому бруску з опорами, який звужується в кінці (ТХБЗОК) [231]. У цьому тесті щурів навчали долати відстань по дерев'яному бруску, виготовленому з 2 склеєних між собою дошок, обидві довжиною 165 см і висотою 2 см. Нижній брусок на відрізку довжиною 15 см має ширину 10 см, верхній брусок — 6 см. Далі на довжині 135 см брусок звужується, при цьому ширина верхньої дошки постійно менша за ширину нижньої на 2 см. На довжині останніх 15 см ширина верхньої дошки становить 1,5 см, а нижньої — 5 см. Перші 15 см бруска є «стартовим», а останні 15 см — «фінішним» майданчиком. 2 см запасу по обидва боки на нижній дошці слугують опорою для щура при зісковзуванні лап. Це запобігає виникненню компенсаторних рухових стратегій і допомагає виявити справжній руховий дефіцит. Під час долання твариною відстані враховується кількість зісковзування лап із бруска. Для полегшення оцінки рухових порушень довжина бруска поділяється на 3 відрізки по 45 см, а верхня дошка зафарбовується у чорний колір.

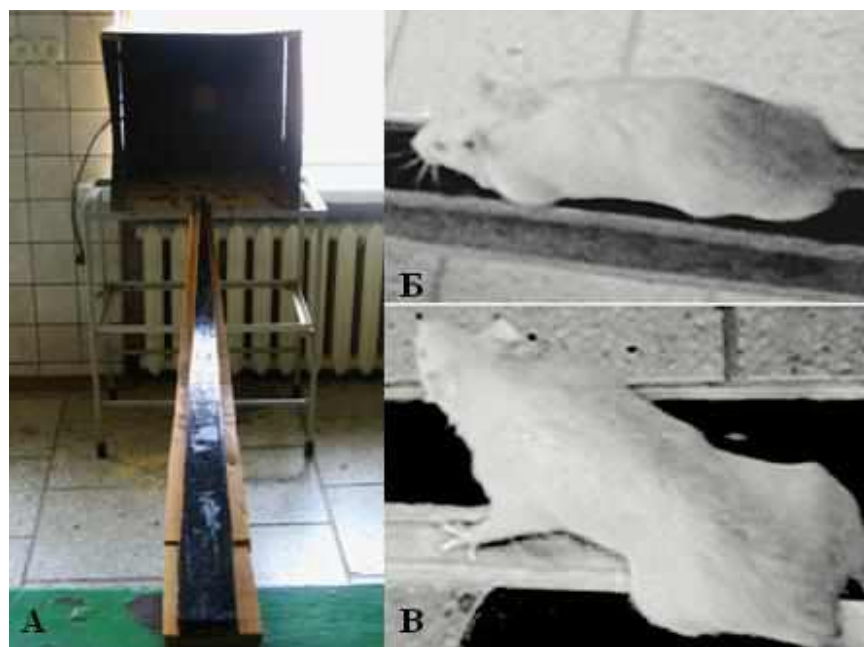


Рис. 2.7.3. Неврологічне тестування щура (ТХБЗОК): (А) загальний вигляд експериментальної кімнати; (Б) інтактний щур не використовує опори при проходженні бруска; (В) у щура із ОСМА спостерігається зісковзування уражених кінцівок на опору.

Кінцевим пунктом шляху є знайома для щура клітка, яка містить шматочки їжі для заохочення тварини проходити відстань по бруску (рис. 2.7.3.А). Інтактний щур легко навчається ходити по бруску по верхній дошці, рідко використовуючи опори (рис. 2.7.3.Б). Тварина з ураженими кінцівками буде використовувати опору для кроків на боці бруска, який відповідає неврологічному дефіциту (рис. 2.7.3.В). Уражені кінцівки будуть спиратися на опору в широкій частині бруска частіше за інтактні кінцівки і ще частіше по мірі звуження 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 однобічного ушкодження, кількість контралатеральних і іпсилатеральних зісковзувань кінцівок на кожному відрізку поділяється на загальну кількість 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. Остаточний результат асиметрії для передніх кінцівок виражали у вигляді a , а для задніх — у вигляді b :

$$a = [\Sigma(x_1/n_1 + x_2/n_2 + x_3/n_3) - \Sigma(y_1/n_1 + y_2/n_2 + y_3/n_3)]/5, \quad (2.7.2)$$

$$b = [\Sigma(z_1/m_1 + z_2/m_2 + z_3/m_3) - \Sigma(s_1/t_1 + s_2/t_2 + s_3/t_3)]/5, \quad (2.7.3)$$

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 інтактної 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 інтактної задньої кінцівки; 5 — кількість спроб.

Асиметрія у використанні передніх кінцівок є однією з основних ознак фокального ураження сенсомоторної кори та підкіркових рухових центрів. Дану дисфункцію дозволяє виявити тест постановки передньої лапи у відповідь на стимуляцію вібрисів (ТППЛСВ, рис. 2.7.3) [231, 233, 234].



Рис. 2.7.3. Неврологічне тестування щура (ТППЛСВ): щур ставить передню лапу на стіл у відповідь на подразнення вібрисів з тієї ж сторони (дані за Schallert T., Woodlee M.T. [231]).

Цей тест також дає змогу провести комплексну оцінку рефлекторної та інтегративної сенсомоторної функції. При проведенні даного тесту тварина утримується за тулуб, при цьому передні кінцівки вільно звисають. За допомогою кількаразового обережного піднімання і опускання досягають максимальної релаксації тварини. Незалежне тестування кожної передньої кінцівки проводиться легким доторком вібрисів з відповідного боку до кінчика стола один раз протягом спроби. Виконували 10 спроб для кожної кінцівки протягом одного тестового дня. Після кожних 3 спроб тварині давали кілька секунд постояти на столі.

Інтактні тварини швидко ставлять передню лапу з обох боків на кінчик стола. Щури з однобічним фокальним ураженням мозку демонструють різні ступені порушення постановки лапи, при цьому впевнено ставлячи неушкоджену кінцівку. 1 бал присвоюється кожен раз, коли щур ставить передню кінцівку на кінець стола у відповідь на подразнення вібрисів. Відсоток невдалих спроб враховується (кількість пропущених \times 10) для ураженої та інтактної кінцівок. Як правило, експериментальні тварини успішно ставлять інтактну кінцівку у 100% спроб. Остаточний результат виражали у вигляді усередненого відсотка успішних спроб.

2.8. Методика визначення об'єму ділянки інфаркту мозку

Волюметричне дослідження проводилося у 40 тварин групи 3 ($n=10$ у кожній підгрупі) на 7 і 14 добу після ОСМА за допомогою імерсії фіксованих зрізів мозку тварини у 2% розчині 2,3,5-трифенілтетразолію хлориду (ТТХ, Sigma, США). ТТХ є жовтуватим порошком, а за хімічною структурою — протонним акцептором для багатьох піридинових нуклеотид-зв'язаних дегідрогеназ (наприклад, сукцинат-дегідрогенази). Розчин ТТХ у 0,9% розчині натрію хлориду при температурі 37°C є безбарвним, проте у живій тканині мозку під впливом мітохондріальних дегідрогеназ ця речовина відновлюється до червоного ліпід-розчинного формагану, в той час як нежива тканина чи ділянка інфаркту залишається незабарвленою [235]. Це дозволяє легко відмежувати зону ішемії від інтактної мозкової речовини (рис. 2.8.1.).

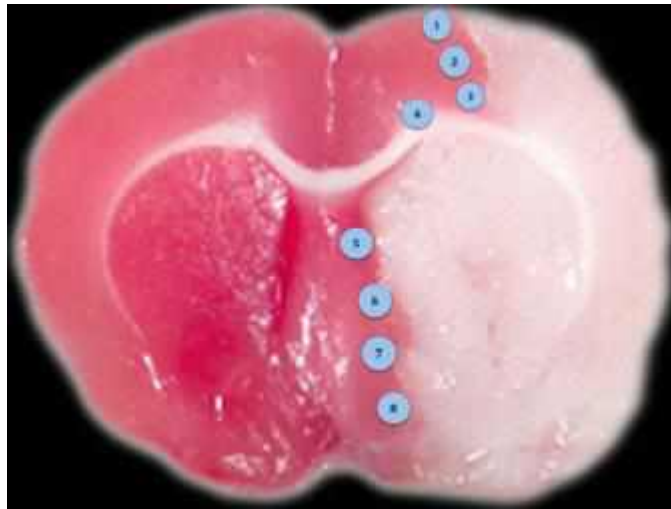


Рис. 2.8.1. Кріостатні зрізи мозку щурів після їх фарбування ТТХ через 24 години після ОСМА.

Примітка. Зона інфаркту має біле забарвлення. Кругами позначені поля зору, які були обрані для кількісної оцінки ангиогенезу в ПІЗ.

Тварин знеболювали сумішшю каліпсолю (75 мг/кг) і ксилазину (10 мг/кг) внутрішньоочеревинно і проводили прижиттєву фіксацію тканин за допомогою транскардіальної перфузії. Передню черевну стінку розсікали лінійним розрізом від пупка до мечоподібного відростка та розсікали діафрагму. Утримуючи мечоподібний відросток за допомогою затискачів, V-подібно у напрямку до пахвових ямок розсікали грудну клітку. Мечоподібний відросток відводили рострально та візуалізували грудну порожнину. Видаляли сполучну тканину навколо серця таким чином, щоб серце можна було утримувати між пальцями, верхівкою донизу. Перфузійну голку 22 G вводили через верхівку серця в лівий шлуночок та просували до аорти так, щоб кінчик голки можна було бачити в дузі аорти (рис. 2.8.2).

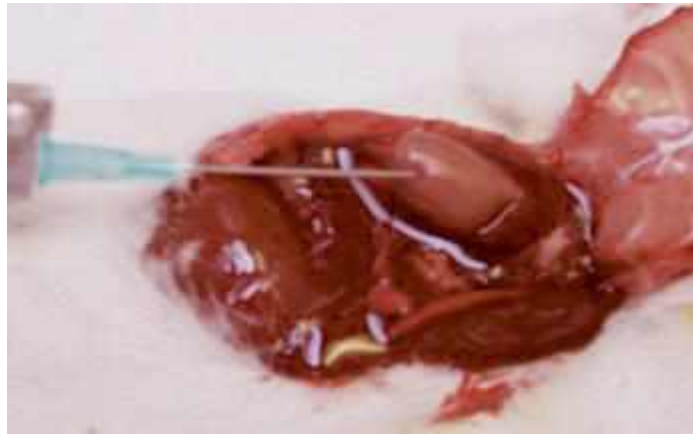


Рис. 2.8.2. Транскардіальна перфузія щура.

Примітка. Голка введена у порожнину лівого шлуночка.

Надсікали стінку правого передсердя, даючи вихід венозній крові, в той час, як в аорту вводили близько 200 мл холодного 0,9% розчину натрію хлориду під тиском близько 100 мм.рт.ст. Перфузію продовжували до тих пір, поки рідина, яка витікала з серця, не ставала прозорою. Далі проводили декапітацію тварини за допомогою гострих ножиць і видаляли мозок. Мозок відмивали у чашці Петрі із фізіологічним розчином і за допомогою вібратора робили 6 послідовних фронтальних зрізів головного мозку товщиною 2 мм у напрямку від лобного до потиличного полюса. Останні поміщали на 15 хвилин температури 37°C. 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>).

Оскільки збільшення інфарктної тканини за рахунок набряку та її зменшення за рахунок зморщування можуть призвести до переоцінки та недооцінки об'єму зони інфаркту, відповідно, ми проводили розрахунок коригованої площі зони інфаркту на зрізі за формулою [236]:

$$S_1 = S_{1TC} - S_{1Ni} \quad (2.8.1)$$

де S_1 — коригована площа зони інфаркту, S_{1TC} — загальна площа протилежної (інтактної) півкулі, S_{1Ni} — ділянка інтактної тканини в ураженій півкулі мозку.

Скориговану величину об'єму інфаркту одержували за допомогою формули:

$$V_1 = \Sigma S_1 n_1 \quad (2.8.2)$$

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

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

$$V = V_1/V_{Ni} \quad (2.8.3)$$

де V_1 — коригований об'єм зони інфаркту, V_{Ni} — об'єм інтактної півкулі мозку.

2.9. Методики морфологічних досліджень

З метою якісної оцінки динаміки патоморфологічних змін в ураженій ділянці мозку, в тому числі ангіогенезу, як одного з основних репаративних процесів, у 21 щура групи 4 (6 у ПГр14 та по 5 — у ПГр15-17) проводили детальне гістологічне дослідження фіксованих зрізів тканин головного мозку на 1, 3, 7, 14, 21 і 28 добу після моделювання ОСМА відповідно до рекомендацій дослідників [237].

Тварин анестезували за допомогою парів ефіру, після чого здійснювали декапітацію. Мозок швидко виймали, відмивали від крові та тканинного детриту у підігрітому до температури 37°C 0,9% розчині натрію хлориду, а потім за допомогою вібратора робили 4 фронтальні зрізи візуально ушкодженої тканини мозку разом із крайовими зонами із кроком 2 мм за координатами 1,5 мм допереду і 6,5 мм дозаду від брегми. Одержані таким чином зрізи вміщували у 10% розчин формаліну на 0,1 М фосфатному буфері (рН=7,4), протягом доби витримували у зростаючих концентраціях етилового спирту (70°, 96°, 99°), хлороформі (протягом 24 год), згодом — у хлороформі та парафіні і формували парафінову заливку. Парафінові зрізи товщиною 6–8 мкм

профарбовували гематоксилін-еозином і тіоніном за методом Ніссля (реагенти виробництва Bio-Optica, Італія). Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлооптичного мікроскопа Olympus BX 51 з наступною цифровою фотореєстрацією камерою Canon PowerShot S50 (Canon, Японія).

У отриманих препаратах визначали розміри некрозу в правій півкулі головного мозку, ушкоджені структури мозку та кількість судин у зоні, суміжній з ділянкою ушкодження. Структури мозку ідентифікували за атласом [230].

Кількісний аналіз активності постішемичного церебрального ангиогенезу проводили у 84 щурів групи 3: n=12 — у ПГр2 — по 6 на 1 і 3 добу після ПОСМА; n=36 — у ПГр1 і ПГр10 — по 6 тварин на 1, 3, 7, 14 і 28 добу після ОСМА; n=36 — у ПГр11-13 — по 6 тварин на 7, 14 і 28 добу після ОСМА).

Для визначення кількості судин в ПЗ були використані моноклональні антитіла до маркера CD34 (QVEnd10, ДАКО, Данія). Останній є одноланцюговим трансмембранним білком з молекулярною масою приблизно 116 кДа, який експресується на ендотеліоцитах, ЕПК і ГСК і клітинах-попередниках, ембріональних фібробластах і деяких гліальних клітинах [238, 239]. Таким чином, активність даного маркера, визначена за допомогою імуногістохімічної детекції, може опосередковано свідчити про наявність новоутворених судин.

Імуногістохімічне дослідження проводилось двох- і трьохкроковим авідин-біотиновим методом 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 хвилин, промивали в дистильованій воді і з метою демаскування антигенних детермінант піддавали температурній обробці в буфері TBS з pH=6,0 (Target retrieval solution, ДАКО, Данія) на водяній бані або в СВЧ-пічі протягом 20 хвилин. Для деяких антитіл використовували EDTA-буфер (pH=9,0) з температурною обробкою протягом 30–35 хвилин. Після промивання в розчині TBS 3 рази по 5 хвилин наносили первинне мишаче або кроляче антитіло.

Інкубацію з первинним антитілом проводили в вологій камері протягом 30-60 хвилин в залежності від властивостей маркерів (цитоплазматичне, мембранне або ядерне фарбування) при кімнатній температурі. Після інкубації з первинними антитілами зрізи промивали в TBS 3 рази по 5 хвилин, потім на 30 хвилин при кімнатній температурі наносили авідин-біотиновий комплекс, кон'югований з пероксидазою з використанням LSAB+ (DAKO, Данія) або системи дирекції EnVision+ (DAKO, Данія) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Виявлення пероксидазної активності здійснювали за допомогою DAB+ (DAKO, Данія). Ядра дофарбовували гематоксиліном. При використанні системи дирекції EnVision+ (DAKO, Данія) методика скорочувалась на один крок в зв'язку з тим, що після первинного антитіла наносили полімер, кон'югований з вторинним антитілом до імуноглобуліну миші і кроля і з ферментом.

Підрахунок кількості судин в ПЗ головного мозку щурів проводили на парафінових зрізах головного мозку товщиною 6–8 мкм у 8 полях зору (розмір 1 поля — близько 15 мкм²), які відповідали ПЗ, після чого визначали середню кількість судин на поле зору у вигляді показника середнього арифметичного (рис. 2.8.1) [240].

2.10. Статистична обробка даних експериментальних досліджень

Статистичну обробку первинних цифрових експериментальних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення здійснювали за допомогою пакету програм SPSS 20.0 (IBM, США) для операційної системи OS X 10.9.4 (Apple, США).

Для порівняльної оцінки результатів моніторингу неврологічних функцій та з метою встановлення достовірності різниці показників між порівнюваними групами та підгрупами використовували однофакторний дисперсійний аналіз із функцією повторних вимірювань (One-way repeated measures Analysis of Variance — ANOVA), а для оцінки морфометричних даних (об'єму зони

інфаркту мозку та кількості мічених антитілами до CD34 — позитивних судин) — двохфакторний дисперсійний аналіз (2-Way ANOVA) для загальних лінійних моделей (GLM — General Linear Models) із подальшою постпроцесинговою обробкою (post-hoc testing) для виявлення різниці між групами за допомогою тестів Bonferroni та Scheffe, згідно з рекомендаціями експертів у цій галузі [241].

Нормальний розподіл величин був підтверджений за допомогою тесту Shapiro-Wilk при збереженні нульової гіпотези за умови $p > 0,05$. Обов'язковими умовами виконання дисперсійного аналізу була гомогенність варіативності розподілу величин, яка перевірялася за допомогою тесту Левена, а також гомогенність рівноцінності коваріантних матриць, яка була підтверджена за допомогою тесту Бокса і тесту сферичності Мууклі (обидва позитивні при збереженні нульової гіпотези, $p > 0,05$).

Для даних моніторингу неврологічних функцій статистичний аналіз починали з тестування щодо наявності взаємодії “час-процедура” на рівні значущості $p = 0,1$. Якщо жодної взаємодії не було виявлено, проводили тестування загального лікувального ефекту ТТ на рівні $p = 0,05$. Аналіз впливу ТТ на середні показники неврологічного дефіциту в підгрупах проводили у вищезазначені терміни на рівні значущості $p = 0,05$ за умови, якщо було виявлено взаємозалежність “час-процедура” на рівні $p = 0,05$ або загальний лікувальний ефект НТ на рівні $p = 0,05$. В протилежному випадку підгруповий аналіз вважався оглядовим.

Враховуючи невелику кількість спостережень у ПГр1 ($n = 5$) і ПГр2 ($n = 6$), а також відсутність нормального розподілу величин, для статистичної оцінки результатів неврологічного тестування за шкалою Bederson J.B. і співавт. на 1 і 3 добу після псевдооклюзії та ОСМА, відповідно, використовували непараметричний U тест Манна-Уїтні.

Одержані результати виражали у вигляді $M \pm m$, де M — середнє арифметичне значення, а m — середнє квадратичне відхилення. Відмінності вважалися статистично вірогідними за умови $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ДИНАМІКА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОРУШЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ШЕМИЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА ТКАНИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

3.1. Результати оцінки неврологічного статусу тварин за допомогою шкали Bederson J.V. і співавторів

ОСМА у тварин всіх експериментальних підгруп на 1 добу після моделювання призводила до появи вираженого контралатерального моторного дефіциту у вигляді тонічної флексії лівої передньої кінцівки при піднятті за хвіст (1 бал за шкалою Bederson J.V. і співавторів) (рис. 3.1.1). При цьому положення ураженої кінцівки варіює від помірного згинання зап'ястка та приведення плеча з розгинанням у ліктьовому суглобі до повного згинання зап'ястка, ліктьового суглоба, приведення та внутрішньої ротації плеча. У більшості тварин всіх експериментальних груп відзначалися знижена резистентність до латерального поштовху (2 бали) і циркумдукція ліворуч (3 бали) (табл. А.1–А.4, розд. “Додатки”).

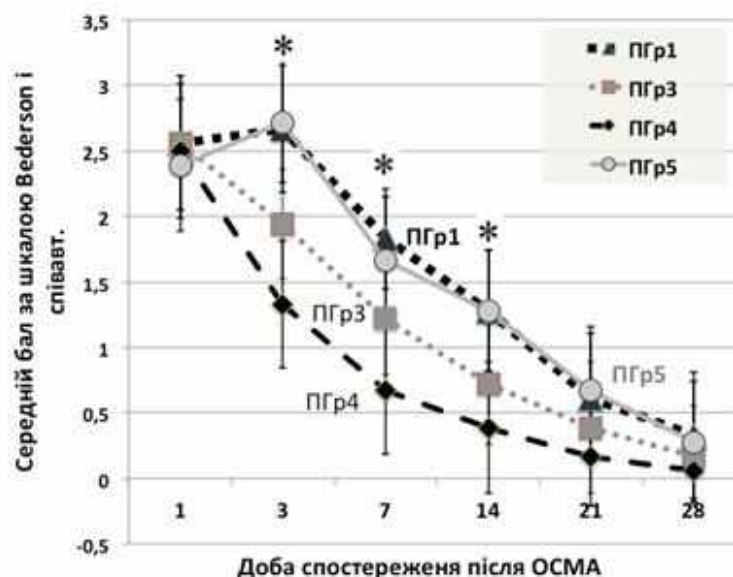


Рис. 3.1.1. Графічне зображення порівняльної динаміки показника тонічної флексії лівої передньої кінцівки за шкалою Bederson J.V. і співавторів.

Примітка. ПГр1 — підгрупа 1, ПГр3 — підгрупа 3, ПГр4 — підгрупа 4, ПГр5 — підгрупа; * — статистично достовірні відмінності між групами ПГр1 і ПГр5, з одного боку, і ПГр 3 і ПГр4, з іншого, а також між ПГр3 і ПГр4, відповідно ($p < 0,001$).

В той же час у частини тварин ПГр2 також відзначалася тонічна флексія контралатеральної кінцівки наприкінці 1 доби після ОСМА, її ступінь був значно менш вираженим (середній бал у ПГр2 — $0,5 \pm 0,1$, рис. 3.1.2).

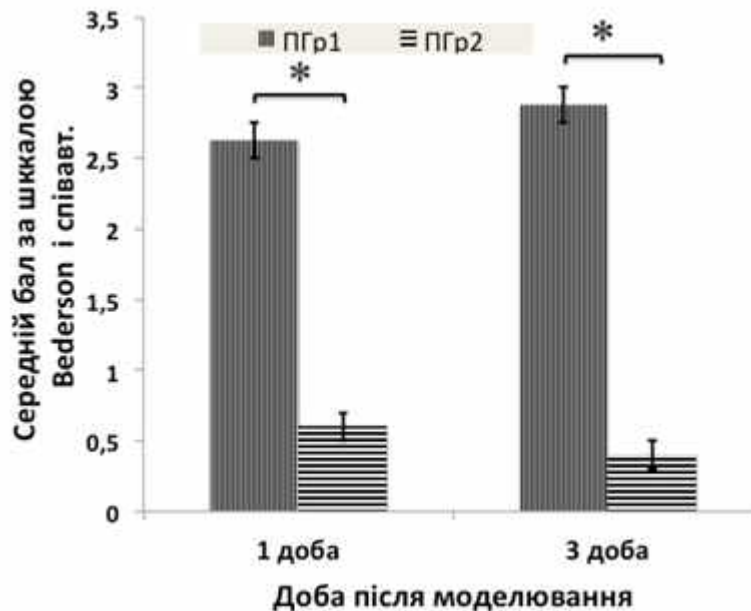


Рис. 3.1.2. Графічне зображення порівняльної динаміки показника тонічної флексії лівої передньої кінцівки за за шкалою Bederson J.V. у ПГр1 (n=5) і ПГр2 (n=8) на 1 і 3 добу після ОСМА та ПОСМА, відповідно.

Примітка. ПГр1 — підгрупа 1, ПГр2 — підгрупа 2, * — статистично достовірні відмінності між ПГр 1 і ПГр 2 ($p < 0,01$).

Даний факт може бути пов'язаний із гемодинамічними коливаннями, зумовленими послідовною оклюзією обох ЗСА у тварин ПГр2 (ПОСМА). Втім, вже на 3 добу у всіх тварин ПГр2 відзначався швидкий регрес даного симптому, тоді як у щурів із ОСМА він утримувався протягом усього періоду спостереження (рис. 3.1.2). При порівнянні середнього показника в ПГр1 і ПГр2 на 1 і 3 добу після ОСМА і ПОСМА, відповідно, була виявлена статистично значуща різниця ($p = 0,001$), яка свідчить про ефективність ОСМА і відсутність впливу хірургічної травми (ПОСМА) на неврологічний статус піддослідних тварин.

На 3 добу після ОСМА у ПГр1 (середній бал — $2,7 \pm 0,5$) і ПГр5 (середній бал — $2,6 \pm 0,5$) спостерігалася збільшення кількості тварин із циркумдукцією. В

той же час у тварин ПГр3 (ТЕНТ) у деяких тварин відзначалася лише знижена резистентність до латерального поштовху (середній бал — $1,9 \pm 0,4$), а більше, ніж у 50% тварин у ПГр4 циркумдукція взагалі не спостерігалася (середній бал — $1,3 \pm 0,5$). При порівняльному аналізі відзначалися статистично достовірні відмінності між показниками за шкалою Bederson і співавт. між ПГр1 і ПГр5, з одного боку, та ПГр3 і ПГр4, з іншого ($F=26,97$, $df=3$, $p<0,001$).

На 7 добу після ОСМА у ПГр1 (середній бал — $1,81 \pm 0,4$) і ПГр5 (середній бал — $1,71 \pm 0,5$) у деяких тварин все ще відзначалася циркумдукція, проте в більшості вона зникала і була помітна лише знижена резистентність до латерального поштовху. Натомість у тварин ПГр3 (середній бал — $1,2 \pm 0,4$) і ПГр4 (середній бал — $0,7 \pm 0,5$) при тестуванні спостерігали лише тонічну флексію лівої передньої кінцівки. При візуальному спостереженні щури після ТЕНТ (ПГр3) і ТТКМ (ПГр4) за руховою активністю не відрізнялися від інтактних.

При статистичному аналізі одержаних показників у ПГр1 і ПГр5 достовірних відмінностей не було виявлено протягом усього періоду спостереження (1–28 доба, $p=1,0$ згідно з корекцією Bonferroni, $p=0,964$ за Scheffe). Між середніми показниками ПГр3 ($1,2 \pm 0,4$) і ПГр4 ($0,7 \pm 0,5$) відзначалася статистично значуща різниця ($p=0,004$ згідно з Bonferroni і $p=0,008$ за Scheffe). Достовірні відмінності виявлені також між ПГр3 і ПГр4, з одного боку, та ПГр1 і ПГр5, з іншого ($p<0,001$).

Вже на 14 добу в тварин всіх експериментальних груп помітний спонтанний регрес рухових порушень. При цьому навіть у тварин ПГр1 (середній бал — $1,28 \pm 0,5$) і ПГр5 (середній бал — $1,31 \pm 0,5$) не виявлена циркумдукція і лише в деяких тварин відзначається знижена резистентність до латерального поштовху. На противагу ПГр1 і ПГр5, лише у частини щурів із ТТКМ (ПГр4) і ТЕНТ (ПГр3) відзначалася тонічна флексія при утримуванні тварини за хвіст (середній бал — $0,4 \pm 0,5$ і $0,7 \pm 0,5$, відповідно). Тоді як між ПГр3 і ПГр4, з одного боку, і ПГр1 і ПГр5, з іншого, утримувалася статистично значуща різниця ($p<0,001$), як при порівнянні ПГр1 і ПГр5, так і при порівнянні

ПГр3 і ПГр4, достовірних відмінностей не було виявлено ($p=1,0$ згідно з корекцією Bonferroni, $p=0,964$ за Scheffe).

На 21 і 28 добу спостереження очевидний спонтанний регрес неврологічних порушень за шкалою Bederson J.V. і співавт., що унеможливило порівняння між підгрупами через статистичну незначущість відмінностей. Втім, в окремих тварин ще на 28 добу спостерігалось незначне згинання лівої передньої лапи у променево-зап'ястковому суглобі.

На фоні спонтанного регресу неврологічного дефіциту за даною шкалою, темпи його регресу в ПГр3 і ПГр4 були швидшими з 3 по 14 добу, ніж в інших підгрупах, а в ПГр4 — швидше, ніж в ПГр3.

3.2. Результати тесту ходіння по бруску з опорами, який звужується в кінці

На 1 добу після ОСМА у тварин всіх експериментальних підгруп відзначалися виражені локомоторні порушення, які проявлялися асиметрією використання лівих (паретичних) кінцівок під час проходження відстані по бруску, особливо останніх 30 см. В деяких випадках тварини не могли подолати всю відстань без додаткової підтримки дослідника через зісковзування в паретичний бік, незважаючи на наявність опор (рис. 3.2.1).

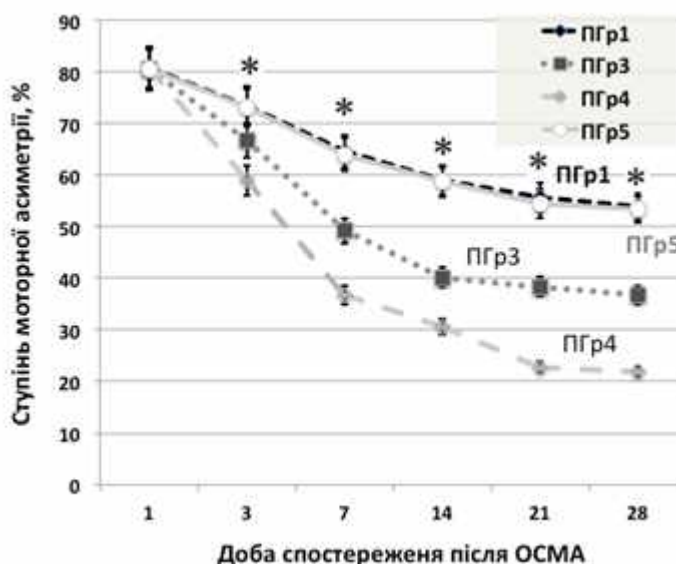


Рис. 3.2.1. Графічне зображення порівняльної динаміки показника моторної асиметрії за даними ТХБЗОК.

Примітка. * — статистично достовірні відмінності між групами ПГр1 — підгрупа 1, ПГр3 — підгрупа 3, ПГр4 — підгрупа 4, ПГр5 — підгрупа; * — статистично достовірні відмінності між групами ПГр1 і ПГр5, з одного боку, і ПГр3 і ПГр4, з іншого, а також між ПГр3 і ПГр4, відповідно ($p < 0,001$).

Моторний дефіцит за даним тестом мав тенденцію до незначного регресу та стабілізації до 28 доби спостереження у ПГр1 і ПГр5 (рис. 3.2.1, табл. А.5–А.7, розділ “Додатки”).

Вже на 3 добу після ОСМА (1 доба після ТТ) тварини навчалися стабілізувати тулуб і повні зісковзування реєструвалися рідко, переважно в кінці дистанції і в тварин з ПГр1 і ПГр5. У цей термін спостерігаються статистично значущі відмінності середнього відсотка моторної асиметрії кінцівок при порівнянні ПГр1 ($73,4 \pm 1,6$, $p < 0,001$ за Scheffe і Bonferroni) і ПГр5 ($73,1 \pm 1,8$, $p = 0,002$ за Scheffe і Bonferroni), з одного боку, і ПГр3 ($66,6 \pm 1,4$), з іншого ($F = 26,97$, $df = 3$).

Зареєстровані також достовірні відмінності між ПГр4 (59 ± 2), з одного боку, і ПГр1 і ПГр5, з іншого ($p < 0,001$ за Scheffe і Bonferroni), а також між ПГр3 і ПГр4 ($p = 0,004$ за Scheffe і Bonferroni). Натомість істотної різниці між показниками у ПГр1 і ПГр5 не було виявлено ($p = 0,953$ і $1,0$ згідно з корекцією Scheffe і Bonferroni, відповідно).

Починаючи з 7 доби, у тварин всіх експериментальних підгруп відзначався розвиток компенсаторних стратегій для корекції нестабільного положення тіла на верхній частині бруска у вигляді девіації хвоста в паретичний бік, активніших рухів правих (інтактних) кінцівок і тулуба в правий бік. Це зумовлювало поступовий регрес локомоторної асиметрії, яка, починаючи з 14 доби після ОСМА у тварин ПГр1 і ПГр5, проявлялася лише частішим використанням опор лівими кінцівками. Достовірних відмінностей між показниками моторної асиметрії у даних між 21 (ПГр1 — $55,7 \pm 2$, ПГр5 — $54,4 \pm 1,2$) і 28 добою (ПГр1 — $53,9 \pm 1,3$, ПГр5 — $53,4 \pm 1,2$) не було виявлено ($p=1,0$ згідно з корекцією Scheffe і Bonferroni, відповідно).

На відміну від ПГр1 (ОСМА) і ПГр5 (ІФБР), у ПГр4 реєстрували швидші темпи відновлення рухової функції лівих кінцівок між 3 і 7 добою. В ці терміни також спостерігався регрес рухової асиметрії і в тварин ПГр3, проте менш виражений, ніж в ПГр4.

Найбільша різниця у показниках рухової асиметрії спостерігалася між експериментальними підгрупами на 28 добу спостереження, коли середній показник моторної асиметрії в ПГр4 становив $21,9 \pm 1$ порівняно з ПГр3 ($36,8 \pm 0,8$), і ПГр1 ($53,9 \pm 1,3$) ($p < 0,001$).

Темпи відновлення рухової функції лівих (паретичних) кінцівок при ТЕНТ (ПГр3) дещо знижуються, починаючи з 14 доби ($40,2 \pm 1,1$), тоді як при ТТКМ (ПГр4) утримується регрес моторної асиметрії з 14 ($30,7 \pm 0,9$) по 21 добу ($22,7 \pm 1,1$).

Істотних відмінностей у показниках рухової асиметрії в щурів ПГр1 (ОСМА) і ПГр5 (ІФБР) не було виявлено протягом усього періоду спостереження до 28 доби включно ($p=0,953$ і $1,0$ згідно з корекцією Scheffe і Bonferroni, відповідно).

3.3. Результати тесту із клейкою стрічкою

ОСМА призводила до появи вираженого сенсорного дефіциту — ігнорування подразника на протилежній передній кінцівці щура. У щурів із ОСМА відзначалася істотна різниця у часі зняття клейкої стрічки між лівою і правою передніми кінцівками. На 1 добу після ОСМА середній показник сенсорної асиметрії у щурів ПГр1 становив $0,13 \pm 0,02$, що свідчило про мінімальний час, витрачений твариною на спроби зняти стрічку з ураженої (лівої) кінцівки, на відміну від протилежної кінцівки, з якої щури знімали стрічку швидко і реагували на даний стимул практично одразу після його нанесення (рис. 3.3.1, табл. А.8–А.10, розділ “Додатки”).

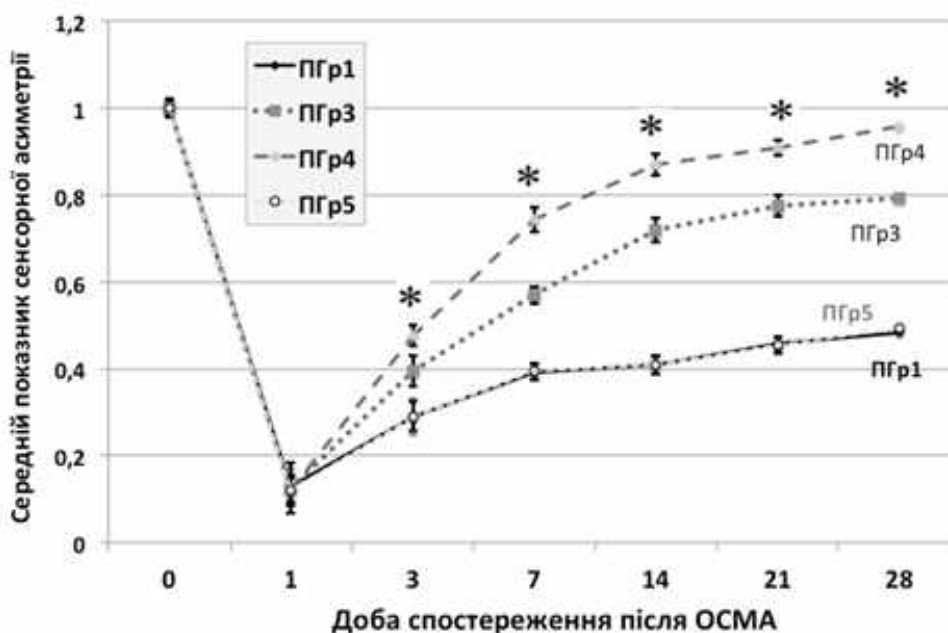


Рис. 3.3.1. Графічне зображення порівняльної динаміки показника сенсорної асиметрії за даними ТКС.

Примітка. ПГр1 — підгрупа 1, ПГр3 — підгрупа 3, ПГр4 — підгрупа 4, ПГр5 — підгрупа; * — статистично достовірні відмінності між групами ПГр1 і ПГр5, з одного боку, і ПГр3 і ПГр4, з іншого, відповідно ($p < 0,001$).

Вже на 3 добу в тварин ПГр1 спостерігалось зменшення різниці у часі зняття стрічки між лівою і правою передніми лапами ($0,29 \pm 0,04$), що свідчило про початок відновлення сенсорної функції. За даними ТКС, в цей термін

реєстрували також статистично значущі відмінності показників сенсорної асиметрії між ПГр3 ($0,39 \pm 0,06$) і ПГр1, а також між ПГр3 і ПГр5 ($0,29 \pm 0,03$, $F=4030,58$, $df=3$, $p<0,001$). Сенсорний дефіцит у тварин із ОСМА (ПГр1) мав тенденцію до регресу з 3 ($0,29 \pm 0,04$) по 21 добу спостереження ($0,46 \pm 0,02$). Проте на 28 добу відзначалася його стабілізація на рівні $0,48 \pm 0,02$, при цьому статистично вірогідної різниці між даними показниками не було виявлено ($p=1,0$ за Bonferroni і Scheffe). На 28 добу в щурів ПГр1 ($0,48 \pm 0,02$) і ПГр5 все ще спостерігалася значна латентність і більша тривалість реакції на сенсорний стимул порівняно з підгрупами із трансплантацією (ПГр3 — $0,79 \pm 0,02$; ПГр4 — $0,95 \pm 0,02$, $p<0,001$). При порівнянні показників сенсорної асиметрії у тварин із ПГр1 (ОСМА) і ПГр5 (ІФБР) з 3 по 28 добу ($0,48 \pm 0,18$ і $0,49 \pm 0,18$ відповідно), статистично значущих відмінностей не було виявлено ($p=1,0$ згідно з корекцією Bonferroni і Scheffe).

Як ТЕНТ (ПГр3), так і ТТКМ (ПГр4) приводили до значного зменшення сенсорної асиметрії за результатами ТКС, починаючи з 3 доби після ОСМА. При цьому вже на 3 добу реєстрували статистично значущі відмінності середніх показників сенсорної асиметрії між ПГр1 ($0,29 \pm 0,04$) і ПГр5 ($0,29 \pm 0,03$), з одного боку, та ПГр3 ($0,39 \pm 0,06$) і ПГр4 ($0,48 \pm 0,03$), з іншого ($p<0,001$ за Scheffe і Bonferroni).

Найвищі темпи відновлення сенсорної функції спостерігаються в підгрупах із ТТ між 3 і 7 (ПГр3 — $0,57 \pm 0,04$, ПГр4 — $0,74 \pm 0,02$, $p<0,001$ за Scheffe і Bonferroni) добою після ОСМА. В той же час регрес сенсорної дисфункції був більш вираженим в тварин підгрупи із ТТКМ (ПГр4) порівняно із підгрупою з ТЕНТ (ПГр3) ($p<0,001$ за Scheffe і Bonferroni). З 14 по 28 добу спостереження, відновлення сенсорної функції у тварин ПГр3 (ТЕНТ) дещо сповільнюється (14 доба — $0,72 \pm 0,02$, 28 доба — $0,79 \pm 0,02$). Натомість у щурів ПГр4 (ТТКМ) на 28 добу ($0,95 \pm 0,02$) спостерігається наближення показників порівняння латентності і часу зняття стрічки між лівою і правою передніми кінцівками до 1 — показника інтактних тварин.

3.4. Результати тесту постановки передньої лапи у відповідь на стимуляцію вібрисів

ОСМА призводила до вираженого порушення сенсо-моторної функції на 1 добу після моделювання, що проявлялося відсутністю рефлекторних рухових відповідей ($0\pm 0\%$) (рис. 3.4.1, табл. А.11–А.13, розділ “Додатки”).

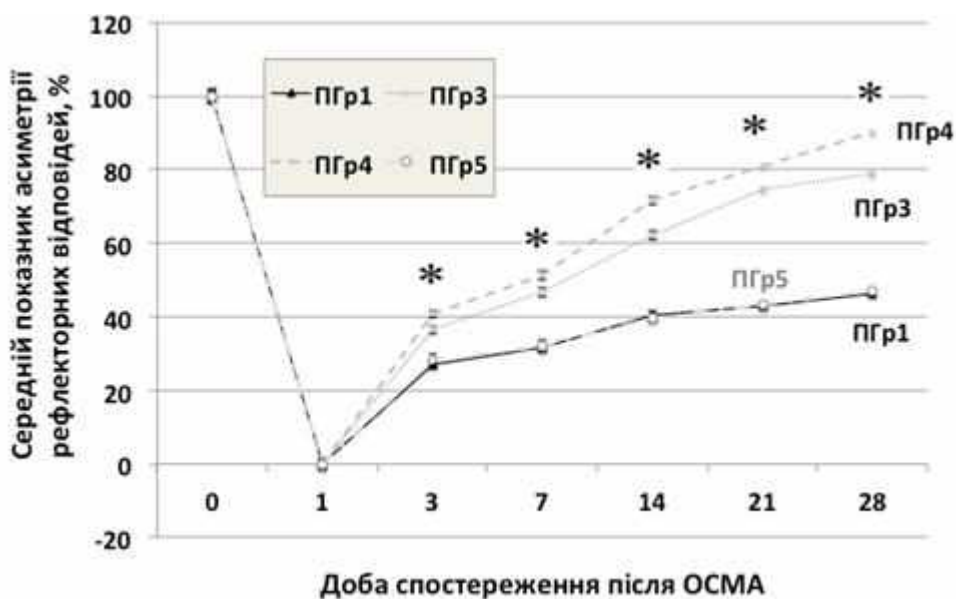


Рис. 3.4.1. Графічне зображення порівняльної динаміки показника рефлекторних відповідей за даними ТПШЛСВ.

Примітка. ПГр1 — підгрупа 1, ПГр3 — підгрупа 3, ПГр4 — підгрупа 4, ПГр5 — підгрупа 5; * — статистично достовірні відмінності між ПГр1 і ПГр5, з одного боку, і ПГр 3 і ПГр4, з іншого, а також між ПГр3 і ПГр4 ($p < 0,001$).

В зв'язку з цим, порівняльний статистичний аналіз динаміки показника рефлекторних відповідей проводили, починаючи з 3 доби після ОСМА. На 3 добу після ОСМА в тварин ПГр1 спостерігалось відновлення сенсо-моторної функції у вигляді збільшення відсотка успішних спроб постановки лівої (ураженої) передньої кінцівки при подразненні вібрисів ($27,2\pm 2,1\%$). У ПГр3 ($36,6\pm 1,3\%$) і ПГр4 ($40,8\pm 1\%$) також було відзначено помірне відновлення сенсо-моторної функції за даним тестом, яке випереджало аналогічні показники в ПГр1 і ПГр5 ($F=6834,99$, $df=3$, $p < 0,001$ за Bonferroni і Scheffe).

Прискорення регресу неврологічного дефіциту в ПГр1 і ПГр5 відзначалося з 7 (ПГр1 — $31,6 \pm 1,3\%$, ПГр5 — $31,9 \pm 1,3\%$) по 14 добу (ПГр1 — $40,3 \pm 1,5\%$, ПГр5 — $39,8 \pm 1,5\%$), що свідчило про певний ступінь спонтанного відновлення сенсо-моторної функції при відсутності статистично значущої різниці між зазначеними підгрупами ($p=0,338$ за Bonferroni, $p=0,296$ за Scheffe). Неврологічний дефіцит за результатами ТППЛСВ у ПГр1 і ПГр5 мав тенденцію до стабілізації з 21 (ПГр1 — $42,8 \pm 1,1\%$, ПГр5 — $43,5 \pm 1,7\%$) по 28 добу (ПГр1 — $46,3 \pm 1,4\%$, ПГр5 — $47,2 \pm 1,3\%$) спостереження. При цьому достовірних відмінностей між термінами спостереження у цих підгрупах не було виявлено ($p=0,338$ за Bonferroni, $p=0,296$ за Scheffe).

На відміну від ПГр1 і ПГр5, у щурів в підгрупах із ТТ спостерігалася стійка позитивна динаміка показника рефлекторних рухових відповідей, починаючи з 7 доби спостереження (ПГр3 — $46,8 \pm 1,3\%$, ПГр4 — $51,4 \pm 1,1\%$). При цьому найшвидші темпи відновлення спостерігалися до 14 доби після ОСМА при кращих показниках у тварин із ТТКМ (ПГр3 — $62,3 \pm 1,1\%$, ПГр4 — $71,7 \pm 1\%$, $p < 0,001$ за Bonferroni і Scheffe).

Найбільша різниця середніх показників відсотка рефлекторних відповідей між ПГр3 ($79,6 \pm 1,3\%$), з одного боку, і ПГр1 ($46,3 \pm 1,4\%$) і ПГр5 ($47,2 \pm 1,3\%$), з іншого, відзначалася на 28 добу ($p < 0,001$). Аналогічна різниця виявлена й для ПГр4 ($90,3 \pm 1,3\%$) при її порівнянні з ПГр1 і ПГр5 ($p < 0,001$ за Bonferroni і Scheffe).

Подібно до динаміки сенсорної функції за даними ТКС, в щурів із ПГр3 (ТЕНТ) спостерігалася сповільнення регресу сенсо-моторної дисфункції за результатами ТППЛСВ, починаючи з 21 доби ($74,7 \pm 1,3\%$) до 28 доби ($79,6 \pm 1,3\%$, $p=0,338$ за Bonferroni, $p=0,296$ за Scheffe).

Натомість у тварин ПГр4 (ТТКМ) відсоток успішних рефлекторних відповідей поступово збільшувався і з 21 доби ($81,1 \pm 1,3\%$), наближаючись на 28 добу ($90,3 \pm 1,3\%$) спостереження до контрольного показника (100%) в інтактних тварин.

Висновки до розділу 3.

Таким чином, однобічна ОСМА призводить до появи контралатерального стійкого неврологічного дефіциту, який проявляється передусім асиметрією сенсорної та моторної функцій.

У тварин усіх експериментальних підгруп спостерігається певний ступінь спонтанного відновлення неврологічних функцій, починаючи з 3 доби спостереження, частково зумовлений розвитком компенсаторних стратегій поведінки в досліджуваних тварин.

За допомогою оптимізованого протоколу неврологічного тестування можна кількісно оцінити показники сенсорної, моторної та рефлекторної функції в щурів із ОСМА, а також виявити стійкий неврологічний дефіцит, який не є очевидним при звичайному спостереженні за тваринами.

Інтрацеребральна ГЕНТ і ТТКМ призводить до регресу неврологічного дефіциту в експериментальних тварин, що спостерігається вже на 3 добу спостереження після ОСМА.

За нашими даними, контралатеральна тонічна флексія передньої лапи, утримується в тварин контрольної групи навіть на 28 добу, хоча й має тенденцію до подальшого регресу. Персистенція контралатеральної флексії у тварин контрольної групи може бути пов'язана, на нашу думку, із модифікованою моделлю перманентної ОСМА, тоді як в багатьох інших дослідженнях були використані моделі транзиторної ОСМА, для яких характерний менший ступінь анатомічного ушкодження тканин головного мозку.

Динаміка рефлекторних відповідей і сенсомоторної функції за даними ТППЛСВ, а також результати ТКС свідчать про тривалість і стійкість сенсорних порушень, незважаючи на певний ступінь спонтанного відновлення, який був найбільш вираженим в лабораторних щурів на 3–7 добу після ОСМА.

Подібно до вищенаведених тестів, тест ходіння по бруску продемонстрував існування вираженої стійкої моторної асиметрії у щурів із

ОСМА протягом усього періоду спостереження. Втім, до 28 доби спостерігалось поступове зниження ступеня рухових порушень із тенденцією до стабілізації неврологічного дефіциту. Слід зауважити, що дані, одержані шляхом порівняння функціональних результатів у тварин контрольних (ПГр1 і ПГр5) підгруп і підгруп із ТТ (ПГр3 і ПГр4), виявилися статистично вірогідними протягом усього терміну спостереження з $p < 0,001$.

Найвищі темпи відновлення сенсорних і моторних функцій після ОСМА в умовах застосування ТТ спостерігаються між 3 і 7 добою (за даними ТКС і ТХБЗОК, відповідно) і 7 і 14 добою (за даними ТППЛСВ), хоча тенденція до регресу неврологічного дефіциту в тварин ПГр3 і ПГр4 утримується і на 28 добу спостереження.

Тканинна трансплантація приводить до кращого відновлення сенсорної і рефлексорної функції, меншою мірою – рухової і локомоторної функції. При цьому ТТКМ (ПГр4) виявилася більш ефективною у відновленні неврологічних функцій у піддослідних тварин, ніж ТЕНТ (ПГр3). Про це свідчить зниження темпів регресу неврологічного дефіциту у щурів ПГр3, починаючи з 21 доби, тоді як у тварин ПГр4 утримувалася позитивна динаміка неврологічних функцій і на 28 добу спостереження після ОСМА.

РОЗДІЛ 4

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ТА ТКАНИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

4.1. Волюметрія ділянки інфаркту мозку експериментальних тварин

Зміни об'єму ділянки інфаркту головного мозку щурів на 7 і 14 добу після моделювання ОСМА і при різних варіантах ТТ, а також інтрацеребральної ІФБР, відображені на рис. 4.1.1, 4.1.2 і в табл. Б.1 (див. додатки).

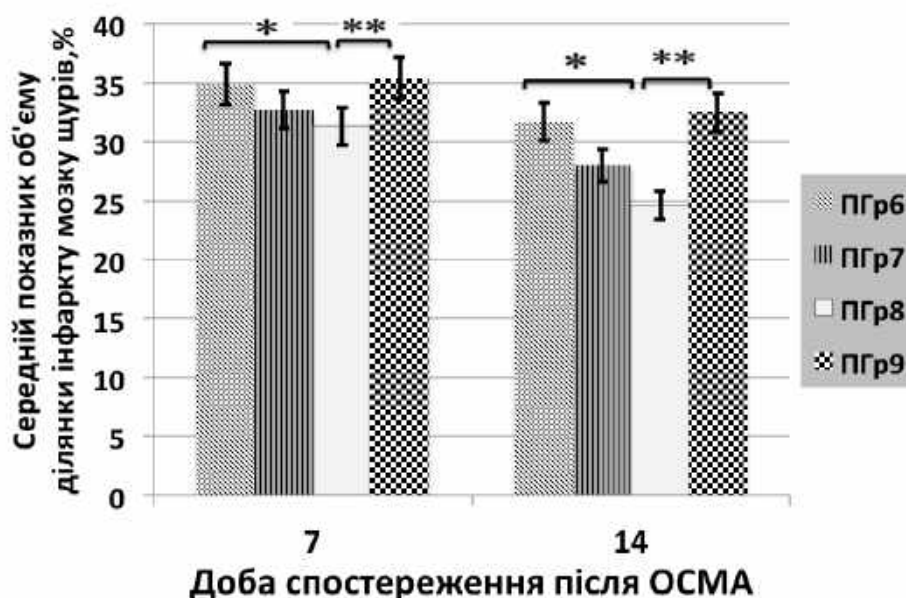


Рис. 4.1.1. Графічне зображення порівняльної динаміки показника об'єму зони інфаркту мозку.

Примітка. ПГр6 — підгрупа 6, ПГр7 — підгрупа 7, ПГр8 — підгрупа 8, ПГр9 — підгрупа 9; * — статистично значущі відмінності між ПГр8 і ПГр6 ($p=0,002$ за Scheffe) ** — статистично значущі відмінності між ПГр8 і ПГр9 ($p=0,007$ за Scheffe).

На 7 добу після ОСМА на фронтальних зрізах головного мозку в щурів усіх експериментальних груп спостерігалася чітко окреслена зона ішемічного некрозу білого кольору, на відміну від інтактної мозкової речовини, яка фарбувалася розчином ТТХ в червоний колір (рис. 4.1.2).

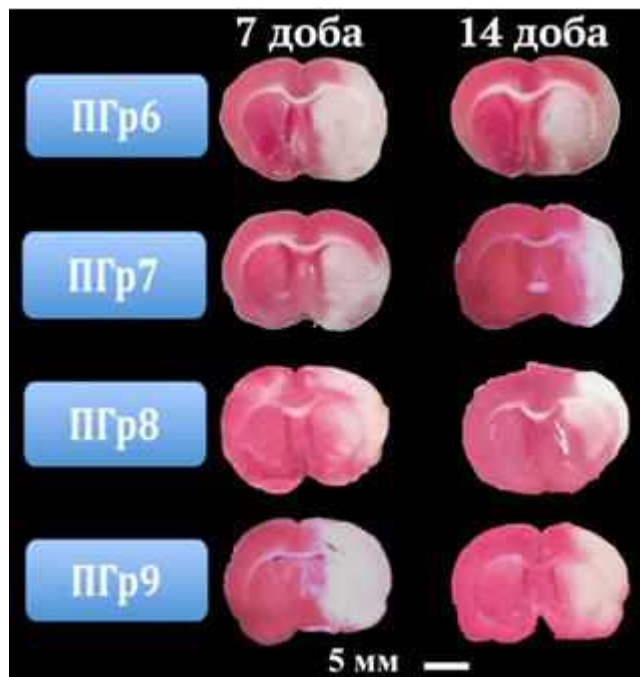


Рис. 4.1.2. Фронтальні зрізи головного мозку щурів на 7 і 14 добу після моделювання ОСМА, фарбування ТТХ.

Примітка. ПГр6 — підгрупа 6 (контрольна, ОСМА), ПГр7 — підгрупа 7 (ТЕНТ), ПГр8 — підгрупа 8 (ТТКМ), ПГр9 — підгрупа 9 (ІФБР). Перший ряд по вертикалі — 7 доба, другий ряд — 14 доба. Значення масштабу шкали (біла поділка внизу) — 5 мм.

Середній об'єм ЗІГМ, виражений у відсотках порівняно з інтактною півкулею, на 7 добу після ОСМА (5 доба після трансплантації в підгрупах із ТЕНТ і ТТКМ) був достовірно меншим в ПГр8 ($32,7 \pm 2,5\%$), ніж в ПГр6 ($34,9 \pm 4,1\%$) і ПГр9 ($35,4 \pm 2,7\%$; $df=1$, $F=19,6$, $p < 0,001$).

При цьому слід зазначити, що істотної різниці в об'ємі вогнища інфаркту головного мозку експериментальних тварин між ПГр6 та ПГр9 не було виявлено протягом усього подальшого періоду спостереження ($p=0,968$ за Scheffe і $p=1,0$ за Bonferroni). Подібна закономірність була виявлена також при порівнянні цього показника у ПГр7 і ПГр8 ($p=0,429$ за Scheffe і $p=0,609$ за Bonferroni).

На 14 добу у тварин усіх експериментальних підгруп спостерігається зменшення об'єму ураженої півкулі головного мозку внаслідок формування гліо-мезодермального рубця та поступового зменшення в розмірах ділянки ІУГМ. Відносний показник об'єму ділянки інфаркту мозку щурів у ПГр8 становив $24,6 \pm 1,9\%$ порівняно з ПГр6 ($31,7 \pm 4,4\%$) і ПГр9 ($32,5 \pm 2,6\%$). При

цьому статистично значущої різниці між зазначеними показниками в ПГр7 ($28 \pm 2,6\%$) і в ПГр6 і ПГр9 не виявлено.

При порівнянні середнього узагальненого показника об'єму ділянки інфаркту головного мозку щурів в усіх експериментальних підгрупах на 7 і 14 добу виявлена достовірна різниця між термінами спостереження ($F=7,84$, $df=3$, $p<0,001$).

Загалом при порівнянні середнього відносного показника об'єму інфаркту головного мозку в експериментальних підгрупах між 7 і 14 добою спостереження, в ПГр8 (ТТКМ) відзначалося його зменшення на 25%, в ПГр7 (ТЕНТ) — на 12,5%, в ПГр6 — на 10% і в ПГр9 — на 8,2%.

Таким чином, при аналізі змін об'єму ділянки інфаркту головного мозку в щурів ПГр6-9 в динаміці між 7 і 14 добою виявлено позитивний вплив ТТКМ порівняно з іншими експериментальними підгрупами у вигляді поступового зменшення розмірів вогнища ІУГМ. Натомість відмінності між підгрупою тварин із ТЕНТ і іншими підгрупами виявилися статистично незначущими.

4.2. Динаміка патоморфологічних змін головного мозку після гострого ішемічного ушкодження та тканинної трансплантації

У даному розділі дисертації наведені різні аспекти морфологічної верифікації результатів експериментального моделювання гострого ІУГМ щурів шляхом постійної внутрішньосудинної оклюзії правої СМА в серії контрольних досліджень у тварин ПГр14, а також після проведення тканинної НТ (ТЕНТ у тварин ПГр15 і ТТКМ у тварин ПГр16).

Цьому розділу ми надаємо важливого значення, оскільки результати анатомічних і гістологічних досліджень головного мозку щурів у динаміці спостереження (1–28 доба після ОСМА) є найбільш демонстративними і доказовими для вивчення порівняльної характеристики активності ангиогенезу у ПЗ головного мозку щурів.

4.2.1. Морфологічні зміни головного мозку в тварин контрольної підгрупи

Вивчені патоморфологічні особливості головного мозку щурів з ОСМА і різними варіантами ТТ (ТТКМ, ТЕНТ) для з'ясування закономірностей перебудови та компенсаторно-приспосувальних реакцій тканин головного мозку в динаміці розвитку модельованого вогнища ІУГМ та характеру динаміки структурних взаємовідношень гліо-мезодермального демаркаційного валу, індукованого постішемічного церебрального ангиогенезу після ТТКМ і ТЕНТ.

На першому етапі проведена оцінка топографічних особливостей локалізації вогнища ІУГМ в щурів шляхом вивчення його поширеності на серії гістологічних зрізів головного мозку, пофарбованих гематоксилином-еозином і тіоніном за Нісслем при збільшенні мікроскопа $\times 100$.

ОСМА у щурів зумовлювала виражені зміни гісто- та ангиоархітекtonіки у корі головного мозку і підкіркових структурах правої півкулі мозку, які характеризувалися певними етапами й динамікою на різних термінах спостереження.

При мікроскопічному дослідженні встановлено, що зона ішемічного ураження анатомічно охоплює ділянки соматосенсорної (тім'яна ділянка) і, частково, моторної кори (лобна і префронтальна ділянки), мозолистого тіла, латеральних і, частково, медіальних відділів смугастого тіла, поширюючись на піриформну кору і гіпокамп і досягає стінки правого бічного шлуночка, що відповідає басейну кровопостачання правої СМА (рис. 2.8.1).

Вже на 1 добу після ОСМА у цих ділянках головного мозку піддослідних тварин спостерігали вогнище ішемічного ураження, в якому умовно розрізняли такі зони: сформованого некрозу — власне ЗІГМ, перифокальну (периінфарктну) зону (ПІЗ), яка відповідає зоні ішемічної «напівтіні», та умовно інтактну зону головного мозку. Макроскопічно права півкуля головного мозку була збільшена в об'ємі порівняно з інтактною лівою півкулею внаслідок

її набряку. При гістологічному дослідженні у зоні ішемічного ураження відзначалися дрібні крововиливи з діapedезом клітинних елементів крові крізь стінку розширених мікросудин (рис. 4.2.1.1). В цей строк спостерігається також активація клітин місцевої глії з утворенням макрофагоподібних типів клітин (“зернистих” куль). Звертає на себе увагу набряк перивентрикулярної зони і клітин епендими бічних шлуночків з ознаками у стані каріопікнозу та гіперхроматозу ядер у деяких епендимоцитах.

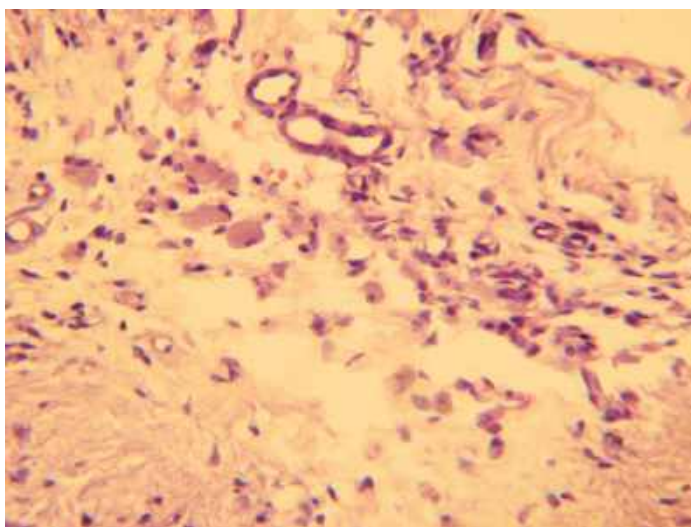


Рис. 4.2.1.1. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр14), 1 доба після ОСМА. Зона розм'якшення нервової тканини довкола з ознаками коліквациї та ангіодистонії, оточена скупченням макрофагів і дрібних судин. Спостерігається активація клітин місцевої глії з утворенням зернистих “куль”. Забарвлення гематоксилін-еозином, 400х.

У корі правої (іпсилатеральної) півкулі головного мозку, променистості мозолистого тіла та смугастому тілі спостерігаються дифузні структурні зміни васкуляризації у вигляді периваскулярного набряку з ознаками порушення судинного тону: різкого звуження просвіту капілярів поряд із вазодилатацією, ознаками каріопікнозу ендотеліоцитів та набряком периваскулярних гліоцитів.

На 1 добу після ОСМА у кіркових шарах нейронів лівої (інтактної) півкулі визначалася типова будова зі збереженням шестишарової цитоархітектонічної структури. Найбільша щільність нейронів і капілярів

виявлена у II-III шарах, в V шарі кори півкуль визначалися пірамідні нейрони з чітко вираженими апікальними і базальними дендритами. Нейрони зберігали спрямованість і компактність шарів — пластинок, з локальним і помірно вираженим дифузним збільшенням сателітних гліоцитів.

Реєстрували лише поодинокі дистрофічно змінені нейрони і гліоцити із різким гіперхроматозом і каріопікнозом ядер. Навколо окремих візуально інтактних мікросудин спостерігали ознаки помірно вираженого периваскулярного набряку.

Мікросудини кори ураженої півкулі характеризувалися вираженими ознаками ангіодистонії із домінуванням ознак стійкого ангіоспазму на відміну від тканини інтактної півкулі головного мозку. Вираженість структурних змін у судинах залежали від зони ушкодження, в центрі вогнищ набряку і некрозу тканин мозку спостерігалися лише тіні сполучнотканинного каркасу мікросудин.

В ПЗЗ тканин головного мозку щурів контрольної групи в цей строк спостерігається фокально виражена гіперхромія та еозинофілія нейронів, що свідчить про їх гострі деструктивні зміни. Внаслідок гострого набухання клітини збільшені в розмірах, відзначається вакуолізація цитоплазми і ядер нейронів усіх шарів кори в щурів ПГр10. Зменшення вмісту нейронів найбільш виражене у III і VI шарах. На тлі ішемії ще однією ознакою дистрофічних змін нейронів було різке зменшення розмірів нейроцитів, особливо виражене в клітинах пірамідного типу.

Судини МЦР представлені прекапілярними артеріолами і капілярами, які пронизують усі шари кори головного мозку. Нейрони розташовані характерними рядами, з локальним або дифузним розташуванням сателітних гліоцитів. В капілярах ядра ендотеліоцитів з різним характером розподілу ядерного хроматину та ступенем дистрофічних змін. Відзначаються ознаки еритростазу і претромбозу.

На 3 добу після ОСМА в корі ушкодженої (правої) півкулі головного мозку щурів контрольної підгрупи (ПГр14) спостерігаються дистрофічні зміни

нейронів різного ступеня вираженості: деформація контурів клітин, гіперхроматоз і пікноз ядер. Окремі нейрони перебувають у стані некробіозу і некрозу з проявами набряку цитоплазми тіл і відростків нейронів з ознаками клазматодендрозу, найбільш вираженого у II і III поверхневих шарах кори, спостерігається також гіперплазія і фокальна проліферація гліоцитів.

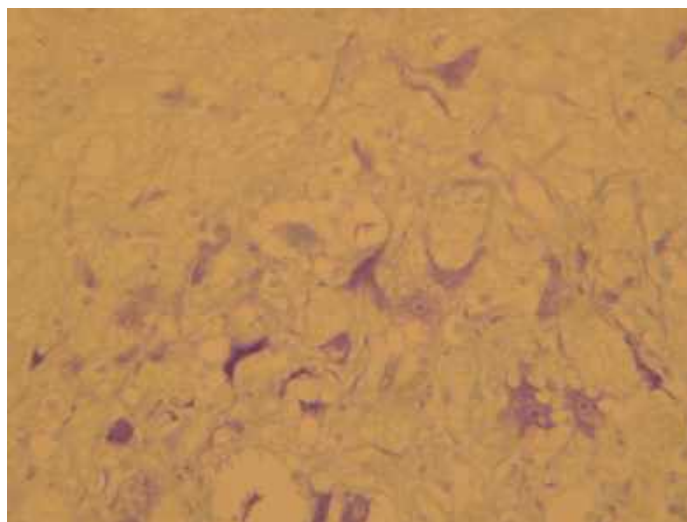


Рис. 4.2.1.2. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр14), 3 доба після ОСМА. Гострі дистрофічні ішемічні зміни нейронів — клітини-«тіні». Забарвлення тіоніном за Нісслем, 800×.

На тлі гіперхромних нейронів виявляються слабо забарвлені клітини з нерівномірними контурами — клітини-«тіні» (рис. 4.2.1.2) Ядра таких нейронів мають ознаки деструкції хроматину внаслідок некрозу та аутолізу клітин. Звертає на себе увагу явища сателітозу й нейронофагії із формуванням полів клітинного «спустошення», поряд із активацією клітин мікроглії і її перивазальним розташуванням.

Таким чином, на 3 добу після моделювання ОСМА у тканині головного мозку щурів контрольної підгрупи (ПГр14) збільшується кількість і ступінь вираженості деструктивних змін ушкоджених нейронів, посилюються явища дегенерації клітин ПІЗ порівняно з попереднім терміном спостереження.

В ділянках набряку подекуди відзначається геморагічна трансформація вогнищ ішемічного ураження тканини мозку. Мікросудини характеризуються

периваскулярним набряком з облітерацією їх просвіту, в деяких з них помітний стаз еритроцитів.

На 7 добу після ОСМА в ПІЗ ураженої (правої) півкулі головного мозку щурів відзначається зменшення набряку тканини мозку. У вогнищі некрозу відзначається перифокальна інфільтрація лейкоцитами і макрофагами, які починають формувати своєрідну демаркаційну зону — т.зв. “лейкоцитарний вал”. Також помітна активація клітин мікроглії та ознаки неоваскуляризації. Лізис еритроцитів із вогнища геморагічної трансформації ділянки ішемії, а також вторинна пенетрація еритроцитами призводили до локального скупчення гемосидерофагів і формування зернистих шарів довкола зони некрозу.

Мікроциркуляторне русло кори головного мозку в зоні ІУГМ на 7 добу характеризується вираженим периваскулярним набряком, еритроцитарним стазом і некрозом клітин окремих капілярів. Разом з тим в ПІЗ спостерігається тенденція до збільшення довжини капілярів і діаметра їх просвіту в проекції зрізу, що опосередковано свідчить про початок репаративних процесів.

Нейрони ПІЗ переважно нормохромні, але зустрічаються скупчення різко зменшених, атрофічних нейронів з тотальним гіперхроматозом, що відображає переважання вторинних дистрофічних процесів. При цьому збільшується вміст гіперхромних дистрофічних нейронів в новій корі і смугастому тілі і гіпокампа ураженої півкулі, що свідчить про розвиток вторинних дистрофічних і дегенеративних процесів на тлі прогресування ІУГМ.

На 14 добу спостереження після ОСМА в ПІЗ головного мозку щурів контрольної підгрупи (ПГр14) спостерігаються початкові ознаки резорбції вогнища ішемії з видаленням некротичних мас і формування зони розплавлення, оточеною демаркаційною гліо-мезодермальною о рубця зоною довкола ділянки інфаркту мозку, в якій виявляється збільшення вмісту мезенхімальних клітин — макрофагів, нейтрофілів, а також активованих мікрогліоцитів (рис. 4.2.1.3).

Поряд з тим, в ПЗ в цей строк експерименту з'являються поодинокі новоутворені капіляри, спостерігаються скупчення клітин моноцитарно-макрофагального ряду, виражене кровонаповнення судин.

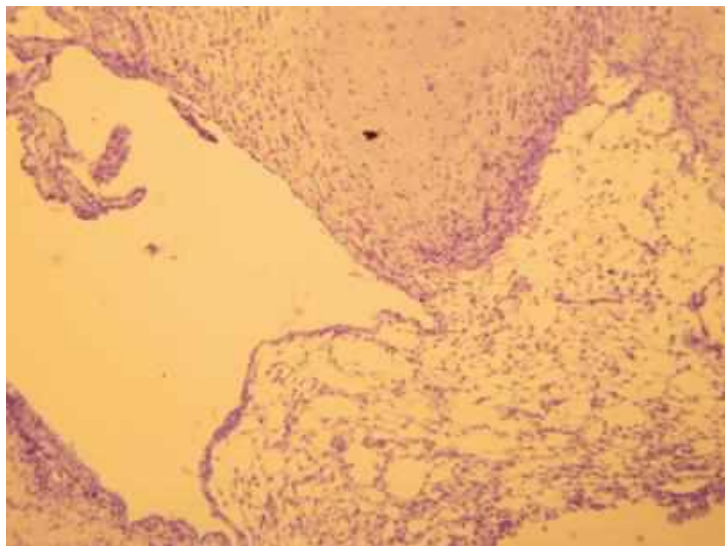


Рис. 4.2.1.3. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр14), 14 доба спостереження після ОСМА. Реактивно-компенсаторні зміни оболонок тканин півкулі: фокальна проліферація фібробластів і гістіоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 125х.

Порушення цитоархітектоніки кори у перифокальній зоні проявлялося відсутністю чіткого пошарового розподілу нейронів, переважно I–IV шарів кори головного мозку. У віддалених від зони ішемії ділянках іпсилатеральної півкулі спостерігаються дифузно уражені дистрофічні нейрони і гліюцити.

В субпендимальній зоні бічних і третього шлуночків спостерігалися скупчення макрофагів, дегенеративно змінених або активованих гліюцитів, а також активація окремих епендимоцитів (рис. 4.2.1.3).

На 21 добу спостереження після ОСМА в правій півкулі головного мозку щурів ПГр14 відзначається подальше формування гліо-мезодермального рубця у вигляді гіперплазії астроцитів переважно фіброзного типу з появою зон реактивного гліозу, реакції клітин макрофагальної системи і появи окремих новоутворених судин в ПЗ. В корі головного мозку різко порушена

архітектоніка шарів нейронів з випадінням I–IV шарів, локально контуруються лише V–VI шари.

У цей строк в підкіркових структурах головного мозку тварин ПГр14 реєстрували окремі судини в стані ангіоспазму із помірним периваскулярним набряком. Окремі нейрони ПІЗ характеризувалися помірно вираженими дистрофічними змінами у вигляді зменшення кількості відростків і розмірів перикаріонів, нерівності контурів цитоплазматичної мембрани. Візуально збільшилася перивазальна щільність макрофагів і кількість гіперплазованих гліоцитів на межі ПІЗ і зони формування гліо-мезодермального рубця. Судини розширені, переповнені кров'ю з ознаками стазу формених елементів крові.

На 28 добу спостереження в іпсилатеральній півкулі головного мозку щурів контрольної групи після ОСМА завершується формування гліо-мезодермального рубця, умовно відмежованого від зміненої перифокальної зони нервової тканини. Очищення зони ІУГМ від некротичних тканин у 95% спостережень призводило до формування кістозної порожнини, заповненої ліквором.

Поряд із тим, у ПІЗ помітно зменшився вміст некробіотично змінених клітин за рахунок гіперплазії як пристосувальної реакції при очищенні від тканинного детриту. Серед структурно інтактних нейронів переважали малі пірамідні і зірчасті нейрони.

В підкіркових структурах мозку утримується перицелюлярний і перивазальний набряк, як у волокнах мозолистого тіла, так і провідниках внутрішньої капсули та смугастого тіла (рис. 4.2.1.4).

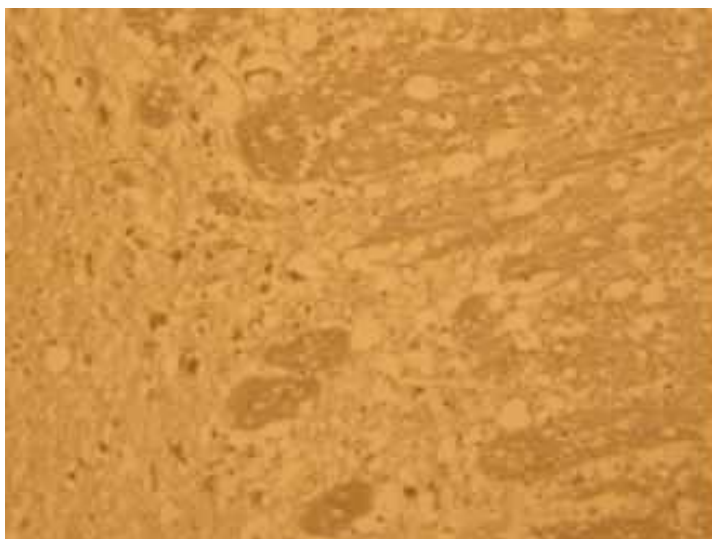


Рис. 4.2.1.4. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр14), 28 доба після ОСМА. Дистрофічні зміни тканини — набряк і зниження компактності волокон провідних шляхів з формуванням стільникової будови й мікрокіст. Дистрофія нейронів. Забарвлення гематоксилін-пікрофуксином, збільшення 200х.

У віддалених від зони інфаркту мозку ділянках кори та підкіркових структурах іпсилатеральної півкулі реєструється значна кількість дрібних гіперхромних нейронів і гліоцитів, судин з облітерованим просвітом.

4.2.2. Морфологічні зміни головного мозку у тварин із тканинною трансплантацією

На 3 добу після ОСМА (1 доба після після ТЕНТ і ТТКМ) встановлено наявність ділянки некрозу тканини мозку, оточеного зоною постінфарктного набряку, нечітко відмежованого від ПЗ — зони ішемічної “напівтіні”. В перифокальних ділянках кори головного мозку спостерігали дистрофічні зміни нейронів і гліоцитів, ознаки ангіодистонії. Ознаки набряку та структурних змін виявлені також у внутрішній капсулі, мозолистому тілі, смугастому тілі та гіпокампі.

У МЦР ПЗ спостерігався периваскулярний набряк, стаз еритроцитів, а в ділянках, прилеглих до некрозу, відзначалася деструкція стінок капілярів, помітні також мікросудини з облітерованим просвітом.

Навколо зони інтрацеребральної ТТКМ візуалізуються скупчення трансплантованих клітин ТКМ, оточених невеликою зоною реактивних змін гліоцитів і набряку мозку (рис. 4.2.2.1). В ділянці ТЕНТ клітини трансплантату формують ланцюжки і кластерні групи по 3–4 клітини у напрямку до ЗІГМ (рис. 4.2.2.2). Деякі з них характеризувалася вираженою синтетичною активацією, деякі перебували в стані мітозу, а інші — в стані деструкції та некробіозу (каріопікноз, каріорексис і пікноз клітин).

На відміну від підгрупи з ОСМА (ПГр14), інфільтрації макрофагів та лейкоцитів в ПІЗ головного мозку не було виявлено.

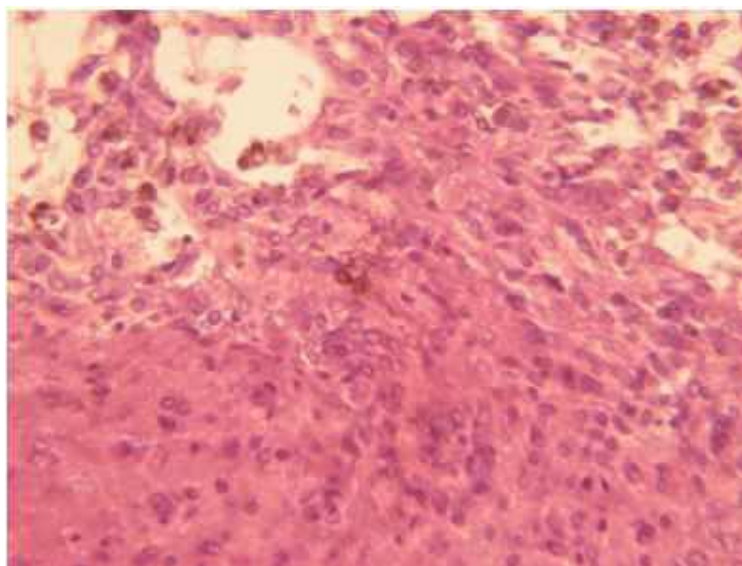


Рис. 4.2.2.1. Гістологічний препарат головного мозку експериментальної тварини (ПГр16, ТТКМ), 3 доба після ОСМА. У ПІЗ виявлена значна кількість локально розташованих клітин трансплантату, які формують кластерні групи. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 400×.

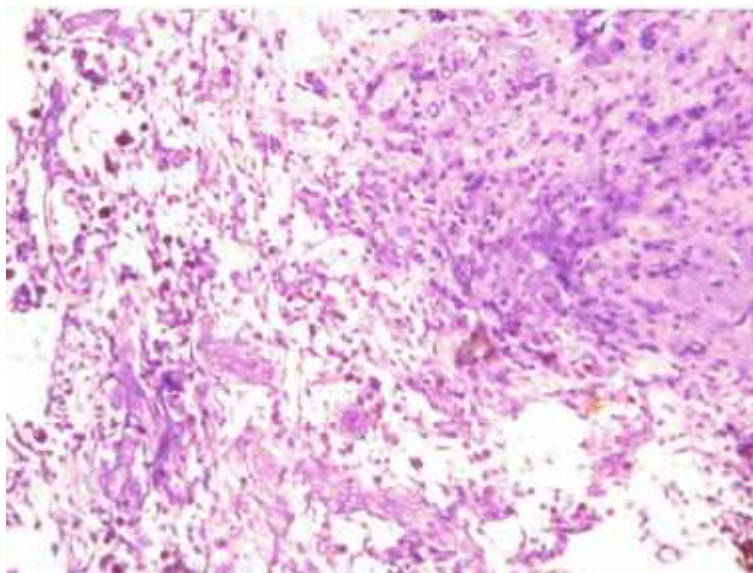


Рис. 4.2.2.2. Гістологічний препарат головного мозку щура із ТЕНТ (ПГр15), 3 доба після ОСМА. Виявлена незначна кількість дифузно розташованих клітин трансплантату, які формують ланцюжки і кластерні групи. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 150×.

В субпендимальній зоні іпсилатерального бічного шлуночка півкулі спостерігалася активація змінених нейронів і гліоцитів навколо зони ішемічного ушкодження.

В корі головного мозку простежується цито-, мієло- та ангіоархітектоніка, а ступінь деструктивно-дегенеративних змін визначається відстанню від зони некрозу. Так, на межі ПЗ і ЗІМ в структурно змінених нейронах виявлені ознаки гідропічної дистрофії, а у віддалених від некротичного вогнища ділянках кори головного мозку помітні лише поодинокі гіперхромні нейрони. У корі півкуль головного мозку спостерігалася зменшення кількості нейронів у стані дистрофії, гліоцитів та реактивно змінених гліоцитів.

Істотних морфологічних відмінностей між ЗІМ і ПЗ щурів після ТЕНТ і ТТКМ на 1 добу після трансплантації не виявлено.

На 7 добу спостереження після ОСМА (5 доба після трансплантації) в тканині головного мозку щурів ПГр15 (ТЕНТ) і ПГр16 (ТТКМ) виявлено зменшення ступеня вираженості набряку мозку зі зменшенням ступеня дистрофічних змін нейронів у ПЗ кори головного мозку та смугастого тіла. Це супроводжується відносною збереженістю пошарового упорядкування нейронів

кори, особливо III–V шарів, а також нейронів гіпокампа, особливо після ТЕНТ (рис. 4.2.2.3.А–4.2.2.3.В).

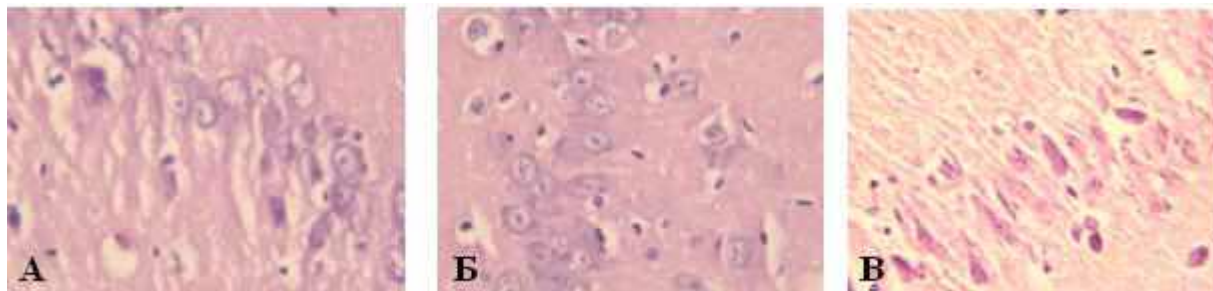


Рис. 4.2.2.3. Гістологічні препарати головного мозку щурів на 7 добу спостереження після ОСМА. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 200 ×. А — ПГр14 (ОСМА). Порушення цитоархітекtonіки — дистрофія, нейронофагія і сателітоз нейроклітин гіпокампа. Б — ПГр15 (ТЕНТ). Наближення до типової цитоархітекtonіки нейронів гіпокампа. Збереження будови і просторової орієнтації нейронів. В — ПГр16 (ТТКМ) Ознаки ішемії та зміни цитоархітекtonіки нейронів гіпокампа.

Нейрони кори головного мозку і смугастого тіла в ПЗ характеризувалися типовою орієнтацією, помірною звивистістю відростків, значна кількість нейроклітин містили гіперхромні ядра, що вказувало на порушення метаболізму й прискорення реактивних вторинних змін; навколо нейронів помітні окремі клітини-сателіти (мікросателітоз).

В зоні ТЕНТ і ТТКМ у цей строк виявлено упорядкування клітинних асоціацій і їх співвідношень, а також ознаки перерозподілу трансплантованих клітин. Останні характеризувалися різним рівнем функціональної активності, про що свідчить ступінь забарвлення ядерного хроматину і об'єму цитоплазми. При цьому структурних ознак каріопікнозу і некробіозу нейронів на вивчених гістологічних препаратах не виявлені.

В мікроциркуляторному руслі ПЗ при ТТКМ виявлено збільшення кількості й розширення просвіту неушкоджених капілярів, а також збільшення вмісту мікросудин навколо зони локалізації трансплантату.

На тлі помірно виражених дистрофічних процесів, зокрема, перичелюлярного та периваскулярного набряку, в перифокальній зоні

смугастого тіла відзначалися реактивно-компенсаторні зміни нейронів та гліоцитів у вигляді збільшення об'єму клітинних ядер.

На 14 добу спостереження після ОСМА (12 доба після трансплантації) в ураженій півкулі мозку щурів після ТТКМ і ТЕНТ встановлено формування демаркаційної зони на межі з некротизованою тканиною і утворення лікворних кіст, ознаки міграції макрофагів.

Позитивний вплив трансплантації на репаративні процеси в системі мікроциркуляції ПЗ проявлявся збільшенням кількості новоутворених судин, довжини капілярів в проекції зрізу і відновленням діаметра функціонально активних і структурно інтактних капілярів. При цьому клітини трансплантату в ПГр16 (ТТКМ) були розташовані навколо мікросудин, формуючи гломерулярні структури (рис. 4.2.2.4).

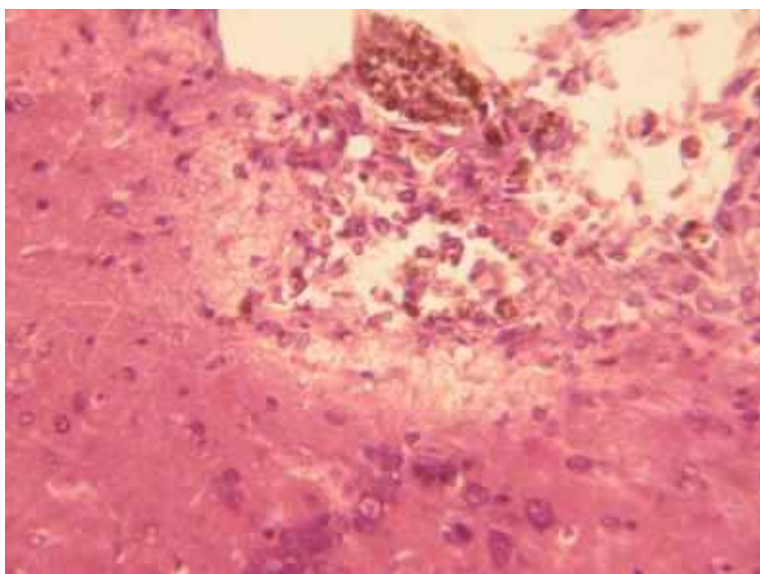


Рис. 4.2.2.4. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр16, ТТКМ), 14 доба після ОСМА. У ПЗ виявлена значна кількість периваскулярно розташованих клітин трансплантату, які формують судинні гломерули. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 400х.

Слід зазначити, що в групі з ТТКМ магістральні мікросудини характеризувалися вираженим кровонаповненням.

На тлі описаних змін в ПЗ помітні поодинокі гіперхромні пірамідні нейрони, що свідчить про їх помірно виражені дистрофічні зміни.

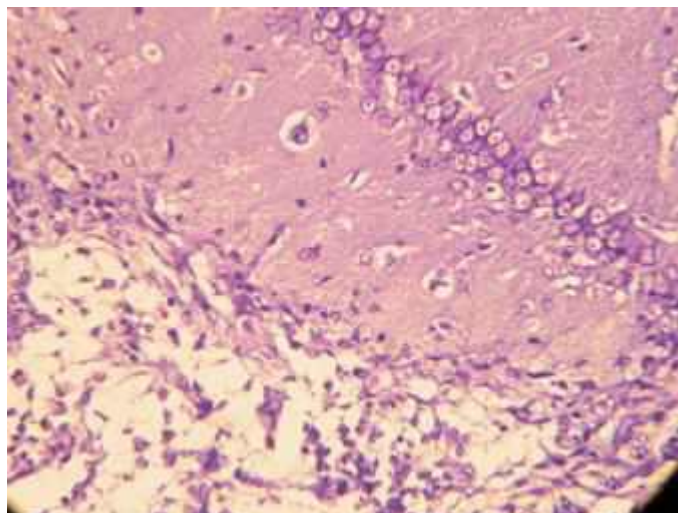


Рис. 4.2.2.5. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр16, ТТКМ), 14 доба після ОСМА. Зменшення обсягу зони ушкодження, збереження структури гіпокампа. Функціональна активація нейронів: збільшення об'єму ядер нейронів, чітка візуалізація ядерця. Ознаки периваскулярного та перицелюлярного набряку. Забарвлення гематоксилін–еозином, збільшення 200х.

В нейронах гіпокампа також наявні ознаки функціональної активації: збільшення об'єму ядер нейронів, чітка візуалізація ядерця (рис. 4.2.2.5).

Про ушкодження тканини мозку в цій ділянці свідчить наявність окремих гіперхромних дистрофічних нейронів і наявність перицелюлярного набряку, проте вираженість дегенеративно-деструктивних змін є меншою порівняно з контрольною підгрупою тварин із ОСМА (ПГр14).

На 21 добу після ОСМА у вогнищі ішемічного ушкодження правої півкулі головного мозку щурів у ПГр15 і ПГр16 (19 доба після трансплантації) продовжується формування гліо-мезодермального рубця та лікворних кіст в зоні некротизованої тканини. Це супроводжується збільшенням кількості функціонуючих мікросудин у ПІЗ.

В корі і гіпокампі ураженої півкулі головного мозку після ТЕНТ реєстрували поодинокі гіперхромні нейрони і гліоцити з ознаками каріопікнозу. Візуалізуються апікальні дендрити пірамідних нейронів, які простежуються до

III-IV шарів. Спостерігається збільшення розмірів тіл нейронів, що свідчить про активацію репаративних і синтетичних процесів.

В цей строк у ПЗ відзначається істотне зменшення щільності трансплантованих клітин. Серед останніх спостерігалися поодинокі капіляри, суміжні з ними венули були кровонаповнені, а в значній кількості клітин трансплантату, особливо в підгрупі тварин із ТТКМ (ПГр16), були виявлені дистрофічні зміни.

На даному терміні спостереження у тварин після ТТКМ суттєвих змін в клітинному складі кори, мозолистого тіла, внутрішньої капсули і гіпокампа не спостерігалося порівняно з попередніми термінами спостереження. Архітектоніка кори ПЗ характеризувалася типовою структурою із чіткою пошаровістю, але в більшості пірамідних нейронів були виявлені ознаки реактивної активації (просвітлення ядерного хроматину, поява в цитоплазмі глибок базофільної субстанції Нісля), що відображає репаративні процеси. Лише у поодиноких нейронах виявлені ознаки цитопікнозу. У щурів із ПГр16 також встановлено збільшення довжини мікросудин в проекції зрізу головного мозку.

На 28 добу після ОСМА (26 доба після ТТ) в головному мозку щурів із ТЕНТ і ТТКМ спостерігається завершення формування гліо-мезодермального рубця і демаркаційної зони на межі з ЗІГМ. Це супроводжується формуванням лікворної кісти на місці розпаду нервової тканини у ЗІГМ. У ПЗ відзначалася поява значного вмісту новоутворених мікросудин.

В перифокальній зоні кори мозку, мозолистого тіла та гіпокампа тварин ПГр11 і ПГр12, на відміну від ПГр10 і ПГр14, спостерігається чіткий типовий малюнок тканинної структури, їх пошарова диференціація (рис. 4.2.2.6.А–4.2.2.6.Б).

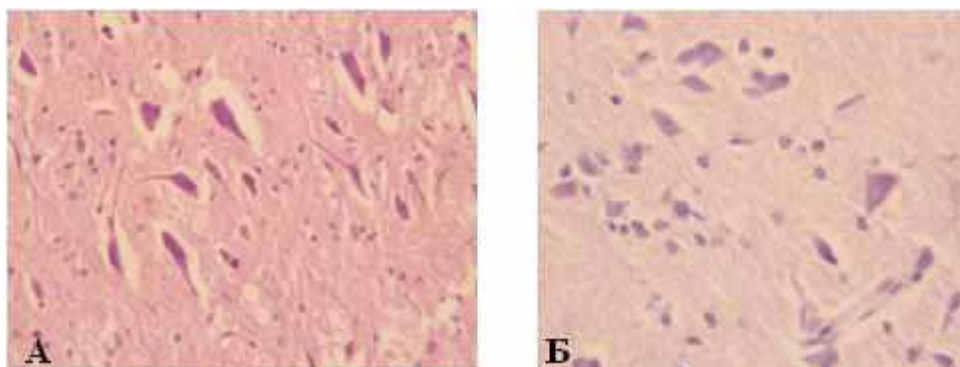


Рис. 4.2.2.6. Гістологічний препарат головного мозку експериментальної тварини, 28 доба після ОСМА. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 200 ×. А — ПГр15 (ТЕНТ). Зміни будови кори головного мозку. Б — ПГр16 (ТТКМ). Зміни будови кори головного мозку, нейронофагія, сателітоз, активація клітин мікрооточення.

Збережені нейрони кори головного мозку характеризувалися відновленням своєї форми та розмірів, особливо в підгрупі з ТЕНТ (ПГр15). Спостерігалось також істотне зменшення кількості дистрофічно змінених нейронів порівняно з ПГр14 (ОСМА), що свідчить про регрес вторинного деструктивно-дегенеративного процесу, який відбувається лише з 28 доби після ТЕНТ і ТТКМ.

На 28 добу після ОСМА в ділянці ТЕНТ продовжували зберігатися скупчення клітин трансплантату, але їх розмір істотно відрізнявся між окремими групами клітин, що може відображати різний ступінь синтетичних і проліферативних процесів. Навколо зони локалізації клітин трансплантату спостерігали також появу новоутворених мікросудин. У корі і гіпокампі іпсилатеральної півкулі структурні ушкодження нейроклітин (дистрофічні, некротичні) у ці строки вже не виявлялися.

У порівнянні з ТТКМ (ПГр16), у підгрупі тварин із ТЕНТ (ПГр15) виявлене збільшення площі пірамідних нейронів, що відображає активацію репаративних процесів. Але вміст гіперхромних нейронів у стані дистрофії істотно не відрізнявся від такого у контрольній підгрупі тварин (ПГр14, ОСМА).

На 28 добу після ОСМА (26 доба після ТТКМ) в щурів із ПГр16 в ділянці інтрацеребральної ін'єкції встановлено ознаки формування гліо-мезодермального рубця на місці ушкодженої тканини мозку. Клітин трансплантату не спостерігали, що може бути пов'язано з їх елімінацією або диференціацією.

В корі головного мозку в цей термін продовжували реєструвати окремі гіперхромні як дистрофічні, так і функціонально активні нейрони (рис. 4.2.2.6). МЦР соматосенсорної кори є структурно інтактним. При цьому відзначається підвищене кровонаповнення мікросудин. В ділянці мозолистого тіла, внутрішньої капсули та прилеглої тканини мозку реєструються гіпертрофовані (активовані) локальні скупчення гліоцитів без ознак каріопікнозу.

У тварин підгрупи з ТТКМ (ПГр16) спостерігається активація ангиогенезу в ПЗ, а розміри мікросудин наближалися до таких в інтактній півкулі головного мозку. Капіляри при цьому були різко кровонаповнені, що вказувало на їх функціональну гемодинамічну активність, незважаючи на наявність ангиодистонії.

На підставі комплексного гістологічного аналізу патоморфологічних змін в ділянці ІУГМ після ТТКМ і ТЕНТ у щурів експериментальних ПГр16 і ПГр15, відповідно, нами було встановлено, що ТТКМ посилювала ангиогенез в ПЗ, сприяючи тим самим відносному збереженню цито- і ангиоархітекtonіки головного мозку, зменшенню поширеності ЗІГМ і ступеня дистрофічних змін у нейронах і глії віддаленої, умовно інтактної, зони головного мозку. Подібні зміни спостерігалися і при ТЕНТ, проте їх вираженість, особливо неоваскуляризації, була меншою. Втім, на відміну від ТТКМ, ТЕНТ викликала посилення мітотичної активності клітин СВЗ бічного шлуночка, що може опосередковано свідчити про активацію нейрогенезу. Клітини трансплантату в ЕНТ довше персисували у вогнищі ІУГМ порівняно з клітинами ТКМ, проте ознак їх анатомічної інтеграції з тканинами реципієнта і диференціації в зрілі клітинні типи не було виявлено.

4.2.3. Морфологічні зміни головного мозку у тварин із інтрацеребральною інфузією 0,1 М фосфат-буферного 0,9% розчину натрію хлориду

З метою оцінки впливу процедури інтрацеребральної стереотаксичної трансплантації і хірургічної травми на динаміку патоморфологічних змін у ділянці ІУГМ нами було виконане гістологічне дослідження головного мозку щурів ПГр17 (“позитивний” контроль), яким було проведено інфузію безклітинного нейтрального розчину (0,1 М фосфат-буферний 0,9% розчин натрію хлориду — ІФБР) в аналогічні ділянки головного мозку, як при ТЕНТ і ТТКМ.

На 3 добу після ОСМА (1 доба після ІФБР) на фронтальних зрізах правої півкулі головного мозку щурів на рівні сенсо-моторної кори, мозолистого тіла, смугастого тіла, гіпокампа та внутрішньої капсули визначалася ЗІГМ із вираженим перифокальним набряком. Нейрони ПІЗ здебільшого гіперхромні, відзначається перицелюлярний і периваскулярний набряк. Серед них у ПІЗ виявлені окремі лейкоцити. Цитоархітектоніка нейронів кори істотно змінена: диференціація шарів практично не визначається.

На 7 добу після ОСМА (5 доба після ІФБР) на фронтальних зрізах правої півкулі головного мозку на тлі істотного зменшення набряку визначається чітко сформоване вогнище інфаркту мозку, по периферії якого у ПІЗ спостерігається активація астроцитів і клітин запалення (переважно, лімфоцитів і макрофагів) із формуванням лейкоцитарного “валу”.

Нейрони ПІЗ в корі і смугастому тілі зменшені в розмірах, містять переважно гіперхромні ядра. Нейрони соматосенсорної кори, смугастого тіла і гіпокампа ураженої (правої) півкулі головного мозку проявляють ознаки некробіотичних змін. У МЦР ПІЗ визначаються ознаки периваскулярного набряку, подекуди — некротичні зміни ендотеліоцитів прекапілярів і капілярів.

На 14 добу після ОСМА (12 доба після ІФБР) спостерігається утворення лікворної кісти на місці елімінації тканинного детриту в зоні інфаркту правої півкулі головного мозку. На межі лікворної кісти і ПІЗ відзначаються початкові ознаки формування гліо-мезодермального рубця. По всій площі ПІЗ

візуалізуються дифузно розосереджені нейрони та гліоцити в стані дистрофії, що відображає прогресування вторинних дегенеративних змін у зоні ІУГМ (рис. 4.2.3.1). Це супроводжується новоутворенням мікросудин.

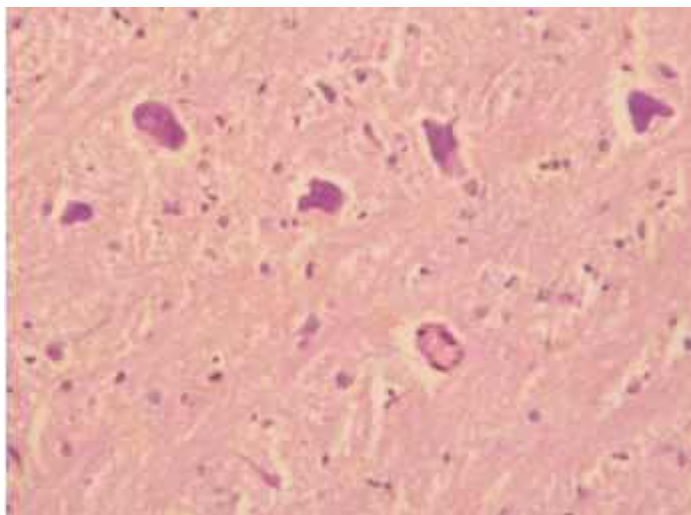


Рис. 4.2.3.1. Гістологічний препарат головного мозку щура (ПГр17, ІФБР), 14 доба після ОСМА. Зміни будови кори головного мозку: набряк, поля клітинного спустошення, каріопікноз. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення 400 ×.

На 21 добу після ОСМА на місці ЗІГМ визначається кістозна порожнина з гліальною вистилкою внутрішньої поверхні, заповнена ліквором. Також триває утворення гліо-мезодермального рубця. На 28 добу після ОСМА, поряд із формуванням гліо-мезодермального рубця та постінфарктної лікворної кісти, визначається розширення бічного шлуночка. Його стінка потовщена, відзначаються деструктивні зміни в окремих епендимоцитах та їх десквамація у просвіт шлуночка. Ознак проліферації клітин СВЗ не спостерігається.

4.3. Динаміка ангиогенезу за даними експресії CD34 в судинах перинфарктної зони головного мозку експериментальних тварин

Динаміка кількості судин за даними імуногістохімічної реактивності маркера ЕПК CD34 в ПЗ тварин ПГр1 на 1 і 3 добу після ОСМА та у відповідній зоні головного мозку дослідних тварин ПГр2 на 1 і 3 добу після ПОСМА відображена на рис. 4.3.1.

Середня кількість ідентифікованих за допомогою моноклональних антитіл до маркера CD34 судин в ПЗ мозку на 1 добу після ОСМА в тварин ПГр1 становила $10,1 \pm 2,0$, а після ПОСМА (в ПГр2) — $8,8 \pm 1,0$. На 3 добу після оклюзії спостерігається деяке збільшення середньої кількості судин в ПЗ до $11,5 \pm 1,4$ в щурів ПГр1, натомість істотних змін кількості судин в аналогічній зоні головного мозку тварин ПГр2 не було виявлено ($8,94 \pm 0,9$).

Різниця у показниках кількості судин між ПГр1 і ПГр2 на 1 і 3 добу виявилася статистично значущою ($F=7,486$, $df=1$; $p=0,014$). При цьому не встановлено істотних відмінностей між узагальненим середнім показником кількості судин в ПЗ у ПГр2 між 1 і 3 добою ($p=0,063$), на відміну від ПГр1 ($p<0,05$).

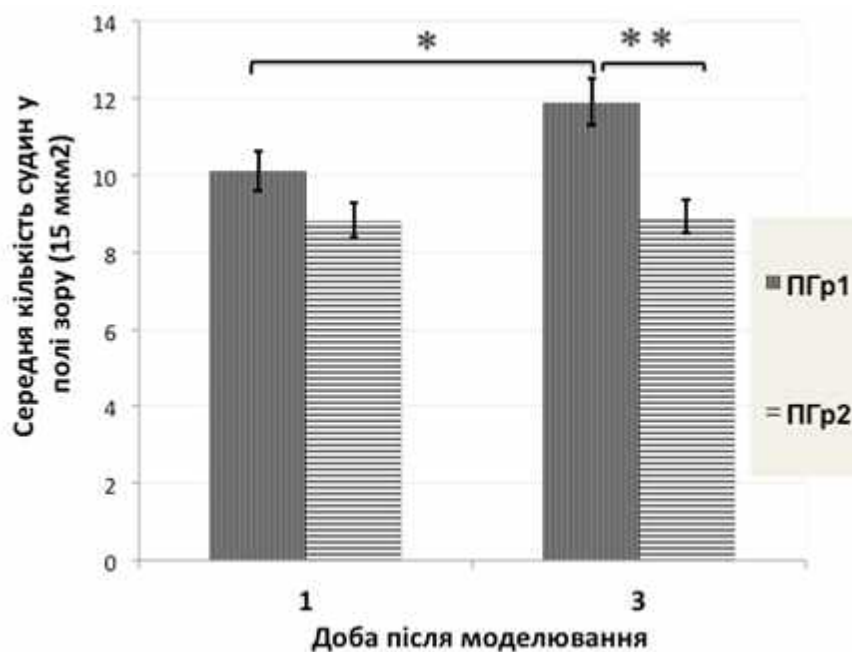


Рис. 4.3.1. Графічне зображення середнього показника кількості судин у полі зору в ПЗ головного мозку щурів ПГр1 і ПГр2 на 1 і 3 добу після ОСМА і ПОСМА, відповідно.

Примітка. ПГр1 — підгрупа 1 (ОСМА), ПГр2 — підгрупа 2 (ПОСМА), * — статистично достовірні відмінності у ПГр1 між 1 та 3 добою ($p<0,05$); ** — статистично достовірні відмінності між ПГр1 і ПГр2 ($p<0,05$).

З 7 по 28 добу спостерігається збільшення кількості судин в ПЗ головного мозку тварин усіх експериментальних груп (рис. 4.3.2–4.3.4).

При порівнянні середньої загальної кількості судин в ПЗ головного мозку в групах тварин в динаміці між 7 і 14 ($p=0,027$ за Scheffe і $p=0,022$ за Bonferroni), 14 і 28, а також 7 і 28 добою також було виявлено істотні відмінності ($F=224,6$, $df=2$, $p<0,001$).

На 14 добу середня кількість судин у полі зору в ПЗ щурів всіх експериментальних груп починає зростати: в ПГр10 — до $15,8\pm 2,3\%$, в ПГр11 — до $20,4\pm 2,2$, в ПГр12 — до $20,7\pm 1,5$, в ПГр13 — до $15,5\pm 1,3$ (рис. 4.3.2). При порівнянні між собою показників середньої кількості судин у ПГр10 і ПГр13 і в ПГр11 і ПГр12 статистично значущої різниці не було виявлено ($p=1,0$). Проте спостерігалися достовірні відмінності при порівнянні ПГр11 і ПГр12, з одного боку, і ПГр10 і ПГр13, з іншого ($p=0,026$).

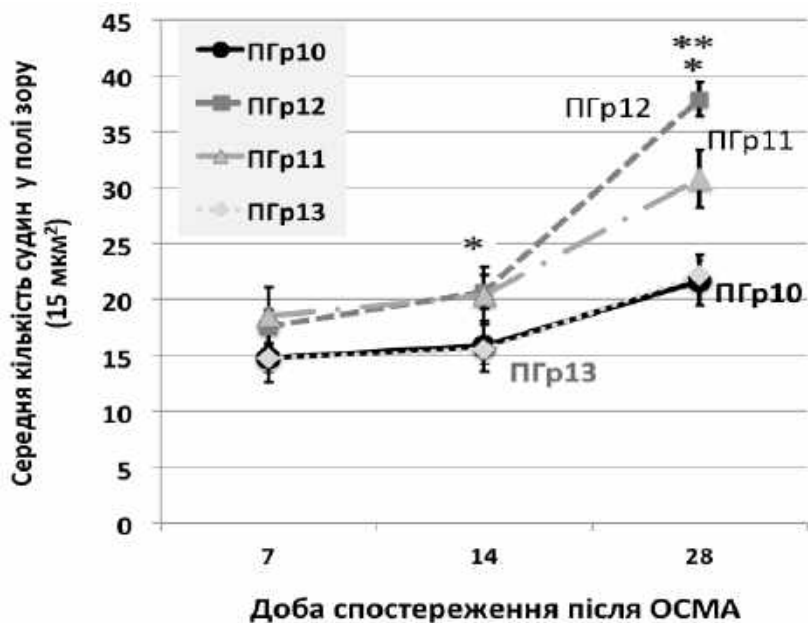


Рис. 4.3.2. Графічне зображення порівняльної динаміки середнього показника кількості судин у полі зору в ПЗ щурів.

Примітка. ПГр10 – підгрупа 10 (ОСМА), ПГр11 — підгрупа 11 (ТЕНТ), ПГр12 — підгрупа 12 (ТТКМ), ПГр13 — підгрупа 13 (ІФБР); * — статистично значущі відмінності ($p<0,001$) між ПГр10 і ПГр13, з одного боку, та ПГр11 і ПГр12, з іншого; ** — статистично значущі відмінності ($p<0,05$) між ПГр11 і ПГр12.

Слід зазначити, що на всіх термінах спостереження спостерігається достовірно вища активність ангиогенезу в ПЗ головного мозку щурів із ПГр11 і ПГр12 порівняно з ПГр10 і ПГр13 ($F=69,21$, $df=3$, $p<0,001$). При порівнянні середньої загальної кількості судин у підгрупах тварин в динаміці між 7 і 14 ($p=0,027$ за Scheffe і $p=0,022$ за Bonferroni), 14 і 28, а також 7 і 28 добою

($p < 0,001$) також були виявлені статистично значущі відмінності. Найбільша різниця між середньою кількістю судин в ПГр11 ($30,8 \pm 2,6$) і ПГр12 ($37,9 \pm 3,5$) відзначається лише на 28 добу ($p = 0,026$ за Scheffe і $p = 0,015$ за Bonferroni). Натомість різниця між середніми показниками кількості судин в ПГр10 (28 доба — $21,7 \pm 2,0$) і ПГр13 (28 доба — $22, \pm 1,7$) виявилася статистично недостовірною.

Загалом, середня кількість судин у полі зору ПЗ при порівнянні між 7 і 28 добою в щурів ПГр12 (ТТКМ) зросла на 215%, в ПГр11 — на 170%, в ПГр10 (ОСМА) і ПГр13 (ІФБР) — на 150%. Цікаво відзначити, що при порівнянні показників середньої кількості судин в ПГр1 (ОСМА) на 1 добу і в ПГр10 (ОСМА) на 28 добу спостереження, виявлено його збільшення на 215%.

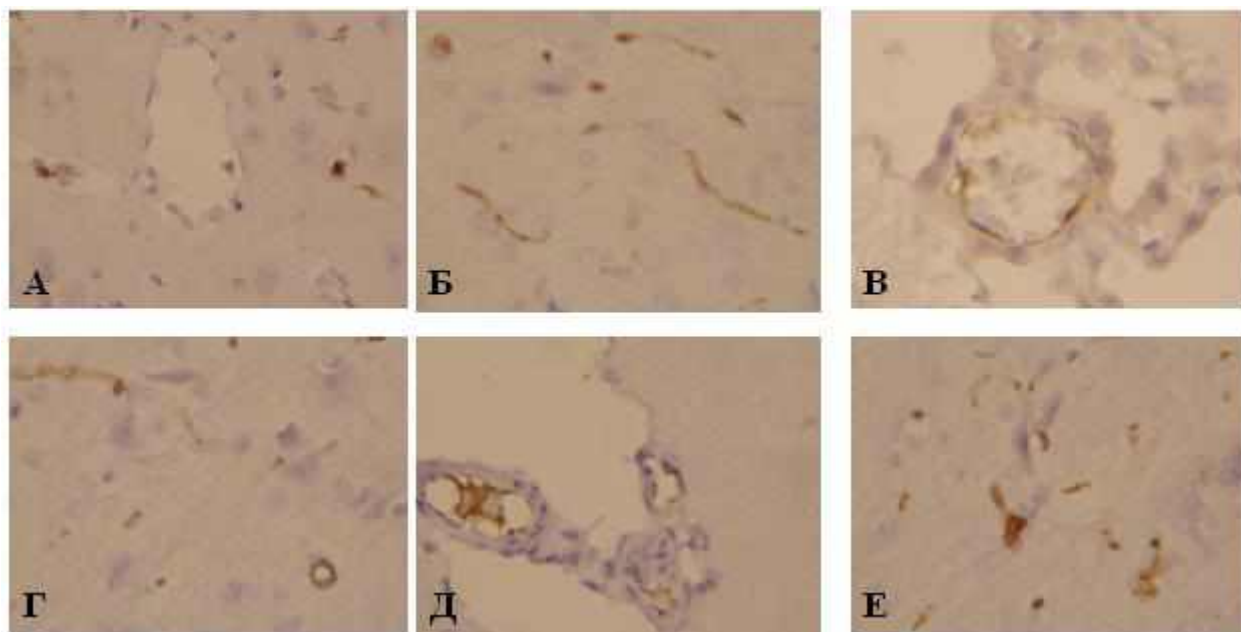


Рис. 4.3.3. Гістологічні препаратів головного мозку щурів. Розподіл новоутворених судин: імуногістохімічна реакція з антитілом до CD34, дозобарвлення гематоксиліном, збільшення 400 \times . А — ПГр10 (ОСМА, 7 доба після ОСМА); Б — ПГр12 (ТТКМ, 7 доба після ОСМА); В — ПГр11 (ТЕНТ, 7 доба після ОСМА); Г — ПГр10 (ОСМА, 14 доба після ОСМА); Д — ПГр12 (ТТКМ, 14 доба після ОСМА); Е — ПГр11 (ТЕНТ, 14 доба після ОСМА).

Результати множинного регресійного аналізу отриманих морфометричних даних і даних функціонального тестування свідчать про наявність сильної негативної кореляції відсотка моторної асиметрії кінцівок щура і кількості судин у ПЗ ($R^2=0,451$; стандартизований $\beta = -0,561$, $t=4,6$, $p<0,0001$) та слабкої позитивної кореляції ($R^2=0,255$, $\beta = 0,294$, $t=2,4$, $p=0,021$) даного показника із об'ємом ділянки інфаркту головного мозку (рис. 4.3.4).

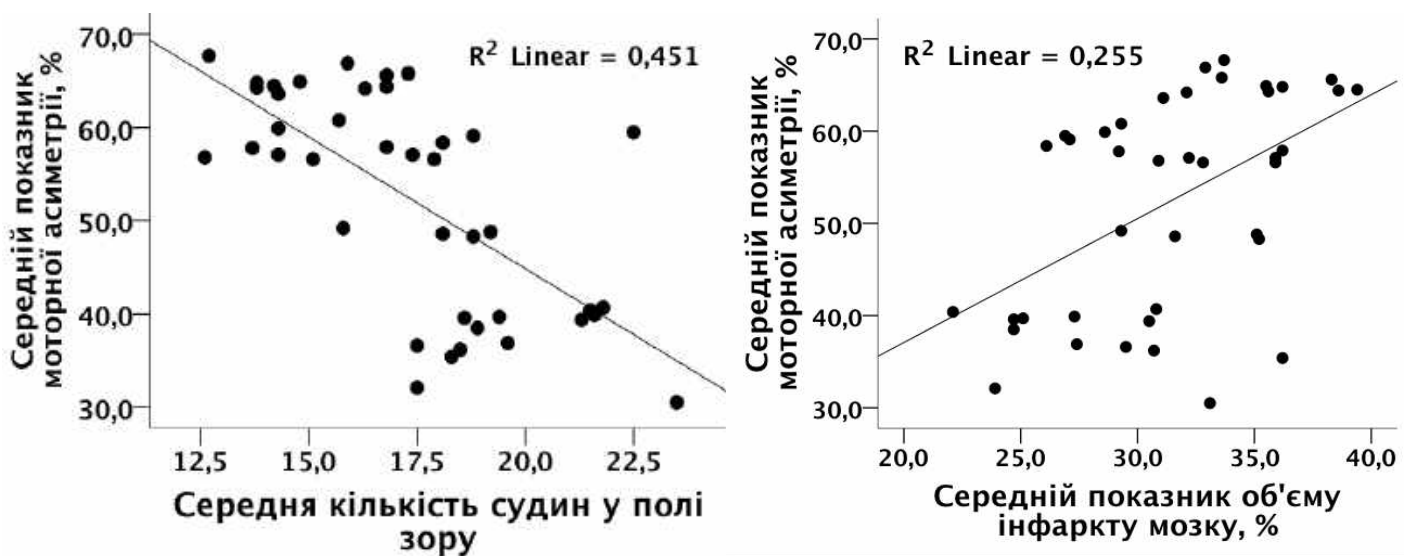


Рис. 4.3.4. Графічне зображення кореляції середнього показника кількості судин у полі зору в ПЗ щурів (ліворуч) і середнього показника об'єму ділянки інфаркту мозку (праворуч) та моторної асиметрії за даними множинного регресійного аналізу.

Примітка. R^2 linear – коефіцієнт лінійної регресії.

Висновки до розділу 4.

Таким чином, отримані експериментальні дані розкривають динаміку структурних змін при ішемічному ушкодженні тканин головного мозку щурів після ОСМА, пов'язаних з ним вторинних деструктивно-дегенеративних змін, порушень функціонування системи МЦР, активації реакцій асептичного запалення і пристосувально-репаративних процесів як безпосередньо в ЗІГМ, так і в ПІЗ і віддалених від неї ділянках ушкодженої півкулі головного мозку. Аналіз одержаних експериментальних даних дозволяє виділити кілька ключових ознак розвитку патоморфологічних змін півкуль мозку на фоні ішемічного ушкодження.

Так, на 1 добу після ОСМА відзначається формування зони ішемічного некрозу тканини головного мозку, який охоплює кору, смугасте тіло, внутрішню капсулу, частково поширюючись на гіпокамп, стінку бічного шлуночка і променистість мозолистого тіла правої півкулі.

На 3 добу завершується формування вогнища інфаркту мозку на тлі початкових проявів реактивної запальної реакції у вигляді інфільтрації зони некрозу та перифокальної зони поліморфноклітинним мезенхімальним інфільтратом (з переважанням у ранні терміни макрофагів, у подальшому — лімфоцитів).

На 7 добу спостерігається активація і гіперплазія астроцитів і формування демаркаційної зони навколо некротичних мас, утвореної переважно лейкоцитами, які в подальшому беруть участь в резорбції тканинного детриту. У ПІЗ відзначається збільшення кількості новоутворених судин.

На 14 добу прояви запальної реакції завершуються формуванням гліо-мезодермального рубця. На місці зони некрозу формуються лікворні кісти. Спостерігається прогресуюча вторинна дегенерація клітин ПІЗ та помірна активація клітин СВЗ бічного шлуночка та клітин мікроглії.

Протягом 21–28 діб навколо зони ІУГМ остаточно формується гліо-мезодермальний рубець і лікворна кіста. Помітні ознаки обмеженої репаративної регенерації в ПІЗ у вигляді адаптивної перебудови МЦР та компенсаторно-приспосувальної мікросудинної реакції (васкуло- і ангиогенез). На 28 добу після ОСМА помітне збільшення кількості новоутворених судин в ПІЗ.

Підсумовуючи вищенаведені дані, слід відзначити істотні відмінності в розвитку ішемічного ушкодження та репаративних процесів у ЗІГМ і ПІЗ щурів після ТЕНТ і ТТКМ порівняно з контрольною групою.

На 3 добу після ОСМА (1 доба після ТТ) у ПІЗ спостерігається скупчення клітин трансплантату на фоні локального набряку і некрозу тканин мозку в ділянці інтрацеребральної ін'єкції. На 7 добу після ОСМА (5 доба після трансплантації) починається активний процес очищення ділянки ішемічного ушкодження від некротичних мас по периметру ПІЗ і її відмежування від умовно інтактною тканини мозку. Реакції запалення виражені менше, ніж у тварин контрольної підгрупи (ПГр14, ОСМА).

При цьому цитоархітектоніка кори ураженої півкулі головного мозку при ТТКМ і ТЕНТ є більш збереженою, ніж при ізольованій ОСМА. Значно зменшується об'єм ділянки інфаркту мозку. При ТТКМ спостерігається активація ангиогенезу в ПІЗ, а при ТЕНТ — проліферація клітин СВЗ бічного шлуночка. Активація астроцитів і формування гліо-мезодермального рубця після ТТ відбуваються швидше, а зона клітинної інфільтрації в ділянці формування рубця є значно вужчою, ніж у тварин ПГр14 (ОСМА).

У ділянці ІУГМ правої півкулі головного мозку щурів на 14 добу після ОСМА спостерігається очищення від некротичних мас. Натомість трансплантовані клітини ЕНТ утворювали скупчення в межах ПІЗ. Деструктивно-дегенеративних змін у віддалених від зони ішемії ділянках ураженої (правої) півкулі мозку практично не спостерігали. У ПІЗ відзначається збільшення кількості новоутворених клітин, більш виражене в підгрупі тварин із ТТКМ. В той же час в ПІЗ головного мозку щурів із ПГр15 (ТЕНТ)

зафіксована більш активна проліферація гліальних клітин. На 21 добу постінфарктний гліо-мезодермальний рубець і лікворні кісти на місці резорбованих тканин були практично сформовані, як у головному мозку щурів із ТЕНТ, так і з ТТКМ.

У ПЗ іпсилатеральної півкулі щурів групи ТТКМ на 28 добу після ОСМА (26 доба після трансплантації) спостерігалася елімінація клітин кісткового мозку, тоді як у підгрупі тварин із ТЕНТ (ПГр15) були помітні ознаки тимчасової персистенції трансплантованих клітин. Лікворні кісти, вистелені гліоцитами, заміщали зону некрозу. Гліо-мезодермальний рубець чітко сформований. При цьому атрофія тканин мозку ураженої півкулі була значно менш вираженою, ніж у тварин контрольної ПГр14 (ОСМА) і ПГр15 (ТЕНТ). В головному мозку щурів цих обох експериментальних підгруп виявлені ознаки функціональної репарації нейронів кори ПЗ у вигляді збільшення їх розмірів.

В підгрупі тварин із ТТКМ (ПГр16) помітна активна неоваскуляризація ПЗ, а також ремоделювання функціонуючого МЦР у вигляді збільшення діаметра капілярів. При цьому найбільша активність ангиогенезу спостерігається на 21 добу після ОСМА, а на 28 добу поступово зменшується, що може свідчити про стабілізацію процесу новоутворення судин.

Таким чином, аналіз морфологічних змін тканин головного мозку після ОСМА і ТТ свідчить, що ТЕНТ і ТТКМ позитивно впливають на динаміку розвитку вогнища ІУГМ шляхом активації неоангиогенезу і прискорення формування гліо-мезодермального рубця і активації репаративних механізмів у ПЗ.

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що ТТ при ІУГМ в експерименті активує пристосувально-репаративні процеси, які сприяють відновленню і підтриманню функції збережених нервових клітин. Але слід наголосити, що інтрацеребральна ТТ також є певною мірою травматичним ушкодженням головного мозку щурів, що підтверджено гістологічно. Разом з тим клітини ТКМ гальмували реакції запалення та прискорювали формування

гліо-мезодермального рубця, що також свідчить про активацію адаптативно-репаративних процесів після травматичного та ішемічного ушкодження.

Отже, ТЕНТ сприяла більшою мірою активації репаративних процесів у нейронах і глії кори та смугастого тіла, а ТТКМ здебільшого активувала ангиогенез в ПЗ ураженої півкулі головного мозку щурів.

Таким чином, динаміка морфологічних змін ділянки ІУГМ щурів групи контролю трансплантації в цілому подібна до еволюції ділянки ішемічного ушкодження після ОСМА. Разом з тим слід зазначити, що інфузія фосфат-буферного розчину у вигляді додаткового об'єму сприяла прогресуванню вторинних деструктивно-дегенеративних змін у ПЗ, призводила до сповільнення формування гліального рубця, пригнічення реакції клітин СВЗ та розширення бічного шлуночка мозку на стороні ураження. Проте зазначені зміни істотно не вплинули на кількісні показники об'єму ділянки інфаркту мозку порівняно з контрольною групою.

Аналіз динаміки об'єму ділянки інфаркту головного мозку свідчить про позитивний вплив ТЕНТ і ТТКМ на стан і реактивні зміни клітин головного мозку в ділянці його ішемічного ушкодження. Даний ефект проявляється вже на 7 добу і досягає піку на 28 добу. На ранніх термінах спостереження (7–14 доба після ОСМА), зона ураження в групі тварин із трансплантацією кісткового мозку виявилася меншою, ніж в контрольній групі та в групі ІФБР, що підтверджується морфометрично. Цікаво, що позитивний вплив ТЕНТ на репарацію тканин мозку в ПЗ на світло-оптичному рівні не проявлявся статистично вірогідними відмінностями показника об'єму ділянки ІУГМ порівняно з тваринами ПГр14 (ОСМА) і ПГр17 (ІФБР). На пізніх термінах спостереження (21–28 доба) ТТ призводила до зменшення розмірів лікворної кісти та ступеня атрофії мозку, що проявлялося збереженням тканинного об'єму.

За нашими даними, прояви ангиогенного ефекту ТТ у вигляді новоутворення мікросудин у ПЗ головного мозку щурів спостерігаються вже на 7 добу і досягають максимуму на 28 добу. Явища неоваскуляризації

спостерігаються також в контрольній підгрупі тварин із ОСМА та в підгрупі щурів із ПОСМА. Натомість при порівнянні кількості судин ПЗ в щурів із ОСМА і в щурів із ПОСМА та подальшою «порожньою» інтрацеребральною ін'єкцією, в останній групі істотної динаміки не відзначалося. Це свідчить про відсутність ангіогенного ефекту локальної травми мозку (стереотаксична ін'єкція). Прояви стимульованого ТТКМ ангіогенезу в ПЗ головного мозку після ОСМА виявився більш вираженим, ніж при ТЕНТ, починаючи з 14 доби і досягав найбільшої вираженості на 28 добу спостереження, що супроводжувалося найбільшою різницею між підгрупою тварин із ТТКМ (ПГр12) та іншими експериментальними підгрупами.

Згідно з даними морфометричних досліджень, неврологічний статус піддослідних тварин відповідно до розробленого нами оптимізованого протоколу неврологічного тестування корелює з динамікою ангіогенезу у ПЗ та об'ємом ділянки інфаркту мозку при ТТКМ і ТЕНТ. При цьому відзначається статистично вірогідний сильний взаємозв'язок між активністю ангіогенезу і ступенем регресу рухових порушень в щурів, тоді як зв'язок між ступенем морфологічного ушкодження головного мозку і неврологічним дефіцитом виражений менше.

ПІДСУМКИ

У даній роботі проведено дослідження впливу інтрацеребральної трансплантації аутологічної ТКМ і алогенної ЕНТ на ангиогенез в ділянці ІУГМ і його морфо-функціональні ефекти в експерименті. На модифікованій моделі експериментального ішемічного інсульту за допомогою монофіламентної ОСМА із виключенням колатералей (оклюзія обох ЗСА і гілок правої ВСА на шії) у щурів нами продемонстрований позитивний вплив ТТКМ і ТЕНТ на структурно-функціональне відновлення в ділянці ІУГМ, пов'язаний із активацією ендогенних репаративних механізмів, передусім, постішемічного неоангиогенезу в ПІЗ. Позитивний вплив індукованого за допомогою ТТ ангиогенезу доведений на підставі комплексного аналізу динаміки неврологічного дефіциту в піддослідних тварин, морфометричного показника об'єму ділянки інфаркту мозку та кількості новоутворених судин за допомогою імуногістохімічної детекції маркера ЕПК CD34. Нами показано, що ТТКМ і, меншою мірою, ТЕНТ викликає збільшення кількості мічених антитілами до CD34-імунопозитивних судин в ПІЗ головного мозку щурів із ОСМА, зменшення об'єму ділянки інфаркту, зменшенню ступеня вираженості запальних реакцій і дегенеративно-дистрофічних процесів в ПІЗ і відновлення неврологічних функцій у піддослідних тварин.

Дані нашого дослідження свідчать про перспективність індукції постішемічного церебрального ангиогенезу за допомогою ТТКМ. Згідно з одержаними нами даними, імунореактивність до CD34 підвищується в судинах ПІЗ щурів вже на 3 добу після ОСМА, а на світлоптичному рівні вже на 7 добу після ОСМА (5 доба після ТТ) в ПІЗ формуються новоутворені судини. ТТКМ викликає істотне збільшення кількості судин в ПІЗ щурів, починаючи з 14 доби після ОСМА, яке триває до 28 доби спостереження, коли спостерігається найбільша різниця між ПГр1 (ОСМА) і ПГр4 (ТТКМ). За різними даними, постінсультна судинна проліферація може тривати близько 21–24 днів і більше [58, 59, 100, 105]. За нашими даними, ангиогенний ефект ТТ досягає максимуму

на 28 добу, що, за деякими даними, відповідає терміну формування стабільної функціонуючої судинної мережі [100, 105]. Слід зазначити, що ангиогенез, стимульований ТТКМ, виявився більш вираженим, ніж при ТЕНТ, починаючи з 14 доби і до кінця терміну спостереження, коли різниця між показниками кількості судин у цих двох підгрупах досягла статистично значущого рівня.

Наші дані про кінетику ІЦА під впливом НТ узгоджуються із даними інших дослідників. Більшість цих досліджень присвячена трансплантації СККМ (мононуклеарних клітин) або МСККМ [191, 192, 242, 243]. У роботі В.І. Цимбалюка і співавторів, В.В. Колесника було встановлено, що кількість судин, виявлених за допомогою імуногістохімічного мічення антитілами до ендотеліального маркера, фактора фон Віллебрандта (ФФВ), в ділянці ІУГМ зростає під впливом трансплантації МСККМ на 14 добу після моделювання емболічного ішемічного інсульту [30, 242]. Втім, зазначені автори відзначають поступове зменшення кількості судин у контрольній групі з модельованим інсультом з 1 по 7 добу, що свідчить про пригнічення ендогенної неоваскуляризації [30, 242]. J. Chen і співавторів переконливо показано, що внутрішньовенне введення СККМ в терміни 24 год. після ОСМА приводить до істотного збільшення периметру і загальної площі судин, а також кількості точок галуження на 14 добу спостереження [187]. Зинькова Н.Н. і співавт. відзначають збільшення вдвічі порівняно з контролем кількості імунопозитивних до ФФВ судин у ПІЗ через 6 тижнів спостереження в умовах внутрішньовенної трансплантації МСККМ на 3 добу після ОСМА [188]. Автори також відзначають збільшення кількості судин в інтактній півкулі мозку. Недоліком зазначених досліджень є використання одного терміну для кількісної оцінки активності ангиогенезу і відсутність порівняння кількості судин в динаміці при ГФЦІ і НТ. J. Wang і співавтори за допомогою методу латексної перфузії показали, що діаметр лептоменінгеальних колатералей і судин Вілізієвого кола збільшується на 14 і 42 добу спостереження під впливом внутрішньовенно введених МККМ через 24 год. після ОСМА [191]. Кількість мічених бромдезоксипурином ендотеліальних клітин зростала на 14 добу і

досягала піку на 28 добу, дещо зменшуючись на 42 добу після ОСМА. При цьому щільність артеріол на 42 добу після ОСМА була значно більшою в групі з трансплантацією, ніж в контрольній групі. Y. Li і співавторами також було встановлено збільшення кількості судин у ПЗ на 14 добу після ОСМА на 218% порівняно з контрольною групою (ОСМА) при внутрішньовенному застосуванні “регенеративних” клітин кісткового мозку через 24 год. після індукції ГФЦІ [35]. T. Onda і співавтори також відзначали збільшення об’єму капілярів у ПЗ на 7 і добу після ОСМА під впливом трансплантації людських МСККМ [244].

За нашими даними, ТЕНТ також викликає помірне підвищення активності ангиогенезу в ПЗ щурів із ОСМА. Ангіогенний ефект ЕНТ може бути пояснений впливом популяції НСК і виділюваних ними ФР, які, за даними деяких авторів, можуть стимулювати ріст новоутворених судин [218–221]. У роботі D. Oishi і співавторів показано, що НСК можуть диференціюватися в ендотеліоцити та формувати судиноподібні тубулярні структури *in vitro* [218]. P. Zhang і співавтори продемонстрували, що кількість судин, мічених антитілами до ФФВ, під впливом ембріональних НСК підвищується на 46 і 65% на 7 і 14 добу після ОСМА порівняно з контролем, проте вже на 28 добу дані відмінності не є статистично значущими [219].

Для визначення питомої кількості судин в ПЗ нами були використані моноклональні антитіла QVEnd10 до маркера CD34, який є одним із конститутивних маркерів ендотеліальних клітин [245]. CD34 використовується в клінічних дослідженнях ангиогенезу, зокрема в онкології, поряд із іншими маркерами (ФФВ, CD31, CD45, CD105 тощо) [238-240]. Даний маркер експресують також ЕПК, які, за різними даними, беруть активну участь у постінсультному ангиогенезі [103, 116, 117]. Ми припускали, що визначення експресії CD34 дозволяє ідентифікувати не лише ендотеліоцити, а й ЕПК в стінці новоутворених судин, що у кількісному відношенні свідчить про активність неоангіогенезу, зокрема васкулогенезу.

Точні механізми активації ангиогенезу за допомогою ТТКМ або СККМ

залишаються предметом дискусій. В нашому дослідженні встановлено збільшення кількості судин із CD34-імунопозитивними клітинами, що вказує передусім на активацію васкулогенезу — утворення судин *de novo* за участю ЕПК кістково-мозкового походження. При цьому ТКМ може виступати як джерелом ЕПК, так і потужним тригером їх мобілізації із судинного русла і кісткового мозку в умовах ішемії. Дана гіпотеза підтверджується літературними даними [246–249]. Так, зокрема, в роботі J. Wang і співавторів було показано, що трансплантовані МККМ, які містять популяції ЕПК і МСК і експресують відповідні маркери (CD34, CD45, CD90, CD117), стимулюють артеріогенез і ангиогенез за рахунок вбудовування в судинну стінку і диференціації в гладенькі міоцити і ендотеліоцити, починаючи з 14 доби після індукції постійної ОСМА [191]. Ангіогенний ефект клітин кісткового мозку утримувався протягом 6 тиж. після трансплантації. D.C. Hess і співавтори спостерігали вбудовування клітин кісткового мозку в стінки судин і експресію ними ендотеліоцитарних маркерів на 3, 7 і 14 добу після ОСМА в мишей [209]. При цьому на 3 добу після ОСМА (2 доба після трансплантації клітин кісткового мозку) 42% мічених зеленим флюоресцентним білком ендотеліальних клітин у судинах ПЗЗ були кістково-мозкового походження, 31% — на 7 добу і 26% — на 14 добу спостереження. Загалом відсоток флюоресцентних клітин варіював у межах 16–61%, в середньому — 34%, що свідчило про питому участь ЕПК кісткового мозку в постішемичному ангиогенезі.

Існують також дані на користь секреції клітинами ділянки ІУГМ гуморальних чинників, які сприяють мобілізації ЕПК із кісткового мозку в системний кровоплин і їх міграції в ЗІГМ [248]. СККМ можуть активувати цей процес в умовах ГФЦІ [2195]. Трансплантація очищеної фракції CD34-позитивних клітин і ЕПК викликали стимуляцію ангио- і нейрогенезу в експериментах на щурах і мишах із ОСМА [194].

Втім, не всі автори поділяють гіпотезу про стимульований постнатальний васкулогенез. Наприклад, в роботі L. Zentilin і співавторів при імплантації

вектора СЕФР в м'язи нижніх кінцівок мишей із попередньо пересадженим кістковим мозком, який містив мічені зеленим флюоресцентним білком ЕПК, не було помічено присутності ЕПК в новоутворених судинах [193]. Обмеженнями даного дослідження, на нашу думку, є проведення дослідів на інтактних тканинах, тоді як при ішемії, створюються зовсім інші умови для судинної регенерації, зумовлені активацією численних сигнальних шляхів. Наприклад, D.C. Hess та ін. показали, що в інтактному мозку імплантовані клітини кісткового мозку практично не диференціюються в ендотеліоцити [209]. За даними В. Yang і співавторів, у МККМ щурів після ОСМА відзначається зменшення кількості Т-клітин і МСК, збільшення рівня CD34-позитивних і NK-клітин, а також підвищення рівнів СЕФР, ФНПа, ІЛ-1 і -6 [164].

Цікаво, що в роботі L. Zentilin і співавторів ангиогенний ефект СЕФР підвищувався на 7 добу і досягав піку на 28 добу, що збігається з одержаними нами результатами [193]. Таким чином, можна припустити, що ІЦА за допомогою ТТКМ пов'язаний передусім із дією СЕФР. Даний механізм ангиогенної дії клітин кісткового мозку підтверджується даними інших авторів [187, 201, 214, 224]. Інтрацеребральна трансплантація СККМ через 1 год. після ОСМА викликає підвищення експресії СЕФР вже на 1 добу спостереження [35, 201]. N. Li і співавтори встановили підвищення рівня СЕФР-позитивних клітин з 1 по 3 добу після ОСМА із подальшим зниженням і стабілізацією на 7 добу в щурів із трансплантацією СККМ [201]. Аналогічні результати одержані Y. Li і співавтори [35]. За їх даними, пік рівня експресії мРНК СЕФР припадав на 1 добу і знижувався на 3 добу після ОСМА у щурів із трансплантацією, що передувало експресії СЕФР, при цьому його рівень був стабільно вищий, ніж у контрольній групі, протягом усього періоду спостереження. Рівень експресії СЕФР і РСЕФР 2 в умовах трансплантації людських СККМ був вищим, ніж в контрольній групі, за даними J. Chen і співавторів [187] Автори також виявили підвищення рівнів експресії РСЕФР2 в ендотеліоцитах мозку, що дозволило їм висунути припущення про активацію експресії СЕФР астроцитами і

ендотеліоцитами і РСЕФР2 ендотеліоцитами, взаємодія яких (СЕФР і РСЕФР2) є ключовою ланкою ангіогенезу. Одним із медіаторів цього процесу може бути оФРФ, який секретується СККМ і стимулює продукцію СЕФР і РСЕФР2 в клітинах ПЗ [187, 214]. Дані про ангіогенний ефект оФРФ підтверджуються іншими авторами [105].

В стимульованому ТТКМ ангіогенезі можуть брати участь і інші фактори росту, зокрема Анг1 і його рецептор Tie2, які стабілізують судинну стінку і підтримують цілісність ГЕБ [214, 244]. Можливо, оФРФ і ФРГ, секретовані СККМ, також беруть участь у стабілізації судинної стінки, оскільки ізольована дія екзогенного СЕФР, особливо в ранні терміни після інсульту, може призводити до формування нестабільних судин із високою проникністю, що потенціюватиме прогресування постішемічного вазогенного набряку мозку [187, 214, 244]. За даними С.V. Borlongan і співавторів, СККМ мишей при імплантації в ділянку ІУГМ викликають підвищення рівня ТФРВ поряд із відновленням мозкового кровоплину і цілісності ГЕБ на 4–5 добу порівняно із групою, яка отримувала ІФБР, в якій ці процеси досягали контрольного рівня лише на 11–14 добу після ОСМА [27].

Поодинокі дані вказують на можливість стимуляції церебрального ангіогенезу і за допомогою ТЕНТ, що спостерігається в наших дослідах [171, 218–221]. У роботі В.І. Цимбалюка і співавторів на емболічній моделі ішемічного інсульту шляхом ін'єкції зависі сульфату барію у ВСА щурів показано, що на 7 добу спостереження діаметр просвіту мікросудин в зоні ІУГМ вдвічі збільшується порівняно з інтактними тваринами, а при ТЕНТ збільшення просвіту судин спостерігається на 2 добу і зменшується до контрольних показників, що свідчить про стабілізацію МЦР під впливом ЕНТ [171].

ЕНТ (ФНТ) є добре вивченим і дослідженим як в експерименті, так і в клініці, засобом регенеративного лікування патології ЦНС, в тому числі, ішемічного інсульту [28, 29, 171]. Позитивний вплив ЕНТ (ФНТ) при патології ЦНС, на думку дослідників, зумовлений наявністю в ній популяцій НСК і НПК

разом із ендogenous мікроточенням, яке сприяє виживанню трансплантату і його інтеграції в мозку реципієнта [27–29]. Дія НПК, НСК і ЕНТ пов'язана в першу чергу, з виживанням трансплантованих клітин в мікрооточенні головного мозку реципієнта, їх міграцією, диференціацією в зрілі нейрони і гліюцити, вбудовуванням у нейрональну мережу, активацією нейрогенезу і процесів синаптичної пластичності [28, 29, 171, 174, 247–249]. Трансплантовані НСК експресують маркери нейронів і клітин глії і проявляють характерні для них електрофізіологічні властивості [169, 173, 248]. Нейрональні клітини як засіб для НТ не позбавлені низки серйозних недоліків, що обмежує перспективи їх потенційного клінічного застосування при інсульті:

- 1) морально-етичні аспекти, пов'язані із забором ембріональних тканин;
- 2) інвазивність процедури забору НСК і НПК дорослого організму;
- 3) необхідність тривалого культивування, його висока вартість;
- 4) інвазивність процедури трансплантації, яка передбачає, як правило, інтрацеребральний шлях введення;
- 5) необхідність додаткової імуносупресії [18, 176, 177].

З огляду на механізми впливу ЕНТ (ФНТ), НСК і НПК на нейрорепарацію, дослідниками підкреслюється необхідність комплексного впливу на всі ланки нейросудинної «одиниці», що передбачає одночасну активацію нейро-, ангіо- і синаптогенезу [16, 17, 138, 177]. Саме такий механізм дії приписують клітинам кісткового мозку і ТКМ в цілому [30, 183].

Втім, ефекти застосування цільного кісткового мозку при ГФЦ вивчалися лише в декількох роботах, які були присвячені вивченню функціонального ефекту ТТКМ [33, 34, 192]. Ангіогенний вплив ТТКМ був продемонстрований лише на моделях ішемії нижніх кінцівок і інфаркту міокарда [36–38].

Стимуляція постішемичного церебрального ангіогенезу розглядається як один із потенційно ефективних механізмів відновлення кровоплину в ПЗ головного мозку, критично важливого для підтримання нормального функціонування нейронів [20, 24–26]. Ендogenous ангіогенез в зоні ІУГМ відбувається за допомогою трьох основних процесів: 1) артеріогенезу —

залучення колатералей на рівні артерій і артеріол за рахунок градієнту тиску і механізму міогенної регуляції — активується одразу після оклюзії привідної артерії; 2) васкулогенезу — міграції і диференціації ЕПК; 3) ангиогенезу — брунькування і галуження “материнських” судин [20, 76, 94, 95]. Питомий внесок кожної з цих ланок в постінсультну неоваскуляризацію є не до кінця з’ясованою. Дискутабельним залишається також питання про функціональну роль ендогенного або екзогенного ангиогенезу, беручи до уваги час, необхідний для утворення нових судин [20, 25]. Більшість дослідників схиляються до думки, що ангиогенні стимули можуть запускати додаткові репаративні механізми в головному мозку, які, зрештою, можуть приводити до функціонального відновлення після інсульту [25, 26, 76, 78, 79].

З метою екзогенної активації церебрального ангиогенезу в експериментальних і клінічних дослідженнях застосовувалися ФР (СЕФР, оФРФ, НФМП, НФГП, Г-КСФ, ГМ-КСФ, ЕПО, фактор стовбурових клітин, Анг, ФСК-1 α , ФРТП, ТФР α , ІФР-1), клітинні суспензії і культури (СККМ, МСККМ, ГСК, НСК, ЕПК, СКПК, АСК), генетично модифіковані СК і їх різноманітні поєднання [22].

З огляду на складність і багатогранність механізмів регуляції альтеративних і репаративних процесів при інсульті, застосування чинників, орієнтованих на один або декілька сигнальних шляхів, вважається дослідниками менш перспективним, ніж агентів із мультимодальним механізмом дії [49, 67, 69]. До того ж, важливим фактором, який необхідно враховувати при застосуванні ангиогенних ФР є ймовірність гіперстимуляції і неконтрольованого росту судин [20]. Для цього проникність ГЕБ і ініціація ангиогенезу повинні бути збалансовані у часі і просторі, що в клінічних умовах застосування ФР є важкодосяжною метою [20, 26, 76]. Доведено, що при посиленому рості судин, перицити і пристінкові клітини не встигають стабілізувати судинну стінку, що призводить до розвитку вазогенного набряку [15, 20, 21]. В зв'язку з цим, з метою модуляції і спрямованої корекції

ангіогенезу при інсульті все частіше використовуються стовбурові і прогеніторні клітини різного походження [22].

Незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених проангіогенній клітинній трансплантації, лише в поодиноких роботах досліджувалися ефекти ТТ [33, 34, 192]. З одного боку, це зумовлено більшою інвазивністю процедури інтрацеребральної трансплантації, необхідної для доставки тканинної суспензії в ділянку ІУГМ, з іншого — використанням методик дисоціації і культивування клітин для створення можливостей для внутрішньовенного і внутрішньоартеріального введення клітинних суспензій.

Залишається відкритим питання про роль як ендогенного, так і стимульованого ангіогенезу у відновленні неврологічних функцій після інсульту. В нашому дослідженні продемонстрований регрес неврологічного дефіциту в піддослідних тварин із ОСМА після інтрацеребральної ТЕНТ і ТТКМ. Даний ефект проявлявся вже на 1 добу після трансплантації і утримувався протягом всього періоду спостереження (28 діб), досягаючи піку на 7 (за даними тестів оцінки сенсорної асиметрії та сенсомоторної інтеграції) і 14 добу (за даними тестування рухової і локомоторної функції). Одержані нами дані свідчать про більш виражений і швидкий регрес неврологічного дефіциту в щурів із ОСМА при ТТКМ порівняно з ТЕНТ. На нашу думку, це пов'язано, в першу чергу, зі стимуляцією постінсультного ангіогенезу в ПІЗ щурів. Результати нашого дослідження вказують на наявність сильної негативної кореляції між показником середньої кількості судин у ПІЗ і ступенем моторної асиметрії, що, в свою чергу свідчить про взаємопов'язаність ангіогенезу і відновлення неврологічних функцій.

Позитивний вплив ТЕНТ, ТТКМ, трансплантації НСК, НПК, СККМ і МККМ, а також індукованого за допомогою ФР церебрального ангіогенезу на відновлення неврологічних функцій у лабораторних тварин після експериментального ішемічного інсульту був переконливо доведений в низці досліджень [22, 24, 26, 108, 109, 156, 250–252]. Лише поодинокі роботи не

відзначають статистично значущого покращення неврологічного статусу тварин при ІЦА і трансплантації СККМ [162, 167].

Динаміка відновлення неврологічних функцій у дослідях із трансплантацією СККМ, МСККМ, ТКМ або МККМ у різних дослідях відрізнялася. Y. Li і співавтори відзначають прогресивне покращення неврологічних функцій у мишей із ТТКМ з 1 по 28 добу після ОСМА за модифікованою шкалою неврологічного дефіциту (mNSS — modified neurological severity score) [35]. В іншому дослідженні, ТТКМ разом із інтрацеребральним введенням НФМП викликала покращення виконання ТКС і обертання в колесі на 7 добу [33]. T. Onda і співавтори відзначають регрес моторного дефіциту за даними тредміл-тесту в тварин із трансплантацією СККМ на 1 добу після ОСМА, який тривав до 7 доби спостереження після ОСМА [244]. У дослідженні із трансплантацією РСЕФР2-модифікованих СККМ, статистично значуще відновлення неврологічних функцій спостерігалось, починаючи з 14 доби після ОСМА [224]. F. Yang не виявили відмінностей у неврологічному статусі щурів контрольної групи і групи із трансплантацією СККМ після на 14 добу після ОСМА, натомість відзначали покращення неврологічних функцій у групі тварин, де трансплантація СККМ проводилася в хітозан-колагеновому матриксі [253]. Поведінкове тестування у водному лабіринті Морріса в дослідях Колесника В.В. і співавт. виявило статистично значущу різницю між контрольною групою і групою із введенням МСККМ на 3 і 7 добу, тоді як Н.Н. Зинькова і співавтори відзначають достовірне покращення за даним тестом лише на 14 добу після моделювання ОСМА, відповідно [30, 138]. Однак в останньому дослідженні, за шкалою комплексної оцінки неврологічного дефіциту, статистично значущі відмінності між групою щурів із трансплантацією і контрольною групою спостерігалися вже на 3 добу після ОСМА [188].

В роботі J. Chen і співавторів кращі результати за модифікованою шкалою неврологічного дефіциту (mNSS) і даними ТКС в групі щурів із трансплантацією СККМ відзначалися, починаючи з 14 доби і утримувалися на

статистично достовірному рівні через 1 рік після ОСМА [254]. N. Li також використали mNSS і продемонстрували статистично значущу різницю в показниках між групою із ОСМА і групою із трансплантацією людських СККМ на 1, 3, 7 і 28 добу після ОСМА [201]. Інша група дослідників при серійному тестуванні тварин з 1 по 42 добу після ОСМА, виявила покращення неврологічного статусу тварин із трансплантацією МККМ, починаючи з 7 доби і протягом усього подальшого періоду спостереження [191]. Y. Li і співавторами одержані аналогічні результати при меншому терміні спостереження (1,7 і 14 доба після ОСМА) [35]. У дослідженні В. Yang краще виконання тесту “в циліндрі” (англ. “cylinder-test”) і “в куті” (англ. “corner-test”) у щурів із ауто трансплантацією мононуклеарних СККМ спостерігалось на 1, 7, 14 і 28 добу після ОСМА порівняно з контролем [164]. Y. Miki і співавтори спостерігали покращення неврологічного статусу щурів із трансплантацією СККМ і трансфеткованих геном СЕФР СККМ за модифікованою шкалою неврологічного дефіциту на 14, 21 і 28 добу після ОСМА [222]. Таким чином, серійне динамічне спостереження за тваринами після ОСМА дає змогу виявити тривалий і стійкий функціональний ефект НТ на експериментальних моделях ішемічного інсульту, що підтверджується іншими авторами [233, 234, 255].

Мета-аналіз 46 експериментальних досліджень і 62 способів трансплантації за допомогою СККМ статистично підтверджує покращення функціональних наслідків у 44 і 52 з них, відповідно [31]. Автори зазначають, що кращі функціональні результати спостерігалися в досліджах на більшій кількості експериментальних тварин, при початку лікування ≥ 24 год. після індукції ГФЦІ і застосуванні більш інвазивних методів трансплантації, зокрема інтрацеребральної. Зменшення об'єму ділянки інфаркту мозку спостерігалось при введенні СККМ у терміни 1–7 діб після ГФЦІ, причому найкращий ефект досягався при трансплантації у перші 8 год. [55].

Дані неврологічного тестування тварин із ОСМА після трансплантації ЕНТ (ФНТ), НПК або НСК також відрізняються в різних лабораторіях [29, 174, 179, 248]. В цілому, за даними різних тестів, регрес функціонального дефіциту

в експериментальних тварин після застосування НСК, ЕНТ(ФНТ) або НПК реєструється пізніше, ніж при застосуванні ТКМ, СККМ, МККМ або МСККМ — починаючи з 2–3 тиж. після трансплантації [27, 169, 179]. При цьому деякими авторами в протоколі тестування частіше використовуються поведінкові тести [173].

Недоліками багатьох досліджень і, як наслідок, існуючих між ними розбіжностей в оцінці функціонального результату НТ, на нашу думку, є використання лише одного фіксованого терміну для неврологічного тестування, недостатня тривалість спостережень, обмеження використання складних для інтерпретації тестів вищої нервової діяльності у щурів (наприклад, водний лабіринт Морріса, тест “відкритого поля”, пасивного уникання та ін.), які недостатньо відображають ступінь анатомічного ушкодження структур мозку після ГФЦІ, або використання недостатньо чутливих тестів, які містять істотний компонент навчання і компенсаторної поведінки.

Загально визнано, що вивчення функціональних і поведінкових наслідків при експериментальній розробці нових методів лікування ішемічного інсульту відіграє провідну роль в оцінці їх ефективності [41, 44, 47, 231]. Серійне дослідження динаміки неврологічних порушень *in vivo* у різні терміни після експериментального моделювання ішемічного інсульту вважається найбільш доцільним для оцінки ефективності тканинної НТ, яка спрямована на стимуляцію ендогенних нейрорепаративних процесів, зокрема ангиогенезу [231, 233, 234, 255]. Незважаючи на велику кількість існуючих методик функціонального тестування, не існує єдиного стандартизованого протоколу оцінки неврологічних порушень в гризунів, зокрема, в щурів. Це зумовлює необхідність відбору релевантних тестів і шкал, які б найбільш достовірно відображали ефект стимульованої нейросудинної регенерації, який розвивається впродовж тривалого часу після ішемічного ушкодження. Зокрема, T. Schallert і співавтори вважають, що поведінковий тест повинен бути не лише чутливим до ступеня анатомічного ушкодження певної ділянки мозку, але й виявляти зміни поведінкових реакцій в результаті тканинних репаративних

процесів або посилення механізмів нейропластичності [231]. Водночас функціональна оцінка повинна бути комплексною і включати тести, специфічні для ушкодження певних ділянок мозку та порушення відповідних їм функцій (соматосенсорних, локомоторних, рухових, когнітивних і поведінкових) [231]. Надзвичайно важливе значення має властивість тестів визначати саме відновлення нативної функції мозку, на відміну від стимуляції процесів навчання та засвоєння альтернативних стратегій поведінки, які можуть маскувати наявний неврологічний дефіцит [231, 233]. На думку дослідників, з метою забезпечення переходу досліджень індукованої нейросудинної регенерації при ішемічному інсульті з доклінічної в клінічну стадію необхідне обов'язкове підтвердження, що досліджуваний метод викликатиме істотний регрес функціонального дефіциту в піддослідних тварин, який значною мірою відтворює подібні симптоми в людини [44, 46, 231, 233, 256].

Застосування НТ в підгострому і віддаленому періоді після експериментального моделювання ішемічного інсульту орієнтоване на тривалий перебіг репаративних процесів, що зумовлює необхідність тривалого виживання тварин і спостереження за ними [233, 234]. В зв'язку з цим, позитивний вплив нейрорепаративних стратегій, зокрема, ІЦА, може бути виявлений лише за допомогою кількісної оцінки неврологічних порушень в умовах серійних повторюваних вимірювань [44, 231]. Для цього тести повинні бути чутливими і стійкими до спонтанного регресу функціонального дефіциту. Оскільки ОСМА викликає ішемічне ушкодження різних функціональних ділянок мозку (смугового тіла, нової кори, гіпокампа), важливою вимогою до тестів є їх специфічність та диференційоване застосування відповідно до модальності [44, 231, 233].

Разом з тим багато повідомлень про успішні результати лікування ішемічного інсульту із застосуванням клітинних технологій в експерименті використовують тести, які не відображають реальної клінічно релевантної ситуації та мають навчальний компонент, який дозволяє використовувати

тваринам альтернативні стратегії для маскуванню наявного дефіциту [231–234, 255].

Запропонований нами протокол серійної оцінки неврологічних порушень при моделюванні ОСМА дозволяє виявити довготривалі стійкі функціональні порушення у лабораторних щурів і визначити динаміку відновного процесу при застосуванні різних методів лікування, в тому числі й таких, що спрямовані на репарацію тканин мозку в ділянці ІУГМ. В нашому протоколі ми використали тести, які вважаються експертами релевантними для визначення доклінічної ефективності регенеративних методів терапії: тест ходіння по бруску з опорами, тест постановки лапи у відповідь на подразнення вібрисів, ТКС [231–234].

Зазначений протокол задовольняє перераховані вимоги і передбачає оцінку найбільш чутливих до ішемії функцій головного мозку в щурів: сенсорної, моторної і рефлекторної (сенсо-моторної координації), які страждають внаслідок ураження соматосенсорної, меншою мірою — моторної кори, та смугастого тіла. Неврологічний дефіцит у піддослідних тварин в наших дослідженнях був зумовлений ішемічним ушкодженням кори мозку та смугастого тіла, меншою мірою — гіпокампа, що вказує на функціональну релевантність обраних тестів.

Дані тести є відносно простими у виконанні, потребують короткочасного (1-2 дні перед операцією) тренування тварин і адекватно відображають перебіг репаративних процесів у мозку на макрорівні [231, 233]. Як показують одержані нами дані, при використанні даного протоколу тестування, неврологічний статус піддослідних тварин з ОСМА корелює з морфологічними змінами у ділянці ішемії та ПІЗ головного мозку при ТТКМ і ТЕНТ.

Слід зазначити, що ступінь відновлення сенсорної функції дещо випереджав темпи регресу рухових порушень. Водночас, в літературі немає однастайності з приводу даного феномену. Деякі дослідники відзначають краще відновлення моторної функції під впливом СККМ, яке пояснюють вибіркоким впливом цих клітин на рухові центри нової кори та смугастого тіла

або нижчим порогом відновлення рухової функції [252, 257, 258]. Важливу роль, на їх думку, у цьому процесі відіграє міграція МСК із ділянки трансплантації (смугасте тіло) до кори іпси- та контралатеральної півкулі [156, 257]. Краще відновлення моторних функцій після ОСМА в експериментах інших авторів, на наш погляд, зумовлена ієрархічною організацією рухової системи та системи сприйняття подразників в щурів. Згідно із даними численних досліджень, моторна активність в щурів залежить, передусім, від функціонування філогенетично більш давніх підкіркових ядер (смугасте тіло) й менш залежить від кори півкуль великого мозку [231]. Система сприйняття, проведення та обробки сенсорної інформації залежить більшою мірою від соматосенсорної ділянки кори мозку [232]. Загальновідомо, що філогенетично давні ділянки мозку є менш уразливими до дії ушкоджуючих чинників, в тому числі й до гіпоксії [156, 251]. Це обумовлює більшу стійкість моторної функції до ішемії.

Згідно з нашими даними, як показники як сенсорної (за даними ТКС), так і рефлекторної (за даними ТППЛСВ) асиметрії в щурів із ТТКМ на 28 добу наближаються до показників в інтактних тварин (1 і 100%, відповідно). Ми припускаємо, що дані відмінності можуть бути пов'язані з особливостями використаної в нашому дослідженні модифікованої моделі ОСМА, при якій ішемічне “ядро” локалізується в смугастому тілі. В той же час, соматосенсорна кора зазнає меншого ушкодження і характеризується, за деякими даними, в щурів більшою пластичністю, ніж підкіркові структури [155, 259–261]. Слід зазначити, що в дослідах, які свідчать про краще відновлення моторної функції, частіше використовувалися транскраніальні моделі ОСМА, при яких більшого ушкодження зазнає кора мозку, на відміну від смугастого тіла [167, 188, 257, 262]. Також слід враховувати особливості тестування рухової функції, оскільки деякі тести (тредміл, колесо обертання, тест підняття за хвіст), які часто застосовуються у подібних дослідах, характеризуються низькою чутливістю і значною складовою навчання і компенсаторної поведінки [231, 234].

Крім тестування неврологічних функцій, важливу роль в оцінці

ефективності методів стимуляції нейросудинної регенерації, на думку експертів, відіграє морфологічний ступінь ушкодження мозку, зокрема, об'єм ділянки інфаркту мозку [44–46, 256]. Терміни та методи його оцінки в різних дослідженнях можуть відрізнятися, що істотно впливає на інтерпретацію даних. В нашому дослідженні показано, що ТТКМ, а не ТЕНТ, сприяє зменшенню розмірів ділянки інфаркту мозку на 7 і 14 добу після ОСМА при використанні методики фарбування зрізів ТТХ. Деякими дослідниками застосовується також оцінка ступеня ушкодження на зрізах мозку, забарвлених гематоксилін-еозином або з використанням МРТ [236]. Деякі автори вважають, що фарбування зрізів ТТХ дає дещо занижені результати порівняно з методикою фарбування гематоксилін-еозином, проте дані відмінності не є статистично достовірними [235, 236]. На нашу думку, фарбування зрізів мозку ТТХ є простим у виконанні методом, який дає змогу швидше і якісніше, за допомогою програм для обробки зображення, оцінити розміри зони інфаркту в динаміці, а також визначити координати ПЗ для подальшої інтрацеребральної трансплантації.

В літературі немає одностайних даних щодо впливу НТ і ІЦА на об'єм ділянки інфаркту мозку і його зв'язок із функціональним відновленням. В той час як одні автори доводять вплив трансплантації нейрогенних клітин на зменшення об'єму ділянки ушкодження мозку при експериментальному ішемічному інсульті, інші не спостерігають даного ефекту [31, 32, 173, 250, 251]. При цьому позитивні результати при оцінці фарбованих ТТХ зрізів одержані, як правило, лише в один термін — на 7 або на 14 добу після ОСМА [33,34,188]. Вплив НТ пояснюється або заміщенням дефекту тканини (наприклад, при ТЕНТ) або нейропротекторним впливом [171, 173, 179]. За даними деяких досліджень, навіть при відстроченій трансплантації НСК (3 тижні після моделювання) спостерігається заміщення постішемічного тканинного дефекту трансплантованими клітинами [173].

В нашому дослідженні виявлена слабка кореляція ступеня відновлення моторної функції і об'єму ділянки інфаркту мозку, що не дає підстав стверджувати, що регрес неврологічного дефіциту пов'язаний із розмірами зони

ІУГМ. Це відповідає даним інших авторів [33, 35]. Так, зокрема J. Chen і співавтори не виявили істотної різниці між об'ємом ділянки інфаркту мозку в щурів, яким проводили інтрацеребральну трансплантацію зависі кісткового мозку на 7 добу після ОСМА, порівняно з контрольною групою на 14 добу після ОСМА [23]. Натомість у дослідженні Y. Li і співавторів внутрішньовенна трансплантація клітин кісткового мозку через 1 добу після моделювання ОСМА сприяла значному зменшенню розмірів ділянки інфаркту на 14 добу спостереження, що супроводжувалося також істотним функціональним відновленням у тварин даної групи порівняно з контрольною групою [35]. Подібні результати були одержані також в іншому дослідженні, де інтрацеребральна трансплантація СККМ проводилася негайно після індукції фокальної кортикальної ішемії [252].

Трансплантація НСК і НПК в ряді досліджень не приводила до зменшення розмірів ділянки ураження [169, 179]. Дані розбіжності можна пояснити застосуванням різних моделей ішемічного інсульту, зокрема — транскраніальної ОСМА, яка при якій формується ділянка ІУГМ менших розмірів, ніж при монофіламентній ОСМА, а також тимчасовою ОСМА із подальшою реперфузією.

Втім, за даними мета-аналізу, більшість досліджень свідчать на користь зменшення об'єму ділянки інфаркту мозку при застосуванні СККМ, що залежить від ранніх термінів трансплантації і узгоджується з нашими даними [31].

Очевидно, що зменшення об'єму інфаркту головного мозку зумовлене різними механізмами, включаючи, але не обмежуючись, виживанням клітин ПЗ (нейропротекція), проліферацією (нейрогенез), замісним ефектом трансплантатів і пригніченням апоптозу [174, 179, 188, 243, 263, 264].

Враховуючи використання нами модифікованої моделі постійної ОСМА, яка призводить до розвитку стабільної, чітко окресленої зони інфаркту мозку, і ранні терміни трансплантації (2 доба після ОСМА), можна припустити, що позитивний вплив ТТКМ зумовлений раннім неспецифічним

нейропротекторним і антиапоптичним впливом клітин трансплантату із проліферативним потенціалом, що дозволяє запобігти загибелі нейронів ішемічної “напівтіні”. Доведено, що ТТКМ викликає зменшення концентрації прозапальних цитокінів та нейроспецифічних білків, маркерів нейродегенерації, збільшення концентрації протизапальних цитокінів [195, 264–267]. Одним із важливих механізмів збільшення кількості клітин в ПЗ є здатність тканинних трансплантатів, передусім, ТКМ, стимулювати нейрогенез у СВЗ мозку [249, 265, 267]. За даними світлооптичної мікроскопії, в нашому дослідженні на 7 добу в СВЗ тварин після ТЕНТ і ТТКМ спостерігається активація і проліферація недиференційованих клітин, які можуть представляти НСК або НПК.

Дані досліджень із трансплантації СККМ і МСККМ на моделях ГФЦ вказують на нерівномірну просторово-часову активацію регенеративних процесів в ділянці ІУГМ [30, 60, 64, 188]. З метою їх якісного аналізу нами були вивчені препарати головного мозку щурів ПГр14 — 17 за допомогою світлооптичної мікроскопії. ТТ, спрямована на активацію ангиогенезу в зоні ІУГМ в щурів, зумовленого застосуванням модифікованої методики моделювання ОСМА, викликала низку патоморфологічних змін у тканинах головного мозку, які характеризувалися чіткою стадійністю розвитку на різних термінах спостереження. ТЕНТ і ТТКМ призводили до прискорення формування гліо-мезодермального рубця та активації репаративних процесів у ПЗ у вигляді збереження форми та структури нейронів, адаптивної перебудови МЦР та ангиогенезу. При цьому нейросудинна репарація була активнішою в підгрупах тварин з ТТКМ. Одержані дані свідчать про ефективність постійної ОСМА та блокування колатералей за допомогою модифікованої методики.

Аналіз морфологічних змін узгоджується з даними щодо еволюції зони ІУГМ в умовах клітинної трансплантації. Зокрема, Зинькова Н.Н. і співавт. були досліджені зміни тканин мозку при використанні методики транскраніальної ОСМА [188]. Авторами продемонстрована послідовність тканинних реакцій при внутрішньовенному введенні МСККМ з 2 доби по 6

тиждень після трансплантації. Так, неоваскуляризація в ПІЗ встановлена на 14 добу, а остаточне формування гліо-мезодермального рубця — через 6 тижнів після ОСМА. Garcia J.H. і співавтори довели, що пік нейросудинного ушкодження та експансії зони ішемії припадає на 3 добу після інтралюмінальної ОСМА, що збігається з нашими даними [54]. Mewezawa H. зі співавт. за допомогою радіоавтографічного визначення мозкового кровоплину показали, що при ендоваскулярній методиці моделювання на 1 добу після ОСМА в неокортексі та медіальних відділах смугастого тіла щурів реєструється зона мінімальної перфузії, яка відповідає зоні “напівтіні” [268]. Остання протягом 1-3 діб може набувати характеристик інтактною тканини після відновлення перфузії або ж перетворюватися на зону некрозу. Гістологічно зона пенумбри відповідає ділянці тканини мозку, де нейрони і гліоцити зазнають початкових дистрофічних змін. За даними багатьох дослідників, саме зона “напівтіні” — перифокальна, або ПІЗ у віддаленому періоді інсульту — є осередком нейросудинної репарації після ГФЦІ [15, 49, 62, 67].

Ефективність доклінічних досліджень ішемічного інсульту залежить від релевантності обраної моделі патофізіологічним механізмам ІУГМ з урахуванням гетерогенності даної патології [44, 46, 47]. Використана в нашому дослідженні модель експериментального ішемічного інсульту є модифікацією однією з найпоширеніших моделей, рекомендованих для застосування в лабораторних умовах Товариством з експериментального інсульту (SFES — Society for Experimental Stroke) [44]. Монофіламентна ОСМА, вперше здійснена J. Koizumi і співавторами, у різноманітних модифікаціях сьогодні використовується у багатьох лабораторіях і рекомендована експертами для проведення доклінічних випробувань лікарських речовин і генно-клітинних технологій при ішемічному інсульті [41, 119, 121, 122, 124, 125]. Дана модель є однією з найбільш близьких до патофізіологічних умов при ішемічному інсульті у людей. Фізико-механічні властивості оклюдерів, особливості хірургічної техніки та правильний вибір експериментальних тварин є ключовими чинниками, які визначають кінцевий результат моделювання —

розвиток ЗІГМ певних розмірів і локалізації, що проявляється стійким вираженим функціональним дефіцитом [43, 124, 125]. При цьому коливання розмірів ділянки ІУГМ та ступеня неврологічних порушень у лабораторних тварин повинні бути мінімальними [44]. В якості оклюдерів дослідниками використовуються монофіламентні нитки, на кінці яких є потовщення, утворене за рахунок нагрівання або покриття різними адгезивними речовинами (гелі, гума, лаки, силікон) [123–125]. Доведено, що застосування оклюдерів, покритих адгезивами, призводить до зменшення частоти ускладнень (субарахноїдальний крововилив) і підвищення надійності оклюзії [124, 125]. Комерційно виготовлені монофіламенти із силіконовим покриттям рекомендовані експертами для використання у доклінічних випробуваннях [44].

Запропонована нами модифікація моделі внутрішньосудинної постійної монофіламентної ОСМА у щурів відрізняється від традиційних методик тим, що за допомогою комерційно виготовленого монофіламентного оклюдера із силіконовим покриттям здійснюється постійна ендovasкулярна ОСМА у щурів в умовах блокування колатерального кровоплину таким чином, що дистальний кінець оклюдера із силіконовим покриттям герметично блокує просвіт судини завдяки щільній адгезії силіконового покриття до ендотелію, забезпечуючи надійне виключення СМА із кровоплину і створюючи умови для розвитку ГПМК із формуванням чітко окресленої зони ішемічного інфаркту, що проявляється виникненням стійкого неврологічного дефіциту в піддослідних тварин. Запропонована модифікація моделі ОСМА дає також змогу усунути ефекти реперфузійного ушкодження та досягти повноти оклюзії і формування вогнища ішемії відтворюваних розмірів і локалізації. Останнє підтверджується даними морфологічних досліджень і порівняльним аналізом функціонального дефіциту у тварин контрольної групи із ОСМА і тварин групи операційного контролю за шкалою Bederson J.V. і співавторів. Результати наших досліджень свідчать про перспективність використання даної моделі для вивчення фундаментальних механізмів нейрорепації та апробації нових методик лікування при ішемічному інсульті. Слід зазначити, що в нашому дослідженні

не спостерігалося ускладнень при проведенні експериментального моделювання ОСМА при допустимому рівні післяопераційної летальності в щурів (близько 25%).

Дана модифікована модель ішемічного інсульту, на нашу думку, вдало підходить для вивчення ефектів індукованого за допомогою НТ ангиогенезу і васкулогенезу, виключаючи при цьому вплив артеріогенезу через блокування колатерального кровоплину. Таким чином, питома вага васкулогенезу при ТТКМ, ймовірно, за безпосередньою участю МККМ і власне ангиогенезу за рахунок трофічного і про-ангіогенного впливу ФР, секретованих ТКМ, значно зростатиме при застосуванні модифікованої моделі ОСМА.

Важливу роль у відтворюваності моделюванні має також технічна складність її виконання. Наш досвід показує, що тривалість операції від розрізу шкіри до оклюзії СМА складає 15–20 хв., а набуття необхідного рівня навичок при щоденному моделюванні досягається протягом 1–2 тижнів.

Таким чином, основними перевагами запропонованої нами моделі є: 1) надійне блокування просвіту СМА; 2) виключення колатерального кровоплину через передню сполучну артерію; 3) виникнення чітко окресленої зони ішемічного інфаркту у корі головного мозку та смугастому тілі щурів; 4) розвиток стійкого неврологічного дефіциту у піддослідних тварин; 5) зменшення варіабельності розмірів зони ішемічного ушкодження та функціонального дефекту у піддослідних тварин; 6) підвищення статистичної вірогідності одержаних даних; 7) відносна технічна простота виконання. Критеріями релевантності даної моделі для доклінічних досліджень нейрорепаративних стратегій при інсульті є: 1) мінімальна інвазивність; 2) надійне відтворення ЗІГМ; 3) відносно низька післяопераційна летальність (25%); 3) тривале виживання тварин (≥ 28 днів); 4) стійкий неврологічний дефіцит.

Механізми дії ТТКМ і ТЕНТ при ГФЦІ слід розглядати з позицій їх диференційованого впливу на просторово-часові параметри репаративних процесів в зоні ІУГМ. Позитивний вплив як ТТКМ, так і ТЕНТ відзначається в

усіх дослідних групах упродовж 28 діб після моделювання ішемічного інсульту. Однак просторово-часова динаміка функціональних даних і морфологічних змін є дещо відмінною у порівнюваних групах лабораторних тварин. Хоча, за даними літератури, альтеративні реакції прогресують з початку 1 доби та досягають максимуму на 3 добу після ОСМА, проте, за нашими даними, в щурів із ПГр3 (ТЕНТ) і ПГр4 (ТТКМ) вже на 1 добу після тканинної НТ у тварин спостерігаються достовірно менші функціональні порушення, в першу чергу в моторній сфері: відсутня циркумдукція та значно нижча частота зісковзувань задньої кінцівки у тесті ходіння по звуженому бруску. На нашу думку, такі результати можуть бути пояснені первинним нейропротекторним впливом індукованого за допомогою ТТКМ і ТЕНТ ангиогенезу шляхом сприяння виживанню нейронів ішемічної пенумбри. Це узгоджується із даними інших авторів, які зазначають, що ангиогенні фактори у гострому періоді інсульту сприяють нейропротекції ще до появи новоутворених судин в ПІЗ [22, 25, 26].

На 3 добу у тварин контрольної групи відзначалося формування чітко окресленого вогнища ІУГМ і збільшення об'єму останнього за рахунок відмирання клітин пенумбри, що добре узгоджується з літературними даними [53, 54, 60, 268]. У цей термін у ПГр3 і ПГр4 показники рефлексорної, сенсорної та моторної функцій вірогідно відрізнялися від аналогічних у контрольній групі (ПГр1), й були найкращими у дослідній ПГр4. Спостерігалось також істотне зменшення розмірів ділянки ураження. Патоморфологічні дослідження підтверджують одержані результати, проте не виявляють появу мітотичної активності. Таким чином, можна припустити, що на 3 добу нейропротекторний ефект ТТКМ і ТЕНТ досягає піку, що відповідає даним деяких авторів [27, 173, 191, 201, 247, 248].

Вже на 7 добу після ОСМА в наших дослідах спостерігаються активні темпи відновлення сенсорної функції (на підставі ТКС) та рухової активності контралатеральних кінцівок (ТХБЗОК), передусім у ПГр3 і ПГр4. Дані світлооптичної мікроскопії свідчать про активацію репаративних механізмів,

які проявляються проліферацією клітинних елементів і неоваскуляризацією в ПЗ головного мозку щурів. При цьому фарбування зрізів ТТХ на 7 добу виявляє подальше зменшення об'єму зони ураження у тварин всіх дослідних груп.

Значне структурно-функціональне відновлення за показниками неврологічного дефіциту та волюметричного дослідження на 14 добу після ОСМА підтверджує дані багатьох досліджень про максимальну активність спонтанного та індукованого ангиогенезу та нейрогенезу саме в даний термін після ІУГМ [76, 97, 157, 188, 213, 252]. У подальшому у тварин ПГр3 і ПГр4 темпи покращення чутливих, рухових і рефлекторних функцій дещо уповільнюються, проте відмінності між тваринами, яким проводили ТТКМ (ПГр4) і ТЕНТ (ПГр3), порівняно з ОСМА (ПГр1) і ІФБР (ПГр5), залишаються статистично вірогідними. Нижчі темпи нейросудинної регенерації можуть бути також пов'язані з формуванням гліо-мезодермального рубця, який перешкоджає дифузії ФР і міграції нейрогенних клітин ЕНТ і ТКМ.

Важливими чинниками, які впливають на результати лікування ішемічного інсульту, є строки і шляхи НТ. Хоча доведена ефективність внутрішньосудинної інфузії СККМ при ГФЦІ, проте, на наш погляд, саме інтрацеребральна стереотаксична ін'єкція є швидким способом доставки клітинного матеріалу та факторів росту до вогнища ураження, який дозволяє подолати ГЕБ і запобігти їх системному впливу та депонуванню в інших тканинах організму [37, 142, 164, 251]. Раннє застосування регенеративної терапії, згідно з нашими даними та даними багатьох авторів, сприяє нейропротекції у гострій стадії ІУГМ та активації ендогенних репаративних механізмів на пізніх стадіях [156, 248]. Введення МСККМ і НСК у терміни пізніше 3 діб після ОСМА, на думку деяких дослідників, є менш ефективним, що може бути пов'язано з формуванням гліо-мезодермального рубця, який слугує бар'єром на шляху міграції клітин і дифузії трофічних чинників [269, 270].

Хоча перевага надається менш інвазивним шляхам введення, наприклад, внутрішньовенному та внутрішньоартеріальному, на нашу думку і за даними літератури, інтрацеребральна трансплантація є більш ефективною [31, 32]. За даними деяких авторів, лише близько 3% МСККМ при внутрішньовенному введенні безперешкодно мігрують у ділянку ІУГМ, а переважна більшість із них осідає в інших органах [222, 271].

Як уже зазначалося вище, стимуляція ангиогенезу за допомогою СККМ може бути ефективною і у віддаленому періоді після інсульту. В нашому дослідженні інтрацеребральна тканинна НТ з ангиогенною метою проводилася на 2 добу після ОСМА. Y. Sun і співавтори показали, що інтрацеребральне введення СЕФР через 48 год. після моделювання ГФЦІ покращує ангиогенез в ПЗ [112]. В іншому дослідженні, СЕФР-генно-модифіковані СККМ трансплантували на 1 добу після ОСМА [222]. В обох випадках прогресування набряку головного мозку не було виявлено. Згідно з даними численних досліджень, саме в кінці 2 доби після експериментального ішемічного інсульту спостерігається найбільша проникність ГЕБ, що, в свою чергу, може сприяти міграції трансплантованих клітин, а також ЕПК крові і кісткового мозку у вогнище ішемії, під впливом хемоатрактантів із ЗІГМ і трансплантованих клітин ТКМ [70, 71, 246, 247, 271].

Варто зазначити, що використана нами в якості позитивного контролю трансплантації ІФБР як нейтральної речовини викликала незначне збільшення набряку та альтераційних процесів у ПЗ на світлооптичному рівні, що, ймовірно, було зумовлене додатковим нефункціональним об'ємом рідини, проте даний ефект не був підтверджений морфометричними показниками і даними функціонального моніторингу. ІФБР аналогічна застосуванню девіталізованих клітин кісткового мозку, а також клітин іншого походження (наприклад, гепатоцитів) в якості позитивного контролю, що було показано в раніше проведених досліджах [33, 34, 201].

Позитивний функціональний вплив ТТ, вірогідно, зумовлений передусім продукцією трофічних чинників, які сприяють виживанню нейронів,

диференціації та міграції ендогенних НСК, аксональній регенерації та формуванню новоутворених судин в ПЗ головного мозку щурів [17, 156, 173, 250, 251, 261]. Більш виражений функціональний ефект ТТКМ порівняно з ТЕНТ, з найбільшою ймовірністю, спричинений переважною активацією ангиогенезу та синаптогенезу, що призводить до ремоделювання нейронних мереж сенсорної та моторної модальності [183, 191, 257, 258, 272].

Кістковий мозок є джерелом гетерогенних популяцій клітин: ГСК, МСК, ЕПК, ангиогенні ефекти яких добре вивчені в експериментальних дослідженнях [22]. Негемопоетичні (мононуклеарні) клітини строми кісткового мозку слугують не лише опорним каркасом для ГСК, а й мають мультипотентний потенціал [195, 209]. В окремих дослідженнях показана здатність клітин строми кісткового мозку виживати, проліферувати і диференціюватися в клітини з нейрональним і гліальним фенотипом [188, 195, 209]. Ці клітини секретують гемопоетичні цитокіни і різноманітні ФР [30, 183]. Строма кісткового мозку містить також катехоламіни [35]. Перевагами ТКМ при трансплантації є: 1) швидкість і простота виділення шляхом аспірації з кісткового мозку під місцевою анестезією; 2) швидка проліферація в культурі; 3) здатність до виживання й інтеграції в мозку реципієнта; 3) імунологічна інертність [31, 32, 39].

Ми припускаємо також, що матриксна підтримка і мікрооточення трансплантованих тканинних суспензій може відігравати позитивну роль у процесах індукованої нейросудинної репарації після інсульту. Слід відзначити, що для підтримки виживання, диференціації і міграції трансплантованих клітин дослідниками розробляються різноманітні штучні матрикси [253, 273, 274]. Проте в літературі відсутні дані щодо порівняння штучних клітинних матриксів із природними, такими, як строма кісткового мозку, які є органічними складовими, забезпечуючи не лише механічну, а й трофічну підтримку. Дані нашого дослідження свідчать про принципову здійсненність і безпечність ТЕНТ і ТТКМ в експерименті, що узгоджується із даними інших дослідників [33, 34, 171, 173, 191].

На нашу думку, кращий функціональний ефект ТТКМ порівняно з ТЕНТ, зумовлений активацією ангиогенезу і потужним трофічним впливом різних клітинних популяцій ТКМ, передусім стромальних і гемопоетичних СК, які секретують ангиогенні і нейропротекторні ФР. ЕПК кісткового мозку (CD34+ -клітини) можуть безпосередньо диференціюватися в ендотеліоцити новоутворених судин [191].

За даними деяких дослідників, відновлення порушених рухових, чутливих і когнітивних функцій після інсульту відбувається до певної міри завдяки перебудові нейронних мереж, в основі якої лежить ряд механізмів: 1) демаскування — активація існуючих латентних міжнейронних зв'язків; 2) спраутинг — формування нових нейронних зв'язків, в тому числі й синаптичних контактів; 3) довготривала потенціація — активація процесів пам'яті та навчання; 4) регрес діашизу (віддаленої функціональної депресії); 5) нейрогенез — заміщення загиблих нейронів [143, 155, 156, 260, 275–277].

В ряді досліджень було показано, що СККМ можуть викликати регрес неврологічних порушень при внутрішньовенному застосуванні на 1 або 7 добу або навіть через 1 міс. після моделювання експериментального ішемічного інсульту [164, 187, 262, 264]. Значне функціональне відновлення при цьому часто спостерігається протягом кількох днів з початку трансплантації за відсутності очевидних доказів замісної дії [262, 264]. М. Chopp і співавтори припускають, що пересаджені клітини можуть стимулювати ендогенні відновні механізми, які призводять до ремоделювання ушкодженого мозку, що обумовлює покращення неврологічних функцій [155, 156].

Накопичені дані свідчать, що лікування ішемічного інсульту за допомогою СККМ стимулює утворення нових нейрональних мереж як у іпсилатеральній, так і в контралатеральній півкулях мозку [260, 261, 276]. Показана здатність СККМ 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 [278, 279]. Активовані астроцити, в свою

чергу, можуть експресувати ангіогенні чинники, зокрема СЕФР, які сприяють утворенню нейросудинної “ніші”, яка є епіцентром тканинної реорганізації, формування нових синаптичних контактів і хемоатракції ендогенних НПК із СВЗ [67–69]. Відновлення моторних функцій може бути пов’язано з ремоделюванням кортико-спінальних шляхів на рівні спинного мозку при експериментальному ішемічному інсульті за допомогою СККМ [277]. Доклінічні дослідження показують, що ремоделювання аксонів в експериментальних тварин починається на 2–3 тижні після інсульту [269]. Олігодендрогенез і ремієлінізація провідникових волокон відіграє ключову роль у функціональному відновленні після ІУГМ [269, 270].

Варто зазначити, що в наших дослідах найбільш активне функціональне відновлення (7–14 доба після ОСМА) в експериментальних тварин ПГр3 і ПГр4 збігалось в часі з активністю ангіогенезу в ПІЗ, що свідчить про взаємопов’язаність цих процесів. Також відзначалася кореляція відновлення моторної функції протилежних сторони ураження кінцівок і збільшення кількості судин у ПІЗ. При цьому дослідники відзначають, що синаптогенез як складова нейропластичності, значно посилюється в умовах активації ангіогенезу і відновлення перфузії головного мозку при трансплантації СККМ [25, 26, 46].

Загально визнано, що трансплантовані СККМ і НСК (НПК) можуть стимулювати продукцію нейропротекторних і репаративних речовин власними клітинами мозку (астроцитами, ендотеліоцитами, мікроглією) [264, 278, 279]. Доведений комплексний вплив СККМ на нейросудинну нішу [156, 251]. СККМ посилюють не лише ангіогенез, а й артеріогенез і васкулогенез [191, 209, 212, 213, 252]. Продукція трофічних чинників і ФР посилюється за рахунок стимуляції новоутворених судин, що в подальшому активує процеси мозкової пластичності та відновлення неврологічних функцій після інсульту [20, 24–26]. Ангіогенний ефект СККМ автори пов’язують також із функціонуванням специфічних мікроРНК [199, 200].

Таким чином, функціональне відновлення при ТТКМ тісно пов'язане з процесом поєднання нейрогенезу і ангиогенезу за допомогою ФР і хемокінів, експресія яких підвищується в ендотеліоцитах і астроцитах нейросудинної “ніші”, а також завдяки трофічній підтримці клітин кісткового мозку [30, 31, 34, 183, 188, 252].

Не існує достатніх доказів анатомічної інтеграції та повноцінного заміщення загиблих клітин за рахунок диференціації клітин кісткового мозку у функціонально повноцінні нейрони і клітини глії [34, 45, 185]. Найбільш обґрунтованою гіпотезою відновлення неврологічних функцій при ТТКМ, на нашу думку, є секреція клітинами трансплантату трофічних чинників внаслідок взаємодії з мікрооточенням мозку реципієнта [18, 31, 191]. ІЛ і різноманітні фактори росту сприяють міграції імплантованих СК, виживанню нейронів, аксональній регенерації та утворенню нових судин, а також можуть активувати нейро- і гліогенез у СВЗ і СГШЗЗ гіпокампа [17, 156, 173, 250, 251, 261]. Окрім МСК і ГСК, безпосередню роль у нейросудинній репарації після ішемічного інсульту бере негемопоетична строма кісткового мозку [33]. У відповідь на ішемію або цитокінову стимуляцію збільшується мітотична активність стромальних прогеніторів і ЕПК кісткового мозку, які запускають процес неоваскуляризації у вогнищі запалення [22, 103, 249].

Загалом кращі результати ТТКМ порівняно з ТЕНТ, на нашу думку, зумовлені ЩА, який вторинно стимулює секрецію клітинами ПЗ великої кількості нейротрофічних (НФМП, ФРН, оФРФ) і проангіогенних чинників (СЕФР, ТФР α , ФРТП тощо).

У підсумку, серед гіпотетичних механізмів позитивного впливу ЩА за участю тканинної НТ на перебіг ІУГМ в нашому дослідженні можна виділити такі: 1) нейропротекторний, зумовлений не стільки новоутвореними судинами, скільки цитопротекторним впливом ФР (підтверджується раннім регресом неврологічної симптоматики в щурів, а також морфологічними даними щодо зменшення ступеня вторинної нейродегенерації і зменшенням об'єму ділянки інфаркту мозку); 2) “очисний” — сприяння міграції макрофагів у зону ІУГМ

для утилізації тканинного детриту (підтверджується даними гістологічного дослідження динаміки процесів запалення в зоні ІУГМ експериментальних тварин); 3) регенеративний — реконструкція нейросудинної “одиниці”, в якій стимулюються процеси нейрогенезу і нейропластичності (підтверджується динамікою відновлення неврологічних функцій і кореляцією ступеня відновлення і активності ангиогенезу).

Таким чином, сумарний вплив трансплантованих аутогенних клітин ТКМ на процеси нейросудинної репарації при експериментальному ішемічному інсульті реалізується шляхом активації ангиогенезу в ПЗ, який сприяє покращенню виживання нейронів зони ішемічної «напівтіні» і зменшенню ступеня вторинних дегенеративно-дистрофічних процесів.

Дещо гірший функціональний ефект ТЕНТ, на нашу думку, може бути пов'язаний із обмеженням повноцінної в кількісному та якісному відношенні інтеграції ЕНТ донора з цитоархітектонікою реципієнта, а також, ймовірно, меншою кількістю виділюваних трофічних чинників і ФР. ЕНТ активує переважно нейрогенез і механізми синаптичної пластичності, не впливаючи при цьому істотно на формування нейросудинної «ніші» у ПЗ [18, 176, 177, 280].

Отже, ЩА за допомогою ТТКМ має істотні переваги перед ТЕНТ при експериментальному ішемічному інсульті завдяки його мультимодальному трофічному ефекту та опосередкованому впливу на процеси ремоделювання нейронних мереж і синаптичної пластичності, що зрештою призводить до регресу неврологічного дефіциту в піддослідних тварин. Внаслідок дії ТТКМ відбувається структурна реорганізація тканин після ОСМА, яка завершується відновленням цито- та гістоархітектоніки ПЗ та макроскопічно проявляється зменшенням об'єму ділянки інфаркту мозку. Виражений нейропротекторний ефект ТЕНТ, як і ТТКМ, проявляється підвищенням виживаності нейронів ПЗ на світлооптичному рівні.

В нашій роботі застосовано інтрацеребральну ТТКМ і ТЕНТ з метою стимуляції ангиогенезу в ділянці ІУГМ. На модифікованій моделі ОСМА продемонстровано виражене покращення неврологічних функцій і активацію

репаративних процесів, пов'язане з ЩА і ймовірно, також процесами нейропластичності і нейропротекторною дією трансплантатів, передусім ТКМ. Перевагою потенційного методу лікування ішемічного інсульту — ЩА за допомогою ТТКМ в експериментальних умовах, є відсутність імуногенності, швидкість забору тканинного матеріалу і його безпосередня імплантація в зону ішемічної «напівтіні», що дає змогу впливати на різні ланки нейросудинної регенерації.

Нами було встановлено, що ефект ТТ при експериментальному ішемічному інсульті має двохфазний характер. З 1 по 3 добу після ОСМА, у період максимальної вираженості запальних реакцій в зоні ішемії, домінує нейропротекторна дія, пов'язана з підвищенням виживаності нейронів ішемічної «напівтіні». З 7 по 14 добу спостерігається більш виражена позитивна динаміка морфофункціональних змін, обумовлена активацією ендогенного ангіогенезу та репаративних процесів у зоні ІУГМ експериментальних тварин. Таким чином, позитивний морфо-функціональний ефект слід очікувати при ранній (перші 48 год.) інтрацеребральній ТТКМ і ТЕНТ.

У контексті світових тенденцій до більш широкого використання засобів регенеративної медицини і трансплантології при лікуванні наслідків уражень ЦНС, реалізація запропонованої схеми відновного нейрохірургічного лікування експериментального ішемічного інсульту шляхом індукції постінсультного ангіогенезу за допомогою ТТКМ в перспективі дозволить покращити процеси регенерації та реваскуляризації в зоні ІУГМ і покращити результати лікування пацієнтів із ішемічним інсультом. Запропонована нами модифікація методики моделювання експериментального ішемічного інсульту та протокол оцінки неврологічних порушень можуть бути корисними для дослідників у галузі патофізіології, регенеративної медицини з метою подальшої розробки нових терапевтичних і хірургічних стратегій лікування ішемічного інсульту та його наслідків.

ВИСНОВКИ

1. Удосконалена експериментальна модель ішемічного інсульту за допомогою постійної монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії в щурів із блокуванням колатерального кровоплину є релевантною гострому тромботичному ішемічному інсульту в людини, оскільки дозволяє відтворити вогнище фокального ішемічного ушкодження головного мозку переважно в корі і смугастому тілі щурів, меншою мірою — в суміжних структурах мозку, що супроводжується виникненням стійкого і довготривалого неврологічного дефіциту в піддослідних тварин. Запропонована модель дозволяє максимально виключити колатеральний кровоплин у ділянці ішемічного ушкодження головного мозку, що дає змогу вивчати питому ефективність нейротрансплантації, індукованого церебрального ангиогенезу та інших методів відновного хірургічного лікування ішемічного інсульту в найменш сприятливих для ендогенної репарації умовах.

2. Розроблений протокол неврологічного тестування дозволяє проводити кількісну оцінку моторної, сенсорної і рефлекторної функцій у щурів в різні терміни після експериментального ішемічного інсульту та нейротрансплантації на підставі набору простих у виконанні тестів, які дозволяють виявити стійкий до розвитку компенсаторних механізмів неврологічний дефіцит, який відповідає анатомічному субстрату ушкодження (кора, смугасте тіло і суміжні ділянки головного мозку) і регресує під впливом відновного хірургічного лікування, спрямованого на активацію репаративних процесів у перинфарктній зоні головного мозку.

3. Інтрацеребральна трансплантація як ембріональної нервової тканини, так і тканини кісткового мозку активує постішемічний церебральний ангиогенез у щурів при експериментальному інсульті, що проявляється збільшенням кількості новоутворених судин в перинфарктній зоні головного мозку в динаміці спостереження з 7 по 28 добу, за даними імуногістохімічного дослідження за допомогою антитіл до маркера CD34 (середня кількість

імунореактивних судин у полі зору в групі з трансплантацією кісткового мозку — $37,9 \pm 3,5$, в групі з трансплантацією ембріональної нервової тканини — $30,8 \pm 3,5$ порівняно з контрольною підгрупою — $21,7 \pm 2,0$ на 28 добу).

4. Трансплантація тканини кісткового мозку є більш ефективним засобом стимуляції постінсультного ангиогенезу в ділянці ішемічного ушкодження головного мозку, ніж трансплантація ембріональної нервової тканини, приводячи до зростання середньої кількості судин у полі зору періінфарктної зони експериментальних тварин на 215%, при порівнянні з підгрупою тварин із трансплантацією ембріональної нервової тканини (170%), і контрольною підгрупою тварин (150%), у строки між 7 і 28 добою спостереження.

5. Інтрацеребральна трансплантація ембріональної нервової тканини і тканини кісткового мозку в періінфарктну зону головного мозку щурів на 2 добу після моделювання експериментального ішемічного інсульту, за даними світло-оптичної мікроскопії, сприяє виживанню клітин зони ішемічної «напівтіні», обмежує поширення зони інфаркту і запобігає вторинним дегенеративним змінам клітин ураженої півкулі головного мозку в щурів.

6. Трансплантація тканини кісткового мозку, на відміну від ембріональної нервової тканини, приводить до зменшення ступеня ішемічного ушкодження тканин головного мозку в динаміці з 7 по 14 добу спостереження, про що свідчать показники об'єму ділянки інфаркту мозку в експериментальних тварин: $24,6 \pm 1,9\%$ при трансплантації тканини кісткового мозку, $31,7 \pm 4,4\%$ — у контрольній підгрупі на 14 добу спостереження.

7. Стимульований за допомогою тканинної трансплантації ангиогенез сприяє швидшому відновленню неврологічних функцій у щурів із експериментальним ішемічним інсультом. Регрес функціонального дефіциту починається вже на 3 добу і досягає максимального рівня на 7 добу (моторні функції) і 14 добу (сенсорні, рефлекторні функції) після оклюзії середньої мозкової артерії. За даними комплексного тестування, відновлення сенсорних і рефлекторних функцій при індукованому церебральному ангиогенезі

відбувається краще, ніж рухових функцій. Протягом усього періоду спостереження після моделювання інсульту (28 діб) в експериментальних тварин виявлена сильна кореляція кількості новоутворених судин у перинфарктній зоні і ступеня відновлення рухових функцій кінцівок.

8. Інтрацеребральна аутотрансплантація тканини кісткового мозку має перевагу порівняно з алотрансплантацією ембріональної нервової тканини за рахунок більш активної стимуляції ангиогенезу та функціонального відновлення у щурів із експериментальним ішемічним інсультом.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Запропоновано удосконалений спосіб експериментального моделювання гострого тромботичного ішемічного інсульту шляхом постійної оклюзії середньої мозкової артерії за допомогою монофіламенту із силіконовим кінчиком та виключенням колатерального кровоплину (патент України на корисну модель №67396 від 27.02.12 р.), який можна використовувати для визначення ефективності методів лікування ішемічного інсульту, особливо нейротрансплантації і індукованого церебрального ангиогенезу, в експерименті.

2. Запропонований оптимізований протокол тестування неврологічних функцій у щурів після моделювання експериментального ішемічного інсульту може бути використаний для оцінки ефективності методів відновного нейрохірургічного лікування ішемічного інсульту в експерименті.

3. Ефективність стимуляції постішемічного церебрального ангиогенезу шляхом інтрацеребральної стереотаксичної трансплантації кісткового мозку в періінфарктну зону головного мозку щурів в експерименті обґрунтовує подальше дослідження і застосування даного методу відновного нейрохірургічного лікування ішемічного інсульту в клінічній практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mackay J. The atlas of heart disease and stroke / J. Mackay, G. Mensah. — Geneva: World Health Organization, 2004. — 112, [1] с.
2. Heart Disease and stroke Statistics — 2015 Update: A Report From the American Heart Association [Електронний ресурс] / D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A.S. Go [et al.] // *Circulation*. — 2015. — Vol. 131. — P. 29—322. — Режим доступу до журн.: <http://dx.doi.org/10.1161/CIR.000000000000152>.
3. Зозуля І. С. Епідеміологія цереброваскулярних захворювань в Україні / І. С. Зозуля, А. І. Зозуля // *Укр. мед. часопис*. — 2011. — № 5(85). — С. 38—41.
4. Гандзюк В. А. Динаміка захворюваності та поширеності хвороб систем кровообігу серед населення України на сучасному етапі: національний та регіональний аспекти / В. А. Гандзюк // *Вісн. соц. гігієни та організації охорони здоров'я України*. — 2014. — № 2(60). — С. 74—78.
5. Кириченко А. Г. Динаміка первинної інвалідності працездатного населення України / А. Г. Кириченко // *Клін. та експерим. патол.* — 2012. — Т. XI, № 2(40). — С. 52—54.
6. Котвіцька А. А. Дослідження соціально-епідеміологічних показників населення України внаслідок хвороб систем кровообігу на державному та регіональному рівнях / А. А. Котвіцька, І. О. Лобова // *Вісн. фармації*. — 2012. — № 4. — С. 62—65.
7. Cardiovascular diseases in Europe 2014: epidemiological update / M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough, M. Rayner // *Eur. Heart J.* — 2014. — Vol. 35, N 42. — P. 2950—2959.
8. Kim A. S. Global variation in the relative burden of stroke and ischemic heart disease / A.S. Kim, C. Johnston // *Circulation*. — 2011. — Vol. 124. — P. 314—323.
9. Mukherjee D. Epidemiology and the global burden of stroke / D. Mukherjee, C. G. Patil // *World Neurosurg.* — 2011. — Vol. 76, Suppl. 6. — P. 85—

90.

10. Risk factors and stroke mechanisms in atherosclerotic stroke: intracranial compared with extracranial and anterior compared with posterior circulation disease / J. S. Kim, H. W. Nah, S. M. Park [et al.] // *Stroke*. — 2012. — Vol. 43, N 12. — P. 3313—3318.

11. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / E. C. Jauch, J. L. Saver, H. P. Adams [et al.] // *Stroke*. — 2013. — Vol. 44. — P. 870—947.

12. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future / J. S. Balami, R. Chen, B. A. Sutherland [et al.] // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. — 2013. — Vol. 12. — P. 145—154.

13. Endovascular vs medical management of acute ischemic stroke / C. J. Chen, D. Ding, R. M. Starke [et al.] // *Neurology*. — 2015. — Vol. 85, N 22. — P. 1980—1990.

14. George P. M. Novel stroke therapeutics: unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments / P. M. George, G. K. Steinberg // *Neuron*. — 2015. — Vol. 87. — P. 297—309.

15. Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke / K. Arai, J. Lok, S. Guo [et al.] // *J. Child Neurol.* — 2011. — Vol. 26, N 9. — P. 1193—1198.

16. Carmichael S. T. Targets for neural repair therapies after stroke / S. T. Carmichael // *Stroke*. — 2010. — Vol. 41. — P. 124—126.

17. Azad T. D. Neurorestoration after stroke [Электронный ресурс] / T. D. Azad, A. Veeravagu, G. K. Steinberg // *Neurosurg. Focus*. — 2016. — Vol. 40, N 5: E2. — Режим доступа до журн.: <http://thejns.org/doi/abs/10.3171/2016.2.FOCUS15637>

18. Neurorestorative therapy for stroke [Электронный ресурс] / J. Chen, P. Venkat, A. Zacharek [et al.] // *Front. Human Neurosci.* — 2014. — Vol. 8, article 382. — P. 1—10. — Режим доступа до журн.:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2014.00382/full>.

19. Lemmens R. Stem cell therapy for acute cerebral injury: what will the future bring? / R. Lemmens, G. K. Steinberg // *Curr. Opin. Neurol.* — 2013. — Vol. 26. — P. 617—625.

20. Vascular remodeling after ischemic stroke: mechanisms and therapeutic potentials / J. Li, Y. Wang, Y. Akamatsu [et al.] // *Prog Neurobiol.* — 2014. — Vol. 115. — P. 138—156.

21. Liman T. G. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration / T. G. Liman M. Endres // *Cerebrovasc. Dis.* — 2012. — Vol. 33. — P. 492—499.

22. Cell-based therapy to promote angiogenesis in the brain following ischemic damage / M. Uemura, Y. Kasahara, K. Nagatsuka [et al.] // *Curr. Vasc. Pharmacol.* — 2012. — Vol. 10, N 3. — P. 285—288.

23. Kalani M. Y. Indications and results of direct cerebral revascularization in the modern era / M. Y. Kalani, L. Rangel-Castilla, W. Ramey [et al.] // *World Neurosurg.* — 2015. — Vol. 83, N 3. — P. 345—350.

24. Yamashita T. Therapeutic approaches to vascular protection in ischemic stroke / T. Yamashita, K. Abe // *Acta Med. Okayama.* — 2011. — Vol. 65, N 4. — P. 219—223.

25. Greenberg D. A. Cerebral angiogenesis: a realistic therapy for ischemic disease? / D. A. Greenberg // *Methods Mol. Biol.* — 2014. — Vol. 1135. — P. 21—24.

26. Ergul A. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke / A. Ergul, A. Alhusban, S. C. Fagan // *Stroke.* — 2012. — Vol. 43, N 8. — P. 2270—2274.

27. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex / S. Kelly, T. M. Bliss, A. K. Shah [et al.] // *PNAS.* — 2004. — Vol. 101, N 32. — P. 11839—11844.

28. Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line / C.

V. Borlongan, Y. Tajima, J. Q. Trojanowski [et al.] // *Neuroreport*. — 1998. — Vol. 9, N 16. — P. 3703—3709.

29. Ефективність нейротрансплантації при лікуванні гострої недостатності мозкового кровообігу в експерименті / В. І. Цимбалюк, А. Т. Носов, Л. В. Бондар [та ін.] // *Бюл. УАН*. — 1998. — № 6. — С. 13—14.

30. Цимбалюк В. І. Можливості та перспективи застосування мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні ішемічного інсульту / В. І. Цимбалюк, В. В. Колесник, І. І. Торяник // *Вісн. Вінницького нац. мед. ун-ту*. — 2012. — Т. 16, № 1. — С. 238—243.

31. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke / Q. Vu, K. Xie, M. Eckert [et al.] // *Neurology*. — 2014. — Vol. 82. — P. 1277—1286.

32. Stem-cell based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis / J. S. Lees, E. S. Sena, K. J. Egan [et al.] // *Int. J. Stroke*. — 2012. — Vol. 7, N 7. — P. 582—588.

33. Chen J. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat / J. Chen, M. Chopp // *Neuropharmacology*. — 2000. — Vol. 39. — P. 711—716.

34. Li Y. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury / Y. Li, M. Chopp. // *Neurosci Lett*. — 2009. — Vol. 456. — P. 120—123.

35. Are bone marrow regenerative cells ideal seed cells for the treatment of cerebral ischemia? / Y. Li, X. M. Hua, F. Hua [et al.] // *Neural Regen. Res*. — 2013. — Vol. 8, N 13. — P. 1201—1209.

36. Хорев Н. Г. Терапевтический клеточный ангиогенез в лечении заболеваний периферических артерий / Н. Г. Хорев, В. А. Елыкомов, Д. А. Залозный // *Ангиология и сосудистая хирургия*. — 2011. — Т. 17, № 2. — С. 36—42.

37. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis / V. Jeevanantham, M. Butler, A. Saad [et al.] // *Circulation*. — 2012. — Vol. 126, N 5.

— P. 551—568.

38. Bone marrow aspirate injection for treatment of critical limb ischemia with comparison to patients undergoing high-risk bypass grafts / K. A. Giles, E. M. Rzcuido, P. P. Goodney [et al.] // *J. Vasc. Surg.* — 2015. — Vol. 61, N 1. — P. 134—137.

39. The translational imperative: making cell therapy simple and effective / G. D. Prestwitt, I. E. Erickson, T. I. Zarembinski [et al.] // *Acta Biomater.* — 2012. — Vol. 8, N 12. — P. 4200—4207.

40. The rise of cell therapy trials for stroke: review of published and registered studies / P. H. Rosado-de-Castro, P. M. Pimentel-Coelho, L. M. Barbosa da Fonseca [et al.] // *Stem cells and Development.* — 2013. — Vol. 22, N 15. — P. 2095—2111.

41. Macrae I. M. Preclinical stroke research — advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia / I. M. Macrae // *Brit. J. Pharm.* — 2011. — Vol. 164, N 4. — P. 1062—1078.

42. Herson P. S. Animal models of stroke: translational potential at present and in 2050 / P. S. Herson, R. J. Traytsman // *Future Neurol.* — 2014. — Vol. 9, N 5. — P. 541—551.

43. Liu F. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls [Электронный ресурс] / F. Liu, L. D. McCullough // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 2011. — Article ID 464701. — С. 1—9. — Режим доступа до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035178>.

44. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition) / S. Liu, G. Zhen; B. P. Meloni [et al.] // *J. Exp. Stroke Transl. Med.* — 2009. — Vol. 2, N 2. — P. 2—27.

45. Stem cell therapies as an emerging paradigm in stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke / L. Wechsler, D. Steindler, C. V. Borlongan [et al.] // *Stroke.* — 2009. — Vol. 40. — P. 510—515.

46. Kahle P. Successfully climbing the “STAIRS”: surmounting failed

translation of experimental ischemic stroke treatments [Электронный ресурс] / M. P. Kahle, G. J. Bix // *Stroke Res. Treat.* — 2012. — Vol. 2012. — Article ID 374098. — 8 с. — Режим доступа до журн.: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/374098>.

47. Dirnagl U. Found in translation. Preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes / U. Dirnagl, M. Endres // *Stroke*. — 2014. — Vol. 45. — P. 1510—1518.

48. An updated definition of stroke for the 21st century. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/ American Stroke Association / R. L. Sacco, S. E. Kasner, J. P. Broderick [et al.] // *Stroke*. — 2013. — Vol. 44. — P. 2064—2089.

49. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke / T. M. Woodruff, J. Thundyil, S.-C. Tang [et al.] // *Molecular Neurodegeneration*. — 2011. — Vol. 6, N 11. — P. 1—19.

50. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke / C. Xing, K. Arai, E. H. Lo [et al.] // *Int. J. Stroke*. — 2012. — Vol. 7, N 5. — P. 378—385.

51. Modeling molecular pathways of neuronal ischemia / Z. H. Taxin, S. A. Neymotin, A. Mohan [et al.] // *Progr. Mol. Biol. Transl. Sci.* — 2014. — Vol. 123. — P. 249—275.

52. Mechanisms of neurovascular dysfunction in acute ischemic brain / Y. Terasaki, Y. Liu, K. Hakayawa [et al.] // *Curr. Med. Chem.* — 2014. — Vol. 21, N 18. — P. 2035—2042.

53. Back T. The natural course of lesion development in brain ischemia / T. Back, O. G. Schüler // *Acta Neurochir.* — 2004. — Vol. 89, Suppl. — P. 55—61.

54. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral occlusion in the rat / J. H. Garcia, Y. Yoshida, H. Chen [et al.] // *Am. J. Parhol.* — 1993. — Vol. 142, N 2. — P. 623—635.

55. Margaritescu O. Histopathological changes in acute ischemic stroke / O. Margaritescu // *Romanian Journal of morphology and Embriology*. — 2009. — Vol. 50, N 3. — P. 327—339.

56. Mena H. Human cerebral infarct: a proposed histopathologic

classification based on 137 cases / H. Mena, D. Cadavid, E. J. Rushing // *Acta Neuropathol.* — 2004. — Vol. 108, N 6. — P. 524—530.

57. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke [Електронний ресурс] / A. Popp, N. Jaenisch, O. W. Witte [et al.] // *PLoS ONE.* — 2009. — Vol. 4, N 3. — e4764. — Режим доступу до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004764>.

58. Reorganisation of the cerebral vasculature following ischaemia / D. Brea, T. Sobrino, P. Ramos–Cabrer [et al.] // *Rev. Neurol.* — 2009. — Vol. 49, N 12. — P. 645—654.

59. Del Zoppo G. J. Cerebral microvessel responses to focal ischemia / G. J. del Zoppo, T. Mabuchi // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2003. — Vol. 23. — P. 879—894.

60. Колесник В. В. Хронологія деструктивно–дегенеративних та запальних процесів при експериментальному інсульті у щурів лінії Вістар / В. В. Колесник // *Проблеми екології та медицини.* — 2013. — Т. 7, № 5–6. — P. 24—31.

61. Astrocytes and ischemic injury / T. Takano, N.–A. Oberheim, M. L. Cotrina [et al.] // *Stroke.* — 2009. — Vol. 40, N 3 (Suppl.). — С. 8—12.

62. Heterogeneity in the penumbra / G. J. del Zoppo, F. R. Sharp, W.–D. Heiss [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2011. — Vol. 31. — P. 1836—1851.

63. Secondary neurodegeneration in remote regions after focal cerebral infarction. A new target for stroke management? / J. Zhang, Y. Zhang, S. Xing [et al.] // *Stroke.* — 2012. — Vol. 43. — P. 1700—1705.

64. Histopathology of motor cortex in an experimental focal ischemic stroke in mouse model [Електронний ресурс] / J. L. de Oliveira, P. Crispin, E. C. Duarte [et al.] // *J. Chem Neuroanat.* — 2014. — Vol. 57–58. — P. 1—9. — Режим доступу до журн.: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061814000155>.

65. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease / J.–C. Baron, H. Yamauchi, M. Fujioka [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* —

2014. — Vol. 34. — P. 2—18.

66. Muoio V. The neurovascular unit — concept review / V. Muoio, P. B. Persson, M. M. Sendeski // *Acta Physiol. (Oxf.)*. — 2014. — Vol. 210, N 4. — P. 790—798.

67. Dirnagl U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond / U. Dirnagl // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2012. — Vol. 1268. — P. 21—25.

68. Madri J. A. Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury / J. A. Madri // *J. Physiol. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 60, Suppl. 4. — P. 95—104.

69. Del Zoppo G. J. Toward the neurovascular unit. A journey in clinical translation: 2012 Thomas Willis Lecture / G. J. del Zoppo // *Stroke*. — 2013. — Vol. 44, N 1. — P. 263—269.

70. Yang Y. Blood–brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease / Y. Yang, G. A. Rosenberg // *Stroke*. — 2011. — Vol. 42, N 11. — P. 3323—3328.

71. Blood–brain barrier alterations provide evidence of subacute diaschisis in an ischemic stroke rat model [Электронный ресурс] / S. Garbuzova–Davis, M. C. O. Rodrigues, D. G. Hernandez–Ontiveros [et al.] // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8, N 5. — e63553. — Режим доступа до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063553>.

72. Yilmaz G. Cell adhesion molecules and ischemic stroke / G. Yilmaz, D. N. Granger // *Neurol. Res.* — 2008. — Vol. 30, N 8. — P. 787—793.

73. Del Zoppo G. J. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia / G. J. del Zoppo // *Neuroscience*. — 2009. — Vol. 158, N 6. — P. 972—982.

74. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke / R. Jin, L. Liu, A. Nanda [et al.] // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* — 2013. — Vol. 6, N 5. — P. 834—851.

75. Seifert H.A. Molecular and cellular immune response to ischemic brain

injury / H. A. Seifert, K. R. Pennypacker // *Transl. Stroke Res.* — 2014. — Vol. 5, N 5. — P. 543—553.

76. Xiong Y. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury / Y. Xiong, A. Mahmood, M. Chopp // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* — 2010. — Vol. 11, N 3. — P. 298—308.

77. Bär T. Morphometric evaluation of capillaries in different laminae of rat cerebral cortex by automatic image analysis: changes during development and aging / T. Bär // *Advances in Neurology* / ed. J. Cervos-Navarro. — New York: Raven Press, 1978. — P. 1—9.

78. Del Zoppo G. J. Virchow's triad: the vascular basis of cerebral injury / G. J. del Zoppo // *Rev. Neurol. Dis.* — 2008. — Vol. 5, Suppl. 1. — P. 12—21.

79. Microvascular structure after embolic focal cerebral ischemia in the rat / D. C. Morris, T. Yeicha, M. Mehdi Khalighib [et al.] // *Brain Research.* — 2003. — Vol. 972, N 1–2. — P. 31—37.

80. Lambertsen K. L. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke / K. L. Lambertsen, K. Biber, B. Finsen // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2012. — Vol. 32. — P. 1677—1698.

81. Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke [Электронный ресурс] / Y. Lee, S.-R. Lee, S. S. Choi [et al.] // *BioMed. Res. Int.* — 2014. — Vol. 2014. — P. 1–9. — Режим доступа до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095830>.

82. Shichita T. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection [Электронный ресурс] / T. Shichita, M. Ito, A. Yoshimura // *Front. Cell. Neurosci.* — 2014. — Vol. 8, Article 319. — P. 1—8. — Режим доступа до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4196547>.

83. Trendelenburg G. Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways / G. Trendelenburg // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2014. — Vol. 34. — P. 1857—1867.

84. Schweizer S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia / S. Schweizer, A. Meisel, S. Märtschitz // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2013. — Vol.

33. — P. 1335—1346.

85. Leucocyte infiltration in experimental stroke [Электронный ресурс] / N. V. Gronberg, F. F. Johansen, U. Kristiansen [et al.] // *J. Neuroinflammation*. — 2013. — Vol. 10, N 115. — С. 1—9. — Режим доступа до журн.: <http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/115>.

86. Iadecola C. The immunology of stroke: from mechanisms to translation / C. Iadecola, J. Anrather // *Nat. Med.* — 2012. — Vol. 17, N 7. — P. 796—808.

87. Hinman J. D. The back and forth of axonal injury and repair after stroke / J. D. Hinman // *Curr. Opin. Neurol.* — 2014. — Vol. 27, N 6. — P. 615—623.

88. Hinman J. D. Remodeling of the axon initial segment after focal cortical and white matter stroke / J. D. Hinman, M. N. Rasband, S. T. Carmichael // *Stroke*. — 2013. — Vol. 44, N 1. — P. 182—189.

89. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke / P. Thored, A. Arvidsson, E. Cacci [et al.] // *Stem Cells*. — 2006. — Vol. 24. — С. 739—747.

90. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke / J. M. Parent, Z. S. Vexler, C. Gong [et al.] // *Ann. Neurol.* — 2002. — Vol. 52. — P. 802—813.

91. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke / A. Arvidsson, T. Collin, D. Kirik [et al.] // *Nat. Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 963—970.

92. Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia / H. Y. Shin, J. H. Kim, J. H. Phi [et al.] // *J. Neurosci. Res.* — 2008. — Vol. 86, N 2. — P. 356—357.

93. Regeneration of neuronal cells following cerebral injury / T. Dailey, N. Tajiri, Y. Kaneko [et al.] // *Front. Neurol. Neurosci.* — 2013. — Vol. 32. — P. 54—61.

94. De novo neurogenesis and acute stroke: are exogenous stem cells really necessary? / J. M. Abrahams, S. Gokhan, E. S. Flamm [et al.] // *Neurosurgery*. — 2004. — Vol. 54, N 1. — P. 150—156.

95. Mancuso M. Developmental angiogenesis of the central nervous system / M. R. Mancuso, F. Kuhnert, C. J. Kuo // *Lymphat. Res. Biol.* — 2008. — Vol. 6, N 3–4. — P. 173—180.
96. Beck H. Angiogenesis after cerebral ischemia / H. Beck, K. H. Plate // *Acta Neuropathol.* — 2009. — Vol. 117, N 5. — P. 481—496.
97. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke / K. Arai, G. Jin, D. Navaratha [et al.] // *FEBS Journal.* — 2009. — Vol. 276. — P. 4644—4652.
98. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke / J. F. Arenillas, T. Sobrino, J. Castillo [et al.] // *Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.* — 2007. — Vol. 9. — P. 205—212.
99. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke / J. Krupinski, J. Kaluza, P. Kumar [et al.] // *Stroke.* — 1994. — Vol. 25. — P. 1794—1798.
100. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia / H. J. Marti, M. Bernaudin, A. Bellail [et al.] // *Am. J. Pathol.* — 2000. — Vol. 156, N 3. — P. 965—976.
101. Some remarks on the growth-rate and angiogenesis of microvessels in ischemic stroke. Morphometric and immunocytochemical studies / J. Krupinski, J. Kaluza, P. Kumar [et al.] // *Pathol. Pol.* — 1993. — Vol. 44, N 4. — P. 203—209.
102. Krupinski J. Three dimensional structure of newly formed blood vessels after focal cerebral ischaemia in rat / J. Krupinski, P. Stroemer, M. Slevin // *NeuroReport.* — 2009. — Vol. 14. — P. 1171—1176.
103. Endothelial progenitor cells in ischemic stroke: an exploration from hypothesis to therapy [Электронный ресурс] / Y.-F. Li, L.-N. Ren, G. Guo [et al.] // *J. Haematol. Oncol.* — 2015. — Vol. 8, N 33. — Режим доступа до журн.: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-015-0130-8>.
104. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia / T. Hayashi, N. Noshita, T. Sugawara [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2003. — Vol. 23. — P. 166—180.

105. Щава С. П. Неоангиогенез и фактор роста фибробластов в условиях острой церебральной ишемии / С. П. Щава // Морфология. — 2006. — Т. 129, № 4: V Междунар. конф. по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения», Орел, 2006 г.: тезисы докл. — С. 144.

106. Growth factors in ischemic stroke / S. Lanfranconi, F. Locatelli, S. Corti [et al.] // J. Cell. Mol. Med. — 2011. — Vol. 15, N 8. — P. 1645—1687.

107. Greenberg D. A. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke / D. A. Greenberg, K. Jin // Cell. Mol. Life Sci. — 2013. — Vol. 70, N 10. — P. 1753—1761.

108. Talwar T. Role of vascular endothelial growth factor and other growth factors in post-stroke recovery / T. Talwar, M. V. Padma Srivastava // Ann. Indian Acad. Neurol. — 2014. — Vol. 17, N 1. — P. 1—6.

109. Zhang Z. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia / Z. Zhang, M. Chopp // Trends Cardiovasc. Med. — 2002. — Vol. 12. — P. 62—66.

110. Hansen T. M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and projection following stroke / T. M. Hansen, A. J. Moss, N. P. Brindle // Curr. Neurovasc. Res. — 2008. — Vol. 5, N 4. — P. 236—245.

111. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke / M. Slevin, J. Krupinski, A. Slowik [et al.] // Stroke. — 2000. — Vol. 31. — P. 1863—1870.

112. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia / Y. Sun, K. Jin, L. Xie [et al.] // J. Clin. Invest. — 2003. — Vol. 111. — P. 1843—1851.

113. Circulating CD133+ CD34+ progenitor cells and plasma stromal-derived factor-1 α : predictive role in ischemic stroke patients / Y. Chen, B. Lu, J. Wang [et al.] // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. — 2015. — Vol. 24, N 2. — P. 319—326.

114. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke / H. K. Yip, L. T. Chang, W. N. Chang [et al.] // *Stroke*. — 2008. — Vol. 39. — P. 69—74.

115. Neurological and functional recovery in human stroke are associated with peripheral blood CD34+ cell mobilization / A. Dunac, C. Frelin, M. Popolo-Blondeau [et al.] // *J. Neurol.* — 2007. — Vol. 254. — P. 327—332.

116. Navarro M. The therapeutic potential of endothelial progenitor cells in ischaemic stroke / M. Navarro, A. Rossell, M. Hernandez-Guillamon // *Rev. Neurol.* — 2007. — Vol. 45, N 9. — P. 556—562.

117. Endothelial progenitor cells and revascularization following stroke / F. Ma, A. Morancho, J. Montaner [et al.] // *Brain Res.* — 2015. — Vol. 1623. — P. 150—159.

118. Stroke-evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels / S. W. Yu, B. Friedman, Q. Cheng [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2007. — Vol. 27, N 4. — P. 755—763.

119. Manual of stroke models in rats / [ed. Y. Wang-Fischer]. — Boca Raton: CRC Press, 2008. — 352 [1] c.

120. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion / A. Tamura, D. I. Graham, J. McCulloch [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1981. — Vol. 1. — P. 53—60.

121. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area / J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa [et al.] // *Jpn. Stroke J.* — 1986. — Vol. 8. — P. 1—8.

122. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson [et al.] // *Stroke*. — 1989. — Vol. 20. — P. 84—91.

123. Effect of suture properties on stability of middle cerebral artery occlusion evaluated by synchrotron radiation angiography / Y. Guan, Y. Wang, F.

Yuan [et al.] // *Stroke*. — 2012. — Vol. 43. — P. 888—891.

124. Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats / N. J. Spratt, J. Fernandez, M. Chen [et al.] // *J. Neurosci. Methods*. — 2006. — Vol. 155. — P. 285—290.

125. Zhao H. A modified suture technique produces consistent cerebral infarction in rats / H. Zhao, W. G. Mayhan, H. Sun // *Brain Res*. — 2008. — Vol. 1246. — P. 158—166.

126. Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при ішемічному інсульті [Електронний ресурс]. Київ (Україна): МОЗ України. 2012. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20120803_602.html.

127. Final report of the Stroke Progress Review Group / [Електронний ресурс]: NINDS. — 2012. — Режим доступу: http://www.ninds.nih.gov/about_ninds/groups/stroke_prg/01-2012-stroke-prg-report.htm.

128. Physical rehabilitation approaches for the recovery of function and mobility following stroke [Електронний ресурс] / A. Pollock, G. Baer, P. Campbell [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev*. — 2014. — Vol. 4. — CD001920. — Режим доступу до журн.: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001920.pub3>.

129. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke // *N. Engl. J. Med*. — 1995. — Vol. 333. — P. 1581—1587.

130. ECASS investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4,5 hours after acute ischemic stroke // *N. Engl. J. Med*. — 2008. — Vol. 359. — P. 1317—1329.

131. Intravenous thrombolysis and endovascular therapy for acute ischemic stroke with internal carotid artery occlusion. A systematic review of clinical outcomes / M. Mokin, T. Kass-Hout, O. Kass-Hout [et al.] // *Stroke*. — 2012. — Vol. 43. — P. 2362—2368.

132. Stroke treatment academic industry roundtable: research priorities in the assessment of neurothrombectomy devices / J. L. Saver, T. G. Jovin, W. S. Smith [et al.] // *Stroke*. — 2013. — Vol. 44, N 12. — P. 3596—3601.

133. A meta-analysis of prospective randomized controlled trials evaluating endovascular therapies for acute ischemic stroke / K. M. Fargen, D. Neal, D. J. Fiorella [et al.] // *J. Neurointerv. Surg.* — 2015. — Vol. 7, N 2. — P. 84—89.

134. Techniques for endovascular treatment of acute ischemic stroke. From intra-arterial fibrinolytics to stent-retrievers / L. Pierot, S. Soize, A. Benaissa [et al.] // *Stroke*. — 2015. — Vol. 46. — P. 909—914.

135. Palaniswami M. Mechanical thrombectomy is now the gold standard for acute ischemic stroke: implications for routine clinical practice / M. Palaniswami, B. Yan // *Intervent. Neurol.* — 2015. — Vol. 4. — P. 18—29.

136. Endovascular treatment with stent-retriever devices for acute ischemic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials [Электронный ресурс] / C. K. Bush, D. Kurimella, L. J. S. Cross [et al.] // *PLoS ONE*. — 2016. — Vol. 11, N 1. — e0147287. — P. 1—19. — Режим доступа до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147287>.

137. Turc G. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke / G. Turc, C. Isabel, D. Calvet // *Diagn. Interv. Imaging*. — 2014. — Vol. 95, N 12. — P. 1129—1133.

138. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside / B. A. Sutherland, J. Minnerup, J. S. Balami [et al.] // *Int. J. Stroke*. — 2012. — Vol. 7. — P. 407—418.

139. Stankowski J. N. Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? / J. N. Stankowski, R. Gupta // *Antioxid. Redox Signal*. — 2011. — Vol. 15, N 10. — P. 1841—1851.

140. Cook D. J. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain / D. J. Cook, L. Teves, M. Tymianski // *Nature*. — 2012. — Vol. 483. — P. 213—217.

141. EuroHYP-1: European multicenter, randomized, phase III clinical trial

of therapeutic hypothermia plus best medical treatment vs. best medical treatment alone for acute ischemic stroke / H. B. van der Worp, M. R. MacLeod, P. M. Bath [et al.] // *Int. J. Stroke*. — 2014. — Vol. 9, N 5. — P. 642—645.

142. Safety and efficacy of NA-1 in patients with iatrogenic stroke after endovascular aneurysm repair (ENACT): a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial / M. D. Hill, R. H. Martin, D. Mikulis [et al.] // *Lancet Neurol*. — 2012. — Vol. 11. — P. 942—950.

143. Komitova M. On neural plasticity, new neurons and the postischemic milieu: an integrated view on experimental rehabilitation / M. Komitova, B. B. Johansson, P. S. Eriksson // *Exp. Neurology*. — 2006. — Vol. 199, N 1. — P. 42—55.

144. Rabadi M. H. Review of the randomized clinical stroke rehabilitation trials in 2009 / M. H. Rabadi // *Med. Sci. Monit*. — 2011. — Vol. 17, N 2. — P. 25—43.

145. What is the evidence for physical therapy poststroke? A systematic review and meta-analysis [Электронный ресурс] / J. M. Veerbeek, E. van Wegen, R. van Peppen [et al.] // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9, N 2. — e87987. — Режим доступа до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913786>.

146. Stimulation targeting higher motor areas in stroke rehabilitation: a proof-of-concept, randomized, double-blinded placebo-controlled study of effectiveness and underlying mechanisms / D. A. Cunningham, N. Varnerin, A. Machado [et al.] // *Restor. Neurol. Neurosci*. — 2015. — Vol. 33. — P. 911—926.

147. Transcranial direct current stimulation (tDCS) for improving activities of daily living, and physical and cognitive functioning, in people after stroke [Электронный ресурс] / B. Elsner, J. Kugler, M. Pohl [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev*. — 2016. — Vol. 3. — Article CD 009645. — 190 p. — Режим доступа до журн.: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD009645.pub3/full>.

148. Transcranial magnetic stimulation in mild to severe hemiparesis early after stroke: a proof of principle and novel approach to improve motor function / A.

B. Conforto, S. M. Anjos, G. Saposnik [et al.] // *J. Neurol.* — 2012. — Vol. 259. — P. 1399—1405.

149. Epidural electrical stimulation for stroke rehabilitation: results of the prospective, multicenter, randomized, single-blinded Everest trial / R. M. Levy, R. L. Harvey, B. M. Kissela [et al.] // *Neurorehabil. Neural Repair.* — 2016. — Vol. 30. — P. 107—119.

150. Chronic deep cerebellar stimulation promotes long-term potentiation, microstructural plasticity, and reorganization of perilesional cortical representation in a rodent model / J. Cooperrider, H. Furmaga, E. Plow [et al.] // *J. Neurosci.* — 2014. — Vol. 34. — P. 9040—9050.

151. Safety, feasibility and efficacy of vagus nerve stimulation paired with upper-limb rehabilitation after ischemic stroke / J. Dawson, D. Pierce, A. Dixit [et al.] // *Stroke.* — 2016. — Vol. 47. — P. 143—150.

152. Optogenetic modulation in stroke recovery [Электронный ресурс] / A. V. Pendharkar, S. L. Levy, A. L. Ho [et al.] // *Neurosurg. Focus.* — 2016. — Vol. 40, N 5. — E6. — Режим доступа до журн.: <http://thejns.org/doi/abs/10.3171/2016.2.FOCUS163>.

153. Optogenetic stimulation of neural grafts enhances neurotransmission and downregulates the inflammatory response in experimental stroke model / M. M. Daadi, J. Q. Klausner, B. Bajar [et al.] // *Cell Transplant.* — 2016. — Vol. 25, N 7. — P. 1371—1380.

154. A randomized controlled trial of EEG-based motor imagery brain-computer interface robotic rehabilitation for stroke / K. K. Ang, K. S. Chua, K. S. Phua [et al.] // *Clin. EEG Neurosci.* — 2015. — Vol. 46. — P. 310—320.

155. Chopp M. Plasticity and remodeling of brain / M. Chopp, Y. Li, J. Zhang. // *J. Neurol. Sci.* — 2008. — Vol. 265. — P. 97—101.

156. Chopp M. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies / M. Chopp, Z. G. Zhang // *Stroke.* — 2009. — Vol. 40, N 3 (Suppl.). — P. 143—145.

157. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood–brain barrier in stroke rats / C. V. Borlongan, J. G. Lind, O. Dillon–Carter [et al.] // *Brain Res.* — 2004. — Vol. 1010, N 1–2. — P. 108—116.

158. PISCES — a phase I trial of CTX0E03 human neural stem cells in ischaemic stroke: interim results [Электронный ресурс] / D. Kalladka, J. Sinden, K. Pollock [et al.] // *Cerebrovasc. Dis.* — 2016. — Vol. 37, Suppl. 1. — Article 49. — Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01151124>.

159. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow– and adipose tissue–derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke [Электронный ресурс] / M. Gutiérrez–Fernández, B. Rodríguez–Frutos, J. Ramos–Cejudo [et al.] // *Stem Cell. Res. Ther.* — 2013. — Vol. 4, N 1. — P. 11. Режим доступа до журн.: <http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/scrt159>.

160. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue–derived stromal cells after cerebral ischemia in rats / S. K. Kang, D. H. Lee, Y. C. Bae [et al.] // *Exp. Neurol.* — 2003. — Vol. 183. — P. 355—366.

161. Peterson D.A. Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem / D. A. Peterson // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 312—314.

162. Intra–arterial infusion of human bone marrow–derived mesenchymal stem cells results in transient localization in the brain after cerebral ischemia in rats / B. Mitkari, E. Kerekelä, J. Nystedt [et al.] // *Exp. Neurol.* — 2013. — Vol. 239. — P. 158—162.

163. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats / J. Chen, Y. Li, L. Wang [et al.] // *J. Neurol. Sci.* — 2001. — Vol. 189. — P. 49—57.

164. Intra–arterial delivery is not superior to intravenous delivery of autologous bone marrow mononuclear cells in acute ischemic stroke / B. Yang, E. Migliati, K. Parsha [et al.] // *Stroke.* — 2013. — Vol. 44, N 12. — P. 3463—3472.

165. Comparative study among three different methods of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation following cerebral infarction in rats / G. P. Ruan, Y. B. Han, T. H. Wang [et al.] // *Neurol. Res.* — 2013. — Vol. 35, N 2. — P. 212—220.

166. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage / M. Modo, R. P. Stroemer, E. Tang [et al.] // *Stroke.* — 2002. — Vol. 33. — P. 2270—2278.

167. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke / J.-R.Chen, G.-Y.Cheng, C.-C.Sheu [et al.] // *J. Anat.* — 2008. — Vol. 213. — P. 249—258.

168. Differential migration of mesenchymal stem cells to ischemic regions after middle cerebral artery occlusion in rats [Електронний ресурс] / S. H. Lee, K. S. Jin, O. Y. Bang [et al.] // *PLoS ONE.* — 2015. — Vol. 10, N 8. — e0134920. — Режим доступу до журн.: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134920>.

169. Darsalia V. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum / V. Darsalia, T. Kallur, Z. Kokaia // *Eur. J. Neurosci.* — 2007. — Vol. 26, N 3. — P. 605—614.

170. Luo Y. Cell-based therapy for stroke / Y. Luo // *J. Neural Transm.* — 2011. — Vol. 118. — P. 61—74.

171. Лікувально-відновний вплив експериментальної нейротрансплантації на ультраструктурні ураження тканини ішемізованого мозку / В. І. Цимбалюк, А. Т. Носов, Л. В. Бондар [та ін.] // *Трансплантологія.* — 2000. — Т. 1, № 1. — С. 260—262.

172. Терапия фетальными нервными клетками в остром периоде экспериментального ишемического инсульта (антиоксидантный эффект) / Д. В. Лебединец, С. Е. Овсянников, В. В. Лебединец [и др.] // *Проблемы криобиологии.* — 2010. — Т. 20, № 3. — С. 338—346.

173. Влияние трансплантации нейрогенных стволовых клеток на

восстановление функций ЦНС у крыс с инсультом в коре мозга / А. И. Волков, С. В. Лебедев, В. П. Чехонин [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2010. — Т. 110, № 12. — С. 64—72.

174. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments / B. Mattsson, J. C. Sorensen, J. Zimmer [et al.] // Stroke. — 1997. — Vol. 28. — P. 1225—1232.

175. Effect of stem cell-based therapy for ischemic stroke treatment: a meta-analysis / Q. Wang, F. Duan, M. X. Wang [et al.] // Clin. Neurol. Neurosurg.. — 2016. — Vol. 146. — P. 1—11.

176. Different sources of stem cells for transplantation therapy in stroke / T. Dailey, D. J. Eve, N. Tajiri [et al.] // Cell-based therapies in stroke / eds.: J. Jolkonnen, P. Walczak. — Springer, 2013. — P. 29—46.

177. Kokaia Z. Neural stem cell-based therapy for ischemic stroke / Z. Kokaia, V. Darsalia // Transl. Stroke Res. — 2011. — Vol. 2. — P. 272—278.

178. Intravascular stem cell transplantation for stroke / A. M. Auriat, S. Rosenblum, T. N. Smith [et al.] // Transl. Stroke Res. — 2011. — Vol. 2. — P. 250—265.

179. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischemic brain / R. Andres, N. Horie, W. Slikker [et al.] // Brain. — 2011. — Vol. 134. — P. 1777—1789.

180. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials [Электронный ресурс] / M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese [et al.] // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7, N 10. — e47559. — Режим доступа до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047559>.

181. Cao W. Effectiveness and safety of autologous bone marrow stromal cells transplantation after ischemic stroke: a meta-analysis / W. Cao, P. Li // Med. Sci. Monit. — 2015. — Vol. 21. — P. 2190—2195.

182. Effects of transplantation with bone marrow-derived mesenchymal stem

cells modified by Survivin on experimental stroke in rats [Электронный ресурс] / N. Liu, Y. Zhang, M. Yuan [et al.] // *J. Transl. Med.* — 2011. — Vol. 9. — Article 105. — Режим доступа до журн.: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/105>.

183. Kuroda S. Bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke — its multi-functional nature / S. Kuroda // *Acta Neurobiol. Exp.* — 2013. — Vol. 73. — P. 57—65.

184. Stem cells for neural regeneration — a potential application of very small embryonic-like stem cells / J. Ratajczak, E. Zuba-Surma, E. Paczkowska [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 62, N 1. — P. 3—12.

185. Bone marrow endothelial progenitor cell transplantation after ischemic stroke: an investigation into its possible mechanism / Y. Y. Bai, X. G. Peng, L. S. Wang [et al.] // *CNS Neurosci. Ther.* — 2015. — Vol. 21, N 11. — P. 877—886.

186. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse / Z. G. Zhang, L. Zhang, Q. Jiang [et al.] // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 90. — P. 284—288.

187. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats / J. Chen, Z. G. Zhang, Y. Li [et al.] // *Circ. Res.* — 2003. — Vol. 92. — P. 692—699.

188. Влияние трансплантации мезенхимных стволовых клеток на динамику морфологических изменений в головном мозге крыс после ишемического инсульта / Н. Н. Зинькова, Е. Г. Гилерович, И. Б. Соколова [и др.] // *Цитология.* — 2007. — № 11. — С. 923—932.

189. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery / Y. Jiang, W. Zhu, J. Zhu [et al.] // *Cell Transplant.* — 2013. — Vol. 22, N 12. — P. 2291—2298.

190. A novel phase 1/2A study of intraparenchymal transplantation of human modified bone marrow derived cells in patients with stable ischemic stroke [Электронный ресурс] / G. K. Steinberg, D. Kondziolka, N. E. Schwartz [et al.]

// Stroke. — 2014. — Vol. 45. — Abstract 149. — Режим доступа до журн.: http://stroke.ahajournals.org/content/45/Suppl_1/A149.

191. Bone marrow mononuclear cells exert long-term neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by promoting arteriogenesis and angiogenesis / J. Wang, L. Yu, C. Jiang [et al.] // Brain Behav. Immun. — 2013. — Vol. 34. — P. 56—66.

192. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis / K. Hamano, T.-S. Li, T. Kobayashi [et al.] // Cell Transplant. — 2000. — Vol. 9. — P. 439—443.

193. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization, but are not incorporated into newly formed vessels / L. Zentilin, S. Tafuro, S. Zacchigna [et al.] // Blood. — 2006. — Vol. 107. — P. 3546—3554.

194. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing β 1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats / W.-C. Shyu, S.-Z. Linn, M.-F. Chiang [et al.] // J. Neuroscience. — 2006. — Vol. 26, N 13. — P. 3444—3453.

195. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke / H. Beck, R. Voswinckel, S. Wagner [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2003. — Vol. 23. — P. 709—717.

196. Safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with nonacute ischemic stroke / V. Battistella, G. R. de Freitas, L. M. Barbosa da Fonseca [et al.] // Regen. Med. — 2011. — Vol. 6, N 1. — P. 45—52.

197. Biodistribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial or intravenous transplantation in subacute stroke patients / P. H. Rosado-de-Castro, F. da Rocha Schmidt, V. Battistella [et al.] // Regen. Med. — 2013. — Vol. 8, N 2. — P. 145—155.

198. Stem cell transplantation for ischemic stroke [Электронный ресурс] / G. B. Boncoraglio, A. Bersano, L. Candelise [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. — 2010. — Vol. 9. — CD007321. — Режим доступа до журн.: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD007231.pub2/full>.

199. Rink C. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology / C. Rink, S. Khanna // *Physiol. Genomics*. — 2011. — Vol. 43, N 10. — P. 521—528.

200. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats / H. Xin, Y. Li, Y. Cui [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* — 2013. — Vol. 33. — P. 1711—1715.

201. Effect of bone marrow stromal cell transplantation on neurologic function and expression of VEGF in rats with focal cerebral ischemia / N. Li, P. Wang, M. Xue-Ling [et al.] // *Mol. Med. Reports*. — 2014. — V.10. — C.2299–2305.

202. Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia / A. Yano, T. Shingo, A. Takeuchi [et al.] // *J. Neurosurg.* — 2005. — Vol. 103. — P. 104—114.

203. Neuroprotection by PlGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia / H. Liu, O. Honmou, K. Harada [et al.] // *Brain*. — 2004. — Vol. 129. — P. 2734—2745.

204. Bath P. M. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke [Электронный ресурс] / P. M. Bath, N. Sprigg, T. England // *Cochrane Database Syst. Rev.* — 2013. — Vol. 6. — CD005207. — Режим доступа до журн.: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005207.pub4/full>.

205. Granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute ischemic stroke. Results of the AX200 for ischemic stroke trial / E. B. Ringelstein, V. Thijs, B. Norrving [et al.] // *Stroke*. — 2013. — Vol. 44. — P. 2681—2687.

206. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats / L. Wang, Z. Zhang, Y. Wang [et al.] // *Stroke*. — 2004. — Vol. 35. — P. 1732—1737.

207. Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF / L. Wang, M. Chopp, S. R. Gregg [et al.] // *J. Cereb. Blood*

Flow Metab. — 2008. — Vol. 28, N 7. — P. 1361—1368.

208. Stromal cell-derived factor-1 α promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone-marrow derived cells in stroke rats / W.-C. Shyu, S.-Z. Lin, P.-S. Yen [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 2008. — Vol. 324. — P. 834—849.

209. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke / D. C. Hess, W. D. Hill, A. Martin-Studdard [et al.] // Stroke. — 2002. — Vol. 33. — P. 1362—1368.

210. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis via $\alpha 6\beta 1$ integrin receptor / B. Carrion, Y. P. Kong, D. Kaigler [et al.] // Exp. Cell. Res. — 2013. — Vol. 319, N 19. — P. 2964—2976.

211. Effects of mesenchymal stem cell treatment on the expression of matrix metalloproteinases and angiogenesis during ischemic stroke recovery [Электронный ресурс] / H. S. Nam, I. Kwon, B. H. Lee [et al.] // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10, N 12. — e0144218. — Режим доступа до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0144218>.

212. Comparing the angiogenic potency of naïve marrow stromal cells and Notch-transferred marrow stromal cells [Электронный ресурс] / M. Dao, C. C. Tate, M. McGrogan [et al.] // J. Transl. Med. — 2013. — Vol. 11, N 81. — Режим доступа до журн.: <http://www.translational-medicine.com/content/11/1/81>.

213. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signaling / F. Guo, S. Lv, Y. Lou [et al.] // Cell Biol. Int. — 2012. — Vol. 36, N 11. — P. 997—1004.

214. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/ Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke / A. Zacharek, J. Chen, X. Cui [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2007. — Vol. 27. — P. 1684—1691.

215. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats / L. Wei, J. L. Fraser, L. Zhong-Yang [et al.] // Neurobiol. Dis. — 2012. — Vol. 46, N 3.

— P. 635—645.

216. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke / C. Moubarik, B. Guillet, B. Youssef [et al.] // *Stem Cell. Rev. and Rep.* — 2011. — Vol. 7. — P. 208—220.

217. Vasculogenesis in experimental stroke after human cerebral endothelial cell transplantation / H. Ishikawa, N. Tajiri, K. Shinozuka [et al.] // *Stroke.* — 2013. — Vol. 44. — P. 3473—3481.

218. Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells / K. Oishi, Y. Ogawa, S. Gamoh [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* — 2004. — Vol. 96. — P. 208—218.

219. Human embryonic neural stem cell transplantation increases subventricular zone cell proliferation and promotes peri-infarct angiogenesis after focal cerebral ischemia / P. Zhang, J. Li, Y. Liu [et al.] // *Neuropathology.* — 2011. — Vol. 31, N 4. — P. 384—391.

220. Transplantation of vascular cells derived from human embryonic stem cells contributes to vascular regeneration after stroke in mice / N. Oyamada, H. Itoh, H. Sone [et al.] // *J. Transl. Med.* — 2008. — Vol. 30. — P. 46—54.

221. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI / Q. Jiang, Z. G. Zhang, G. L. Ding [et al.] // *Neuroimage.* — 2005. — Vol. 28, N 3. — P. 698—707.

222. Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with a Herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in brain ischemia / Y. Miki, N. Nonoguchi, N. Ikeda [et al.] // *Neurosurgery.* — 2004. — Vol. 61, N 3. — P. 586—595.

223. Multimodal approaches for regenerative stroke therapies: combination of granulocyte colony-stimulating factor with bone marrow mesenchymal stem cells is not superior to G-CSF alone [Электронный ресурс] / A. T. Balseanu, A.-M. Buga, B. Catalin [et al.] // *Front. Aging Neurosci.* — 2014. — Vol. 6, article 130. — P. 1—10.

— Режим доступа до журн.:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0144218>

224. Transplantation of Flk-1 human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats / X. Bao, M. Feng, J. Wei [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* — 2011. — Vol. 34, N 1. — P. 87—98.

225. Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах [Електронний ресурс] / Наказ Міністерства освіти і науки, молоді і спорту України № 249 від 01.03.2012 р. — 2012. — Режим доступу: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12>.

226. МКХ-10 — онлайн-довідник. Міжнародна класифікація хвороб [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://mkh10.com.ua>.

227. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination / J. B. Bederson, L. H. Pitts, M. Tsuji [et al.] // *Stroke.* — 1986. — Vol. 17. — P. 472—476.

228. Патент 46029 Україна, МПК А61В17/00. Спосіб прижиттєвого забору клітин кісткового мозку щурів із стегнової кістки / Гридіна Н.Я., Медведєв В.В., Серкіз О.В. [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.

229. Bone marrow aspiration from rats: a minimally invasive procedure / V. L. Ordodi, F. A. Mic, A. A. Mic [et al.] // *Lab Anim. (NY).* — 2006. — Vol. 35, N 5. — P. 41—44.

230. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. — New York: Academic Press, 1998. — 540 с.

231. Schallert T. Orienting and placing // *Behavior of the laboratory rat: a handbook with tests* / T. Schallert, M. T. Woodlee. — Oxford: Oxford University Press, 2005. — P. 129—140.

232. Neurologic assessment of somatosensory dysfunction following an experimental rodent model of cerebral ischemia / R.J. Komotar, G.H. Kim, M.E. Sughrue [et al.] // *Nature Protocols.* — 2007. — Vol.2, N10. — P.2345—2347.

233. On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside / T. Freret, P. Schumann-Bard, M. Boulouard [et al.] // *Exp. Transl. Stroke Medicine*. — 2011. — Vol. 3, N 6. — P. 1—5.

234. Modo M. Long-term survival and serial assessment of stroke damage and recovery — practical and methodological considerations // *J. Exp. Stroke Transl. Med.* — 2009. — Vol. 2, N 2. — P. 52—68.

235. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains / E. J. Goldlust, R. P. Paczynski, Y. Y. He [et al.] // *Stroke*. — 1996. — Vol. 27, N 9. — C. 1657—1662.

236. Sommer C. Histology and infarct volume determination / C. Sommer // *Rodent models of stroke: in the series “Neuromethods”*. — Berlin, 2010. — Vol. 47. — P. 213—226.

237. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives / M. Zille, T. D. Farr, I. Przesdzing [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2012. — Vol. 32. — P. 213—231.

238. CD34: structure, biology, and clinical utility / D. S. Krause, M. J. Fackler, C. I. Civin [et al.] // *Blood*. — 1996. — Vol. 87, N 1. — P. 1—13.

239. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures / M. J. Siemerink, I. Klaassen, I. M. Vogels [et al.] // *Angiogenesis*. — 2012. — Vol. 15, N 1. — P. 151—163.

240. Leung W. Y. Histological quantification of angiogenesis after focal cerebral infarction: a systematic review / W. Y. Leung, M. B. Jensen // *Int. J. Neurosci.* — 2014. — Vol. 124, N 3. — P. 160—165.

241. Schlattman P. Statistics in experimental cerebrovascular research: comparison of more than two groups with a continuous outcome variable / P. Schlattmann, U. Dirnagl // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2010. — Vol. 30. — P. 1558—1563.

242. Колесник В. В. Сравнительная картина морфологических изменений в веществе головного мозга крыс линии Вистар с моделированным

ишемическим инсультом и различными способами введения аутологических мезенхимальных стволовых клеток / В. В. Колесник // Укр. мед. альманах. — 2012. — Т. 15, № 5. — С. 131—133.

243. Combination therapy of stroke i rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis / J. Chen, Y. Li, R. Zhang [et al.] // Brain Res. — 2004. — Vol. 1005, N 1–2. — P. 21—28.

244. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia / T. Onda, O. Honmou, K. Harada [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2008. — Vol. 28, N 2. — P. 329—340.

245. Ramani P. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assesment of its diagnostic utility in paraffin sections / P. Ramani, N. J. Bradley, C. D. M. Fletcher // Histopathology. — 1990. — Vol. 17. — P. 237—242.

246. Mobilization of endogenous bone marrow derived endothelial progenitor cells and therapeutic potential of parathyroid hormone after ischemic stroke in mice [Электронный ресурс] / L.-L. Wang, D. Chen, J. Lee [et al.] // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9, N 2. — e87284. — Режим доступа до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087284>.

247. The great migration of bone-marrow derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders / C. V. Borlongan, L. E. Glover, N. Tajiri [et al.] // Progr. Neurobiol. — 2011. — Vol. 95, N 2. — P. 213—228.

248. Ischemic stroke may activate bone marrow mononuclear cells to enhance recovery after stroke / B. Yang, X. P. Xi, J. Aronowski [et al.] // Stem Cells and Development. — 2012. — Vol. 21, N 18. — P. 3332—3340.

249. Borlongan C. V. Bone marrow stem cell mobilization in stroke: a “bonehead” may be good after all! / C. V. Borlongan // Leukemia. — 2011. — Vol. 25, N 11. — P. 1674—1686.

250. Hicks A. Cell-based therapies and functional outcome in experimental stroke / A. Hicks, T. Schallert, J. Jolkonnen // Cell Stem Cell. — 2009. — Vol. 5. —

P. 139—140.

251. Stem cell mediation of functional recovery after stroke in the rat [Электронный ресурс] / P. Ramos–Cabrer, C. Justicia, D. Wiedermann [et al.] // PLoS One. — 2010. — Vol. 22, N 5. — e2779. — Режим доступа до журн.: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012779>.

252. Enhanced recovery from chronic ischemic injury by bone marrow cells in a rat model of ischemic stroke / J. Yoo, J. J. Seo, J. H. Eom [et al.] // Cell Transplant. — 2015. — Vol. 24, N 2. — P. 167—182.

253. Chitosan–collagen porous scaffold and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for ischemic stroke / F. Yan, W. Yue, Y. Zhang [et al.] // Neural Regen. Res. — 2015. — Vol. 10, N 9. — P. 1421—1426.

254. One–year follow–up after bone marrow stromal cell treatment in middle–aged female rats with stroke / L. H. Shen, Y. Li, J. Cui [et al.] // Stroke. — 2007. — Vol. 38, N 7. — P. 2150—2156.

255. Long–lasting functional disabilities in middle–aged rats with small cerebral infarcts / M. D. Lindner, V. K. Gribkoff, N. A. Donlan [et al.] // J. Neurosci. — 2003. — Vol. 23, N 34. — P. 10913—10922.

256. Savitz S. I. Cell therapies: careful translation from animals to patients / S. I. Savitz // Stroke. — 2013. — Vol. 44. — P. 107—109.

257. Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralesional axonal connections after ischemic stroke in adult mice / Z. Liu, Y. Li, R. L. Zhang [et al.] // Stroke. — 2011. — Vol. 42, N 3. — P. 740—744.

258. Restoration of cortical and thalamocortical circuits after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into the ischemic brain of mice / M. Song, O. Mohamad, X. Gu [et al.] // Cell Transplant. — 2013. — Vol. 22, N 11. — P. 2001—2015.

259. Jiang L. Brain connectivity plasticity in the motor network after ischemic stroke [Электронный ресурс] / L. Jiang, H. Xu, C. Yu // Neural Plasticity. — 2013. — Vol. 2013. — Article ID 924192. — 11 p. — Режим доступа до журн.: <http://www.hindawi.com/journals/np/2013/924192>.

260. Synaptic plasticity during recovery from permanent occlusion of the middle cerebral artery / D. Sentonze, S. Rossi, A. Tortiglione [et al.] // *Neurobiol. Dis.* — 2007. — Vol. 27. — P. 44—53.

261. Hermann D. M. Promoting brain remodeling and plasticity for stroke recovery: Therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation / D. M. Hermann, M. Chopp // *Lancet Neurol.* — 2012. — Vol. 11. — P. 369—380.

262. Transplantation of human bone marrow–derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats / X. Bao, J. Wei, M. Feng [et al.] // *Brain Res.* — 2010. — Vol. 7. — P. 103—113.

263. Intra–striatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice / Y. Li, M. Chopp, J. Chen [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2000. — Vol. 20. — P. 1311—1319.

264. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model / K. Wakabayashi, A. Nagai, A. M. Sheikh [et al.] // *J. Neurosci. Res.* — 2010. — Vol. 88. — P. 1017—1025.

265. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat / J. Chen, Y. Li, M. Katakowski [et al.] // *J. Neurosci. Res.* — 2003. — Vol. 73. — P. 778—786.

266. 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 [Электронный ресурс] / M.–J. Tsai, S.–K. Tsai, B.–R. Hu [et al.] // *J. Biomed. Sci.* — 2014. — Vol. 21, N 5. — Режим доступа до журн.: <http://www.jbiomedsci.com/content/21/1/5>.

267. Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats / Y. Deng, W. B. Ye, Z. Z. Hu [et al.] // *Neurol. Res.* — 2010. — Vol. 32, N 2. — P. 148—156.

268. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery

occlusion in the rat / H. Mewezawa, H. Minasawa, M.–L. Smith [et al.] // *Exp. Brain Res.* — 1992. — Vol. 69. — P. 67—78.

269. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial–axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats / Y. Li, K. McIntosh, J. Chen [et al.] // *Exp Neurol.* — 2006. — Vol. 198. — P. 313—325.

270. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells / Y. Li, J. Chen, C. L. Zhang [et al.] // *Glia.* — 2005. — Vol. 49, N 3. — P. 407—417.

271. From blood to the brain: can systematically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood–brain barrier? [Электронный ресурс] / L. Liu, M. A. Eckert, H. Riazifar [et al.] // *Stem Cells Int.* — 2013. — Vol. 2013. — Article ID 435093. — P. 1—7. — Режим доступа до журн.: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/435093>.

272. The sonic hedgehog pathway mediates brain plasticity and subsequent functional recovery after bone marrow stromal cell treatment of stroke in mice / X. Ding, Y. Li, Z. Liu [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2013. — Vol. 33. — P. 1015—1024.

273. Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke / J. Zhong, A. Chan, L. Morad [et al.] // *Neurorehabil. Neural Repair.* — 2010. — Vol. 24. — P. 636—644.

274. Moshayedi P. Hyaluronan, neural stem cells and tissue reconstruction after acute ischemic stroke [Электронный ресурс] / P. Moshayedi, S. T. Carmicahel // *Biomatter.* — 2013. — Vol. 3, N 1. — e23863. — 9 с. — Режим доступа до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732322/pdf/biom-3-e23863>

275. Dreier J. P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease / J. P. Dreier // *Nat. Med.* — 2011. — Vol. 17. — P. 439—447.

276. Effect of a contralateral lesion on neurological recovery from stroke in rats / F. Sun, L. Xie, X. O. Mao [et al.] // *Restor. Neurol. Neurosci.* — 2012. — Vol. 30, N 6. — P. 491—495.

277. Remodeling of the corticospinal innervation and spontaneous behavioral recovery after ischemic stroke in adult mice / Z. Liu, R. L. Zhang, Y. Cui [et al.] // *Stroke*. — 2009. — Vol. 40. — P. 2546—2551.

278. Shen L. H. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats / L. H. Shen, Y. Li, M. Chopp // *Glia*. — 2010. — Vol. 58. — P. 1074—1081.

279. Gao Q. Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult / Q. Gao, Y. Li, M. Chopp // *Neuroscience*. — 2005. — Vol. 136.

280. Lindvall O. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? / O. Lindvall, Z. Kokaia // *Stroke*. — 2011. — Vol. 42. — P. 2369—2375.

ДОДАТКИ
ДОДАТОК А

ТАБЛИЦІ СТАТИСТИЧНОЇ ОБРОБКИ ПЕРВИННИХ ДАНИХ
ТЕСТУВАННЯ НЕВРОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ В
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Таблиця А.1

Середній бал за шкалою Bederson J.B. і співавторів в тварин
експериментальних підгруп на різних термінах спостереження після
ОСМА

Термін спостереження, доба	Експериментальна підгрупа (ПГр)	Mean, бали	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
1	ПГр1	2,56	0,511	0,120	2,316	2,795	18
	ПГр3	2,56	0,511				18
	ПГр4	2,5	0,514		2,260	2,740	18
	ПГр5	2,39	0,502		2,149	2,629	18
3	ПГр1	2,67	0,485	0,109	2,449	2,884	18
	ПГр3	1,94	0,416				1,727
	ПГр4	1,33	0,485		1,116	1,551	18
	ПГр5	2,72	0,461		2,505	2,940	18
7	ПГр1	1,83	0,383	0,105	1,623	2,044	18
	ПГр3	1,22	0,428				1,012
	ПГр4	0,67	0,485		0,456	0,877	18
	ПГр5	1,67	0,485		0,167	0,611	18
14	ПГр1	1,28	0,461	0,111	1,623	2,044	18
	ПГр3	0,72	0,461				0,501
	ПГр4	0,39	0,502		0,167	0,611	18
	ПГр5	1,28	0,461		1,056	1,499	18
21	ПГр1	0,61	0,502	0,111	0,390	0,832	18
	ПГр3	0,39	0,502				0,168
	ПГр4	0,17	0,383		- 0,055	0,388	18
	ПГр5	0,67	0,485		0,445	0,888	18
28	ПГр1	0,33	0,485	0,095	0,144	0,523	18
	ПГр3	0,17	0,383				-0,23
	ПГр4	0,06	0,236		-0,134	0,245	18
	ПГр5	0,28	0,461		0,088	0,467	18

Таблиця А.2

**Визначення відмінностей між експериментальними підгрупами за шкалою
Bederson J.B. і співавторів (однофакторний дисперсійний аналіз із
повторними вимірюваннями)**

Джерело даних	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
Intercept	692,613	1	692,613	1648,802	0,000	0,960	1648,802	1,000
Procedure*	33,988	3	11,329	26,970	0,000	0,543	80,911	1,000
Error	28,565	68	0,420					

Таблиця А.3

**Дані попарних множинних порівнянь за результатами постпроцесингового
тестування за Scheffe і Bonferroni**

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	ПГр1	ПГр3	0,38*	0,088	0,001	0,13	0,63
		ПГр4	0,69*	0,088	0,000	0,44	0,95
		ПГр5	0,05	0,088	0,964	-0,21	0,30
	ПГр3	ПГр1	-0,38*	0,088	0,001	-0,63	-0,13
		ПГр4	0,31*	0,088	0,008	0,06	0,57
		ПГр5	-0,33*	0,088	0,005	-0,59	-0,08
	ПГр4	ПГр1	-0,69*	0,088	0,000	-0,95	-0,44
		ПГр3	-0,31*	0,088	0,008	-0,57	-0,06
		ПГр5	-0,65*	0,088	0,000	-0,90	-0,40
	ПГр5	ПГр1	-0,05	0,088	0,964	-0,30	0,21
		ПГр3	0,33*	0,088	0,005	0,08	0,59
		ПГр4	0,65*	0,088	0,000	0,40	0,90
Bonferroni	ПГр1	ПГр3	0,38*	0,088	0,000	0,14	0,62
		ПГр4	0,69*	0,088	0,000	0,45	0,93
		ПГр5	0,05	0,088	1,000	-0,19	0,29
	ПГр3	ПГр1	-0,38*	0,088	0,000	-0,62	-0,14
		ПГр4	0,31*	0,088	0,004	0,08	0,55
		ПГр5	-0,33*	0,088	0,002	-0,57	-0,09
	ПГр4	ПГр1	-0,69*	0,088	0,000	-0,93	-0,45
		ПГр3	-0,31*	0,088	0,004	-0,55	-0,08
		ПГр5	-0,65*	0,088	0,000	-0,89	-0,41
	ПГр5	ПГр1	-0,05	0,088	1,000	-0,29	0,19
		ПГр3	0,33*	0,088	0,002	0,09	0,57
		ПГр4	0,65*	0,088	0,000	0,41	0,89

Значення похибки (Mean Square Error) на рівні = 0,07

* – значущість різниці на відповідному рівні, вказаному в стовпчику 6

Таблиця А.4

Порівняльні дані тестування експериментальних тварин підгруп 1 і 2 за шкалою Bederson і співавторів на 1 добу за результатами Mann-Witney U test

Групування середніх	Доба	N	Mean	Std. deviation	Min.	Max.	Статистичні тести		
								1 доба	3 доба
Bederson scale	1	14	1,71	1,204	0	3	Mann-Whitney U	0,000	0,000
	3	14	1,50	1,160	0	3	Wilcoxon W	21,000	21,000
Surgical procedure	1	14	1,43	0,514	1	2	Z	3,213	-3,225
	3	14	1,43	0,514	1	2	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,001	0,001
Експериментальні підгрупи (ПГр)			N	Mean Rank	Sum of Ranks		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,001	0,001
ПГр1			8	10,50	84,00		Exact Sig. (2-tailed)	0,000	0,000
ПГр2			6	3,50	21,00		Exact Sig. (1-tailed)	0,000	0,000
							Point Probability	0,000	0,000

Таблиця А.5

Середні показники ступеня рухової асиметрії за даними ТХБЗОК, у тварин різних експериментальних підгруп

Термін спостереження, доба	Експериментальна підгрупа (ПГр)	Mean, %	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
1	ПГр1	80,872	1,4054	0,357	80,161	81,584	18
	ПГр3	80,556	1,7830		79,844	81,267	18
	ПГр4	80,433	1,5537		79,722	81,145	18
	ПГр5	80,417	1,2590		79,705	81,128	18
3	ПГр1	73,356	1,5741	0,402	72,553	74,159	18
	ПГр3	66,561	1,4394		65,758	67,364	18
	ПГр4	59,039	1,9668		58,236	59,842	18
	ПГр5	73,139	1,8004		72,336	73,942	18

Продовж. табл. А.5

Термін спостереження, доба	Експериментальна підгрупа (ПГр)	Mean, %	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
7	ПГр1	64,583	2,0842	0,413	63,760	65,407	18
	ПГр3	49,183	1,3021		48,360	50,007	18
	ПГр4	36,694	1,0729		35,871	37,518	18
	ПГр5	64,000	2,2510		63,177	64,823	18
14	ПГр1	58,917	1,4284	0,284	58,351	59,483	18
	ПГр3	40,150	1,0590		39,584	40,716	18
	ПГр4	30,661	0,8899		30,095	31,227	18
	ПГр5	58,617	1,3557		58,051	59,183	18
21	ПГр1	55,661	1,5359	0,292	55,078	56,244	18
	ПГр3	38,250	1,0750		37,667	38,833	18
	ПГр4	22,678	1,0941		22,095	23,261	18
	ПГр5	54,389	1,1995		53,806	54,972	18
28	ПГр1	53,894	1,3175	0,261	53,373	54,416	18
	ПГр3	36,789	0,8429		36,268	37,310	18
	ПГр4	21,900	1,0070		21,379	22,421	18
	ПГр5	53,389	1,2058		52,868	53,910	18

Таблиця А.6

Визначення відмінностей показника рухової асиметрії між експериментальними групами за даними ТХБЗОК (однофакторний дисперсійний аналіз із повторними вимірюваннями)

Джерело даних	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power
Intercept	1334922,696	1	1334922,696	511053,239	0,000	1,000	511053,239	1,000
Procedure	37985,497	3	12661,832	4847,375	0,000	0,995	14542,124	1,000
Error	177,623	68	2,612					

Таблиця А.7

Дані попарних множинних порівнянь показника рухової асиметрії за даними ТХБЗОК, за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	ПГр1	ПГр3	12,632*	0,2199	0,000	12,002	13,263
		ПГр4	22,646*	0,2199	0,000	22,016	23,277
		ПГр5	0,556	0,2199	0,105	-,075	1,186
	ПГр3	ПГр1	-12,632*	0,2199	0,000	-13,263	-12,002
		ПГр4	10,014*	0,2199	0,000	9,383	10,644
		ПГр5	-12,077*	0,2199	0,000	-12,707	-11,446
	ПГр4	ПГр1	-22,646*	0,2199	0,000	-23,277	-22,016
		ПГр3	-10,014*	0,2199	0,000	-10,644	-9,383
		ПГр5	-22,091*	0,2199	0,000	-22,721	-21,460
	ПГр5	ПГр1	-0,556	0,2199	0,105	-1,186	0,075
		ПГр3	12,077*	0,2199	0,000	11,446	12,707
		ПГр4	22,091*	0,2199	0,000	21,460	22,721
Bonferroni	ПГр1	ПГр3	12,632*	0,2199	0,000	12,035	13,230
		ПГр4	22,646*	0,2199	0,000	22,049	23,244
		ПГр5	0,556	0,2199	0,083	-0,042	1,153
	ПГр3	ПГр1	-12,632*	0,2199	0,000	-13,230	-12,035
		ПГр4	10,014*	0,2199	0,000	9,416	10,612
		ПГр5	-12,077*	0,2199	0,000	-12,675	-11,479
	ПГр4	ПГр1	-22,646*	0,2199	0,000	-23,244	-22,049
		ПГр3	-10,014*	0,2199	0,000	-10,612	-9,416
		ПГр5	-22,091*	0,2199	0,000	-22,688	-21,493
	ПГр5	ПГр1	-0,556	0,2199	0,083	-1,153	0,042
		ПГр3	12,077*	0,2199	0,000	11,479	12,675
		ПГр4	22,091*	0,2199	0,000	21,493	22,688
Значення похибки (Mean Square Error) = 0,435.							
* – різниця значуща на даному рівні							

Середні показники сенсорної асиметрії в тварин різних експериментальних підгруп за даними ТКС

Термін спостереження, доба	Експериментальна підгрупа (ПГр)	Mean	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
1	ПГр1	0,1289	0,02083	0,005	0,120	0,138	18
	ПГр3	0,1244	0,01886		0,115	0,134	18
	ПГр4	0,1200	0,02058		0,111	0,129	18
	ПГр5	0,1200	0,01815		0,111	0,129	18
3	ПГр1	0,2889	0,03894	0,010	0,270	0,308	18
	ПГр3	0,3944	0,05772		0,375	0,414	18
	ПГр4	0,4756	0,03468		0,456	0,495	18
	ПГр5	0,2900	0,02679		0,271	0,309	18
7	ПГр1	0,3911	0,04129	0,008	0,375	0,407	18
	ПГр3	0,5700	0,03581		0,554	0,586	18
	ПГр4	0,7433	0,02301		0,727	0,759	18
	ПГр5	0,3944	0,03417		0,378	0,411	18
14	ПГр1	0,4078	0,01833	0,005	0,397	0,418	18
	ПГр3	0,7189	0,01997		0,709	0,729	18
	ПГр4	0,8700	0,02849		0,860	0,880	18
	ПГр5	0,4089	0,01967		0,399	0,419	18
21	ПГр1	0,4567	0,01847	0,005	0,446	0,468	18
	ПГр3	0,7756	0,02706		0,765	0,786	18
	ПГр4	0,9078	0,02487		0,897	0,919	18
	ПГр5	0,4533	0,02169		0,442	0,464	18
28	ПГр1	0,4844	0,01756	0,005	0,475	0,494	18
	ПГр3	0,7922	0,02487		0,783	0,802	18
	ПГр4	0,9578	0,01801		0,948	0,967	18
	ПГр5	0,4933	0,01815		0,484	0,503	18

Таблиця А.9

Визначення відмінностей показника сенсорної асиметрії між експериментальними підгрупами за даними ТКС (однофакторний дисперсійний аналіз із повторними вимірюваннями)

Джерело	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power
Intercept	103,860	1	103,860	155220,006	0,000	1,000	155220,006	1,000
Procedure	8,091	3	2,697	4030,576	0,000	0,994	12091,727	1,000
Error	0,046	68	0,001					

Таблиця А.10

Дані попарних множинних порівнянь показника сенсорної асиметрії між експериментальними підгрупами за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	ПГр1	ПГр3	-0,2030*	0,00352	0,000	-0,2131	-0,1929
		ПГр4	-0,3194*	0,00352	0,000	-0,3295	-0,3094
		ПГр5	-0,0004	0,00352	1,000	-0,0105	0,0097
	ПГр3	ПГр1	0,2030*	0,00352	0,000	0,1929	0,2131
		ПГр4	-0,1165*	0,00352	0,000	-0,1266	-0,1064
		ПГр5	0,2026*	0,00352	0,000	0,1925	0,2127
	ПГр4	ПГр1	0,3194*	0,00352	0,000	0,3094	0,3295
		ПГр3	0,1165*	0,00352	0,000	0,1064	0,1266
		ПГр5	0,3191*	0,00352	0,000	0,3090	0,3292
	ПГр5	ПГр1	0,0004	0,00352	1,000	-0,0097	0,0105
		ПГр3	-0,2026*	0,00352	0,000	-0,2127	-0,1925
		ПГр4	-0,3191*	0,00352	0,000	-0,3292	-0,3090
Bonferroni	ПГр1	ПГр3	-0,2030*	0,00352	0,000	-0,2125	-0,1934
		ПГр4	-0,3194*	0,00352	0,000	-0,3290	-0,3099
		ПГр5	-0,0004	0,00352	1,000	-0,0099	0,0092
	ПГр3	ПГр1	0,2030*	0,00352	0,000	0,1934	0,2125
		ПГр4	-0,1165*	0,00352	0,000	-0,1260	-0,1069
		ПГр5	0,2026*	0,00352	0,000	0,1930	0,2122
	ПГр4	ПГр1	0,3194*	0,00352	0,000	0,3099	0,3290
		ПГр3	0,1165*	0,00352	0,000	0,1069	0,1260
		ПГр5	0,3191*	0,00352	0,000	0,3095	0,3286
	ПГр5	ПГр1	0,0004	0,00352	1,000	-0,0092	0,0099
		ПГр3	-0,2026*	0,00352	0,000	-0,2122	-0,1930
		ПГр4	-0,3191*	0,00352	0,000	-0,3286	-0,3095
Значення похибки (Mean Square Error) <0,001.							
* – різниця значуща на даному рівні							

Середні показники рефлекторної асиметрії (%) в тварин різних експериментальних підгруп за даними ТПІЛСВ

Термін спостереження, доба	Експериментальна підгрупа (ПГр)	Mean, %	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
3	ПГр1	27,22	2,102	0,377	27,22	2,102	18
	ПГр3	36,56	1,294		35,804	37,307	18
	ПГр4	40,83	1,043		40,082	41,585	18
	ПГр5	28,28	1,742		27,526	29,029	18
7	ПГр1	31,61	1,335	0,301	31,011	32,211	18
	ПГр3	46,78	1,309		46,178	47,378	18
	ПГр4	51,39	1,145		50,789	51,989	18
	ПГр5	31,94	1,305		31,345	32,544	18
14	ПГр1	40,33	1,495	0,309	39,716	40,951	18
	ПГр3	62,33	1,138		61,716	62,951	18
	ПГр4	71,67	1,029		71,049	72,284	18
	ПГр5	39,78	1,517		39,161	40,395	18
21	ПГр1	42,78	1,060	0,319	42,142	43,413	18
	ПГр3	74,72	1,32		74,087	75,358	18
	ПГр4	81,06	1,305		80,420	81,691	18
	ПГр5	60,51	17,693		42,864	44,136	18
28	ПГр1	46,28	1,364	0,302	45,676	46,879	18
	ПГр3	79,06	1,305		78,454	79,657	18
	ПГр4	90,28	1,127		89,676	90,879	18
	ПГр5	47,22	1,309		46,621	47,824	18

Таблиця А.12

Визначення відмінностей показника рефлекторної асиметрії (%) між експериментальними підгрупами за даними ТППЛСВ (однофакторний дисперсійний аналіз із повторними вимірюваннями)

Джерело	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power
Intercept	924666,736	1	924666,736	309961,134	0,000	1,000	309961,134	1,000
Procedure	61169,808	3	20389,936	6834,990	0,000	0,997	20504,969	1,000
Error	202,856	68	2,983					

Таблиця А.13

Дані попарних множинних порівнянь показника рефлекторної асиметрії (%) за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	ПГр1	ПГр3	-22,24*	0,257	0,000	-22,98	-21,51
		ПГр4	-29,40*	0,257	0,000	-30,14	-28,66
		ПГр5	-0,50	0,257	0,296	-1,24	0,24
	ПГр3	ПГр1	22,24*	0,257	0,000	21,51	22,98
		ПГр4	-7,16*	0,257	0,000	-7,89	-6,42
		ПГр5	21,74*	0,257	0,000	21,01	22,48
	ПГр4	ПГр1	29,40*	0,257	0,000	28,66	30,14
		ПГр3	7,16*	0,257	0,000	6,42	7,89
		ПГр5	28,90*	0,257	0,000	28,16	29,64
	ПГр5	ПГр1	0,50	0,257	0,296	-0,24	1,24
		ПГр3	-21,74*	0,257	0,000	-22,48	-21,01
		ПГр4	-28,90*	0,257	0,000	-29,64	-28,16
Bonferroni	ПГр1	ПГр3	-22,24*	0,257	0,000	-22,94	-21,54
		ПГр4	-29,40*	0,257	0,000	-30,10	-28,70
		ПГр5	-0,50	0,257	0,338	-1,20	0,20
	ПГр3	ПГр1	22,24*	0,257	0,000	21,54	22,94
		ПГр4	-7,16*	0,257	0,000	-7,86	-6,46
		ПГр5	21,74*	0,257	0,000	21,04	22,44
	ПГр4	ПГр1	29,40*	0,257	0,000	28,70	30,10
		ПГр3	7,16*	0,257	0,000	6,46	7,86
		ПГр5	28,90*	0,257	0,000	28,20	29,60
	ПГр5	ПГр1	0,50	0,257	0,338	-0,20	1,20
		ПГр3	-21,74*	0,257	0,000	-22,44	-21,04
		ПГр4	-28,90*	0,257	0,000	-29,60	-28,20
Значення похибки (Mean Square Error) = 0,597							
* – різниця значуща на даному рівні							

Результати аналізу множинної регресії щодо показника ступеня рухової асиметрії (залежна величина) і показників об'єму ділянки інфаркту мозку та середньої кількості судин у перинфарктній зоні головного мозку експериментальних тварин

Модель	Нестандартизовані коефіцієнти		Стандартизовані коефіцієнти	t	Sig.	95.0% Довірчий інтервал для B		Кореляції		
	B	Std. Error	Beta			нижня межа	верхня межа	Zero-order	Partial	Part
Константа	68,792	15,950		4,313	0,000	36,473	101,111			
Середня кількість судин	-2,361	0,515	-0,561	-4,586	0,000	-3,404	-1,318	-0,671	-0,602	-0,520
Об'єм ділянки інфаркту мозку	0,782	0,325	0,294	2,402	0,021	0,122	1,441	0,505	0,367	0,272

ДОДАТОК Б
ТАБЛИЦІ СТАТИСТИЧНОЇ ОБРОБКИ ПЕРВИННИХ ДАНИХ
МОРФОМЕТРИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ТВАРИН

Таблиця Б.1

Середній відносний показник об'єму ділянки інфаркту мозку у тварин експериментальних груп (%) за даними морфометричного дослідження

Термін спостереження, доба	Експериментальна група	Mean	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
7	ПГр6	34,860	4,071	1,394	32,020	37,7	5
	ПГр7	32,660	2,5066		28,82	34,5	5
	ПГр8	31,340	3,3679		28,5	34,18	5
	ПГр9	35,4	2,71		32,56	38,24	5
14	ПГр6	31,660	4,3627	1,394	29,820	35,5	5
	ПГр7	28	2,591		25,16	30,84	5
	ПГр8	24,62	1,89		21,78	27,46	5
	ПГр9	32,52	2,591		29,68	35,36	5

Таблиця Б.2

Визначення відмінностей показників об'єму ділянки інфаркту мозку між експериментальними групами за даними морфометричного дослідження (двохфакторний дисперсійний аналіз)

	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power
Corrected Model	442,054 ^a	7	63,151	6,499	0,000	0,587	45,493	0,998
Intercept	39394,452	1	39394,452	4054,178	0,000	0,992	4054,178	1,000
Доба спостереження	228,533	3	76,178	7,840	0,000	0,424	23,519	0,979
Група тварин	190,532	1	190,532	19,608	0,000	0,380	19,608	0,990
Доба * Група	22,989	3	7,663	0,789	0,509	0,069	2,366	0,200
Похибка	310,944	32	9,717					
Total	40147,450	40						
Corrected Total	752,998	39						

a. $R^2 = 0,898$ (Коригований $R^2 = 0,497$)

Дані попарних множинних порівнянь показників об'єму ділянки інфаркту мозку в експериментальних тварин залежно від групи за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	ПГр6	ПГр7	2,930	1,3941	0,241	-1,183	7,043
		ПГр8	5,280*	1,3941	0,007	1,167	9,393
		ПГр9	-,700	1,3941	0,968	-4,813	3,413
	ПГр7	ПГр6	-2,930	1,3941	0,241	-7,043	1,183
		ПГр8	2,350	1,3941	0,429	-1,763	6,463
		ПГр9	-3,630	1,3941	0,100	-7,743	0,483
	ПГр8	ПГр6	-5,280*	1,3941	0,007	-9,393	-1,167
		ПГр7	-2,350	1,3941	0,429	-6,463	1,763
		ПГр9	-5,980*	1,3941	0,002	-10,093	-1,867
	ПГр9	ПГр6	0,700	1,3941	0,968	-3,413	4,813
		ПГр7	3,630	1,3941	0,100	-0,483	7,743
		ПГр8	5,980*	1,3941	0,002	1,867	10,093
Bonferroni	ПГр6	ПГр7	2,930	1,3941	0,261	-0,991	6,851
		ПГр8	5,280*	1,3941	0,004	1,359	9,201
		ПГр9	-,700	1,3941	1,000	-4,621	3,221
	ПГр7	ПГр6	-2,930	1,3941	0,261	-6,851	0,991
		ПГр8	2,350	1,3941	0,609	-1,571	6,271
		ПГр9	-3,630	1,3941	0,083	-7,551	0,291
	ПГр8	ПГр6	-5,280*	1,3941	0,004	-9,201	-1,359
		ПГр7	-2,350	1,3941	0,609	-6,271	1,571
		ПГр9	-5,980*	1,3941	0,001	-9,901	-2,059
	ПГр9	ПГр6	,700	1,3941	1,000	-3,221	4,621
		ПГр7	3,630	1,3941	0,083	-0,291	7,551
		ПГр8	5,980*	1,3941	0,001	2,059	9,901
Значення похибки (Mean Square Error) =9,717							
* – середня різниця значуща на даному рівні							

Таблиця Б.4

Дані попарних множинних порівнянь показників об'єму ділянки інфаркту мозку в експериментальних тварин залежно від терміну спостереження за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

(I) Термін спостереження	(J) Термін спостереження	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
					нижня межа	верхня межа
7 доба	14 доба	4,365*	0,986	0,000	2,357	6,373
14 доба	7 доба	-4,365*	0,986	0,000	-6,373	-2,357
* – різниця значуща на зазначеному рівні						
b. корекція довірчого інтервалу для множинних порівнянь: Bonferroni.						

Таблиця Б.5

Середні показники кількості судин в перинфарктній зоні головного мозку щурів експериментальних підгруп 1 і 2

Термін спостереження, доба	Експериментальна підгрупа (ПГр)	Mean	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
1	ПГр1	9,367	1,7025	0,538	8,237	10,497	6
	ПГр2	8,840	0,9762		7,602	10,078	5
3	ПГр1	11,500	1,3928	0,589	10,370	12,630	6
	ПГр2	8,940	0,8989		7,702	10,178	5

Таблиця Б.6

Визначення відмінностей показника середньої кількості судин в перинфарктній зоні головного мозку щурів між експериментальними підгрупами 1 і 2 за даними імуногістохімічного дослідження із моноклональними антитілами до маркера CD34 (двохфакторний дисперсійний аналіз)

Джерело	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^b
Corrected Model	26,670 ^a	3	8,890	5,123	0,010	0,461	15,368	0,851
Intercept	2036,679	1	2036,679	1173,603	0,000	0,985	1173,603	1,000
Експериментальна група	12,992	1	12,992	7,486	0,014	0,294	7,486	0,735
Доба спостереження	6,802	1	6,802	3,919	0,063	0,179	3,919	0,466
Експериментальна група * доба спостереження	5,638	1	5,638	3,249	0,088	0,153	3,249	0,400
Error	31,237	18	1,735					
Сума	2141,490	22						
Коригована сума	57,908	21						

a. $R^2 = 0,461$ (Коригований $R^2 = 0,371$)

Таблиця Б.7

Дані попарних порівнянь середнього показника кількості судин в перинфарктній зоні головного мозку експериментальних тварин підгруп 1 і 2 залежно від групи порівняння

(I) Підгрупа (ПГр)	(J) Підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% довірчий інтервал для різниці ^b	
					нижня межа	верхня межа
ПГр1	ПГр2	1,543*	0,564	0,014	0,358	2,728
ПГр2	ПГр1	-1,543*	0,564	0,014	-2,728	-0,358

* – різниця значуща на зазначеному рівні

b. корекція довірчого інтервалу для множинних порівнянь: Bonferroni.

Таблиця Б.8

Дані попарних порівнянь середнього показника кількості судин в перинфарктній зоні головного мозку експериментальних тварин підгруп 1 і 2 залежно від терміну спостереження

(I) Доба	(J) Доба	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% довірчий інтервал для різниці ^a	
					нижня межа	верхня межа
1	3	-1,117	0,564	0,063	-2,302	0,068
3	1	1,117	0,564	0,063	-0,068	2,302

a. корекція довірчого інтервалу для множинних порівнянь: Bonferroni.

Таблиця Б.9

Середня кількість судин в перинфарктній зоні головного мозку щурів експериментальних підгруп за даними імуногістохімічного дослідження із моноклональними антитілами до маркера CD34 в ендотеліоцитах

Термін спостереження, доба	Експериментальна група	Mean	Std. dev.	Std. error	95% confidence interval		Кількість спостережень (n)
					від	до	
7	ПГр10	14,800	2,1503	0,786	13,243	16,357	6
	ПГр11	18,533	1,8662		16,043	19,157	6
	ПГр12	17,600	1,3579		16,977	20,090	6
	ПГр13	14,783	1,1321		13,227	16,340	6
14	ПГр10	15,800	2,2521	0,786	14,243	17,357	6
	ПГр11	20,350	2,2314		18,793	21,907	6
	ПГр12	20,700	1,5297		19,143	22,257	6
	ПГр13	15,500	1,3038		13,943	17,057	6
28	ПГр10	21,667	2,0255	0,786	20,110	23,223	6
	ПГр11	30,817	2,5522		29,260	32,373	6
	ПГр12	37,917	3,5380		36,360	39,473	6
	ПГр13	22,167	1,7466		20,610	23,723	6

Таблиця Б.10

Визначення відмінностей середньої кількості судин у періінфарктній зоні головного мозку щурів між експериментальними підгрупами за даними імуногістохімічного дослідження із моноклональними антитілами до маркера CD34 (двохфакторний дисперсійний аналіз)

Джерело	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^b
Corrected Model	3220,346 ^a	11	292,759	68,205	0,000	0,926	750,255	1,000
Intercept	31408,534	1	31408,534	7317,357	0,000	0,992	7317,357	1,000
Група	891,221	3	297,074	69,210	0,000	0,776	207,631	1,000
Доба	1928,152	2	964,076	224,604	0,000	0,882	449,208	1,000
Група * Доба	400,974	6	66,829	15,569	0,000	0,609	93,416	1,000
Похибка	257,540	60	4,292					
Total	34886,420	72						
Corrected Total	3477,886	71						

a. R² = 0,926 (Коригований R² = 0,912)

Таблиця Б.11

Дані попарних множинних порівнянь кількості судин у періінфарктній зоні головного мозку експериментальних тварин залежно від підгрупи за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	ПГр10	ПГр11	-7,983*	0,6906	0,000	-9,970	-5,997
		ПГр12	-5,811*	0,6906	0,000	-7,798	-3,825
		ПГр13	-0,061	0,6906	1,000	-2,048	1,925
	ПГр11	ПГр10	7,983*	0,6906	0,000	5,997	9,970
		ПГр12	2,172*	0,6906	0,026	0,186	4,159
		ПГр13	7,922*	0,6906	0,000	5,936	9,909
	ПГр12	ПГр10	5,811*	0,6906	0,000	3,825	7,798
		ПГр11	-2,172*	0,6906	0,026	-4,159	-0,186
		ПГр13	5,750*	0,6906	0,000	3,763	7,737
	ПГр13	ПГр10	0,061	0,6906	1,000	-1,925	2,048
		ПГр11	-7,922*	0,6906	0,000	-9,909	-5,936
		ПГр12	-5,750*	0,6906	0,000	-7,737	-3,763

	(I) Експериментальна підгрупа (ПГр)	(J) Експериментальна підгрупа (ПГр)	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Bonferroni	ПГр10	ПГр11	-7,983*	0,6906	0,000	-9,868	-6,099
		ПГр12	-5,811*	0,6906	0,000	-7,695	-3,927
		ПГр13	-0,061	0,6906	1,000	-1,945	1,823
	ПГр11	ПГр10	7,983*	0,6906	0,000	6,099	9,868
		ПГр12	2,172*	0,6906	0,015	0,288	4,057
		ПГр13	7,922*	0,6906	0,000	6,038	9,807
	ПГр12	ПГр10	5,811*	0,6906	0,000	3,927	7,695
		ПГр11	-2,172*	0,6906	0,015	-4,057	-0,288
		ПГр13	5,750*	0,6906	0,000	3,866	7,634
	ПГр13	ПГр10	0,061	0,6906	1,000	-1,823	1,945
		ПГр11	-7,922*	0,6906	0,000	-9,807	-6,038
		ПГр12	-5,750*	0,6906	0,000	-7,634	-3,866
Значення похибки (Mean Square Error) = 4,292							
* – різниця значуща на даному рівні							

Таблиця Б.12

Дані попарних множинних порівнянь кількості судин у периінфарктній зоні головного мозку експериментальних тварин залежно від терміну спостереження за результатами постпроцесингового тестування за Scheffe і Bonferroni

	(I) Доба спостереження	(J) Доба спостереження	Середня різниця (I-J)	Std. Error	Sig.	95% довірчий інтервал	
						нижня межа	верхня межа
Scheffe	7	14	-1,658*	0,5981	0,027	-3,160	-0,157
		28	-11,713*	0,5981	0,000	-13,214	-10,211
	14	7	1,658*	0,5981	0,027	0,157	3,160
		28	-10,054*	0,5981	0,000	-11,555	-8,553
	28	7	11,713*	0,5981	0,000	10,211	13,214
		14	10,054*	0,5981	0,000	8,553	11,555
Bonferroni	7	14	-1,658*	0,5981	0,022	-3,131	-0,185
		28	-11,713*	0,5981	0,000	-13,186	-10,239
	14	7	1,658*	0,5981	0,022	0,185	3,131
		28	-10,054*	0,5981	0,000	-11,527	-8,581
	28	7	11,713*	0,5981	0,000	10,239	13,186
		14	10,054*	0,5981	0,000	8,581	11,527
Значення похибки (Mean Square Error)= 4,292.							
* – середня різниця значуща на даному рівні							