

УДК 616.831-092.9:616.12-008.331.1:615.832.9+[611.018.5:618.48

В.С. Айдарова¹, В.Г. Бабийчук¹, О.В. Кудокоцева¹,
О.В. Наумова², И.И. Ломакин^{1,*}, Е.С. Проценко³

Экспериментальное обоснование применения лечебной гипотермии и клеточной терапии при дисциркуляторной энцефалопатии у крыс линии SHR. Часть 2. Структурные изменения в ткани головного мозга

UDC 616.831-092.9:616.12-008.331.1:615.832.9+[611.018.5:618.48

V.S. Aidarova¹, V.G. Babiichuk¹, O.V. Kudokotseva¹,
O.V. Naumova², I.I. Lomakin^{1,*}, O.S. Protsenko³

Experimental Substantiation of Therapeutic Hypothermia and Cell Therapy Application at Dyscirculatory Encephalopathy in SHR Rats. Part 2. Structural Changes in Brain Tissue

Реферат: В настоящее время сосудистые заболевания головного мозга (ГМ) признаны одной из основных причин инвалидизации и смертности, а вопросы оптимизации патогенетической терапии этого заболевания остаются далекими от разрешения. В этой связи разработка новых эффективных методов борьбы с развитием и прогрессированием цереброваскулярных нарушений при дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) является важнейшей задачей медицины и биологии. В работе проведена оценка морфологических и морфометрических показателей ткани ГМ крыс линии SHR через 30 суток после применения ритмической краниocereбральной гипотермии и введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови. Показано, что каждый из исследуемых методов воздействия в большей или меньшей степени способствует уменьшению выраженности дегенеративных процессов в ткани ГМ крыс с признаками ДЭ. Сочетанное применение указанных методов способствовало их взаимопотенцированию, проявлялось в уменьшении степени дегенеративно-дистрофических поражений ткани ГМ, о котором свидетельствует значимое снижение нейроглиального индекса.

Ключевые слова: крысы SHR, головной мозг, дисциркуляторная энцефалопатия, краниocereбральная гипотермия, кордовая кровь.

Реферат: На даний час судинні захворювання головного мозку (ГМ) визнані однією з основних причин інвалідації та смертності, а питання оптимізації патогенетичної терапії цього захворювання залишаються далекими від вирішення. У зв'язку з цим розробка нових ефективних методів боротьби з розвитком і прогресуванням цереброваскулярних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії (ДЕ) є найважливішим завданням медицини та біології. У роботі проведена оцінка морфологічних і морфометричних показників тканини ГМ щурів лінії SHR через 30 діб після застосування ритмічної краниocereбральної гіпотермії та криоконсервованих ядромісних клітин кордової крові. Показано, що кожен із досліджуваних методів більшою чи меншою мірою сприяє зменшенню вираженості дегенеративних процесів у тканині ГМ щурів із ознаками ДЕ. Одночасне застосування зазначених методів сприяло їх взаємопотенціюванню, виявлялося в зменшенні ступеня дегенеративно-дистрофічних уражень тканини ГМ, про що свідчить значуще зниження нейрогліального індексу.

Ключові слова: щури SHR, головний мозок, дисциркуляторна енцефалопатія, краниocereбральна гіпотермія, кордова кров.

Abstract: Nowadays the cerebral vascular diseases are recognized as the main causes of disability and mortality, and the issues of optimizing the pathogenetic therapy of this disease remain far from being solved. In this regard, the development of new effective methods to combat the development and progression of cerebrovascular disorders in dyscirculatory encephalopathy (DE) is the most important task of medicine and biology. In this paper, we evaluated the morphological and morphometric parameters of brain tissue in the SHR rats 30 days after applying the rhythmic craniocerebral hypothermia and cryopreserved cord blood nucleated cells. It has been shown that each of the studied methods of influence has a more or less positive effect on reducing the severity of degeneration in the tissue of rat's brain with the DE signs. The combined use of these methods contributed to their mutual potentiation, manifested in a decrease in the degree of degenerative-dystrophic lesions of brain tissue, as evidenced by a significant decrease in the neuroglial index.

Key words: SHR rats, brain, dyscirculatory encephalopathy, craniocerebral hypothermia, cord blood.

¹Відділ кріофізіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Харківський національний медичний університет

³Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

³V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: journal@cryo.org.ua

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: journal@cryo.org.ua

Надійшла 01.06.2018

Прийнята до друку 18.02.019

Received June, 01, 2018

Accepted February, 18, 2019

© 2019 I.I. Lomakin et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Под термином «дисциркуляторная энцефалопатия» (ДЭ) подразумевают хроническое заболевание головного мозга (ГМ), проявляющееся прогрессирующим многоочаговым расстройством его функций и обусловленное недостаточностью мозгового кровообращения. По данным ВОЗ от цереброваскулярных заболеваний ежегодно умирают около 5 млн человек, а сосудистые заболевания ГМ признаны одной из основных причин смертности и инвалидности в мире [24].

Этиологическим фактором развития ДЭ наиболее часто является артериальная гипертензия (АГ). В этой связи крысы линии SHR, спонтанно развивающие АГ, могут быть перспективными моделями для изучения цереброваскулярных заболеваний [19, 22] и сосудистой деменции [18, 23]. Показано, что АГ изменяет структуру церебральных сосудов, вызывая гипертрофию и ремоделирование сосудистой стенки, способствует развитию атеросклероза крупных и липогиалиноза мелких сосудов [7]. Важную роль в развитии ДЭ играет нарушение функционирования нейроваскулярных единиц, объединяющих в единую функциональную систему нейроны, клетки глии и мелкие сосуды. Нарушение функционирования нейроваскулярных единиц приводит к расстройству механизмов ауторегуляции мозгового кровообращения [27]. Важнейшими звеньями этого процесса являются эндотелиальная дисфункция на уровне малых церебральных сосудов, вызывающая снижение их реактивности и, соответственно, дефицит перфузии активных участков мозга [14, 16, 20], а также низкий терапевтический результат от приема традиционных вазоактивных средств [8, 24]. Поэтому разработка новых эффективных методов борьбы с развитием и прогрессированием сосудистой деменции при ДЭ – важная задача медицины и биологии.

На протяжении последних 20 лет предпринимаются попытки создания принципиально новых методов лечения ДЭ. К таким методам можно отнести терапию стволовыми клетками (СК), которые могут служить ценным источником нейроноподобных клеток и нейротрофических факторов для лечения ряда нейродегенеративных заболеваний сосудистого генеза [2, 18]. К наиболее перспективным СК можно отнести клетки кордовой крови (КК) человека [21].

В КК, помимо самой многочисленной популяции гемопоэтических СК (CD34⁺), также содержатся эндотелиальные и эпителиальные клетки-предшественники, мезенхимальные, эмбриональноподобные и соматические СК [18]. В условиях культивирования СК КК способны дифференцироваться в нервные клетки, астроциты и олиго-

The term ‘dyscirculatory encephalopathy’ (DE) implies a chronic brain disease, manifested by a progressive multifocal disorder of its functions and caused by cerebral circulatory insufficiency. According to the WHO, about 5 million people die from cerebrovascular diseases every year, and the brain vascular diseases are recognized as the leading causes of death and disability worldwide [14].

The etiological factor in the developing DE is most often arterial hypertension (AH). In this regard, SHR rats which spontaneously develop hypertension, can be promising models for studying the cerebrovascular diseases [3, 10] and vascular dementia [11, 31]. Hypertension has been shown to change the structure of cerebral vessels, causing hypertrophy and remodeling of the vascular wall, to contribute to the development of large atherosclerosis and small vessels lipohyalinosis [12]. An important role in the DE development is played by the impaired functioning of neurovascular units, which combine neurons, glial cells and small vessels into a single functional system. Impaired functioning of the neurovascular units leads to a breakdown in the mechanisms of cerebral autoregulation [22]. The most important links in this process are endothelial dysfunction at the level of small cerebral vessels, causing a decrease in their reactivity and, accordingly, a lack of perfusion of active brain areas [4, 23, 25], and a low therapeutic effect of traditional vasoactive agents [13, 14]. Therefore, designing the new effective methods to combat the development and progression of vascular dementia in DE is the most important task of medicine and biology.

Over the past 20 years, the attempts to create the fundamentally new methods for treating the DE have been made. These methods include stem cell therapy, which can serve as a valuable source of neuron-like cells and neurotrophic factors to treat a number of neurodegenerative diseases of vascular genesis [2, 31]. Human cord blood cells are the most promising stem cells [9].

In addition to the largest population of hematopoietic stem cells (CD34⁺), the cord blood also contains endothelial and epithelial progenitor cells, mesenchymal, embryonic-like and somatic stem cells [31]. When culturing the stem cells (cord blood) can differentiate into nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes [31]. Thus, the cord blood stem cells can serve as a valuable material for cell therapy of neurodegenerative diseases, including DE [2, 27, 28, 30, 31].

Considering the relationship between hypertension and morphofunctional state of brain, two

дендрциты [18]. Таким образом, СК КК могут служить ценным материалом для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний, в том числе и ДЭ [2, 18, 28, 29, 31].

Рассматривая взаимосвязь между АГ и морфофункциональным состоянием ГМ, следует выделить два аспекта: влияние АГ на состояние ГМ и участие ГМ в формировании АГ. В обеспечении долговременной регуляции величины АД принимают участие все сегменты церебральной артериальной системы, начиная от магистральных артерий головы и заканчивая артериолярным руслом. Развивающиеся патологические процессы в структурах ГМ при хронической АГ являются результатом сочетанного действия миогенного, неврогенного и метаболического механизмов ауторегуляции. Однако со временем при постоянно повышенном АД происходит истощение или адаптация артериального барорецепторного рефлекса, который не может выполнять роль механизма регуляции АД [7, 13]. Исходя из вышеизложенного актуальным является моделирование неспецифических защитных механизмов мозга, направленных на создание условий для его саморегуляции. Перспективным может быть применение холодных методов воздействия, при которых гипоталамус, являясь центром нейромедиаторных регуляторных механизмов, играет одну из основных ролей в системе терморегуляции. При участии гипоталамуса происходит трансформация вегетативных влияний на периферические системы. Учитывая роль высших вегетативных центров, локализованных в лимбико-ретикулярном комплексе, и симпатического отдела автономной нервной системы в развитии АГ [26], можно ожидать клинический эффект от применения холодных методов воздействия на ГМ в условиях формирования ДЭ.

Ритмическая краниocereбральная гипотермия (рКЦГ) осуществляется воздействием прерывистого потока холодного воздуха (~ 4–6°C) на наружные покровы головы. В условиях рКЦГ, при которых наблюдается дефицит тепла, происходят функциональные изменения в нейромедиаторных системах ГМ, заключающиеся в активации секреции норадреналина, а также в периодическом подавлении и активации секреции серотонина. Исследователи отмечают, что гипотермия мозга может оказывать ощутимое действие на животных при существенных изменениях условий их существования (болезни, влияние неблагоприятных факторов и т. п.) [3, 10].

Краниocereбральная гипотермия может успешно сочетаться с традиционными методами лечения (лекарственные средства, физиотерапев-

aspects should be highlighted: the influence of hypertension on the brain state and the brain participation in hypertension formation. All the segments of cerebral arterial system, starting from the main arteries of head and ending with the arteriolar bed, take part in the provision of a long-term regulation of blood pressure. Developing pathological processes in the brain structures in chronic hypertension are the result of a combined action of myogenic, neurogenic and metabolic mechanisms of autoregulation. However, over time, with constantly elevated blood pressure, the depletion or adaptation of the arterial baroreceptor reflex occurs, which cannot play the role of a mechanism to regulate the blood pressure [12, 19]. Based on the above, the modeling of non-specific protective mechanisms of brain, aimed at creating the conditions for the brain self-regulation, is relevant. It may be promising to use cold exposure methods, wherein the hypothalamus, being the center of neurotransmitter regulatory mechanisms, plays a major role in thermoregulation system. With the involvement of the hypothalamus, vegetative effects on peripheral systems are transformed. Assuming the role of higher vegetative centers localized in the limbic-reticular complex, and the sympathetic autonomic nervous system in the development of hypertension [21], we can expect a clinical effect from the use of cold methods to influence the brain during the DE formation.

Rhythmic craniocerebral hypothermia (rCCH) is carried out by the action of intermittent flow of cold air (~ 4–6°C) on external covers of the head. Under conditions of rCCH, whereat there is a shortage of heat, functional changes occur in the brain neurotransmitter systems, which consist in the activation of norepinephrine secretion, as well as in periodic suppression and activation of serotonin secretion. The researchers note that the brain hypothermia can have a tangible effect on animals, with significant changes under conditions of their existence (illness, exposure to adverse factors, etc.) [5, 16].

Craniocerebral hypothermia can successfully be combined with traditional methods of treatment (drugs, physiotherapy methods, etc.) and increase their effectiveness [5]. The Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine) investigated the physiological features of the body's responses and its functional systems to cold exposures and showed a high therapeutic efficiency not only of their individual use, but also combined (in particular, with cell therapy) [17, 18].

тические способы и т.п.) и повышать их эффективность [3]. В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина) исследованы физиологические особенности реакций организма и его функциональных систем на холодовые воздействия и показано высокое терапевтическое действие не только индивидуального, но и сочетанного (в частности, с клеточной терапией) их применения [11, 12].

Цель работы – оценка морфологических и морфометрических показателей ткани головного мозга спонтанно гипертензивных крыс линии SHR после применения ритмической краниocereбральной гипотермии и криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых 12–13-месячных спонтанно гипертензивных крысах-самцах линии SHR.

Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447– IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Крысы линии SHR были разделены на 4 группы ($n = 7$ в каждой): 1 – контроль; 2 – проведение процедуры рКЦГ; 3 – введение криоконсервированных ядродержащих клеток КК; 4 – сочетанное применение двух методов воздействия.

Для проведения рКЦГ использовали аппарат «Флюидокраниотерм ПГВ-02» (завод «Электромаш», Нижний Новгород, Россия) с блоком программного управления, обеспечивающим в задаваемом режиме прерывистую подачу хладагента (холодный воздух с температурой 4–6°C) при частоте воздействия 0,05–0,2 Гц [13]. Во время проведения рКЦГ животное помещали в специальную камеру, ограничивающую движение. Поток холодного воздуха подавали только на краниоцервикальную область. В течение всей процедуры животное дышало атмосферным воздухом. Краниocereбральную гипотермию проводили однократно, время воздействия не превышало 90 мин. Ректальная температура у экспериментальных крыс не опускалась ниже 35°C.

Криоконсервированную суспензию ядродержащих клеток (кЯСК) КК получали в криобанке Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины [4, 5]. Криоконсервированная клеточная суспензия КК

The research aim was to assess the morphological and morphometric parameters of brain tissue of spontaneously hypertensive SHR rats when the rhythmic craniocerebral hypothermia and cryopreserved cord blood nucleated cells were applied.

Materials and methods

Studies were performed in adult 12–13 month-old males of spontaneously hypertensive SHR rats.

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447– IV of February 21st, 2006) while observing the requirements of the Institute’s Committee in Bioethics agreed with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The SHR rats were divided into 4 groups ($n = 7$ in each): 1 – control; 2 – with rCCH procedure; 3 – introduction of cryopreserved cord blood nucleated cells; 4 – combined use of two methods of exposure.

Fluidocraniotherm PGV-02 device (Nizhny Novgorod Machine Building Plant, Russia) with a program control unit providing an intermittent refrigerant supply (cold air of 4–6°C temperature) at an exposure frequency of 0.05–0.2 Hz was used [19]. During rCCH the animal was placed into a special chamber that restricted its movement. A stream of cold air was supplied only to a cranio-cervical region. Throughout the procedure, the animal breathed an atmospheric air. Craniocerebral hypothermia was performed once, an exposure time did not exceed 90 min, and the rectal temperature of experimental rats did not fall below 35°C.

A cryopreserved suspension of cord blood nucleated cells (cCBNCs) was obtained at the Cryobank of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [6, 7]. The cryopreserved cord blood cell suspension was a suspension of nucleated cells isolated by sedimentation in a dextran density gradient with the molecular weight of 60,000 (Yuria Pharm, Ukraine) and frozen in autoplasm with dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectant at a final concentration of 5% according to the original method [6, 7]. The number (CD45⁺) and viability (CD45⁺ 7AAD⁻) NCs were determined with a flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA) using the Becton Dickinson reagents according to the Protocol of the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering.

представляла собой взвесь ядросодержащих клеток, выделенных методом седиментации в градиенте плотности декстрана с м. м. 60 000 («Юрия-Фарм», Украина) и замороженных в аутоплазме с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) в конечной концентрации 5% по оригинальной методике [4, 5]. Количество (CD45⁺) и жизнеспособность (CD45⁺7AAD⁻) ЯСК определяли с помощью проточного цитофлуориметра («FACS Calibur», «Becton Dickinson», США) с использованием реагентов «Becton Dickinson» по протоколу Международного общества гематотерапии и трансплантационной инженерии.

Размороженные образцы кЯСК КК вводили в объеме 1 мл однократно внутривентриально в дозе $(3-5) \times 10^7$ клеток на 1 кг массы тела.

При сочетанном применении рКЦГ и кЯСК КК (группа 4) соблюдали следующий порядок: сначала проводили процедуру рКЦГ, затем в течение суток вводили кЯСК КК. Животных декапитировали на 30-е сутки после введения кЯСК КК.

Материалом для гистологического исследования служил ГМ крысы, фиксированный в растворе 10%-го нейтрального формалина. Из области прецентральной извилины ГМ иссекали образцы толщиной 0,4 см, включающие мягкую мозговую оболочку, серое и белое вещество, кору и подкорковые структуры. Обзорные препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для общей оценки состояния мягких мозговых оболочек и вещества ГМ. Препараты окрашивали пикрофуксином по ван Гизону для выявления и оценки степени развития коллагеновых волокон в строме мягких мозговых оболочек и стенке сосудов. Препараты, окрашенные толуидиновым синим по Нисслю, служили объектом для изучения состояния нейронной популяции, глиального компонента клеточной популяции вещества мозга, глионейрональных взаимодействий [9]. Микроскопическое исследование препаратов выполняли на микроскопе «Olympus BX-41» («Olympus Corporation», Япония).

Морфометрическое исследование для объективизации полученных данных проводили на препаратах, окрашенных толуидиновым синим по Нисслю. Определяли значение нейроглиального индекса (количество глиальных клеток, приходящихся на один нейрон), плотность нейронов, глиоцитов и функционирующих (открытых) капилляров (в 1 мм²) в III–V слоях коры ГМ. Все морфометрические и морфологические исследования выполняли на микроскопе «Olympus BX-41» с использованием компьютерной программы «Olympus DP-Soft 3.1» («Olympus Corporation», Япония).

Warmed samples of the cCBNCs were injected in a volume of 1 ml once intraperitoneally at a dose of $(3-5) \times 10^7$ cells per 1 kg of body weight.

In the combined use of rCCH and cCBNCs (group 4), the following procedure was followed: the procedure of rCCH was performed first, then the cCBNCs was administered during the day. The animals were decapitated to day 30 after the injection of cCBNCs.

The material for the histological study was rat's brain, fixed in a solution of 10% neutral formalin. From the area of brain precentral gyrus specimens 0.4 cm thick were dissected, including the *pia mater*, gray and white matter, the cortex and subcortical structures. The survey preparations stained with hematoxylin and eosin were used for a general assessment of the condition of *pia mater* and brain substance. The preparations were stained with picrofuchsin according to van Gieson to identify and assess the degree of development of collagen fibers in the stroma of *pia mater* and vascular wall. Preparations stained with toluidine blue according to Nissl served as the research object to study the state of neural population, glial component of the brain's cell population, and glioneuronal interactions [15]. Microscopic examination of the preparations was performed with an Olympus BX-41 microscope (Olympus Corporation, Japan).

A morphometric study to objectify the data obtained was carried out in preparations stained with toluidine blue according to Nissl. The neuroglial index (number of glial cells per one neuron), density of neurons, gliocytes and functioning (open) capillaries (1 mm²) in the third to fifth layers of the brain cortex were determined. All the morphometric and morphological studies were performed with Olympus BX-41 microscope using the Olympus DP-Soft 3.1 (Olympus Corporation, Japan).

For statistical processing of morphometric data, an Excel software (Microsoft, USA) was used. The obtained digital data were presented (expressed) as an $m \pm M$ arithmetic mean (Mm) and arithmetic mean error (Mm). Based on the Mann-Whitney U-test between groups, the probability of differences (p) was calculated. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

As we demonstrated earlier, spontaneously hypertensive SHR rats can serve as an adequate model of DE. The changes in the architectonics of the brain vascular bed and degenerative-dystrophic damages of the brain tissue found in the animals of group 1 were the result of chronically high blood

Для статистической обработки морфометрических данных использовали пакет прикладных программ фирмы «Excel» («Microsoft», США). Полученные данные представляли в виде средней арифметической величины (M) и ошибки средней арифметической величины (m). На основании U-критерия Манна-Уитни между группами рассчитывали вероятность различий (p). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как показано нами ранее, спонтанно гипертензивные крысы линии SHR могут служить адекватной моделью ДЭ. Выявленные у животных группы 1 изменения архитектоники сосудистого русла ГМ и дегенеративно-дистрофические поражения ткани ГМ были следствием хронически высоких цифр АД, повышенной вязкости крови, снижения уровня доставки кислорода к тканям и интенсификации процессов перекисного окисления липидов, приводили к развитию и прогрессированию сосудистой энцефалопатии [1].

Через 30 суток после проведения процедуры рКЦГ (группа 2) гистологическое исследование показало неравномерное утолщение и отечность мягких мозговых оболочек. Однако в сравнении с группой 1 выраженность и распространенность отека и периадериального фиброза уменьшались. Адериальные сосуды умеренно кровенаполнены, местами неравномерно сужены вследствие спазма, с просветами, в участках которых определялись вертикальная ориентация и очаговая десквамация эндотелиоцитов. Стенки артерий коры ГМ крыс группы 2 несколько утолщены за счет умеренной гиперплазии и гипертрофии гладкомышечных клеток, а также усиления межмышечного коллагенообразования (рис. 1), однако эти изменения были менее выражены в сравнении с группой 1 [1]. Просветы вен расширены, полнокровны, тонус стенки снижен, эндотелиоциты ориентированы горизонтально, пространства между ними расширены.

В 40% случаев в коре ГМ крыс группы 2 сохранялось ламинарное строение, однако с меньшей плотностью нейронов. В остальных случаях отмечались очаги ганглиозноклеточного разрежения и реже – очаги запустения. Ишемически измененные нейроны имели небольшой размер, треугольную или вытянутую форму, мелкое эксцентрично расположенное ядро, гомогенную гиперхромную цитоплазму, в которой не выявлялась характерная гранулярность при окраске по Нисслю. Преимущественно в коре ГМ визуализировались мелкие группы или отдельные безядерные нейроны с бледно окрашенной гомоген-

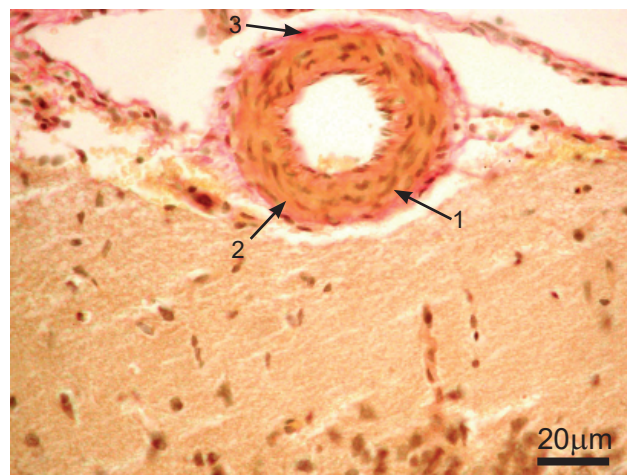


Рис. 1. Гиперплазия и гипертрофия гладкомышечных клеток (1), межмышечный склероз (2) в стенке артерии; слабо выраженный периадериальный фиброз (3) крыс группы 2. Окрасивание пикрофуксином по ван Гизону.

Fig. 1. Hyperplasia and hypertrophy of smooth muscle cells (1), intermuscular sclerosis (2) in artery wall; mild periarterial fibrosis (3) of group 2 rats. Staining with picrofuchsin according to van Gieson.

pressure, increased blood viscosity, reduced oxygen delivery to the tissues and intensification of lipid peroxidation, led to the development and progression of vascular encephalopathy [1].

Thirty days after the RCG procedure (group 2), a histological examination showed uneven thickening and swelling of the *pia mater*. However, in comparison with group 1, the severity and prevalence of edema and periarterial fibrosis decreased. Arterial vessels were moderately filled with blood, somewhere they were unevenly narrowed as a result of the spasm lumens, in the sites of those the vertical orientation and focal desquamation of endotheliocytes were determined. The walls of the arteries of the brain cortex of the rats of group 2 were somewhat thickened due to a moderate hyperplasia and hypertrophy of smooth muscle cells, as well as increased intermuscular collagen formation (Fig. 1), but these changes were less pronounced if compared with group 1 [1]. The venous lumens were enlarged, plethoric, the wall tone was reduced, endotheliocytes were oriented horizontally, the spaces between them were expanded.

In 40% of cases in the brain cortex of the group 2 rats, the laminar structure remained, but with a lower density of neurons. In other cases, foci of gangliocellular thinning were noted, and more rarely the foci of desolation were found. The ischemically altered neurons had a small size, triangular or elongated shape, a small eccentrically located nucleus, a homogeneous hyperchromic cytoplasm, in which no characteristic granularity was detected

ной цитоплазмой, не контурирующей клеточной мембраной, иногда со слабо намечающимся и очень бледно окрашенным ядрышком – клетки «тени», часть из них была с явлениями нейронофагии (рис. 2). Плотность нейронов в III–V слоях коры ГМ составляла $(1267,16 \pm 41,97)$ экз/мм², что значительно превышало аналогичный показатель интактных гипертензивных крыс (таблица).

Нейропил был мелкозернистым, бледным с очагово-диффузным увеличением плотности глиоцитов. Плотность клеток нейроглии в III–V слоях коры составляла $(1569,19 \pm 58,62)$ экз/мм², значение нейроглиального индекса – $1,19 \pm 0,03$. При сравнении с гипертензивными крысами группы 1 плотность глиоцитов в коре ГМ животных группы 2 имела тенденцию к снижению, нейроглиальный индекс был значительно ниже (таблица).

Внутричерепные артерии у животных группы 2 имели несколько утолщенную стенку, в которой отмечались умеренная гиперплазия и гипертрофия гладкомышечных клеток, нерезко выраженный, в сравнении с крысами группы 1, межмышечный склероз. Просветы артерий неравномерно наполнены кровью, местами с участками парциального спазма и типичной аккомодацией эндотелиоцитов. В некоторых мелких артериях и артериолах наблюдался гиалиноз стенки. Вены расширены, полнокровны, выстланы эндотелиоцитами уплощенной формы с вытянутым базофильным ядром и умеренно эозинофильной цитоплазмой. В некоторых капиллярах определялась агрегация эритроцитов, визуализировались капилляры с трудно различимым просветом, а также функционирующие капилляры с хорошо выраженным просветом, плотность которых составляла $(194,95 \pm 8,68)$ экз/мм², что значительно превышало аналогичный показатель у гипертензивных животных контрольной группы 1 (таблица).

На гистологических препаратах ГМ в 50% случаев в области подкорковых структур и белого вещества обнаруживались одиночные или многокамерные кисты, которые сформировались в исходе организующихся гематом. Острое мелкоочаговое кровоизлияние отмечалось редко (10%).

Таким образом, цереброваскулярные процессы при ДЭ частично восстанавливаются вследствие влияния рКЦГ на активность центральной регуляции периферических процессов посредством изменения направленности вегетативных реакций и гуморального звена регуляции [3, 10, 13].

На основании вышеизложенного можно констатировать, что через 30 суток после проведения процедуры рКЦГ во всех изучаемых структурных компонентах ГМ гипертензивных крыс группы 2

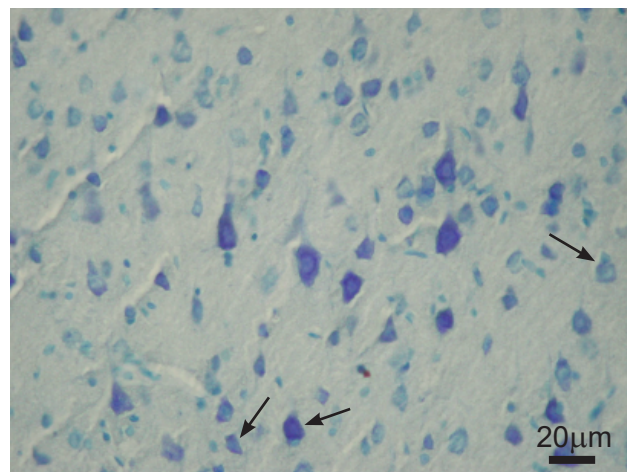


Рис. 2. Дегенеративные изменения отдельных нейронов в ганглионарном слое коры ГМ крыс группы 2. Окрасивание по Нисслю.

Fig. 2. Degenerative changes of individual neurons in ganglionic layer of cerebral cortex of group 2 rats. Nissl staining.

when stained according to Nissl. Mostly in the brain cortex the small groups or individual non-nuclear neurons with a pale-colored homogeneous cytoplasm, a non-contoured cell membrane, sometimes with a faintly visible and very pale-colored nucleolus (shadow cells) were visualized, some of those had neuronophagy (Fig. 2). The density of neurons in the third to fifth layers of the brain cortex was $(1,267.16 \pm 41.97)$ cells/mm², which significantly exceeded the similar index of intact hypertensive rats (Table).

The neuropil was fine-grained, pale with a focal-diffuse increase in the density of gliocytes. The density of neuroglia cells in the third to fifth layers of the cortex was $(1,569.19 \pm 58.62)$ cells/mm², the neuroglial index made 1.19 ± 0.03 . When compared with hypertensive rats of group 1, the density of gliocytes in the cortex of brain animals in group 2 tended to decrease, and the neuroglial index was significantly lower (Table).

The intracerebral arteries in group 2 animals had a somewhat thickened wall, wherein moderate hyperplasia and hypertrophy of smooth muscle cells were noted, not very pronounced in comparison with the rats of group 1 mild sclerosis. Arterial lumens were unevenly filled with blood, somewhere with the areas of partial spasm and typical accommodation of endotheliocytes. In some small arteries and arterioles, a wall hyalinosis was observed. The veins were enlarged, plethoric, lined with the flattened endothelial cells with an elongated basophilic nucleus and moderately eosinophilic cytoplasm. In some capillaries, the aggregation of erythrocytes was determined, capillaries with a hardly



Показатели компенсаторных процессов в коре ГМ экспериментальных животных
Compensatory processes in brain cortex of experimental animals

Группа Group	Нейроглиальный индекс Neuroglial index	Плотность, экз/мм ² Density ex/mm ²		
		нейронов of neurons	глиоцитов of glyocytes	функционирующих капилляров functioning capillaries
1	1,48 ± 0,04 [#]	1116,15 ± 41,97	1655,68 ± 52,26	170,23 ± 7,01
2	1,24 ± 0,02 ^{*,#}	1267,16 ± 41,97 [*]	1569,19 ± 58,62	194,95 ± 8,68 [*]
3	1,17 ± 0,03 ^{*,#}	1263,04 ± 38,28 [*]	1474,47 ± 62,14 [*]	201,81 ± 11,30 [*]
4	1,10 ± 0,03 [*]	1319,33 ± 32,65 [*]	1448,38 ± 39,50 [*]	204,56 ± 10,13 [*]

Примечание: различия значимы в сравнении с группами 1 (*) и 2 (#) соответственно, $p < 0,05$.

Note: differences are statistically significant if compared with group 1 (*) and 2 (#), $p < 0.05$.

наблюдались морфологические признаки уменьшения выраженности и распространенности альтеративных и компенсаторно-адаптивных процессов. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения данного метода для лечения ДЭ и предупреждения развития ее осложнений.

Гистологическое исследование препаратов ГМ крыс линии SHR через 30 суток после введения КЯСК КК показало, что мягкие мозговые оболочки были неравномерной толщины, преимущественно за счет отека, вследствие чего пространства между волокнистыми структурами несколько расширены. По сравнению с животными группы 1 степень периваскулярного фиброза снижалась. Просветы артериальных сосудов были выражены, умеренно кровенаполнены, выстланы уплощенными эндотелиоцитами с вытянутым базофильным ядром. Некоторые мелкие артерии имели несколько суженный просвет вследствие парциального спазма с типичной аккомодацией эндотелиоцитов в них. Стенки артерий утолщены за счет умеренного межмышечного фиброза среднего слоя, в котором определялись нерезко выраженная гиперплазия и гипертрофия гладкомышечных клеток, степень развития которых была несколько ниже, чем у животных группы 1. Вены имели несколько сниженный тонус стенки, а их просветы неравномерно расширены и полнокровны (рис. 3).

Ламинарное строение коры ГМ у крыс группы 3 в 50% случаев было сохранено, характеризовалось относительно равномерным распределе-

дistinguishable lumen were visualized, as well as functioning capillaries with well-defined lumen, the density of which was (194.95 ± 8.68) cells/mm², that significantly exceeded the same index in hypertensive animals of the control group 1 (Table).

In histological specimens of brain in 50% of cases, in the area of subcortical structures and white matter, the forming hematomas, single or multichamber cysts formed in their outcome were detected. Acute small-focal hemorrhage was rarely observed (10%).

Thus, cerebrovascular processes in DE were partially restored due to the influence of rCCH on the activity of central regulation of peripheral processes by changing the direction of vegetative reactions and humoral regulation [5, 16, 19].

Based on the above, it can be stated that 30 days after the rCCG procedure in all the studied structural components of the brain of group 2 hypertensive rats, morphological signs of a decrease in severity and decrease in prevalence of alterative and compensatory-adaptive processes were observed. The results indicate the feasibility of applying this method to treat the DE and prevent the development of its complications.

Histological examination of the brain preparations of SHR rats 30 days after the introduction of the cCBNCs showed that the *pia mater* were irregular, mainly due to edema, as a result of which the spaces between the fibrous structures were somewhat enlarged. Compared with the animals of group 1, the degree of perivascular fibrosis was reduced. Arterial vascular lumens were expressed,

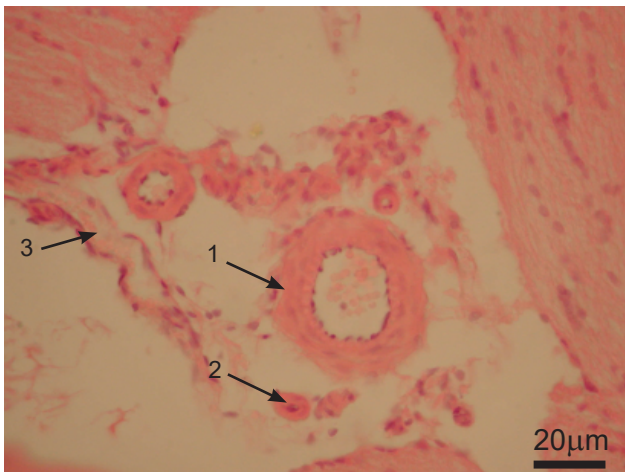


Рис. 3. Сосуды мягких мозговых оболочек ГМ крыс группы 3: гиперплазия гладкомышечных клеток в стенке артерии (1); спазм мелкой артерии (2); полнокровие вен (3). Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 3. Vessels of brain pia mater of group 3 rats: hyperplasia of smooth muscle cells in artery wall (1); small artery spasm (2); venous plethora (3). Staining with hematoxylin and eosin.

нием нейронов. Нейронная популяция во всех наблюдениях была неоднородной: наряду с нейронами обычного строения выявлялись отдельные клетки или их небольшие группы с гиперхромным деформированным телом, сморщенным базофильным ядром, смещенным к периферии. Визуализировались единичные клетки-«тени» округлой формы с бледным набухшим телом и мелким слабо базофильным ядром, смещенным к клеточной мембране, у части таких клеток ядро не визуализировалось (рис. 4). Плотность нейронов в III–V слоях коры составляла $(1263,04 \pm 38,28)$ экз/мм², что значительно превышало аналогичный показатель у крыс группы 1 (таблица).

Через 30 суток после введения КЯСК КК у крыс группы 3 по сравнению с контрольной группой 1 отмечалось снижение интенсивности глиоза при сохранении его диффузно-очагового характера. Морфометрически плотность клеток нейроглии в III–V слоях коры ГМ составляла $(1474,47 \pm 62,14)$ экз/мм², значение нейроглиального индекса соответствовало $1,17 \pm 0,03$ (таблица).

Просветы внутримозговых артериальных сосудов ГМ крыс группы 3 несколько сужались, содержали умеренное количество форменных элементов крови, преимущественно эритроцитов. Стенка сосудов утолщена: артерий – за счет гиперплазии и гипертрофии гладких миоцитов и избыточного развития коллагеновых волокон в среднем слое, артериол – вследствие гиалиноза и реже – плазматического пропитывания. Из-

moderately filled with blood, lined with flattened endothelial cells with an elongated basophilic nucleus. Some small arteries had a somewhat narrowed lumen due to partial spasm with typical accommodation of endotheliocytes in them. The walls of the arteries were thickened due to a moderate intermuscular fibrosis of the middle layer, wherein mild hyperplasia and hypertrophy of smooth muscle cells were determined, the development extent of those was slightly lower than in the animals of group 1. The veins had a slightly reduced wall tone, and their lumens were unevenly expanded, plethoric (Fig. 3).

Laminar structure of the brain cortex in group 3 rats in 50% of cases was preserved, characterized by a relatively uniform distribution of neurons. In all the cases, the neuronal population was heterogeneous: along with neurons of normal structure, individual cells or their small groups were detected with a hyperchromic deformed body, wrinkled basophilic nucleus, shifted to the periphery. Single round-shaped ‘shadow’ cells with a pale swollen body and a small, weakly basophilic nucleus shifted to the cell membrane were visualized; in a part of such cells, the nucleus was not visualized (Fig. 4). The density of neurons in the third to fifth layers of the cortex was $(1,263.04 \pm 38.28)$ cells/mm², which significantly exceeded the similar index in the rats of group 1 (Table).

Thirty days after the introduction of the cCBNCs in group 3 rats as compared to the control group 1, a decrease in the intensity of gliosis was observed, while its diffuse focal character was maintained. Morphometrically the density of neuroglia cells

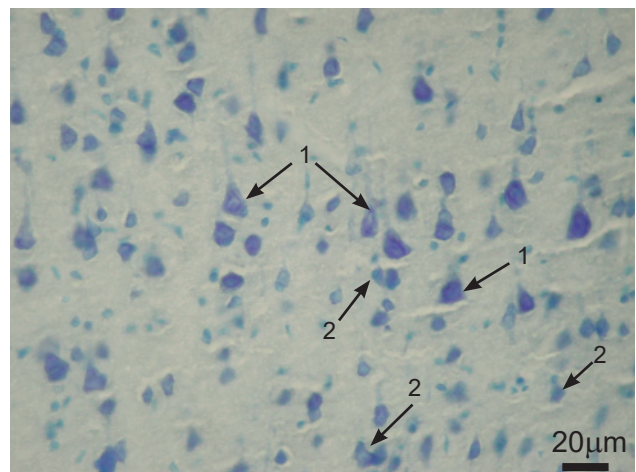


Рис. 4. Пирамидные клетки ганглионарного слоя коры ГМ (1) и дистрофия отдельных нейронов (2) крыс группы 3. Окрашивание по Нисслю.

Fig. 4. Pyramidal cells of ganglionic layer of brain cortex (1) and dystrophy of individual neurons (2) of group 3 rats. Staining according to Nissl.

редка определялись признаки парциального спазма стенки артериальных сосудов. Вены с расширенными просветами, полнокровны. Через 30 суток после введения кЯСК КК, по сравнению с крысами группы 1, значимо снижалось количество капилляров со спавшимися просветами, местами встречались признаки стаза. Морфометрически значимо увеличивалось количество функционирующих капилляров, плотность которых составляла $(201,81 \pm 11,30)$ экз/мм² (таблица). Периваскулярный отек вещества мозга был выражен слабо или умеренно. Острых очаговых деструктивных изменений вещества мозга во всех наблюдениях обнаружено не было.

Таким образом, проведенные гистологическое и морфометрическое исследования ГМ крыс линии SHR после введения кЯСК КК позволили выявить признаки, свидетельствующие об уменьшении выраженности дегенеративных и компенсаторно-адаптивных процессов в ткани ГМ на фоне полного отсутствия острых деструктивных изменений.

Высокий терапевтический потенциал СК КК доказан результатами многочисленных экспериментальных работ. Они успешно применяются в эксперименте для лечения неврологических заболеваний, что открывает перед исследователями возможности замещения или регенерации поврежденных тканей и органов [6, 18, 21, 25, 31]. Результат трансфузии или трансплантации определяется рядом факторов, одним из которых может быть способ введения клеток. Так, интрацеребральная трансплантация СК оказалась перспективной для коррекции микроциркуляторных нарушений в ГМ при АГ, поскольку способствовала активации ангиогенеза и повышала выживаемость нейронов в ткани ГМ после экспериментального ишемического инсульта и травм головы [15]. Однако некоторые исследования доказали отсутствие необходимости прямой инъекции в мозг [30]. При этом положительный эффект отмечался, даже в том случае, когда СК не достигали органа-мишени [25].

Результаты, полученные нами через 30 суток после введения кЯСК КК крысам с ДЭ, согласуются с данными А.О. Соловьевой и соавт. [17], которые показали присутствие маркеров донорских клеток при трансплантации СК костного мозга в органах реципиента в течение 3-х месяцев, причем в некоторых органах (печень, селезенка и ГМ) количество клеток донорского происхождения увеличивалось со временем. По мнению авторов, это может свидетельствовать о пролиферации и дифференцировке трансплантируемых клеток, что не противоречит теории о при-

in the third to fifth layers of the brain cortex made $(1,474.47 \pm 62.14)$ cells/mm², the neuroglial index corresponded to 1.17 ± 0.03 (Table).

The lumens of intracerebral arterial vessels of the brain of group 3 rats were somewhat narrowed, contained a moderate number of blood formed elements, mainly erythrocytes. The vascular wall was thickened: the arteries due to hyperplasia and hypertrophy of smooth myocytes and excessive development of collagen fibers in the middle layer, arterioles due to hyalinosis and less often plasma infiltration. Occasionally, the signs of partial spasm of the arterial vascular wall were determined. Veins with the expanded lumens were plethoric. Thirty days after the introduction of the cCBNCs, if compared with the rats of group 1, the number of capillaries with collapsed lumens significantly decreased, in some places there were the signs of stasis. Morphometrically significantly the number of functioning capillaries increased, the density of which was (201.81 ± 11.30) cells/mm² (Table). Perivascular edema of the brain substance was mild or moderate. Acute focal destructive changes in the brain substance were not detected in all the cases.

Thus, histological and morphometric studies of the brain of SHR rats after the introduction of cCBNCs revealed the signs indicating a decrease in the severity of degenerative and compensatory-adaptive processes in the brain tissue against the background of a complete absence of acute destructive changes.

The results of numerous experimental studies have proven a high therapeutic potential of cord blood stems cells. They have been successfully used in experiments to treat neurological diseases, which opens up the possibility for researchers to replace or regenerate damaged tissues and organs [8, 9, 20, 30, 31]. The result of a transfusion or transplantation is determined by a number of factors, one of which may be the way the cells are introduced. Thus, intracerebral SC transplantation was promising for the correction of microcirculatory disorders in brain in hypertension, since it promoted the activation of angiogenesis and increased the survival of neurons in brain tissue after experimental ischemic stroke and head injuries [24]. However, some studies have shown that there is no need for a direct injection into the brain [29], and a positive effect was observed even when the SC did not reach the target organ [20].

The results obtained by us 30 days after the introduction of the cCBNCs to the rats with DE were consistent with the data of A.O. Solovyova et al. [26], who showed the presence of markers of



Рис. 5. Умеренный склероз стенки артерий (1), полнокровие вены мягких мозговых оболочек (2) ГМ крыс группы 4. Окрашивание пикрофуксином по ван Гизону.

Fig. 5. Moderate sclerosis of arterial walls (1), plethora of cerebral *pia mater* vein (2) of brain of rats group 4. Staining with picrofuchsin according to van Gieson.

обретении СК фенотипа зрелых клеток. Относительно дальнейшей судьбы трансплантированных клеток существуют разные мнения. Однако факт увеличения количества маркера в органах через 1 и 3 месяца, вероятно, свидетельствует о пластичности СК, пролиферации и дифференцировке трансплантированных клеток в органах реципиентов. Кроме того, данные литературы подтверждают способность ЯСК КК секретировать такие нейротрофические факторы, как NT3 и BDNF [2, 18, 21].

Гистологическое исследование препаратов ГМ крыс линии SHR после сочетанного применения рКЦГ и кЯСК КК (группа 4) показало, что просветы артериальных сосудов мягких мозговых оболочек, как правило, были хорошо различимы, заполнены форменными элементами крови, преимущественно эритроцитами. В некоторых артериях определялись признаки парциального спазма, типичная аккомодация эндотелия в виде «частокола». Венозные сосуды имели хорошо выраженный просвет, были полнокровны и выстланы эндотелиоцитами уплощенной формы с вытянутым базофильным ядром (рис. 5).

В 60% наблюдений слои коры ГМ имели обычную или несколько пониженную плотностью нейронов. В остальных случаях в сером веществе определялись очаги ганглиозноклеточных разрежений, реже – локусы относительного повышения плотности нейронов на фоне сохранной структуры (рис. 6). Плотность нейронов в III–V слоях коры ГМ составляла $(1319,33 \pm 32,65)$ экз/мм², что значительно превышало соответствующий показатель у крыс группы 1 (таблица).

donor cells during bone marrow stem cells transplantation in the recipient's organs for 3 months, and in some organs (liver, spleen, and brain) the number of donor-derived cells increased with time. As authors believe, this may indicate the proliferation and differentiation of transplanted cells, which does not contradict the theory that the stem cells gain the phenotype of mature cells. Concerning the further fate of the transplanted cells, there are different opinions. However, the fact of an increase in the number of markers in the organs after 1 and 3 months probably indicates the plasticity of the stem cells, proliferation and differentiation of transplanted cells in the recipients organs. In addition, the published data confirm the ability of cord blood nucleated cells to secrete such neurotrophic factors as NT3 and BDNF [2, 9, 31].

Histological examination of the brain specimens of SHR rats after the combined use of rCCH and cCBNCs (group 4) showed that the lumens of cerebral arterial vessels, as a rule, were clearly distinguishable, filled with blood cells, mainly with red blood ones. In some arteries the signs of partial spasm were determined, typical accommodation of the endothelium as the 'palisade' was found. The venous vessels had a well-defined lumen, were full-blooded and lined by flattened endotheliocytes with an elongated basophilic nucleus (Fig. 5).

In 60% of cases, the layers of the brain cortex had a normal or somewhat lower density of neurons. In the remaining cases, foci of ganglion cell discharges were determined in gray matter, less frequently loci of a relative increase in neuron density against the background of a preserved structure (Fig. 6).

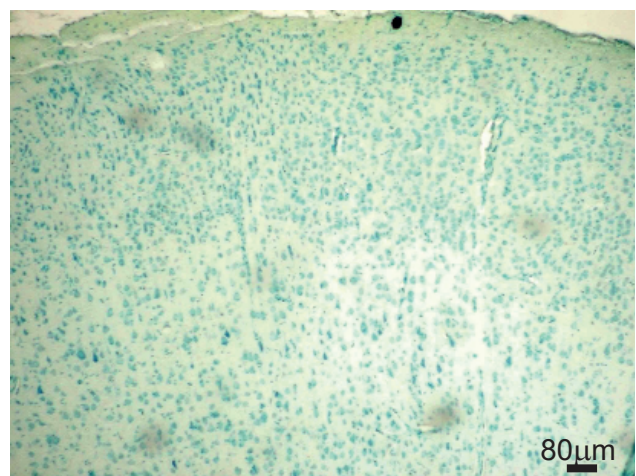


Рис. 6. Участок коры ГМ крыс группы 4 с сохраненной ламинарной структурой. Окрашивание по Нисслю.

Fig. 6. Site of brain cortex of group 4 rats with preserved laminar structure. Staining according to Nissl.

В мелкозернистом бледном нейропиле визуализировались многочисленные глиоциты, плотность клеток нейроглии в III–V слоях коры составляла $(1448,38 \pm 39,50)$ экз/мм². Расчетное значение нейроглиального индекса в группе 4 было $1,10 \pm 0,03$, что значимо меньше, чем в остальных группах животных (таблица).

Внутричерепные артериальные сосуды были умеренно кровенаполнены, имели несколько суженный просвет вследствие умеренного утолщения стенки за счет слабо выраженного склероза или гиалиноза и умеренной гипертрофии гладких миоцитов. В отличие от интактных гипертонивных крыс склероз стенки артерий был выражен в меньшей степени, гиперплазии гладкомышечных клеток не отмечалось, реже наблюдались признаки спазма в мелких артериях. Вены были с несколько расширенными просветами, умеренно полнокровны. У части капилляров отмечался спавшийся просвет, у остальных – хорошо различимый просвет, заполненный эритроцитами. Плотность функционирующих капилляров значимо увеличивалась в сравнении с гипертонивными крысами группы 1 и составляла $(204,56 \pm 10,13)$ экз/мм² (таблица). Периваскулярные пространства местами были несколько отечны, выглядели оптически пустыми. Острые очаговые деструктивные изменения вещества мозга обнаружены не были.

Таким образом, после сочетанного применения рКЦГ и КЯСК КК во всех изучаемых структурных компонентах ГМ отсутствовали морфологические признаки острых деструктивных изменений, снижалась выраженность дистрофических и компенсаторно-адаптивных процессов, что свидетельствует об эффективности выбранного метода для коррекции цереброваскулярных нарушений при сосудистой энцефалопатии.

Распространено мнение, что клетки КК не мигрируют через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), а только стимулируют эндогенный нейро- и ангиогенез [21]. На основании результатов изучения сочетанного применения холодовых воздействий и КК [11, 12] можно заключить, что процедура рКЦГ способствует проницаемости ГЭБ для ЯСК, тем самым потенцируя их терапевтический эффект. Однако у крыс линии SHR при таком патологическом состоянии, как хроническая АГ, проницаемость ГЭБ увеличена из-за нарушения плотных контактов между эндотелиальными клетками или повышения активного транспорта через эндотелий [23, 26]. Очевидно, что установленное нами в эксперименте взаимопотенцирующее действие рКЦГ и КЯСК КК объясняется созданием условий, направленных на ак-

The density of neurons in the third to fifth layers of the brain cortex was $(1,319.33 \pm 32.65)$ cells/mm², which significantly exceeded the corresponding value in group 1 rats (Table).

In the fine-grained pale neuropil numerous gliocytes were visualized, the density of neuroglia cells in the third to fifth layers of the cortex was $(1,448.38 \pm 39.50)$ cells/mm². The calculated value of the neuroglial index in group 4 was 1.10 ± 0.03 , which was significantly less than in other groups of animals (Table).

The intracerebral arterial vessels were moderately filled with blood, had a somewhat narrowed lumen due to moderate wall thickening due to mild sclerosis or hyalinosis and moderate hypertrophy of smooth myocytes. Unlike intact hypertensive rats, arterial wall sclerosis was less pronounced, smooth muscle cell hyperplasia was not observed, and signs of small arteries spasms were less common. The veins were slightly dilated, moderately full. A part of the capillaries had a collapsed lumen, and the rest had a well-defined lumen filled with red blood cells. The density of functioning capillaries significantly increased in comparison with hypertensive rats of group 1 and was (204.56 ± 10.13) cells/mm² (Table). In some places, the perivascular spaces were somewhat swollen, looked optically empty. Acute focal destructive changes in the brain substance were not detected.

Thus, after the combined use of rCCH and cCBNCs in all studied structural components of the brain, there were no morphological signs of acute destructive changes, decreased severity of dystrophic and compensatory-adaptive processes, which indicated the effectiveness of the selected method for correcting cerebrovascular disorders in vascular encephalopathy.

The cord blood cells are widely believed not to migrate across the blood-brain barrier (BBB), but only to stimulate endogenous neuro- and angiogenesis [9]. Based on the results of studying the combined use of cold effects and cord blood [17, 18], it can be concluded that the rCCH procedure promotes BBB permeability for nucleated cells, thereby potentiating their therapeutic effect. However, in SHR rats at such a pathological condition as chronic hypertension, the BBB permeability is increased due to disruption of tight contacts between endothelial cells or increased active transport through the endothelium [11, 21]. Obviously, the mutually potentiating effect of rCCH and cCBNCs, which we established in the experiment, is due to the creation of conditions aimed at activating the nonspecific protective mechanisms of brain,

тивацию неспецифических защитных механизмов ГМ, изменение активности нейромедиаторных систем и коррекцию нейротрансмиттерных процессов при ДЭ у линии SHR.

Выводы

1. Проведенные гистологические и морфометрические исследования ГМ спонтанно гипертензивных крыс (линия SHR) показали выраженные изменения архитектоники его сосудистого русла и дегенеративно-дистрофические поражения ткани, которые могут быть проявлением начинающегося срыва ауторегуляции мозгового кровотока, развития цереброваскулярной патологии и формирования хронической ишемии ГМ.

2. При гистологическом исследовании препаратов ГМ крыс линии SHR с подтвержденными нами признаками ДЭ через 30 суток после проведения рКЦГ установлены уменьшение степени ишемизации тканей ГМ, значимое увеличение плотности нейронов и функционирующих капилляров, снижение нейроглиального индекса.

3. Через 30 суток после внутрибрюшинного введения кЯСК КК в ГМ крыс линии SHR (на фоне полного отсутствия острых деструктивных изменений) уменьшалась выраженность дегенеративных и компенсаторно-адаптивных процессов, значимо увеличивались показатели плотности нейронов и функционирующих капилляров, снижались показатели плотности глиоцитов и нейроглиального индекса.

4. Результаты гистологического исследования ткани ГМ крыс линии SHR через 30 суток после сочетанного применения рКЦГ и кЯСК КК подтвердили отсутствие (полное или частичное) признаков гиперплазии гладкомышечных клеток и спазма стенок артериальных сосудов, снижение степени полнокровия в венах и значимое уменьшение нейроглиального индекса в сравнении с группами 2 и 3. Обнаруженные структурные особенности сосудистого компонента могут рассматриваться как морфологические признаки улучшения кровообращения и снижения степени ишемии ГМ и подтверждать эффективность коррекции цереброваскулярных нарушений при сосудистой энцефалопатии.

Литература

1. Айдарова ВС, Бабийчук ВГ, Кудокотсева ОВ, и др. Экспериментальное обоснование применения лечебной гипотермии и клеточной терапии при дисциркуляторной энцефалопатии у крыс линии SHR. Часть 1. Спонтанно гипертензивные крысы линии SHR в качестве модели дисциркуляторной энцефалопатии. Проблемы кріобіології і кріомедицини 2018; 28(3): 224–36.

changes in the activity of neurotransmitter systems and correcting neurotransmitter processes in DE in SHR rats.

Conclusions

1. Performed histological and morphometric studies of brain of spontaneously hypertensive rats (SHR) showed the marked changes in architecture of its vascular bed and degenerative-dystrophic tissue damage, which might be a manifestation of the beginning disruption of cerebrovascular autoregulation, development of cerebrovascular pathology and the formation of chronic ischemia of brain.

2. Histological examination of brain preparations of SHR rats with the confirmed DE signs 30 days after the rCCH demonstrated a reduced ischemia of brain tissues, significantly increased density of neurons and functioning capillaries, and decreased neuroglial index.

3. In 30 days after the intraperitoneal administration of the cCBNCs to brains of SHR rats (against the background of a complete absence of acute destructive changes), the severity of degenerative and compensatory-adaptive processes decreased, the density of neurons and functioning capillaries significantly increased, and the density of gliocytes and neuroglial index decreased.

4. The results of histological examination of brain tissue of SHR rats 30 days after the combined use of rCCH and cCBNCs confirmed the absence (either complete or partial) of the hyperplasia signs of smooth muscle cells and spasm of arterial walls, a decreased plethora in the veins and significantly reduced neuroglial index if compared to groups 2 and 3. The found structural features of vascular component can be regarded as morphological signs of improving the blood circulation and reducing the degree of brain ischemia and may confirm the correction of cerebrovascular disorders during vascular encephalopathy.

References

1. Aidarova VS, Babiichuk VG, Kudokotseva OV, et al. Experimental substantiation of therapeutic hypothermia and cell therapy application at dyscirculatory encephalopathy in SHR rats. Part 1. Spontaneously hypertensive SHR rats as a model of dyscirculatory encephalopathy. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28(3): 224–36.
2. Aidarova VS, Kudokotseva OV, Lomakin II, Babiichuk GA. Applications of cord blood cells in neurology. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(2): 103–15.
3. Amenta F, Di Tullio MA, Tomassoni D. Arterial hypertension and brain damage—evidence from animal models (review). Clin Exp Hypertens. 2003; 25(6): 359–80.



2. Айдарова ВС, Кудокоцева ОВ, Ломакин ИИ, Бабийчук ГА. Возможности использования клеток кордовой крови в неврологии. Проблемы криобиологии и криомедицины 2016; 26(2): 103–15.
3. Бабийчук ГА, Марченко ВС, Ломакин ИИ, Белостоцкий АВ. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. Киев: Наук. думка; 1992. 208 с.
4. Бабийчук ГА, Зубов ПМ, Рязанцев ВВ, и др. Кордовая кровь – альтернативный источник стволовых клеток для регенеративной медицины: новые подходы к проблеме криоконсервирования. Буковинський медичний вісник 2009; 13(4): 23–6.
5. Бабийчук ГА, Кудокоцева ОВ, Зубов ПМ, Зубова ОЛ. Новые подходы к криоконсервированию ядродержащих клеток кордовой крови и оценка их жизнеспособности. Украинский химиотерапевтический журнал 2008; (1–2): 85–7.
6. Бабийчук ЛВ, Коваль СН, Бабийчук ГА. Структура миокарда молодых гипертензивных крыс после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека. Проблемы криобиологии и криомедицины 2016; 26(3): 271–87.
7. Головченко ЮИ, Трещинская МА. Патогенетические особенности развития циркуляторной гипоксии мозга при артериальной гипертензии. Медицина неотложных состояний 2011; 35(4): 86–93.
8. Гусев ЕИ, Коновалов АН, Скворцова ВИ. Неврология. Национальное руководство. Москва: Всероссийское общество неврологов; 2015. 1064 с.
9. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Москва: Мир; 1960. 648 с.
10. Ломакин ИИ. Обоснование методов лечебного охлаждения в терапии хронического алкоголизма. Проблемы криобиологии 2008; 18(3): 335–8.
11. Ломакин ИИ, Кудокоцева ОВ, Пурешева ВЮ. Терапевтический эффект препаратов кордовой крови на примере структурных изменений дермы при экспериментальном гипотиреозе и его потенцирование аэрокриотерапией. В: Панченко О.А., редактор. Криотерапия: безопасные технологии применения: Киев: КВИЦ; 2012. с. 51–9.
12. Ломакин ИИ, Шило ОВ, Козлов ОВ, та ін. Потенціювання ефекту тканинної терапії в умовах моделювання патологічного старіння мозку у тварин. Трансплантологія 2000; 1(1). 270–1.
13. Марченко ВС, Полищук ЛВ, Бабийчук ВГ. Влияние ритмического охлаждения на проницаемость гематоэнцефалического барьера для экзогенного норадреналина. Проблемы криобиологии 2000; (1): 36–40.
14. Скворцова ВИ, Боцина АЮ, Кольцова КВ, и др. Артериальная гипертензия и головной мозг. Журнал неврологии и психиатрии 2006; (10): 68–76.
15. Соколова ИБ, Польшинцев ДГ. Эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток для улучшения микроциркуляции в коре головного мозга спонтанно гипертензивных крыс. Цитология 2017; 59(4): 279–84.
16. Соколова ИБ, Сергеев ИВ, Федотова ОР, и др. Возрастные изменения микроциркуляции в коре головного мозга у крыс-гипертоников. Успехи геронтологии 2016; 29(4): 567–72.
17. Соловьева АО, Повещенко АФ, Повещенко ОВ, и др. Сравнительное исследование миграции и распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелимфоидные органы в разные сроки после трансплантации *in vivo* у мышей СВА. Бюллетень СО РАМН 2013; 33(4): 35–41.
18. Ярыгин КН, Семченко ВВ, Есенин СИ, и др. Регенеративная биология и медицина. Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы. Омск: Омская областная типография; 2015. 360 с.
19. Amenta F, Di Tullio MA, Tomassoni D. Arterial hypertension and brain damage—evidence from animal models (review). Clin Exp Hypertens 2003; 25(6): 359–80.
20. Amenta F, Tayebati SK, Tomassoni D. Spontaneously hypertensive rat neuroanatomy: applications to pharmacological research. Ital J Anat Embryol. 2010; 115(1–2): 13–7.
21. Babijchuk GA, Marchenko VS, Lomakin II, Belostotskiy AV. [Neurophysiological processes of cooled brain]. Kyiv: Naukova dumka; 1992. Russian.
22. Babijchuk LA, Kudokotseva OV, Zubov PM, Zubova OL. [New approaches for cryopreservation and estimation of cord blood nucleated cells viability]. Ukrainskiy Khimioterapevticheskiy Zhurnal. 2008; (1–2): 85–8. Russian.
23. Babijchuk LA, Zubov PM, Ryazantsev VV, et al. [Cord blood as an alternative source of stem cells for regenerative medicine: new approaches to problem of cryopreservation]. Bukovinian Medical Herald 2009; 13(4): 23–6. Russian.
24. Babijchuk LV, Koval SN, Babijchuk G.A. Structure of myocardium of young hypertensive rats after injection of cryopreserved human cord blood nucleated cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(3): 271–87.
25. Chen J, Venkat P, Zacharek A, Chopp M. Neurorestorative therapy for stroke. Front Hum Neurosci [Internet]. 2014 [cited 08.09.2018]; 27(8): 382. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2014.00382/full>.
26. Cheng J, Liu A, Shi MY, Yan Z. Disrupted glutamatergic transmission in prefrontal cortex contributes to behavioral abnormality in an animal model of ADHD. Neuropsychopharmacology. 2017; 42(10): 2096–104.
27. De Deyn PP, Dam DV. Animal models of dementia. NY: Humana Press; 2011.
28. Golovchenko Yul, Treshchinskaya MA. [Pathogenetic features of the development of circulatory brain hypoxia in hypertension]. Meditsyna Neotlozhnykh Sostoyaniy. 2011; 35(4): 86–93. Russian
29. Gusev E, Kononov A, Skvortsova V. [Neurology. National guidelines]. Moscow: GEOTAR; 2009. Russian.
30. Hachinski V. World stroke day proclamation. Stroke. 2008; 39(9): 2409–20.
31. Lilly R. [Pathohistological technique and practical histochemistry]. Moscow: Mir; 1960. Russian.
32. Lomakin II. Substantiation of medical cooling methods in the therapy of chronic alcoholism. Problems of Cryobiology. 2008; 18(3): 335–8.
33. Lomakin II, Kudokotseva OV, Purysheva VYu. [Therapeutic effect of cord blood preparations at an example of dermal structural changes under experimental hypothyroidism and its potentiation by aerocryotherapy]. In: Panchenko O.A., editor. [Cryotherapy: safe application technology]. Kyiv: KVIC; 2012. p. 51–9. Russian.
34. Lomakin II, Shilo OV, Kozlov OV, et al. [Potentiation of tissue therapy effect in the model of pathological aging of the brain in animals]. Transplantologia. 2000; 1(1): 270–1. Ukrainian.
35. Marchenko VS, Polyschuk LV, Babijchuk VG. Effect of rhythmic cooling on BBB permeability for exogenous norepinephrine. Problems of Cryobiology. 2000; (1): 36–41.
36. Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, et al. Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair. Exp Neurol. 2006; 199(1): 201–8.
37. O'Brien JT. Vascular cognitive impairment. Lancet Neurology. 2003; 2(2): 89–98.
38. Rahn KY, Barenbrock M, Hausberg M. The sympathetic nervous system in the pathogenesis of hypertension. J Hypertens Suppl. 1999; 17(3): S11–S14.
39. Skvortsova VI, Botzina AY, Koltsova KV. [Arterial hypertension and the brain]. Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova. 2006; 10: 68–76. Russian.
40. Sokolova IB, Polyntsev DG. [Efficacy of mesenchymal stem cells used for the improvement cerebral microcirculation in spontaneously hypertensive rats]. Tsitologiya. 2017; 59(4): 279–84. Russian.

20. Amenta F, Tayebati SK, Tomassoni D. Spontaneously hypertensive rat neuroanatomy: applications to pharmacological research. *Ital J Anat Embryol*. 2010; 115(1–2): 13–7.
21. Chen J, Venkat P, Zacharek A, Chopp M. Neurorestorative therapy for stroke. *Front Hum Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 08.09.2018]; 27(8): 382. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2014.00382/full>.
22. Cheng J, Liu A, Shi MY, Yan Z. Disrupted glutamatergic transmission in prefrontal cortex contributes to behavioral abnormality in an animal model of ADHD. *Neuropsychopharmacology* 2017; 42(10): 2096–104.
23. De Deyn PP, Dam DV. *Animal models of dementia*. NY: Humana Press; 2011.
24. Hachinski V. World stroke day proclamation. *Stroke* 2008; 39(10): 2409–20.
25. Newman MB, Willing AE, Manressa JJ, et al. Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair. *Exp Neurol* 2006; 199(1): 201–8.
26. O'Brien JT. Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurology* 2003; 2(2): 89–98.
27. Rahn KY, Barenbrock M, Hausberg M. The sympathetic nervous system in the pathogenesis of hypertension. *J. Hypertens* 2000; 17 (suppl.3): S11–S14.
28. Venkat P, Shen Y, Chopp M, Chen J. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke. *Neuropharmacology* [Internet] 2018 [cited 08.09.2018]; 134(PtB): 310–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390817303994?via%3Dihub>
29. Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis* 2012; 46(3): 635–45.
30. Willing AE, Lixian J, Milliken M, et al. Intravenous versus intraatrial cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 2003; 73(3): 296–307.
31. Yanhong Z, Honghong Y. Potential therapeutic mechanisms and tracking of transplanted stem cells: implications for stroke treatment. *Stem Cells International* 2017 [Internet]. 2017 [cited 08.09.2018]; (17): Article ID 2707082. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/2707082/>
25. Sokolova IB, Sergeev IV, Fedotova OR, et al. Age-related changes of microcirculation in pia mater of rats' sensorimotor cortex. *Adv Gerontol*. 2016; 29(4): 567–72.
26. Solovieva AO, Poveshchenko AF, Poveshchenko OV. [Comparative study on the migration and distribution of bone marrow and spleen cells into lymphoid and non-lymphoid organs of CBA mice in vivo in different periods after transplantation]. *Bulleten SO RAMN*. 2013; 33(4): 35–41. Russian.
27. Venkat P, Shen Y, Chopp M, Chen J. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke. *Neuropharmacology*. [Internet]. 2018 [cited 08.09.2018]; 134(PtB): 310–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390817303994?via%3Dihub> pubmed: 28867364.
28. Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2012 [cited 08.09.2018]; 46(3): 635–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996112000733?via%3Dihub>.
29. Willing AE, Lixian J, Milliken M, et al. Intravenous versus intraatrial cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res*. 2003; 73(3): 296–307.
30. Yanhong Z, Honghong Y. Potential therapeutic mechanisms and tracking of transplanted stem cells: implications for stroke treatment. *Stem Cells Int*. 2017 [Internet]. 2017 [cited 08.09.2018]; (17): Article ID 2707082. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/2707082/>
31. Yarygin KN, Semchenko VV, Yereniev SI, et al. [Regenerative biology and medicine. Book II. Cellular technologies in therapy of nervous diseases]. Omsk: Omsk Regional Printing House; 2015. 360 p. Russian.