

UDK 615.832.9+[615.361:611.018.5:618.48]:57.086.13:616.831-005:612.821.44.084

В.Г. Бабійчук¹, В.С. Айдарова², І.І. Ломакін^{1*},
О.В. Кудокотцева¹, Н.В. Рой³,
О.В. Наумова³, О.С. Проценко²

Вплив гіпотермії та клітинної терапії на структурні зміни в тканинах головного мозку щурів із дисциркуляторною енцефалопатією змішаного ґенезу

UDC 615.832.9+[615.361:611.018.5:618.48]:57.086.13:616.831-005:612.821.44.084

V.G. Babiychuk¹, V.S. Aidarova², I.I. Lomakin^{1*},
O.V. Kudokotseva¹, N.V. Roy³,
O.V. Naumova³, O.S. Protsenko²

Influence of Hypothermia and Cell Therapy on Structural Changes in Brain Tissues of Rats with Dyscirculatory Encephalopathy of Mixed Genesis

Реферат: У роботі досліджували морфологічні зміни, які відбуваються в головному мозку (ГМ) щурів лінії SHR на тлі розвитку гіпертензивної дисциркуляторної енцефалопатії (ДЕ), ускладненою хронічною алкогольною інтоксикацією (ХАІ). Доведено, що ХАІ потенціює прогресуюче старіння ГМ щурів із гіпертензивною формою ДЕ, обтяжує її перебіг і призводить до розвитку ДЕ змішаного ґенезу. Встановлено ефективність самостійного й поєднаного застосування ритмічної краніоцеребральної гіпотермії (рКЦГ) і введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові (кЯВК КК) з метою зменшення прогресуючого судинного ураження ГМ та наслідків дії хронічної ішемії у тварин з ДЕ змішаного ґенезу. Доведено, що поєднане застосування рКЦГ і кЯВК КК щурам зі змішаною формою ДЕ мало більш виражений позитивний вплив на морфологічну структуру тканин і судин ГМ, ніж їх самостійне використання. Спостерігалось подальше зниження ознак прояву дистрофічних, деструктивних і патологічно змінених компенсаторно-адаптивних процесів у ГМ на тлі значного зменшення нейрогліального індексу, стимуляції ангиогенезу, повної або часткової відсутності ознак гіперплазії гладком'язових клітин, гострих геморагій та ішемічних інфарктів, спазму стінок артеріальних судин і повнокров'я в венах, що сприяло відновленню мікрогемодинаміки та цитоархітекtonіки мозку.

Ключові слова: спонтанно гіпертензивні щури, дисциркуляторна енцефалопатія, хронічна алкогольна інтоксикація, ритмічна краніоцеребральна гіпотермія, кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові, головний мозок.

Abstract: The study examines the morphological changes that occur in brain of SHR rats on the background of developing hypertensive dyscirculatory encephalopathy (DE), complicated by chronic alcohol intoxication (CAI). CAI has been proven to potentiate the progressive aging of brain in rats with hypertensive DE by aggravating its course and to lead to the development of DE of mixed genesis. The effectiveness of a single and combined use of rhythmic craniocerebral hypothermia (rCCH) and the introduction of cryopreserved cord blood nucleated cells (cCBNCs) to reduce the progressive vascular lesions of brain and the effects of chronic ischemia in animals with DE of mixed genesis has been established. It has been proven that the combined use of rCCH and cCBNCs in the rats with a mixed DE had a more pronounced positive effect on morphological structure of brain tissues and vessels than their single use. There was a further decrease in the signs of dystrophic, destructive and pathologically altered compensatory-adaptive processes in brain on the background of a significant decrease in neuroglial index, stimulation of angiogenesis, complete or partial absence of signs of smooth muscle cell hyperplasia, acute hemorrhages and ischemic strokes, spasms of arterial vessels' walls and plethora in veins, that contributed to restoration of brain microhemocirculation and cytoarchitectonics.

Key words: spontaneously hypertensive rats, dyscirculatory encephalopathy, chronic alcohol intoxication, rhythmic craniocerebral hypothermia, cryopreserved nucleated cord blood cells, brain.

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

² Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна

³ Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

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

² V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

³ Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

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

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: 2ilomakin53@gmail.com

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

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 4143, fax: +380 57 373 5952
e-mail: 2ilomakin53@gmail.com

Надійшла 07.02.2020

Прийнята до друку 20.04.2021

Received February, 07, 2020

Accepted 20, April, 2021

© 2021 V.G. Babiychuk, 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.

Термін «цереброваскулярні захворювання» (ЦВЗ) об'єднує групу захворювань головного мозку (ГМ), які обумовлені патологією церебральних судин з порушенням мозкового кровообігу. У структурі ЦВЗ більше 90% випадків є хронічними порушеннями мозкового кровообігу. У вітчизняній науковій літературі вони позначаються терміном «дисциркуляторна енцефалопатія» (ДЕ).

За останні 10 років кількість ЦВЗ (особливо її хронічних форм) у нашій країні істотно зросла [8]. Існує багато причин збільшення темпів поширеності ДЕ в Україні, серед яких виділяють артеріальну гіпертензію, цукровий діабет, стреси, зловживання алкоголем та ін.

Найбільш несприятливий перебіг та розвиток патологічних процесів у ГМ відзначається за наявності додаткового токсичного фактора, який може спровокувати розвиток ДЕ на тлі вже існуючих змін [10]. Так, емоційна та психологічна компенсація несприятливого зовнішнього впливу внаслідок прийому алкоголю лише посилює порушення метаболічних процесів у тканинах ГМ, сприяючи розвитку ДЕ змішаного генезу на тлі хронічної алкогольної інтоксикації (ХАІ).

Традиційні методи лікування, які мають багаторічну історію, в більшості випадків не можуть змінити прогресуючий перебіг ДЕ [6, 12]. Тому розробка нових ефективних методів боротьби з розвитком і прогресуванням судинної деменції на тлі ДЕ – найважливіше завдання сучасної медицини і біології.

У зв'язку з необхідністю створення принципово нових методів лікування ДЕ були проведені дослідження в галузі терапії кріоконсервованими ядромісними клітинами (кЯВК) кордової крові (КК), які можуть бути цінним джерелом нейроноподібних клітин і нейротрофічних факторів для лікування цілого ряду нейродегенеративних захворювань судинного генезу [9, 13].

Як показали раніше проведені в ІПКіК НАН України дослідження, ритмічна краніоцеребральна гіпотермія (рКЦГ) теж має нейропротективні властивості, запобігає загибелі нейронів кори ГМ, сприяє поліпшенню адаптаційно-компенсаторних можливостей центральної нервової, серцево-судинної, дихальної та інших систем організму [4]. Даний метод дозволяє коригувати вегетативну регуляцію периферичних процесів у гіпертензивних щурів [4], цілеспрямовано змінювати проникність гематоенцефалічного бар'єра та створювати більш сприятливі умови для проведення подальших заходів терапії хронічного алкоголізму [7].

З урахуванням прогресуючого і несприятливого характеру ДЕ на тлі ХАІ та прагнення збе-

The term 'cerebrovascular disease' (CVD) denotes a group of the brain diseases, caused by pathology of cerebral vessels with cerebral circulatory disorders. In the structure of CVD more than 90% of cases are chronic disorders of cerebral circulation. In national published reports, they are referred as 'dyscirculatory encephalopathy' (DE).

Over the past 10 years, the prevalence of CVD (especially its chronic forms) in our country has increased strongly [13]. There are many reasons of such a rise in the prevalence of DE in Ukraine, among which are hypertension, diabetes, stress, alcohol abuse and others.

The most unfavorable course and development of pathological processes in brain is observed in the presence of an additional toxic factor able to provoke the development of DE on the background of existing changes [6]. Thus, emotional and psychological compensation of adverse external influences through alcohol intake only exacerbates metabolic disorders in brain tissues, contributing to the development of DE of mixed genesis on the background of chronic alcohol intoxication (CAI).

Traditional treatments, which have a long history, are not capable of changing mostly the progressive course of DE [9, 10]. Therefore, the development of new effective methods to combat the development and progression of vascular dementia on the DE background is the most important task of current medicine and biology.

Due to the need to create fundamentally new methods of DE treatment, there have been performed the studies in therapy with cryopreserved nucleated cells (cNCs) of cord blood (CB), which can be a valuable source of neuronal cells and neurotrophic factors to treat a number of neurodegenerative vascular diseases [1, 11].

As shown by previous studies at the IPC&C of NAS of Ukraine, the rhythmic craniocerebral hypothermia (rCCH) also has neuroprotective properties, prevents the death of neurons of brain cortex, improves the adaptive-compensatory capabilities of the central nervous, cardiovascular, respiratory and other systems [5]. This method enables the adjustment of an autonomic regulation of peripheral processes in hypertensive rats [5], purposefully changes the permeability of the blood-brain barrier and creates more favorable conditions for further treatment of chronic alcoholism [12].

Due to the progressive and unfavorable nature of DE on the CAI background and the desire to maintain the viability of brain nerve tissue in chronic hypoxia, the aim of this research was to study the effects of rhythmic craniocerebral hypothermia, cryopreserved cord blood cells and their combined



регти життєздатність нервової тканини ГМ в умовах хронічної гіпоксії, метою роботи було вивчення впливу ритмічної краніоцеребральної гіпотермії, кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові та їх поєднаного застосування на структурні зміни в тканинах головного мозку щурів лінії SHR зі змішаною формою дисциркуляторної енцефалопатії.

Матеріали та методи

Дослідження виконували на статевозрілих 12–13-місячних спонтанно гіпертензивних щурах-самцях лінії SHR. Експерименти були проведені відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (№ 3447 – IV від 21.02.2006 р.) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Щурів лінії SHR, яких використовують в якості моделі гіпертензивної ДЕ [1–3, 11], піддавали ХАІ протягом 9-ти місяців до початку проведення експерименту та протягом всього експерименту за методом В.І. Грищенка та співавт. [5]. Щурів лінії SHR з ХАІ використовували в якості моделі ДЕ змішаного генезу (гіпертензивна ДЕ, обтяжена ХАІ) [11].

Тварини були розділені на 4 групи ($n = 7$ у кожній): 1 – контроль ($SHR_{алк}$); 2 – щури $SHR_{алк}$ після проведення процедури рКЦГ ($SHR_{алк} + рКЦГ$); 3 – щури $SHR_{алк}$ після введення кЯСК КК ($SHR_{алк} + кКК$); 4 – щури $SHR_{алк}$ після поєднаного застосування двох методів впливу ($SHR_{алк} + рКЦГ + кКК$). Контрольних і дослідних тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на 30-ту добу після проведених впливів.

Ритмічну КЦГ проводили одноразово на апараті «Флюїдокраніотерм ПГВ-02 («Електромаш», Нижній Новгород, Росія) [2]. Кріоконсервовану суспензію ЯВК КК людини отримували в кріобанку ПКіК НАН України (м. Харків). Після розморожування кЯВК КК вводили одноразово внутрішньочеревно в дозі $(3–5) \times 10^7$ життєздатних клітин на кілограм маси тіла тварини [2]. З метою вивчення поєднаного застосування рКЦГ і кЯВК КК суспензію клітин вводили щурам на наступну добу після проведення рКЦГ.

Матеріалом для гістологічних досліджень був ГМ щурів із ділянки прецентральної звивини [2]. Застосовували 3 типи забарвлення: гематоксином Ганзена та еозином, пікрофуксином за методом Ван Гісона та толуїдиновим синім за

use on structural changes in brain tissue of SHR rats with a mixed form of dyscirculatory encephalopathy.

Materials and methods

The studies were performed in adult 12–13-month-old spontaneously hypertensive male SHR rats. The experiments were conducted in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty ((3447 – IV of 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Institute’s Bioethics Committee, consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986).

SHR rats used as a model of hypertensive DE [2–4, 7] were subjected to CAI for 9 months before the experiment start and throughout the experiment by the method V.I. Grishchenko *et al.* [8]. SHR rats with CAI were used as a model of DE of mixed genesis (CAI-burdened hypertensive DE) [7].

Animals were divided into 4 groups ($n = 7$ in each): 1 – control (SHR_{alk}); 2 – rats SHR_{alk} after the procedure rCCH ($SHR_{alk} + rCCH$); 3 – SHR_{alk} rats after introduction cCBNCs ($SHR_{alk} + cCB$); 4 – SHR_{alk} rats after combined use of two methods of exposure ($SHR_{alk} + rCCH + cCB$). Control and experimental animals were decapitated on day 30 after exposure.

Rhythmic CCH was performed once with Fluidocraniotherm PGV-02 device (Nizhny Novgorod Machine Building Plant, Russia) [3]. Cryopreserved suspension of human CBNCs was obtained at the cryobank of IPC&C of NAS of Ukraine (Kharkiv). After thawing, cCBNCs were administered once intraperitoneally at a dose of $(3–5) \times 10^7$ viable cells per kilogram of animal body weight [3]. To investigate the combined use of rCCH and cCBNCs the suspension of cells was administered to rats the day after rCCH.

The material for histological examination was rat’s BM from the precentral gyrus site [3]. Three types of staining were used: Hansen’s hematoxylin and eosin, van Gieson’s picrofuchsin, and Nissl’s toluidine blue. During morphometric analysis, the density of neurons, gliocytes and functioning (open) capillaries (FC) (in 1 mm^2) in the III – V layers of the brain cortex, as well as the neuroglial index (NGI) (number of glial cells per neuron) were determined. Morphometric and morphological studies were performed with an Olympus BX-41 microscope (Olympus Corporation, Japan).

Morphometric data were statistically processed using the Excel software (Microsoft, USA). The obtained digital data were presented as an arithmetic



Ніслем. Під час морфометричного аналізу визначали щільність нейронів, гліоцитів і функціонуючих (відкритих) капілярів (ФК) (в 1 мм²) в III–V шарах кори ГМ, а також нейрогліальний індекс (НГІ) (кількість гліальних клітин на один нейрон). Морфометричні та морфологічні дослідження виконували на мікроскопі «Olympus BX-41» («Olympus Corporation», Японія).

Статистичну обробку морфометричних даних проводили за допомогою пакета прикладних програм фірми «Excel» («Microsoft», США). Отримані цифрові дані представляли у вигляді середньої арифметичної величини (M) та помилки середньої арифметичної величини (m). На підставі U-критерію Манна-Уїтні між групами розраховували ймовірність відмінностей (*p*). Відмінності вважали значущими при *p* < 0,05.

Результати та обговорення

Як було показано нами раніше, спонтанно гіпертензивні щури лінії SHR можуть використовуватися в якості моделі гіпертензивної ДЕ, оскільки для їхнього ГМ характерно потовщення м'яких мозкових оболонок за рахунок набряку та надлишкового розвитку колагенових волокон, спазм артеріальних судин, зниження тонуусу стінок вен, наявність в III–V шарах кори ГМ вогнищ гангліозноклітинних розріджень і запустінь зі зниженням щільності нейронів, ішемічними інфарктами та крововиливами в підкіркових структурах [1–3].

У всіх досліджуваних структурних компонентах ГМ щурів контрольної групи 1 (SHR_{алк}) були достатньо виражені морфологічні ознаки розвитку дистрофічних і деструктивних процесів. Так, м'які мозкові оболонки ГМ щурів групи 1 були нерівномірно потовщені, набряклі, артеріальні судини м'яких мозкових оболонок мали ознаки парціального або тотального спазму з типовою акомодациєю ендотеліоцитів у вигляді частоколу, осередковою десквамацією та проліферацією ендотеліоцитів. Венозні судини оболонок вистелені сплющеним ендотелієм з помірно базофільним витягнутим ядром і слабо базофільною цитоплазмою, а їх просвіти розширені, переповнені кров'ю, місцями з вогнищевим еритродіapedезом і формуванням дрібних периваскулярних крововиливів (рис. 1).

Ламінарна організація кори ГМ тварин контрольної групи була порушена. В усіх її шарах знижувалася щільність нейронів, клітини розташовувалися нерівномірно та містили осередки гангліозноклітинних розряджень і запустінь. Окремі нейрони або їх групи мали вигляд «тіней». Вони були сферичної форми, гомогенного виду

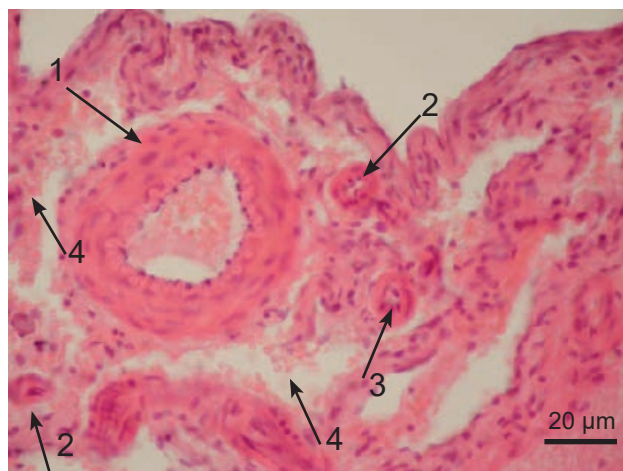


Рис. 1. М'які мозкові оболонки ГМ контрольних щурів групи 1. Гіперплазія і гіпертрофія гладком'язових клітин (1) в стінці артерії дрібного калібру; звуження просвітів артеріол (2) з розташуванням ендотелію у вигляді частоколу (3); вогнищеві периваскулярні крововиливи (4). Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Fig. 1. *Pia mater* of group 1 rats (SHRalc). Hyperplasia and hypertrophy of smooth muscle cells (1) in artery wall of small caliber; narrowing of lumens of arterioles (2) with location of endothelium in the form of a palisade (3); focal perivascular hemorrhages (4). Hematoxylin and eosin staining.

mean (M) and an arithmetic mean error (m). Based on the Mann-Whitney U-test, the probability of differences (*p*) between the groups was calculated. The differences were considered significant at *p* < 0.05.

Results and discussion

We have shown earlier, that spontaneously hypertensive SHR rats can be used as a model of hypertensive DE, because they are characterized by thickening of the brain *pia mater* due to edema and excessive development of collagen fibers, arterial vasospasm, decreased venous wall tone, the presence in the third – fifth layers in the brain cortex of the foci of ganglion cell rarefaction and desolation with a reduced neuronal density, ischemic heart attacks and hemorrhages in subcortical structures [2–4].

In rats of control group 1 (SHRalc) the morphological signs of development of dystrophic and destructive processes in all investigated structural components of brain were rather expressed. Thus, the brain *pia mater* of group 1 rats was unevenly thickened, swollen, and the soft vessels of *pia mater* showed signs of partial or total spasm with typical endothelial cell accommodation in the form of palisade, focal desquamation, and endothelial cell proliferation. Venous vessels of membranes are lined with a flattened endothelium with a moderately basophilic elongated nucleus and weakly ba-



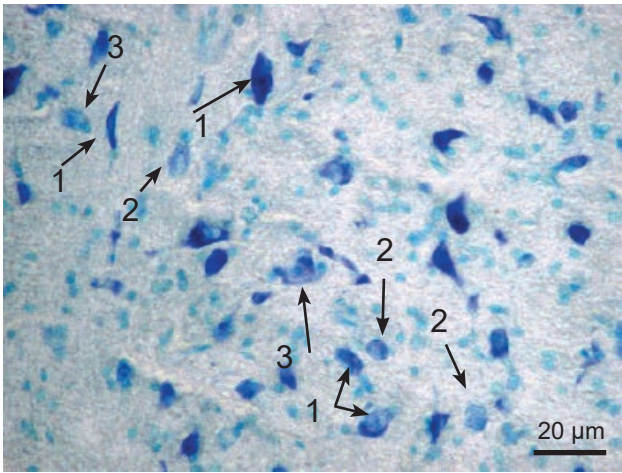


Рис. 2. Дегенеративні зміни нейронів (1), клітини-«тіні» (2), нейронофагія в корі ГМ (3) контрольних щурів групи 1 (SHR_{алк}). Забарвлення за Ніслем.

Fig. 2. Degenerative changes of neurons (1), 'shadow' cells (2), neuronophagy in brain cortex (3) group 1 rats (SHR_{alc}). Nissl staining.

з набряклого безконтурною цитоплазмою та зі зміщенням ядра на периферичну зону або каріолізисом (рис. 2). На місці фрагментів зруйнованих нейронів визначалися скупчення мікрогліоцитів (нейронофагія), візуалізувалися численні дрібні олігодендрогліоцити з темним круглим ядром і гіпертрофовані астроцити з великим ядром.

Численні дрібні артерії та артеріоли ГМ щурів групи 1 мали звужений просвіт, потовщену гомогенну еозинofilьну стінку (гіаліноз). Більшість капілярів знаходилася в спалому стані і характеризувалася слабо помітним просвітом. Окремі капіляри зі зниженим тонусом були дилатовані, з ознаками стази. У 80% спостережень відзначався фокальний або тотальний фібриноїдний некроз стінки судин, а в 30% – прорив крові в бічні шлуночки. Виявлялися як свіжі крововиливи, так і геморагії на різних стадіях репаративного процесу (рис. 3).

Щільність нейронів в III–V шарах кори ГМ щурів SHR_{алк} у середньому становила $(829,21 \pm 30,205)$ екз/мм², щільність клітин нейроглії в V шарі кори ГМ – $(1879,46 \pm 73,02)$ екз/мм², щільність ФК – $(113,95 \pm 8,79)$ екз/мм² (таблиця). Нейрогліальний індекс становив $(2,27 \pm 0,06)$, що на 53,4% вище за аналогічний показник для інтактної групи щурів цієї лінії $(1,48 \pm 0,04)$ [2].

Отримані експериментальні дані свідчать про потенціювання ХАІ прогресуючого старіння ГМ щурів із гіпертензивною формою ДЕ та обтяження її перебігу, розвиток ДЕ змішаного генезу.

Під час гістологічного дослідження препаратів ГМ спонтанно гіпертензивних щурів лінії SHR зі змішаною формою ДЕ через 30 днів після

sophylic cytoplasm, and their lumens are dilated, filled with blood, places with focal erythrodiapedesis and the formation of small perivascular hemorrhages (Fig. 1).

The laminar organization of the brain cortex of the control group animals was disturbed. In all its layers, the density of neurons decreased, the cells were unevenly distributed and contained foci of ganglion cell discharges and desolations. Individual neurons or groups of them had the form of 'shadows'. They were spherical in shape, homogeneous in appearance with swollen contourless cytoplasm and with displacement of the nucleus to the peripheral zone or karyolysis (Fig. 2). Clusters of microgliaocytes (neurophage) were detected at the site of fragments of destroyed neurons, and numerous small oligodendrogliaocytes with a dark round nucleus and hypertrophied astrocytes with a large nucleus were visualized.

Numerous small arteries and arterioles of GM rats of group 1 had a narrowed lumen, a thickened homogeneous eosinophilic wall (hyalinosis). Most capillaries were in a dormant state and were characterized by a faint lumen. Individual capillaries with reduced tone were dilated, with signs of stasis. In 80% of cases there was focal or total fibrinoid necrosis of the vascular wall, and in 30% there was a breakthrough of blood into lateral ventricles. Both fresh hemorrhages and the ones at different stages of reparative process were detected (Fig. 3).

The density of neurons in the third – fifth layers of the brain cortex of SHR_{alc} rats averaged (829.21 ± 30.205) cells / mm², the density of neuroglia cells in the fifth layer of the brain cortex was

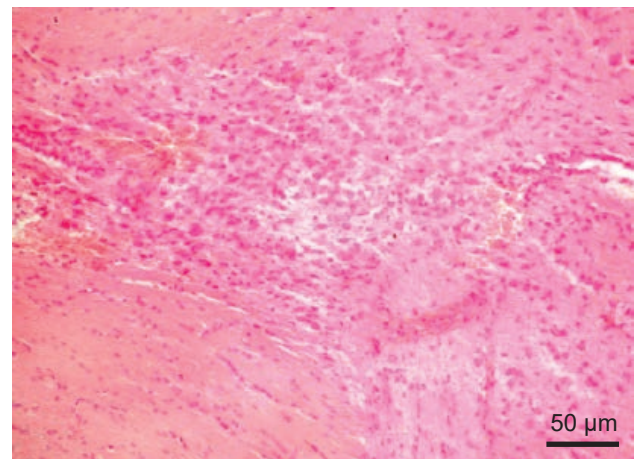


Рис. 3. Наслідки ішемізації тканини з розвитком ранніх репаративних процесів у зоні крововиливу паравентрикулярної ділянки ГМ контрольних щурів групи 1. Забарвлення гематоксилином і еозином.

Fig. 3. Consequences of tissue ischemia with developing early reparation in hemorrhage zone of paraventricular area of group 1 rats. Hematoxylin and eosin staining.

проведення рКЦГ (група 2) в усіх структурних компонентах ГМ відзначалося зниження вираженості морфологічних змін, що розвиваються в разі тривалої ішемії та інтоксикації мозку. У 50% спостережень візуалізувалися крововиливи на стадії організації або сформовані дрібні кісти, а в корі й підкіркових структурах виявлялися дрібновогнищеві ішемічні інфаркти на стадії організації (рис. 4).

У порівнянні з контролем ($SHR_{алк}$) у групі 2 ($SHR_{алк} + рКЦГ$) відзначалося зменшення НГІ (на 38,33%) за рахунок збільшення щільності нейронів (на 41,72%) і зниження щільності гліальних клітин у корі ГМ (на 12,64%). Збільшувалася кількість ФК (на 63,85%), що свідчило про зменшення ступеня ішемії мозку (таблиця).

Після застосування кЯВК КК (група 3) у якості самостійного методу терапії значуще збільшувалася кількість ФК із добре вираженим просвітом (на 68,67%) на тлі зниження НГІ (на 44,49%) та збільшення щільності нейроклітин (на 45,03%) порівняно з групою 1 (таблиця). У 50% спостережень у корі та підкіркових утвореннях ГМ щурів групи 3 відзначалися осередки ішемічних інфарктів на стадії організації, а також одно- або багатокамерні дрібні кісти. У білій речовині та підкіркових ядрах виявлялися невеликі гематоми на стадії організації, які приводили до формування одиночних або множинних лакун (рис. 5). Свіжих крововиливів та інфарктів на стадії некрозу в речовині ГМ тварин групи 3 не виявлено.

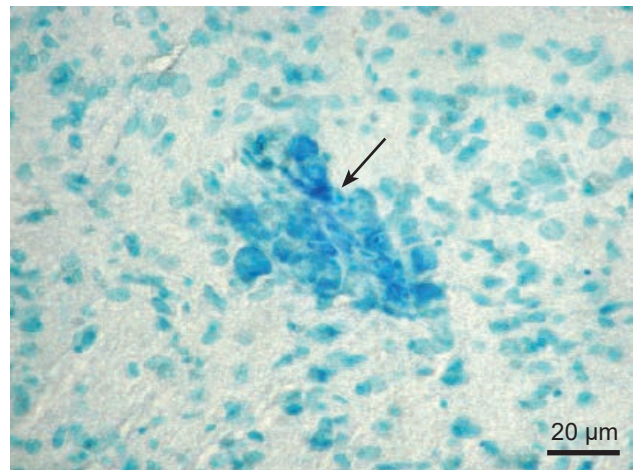


Рис. 4. Дрібновогнищевий ішемічний інфаркт кори ГМ щурів групи 2 ($SHR_{алк} + рКЦГ$) на стадії організації (стрілка). Забарвлення за Ніслем.

Fig. 4. Small focal ischemic infarction of brain cortex of group 2 rats ($SHR_{alc} + rCCH$) at stage of organization (arrow). Nissl staining.

($1,879.46 \pm 73.02$) cells / mm^2 , the density of FC made (113.95 ± 8.79) cells / mm^2 (Table). The neuroglial index was (2.27 ± 0.06), that is 53.4% higher than the same value for the intact group of rats of this line (1.48 ± 0.04) [3].

The obtained experimental data indicate the CAI potentiation as for progressive aging of brain of rats with hypertensive DE with burdening of its course and the development of DE of mixed genesis.

During histological examination of brain samples of spontaneously hypertensive SHR rats with

Морфометричні показники компенсаторних процесів в III–V шарах кори ГМ щурів зі змішаною формою ДЕ на 30-ту добу після проведення рКЦГ, введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування

Morphometric parameters of compensatory processes in the third-fifth layers of the brain cortex of rats with mixed DE on day 30 after rCCH, introduction of cCBNCs and their combined use

Група Group	Нейрогліальний індекс Neuroglial index	Щільність, екз/мм ² Density, cells/ mm^2		
		нейронів of neurons	гліоцитів of gliocytes	функціонуючих (відкриті) капілярів of functioning (open) capillaries
1	$2,27 \pm 0,06$	$829,21 \pm 30,20$	$1879,46 \pm 73,02$	$113,9 \pm 8,8$
2	$1,40 \pm 0,021$	$1175,18 \pm 40,821$	$1641,96 \pm 48,811$	$186,7 \pm 9,11$
3	$1,26 \pm 0,041$	$1202,64 \pm 34,971$	$1521,14 \pm 65,301$	$192,2 \pm 9,21$
4	$1,19 \pm 0,031,2,3$	$1250,69 \pm 33,281,2$	$1489,57 \pm 9,821,2$	$200,4 \pm 9,61,2$

Примітки: ¹ – відмінності значущі порівняно з групою 1; ² – відмінності значущі між групами 2 та 4; ³ – відмінності значущі між групами 3 та 4; $p < 0,05$.

Notes: ¹ – differences are significant from group 1; ² – differences are significant between groups 2 and 4; ³ – differences are significant between groups 3 and 4; $p < 0.05$.



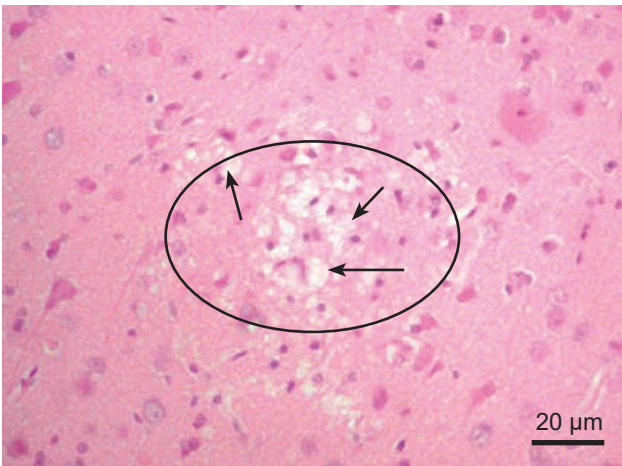


Рис. 5. Дрібні багатокімберні кісти в гангліонарному шарі кори ГМ (стрілки) щурів групи 3 ($SHR_{alk} + cCB$). Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Fig. 5. Small multichamber cysts in ganglion layer of brain cortex (arrows) of group 3 rats ($SHR_{alk} + cCB$). Hematoxylin and eosin staining.

Таким чином, самостійне застосування рКЦГ і кЯВК КК щурам лінії SHR зі змішаною формою ДЕ супроводжувалося нейропротекцією, стимуляцією ангиогенезу, знижувало ознаки дистрофічних, деструктивних і патологічно змінених компенсаторно-адаптивних процесів у ГМ за рахунок відновлення його мікрогемодинаміки та цитоархітекτονіки.

З огляду на досвід поєднаного використання методу рКЦГ і введення кЯВК КК із метою їх взаємопотенціювання та підвищення терапевтичного ефекту на прикладі щурів лінії SHR з гіпертензивною формою ДЕ [2] морфологічні та морфометричні показники ГМ щурів групи 4 викликали у нас підвищений інтерес.

Гістологічне дослідження препаратів ГМ щурів групи 4 показало, що м'які мозкові оболонки були дещо набряклі та представлені тонкими або трохи потовщеними пучками фуксинофільних колагенових волокон на відміну від групи контролю, в ГМ щурів якої фіброз строми мозкових оболонок мав більш виражений дифузний характер. Серед клітинних елементів візуалізувалися в помірній кількості фібробласти, фіброцити, лімфоцити та нечисленні гістіоцити. Провітри артеріальних судин були добре виражені, однак дещо звужені в ділянках спазму, який виявлявся значно рідше, ніж у контролі. Артерії та артеріоли ГМ тварин групи 4 були помірно повнокровні, вистелені рівномірно розташованими сплюсненими ендотеліальними клітинами, за винятком ділянок спазму, де ендотеліоцити були розташовані у вигляді частоколу. Стінка судин була помірно потовщена в результаті гіпертро-

mixed DE 30 days after rCCH (group 2) in all structural components of brain there was a decrease in the severity of morphological changes that develop in case of prolonged ischemia and brain intoxication. In 50% of cases, hemorrhages were visualized in the organization stage or small cysts were formed, and in the cortex and subcortical structures, small-focal ischemic strokes were detected at the organization stage (Fig. 4).

In comparison with the control (SHR_{alc}) in group 2 ($SHR_{alc} + rCCH$) there was a decrease in NGI (by 38.33%) due to an increase in the density of neurons (by 41.72%) and a decrease in the density of glial cells in brain cortex (12.64%). The number of FC increased (by 63.85%), which indicated a decrease in the degree of cerebral ischemia (Table).

After the use of cCBNCs (group 3) as an independent method of therapy, the number of FC with a well-defined lumen (by 68.67%) significantly increased on the background of a decrease in NGI (by 44.49%) and an increase in neurocellular density (by 45.03%) compared with group 1 (Table). In 50% of observations in the cortex and subcortical formations of brain of group 3 rats there were foci of ischemic heart attacks at the stage of organization, as well as single- or multi-chamber small cysts. Small hematomas were found in the white matter and subcortical nuclei at the stage of organization, which led to the formation of single or multiple gaps (Fig. 5). Fresh hemorrhages and heart attacks at the stage of necrosis in the substance of brain of group 3 animals were not detected.

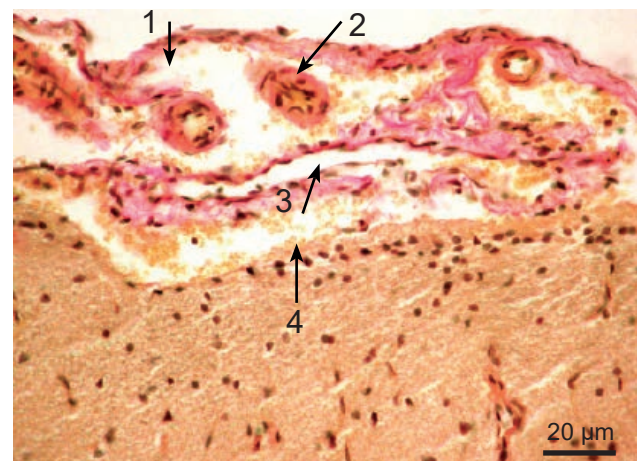


Рис. 6. Набряк м'яких мозкових оболонок (1), помірний склероз стінки та парціальний спазм дрібних артерій (2), повнокров'я вени (3), вогнищеві периваскулярні крововиливи (4) у щурів групи 4 ($SHR_{alk} + rCCH + cCB$). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гісона.

Fig. 6. Swelling of *pia mater* (1), moderate sclerosis of wall and partial spasm of small arteries (2), plethora of veins (3), focal perivascular hemorrhage (4) in rats of group 4 ($SHR_{alc} + rCCH + cCB$). Staining with picrofuchsin by Van Gieson.

фії гладком'язових клітин і накопичення колагенових волокон у середньому шарі артерій (рис. 6).

На відміну від препаратів ГМ тварин групи 1 в досліджуваних зразках групи 4 були відсутні ознаки гіперплазії гладком'язових клітин, міжм'язовий склероз був менш виражений. Вени помірно повнокровні, просвіти їх дещо розширені, периваскулярно візуалізувалися осередкові екстравазати, які в порівнянні з контролем зустрічалися рідше і мали дрібновогнищевий характер (рис. 6).

Просвіти внутрішньомозкових артеріальних судин у тварин групи 4 були помірно звужені (внаслідок потовщення стінки) і виконані форменими елементами крові. На відміну від контролю артерії щурів цієї групи характеризувалися помірно вираженим міжм'язовим склерозом, помірною гіпертрофією гладком'язових клітин без ознак їх гіперплазії. Велика частина дрібних артерій і артеріол мала ознаки гіалінозу, зрідка визначалися артерії та артеріоли з явищами парціального спазму і плазматичного просочування стінки. Вени мали нерівномірно знижений тонус стінки. Просвіти численних капілярів добре візуалізувалися, подекуди виявлялися дилатовані капіляри з ознаками стазу, а також спалі капіляри зі слабо помітними просвітами.

У речовині ГМ та підкіркових утвореннях ознаки гострих деструктивних вогнищевих змін не зустрічалися. Разом з тим у групі 4 в 30% спостережень мали місце дрібновогнищеві крововиливи та ішемічні інфаркти на стадії організації, а також дрібні кісти. Нейрони з дегенеративними змінами виявлялися рідше, ніж в інших групах.

Щільність нейронів в III–V шарах кори ГМ в середньому становила $(1250,69 \pm 33,28)$ екз/мм² (таблиця), що значуще перевищувало аналогічний показник групи 1 (на 50,83%). Показники щільності клітин нейроглії та НГІ знижувалися в порівнянні з контрольною групою тварин на 20,75% ($p \geq 0,05$) та на 47,58% ($p < 0,05$) відповідно. Щільність ФК в середньому становила $(200,44 \pm 9,60)$ екз/мм² (таблиця), що значуще (на 75,90%) перевищувало відповідний контрольний показник.

Таким чином, через місяць після поєданого застосування рКЦГ і кЯВК КК у щурів лінії SHR зі змішаною формою ДЕ (обтяженої ХАІ) у всіх досліджуваних структурних компонентах ГМ дистрофічні і компенсаторно-адаптивні зміни, що виявлялися, були виражені помірно. На відміну від контрольних тварин визначалися значуще зниження щільності гліоцитів і НГІ, збільшення щільності нейронів і кількості ФК. Гострі гемо-

Thus, a single use of rCCH and cCBNCs in SHR rats with mixed DE was accompanied by neuroprotection, stimulation of angiogenesis, reduced signs of dystrophic, destructive and pathologically altered compensatory-adaptive processes in brain due to restoration of its microcytotoxicity.

Assuming the experience of the combined use of rCCH methods and introduction of cCBNCs to mutually potentiate and increase a therapeutic effect on the example of SHR rats with hypertensive DE [3], morphological and morphometric parameters of brain in rats of group 4 aroused our interest.

Histological examination of brain specimens of group 4 rats showed that the *pia mater* of their brain were slightly swollen and represented by thin or slightly thickened bundles of fuchsinophilic collagen fibers in contrast to the control group, in which fibrosis of the stroma of the meninges was more diffuse. Among the cell elements, fibroblasts, fibrocytes, lymphocytes, and a few histiocytes were visualized in moderation. The lumens of the arteries were well defined, but somewhat narrowed in the areas of spasm, which was much less common than in the control. Brain arteries and arterioles of group 4 animals were moderately plethoric, lined with evenly spaced flattened endothelial cells, except for areas of spasm, where endotheliocytes were located in the form of a palisade. The vascular wall was moderately thickened because of hypertrophy of smooth muscle cells and accumulation of collagen fibers in the middle layer of arteries (Fig. 6).

Unlike brain specimens of group 1 animals in the studied samples of group 4 there were no signs of hyperplasia of smooth muscle cells, intermuscular sclerosis was less pronounced. The veins are moderately plethoric, their lumens are slightly dilated, focal extravasates were visualized perivascularly, which were less common in comparison with the control and had a small focal character (Fig. 6).

The lumens of intracerebral arterial vessels in group 4 animals were moderately narrowed (due to wall thickening) and made of shaped blood elements. In contrast to artery control, rats in this group were characterized by moderate intermuscular sclerosis, moderate hypertrophy of smooth muscle cells without signs of hyperplasia. Most of the small arteries and arterioles had signs of hyalinosis, occasionally identified arteries and arterioles with symptoms of partial spasm and plasma wall infiltration. The veins had an unevenly reduced wall tone. The lumens of numerous capillaries were well visualized, in some places there were split capillaries with signs of stasis, as well as burned capillaries with faint lumens.

No signs of acute destructive focal changes were found in the substance of brain and subcortical



рагії та ішемічні інфаркти були відсутні. Виявлені компенсаторно-адаптивні зміни структур ГМ свідчать про ефективність поєданого застосування рКЦГ і кЯВК КК з метою як терапії ішемічно-токсичних станів, так і для корекції їх ускладнень.

Висновки

1. Хронічна алкогольна інтоксикація щурів лінії SHR потенціює прогресуюче старіння ГМ із гіпертензивною формою ДЕ, обтяжуючи її перебіг, і призводить до розвитку ДЕ змішаного генезу.

2. Встановлено, що проведення рКЦГ щурам зі змішаною формою дисциркуляторної енцефалопатії збільшує кількість ФК (на 63,85%) і знижує НГІ (на 38,3%) і практично повністю усуває токсичний вплив алкоголю на морфометричні показники ГМ.

3. Введення кЯВК КК щурам лінії SHR зі змішаною формою ДЕ сприяло значущому збільшенню (на 68,67%) кількості ФК із добре вираженими проsvітами на тлі зниження НГІ (на 44,49%), що вказує на зменшення ознак дистрофічних, деструктивних і патологічно змінених компенсаторно-адаптивних процесів у ГМ.

4. Поєдане застосування рКЦГ і кЯВК КК щурам зі змішаною формою ДЕ мало більш виражений позитивний вплив на морфологічну структуру тканин і судин ГМ, ніж їх самостійне використання. Спостерігалися подальше зниження НГІ, стимуляція ангиогенезу. Ознаки гіперплазії гладком'язових клітин, гострих геморагій та ішемічних інфарктів, спазму стінок артеріальних судин і повнокров'я в венах були відсутні, що сприяло відновленню мікрогемодинаміки та цитоархітектоники ГМ.

5. Виявлені особливості морфологічного стану тканин і судин ГМ у щурів лінії SHR на тлі поєданого застосування рКЦГ і кЯВК КК свідчать про доцільність використання цього методу для корекції цереброваскулярних порушень за різних форм ДЕ.

Література

1. Айдарова ВС, Бабийчук ВГ, Кудокоцева 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.

formations. However, in group 4 in 30% of cases there were small hemorrhages and ischemic heart attacks at the stage of organization, as well as small cysts. Neurons with degenerative changes were observed less frequently than in other groups.

The density of neurons in the third–fifth layers of the brain cortex averaged $(1,250.69 \pm 33.28)$ cells/mm² (Table), which significantly exceeded the same index of group 1 (by 50.83%). Indices of neuroglia and NGI cell density decreased in comparison with the control group of animals by 20.75% ($p \geq 0.05$) and 47.58% ($p < 0.05$), respectively. The density of FC averaged (200.44 ± 9.60) cells/mm² (Table), which significantly (by 75.90%) exceeded the corresponding control value.

Thus, one month after the combined use of rCCH and cCBNCs in SHR rats with a mixed DE (CAI-burdened) in all studied structural components of dystrophic and compensatory-adaptive changes that were detected were moderate. In contrast to control animals, a significant decrease in the density of gliocytes and NGI, an increase in the density of neurons and the number of FC were determined. Acute hemorrhages and ischemic heart attacks were absent. The revealed compensatory-adaptive changes of brain structures testify to the effectiveness of the combined use of rCCH and cCBNCs for the purpose of both to treat the ischemic-toxic conditions and to correct their complications.

Conclusions

1. Chronic alcohol intoxication of SHR rats potentiates the progressive aging of brain of the rats with a hypertensive DE, complicating its course, and leads to the development of DE of mixed genesis.

2. It was found that rCCH in rats with a mixed dyscirculatory encephalopathy increased the FC amount (by 63.85%) and reduced NGI (by 38.3%) and almost completely eliminated the toxic effects of alcohol on the morphometric parameters of brain.

3. The introduction of cCBNCs to SHR rats with a mixed DE contributed to a significant increase (68.67%) in the number of FC with well-defined lumens on the background of a decrease in NGI (44.49%), indicating a decrease in signs of dystrophic, destructive and pathological altered compensatory-adaptive processes in brain.

4. The combined use of rCCH and cCBNCs in rats with a mixed DE had a more pronounced positive effect on the morphological structure of the brain tissues and vessels than their independent use. There was a further decrease in NGI, stimulation of angiogenesis. There were no signs of smooth muscle cell hyperplasia, acute hemorrhage and ischemic infarction, spasm of arterial vessel walls and plethora



2. Айдарова ВС, Бабийчук ВГ, Кудокоцева ОВ, и др. Экспериментальное обоснование применения лечебной гипотермии и клеточной терапии при дисциркуляторной энцефалопатии у крыс линии SHR. Часть 2. Структурные изменения в ткани головного мозга. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(1): 58–72.
3. Айдарова ВС, Наумова ОВ, Кудокоцева ОВ, и др. Структура мозга крыс линии SHR с генетически детерминированной артериальной гипертензией. Світ медицини та біології. 2018; 64(2): 115–9.
4. Бабийчук ГА, Марченко ВС, Ломакин ИИ, Белостоцкий АВ. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. Киев: Наукова думка; 1992. 208 с.
5. Грищенко ВИ, Ковалев ГА, Петренко АЮ, и др. Регенеративно-пластическая терапия алкогольных висцеропатий. Киев: Наукова думка, 2010; 152 с.
6. Гусев ЕИ, Коновалов АН, Скворцова ВИ. Неврология. Национальное руководство. Москва: Всероссийское общество неврологов; 2015. 1064 с.
7. Ломакин ИИ. Обоснование методов лечебного охлаждения в терапии хронического алкоголизма. Проблемы кріобіології. 2008; 18(3): 383–5.
8. Мищенко ТС. Эпидемиология цереброваскулярных заболеваний и организация помощи больным с мозговым инсультом в Украине. Український вісник неврології. 2017; 25(90): 22–4.
9. Achyut BR, Varma NRS, Arbab AS. Application of umbilical cord blood derived stem cells in diseases of the nervous system. J Stem Cell Res Ther. [Internet]. 2014 May 7 [cited 20.02.2018]; 4: 1000202. Available from: <https://www.longdom.org/open-access/application-umbilical-cord-blood-derived-stem-cells-diseases-nervous-system-2157-7633.1000202.pdf>.
10. Coca A. Hypertension and Brain Damage. New York: Springer; 2016. 329 p.
11. De Deyn PP, Dam DV, editors. Animal models of dementia. New York: Humana Press; 2011. 732 p.
12. Hachinski V. World stroke day proclamation. Stroke. 2008; 39(10): 2409–20.
13. Jaing TH. Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. Cell Transplant. 2014; 23(4–5): 493–6.

in the veins, which contributed to the restoration of microhemocirculation and cytoarchitectonics of brain.

5. The identified features of morphological state of the brain tissues and vessels in SHR rats on the background of the combined use of rCCH and cCBNCs indicate the feasibility of using this method to correct the cerebrovascular disorders in different forms of DE.

References

1. Achyut BR, Varma NRS, Arbab AS. Application of umbilical cord blood derived stem cells in diseases of the nervous system. J Stem Cell Res Ther. [Internet]. 2014 May 7 [cited 20.02.2018]; 4: 1000202. Available from: <https://www.longdom.org/open-access/application-umbilical-cord-blood-derived-stem-cells-diseases-nervous-system-2157-7633.1000202.pdf>.
2. 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.
3. Aidarova VS, Babiichuk VG, Kudokotseva OV, et al. Experimental substantiation of therapeutic hypothermia and cell therapy application at dyscirculatory encephalopathy in SHR rats. Part 2. Structural changes in brain tissue. Probl Cryobiol Cryomed 2019; 29(1): 58–72.
4. Aidarova VS, Naumova OV, Kudokotseva OV, et al. [Brain structure of SHR rats with genetically determined arterial hypertension]. World of Medicine and Biology. 2018; 64(2): 115–9. Russian.
5. Babiichuk GA, Marchenko VS, Lomakin II, Belostotskiy AV. [Neurophysiological processes of cooled brain]. Kyiv: Naukova dumka; 1992. Russian.
6. Coca A. Hypertension and Brain Damage. New York: Springer; 2016. 329 p.
7. De Deyn PP, Dam DV, editors. Animal models of dementia. New York: Humana Press; 2011. 732 p.
8. Grishchenko VI, Koval'ov GA, Petrenko AYU, et al. [Regenerative-Plastic Therapy of Alcoholic Visceropathies]. Kyiv: Naukova Dumka, 2010. Russian.
9. Gusev E, Konovalov A, Skvortsova V. [Neurology. National guidance]. Moscow: All-Russian Society of Neurologists; 2015. Russian.
10. Hachinski V. World stroke day proclamation. Stroke. 2008; 39(10): 2409–20.
11. Jaing TH. Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. Cell Transplant. 2014; 23(4–5): 493–6.
12. Lomakin II. Substantiation of medical cooling methods in therapy of chronic alcoholism. Problems of Cryobiology 2008; 18(3): 383–5.
13. Mishchenko TS. [Epidemiology of cerebrovascular diseases and organization of care for stroke patients in Ukraine]. Ukrainian Newsletter of Neurology. 2017; 25(90): 22–4. Russian.

