

АНОТАЦІЯ

Кураєва А.В. **Морфофункціональні зміни кори великих півкуль мозку при геморагічному інсульті та модуляції відновлювальних процесів (експериментальне дослідження).** - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 “Охорона здоров’я” за спеціальністю 222 «Медицина». – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2024.

Внутрішньомозковий крововилив (ВК) є найбільш катастрофічним типом інсульту, з високим ризиком смертності, інвалідизації та тривалим функціональним відновленням. Незважаючи на значні успіхи у вивченні патогенезу захворювання, розробці лікарських засобів та попередження ускладнень та повторного інсульту, досі невирішеними є питання функціонального відновлення. Ендогенний потенціал до відновлення після інсульту є дуже слабким, проте відомі багатоочікувані результати щодо ролі мезенхімальних стовбурових клітин у відновленні деяких функцій мозку. Покращення функції може бути досягнуто шляхом місцевого трофічного впливу стовбурових клітин або через органоспецифічне диференціювання стовбурових клітин у пошкоджених ділянках мозку. Модуляція цих впливів потенційно є перспективним напрямком у відновлювальній неврології.

У дисертаційному дослідженні розглядалася гіпотеза щодо можливості шляхом модуляції ендогенного пулу мезенхімальних стовбурових клітин сприяти відновлювально-компенсаторним процесам у головному мозку після ВК. Стовбурові клітини являють собою гетерогенну популяцію, представники якої експресують різні білкові маркери, а їх імунофенотип змінюється по мірі диференціювання. Розглядалися дві конкуруючі гіпотези, які не суперечать одна одній. Перша - про те, що клітини, які експресують CD44, CD68, CD90 та CD146, є клітинами прозапального фенотипу і залучені

до запального процесу. Друга - серед них є мезенхімальні стовбурові клітини, які можуть органоспецифічно диференціюватися у пошкодженому мозку та/або продукувати біологічно активні речовини.

Збільшення кількості стовбурових клітин та цільової міграції у перифокальну тканину мозку можливе через застосування гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту, а зміна напрямку їх диференціації – у поєднанні з високими дозами дексаметазону.

Мета дослідження – вивчити зміни у корі великих півкуль головного мозку щурів при внутрішньомозковому крововиливі та модуляції компенсаторно-відновлювальних процесів через застосування гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону.

Завдання:

1. Дослідити структурні зміни навколо ділянки ВК та у СМК (сенсомоторній корі) у динаміці 1, 3, 10, 30 і 60 діб після пошкодження, дії гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону.
2. Оцінити неврологічний дефіцит, що виникає після ВК, дії гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону за допомогою функціональних проб.
3. Дослідити особливості реактивних змін астроцитів у перифокальній ділянці кори мозку після ВК та за умов дії гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону.
4. Імуногістохімічно виявити клітини, які експресують CD44, CD68, CD90, CD146, динаміку їх появи у ділянці ВК та у СМК, а також після введення гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону, їх комбінації.
5. Оцінити стан нейронів кори мозку за рівнем експресії CD73 після ВК, введення гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону, їх комбінації.

6. Вивчити кореляційні зв'язки між кількісними характеристиками ВК і активністю міграції клітини, які експресують CD44, CD68, CD90, CD146.

В експериментальному дослідженні використано модель ВК, яка полягала у введенні аутогенної крові щурів у праву гемісферу головного мозку. Дослідним тваринами вводили гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор росту, дексаметазон або їх комбінацію на 1, 2 та 3-й день спостереження. Через 1, 3, 10, 30 і 60 діб після моделювання ВК досліджували функціональні показники щурів за тестами «інвертований тест» та «вихід на платформу», морфологічно та імуногістохімічно досліджували ділянку ВК та перифокальну СМК. Проведено оцінку зміни морфології астроцитів, імуногістохімічне виявлення CD73 як потенційного показника морфофункціонального стану нейронів та оцінку накопичення та динаміку кількості CD44+, CD68+, CD90+, CD146+ клітин в області ураження мозку.

За результатами гістологічних досліджень ділянки ВК показано, що у терміни до 10-ї доби включно відбувалася елімінація гематоми, а через 30 та 60 діб на її місці відбувалося формування псевдокисти з осередками гліомезодермальних тканинних комплексів. Морфологічними ознаками нейродистрофічних процесів у перифокальній СМК виявилися: загибель нейронів, порушення цитоархітекtonіки кори та реактивні зміни астроцитів. Встановлено зміни вмісту CD73 у нейронах перифокальної СМК: гіперекспресія у дегенеруючих нейронах та майже повна відсутність у клітинах з ознаками гідропічної дистрофії. Встановлено залежність механізму загибелі нейронів у СМК від відстані до гематоми та терміну спостереження. Показано, що гідропічна дистрофія нейронів домінувала тільки у перші 3 доби у перифокальній СМК, а на відстані 1000-1500 мкм від гематоми переважали гіперхромні клітини і клітини-тіні, особливо у віддалений період. Показано, що рівень експресії CD73 є показником морфофункціональних змін нейронів і може бути використаний в оцінці

динаміки та ступеня ураження кори мозку. При цьому об'єм гематоми мав позитивну слабку кореляцію з показниками функціональних проб через 1, 3 і 10 діб після ВК, а наступне часткове відновлення загальносоматичного стану тварин не залежало від об'єму ділянки некрозу у мозку.

Реакція реактивних астроцитів у перифокальній СМК на пошкодження мозку проявлялася гіпертрофією та арборизацією відростків і залежала від відстані до гематоми. Гіпертрофія астроцитів розвивалася у терміни 3-30 діб після ВК і виявляла тенденцію до регресу. Доведено стимулюючий вплив дексаметазону на розвиток астрогліозу навколо гематоми та у глибоких шарах кори мозку і ішемічному ядрі через 3, 10 та 30 діб. Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор росту і його комбінації з дексаметазоном викликали тільки помірну гіпертрофію астроцитів. У віддалений період (через 30 і 60 діб) встановлено зменшення реактивних змін астроцитів, що є морфологічним проявом стабілізації процесу у пошкодженому мозку навколо гематоми.

На тлі ВК у головному мозку встановлено появу нерезидентних клітин, які експресували CD44, CD68, CD90 та CD146. Поява деяких досліджуваних імунофенотипів клітин залежала від терміну після ВК. CD44+ клітини відрізнялися від CD68+, CD90+ та CD146+ клітин за морфологією, локалізацією інфільтрації та часом виявлення у мозку. Активність міграції CD44+ клітин залежала від об'єму ВК. Вони виявлялися у перифокальній СМК та у гематомі у всі терміни дослідження з максимальною активністю через 3, 10 і 30 діб, і наступною тенденцією до зменшення. Появу CD68+, CD90+ та CD146+ клітин частіше реєстрували через 10 та 30 діб після ВК. Їх міграція була асоційована з вогнищевими клітинними запальними інфільтратами і не залежала від об'єму ураження мозку. Встановлено помірну залежність між появою у області ушкодження CD44+ та CD146+ клітин через 3 доби та сильну кореляцію між вмістом CD44+ та CD90+ клітин через 60 діб.

Аналіз морфологічних змін гематоми та активності накопичення нерезидентних клітин дозволив встановити деякі потенційні ролі клітин з досліджуваним імунофенотипів у відновних процесах на тлі ВК. Показано, що CD44+ і CD68+ клітини залучені до елімінації гематоми. Кількість CD146+ клітин не залежала від інфільтрації CD68+ і CD90+ клітинами і була пов'язана з новоутворенням кровоносних судин, тоді як поява CD90+ клітин була найменш чисельною, і їх роль потребує подальшого вивчення.

Виявлена відмінність фармакологічних ефектів гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту та дексаметазону щодо накопичення у перифокальній тканині мозку клітин, які експресували CD44, CD68, CD90 та CD146. Дія дексаметазону полягала у посиленні міграції CD44+ клітин і їх тривалішому накопиченню до 30-ї доби після ВК, модуляції накопичення CD68+ та CD146+ клітин і потенційній тенденції до стимуляції інфільтрації CD90+ клітин у віддалений термін. Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор росту сприяв більш ранній міграції CD68+ і CD146+ клітин, але менш інтенсивній порівняно з дексаметазоном. На тлі комбінованого застосування гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту з дексаметазоном міграція CD68+ і CD146+ клітин була менш інтенсивною та у вузькому діапазоні спостереження (10-а і 30-а доба), а активність накопичення CD44+ клітин у пошкодженому мозку не відрізнялась від ізольованого введення досліджуваних засобів.

Таким чином, вперше вивчена специфіка міграції нерезидентних стовбурових мезенхімальних клітини, які експресували CD44, CD68, CD90 та CD146, у ділянку пошкодження мозку після ВК. Проведено аналіз змін активності міграції клітин із зазначеним імунофенотипом за умов модуляції ГКСФ, дексаметазоном та їх сумісної дії. Досліджено динаміку реактивних змін астроцитів у перифокальній СМК і показано посилення астрогліозу на тлі застосування дексаметазону. Виявлено потенційний зв'язок між появою CD68+, CD90+ і CD146+ клітин, клітинно-запальними інфільтраціями та реактивними змінами астроцитів, що може бути кореговано комбінованим

застосуванням гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту з дексаметазоном. Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор росту призводив до зменшення явищ астрогліозу у перигематомній ділянці мозку, у тому числі й за умов активації астрогліозу дексаметазоном.

Ключові слова: мозок, кора мозку, ушкодження мозку, судинна патологія мозку, інсульт, експериментальна модель, нейродегенерація, регенерація, стовбурові клітини, мезенхімальні клітини, гліальні клітини, астроцити, кортикостероїди, ростовий фактор.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Dovgan, I.M.; Savosko, S.I.; Savosko, A.O.; Melnyk, N.O.; Kuraieva, A.; Sokolowska, I.V.; Bulgakova, N.V.; Chaikovsky, Yu.B.; Maznychenko, A.V. Experimental unilateral intracerebral hemorrhage induces delayed bilateral neurodegeneration of sciatic nerve fibres in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. **2022**, 82(4), 477-488. doi: 10.55782/ane-2022-046.
2. Savosko, S.I.; Kuraieva, A.V.; Chaikovsky, Yu.B.; Grabovoy, A.N.; Makarenko, O.M. Dexamethasone-induced modifications of the intracerebral hemorrhage-related reactions of astrocytes in rats. *Neurophysiology*. **2022**, 3, 99-105.
3. Kuraieva, A.V.; Savosko, S.I.; Grabovyi, A.N.; Makarenko, O.M. Astrocyte response to intracerebral hemorrhage in various brain regions and pharmacological correction. *World of medicine and biology*. **2023**, №4(86), 206-211. doi: 10.26724/2079-8334-2023-4-86-206-211.
4. Кураєва, А.В.; Савосько, С.І.; Грабовий, О.М.; Макаренко, О.М. Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор стимулює міграцію нерезидентних клітин до внутрішньомозкового крововиливу. *Запорізький медичний журнал*. **2023**, 25,6(141), 528-534. doi: 10.14739/2310-1210.2023.6.287456.
5. Кураєва, А.В.; Савосько, С.І. Дексаметазон та гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор впливають на морфологію перигематомної

ділянки у мозку щурів з локальним геморагічним інсультом. *Морфологія*. **2023**, 17(3), 68-75. doi: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.68-75>.

6. Демидчук, А.С.; Шамало, С.М.; Гончарук, О.О.; Кураєва, А.В.; Макаренко, О.М. Гліоцити головного мозку: цитологічні і функціональні особливості. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. **2023**, 23,3(83), 237-245. doi: <https://doi.org/10.31718/2077-1096.23.3.237>.

Публікації по апробації результатів дисертації:

1. Savosko, S.; Dovgan, I.; Maznychenko, A.; Sololowska, I.; Kuraieva, A.; Bibikova, V.; Makarenko, O.; Chaikovsky, Yu. Effect of unilateral intracerebral hemorrhage in the capsula interna on the degree of neurodegeneration and locomotor activity of rats. In Book of Abstracts, *Neuronus IBRO Neuroscience Forum*, Krakow, Poland, december 8-11, 2020; p. 111. https://neuronusforum.pl/uploads/archiwum%20edycji/NEURONUS_2020_Book_of_Abstracts.pdf

2. Кураєва; А.В.; Савосько; С.І.; Чайковський; Ю.Б. Функціональні і структурні показники неврологічним розладів при локальному геморагічному інсульті та застосуванні дексаметазону (на моделі інтрацеребральної гематоми в експерименті). У збірнику конференції, *Науково-практична конференція з міжнародною участю присвячена 140-річчю з дня народження академіка О.О. Богомольця*, Київ, Україна, 24 травня 2021 року; с. 54. DOI: <https://doi.org/10.32345/conf.2021/NMU/Kyiv>

3. Kuraieva; A.; Savosko; S.I. Spinal cord neuronal cell reactions after intracerebral hemorrhage in rats. In Book of Abstracts, *52nd International Congress of Czech Anatomical Society*, Prague, Czech Republic, 9-11 September, 2021; p. 75. https://morphology.lf1.cuni.cz/images/programme+abstracts_morpho2021.pdf

4. Kuraieva; A.; Savosko; S.; Chaikovsky; Y.; Bashyrova; O.; Makarenko; O. Dexamethasone prolongs the duration of astrogliosis in the rat brain following intracerebral hemorrhage. In Book of Abstracts, *Ukrainian*

Conference on Neuroscience dedicated to the 90th birthday of academician Vladimir Skok, Kyiv, Ukraine, 25-27 July, 2022; p. 50.
<https://fz.kiev.ua/index.php?list1=147>.

5. Kuraieva; A.; Savosko; S.; Chaikovsky; Yu.; Makarenko; O. Characteristics of infiltrating cells within brain hematoma in a rat model of intracerebral hemorrhage. *12th Neuronus 2022 Neuroscience Forum supported by IBRO, Krakow, Poland, 15-17 october, 2022.* In: *Acta Neurobiologiae Experimentalis.* 2022, 82, Supplement, 2022, I-CIV.
<https://ane.pl/archive?vol=82&no=Sup1&id=8271>.

6. Кураєва; А.В.; Савосько; С.І.; Макаренко; О.М.; Демидчук; А.С.; Грабовий; О.М. Мезенхімальні стовбурові клітини мігрують у перигематомну ділянку при геморагічному інсульті. У збірнику конференції, *Всеукраїнська науково-практична конференція III Жутаєвські читання «Морфогенез та регенерація»*, Полтава, Україна, 20-21 квітня, 2023; с. 41-42.

7. Кураєва, А.В.; Савосько, С.І.; Грабовий, О.М.; Макаренко, О.М. Дексаметазон модулює міграцію нерезидентних клітин до перифокальної ділянки крововиливу у мозку У збірнику конференції, *«Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці»*, *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю присвячена пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю. Б. Чайковського*, Київ, Україна, 8-9 червня, 2023; с. 90-91.
<https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/982/796>

ABSTRACT

Kuraieva A.V. Morphofunctional changes in the brain cortex against hemorrhagic stroke and modulation of recovery processes (experimental study). - Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 "Health care" in the specialty 222 "Medicine". - Bogomolets National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2024.

Intracerebral hemorrhage (ICH) is the most catastrophic type of stroke, with a high risk of mortality, disability, and long-term functional recovery. Despite there is significant progress in the study of the pathogenesis of this disease, the development of drugs, and the prevention of complications and repeated stroke, the issue of functional recovery is still unresolved. The endogenous potential for recovery after a stroke is very weak, but the much-anticipated results are known about the role of mesenchymal stem cells in the recovery of some brain functions. Improvement of function can be achieved through local trophic influence of stem cells or organ-specific differentiation of stem cells in damaged areas of the brain. Modulation of these influences is potentially a promising area in regenerative neurology.

The dissertation study considered the possibility of promoting repair and compensatory processes in the brain after ICH by modulating the endogenous pool of mesenchymal stem cells. Stem cells are a heterogeneous population, whose representatives express different protein markers and their immunophenotype changes as they differentiate. Two competing hypotheses that do not contradict each other were considered. The first is that cells expressing CD44, CD68, CD90 and CD146 are cells of a pro-inflammatory phenotype and are involved in the inflammatory process. Second, among them are mesenchymal stem cells that can differentiate organ-specifically in the damaged brain and/or produce biologically active substances.

An increase in the number of stem cells and targeted migration into the perifocal tissue of the brain is possible due to the use of granulocyte colony-stimulating growth factor (G-CSF), and a change in the direction of their differentiation – in combination with high doses of dexamethasone.

The purpose of the research is to study the changes in the cortex of the large cerebral hemispheres of rats with intracerebral hemorrhage and the modulation of compensatory-restorative processes through the use of granulocyte colony-stimulating growth factor and dexamethasone

Tasks:

1. To study the structural changes around the hemorrhage and in the sensorimotor cortex (SMC) in the dynamics of 1, 3, 10, 30, and 60 days after damage, the action of G-CSF and dexamethasone.

2. To evaluate the neurological deficit that occurs after ICH, and the effect of G-CSF and dexamethasone by using functional tests.

3. To study the peculiarities of the reactive changes of astrocytes in the perifocal area of the SMC after ICH and under the conditions of action of G-CSF and dexamethasone.

4. Immunohistochemical detection of cells expressing CD44, CD68, CD90, CD146, the dynamics of their appearance in the hemorrhage area and in the SMC, as well as after application of G-CSF and dexamethasone, their combination.

5. To evaluate the condition of neurons of the SMC by the level of CD73 expression after ICH, application of G-CSF and dexamethasone, their combination.

6. To study correlations between the quantitative characteristics of ICH and the migration activity of cells expressing CD44, CD68, CD90 and CD146.

In the experimental study, the ICH model was used, which consisted in the introduction of autologous rat blood into the right hemisphere of the brain. Experimental animals were injected with G-CSF, dexamethasone or their combination on the 1st, 2nd and 3rd day of observation. After 1, 3, 10, 30, and 60 days after modeling the ICH, the functional indicators of rats were studied using the "inverted test" and "exit to the platform" tests, the area of the hemorrhage and

the perifocal SMC were examined morphologically and immunohistochemically. Changes in the morphology of astrocytes were assessed, CD73 was detected immunohistochemically as a potential indicator of the morphofunctional state of neurons, and the accumulation and dynamics of the number of CD44+, CD68+, CD90+, CD146+ cells in the brain lesion were evaluated.

According to the results of histological studies of the hemorrhage site, it was shown that within 10 days, the hematoma was eliminated, and after 30 and 60 days, a pseudocyst with foci of gliomesodermal tissue complexes was formed in its place. Morphological signs of neurodystrophic processes in perifocal SMC were: death of neurons, violation of cortical cytoarchitectonic and morphological changes of reactive astrocytes. Changes in the detection of CD73 in neurons of the perifocal SMC were found: hyperexpression in degenerating neurons and almost complete absence in cells with signs of hydropic dystrophy. The dependence of the mechanism of neuronal death in the SMC on the distance to the hematoma and the observation period was established. It was shown that hydropic dystrophy of neurons dominated only in the first 3 days in the perifocal SMC, and at a distance of 1000-1500 μm from the hematoma, hyperchromic cells and ghost cells dominated, especially in the remote period. It is shown that the level of CD73 expression is an indicator of morphofunctional changes in neurons and can be used to assess the dynamics and degree of damage to the cerebral cortex. At the same time, the volume of the hematoma had a positive weak correlation with the indicators of functional tests 1, 3 and 10 days after ICH, and the subsequent partial recovery of the general somatic condition of the animals did not depend on the volume of the area of necrosis in the brain.

The response of reactive astrocytes in the perifocal SMC to brain damage was manifested by hypertrophy and arborization of processes and depended on the distance to the hematoma. Hypertrophy of astrocytes developed within 3-30 days after ICH and showed a tendency to regress. The stimulating effect of dexamethasone on the development of astrogliosis around the hematoma and in the deep layers of the cerebral cortex and the ischemic core after 3, 10, and 30 days

has been proven. G-CSF and its combination with dexamethasone caused only moderate hypertrophy of astrocytes. In the remote period (after 30 and 60 days), a decrease in the reactive changes of astrocytes was established, which is a morphological manifestation of the stabilization of the process in the damaged brain around the hematoma.

Against the ICH, the appearance of non-resident cells expressing CD44, CD68, CD90, and CD146 was established in the brain. The appearance of some studied immunophenotypes of cells depended on the time after ICH. CD44+ cells differed from CD68+, CD90+, and CD146+ cells in morphology, location of infiltration, and detection time in the brain. The migration activity of CD44+ cells depended on the volume of the hematoma. They were detected in the perifocal SMC and the hematoma at all times of the study with maximum activity after 3, 10, and 30 days and a subsequent tendency to decrease. The appearance of CD68+, CD90+, and CD146+ cells was more often recorded 10 and 30 days after ICH. Their migration was associated with focal inflammatory cell infiltrations and did not depend on the volume of the brain lesion. A moderate dependence was established between the appearance of CD44+ and CD146+ cells in the area of damage after 3 days and a strong correlation between the content of CD44+ and CD90+ cells after 60 days.

The analysis of the morphological changes of the hematoma and the activity of the accumulation of non-resident cells made it possible to establish some potential roles of cells with the studied immunophenotypes in the recovery processes against the ICH. It was shown that CD44+ and CD68+ cells are involved in hematoma elimination. The number of CD146+ cells was independent of infiltration by CD68+ and CD90+ cells and was associated with regeneration of blood vessels, while the appearance of CD90+ cells was the least numerous and their role requires further study.

The difference between the pharmacological effects of G-CSF and dexamethasone on the accumulation of cells expressing CD44, CD68, CD90, and CD146 in the perifocal brain tissue was revealed. The effect of dexamethasone

consisted of increasing the migration of CD44+ cells and their longer accumulation up to 30 days after ICH, modulation of the accumulation of CD68+ and CD146+ cells, and a potential tendency to stimulate the infiltration of CD90+ cells in the long term. G-CSF promoted earlier migration of CD68+ and CD146+ cells, but less intensively compared to dexamethasone. Against the combined use of G-CSF with dexamethasone, the migration of CD68+ and CD146+ cells was less intense and in a narrow observation range (10 and 30 days), and the activity of CD44+ cell accumulation in the damaged brain did not differ from the isolated administration of the studied agents.

Thus, the migration of non-resident mesenchymal stem cells expressing CD44, CD68, CD90, and CD146 into the area of brain damage after ICH was studied for the first time. The analysis of changes in the migration activity of cells with the specified immunophenotype under the conditions of G-CSF modulation, dexamethasone, and their combined action was carried out. The dynamics of reactive changes of astrocytes in the perifocal SMC were studied and the development of severe astrogliosis against the background of dexamethasone was proven. A potential relationship between the appearance of CD68+, CD90+, and CD146+ cells, inflammatory cell infiltrations, and reactive changes of astrocytes was revealed, which can be corrected by the combined use of G-CSF with dexamethasone. G-CSF led to a decrease in the phenomena of astrogliosis in the perihematoma area of the brain, including under the conditions of astrogliosis activation by dexamethasone.

Keywords: brain, brain cortex, brain injury, vascular pathology of the brain, stroke, experimental model, neurodegeneration, regeneration, mesenchymal stem cells, stem cells, glial cells, astrocytes, corticosteroids, growth factor.