

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗГОВОЙ ТКАНИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТОМ КРИОЦЕЛЛ-КРИОКОРД

УДК 616.831.001.57–005.4–092:615.37

Поступила 08.05.2015 г.



В.С. Лычко, к.м.н., доцент кафедры нейрохирургии и неврологии¹;

В.А. Малахов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой медицинской реабилитации, спортивной медицины и лечебной физкультуры²;

А.А. Потапов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой нейрохирургии и неврологии¹

¹Медицинский институт Сумского государственного университета, Сумы, Украина, 40018, ул. Санаторная, 31;

²Харьковская медицинская академия последиplomного образования, Харьков, Украина, 61176, ул. Корчагинцев, 58

Исследование биологических характеристик ангиогенеза в постинфарктной зоне может иметь важнейшее значение не только для лучшего понимания причин развития инсульта, но и для более качественного планирования лечения. И хотя прогностические и терапевтические принципы еще только формируются, достижения в понимании процессов ангиогенеза используются в клинической практике, и, возможно, оценка их будет применяться в рутинной клинической деятельности.

Цель исследования — оценка возможностей использования иммунобиологического препарата Кριοцелл-кριοкорд в лечении ишемического инсульта по данным изучения морфологических характеристик мозговой ткани и состояния церебральных капилляров крыс в эксперименте.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 120 беспородных белых крыс. Все животные были разделены на 4 группы по 30 особей: интактные — без травматизации и без лечения; после фокальной церебральной ишемии (ФЦИ) без лечения; после ФЦИ со стандартным лечением; после ФЦИ со стандартным лечением, дополненным введением Кριοцелл-кριοкорда. Проведен сравнительный морфометрический анализ структурных компонентов сенсомоторной области коры головного мозга и новообразованных сосудов в зоне некроза в динамике развития инфаркта мозга. Ультраструктуру исследовали с помощью электронного микроскопа.

Результаты. Установлено, что включение в стандартную схему лечения ишемического инсульта иммунобиологического препарата Кριοцелл-кριοкорд способствовало активизации процессов ангиогенеза в зоне инфаркта и сохраняло структуру гематоэнцефалического барьера, что благоприятно сказывалось на восстановлении утраченных функций.

Заключение. Иммунобиологический препарат Кριοцелл-кριοкорд проявляет выраженные ангиопротекторные и стимулирующие эндогенный ангиогенез свойства, что позволяет включать его в схемы лечения ишемического инсульта.

Ключевые слова: ангиогенез; ишемический инсульт; репарация; эндотелиальные клетки; некроз; гипоксия.

English

Morphological Changes of the Brain Tissue in Rats with Experimental Model of Ischemic Stroke in the Dynamics of Treatment by Immunobiological Preparation Cryocell-Cryocord

V.S. Lychko, MD, PhD, Associate Professor, Department of Neurosurgery and Neurology¹;

V.A. Malakhov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Medical Rehabilitation, Sports Medicine and Exercise Therapy²;

Для контактов: Лычко Владимир Станиславович, e-mail: vladlychko@ua.ru

A.A. Potapov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Neurosurgery and Neurology¹

¹Medical Institute of Sumy State University, 31 Sanatornaya St., Sumy, 40018, Ukraine;

²Kharkov Medical Academy of Post-Graduate Education, 58 Korchagintsev St., Kharkov, 61176, Ukraine

Investigations of angiogenesis biological characteristics in the post-infarction zone may be of great importance not only for understanding the causes of stroke development, but also for more qualitative treatment planning. And although prognostic and therapeutic principles are only being formed, achievements in understanding the processes of angiogenesis have already been used in clinical practice, and their assessment, perhaps, will be applied in routine clinical activities.

The aim of the investigation was to evaluate the possibilities of using immunobiological preparation Cryocell-Cryocord in the treatment of ischemic stroke on the basis of the findings obtained in the course of studying morphological characteristics of brain tissue and the condition of the rats cerebral capillaries in experiment.

Materials and Methods. 120 white outbred rats were used in our investigation. They were divided into 4 groups, with 30 animals in each: intact rats without focal cerebral ischemia (FCI) and treatment; rats after FCI and with no treatment; rats after FCI with standard treatment; and rats after FCI with standard treatment complemented by Cryocell-Cryocord. A comparative morphometric analysis of the sensorimotor cortex structural components and the newly formed blood vessels in the necrotic area has been carried out during the period of cerebral infarction progression. The ultrastructure has been examined by an electron microscope.

Results. Inclusion of the immunobiological preparation Cryocell-Cryocord into the standard treatment scheme for ischemic stroke has been found to trigger angiogenesis in the infarcted area and to preserve the blood-brain barrier structure, which favored the recovery of the lost functions.

Conclusion. The immunobiological preparation Cryocell-Cryocord has been shown to possess pronounced angioprotective properties and to stimulate endogenous angiogenesis, which allows it to be included into the treatment scheme for ischemic stroke.

Key words: angiogenesis; ischemic stroke; reparation; endothelial cells; necrosis; hypoxia.

Проблема профилактики и лечения ишемического инсульта, несмотря на многочисленные фундаментальные и клинические исследования, далека от своего решения. Для лечения его применяют препараты разных групп (тромболитики, противовоспалительные, ноотропы, антиоксиданты), физиотерапевтические средства в различных комбинациях, однако пока ни одна из предложенных методик не позволяет достичь радикального решения проблемы. Поэтому для консервативного лечения ведется поиск принципиально новых подходов [1].

Перспективными могут быть методы направленной тканевой регенерации и терапевтического ангиогенеза, суть которых заключается в активации компенсаторных ресурсов поврежденных клеток, тканей, сосудистой системы, стимуляции механизмов восстановления и регенерации, замещении утраченных структур и функций организма, органа или ткани [2, 3].

Данная медицинская технология уже используется при лечении различных деструктивных процессов паренхиматозных органов (цирроз печени); в восстановительном периоде при вирусных гепатитах, хронической печеночной недостаточности; для дезинтоксикации; при врожденных и приобретенных иммунодефицитных состояниях, анемиях различного происхождения, бесплодии, гипоплазии тимуса, панцитопении; в комплексном лечении воспалительных процессов в хирургической и стоматологической практике; в терапии инсулинозависимого диабета и его осложнений; при нарушениях гемопоэза после химио- и лучевой терапии. Сведения о применении ее для лечения больных с ишемическим инсультом крайне ограничены [4].

В рамках этой технологии пациент получает ряд биологически активных сбалансированных соединений

природного происхождения, способных оказывать влияние на различные стороны метаболизма целостного организма. Для лечения ишемического инсульта нами был применен препарат криоконсервированной сыворотки кордовой крови человека Кριοцелл-криокорд, который содержит биологически активные соединения: гемопозитины, адаптогены, опиоидные пептиды, ферменты, комплекс репродуктивных иммуномодуляторов, витамины.

Понимание роли в возникновении и прогрессировании ишемического инсульта местных и общих факторов, в частности изменений цитокинового статуса, реологических свойств крови и прямого повреждения сосудистой сети в зоне некроза, а также установленная в экспериментах протекторная эффективность Кριοцелл-криокорда, которая обеспечивается в первую очередь его антигипоксическими и антиоксидантными свойствами, способностью стимулировать процессы репарации в зоне повреждения, послужили стимулом к изучению влияния препарата на процессы ангиогенеза у крыс с моделированной фокальной церебральной ишемией (ФЦИ).

Цель исследования — изучение морфологических характеристик мозговой ткани и состояния церебральных капилляров крыс с экспериментальной моделью ишемического инсульта в динамике лечения иммунобиологическим препаратом Кριοцелл-криокорд для оценки его ангиопротективных и стимулирующих ангиогенез свойств.

Материалы и методы. Исследования проведены на 120 беспородных белых крысах-самцах массой 200±20 г. При проведении исследования неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных жи-

вотных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), и рекомендации Комиссии по вопросам соблюдения биоэтики при проведении экспериментальных и клинических исследований медицинского института Сумского государственного университета.

Все животные были разделены на 4 группы: 1-я группа — интактные крысы без травматизации и без лечения; 2-я — животные после ФЦИ без лечения; 3-я — после ФЦИ со стандартным лечением; 4-я — после ФЦИ со стандартным лечением, дополненным введением Криоцелл-криокорда.

Все оперативные вмешательства проводили под внутрибрюшинным наркозом из расчета 20 мг тиопентала натрия на 1 кг массы животного. Моделирование ФЦИ осуществляли путем инъекции взвеси сульфата бария в стерильном физиологическом растворе в пропорции 1:3 в правую сонную артерию через разрез мягких тканей на шее [5]. Вводили взвесь интраартериально в количестве 0,1–0,3 мл.

Стандартное лечение включало введение 40 мг/кг массы 25% раствора сульфата магнезии, 15 мг/кг раствора цитиколина. В 4-й группе оно дополнялось 100 мкл иммунобиологического препарата Криоцелл-криокорд, произведенного в Межведомственном научном центре криобиологии и криомедицины Национальной академии науки, Академии медицинских наук и Министерства охраны здоровья Украины (Харьков, Украина). Это криоконсервированный бесклеточный препарат сыворотки плацентарной крови человека, содержащий биологически активные вещества — монокины, интерлейкины, интерфероны; гормоны — стероидные, эстрогены, гестогены, тестостерон, прогестерон и др.; комплекс репродуктивных иммуномодуляторов, факторы роста, гемопоэтины, адаптогены, ферменты, микроэлементы, витамины.

Нормирование препарата производили по содержанию общего белка и α -фетопротеина: 1 мл содержит 21,0±0,8 мг общего белка и 2100±600 МЕ α -фетопротеина. Препараты вводили внутрибрюшинно выжившим крысам через 12 ч с момента моделирования ФЦИ, а также на 2-, 3- и 4-е сутки. Осуществляли ежедневный контроль психоневрологического статуса животных. Материал для морфологического исследования забирали через 7 сут после моделирования ФЦИ.

Для морфологических исследований мозг экспериментальных животных фиксировали путем транскардиальной перфузии смеси 4% раствора параформальдегида, 1% раствора глутарового альдегида, 5% раствора сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4) в течение 15–20 мин под давлением 90 мм рт. ст. После фиксации материала готовили светооптические (заклучали в парафин) и электронно-микроскопические препараты.

Для электронно-микроскопического исследования выделяли сенсомоторную область коры головного мозга (поля Fpa и Fpp) с использованием стереотаксического атласа мозга взрослой крысы [5]. Использовали ультратонкие (70–100 нм) срезы всех слоев сенсомо-

торной области коры. Ультраструктуру исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ, снабженного системой съемки и анализа изображения САИ-01А (SELMI, Украина) на основе CCD-камеры DX-2 и пакета программ (KAPPA, Германия).

Методологической основой морфологического исследования сенсомоторной области коры головного мозга служил гистофизиологический подход: большое внимание уделялось сравнительному морфометрическому анализу структурных компонентов сложной многоуровневой системы, которой является сенсомоторная область коры в динамике развития постишемического периода [6, 7].

Результаты и обсуждение. В эксперименте на крысах установлено, что в постишемическом периоде нарушения гемостаза структурно проявлялись на всех уровнях микрососудистой сети сенсомоторной области коры головного мозга. При этом структурные изменения затрагивали состояние форменных элементов и плазмы крови, стенку микрососудов (эндотелий, базальная мембрана (БМ), перicyты), а также сосудистых ножек астроглии. Остановка кровотока вызывала адгезию эритроцитов к люминальной поверхности эндотелиальных клеток (ЭК) (рис. 1).

Наиболее вариабельным изменениям подвергались ЭК церебральных капилляров. Ультраструктурные проявления их реактивных изменений варьировались от незначительных дистрофических к выраженным некробиотическим проявлениям.

К незначительным, начальным признакам реактивных изменений относились: набухание митохондрий, появление вакуолей, деструкция полирибосомальных розеток, распыление рибосом, отделение их от мембраны гранулярного ретикула, увеличение толщины и микроклазматоз ЭК, появление длинных цитоплазматических отростков, варикозных образований эндотелия, изменение содержания пиноцитозных везикул, редукция межклеточных связей, разрывы щелевидных контактов, увеличение толщины БМ (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют, что в постишемическом периоде значительно меняются агрегационные свойства клеток крови и их взаимоотношения с поверхностью ЭК, часть из них подвергается полной или частичной деструкции, сопровождающейся выделением в кровяной ток биологически активных веществ. При поражении сосудистой стенки утрачивается изолирующая функция ЭК, обнажается субэндотелиальный слой, оголяются коллагеновые волокна БМ, что способствует активации фактора Хагемана, изменению заряда и дзета-потенциала [8, 9].

Деструктивные изменения в церебральных капиллярах сочетаются со стимуляцией неповрежденных ЭК, в результате чего увеличивается продукция как релаксантов, так и констрикторов [10, 11]. Увеличение сосудистой проницаемости структурно проявляется сокращением ЭК; реорганизацией их цитоскелета и контактов; повреждением эндотелия с ретракцией, лизисом и отслойкой эндотелия либо отслойкой эндотелия без лизиса [12–14].

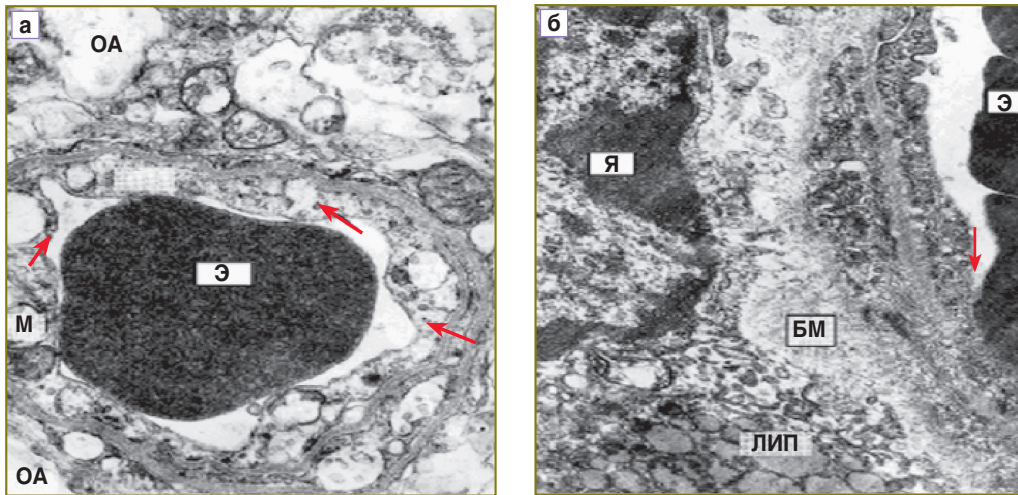


Рис. 1. Капилляр III слоя сенсомоторной области коры головного мозга белой крысы на 7-е сутки после фокальной церебральной ишемии без лечения: *а* — изменение эндотелиальных клеток (ЭК) по светлому типу, набухание и деструкция митохондрий (М), вакуолизация цитоплазмы, появление большого количества эндоцитозных пузырьков (стрелки), адгезия эритроцита (Э) к поверхности эндотелиальных клеток, отек периваскулярных отростков астроцитов (ОА); $\times 15\ 300$; *б* — агрегация и деформация Э, адгезия их к поверхности эндотелиальных клеток (стрелка), набухание и деструкция базальной мембраны (БМ), скопления липидов (ЛИП) в цитоплазме пероцитов, Я — ядро пероцита; $\times 19\ 800$

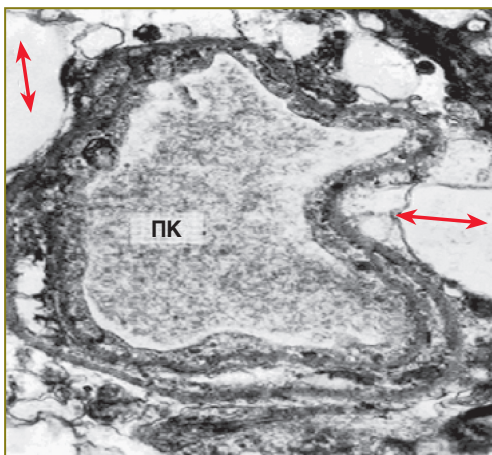


Рис. 2. Капилляр III слоя сенсомоторной области коры головного мозга белой крысы на 7-е сутки после фокальной церебральной ишемии без лечения. Церебральный капилляр с повышенным содержанием белка, выраженный отек периваскулярных отростков астроцитов (двойные стрелки), ПК — просвет капилляра; $\times 17\ 500$

Отмечались также признаки дисфункции гематоэнцефалического барьера: расплавление отдельных участков БМ, набухание ЭК и пероцитов, отек и деструкция периваскулярной глии.

Анализ структурных и сосудистых нарушений в мозге крыс при выполнении моделирования ишемического инсульта свидетельствует, что только нормализация всех основных компонентов, обеспечивающих адекватный гомеостаз (состояние сосудистой стенки, клеток крови и плазмы), позволит минимизировать последствия вторичного нарушения микроциркуляции.

К сожалению, применяемые традиционные методы

лечения не обеспечивают ожидаемого положительного эффекта, и это побуждает искать новые терапевтические возможности. Именно поэтому с целью стимуляции ангиогенеза и нормализации метаболических процессов в инфарктной зоне классическое лечение ФЦИ нами было дополнено иммунобиологическим препаратом Криоцелл-криокорд, содержащим различные биологически активные вещества, ростовые факторы, гормоны.

Результаты исследования убедительно показали, что дополнение классического лечения ФЦИ Криоцелл-криокордом приводит к статистически значимому уменьшению площади периваскулярного отека на 21,4%, тогда как в группе животных, получавших только стандартное лечение, этот показатель уменьшался всего на 12,7% ($p < 0,01$), а в группе без лечения — на 11,3% ($p < 0,01$). При этом в 4-й группе животных снижалась степень адгезии форменных элементов крови к сосудистому эндотелию, регрессировал отек ЭК, увеличивалась устойчивость эритроцитов к гемолизу, что уменьшало проявления ишемического повреждения. Подобные изменения отмечались и в других исследуемых группах, но они были значительно менее выраженными в сравнении с группой животных, дополнительно получавших Криоцелл-криокорд.

На 7-е сутки эксперимента в 4-й группе животных было зафиксировано увеличение количества элементов новообразующихся церебральных капилляров на 34,7% ($p < 0,01$) по сравнению с интактными животными, на 22,3 и 18,8% — со 2-й и 3-й группами соответственно.

Использование растворов сульфата магнесии, цитиколина совместно с Криоцелл-криокордом стимулировало более быстрое восстановление ультраструктуры поврежденных капилляров и новообразование капилляров на базе уже существующих (рис. 3).

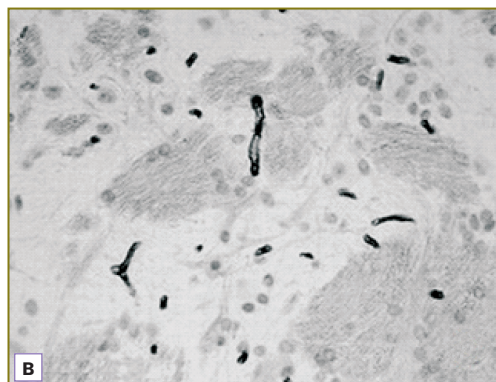
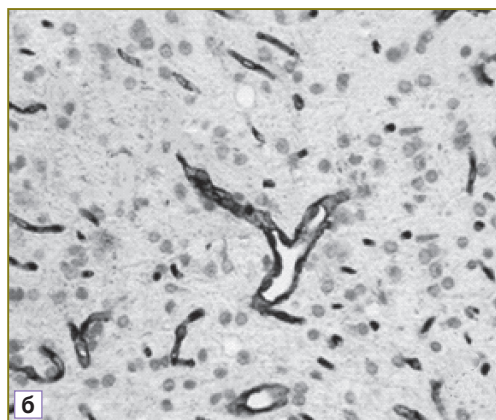
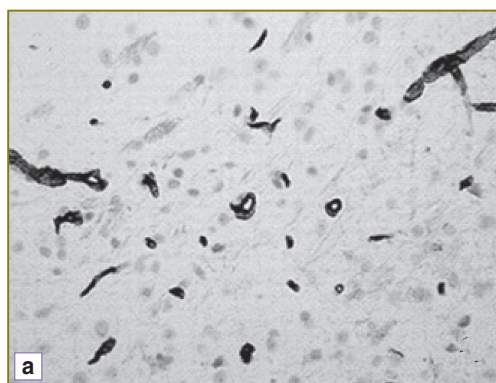


Рис. 3. III слой сенсомоторной области коры головного мозга белой крысы на 7-е сутки после фокальной церебральной ишемии на фоне стандартного лечения (а), при включении в схему терапии Криоцелл-криокорда (б), подобный слой на контрлатеральной гемисфере (в) в качестве объекта для сравнения. На рис. а и б отмечается увеличение размеров церебральных капилляров, сосудистой плотности по сравнению с контрлатеральной гемисферой (в); окраска гематоксилин-эозином, $\times 40$

Особенно это характерно для капилляров, в которых сохранилась БМ и перициты. На данном каркасе образовывался новый пласт эндотелия, замещающий погибшие ЭК. Как правило, новообразованный капилляр имел расщепленную БМ.

При использовании Криоцелл-криокорда сокращались проявления и даже исчезали такие признаки истощения репаративных возможностей, как уменьшение

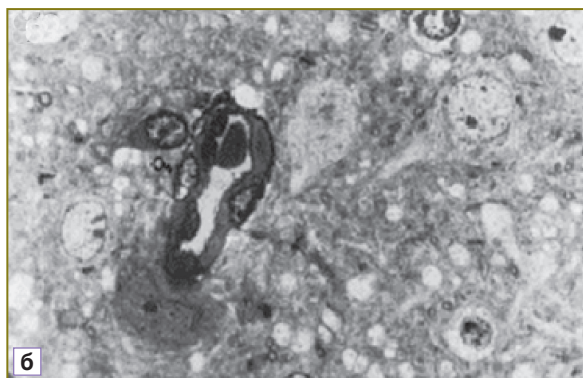
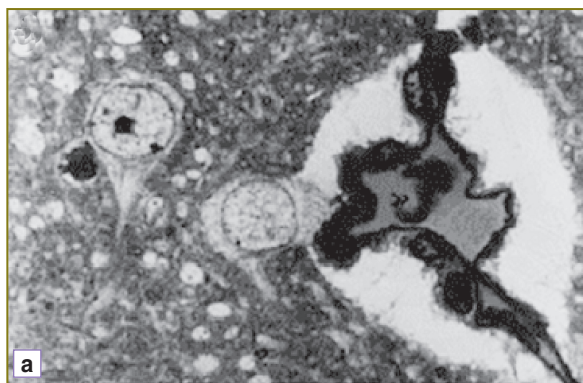


Рис. 4. Кора больших полушарий головного мозга нелеченых крыс из 2-й группы (а) и животных, которым вводили растворы сульфата магнезии, цитиколина совместно с Криоцелл-криокордом (б); окраска гематоксилин-эозином, $\times 120$

рабочего просвета сосудов, накопление остаточных тел в цитоплазме ЭК, пролиферация периваскулярной астроглии, накопление в ней липидов, вторичных лизосом, фибриллярных структур, атрофия ЭК. В целом ультраструктура сосудистой стенки выглядела более сохраненной, а повреждения БМ не были такими глубокими.

В материале, взятом у животных 4-й группы, регистрировались новообразованные сосуды, периваскулярное пространство которых не отличалось от нормального. Однако отмечалось значительное количество умеренно отечных ножек астроцитов с небольшим количеством органоидов. Просвет сосудов был, как правило, прозрачен, заполнен плазмой (рис. 4).

Указанные изменения служат, по-видимому, адаптивно-приспособительным механизмом при острой ФЦИ. Острая гипоксия и выброс большого количества медиаторов в зоне ишемии являются мощными стимуляторами ангиогенеза. Также одним из возможных механизмов данных изменений может быть и активация эндогенного ангиогенеза в мозге при участии ряда биологически активных веществ, содержащихся в составе иммунобиологического препарата Криоцелл-криокорд, поскольку введение его приводит к достоверно более активной стимуляции ангиогенеза в отличие от группы животных, получавших стандартное лечение. Полученные обнадеживающие результаты на живот-

ных могут стать стимулом к дальнейшему изучению эффектов Криоцелл-криокорда на больных с ишемическим инсультом.

Заключение. На модели экспериментальной фокальной церебральной ишемии в динамике лечения с добавлением иммунобиологического препарата Кристоцелл-криокорд установлено, что данный препарат проявляет выраженные ангиопротекторные свойства, предотвращает капилляростаз, сохраняет структуру гематоэнцефалического барьера, активизирует процессы ангиогенеза в перинекротической зоне путем повышения количества функционирующих капилляров и обменной поверхности капиллярного русла. Выразительность сосудистой реакции на 7-е сутки эксперимента, плотное расположение капилляров и наличие множества анастомозов указывают на активацию коллатерального кровообращения в перинекротической зоне у крыс, дополнительно получавших Кристоцелл-криокорд.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Каны О.В. Ангиогенез как адаптивный механизм при ишемии. Бюллетень ВЦНЦ СО РАМН 2013; 5: 192–195. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N., Kanya O.V. Angiogenesis as an adaptive mechanism in ischemia. *Bulletin of ESSC SB RAMS* 2013; 5: 192–195.
2. Lawler P.R., Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2(5): a006627, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006627>.
3. Fujii T., Yonemitsu Y., Onimaru M., Tanii M., Nakano T., Egashira K., Takehara T., Inoue M., Hasegawa M., Kuwano H., Sueishi K. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(11): 2483–2489, <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000244684.23499.bf>.
4. Трифонов В.Ю., Прокопчук В.Ю., Зайченко А.В. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме. Проблемы криобиологии 2011; 1(21): 75–84. Trifonov V.Yu., Prokopyuk V.Yu., Zaychenko A.V. Cryoconserved cord blood serum in restoration of reproductive function in antiphospholipid syndrome. *Problemy kriobiologii* 2011; 1(21): 75–84.
5. Стереотаксический атлас мозга крысы (фронтальные сечения). Под ред. Буданцева А.Ю. Пушино: Аналитическая микроскопия; 2002. *Stereotaksicheskiy atlas mozga krysy (frontal'nye secheniya)* [Stereotaxic atlas of the rat brain (frontal sections)]. Pod red. Budantseva A.Yu. [Budantsev A.Yu. (editor)]. Pushchino: Analiticheskaya mikroskopiya; 2002.
6. Nemoto M., Koyama H., Nishiyama A., Shigematsu K., Miyata T., Watanabe T. Adequate selection of a therapeutic site enables efficient development of collateral vessels in angiogenic treatment with bone marrow mononuclear cells. *J Am Heart Assoc* 2015; 4: e002287, <http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.115.002287>.
7. Kim J., Kim M., Jeong Y., Lee W.B., Park H., Kwon J.Y., Kim Y.M., Hwang D., Kwon Y.G. BMP9 Induces cord blood-derived endothelial progenitor cell differentiation and ischemic neovascularization via ALK1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 2020–2031, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306142>.
8. van Lessen M.V., Nakayama M., Kato K., Kim J.M., Kaibuchi K., Adams R.H. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor function in angiogenesis by numb and numb-like. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(8): 1815–1825, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305473>.
9. Smith C.J., Emsley H.C., Gavin C.M., Georgiou R.F., Vail A., Barberan E.M., del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M., Rothwell N.J., Hopkins S.J., Tyrrell P.J. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol* 2004; 4: 2, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2377-4-2>.
10. Silvestre J.-S., Mallat Z., Tedgui A., Levy B.I. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc Res* 2008; 78(2): 242–249, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn027>.
11. Calic Z., Cappelen-Smith C., Zagami A.S. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Internal Med J* 2015; 45(6): 599–608, <http://dx.doi.org/10.1111/imj.12669>.
12. Passaglia P., Gonzaga N.A., Tirapelli D.P., Tirapelli L.F., Tirapelli C.R. Pharmacological characterisation of the mechanisms underlying the relaxant effect of adrenomedullin in the rat carotid artery. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66(12): 1734–1746, <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12299>.
13. Taylor C., Weston R., Dusing G., Roulston C. NADPH oxidase and angiogenesis following endothelin-1 induced stroke in rats: role for Nox2 in brain repair. *Brain Sci* 2013; 3(1): 294–317, <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci3010294>.
14. Zhu H.-F., Wan D., Luo Y., Zhou J.L., Chen L., Xu X.Y. Catalpol increases brain angiogenesis and up-regulates vegf and epo in the rat after permanent middle cerebral artery occlusion. *Int J Biol Sci* 2010; 6(5): 443–453, <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.6.443>.