

DOI 10.29254/2077-4214-2019-3-152-108-112

УДК 616.831-005.1:615.361:611.018.82.013]:57.086.13

<sup>1,2</sup>Золотко К. Н., <sup>1,3</sup>Сукач А. Н., <sup>1</sup>Компаниец А. М.

**ДИНАМИКА ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТОВ У КРЫС С ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНЫМ КРОВОИЗЛИЯНИЕМ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина (г. Харьков)

<sup>3</sup>Харьковский педагогический университет им. Г.С. Сковороды (г. Харьков)

zolotko@karazin.ua

**Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами.** Статья выполнена в рамках научно-исследовательской работы отдела криобиохимии по теме «Низкотемпературное консервирование стволовых клеток в составе трехмерных структур», № государственной регистрации 0112U003132.

**Вступление.** Интрацеребральное кровоизлияние (ИК), которое является причиной 15% всех инсультов, сопровождается тяжелыми осложнениями и высокой смертностью. В связи с этим необходима разработка методов, направленных на снижение выраженности проявлений ИК. Одним из таких подходов может быть клеточная терапия с использованием криоконсервированных нейральных клеток. Однако, перед их применением в клинической практике, необходимо проведение длительной процедуры испытаний, в т. ч., доклинических исследований на животных для установления эффективности и безопасности метода, а также способа введения и определение оптимального количества имплантируемых клеток [1,2].

**Цель работы** – изучение влияния введения криоконсервированных нейральных клеток (НК) головного мозга плодов крыс, а также их агрегатов на восстановление двигательной активности животных после интрацеребрального кровоизлияния.

**Объект и методы исследования.** Эксперименты были проведены на 33 белых беспородных крысах-самцах массой 250–350 г, в возрасте 11-13 месяцев. Всем животным проводили хирургическую операцию моделирования ИК [3]. Для этого, после анестезии, путем внутрибрюшинного введения 20 мг/кг пропофола (Daewon Pharmaceutical Co. Ltd. Корея/Швейцария) и 20 мг/кг седазина (Biowet Puławy Sp., Польша), крысам интрацеребрально стереотаксически (координаты от брегмы: переднезадняя – 0,2 мм, медиолатеральная с левой стороны – 3,0 мм), используя иглу диаметром 0,47 мм медленно на глубину 6,0 мм вводили 0.2 ЕД коллагеназы IV типа («Sigma-Aldrich», США) в 1 мкл физиологического раствора. Через 5 мин. после введения иглу извлекали и на рану накладывали швы. Из 33 прооперированных крыс три умерли после операции. Степень повреждения оценивали по изменениям в поведенческих тестах на следующий день после моделирования ИК.

Все животные были разделены на 4 группы: 1-я (контроль 1, n = 9) – крысы, которым вводили 30 мкл DMEM/F12 (Sigma, США); 2-я (контроль 2, n = 7) – введение разрушенных нейральных клеток (НК); 3-я (опытная, n = 7) – введение криоконсервированных НК; и 4-я (опытная, n = 7) – введение криоконсервированных агрегатов нейральных клеток (АНК).

30 мкл среды DMEM/F12, содержащей разрушенные НК, криоконсервированные НК, или АНК вводили в боковой желудочек мозга стереотаксически (координаты от брегмы: переднезадняя – 0,9 мм, медиолатеральная – 1,4 мм) на глубину 3,4 мм через сутки после формирования ИК.

Количество вводимых клеток во 2-й, 3-й и 4-й группах составляло  $1,5 \times 10^6$ . Расчет количества трансплантируемых клеток и объема вводимой среды проводили на основании предварительно проведенных исследований [4-6].

Нейральные клетки выделяли из головного мозга плодов крыс 15-16 дней гестации в стерильных условиях. Для этого ткань головного мозга извлекали, промывали стерильным физиологическим раствором, инкубировали 5 мин. при 37°C в 0,25% растворе трипсина, переносили в среду DMEM/F12, обогащенную 10% сыворотки и механически дезагрегировали на единичные клетки при помощи вибрации [7]. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр.

Для формирования агрегатов свежеизолированные НК культивировали в 24-х луночном планшете в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/1 мл DMEM/F12 (Sigma, США), обогащенной 10% сыворотки. При этом в агрегаты объединялось около 75% клеток [8]. Образовавшиеся в одной лунке агрегаты собирали и криоконсервировали.

Криоконсервирование НК и АНК проводили под защитой 10% ДМСО путем замораживания со скоростью 1°C/мин до -80 °C, после чего клетки переносили в жидкий азот [9].

Оттаивание НК и АНК проводили на водяной бане при +40°C. После размораживания, для удаления ДМСО, к клеткам добавляли 10-кратное количество DMEM/F12, перемешивали и центрифугировали 5 мин. при 100 g. Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12. Подсчет жизнеспособности и количества размороженных НК проводили в камере Горяева после окрашивания трипановым синим.

Разрушение НК проводили путем трехкратного замораживания и оттаивания клеток без криопротектора.

Функциональные нарушения у крыс после ИК оценивали по результатам лестничного теста, теста удаления липкой ленты и теста углового поворота. Тестирование проводилось до эксперимента, а также через 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сутки после моделирования ИК.

**Лестничный тест** [10,11] проводили для оценки у крыс тонких навыков нарастающей сложности, приобретенных при обучении – способности доставать с разной глубины лестницы съедобные гранулы. Для этого животных помещали в стеклянный бокс,

по центру которого находилась платформа с прикрепленными по бокам двумя лестницами, состоящими из 7 ступенек. На каждой ступеньке лестницы находилось 3 гранулы, по 45 мг каждая (Bio-Serv, США). Крысу после голодания помещали в бокс и подсчитывали количество съеденных в течение 15 мин. гранул.

**Тест удаления липкой ленты** [11,12] проводили для оценки нарушения тактильной чувствительности. Для проведения теста две липкие ленты одинакового размера (1 см x 1 см Urgosyal® Laboratoires Urgo, Франция) приклеивали к внутренней поверхности передних лап крыс. Эффективность тактильного ответа оценивалась по времени, затраченному животными для удаления липкой ленты. Максимальная продолжительность измерения составляла 180 с. До операции крысы предварительно были дважды тренированы для выполнения теста.

**Тест углового поворота** [11] использовали для оценки асимметрии сенсорно-моторного дефицита. Для проведения теста крысу помещали головой вперед в угол равный 30°. Это приводило к стимулированию вибрисс на обеих сторонах головы, и вынуждало животное вставать, поворачиваясь через правую или левую лапу. Подсчитывали относительное количество поворотов при вставании крысы на две задние лапы через сторону, контрлатеральную относительно ИК. В процессе проведения теста анализировалось 15 попыток. Для выявления изначального предпочтения какой-либо стороны, в обеих группах были проведены предварительные тестирования до эксперимента.

**Анализ данных.** Статистическую значимость изменений после моделирования ИК определяли по критерию Уилкоксона. Статистическую значимость исследуемых показателей оценивали по критерию Краскла-Уоллиса и Манна-Уитни для попарных сравнений при уровне значимости  $\alpha < 0,05$ . В качестве среднего значения использовали медиану [13]. Любые изменения, описанные в результатах, и не отмеченные как тенденция, следует понимать как статистически значимые.

Эксперименты рассмотрены и одобрены Комитетом по биоэтике при ИПКиК НАНУ и проводились в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (2004 г.) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (ETS 123 (1986)).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Жизнеспособность деконсервированных НК составляла  $32,4 \pm 3,5\%$ . Как показали предварительные исследования [9], такие клетки в своем составе содержат жизнеспособные стволовые/прогениторные и ранние дифференцированные клетки, способные в процессе культивирования пролиферировать, мигрировать и дифференцироваться в нейроны и клетки глии.

Жизнеспособность клеток в составе АНК составляла около 80%. В культуре эти агрегаты, были способны прикрепляться к подложке,

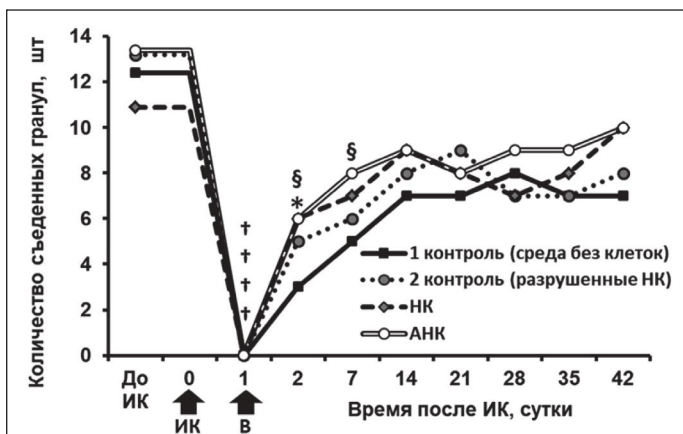


Рисунок 1 – Оценка влияния введения криоконсервированных НК и АНК на восстановление тонких навыков животных по результатам лестничного теста.

**Примечание.** ИК – моделирование интрацеребрального кровоизлияния; В – введение НК, АНК, разрушенных НК или среды DMEM/F12. † – отличия во всех группах статистически значимы по сравнению с животными в этих же группах до ИК,  $P < 0,001$ . \* – отличия в 3-й группе достоверны по отношению к 1-й группе,  $P = 0,02$ ; § – отличия в 4-й группе статистически значимы по сравнению с 1-й группой,  $P < 0,05$ .

после чего происходило формирование монослоя, образование нейробластов и колоний нейральных прогениторных клеток [14].

В суспензии НК, подвергнутых трехкратному замораживанию/отогреву жизнеспособных клеток обнаружено не было.

На 1-е сутки после моделирования ИК у 6 крыс 1-й группы, 6 животных 2-й группы, у 5 крыс 3-й группы и у 5 крыс 4-й группы отмечалась неспособность доставать гранулы (рис. 1), что свидетельствовало о выраженном нарушении функции воспроизведения тонких навыков у животных всех групп.

У 7 крыс 1-й группы, 5 животных 2-й, у 5 крыс 3-й группы и у 5 крыс 4-й группы отмечалось отсутствие попыток удалить липкую ленту, что отражало значи-

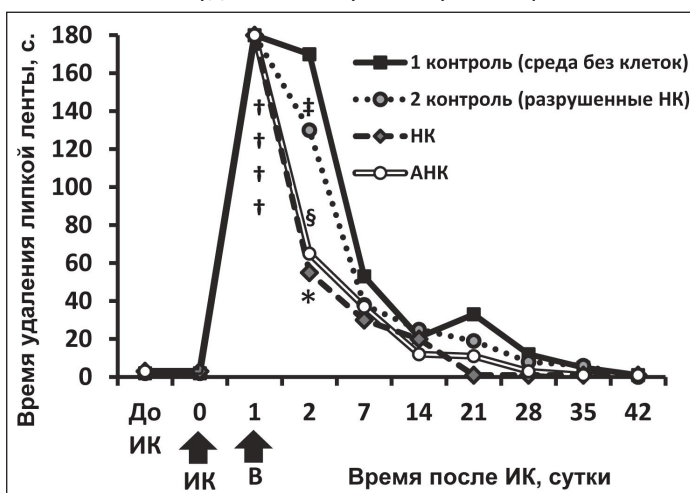


Рисунок 2 – Оценка влияния введения криоконсервированных НК и АНК на восстановление чувствительности животных по результатам теста удаления липкой ленты.

**Примечание.** ИК – моделирование интрацеребрального кровоизлияния; В – введение НК, АНК, разрушенных НК или среды DMEM/F12. † – отличия во всех группах статистически значимы по сравнению с животными в этих же группах до ИК,  $P < 0,001$ . \* – отличия в 3-й группе достоверны по отношению к 1-й группе,  $P = 0,01$ ; § – отличия в 4-й группе статистически значимы по сравнению с 1-й группой,  $P = 0,02$ ; ‡ – отличия между 3-й и 2-й группами статистически значимы,  $P = 0,04$ .

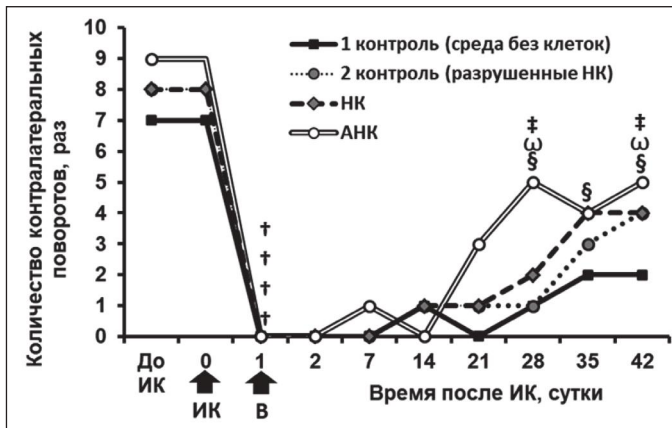


Рисунок 3 – Оценка влияния введения криоконсервированных НК и АНК на степень асимметрии поражения головного мозга животных по результатам теста углового поворота.

**Примечание.** ИК – моделирование интрацеребрального кровоизлияния; В – введение НК, АНК, разрушенных НК или среды DMEM/F12. † – отличия во всех группах статистически значимы по сравнению с животными в этих же группах до ИК,  $P < 0,001$ . § – отличия в 4-й группе статистически значимы по сравнению с 1-й группой,  $P < 0,05$ . ‡ – отличия в 4-й группе достоверны по отношению ко 2-й группе,  $P < 0,05$ . ω – отличия в 4-й группе статистически значимы по сравнению с 3-й группой,  $P < 0,05$ .

тельное нарушение тактильной чувствительности и связанной с ней двигательной активности животных (рис. 2).

При проведении теста углового поворота, все крысы в каждой из групп, поворачивались через неповрежденную сторону (рис. 3), что указывало на выраженную асимметрию нарушений функций головного мозга.

На 2 сутки (1 сутки после введения клеток) у крыс 3-й и 4-й групп наблюдалось увеличение в 2 раза количества съеденных гранул, по сравнению с животными 1-й группы. Также наблюдалась тенденция к увеличению количества съеденных гранул в 1,7 раз во 2-й группе, ( $P = 0,09$ ), что свидетельствовало о положительной динамике восстановления тонких навыков в группах введения НК и АНК (рис. 1). Также у крыс 3-й группы отмечалось сокращение времени удаления липкой ленты (55 сек.) по сравнению с животными 1-й группы (170 сек.) и 2-й группы (130 сек.). У крыс 4-й группы отмечалось уменьшение времени, затраченного на удаление липкой ленты (65 сек.) по сравнению с 1-й группой (170 сек.) (рис. 2). Это указывает на улучшение тактильной чувствительности у крыс в группах применения НК и АНК, а также о большей эффективности в группе введения НК по сравнению с группой введения разрушенных клеток. При оценке асимметрии, сенсорно-моторного дефицита изменений не отмечалось (рис. 3).

На 7 сутки в 3-й и 4-й опытных группах сохранялась тенденция ( $P = 0,14$  и  $P = 0,15$  соответственно) к сокращению времени удаления липкой ленты (рис. 2). Также отмечалась тенденция к увеличению количества контралатеральных поворотов в 4-й опытной группе по сравнению с 1-й и 3-й группами ( $P = 0,1$  и  $0,07$  соответственно) (рис. 3). У крыс 4-й группы наблюдалось увеличение количества съеденных гранул в 1,6 раза по сравнению с 1-м контролем (рис. 1), что говорит о положительной динамике восстановления тонких навыков у крыс в группе применения АНК. На 7-е и 14-е сутки у животных 3-й группы сохранялась

тенденция ( $P = 0,08$  и  $P = 0,13$  соответственно) к увеличению количества съеденных гранул по сравнению с 1 группой (рис. 1).

На 21 сутки в тестах не было обнаружено значимых изменений.

На 28 сутки отмечалась тенденция к увеличению количества съеденных гранул в 4-й группе (9 гранул) по сравнению со 2-й и 3-й (по 7 гранул) ( $P = 0,14$  и  $P = 0,14$  соответственно) (рис. 1). В 4-й группе также наблюдалось увеличение количества контралатеральных поворотов по сравнению с 1-й, 2-й и 3-й группами в 5 раз, 5 и 2,5 раза соответственно, что свидетельствует о значительном уменьшении асимметрии сенсорно-моторного дефицита в группе применения АНК (рис. 3).

На 35 сутки отмечалось увеличение количества контралатеральных поворотов у крыс 4-й группы по сравнению с 1-й ( $P = 0,04$ ) что свидетельствует об уменьшении асимметрии сенсорно-моторного дефицита в группе применения АНК и тенденция к увеличению в 2 раза количества поворотов в 3-й группе по сравнению с 1-й ( $P = 0,07$ ) (рис. 3).

На 42 сутки в 4-й группе отмечалась тенденция ( $P = 0,09$ ) к увеличению количества съеденных гранул по отношению к 1 группе (рис. 1). В тесте углового поворота наблюдалась тенденция ( $P = 0,09$ ) к повышению частоты использования контралатеральной лапы в 3 группе по сравнению с 1-й. В 4-й группе отмечалось повышение частоты использования контралатеральной лапы по сравнению с 1-й, 2-й и 3-й группами в 2,5 раза, 1,25 и 1,25 раз соответственно (рис. 3), что говорит о значительном уменьшении асимметрии сенсорно-моторного дефицита в группе применения АНК.

Полученные результаты свидетельствуют о двухфазном положительном эффекте введения криоконсервированных клеток крысам с ИК на 2 – 7 сутки – 1 фаза и после 21 суток – 2 фаза. Положительные изменения, которые наблюдались в течение 1 фазы, можно объяснить паракринным нейропротекторным и ангиогенным эффектом введенных клеток [15,16], а также их противовоспалительным действием [17,18]. Положительный эффект введенных клеток во 2 фазе, вероятно, обусловлен подавлением апоптоза в течение 1 фазы, а также, возможно, миграцией и дифференцировкой собственных нейробластов субвентрикулярной зоны желудочков мозга в ответ на паракринное стимулирующее действие введенных клеток [18-21].

Разрушенные нейральные клетки оказывали мало выраженный положительный эффект на 2 сутки, который проявлялся в восстановлении тонких навыков. Это можно объяснить слабо выраженным действием факторов роста, содержащихся в суспензии разрушенных клеток.

Нейральные клетки оказывали кратковременный эффект в восстановлении тонких навыков и тактильной чувствительности на протяжении 2 – 7 суток (1 фаза) и обуславливали тенденцию к уменьшению сенсорно-моторного дефицита на протяжении 2 фазы (после 21 суток). Это можно объяснить паракринным действием НК. Однако этот эффект угасает после 1 фазы, что может быть обусловлено гибелью

частинок кліток внаслідок небажального впливу факторів запалення та ішемії в зоні пошкодження.

Агрегати нейтральних кліток продемонстрували ефективність в обох фазах. В 1 фазі (2 – 7 днів) АНК сприяли повному відновленню тонких навичок та тактильної чутливості. В 2 фазі (після 21 днів) застосування АНК виявилось ефективним для зменшення асиметрії сенсорно-моторного дефіциту та відновлення тонких навичок за 42 днів. Більш виражений та триваліший ефект введення АНК можна пояснити тривалішим часом виживання НК в складі агрегатів та їх паракринним впливом на

пошкоджену нервову тканину порівняно з НК в складі суспензії [8].

**Висновки.** На основі результатів експерименту, можна зробити висновок, що введення криоконсервованих АНК миші з ІК сприяє більш ефективному відновленню здатності до вироблення тонких навичок та мінімізації асиметрії сенсорно-моторного дефіциту порівняно з суспензією криоконсервованих НК.

**Перспективи подальших досліджень.** Виходячи з отриманих результатів, цілком природно взяти до уваги ефективність проведення повторного введення агрегатів нейтральних кліток.

### Література

1. Andres RH, Guzman R, Ducray AD, Mordasini P, Gera A, Barth A, et al. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Focus*. 2008 Jan 21;24(3-4):E15.
2. Detante O, Jaillard A, Moisan A, Farve IMA. Bioterapies in stroke. *Revue Neurologique*. 2014 Nov 6;170:779-98.
3. MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, Buist R, Peeling J, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Aug 29;28:516-25.
4. Cordeiro MF, Horn AP. Stem cell therapy in intracerebral hemorrhage rat model. *World J Stem Cells*. 2015 Apr 26;7(3):618-29.
5. Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, Pera M, Reinhartz E, Itzik A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neuronal progenitors improves behavioral deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells*. 2004;22(7):1246-55.
6. Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim M, Roh. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2003 Sep;34:2258-63.
7. Sukach AN, vynakhidnyk; IPKK NAN Ukrainy, patentovlasnyk. Metod otrymannya neiralnykh prohenitornykh klityn. Patent Ukrainy № 119411. 2017 Ver. 25. [in Ukrainian].
8. Sukach AN, Liashenko TD, Shevchenko MV. Svoistva izolirovannykh kletok nervnoi tkani novorozhdennykh kryss v kulture. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(3):63-8. [in Russian].
9. Sukach AN, vynakhidnyk; IPKK NAN Ukrainy, patentovlasnyk. Metod kriokonservuvannya izoliovanykh neiralnykh klityn. Patent Ukrainy № 127057. 2018 Lyp. 10. [in Ukrainian].
10. Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB. The "staircase test": a measure of independent forelimb reach and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods*. 1991;36:219-28.
11. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med*. 2010 Jul 19;2(1):13. DOI: 10.1186/2040-7378-2-13
12. Beray-Berthet V, Delifer C, Besson VC, Girgis H, Coqueran B, Plotkine M, et al. Long-term histological and behavioural characterisation of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats. *J Neurosci Methods*. 2010 Jun 19;191:180-90.
13. Artamentova LO, Utevska OM. Statystyka dlia biolohiv. Kharkiv: HTMT; 2014. 331 s. [in Ukrainian].
14. Sukach AN, Liashenko TD. Rol' formirovaniya agregatov v protsesse vyzhivaniya izolirovannykh nervnykh kletok novorozhdennykh kryss posle kriokonservirovaniya. *Problemy kriobiologii*. 2011;21(4):395-405. [in Russian].
15. Donatella DF, Merlini A, Laterza C, Martino G. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. *Curr Opin Neurol*. 2012 Jun;25(3):322-33.
16. Hagg T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *The Neuroscientist*. 2009 Feb;15(1):20-7. DOI: 10.1177/1073858408324789
17. Matarredona ER, Talaverón R, Pastor AM. Interactions between neural progenitor cells and microglia in the subventricular zone: physiological implications in the neurogenic niche and after implantation in the injured brain. *Front Cell Neurosci*. 2018 Aug 20;12:268. DOI: 10.3389/fncel.2018.00268
18. Marques BL, Carvalho GA, Freitas EM, Chiarelli RA, Barbosa TG, Di Araújo AG, et al. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [Internet]. 2018 Dec 5. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.12.003>
19. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS*. 2002 May 16;99(18):11946-50. DOI:10.1073/pnas.182296499
20. Ryu S, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural Regen Res*. 2016 Feb;11(2):298-304.
21. Lim DA, Alvarez-Buylla A. The adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 May 2;8(5). DOI: 10.1101/cshperspect.a018820

### ДИНАМІКА ПОВЕДІНКОВИХ ТЕСТІВ У ЩУРІВ З ІНТРАЦЕРЕБРАЛЬНИМ КРОВОВИЛИВОМ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ НЕЙРАЛЬНИХ КЛІТИН

Золотко К. М., Сукач О. М., Компанієць А. М.

**Резюме.** Інтрацеребральний крововилив супроводжується важкими ускладненнями і високою смертністю. Ефективних методів лікування цього захворювання в даний час не існує.

Метою роботи було вивчення впливу введення криоконсервованих нейральних клітин головного мозку щурів, а також їх агрегатів на відновлення рухової активності тварин після інтрацеребрального крововиливу.

Експериментальним тваринам вводили криоконсервовані нейральні клітини, а також агрегати нейральних клітин. Контрольним тваринам вводили середу DMEM/F12 (1-й контроль) і зруйновані нейральні клітини (2-й контроль).

В результаті дослідження виявилось, що найбільш виражений і тривалий ефект спостерігався в групі застосування агрегатів нейральних клітин за рахунок їх паракринного стимулюючого впливу. Це може бути обу-

мовлено більш тривалим виживанням клітин у складі агрегатів в несприятливих умовах ішемії і запалення у порівнянні з нейральними клітинами, які виявилися менш ефективними.

**Ключові слова:** інтрацеребральний крововилив, щури, кріоконсервовані нейральні клітини, агрегати, імплантація, сходовий тест, тест кутового повороту, тест видалення липкої стрічки.

### ДИНАМИКА ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТОВ У КРЫС С ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНЫМ КРОВОИЗЛИЯНИЕМ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК

**Золотко К. Н., Сукач А. Н., Компаниец А. М.**

**Резюме.** Интрацеребральное кровоизлияние сопровождается тяжелыми осложнениями и высокой смертностью. Эффективных методов лечения этого заболевания в настоящее время не существует.

Целью работы явилось изучение влияния введения кріоконсервированных нейральных клеток головного мозга плодов крыс, а также их агрегатов на восстановление двигательной активности животных после интрацеребрального кровоизлияния.

Экспериментальным животным вводили кріоконсервированные нейральные клетки, а также агрегаты нейральных клеток. Контрольным животным вводили среду DMEM/F12 (1-й контроль) и разрушенные нейральные клетки (2-й контроль).

В результате исследования выявилося, что наиболее выраженный и продолжительный эффект наблюдался в группе применения агрегатов нейральных клеток, за счет паракринного стимулирующего воздействия. Это может быть обусловлено более длительным выживанием клеток в составе агрегатов в неблагоприятных условиях ишемии и воспаления по сравнению с нейральными клетками, которые оказались менее эффективными.

**Ключевые слова:** интрацеребральное кровоизлияние, крысы, кріоконсервированные нейральные клетки, агрегаты, имплантация, лестничный тест, тест углового поворота, тест удаления липкой ленты.

### THE DYNAMICS OF BEHAVIORAL TESTS IN RATS WITH INTRACEREBRAL HEMORRHAGE AFTER THE INJECTION OF CRYOPRESERVED NEURAL CELLS

**Zolotko K. M., Sukach O. M., Kompaniets A. M.**

**Abstract.** Intracerebral hemorrhage is accompanied by severe complications and high mortality. Effective treatment of this disease does not currently exist. Cryopreserved neural cells therapy can be one such approach.

*The aim of the study* was to investigate the effect of rat fetuses cryopreserved neural brain cells, as well as their aggregates injection on the rehabilitation of the animals' motor activity after intracerebral hemorrhage.

*Object and methods of research.* The experiments have been conducted on 33 white outbred male rats having weights from 250 to 350 grams. All animals were operated on to model intracerebral hemorrhage in the striatum.  $1.5 \times 10^6$  cryopreserved neural cells as well as aggregates of neural cells were injected into the lateral ventricles of experimental animals. The rats of the 1-st control group were implanted with DMEM/F12 medium. The animals of the 2-d control group were implanted with destroyed cells. Functional impairment in rats after intracerebral hemorrhage was assessed by the results of the staircase test, the adhesive removal test and the corner turn test. Testing was carried out before the experiment, as well as after 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after the intracerebral hemorrhage modelling. The statistical significance of the obtained results was assessed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests for pairwise comparisons at a significance level of 0.05. The median was used as the mean.

*Result and discussion.* It was found that destroyed neural cells had a moderate positive effect for 2 days, which became apparent in the improvement in skilled reaching tasks. Neural cells had a short-term effect during the 1-st week in the recovery of subtle skills and tactile sensitivity. The aggregates of neural cells contributed to the restoration of subtle skills and tactile sensitivity during the first 7 days. After 21 days, the neural cells' aggregates application was effective in reducing the asymmetry of sensory-motor deficit and the restoration of skilled reaching tasks. The cell implantation effectiveness can be explained by paracrine stimulating effects of the neural cells. The higher efficacy of the aggregates may be the result of their longer survival under unfavorable conditions of ischemia and inflammation compared to neural cells.

*Conclusions.* It was shown that the implantation of cryopreserved neural cells' aggregates to rats with intracerebral hemorrhage contributes to a more effective recovery of behavioral tests compared with a suspension of cryoconserved neural cells.

**Key words:** intracerebral hemorrhage, rats, cryopreserved, neural cells, aggregates, staircase test, corner turn test, adhesive removal test.

*Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.*

*Стаття надійшла 18.07.2019 року*