

UDC 611.018.013.395:615.361:611.018.82.013]:57.086.13:616.831-005.1-092.9-089.843

К.М. Золотко^{1,3*}, О.М. Сукач^{2,4}, А.М. Компанієць¹, Н.Є. Пірятінська³

Вплив комбінованого введення кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин та агрегатів нейральних клітин на відновлення рухової активності щурів із інтрацеребральним крововиливом

UDC 611.018.013.395:615.361:611.018.82.013]:57.086.13:616.831-005.1-092.9-089.843

К.М. Zolotko^{1,3*}, О.М. Sukach^{2,4}, А.М. Kompaniets¹, N.E. Piriatsinska³

Impact of Combined Administration of Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells and Neural Cell Aggregates on Recovery of Motor Activity in Rats with Intracerebral Hemorrhage

Реферат: У роботі вивчали вплив введення кріоконсервованих нейральних клітин у складі агрегатів нейральних клітин (АНК) із мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК) на відновлення поведінкових функцій і рухової активності щурів після інтрацеребрального крововиливу (ІК). Моделювання ІК проводилося методом стереотаксичного введення колагенази у стріатум щурів, що призводило до зникнення чутливості на ураженій стороні, порушення рухової активності та значної асиметрії сенсорно-моторного дефіциту у тварин. Кріоконсервовані нейральні клітини ($1,5 \times 10^6$ кл) у складі агрегатів та кріоконсервовані МСК ($1,0 \times 10^6$ кл) імплантували в шлуночки головного мозку щурів. Експериментально встановлено статистично значуще відновлення відчуття дотику, покращення виконання тонких навичок, зменшення асиметрії сенсорно-моторного дефіциту у щурів із ІК після імплантації кріоконсервованих АНК, а також комбінації останніх із МСК. Введення кріоконсервованих МСК із АНК приводило до більш раннього покращення поведінково-рухових функцій у щурів із ІК порівняно з тваринами, яким вводили тільки АНК.

Ключові слова: інтрацеребральний крововилив, щури, кріоконсервування, агрегати, нейральні клітини, мезенхімальні стовбурові клітини, імплантація, поведінкові тести.

Abstract: The effect of implantation of cryopreserved neural cells (NCs) within the neural cells aggregates (NCAs) together with mesenchymal stem cells (MSCs) on the recovery of rat behavioural functions and motor activity after intracerebral hemorrhage (ICH) has been studied. The ICH was simulated by stereotactic injection of collagenase into rat striatum, resulted in loss of sensitivity on the affected side, disorder in motor activity and significant asymmetry of sensory-motor deficits in animals. The cryopreserved NCs (1.5×10^6 cells) within the aggregates and cryopreserved MSCs (1.0×10^6 cells) were implanted into the lateral ventricles of rat brain. A significant recovery of tactile sensitivity, improvement in the skilled tasks performance, as well as a decrease in the asymmetry of sensory-motor deficits in the ICH rats after implantation of cryopreserved NCAs, as well as the combination of the latter with MSCs, have been experimentally established. The implantation of cryopreserved MSCs together with NCAs led to an earlier improvement in behavioural-motor functions in rats with ICH as compared to the animals received the NCAs only.

Key words: intracerebral hemorrhage, rats, cryopreservation, aggregates, neural cells, mesenchymal stem cells, implantation, behavioral tests.

Інтрацеребральний крововилив (ІК) є поширеною інвалідизуючою патологією головного мозку з високим рівнем смертності. На сьогодні не існує ефективних методів лікування даної патології [7], у зв'язку з чим актуальною є розробка нових підходів до лікування ІК. Одним із способів лікування може бути застосування клітинної терапії з використанням нейральних клітин (НК), які можуть диференціюватися у нейрони, клітини глії та продукувати біологічно активні фактори [3, 7].

An intracerebral hemorrhage (ICH) is a common, disabling brain pathology with a high mortality rate. To date, due to no efficient therapies exist [2], of topicality is to design the novel approaches to ICH treatment. Cell therapy with neural cells (NCs), which can differentiate into neurons, glial cells and produce biologically active factors, may be one of these methods [2, 14]. As we previously reported [18], the implantation of cryopreserved neural cells into the lateral ventricle of rat brain

¹ Відділ кріопротекторів,

² Відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

³ Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

⁴ Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С. Сковороди

¹ Department of Cryoprotectants,

² Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

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

⁴ H.S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

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

*To whom correspondence should be addressed:

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

Надійшла 04.12.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

Received December, 04, 2019

Accepted April, 23, 2020

© 2020 K.M. Zolotko, 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.

У нашій попередній роботі [1] показано, що імплантація кріоконсервованих нервових клітин у бічний шлуночок мозку щурів із ІК покращувала відновлення рухових навичок тварин. Імплантація НК у складі агрегатів нейральних клітин (АНК) продемонструвала більш високу ефективність у порівнянні з введенням НК у складі суспензії, однак повного відновлення рухової активності за період експерименту не спостерігалося [1]. Збільшенню ефективності дії НК, окрім їх імплантації у складі агрегатів, може сприяти сумісне введення з мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК), які мають властивість пригнічувати імунну відповідь і захищати від надмірної дії запальних реакцій [7, 15].

Мета роботи – вивчення впливу введення кріоконсервованих агрегатів нейральних клітин та їх комбінації з кріоконсервованими мезенхімальними стовбуровими клітинами на відновлення рухової активності щурів після інтрацеребрального крововиливу.

Матеріали і методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) із дотриманням вимог комітету з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол №14 від 25.11.2010), узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Експерименти виконували на 23 білих безпородних 11–13-місячних щурах-самцях масою 300–400 г. Усіх тварин було розділено на групи: 1 (контрольна, $n = 9$) – введення 30 мкл культурального середовища DMEM/F12; 2 (дослідна АНК, $n = 7$) – введення суспензії АНК, що містили приблизно $1,5 \times 10^6$ кл у 30 мкл DMEM/F12; 3 (дослідна група АНК/МСК, $n = 7$) – введення АНК, що містили приблизно $1,5 \times 10^6$ кл разом із 1×10^6 МСК у 45 мкл DMEM/F12.

Моделювання ІК здійснювали під загальною анестезією 15 мг/кг пропофолу («Daewon Pharmaceutical Co. Ltd.», Південна Корея / Швейцарія) та 5 мг/кг седазину («Biowet Puławy Sp.», Польща), які вводили внутрішньочеревно у співвідношенні 3/1. У стріатум щурів через голку діаметром 0,47 мм повільно вводили 0,2 од. колагенази IV типу («Sigma-Aldrich», США) в 1 мкл фізіологічного розчину. Стереотаксичні координати введення колагенази: передньозадня – 0,2 мм попереду від брегми, медіолатеральна – 3,0 мм із лівого боку від брегми, глибина – 6 мм. Через 5 хв піс-

with ICH improved the restoration of animal motor skills. The NCs implantation within the neural cell aggregates (NCAs) demonstrated a higher efficiency as compared to NCs administration within the suspension, but no complete recovery of motor activity during the experiment was observed [18]. An increased efficiency of NCs, in addition to their implantation within aggregates, may be provided by mutual administration with mesenchymal stem cells (MSCs), which have the property to suppress the immune response and protect against excessive inflammatory response [2, 11].

The research aim was to study the impact of implantation of cryopreserved neural cell aggregates and their combination with cryopreserved mesenchymal stem cells on the motor activity restoration in rats after intracerebral hemorrhage.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ (N 3447-IV of February 21, 2006), agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of M.I. Pirogov Vinnytsia National Medical University (protocol N14 of November 25, 2010). The experiments were performed in 23 white outbred 11–13-month-old male rats weighing 300–400 g. All the animals were divided into the following groups: group 1 (control, $n = 9$) received 30 μ l DMEM / F12 culture medium; group 2 (NCAs, $n = 7$) was administered with NCAs suspension containing approximately 1.5×10^6 cells in 30 μ l of DMEM/F12; group 3 (NCAs / MSCs, $n = 7$) was injected with NCAs, containing approximately 1.5×10^6 cells together with 1×10^6 MSCs in 45 μ l DMEM/F12.

The ICH was simulated under general anesthesia with 15 mg/kg of propofol (Daewon Pharmaceutical Co. Ltd., South Korea/Switzerland) and 5 mg/kg of Sedazine (Biowet Puławy Sp., Poland), administered intraperitoneally in 3/1 ratio. Using 0.47 mm needle, 0.2 U of type IV collagenase (Sigma-Aldrich, USA) in 1 μ l of saline were slowly introduced into the rat striatum. Stereotactic coordinates of collagenase administration were as follows: 0.2 mm anteroposterior in front of the bregma, 3.0 mm mediolateral on the left side of the bregma, 6 mm depth. Five minutes after injection, the needle was removed and the wound was sutured [8]. The next day after ICH formation, the group 2 was injected with 30 μ l DMEM / F12



ля введення голку вилучали і на рану накладали шви [13]. На наступну добу після формування ІК у бічний шлуночок мозку вводили 30 мкл середовища DMEM/F12 («Sigma», США) з АНК у групі 2 або 45 мкл DMEM/F12 з АНК та МСК у групі 3. Стереотаксичні координати: передньо-задня – 0,9 мм позаду від брегми, медіолатеральна – 1,4 мм справа від брегми, глибина – 3,4 мм.

Розрахунок необхідної кількості трансплантованих клітин проводили на підставі попередньо проведених досліджень [6, 7, 14]. Різниця в об'ємі суспензій, які вводили щурам дослідних груп, пояснюється додатковою кількістю клітин (1×10^6 кл) у групі 3, а також відсутністю можливості концентрування клітин для зменшення об'єму суспензій через загибель МСК і НК у складі агрегатів під час центрифугування при 100g.

Для формування агрегатів нейральні клітини, виділені з головного мозку щурів 15–16 днів гестації методом вібрації [5], культивували в концентрації 2×10^6 кл/мл у збагаченому середовищі DMEM/F12, що містило 10% сироватки. При цьому близько 75% клітин самостійно об'єднувалися в агрегати, діаметром від 50 до 250 мкм [4]. Таким чином, суспензія АНК після 5 хв центрифугування при 100g містила приблизно 5×10^7 кл/мл ($1,5 \times 10^6$ кл / 30 мкл). Мезенхімальні стовбурові клітини отримували в процесі культивування 5×10^5 кл/мл, виділених із печінки щурів 15–16 днів гестації, у CO₂-інкубаторі у середовищі DMEM/F12 із 10% сироватки. Після третього пересіву клітини знімали з підкладки та кріоконсервували. Відталу суспензію МСК центрифугували 5 хв при 100g, підраховували кількість клітин у 1 мл осаду і, в разі потреби, розбавляли середовищем DMEM/F12 до концентрації $6,7 \times 10^7$ кл/мл (1×10^6 кл/15 мкл). Кріоконсервування АНК та МСК проводили під захистом 10% ДМСО шляхом заморожування зі швидкістю 1 град/хв до -80°C , після чого клітини переносили в рідкий азот. Відтавання АНК та МСК здійснювали на водяній бані при 40°C , після чого з цих суспензій відмивали ДМСО. Перед визначенням кількості АНК проводили їх дезагрегування на поодинокі НК за допомогою вібрації [5]. Підрахунок кількості МСК і НК, а також оцінку їх життєздатності здійснювали у камері Горяєва після фарбування трипановим синім.

Функціональні порушення у щурів після ІК оцінювали за результатами поведінкових тестів. Кожну тварину в експерименті протестували 9 разів. Перший раз перед моделюванням ІК для кожного щура розраховували середнє арифметичне трьох останніх тренувань, за винятком тесту

(Sigma, USA) with NCAs into the lateral ventricle of the brain, and it was 45 μl DMEM / F12 with NCAs and MSCs for group 3. Stereotaxic coordinates were as follows: 0.9 mm anterior-posterior behind the bregma, 1.4 mm mediolateral to the right of the bregma, 3.4 mm depth.

The cell number needed for transplantation was calculated proceeding from the previously reported findings [1, 2, 9]. The difference in the suspension volume, administered to the rats of experimental groups is explained by an additional number of cells (1×10^6 cells) in group 3, and the impossibility to concentrate the cells for reducing the suspension volume due to MSCs and NCs death within aggregates during centrifugation at 100g.

To form the aggregates, the neural cells, isolated from rat brain of 15–16 days of gestation by vibration [16] were cultured at 2×10^6 cells / ml concentration in the enriched DMEM / F12 medium, containing 10% serum. Herewith, about 75% of cells were self-assembled into aggregates with a diameter from 50 to 250 μm [15]. Thus, the NCAs suspension after 5 min centrifugation at 100g contained approximately 5×10^7 cells / ml ($1,5 \times 10^6$ cells / 30 μl). Mesenchymal stem cells were obtained during culturing of 5×10^5 cells / ml, isolated from rat liver of 15–16 days of gestation in a CO₂ incubator in DMEM / F12 medium with 10% serum. After the third passage, the cells were removed from the substrate and cryopreserved. A thawed suspension of MSCs was centrifuged for 5 min at 100g, the number of cells was counted in 1 ml of precipitate, and diluted, if necessary, with DMEM / F12 medium up to $6,7 \times 10^7$ cells / ml (1×10^6 cells / 15 μl) concentration. The NCAs and MSCs were cryopreserved with 10% DMSO by freezing with 1 deg/min rate down to -80°C , then the cells were transferred into liquid nitrogen. The NCAs and MSCs were thawed in a water bath at 40°C , afterwards DMSO was washed out from these suspensions. Prior to determine the number of NCAs, they were disaggregated into single NCs using vibration [16]. The number of MSCs and NCs was calculated, as well as their viability was assessed in Goryaev's chamber after trypan blue staining.

Functional disorders in ICH rats were evaluated by behavioral test results. Each animal was tested 9 times in the experiment. First, before the ICH simulation, for each rat we calculated the arithmetic mean of the last three training sessions, excepting the single pellet reaching test, where the last 5 training sessions were counted. Then, the re-



однієї гранули, у якому для підрахунку брали 5 останніх тренувань. Потім оцінювали результати тестів, які проводили на 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35 і 42-у доби після моделювання ІК. Час проведення тестів: з 10.00 до 13.00.

Тест однієї гранули [12] проводили для оцінки у щурів набутих під час навчання тонких моторних навичок – здатності діставати їстівні гранули. Для цього тварин поміщали в скляний бокс із отвором у 1 см, через який щури могли діставати їстівні гранули (45 мг кожна; «Bio-Serv», США). Ці гранули підкладали в луночку на стілець контрлатерально від паралізованої кінцівки для виключення використання здорової лапи. Успішною вважали спробу, коли щур схоплював гранулу з першої спроби діставав її лапою та з'їдав. Підраховували відсоток успішних спроб.

Тест видалення липкої стрічки проводили для оцінки порушення відчуття дотику: дві липкі стрічки однакового розміру 1×1 см («Urgosyval® Laboratoires Urgo», Франція) послідовно приклеювали до внутрішньої поверхні передніх лап щурів. Ефективність тактильної відповіді оцінювалася за часом видалення липкої стрічки. До моделювання ІК щури попередньо тричі тренували для виконання тесту [16].

Асиметрію сенсорно-моторного дефіциту оцінювали за допомогою тесту кутового повороту, для чого щура поміщали головою вперед у кут, рівний 30° . Це приводило до стимулювання вібрис на обох сторонах голови, і змушувало тварину вставати, повертаючись через праву або ліву лапу. Підраховували кількість поворотів під час вставання щура на дві задні лапи через сторону, контрлатеральну ІК [16].

Статистичну значущість змін після моделювання ІК визначали за Т-критерієм Вілкоксона. Значущість відмінностей показників у групах оцінювали за критерієм Крускала-Волліса і Манна-Уїтні для попарних порівнянь при рівні значущості $\alpha < 0,05$. Результати далі подаються як медіана, з зазначенням у дужках показників 1-ї і 3-го кватилів.

Результати та обговорення

Життєздатність деконсервованих МСК складала 75% (68%; 79%). Життєздатність клітин у складі деконсервованих АНК становила 78% (67%; 83%). У культурі клітини агрегатів після їх прикріплення до підкладки мігрували й диференціювалися в нейрони та клітини глії, формуючи моношар, на якому з часом утворювалися колонії нейральних стовбурових/прогеніторних, комітованих і незрілих диференційованих нейральних клітин [2].

sults of tests, performed to days 1, 2, 7, 15, 21, 28, 35 and 42 after ICH simulation, were assessed. All testing was conducted between 10.00 a. m. and 1.00. p. m.

The single pellet reaching test [7] was performed in rats to evaluate the fine motor skills, acquired during training, *i. e.* the ability to retrieve the food pellets. For this purpose, the animals were placed into a glass box with a 1 cm opening through which the rats could retrieve the food pellets (45 mg each; Bio-Serv, USA). These pellets were placed in a hole on the chair contralateral to the paralyzed limb to avoid the other paw using. The attempt was considered successful if the rat grabbed the pellet on the first reach attempt, retrieved it with its paw and ate it. The percentage of successful attempts was calculated.

The adhesive removal test was performed to assess the disorder in tactile sensitivity: two adhesive tapes of the same size (1×1 cm) (Urgosyval® Laboratoires Urgo, France) were gradually applied onto the inner surface of rat forepaws. The efficiency of tactile response was evaluated by measuring the time-to remove it. Prior to ICH simulation, the rats were previously trained three times to perform the test [12].

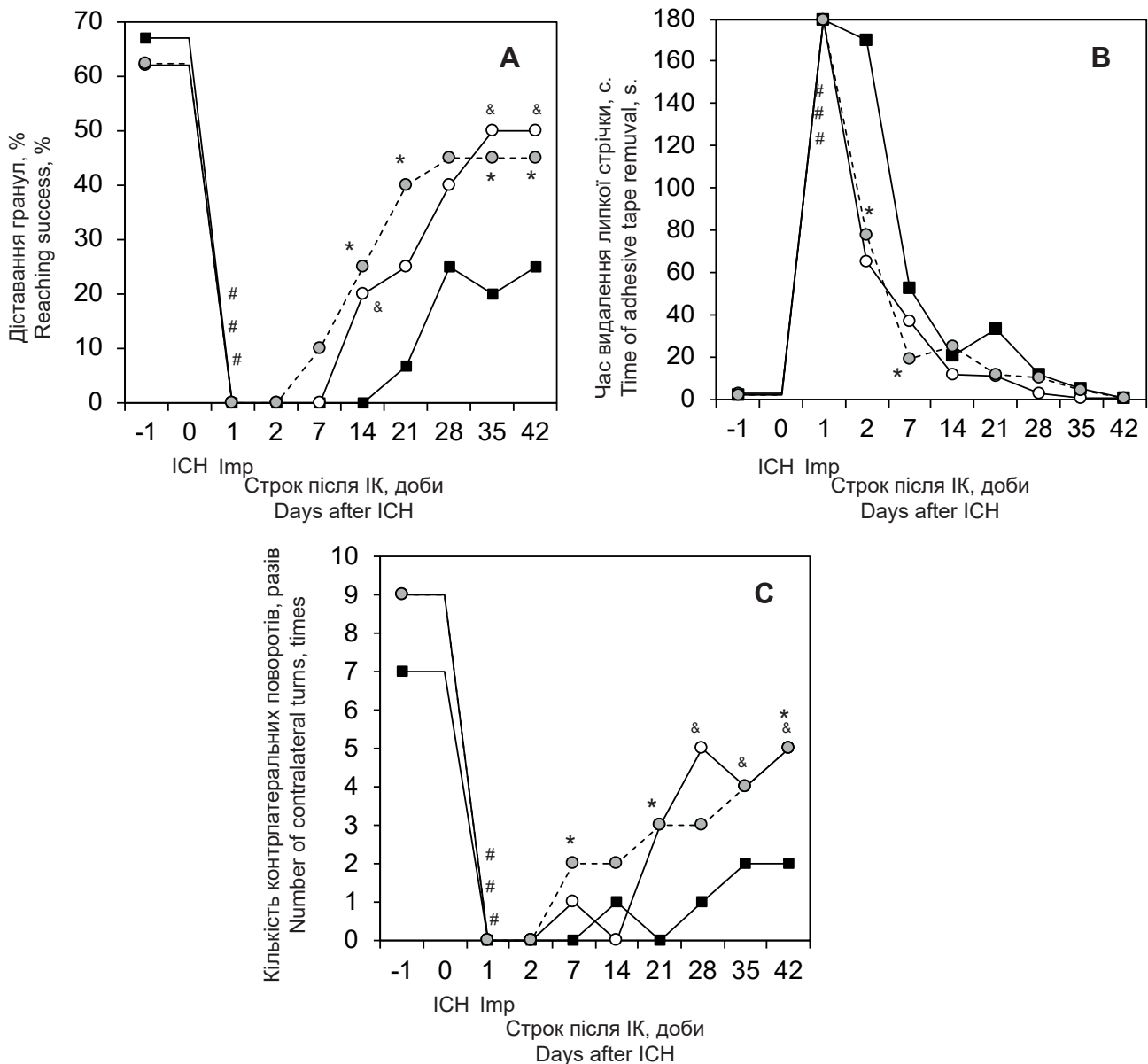
The asymmetry of sensory-motor deficits was assessed using the corner turn test, where the rat was placed with the head forward into the 30° angle. This resulted in whisker stimulation on both sides of the head, and forced the animal to stand up, turning through the right or left paw. The number of turns was counted when the rat stood up on two hind paws through the side, contralateral to ICH [12].

The significance of changes after ICH modeling was determined by the Wilcoxon signed-rank test. Significant difference between these groups was assessed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney criteria for paired comparisons at a significance level of $\alpha < 0.05$. The results were then reported as the median, with specifying the first and third quartiles in parenthesis.

Results and discussion

The viability of warmed MSCs was 75% (68%; 79%). The cell viability within the warmed NCAs was 78% (67%; 83%). In culture, the aggregate cells following attachment to the substrate migrated and differentiated into the neurons and glial cells, by forming a monolayer, where the colonies of neural stem / progenitor, committed and immature differentiated neural cells were eventually formed [10].





Оцінка ефективності імплантації у тварин групи 1 (контроль) (—■—), групи 2 (АНК) (—○—) та групи 3 (АНК/МСК) (—●—). **A** – відновлення тонких навичок у тварин за результатами тесту однієї гранули; **B** – відновлення відчуття дотику у тварин за результатами тесту видалення липкої стрічки; **C** – ступінь асиметрії сенсорно-моторного дефіциту, що виражається у зручності використання ураженої кінцівки, за результатами тесту кутового повороту. ICH – моделювання інтрацеребрального крововиливу; Imp – імплантація клітин або середовища DMEM/F12. # – відмінності в усіх групах статистично значущі порівняно з тваринами у цих самих групах до ІК, $p < 0,01$. * – відмінності у групі 2 (&) та 3 (*) статистично значущі по відношенню до контрольної групи, $p < 0,05$.

Evaluation of implantation efficiency in animals of group 1 (control) (—■—), group 2 (NCAs) (—○—) and group 3 (NCAs/MSCs) (—●—). **A** – restoration of animal fine skills by the single pellet test results; **B** – recovery of tactile sensitivity in animals by the adhesive removal test results; **C** – asymmetry rate of sensory-motor deficits, manifested in comfortable use of affected limb by the corner turn test results. ICH – intracerebral hemorrhage modeling; Imp – implantation of cells or DMEM/F12 medium. # – differences between groups are significant as compared to animals within the same groups prior to ICH, $p < 0.01$. * – differences between groups 2 (&) and 3 (*) are significant as compared to the control, $p < 0.05$.

На 1-у добу після моделювання ІК у всіх групах тварин відзначалося значуще погіршення результатів у кожному з поведінкових тестів (рисунок).

На 2-у добу після ІК (1-а доба після введення клітин) у щурів груп 2 та 3 відзначалося

To day 1 after ICH modeling, the results in each behavioral test aggravated significantly in all groups of animals (Figure).

To day 2 after ICH (day 1 after cell administration), the time-to-remove the adhesive tape redu-

зменшення часу видалення липкої стрічки до 65 та 78 с відповідно у порівнянні з контрольною групою (170 с) ($p < 0,05$; рисунок В). У тестах однієї гранули та кутового повороту в жодній групі не було покращення результатів. На 7-у добу в тесті однієї гранули у групі 3 спостерігалася тенденція до збільшення кількості з'їдених гранул у порівнянні з групою 2 ($p = 0,10$; рисунок А). У групі 3 відзначалося зменшення часу видалення липкої стрічки до 19 с у порівнянні з контролем (53 с) ($p < 0,05$). Щури групи 3 почали повертатися 2 (0,5; 5) рази через контрлатеральну сторону на відміну з контрольною групою, у якій більшість тварин поверталася тільки через неуражену сторону ($p < 0,05$; рисунок С). На 14-у добу тварини у групах 2 та 3 брали 20 і 25% гранул відповідно у порівнянні з контрольною групою, де більшість щурів ще не брала гранул ($p < 0,05$; рисунок А). На 21-у добу у щурів групи 3 виявлено збільшення кількості з'їдених гранул до 40% у порівнянні з контрольною групою (6,7%) ($p < 0,05$). Також спостерігалася тенденція до збільшення кількості з'їдених гранул у групі 2 порівняно з контролем ($p = 0,07$) та у групі 3 порівняно з групою 2 ($p = 0,15$; рисунок А). Крім того, у щурів групи 3 збільшилася кількість контрлатеральних поворотів до 3 (1; 7) разів порівняно з контрольною групою, у якій більшість тварин через уражену сторону не поверталася ($p < 0,05$; рисунок С). На 28-у добу у групі 2 спостерігали збільшення кількості контрлатеральних поворотів до 5 разів порівняно з контролем (1 раз) ($p < 0,05$; рисунок С). На 35-у добу у групах 2 і 3 виявлено збільшення кількості взятих гранул до 50 та 45% відповідно у порівнянні з контролем (20%) ($p < 0,05$; рисунок А). У групі 2 спостерігалася збільшення кількості контрлатеральних поворотів до 4 разів у порівнянні з контролем (2 рази) ($p < 0,05$; рисунок С). На 42-у добу у групах 2 і 3 виявлено більшу кількість взятих гранул: 50 та 45% відповідно у порівнянні з контролем (25%) ($p < 0,05$; рисунок А). У групах 2 і 3 спостерігалася збільшення кількості поворотів до 5 разів у порівнянні з контрольною групою (2 рази) ($p < 0,05$; рисунок С).

Імплантація кріоконсервованих АНК продемонструвала ефективність у відновленні порушених ІК поведінкових тестів: покращення відчуття дотику на 2-у добу, відновлення тонких навичок і зменшення асиметрії сенсорно-моторного дефіциту, починаючи з 14- та 21-ї доби відповідно. Зазначені зміни, скоріше всього, обумовлені зменшенням набряку та здавлювання внутрішньої капсули (покращення відчуття дотику), що

ced down to 65 and 78 s in the rats of group 2 and 3, respectively, as compared to the control group (170 s) ($p < 0.05$; Fig. B). No group demonstrated the improved results in the single pellet reaching test and the corner turn test. To day 7, when performing the single pellet reaching test, the group 3 showed the tendency to increase in the number of eaten pellets as compared to the group 2 ($p = 0.10$; Fig. A). The time-to-remove the adhesive tape was reduced down to 19 s in the group 3 as compared to the control (53 s) ($p < 0.05$). In the group 3, the rats began to turn 2 times (0.5; 5) through the contralateral side as compared to the control group, where most animals turned through the unaffected side only ($p < 0.05$; Fig. C). To day 14, the animals from groups 2 and 3 retrieved 20 and 25% of pellets, respectively, as compared to the control group, where most rats had not retrieved pellets yet ($p < 0.05$; Fig. A). To day 21, we revealed an increased number of eaten pellets up to 40% in the rats of group 3 as compared to the control group (6.7%) ($p < 0.05$). The tendency to increase the number of eaten pellets was observed in group 2 as compared to the control ($p = 0.07$) and in group 3 versus group 2 ($p = 0.15$; Figure A). In addition, an increased number of contralateral turns up to 3 times (1; 7) was noted in the rats from group 3 as compared to the control group, where most animals did not turn through an affected side ($p < 0.05$; Fig. C). To day 28, the number of contralateral turns augmented up to 5 times in group 2 as compared to the control (1 time) ($p < 0.05$; Fig. C). To day 35, the groups 2 and 3 showed an increase number of retrieved pellets up to 50 and 45%, respectively, as compared to the control (20%) ($p < 0.05$; Figure A). An increased number of contralateral turns up to 4 times was observed in the group 2 as compared to the control (2 times) ($p < 0.05$; Figure C). To day 42, the groups 2 and 3 showed a higher number of retrieved pellets, *i. e.* 50 and 45%, respectively, as compared to the control (25%) ($p < 0.05$; Fig. A). An increase in the turn number up to 5 times was observed in groups 2 and 3 as compared to the control group (2 times) ($p < 0.05$; Fig. C).

The implantation of cryopreserved NCAs demonstrated the efficiency in restoring the ICH-impaired behavioral tests such as: the improvement in tactile sensitivity to day 2, restoration of fine skills and reduction of asymmetry of sensory-motor deficits, starting to days 14 and 21, respectively. The mentioned changes were most likely stimulated by reduction of swelling and compression of internal capsule (improvement of tactile sensitivity),



сприяло відновленню синаптичної передачі між нейронами стріатуму, які вціліли (покращення виконання тонких моторних навичок), та появи у щурів відчуття більшої зручності у використанні ураженої кінцівки (зменшення асиметрії сенсорно-моторного дефіциту) [16].

Відомо, що нейральні стовбурові клітини (НСК), які входять у склад імплантованих НК, можуть проліферувати та диференціюватися у такі лінії нейральних клітин як астроцити, олигодендроцити та нейрони [10]. Імплантовані НСК також секретують індукований гіпоксією фактор альфа-1 та фактор росту судинного ендотелію, що підвищує нейропластичність ендогенних НСК [17]. З іншого боку МСК пригнічують апоптоз та мають значний протизапальний вплив, обумовлений зниженням міграції Т-лімфоцитів [9, 15], а також експресії аквапорину-4 в астроцитах, що сприяє зменшенню набряку та проникності гемато-енцефалічного бар'єру [18]. Мезенхімальні стовбурові клітини також секретують декілька нейротрофічних цитокінів: VEGF, VEGFR-3, BDNF, IGF-2, тирозингідроксилазу та фактор росту гепатоцитів, що може сприяти регенерації нейронів в уражених ділянках мозку [11]. Н. Huang і співавт. [8] провели дослідження впливу внутрішньошлуночкового введення МСК на перебіг ІК. При цьому було встановлено покращення результатів у поведінкових тестах (тест асиметрії передньої кінцівки), стимулювання нейрогенезу та зменшення об'єму крововиливу. Однак за результатами цього дослідження у перигематомній зоні не було знайдено імплантованих МСК, що свідчить про відсутність міграції цих клітин у зону ураження і, переважно, дистанційний вплив МСК після введення їх у шлуночки мозку.

Додавання МСК до імплантованих АНК приводило до більш раннього покращення результатів усіх тестів, а саме: відновлення відчуття дотику протягом 1-го тижня, тенденція до поліпшення виконання тонких навичок із 7- до 21-ї доби, а також збільшення зручності використання ураженої кінцівки на 7- та 14-у доби. Динаміка покращення функцій у групі 3 порівняно з контролем зберігалася до кінця експерименту, хоча результати у цей період майже не відрізнялися від показників групи 2. Більш раннє покращення результатів поведінкових тестів у тварин групи 3 порівняно з групою 2 можна пояснити протизапальною активністю МСК протягом перших днів після інтрацеребрального крововиливу, коли розвивається значне запалення та порушується цілісність гематоенцефалічного бар'єра.

which contributed to the restoration of synaptic transmission between the survived striatum neurons (improved fine motor skills) and the appearance in rats of feeling of more comfortable use of affected limb (decrease in asymmetry of sensory-motor deficits) [12].

It is known that neural stem cells (NSCs) within the implanted NCs may proliferate and differentiate into such neural cell lines as astrocytes, oligodendrocytes, and neurons [5]. The implanted NSCs also secrete the hypoxia-induced alpha-1 factor and vascular endothelial growth factor, which increases the neuroplasticity of endogenous NSCs [13]. The MSCs, for their part, suppress the apoptosis and have a significant anti-inflammatory effect due to a decreased migration of T-lymphocytes [4, 11], and the expression of aquaporin-4 in astrocytes, reducing thereby swelling and blood-brain barrier permeability [17]. Mesenchymal stem cells also produce several neurotrophic cytokines such as: VEGF, VEGFR-3, BDNF, IGF-2, tyrosinhydroxylase, and hepatocyte growth factor, that may promote neural regeneration in the affected brain sites [6]. H. Huang *et al.* [3] have studied the effect of intraventricular delivery of MSCs on ICH course. They revealed the improvement in behavioral test results (anterior limb asymmetry test), stimulation of neurogenesis, and reduction of hemorrhage volume. However, according to this research findings, no implanted MSCs were found in perigematomia area, suggesting thereby that no migration of these cells into the affected area occurred, and MSCs had mostly a distant influence within their delivery into the brain ventricles.

The MSCs supplement to the implanted NCAs entailed an earlier improvement in all tests results, *i. e.* renewal of tactile sensitivity during the 1st week, a tendency to improved fine skills from day 7 to day 21, as well more comfortable use of affected limb to days 7 and 14. The dynamics of function enhancement in group 3 as compared to the control was kept until the experiment end, although the results within this period were almost not different from the indices in group 2. The earlier improvement of behavioral test results in the group 3 animals than in group 2 may be explained by an anti-inflammatory activity of MSCs within the first days after intracerebral hemorrhage, when a significant inflammation develops and the integrity of blood-brain barrier is disrupted.

Conclusions

Thus, from day 14 to day 21, an intraventricular implantation of cryopreserved neural cell aggre-

Висновки

Таким чином, із 14-ї по 21-у доби внутрішньошлуночкова імплантація кріоконсервованих агрегатів нейральних клітин або їх комбінація з мезенхімальними стовбуровими клітинами приводила до значущого та приблизно однакового покращення поведінкових функцій у тварин обох груп порівняно з контролем. Але у щурів, яким додатково вводили мезенхімальні стовбурові клітини, спостерігали більш раннє (7–14 доба) покращення чутливості, координації тонких рухів і відчуття зручності використання ураженої кінцівки, ніж у групі тварин, яким вводили тільки агрегати нервових клітин.

Література

1. Золотько КН, Сукач АН, Компаниец АМ. Динамика поведенческих тестов у крыс с интрацеребральным кровоизлиянием после введения кріоконсервированных нейральных клеток. Вісник проблем біології і медицини. 2019; (3): 108–12.
2. Петренко АЮ, Петренко ЮА, Сукач АН, и др. Кріоконсервирование стволовых прогениторных клеток фетальных тканей. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2012. с. 295–336.
3. Сукач АН, Лебединский АС, Оченашко ОВ, и др. Трансплантация кріоконсервированных нейральных клеток плодов крыс в составе суспензии и многоклеточных агрегатов крысам с повреждением спинного мозга. Клітинна та органна трансплантологія. 2016; 4(1): 14–21.
4. Сукач АН, Ляшенко ТД, Шевченко МВ. Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре. Biotechnol Acta. 2013; 6(3): 63–8.
5. Сукач ОМ, винахідник; Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання нейральних клітин-попередників. Патент України № 119411. 25.09.2017.
6. Chen AZ, Liu N, Huang H, et al. Outgrowth of neuronal axons on adipose-derived stem cell transplanting for treatment of cerebral infarction in rats. Chinese journal of cellular and molecular immunology. 2011; 27(8): 868–71.
7. Detante O, Jaillard A, Moisan A, et al. Bioterapies in stroke. Rev Neurol. 2014; 170: 779–98.
8. Huang P, Freeman WD, Edenfield BH, et al. Safety and efficacy of intraventricular delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in hemorrhagic stroke model. Sci Rep [Internet]. 2019 Apr 5 [Cited 06.04.2020]; 9(1):5674. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42182-1>
9. Jellema RK, Wolfs TG, Lima PV, et al. Mesenchymal stem cells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. PLoS One [Internet]. 2013 Aug 26 [Cited 03.04.2020]; 8(8):e73031. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073031>
10. Leker RR. Fate and manipulations of endogenous neural stem cells following brain ischemia. Expert Opin Biol Ther. 2009; 9: 1117–25.
11. Liang CM, Weng SJ, Tsai TH, et al. Neurotrophic and neuroprotective potential of human limbic-derived me-

gates or their combination with mesenchymal stem cells resulted in a significant and approximately equal improvement in behavioral function in animals of both groups as compared to the control. However, the rats, additionally injected with mesenchymal stem cells demonstrated an earlier improvement (days 7–14) in sensitivity, fine-motor coordination, and in comfortable use of affected limb, than in the group of animals received the neural cell aggregates only.

References

1. Chen AZ, Liu N, Huang H, et al. Outgrowth of neuronal axons on adipose-derived stem cell transplanting for treatment of cerebral infarction in rats. Chinese journal of cellular and molecular immunology. 2011; 27(8): 868–71.
2. Detante O, Jaillard A, Moisan A, et al. Bioterapies in stroke. Rev Neurol. 2014; 170: 779–98.
3. Huang P, Freeman WD, Edenfield BH, et al. Safety and efficacy of intraventricular delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in hemorrhagic stroke model. Sci Rep [Internet]. 2019 Apr 5 [cited 2020 Apr 6]; 9(1):5674. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42182-1>
4. Jellema RK, Wolfs TG, Lima PV, et al. Mesenchymal stem cells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. PLoS One [Internet]. 2013 Aug 26 [cited 2020 Apr 3]; 8(8):e73031. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073031>
5. Leker RR. Fate and manipulations of endogenous neural stem cells following brain ischemia. Expert Opin Biol Ther. 2009; 9: 1117–25.
6. Liang CM, Weng SJ, Tsai TH, et al. Neurotrophic and neuroprotective potential of human limbic-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2014; 16(10): 1371–83.
7. MacLellan CL, Gyawali S, Colbourne F. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. Behav Brain Res. 2006; 175: 82–9.
8. MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. J Cereb Blood Flow Metab. 2008; 28: 516–25.
9. Nonaka M, Yoshikawa M, Nishimura F, et al. Intraventricular transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in intracerebral hemorrhage rats. Neurol Res. 2004; 26(3): 265–72.
10. Petrenko AYU, Petrenko YuA, Sukach AN, et al. [Cryopreservation of stem progenitor cells of fetal tissues]. In: Goltsev AN, editor. [Actual problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkiv: IPCC NASU; 2012. p. 295–336. Russian.
11. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. Mol Ther. 2012; 20(1): 14–20.
12. Schaar KL, Breneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. Exp & Trans Stroke Med [Internet]. 2010 Jul 19 [Cited 2020 Apr 3]; 2:13. Available from: <https://etmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-7378-2-13>
13. Song S, Park JT, Na JY, et al. Early expressions of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor increase the neuronal plasticity of activated endogenous neural stem cells after focal cerebral ischemia. Neural Regen Res. 2014; 9: 912–18.



- senchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2014; 16(10): 1371–83.
12. MacLellan CL, Gyawali S, Colbourne F. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behav Brain Res*. 2006; 175: 82–9.
 13. MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28: 516–25.
 14. Nonaka M, Yoshikawa M, Nishimura F, et al. Intraventricular transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in intracerebral hemorrhage rats. *Neurol Res*. 2004; 26(3): 265–72.
 15. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*. 2012; 20(1): 14–20.
 16. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp & Trans Stroke Med* [Internet]. 2010 Jul 19 [Cited 03.04.2020]; 2:13. Available from: <https://etmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-7378-2-13>
 17. Song S, Park JT, Na JY, et al. Early expressions of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor increase the neuronal plasticity of activated endogenous neural stem cells after focal cerebral ischemia. *Neural Regen Res*. 2014; 9: 912–18.
 18. Tang G, Liu Y, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells maintain blood-brain barrier integrity by inhibiting aquaporin-4 upregulation after cerebral ischemia. *Stem Cells*. 2014; 32: 3150–62.
 19. Sukach AN, Lebedinsky AS, Otchenashko OV, et al. Transplantation of cryopreserved rat fetal neural cells in suspension and in multicellular aggregates into rats with spinal cord injury. *Cell and Organ Transplantation*. 2016; 4(1): 22–8.
 20. Sukach AN, Liashenko TD, Shevchenko MV. [Properties of the isolated cells of newborn rats' nervous tissue in culture]. *Biotechnol Acta*. 2013; 6(3): 63–8. Russian.
 21. Sukach OM, inventor; Institute for problems of cryobiology and cryomedicine National academy of sciences of Ukraine, assignee. [The method of neural precursor cells obtaining]. Patent of Ukraine 119411. 2017 Sep 25. Ukrainian.
 22. Tang G, Liu Y, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells maintain blood-brain barrier integrity by inhibiting aquaporin-4 upregulation after cerebral ischemia. *Stem Cells*. 2014; 32: 3150–62.
 23. Zolotko KM, Sukach AN, Kompaniets AM. [The dynamics of behavioral tests in rats with intracerebral hemorrhage after the injection of cryopreserved neural cells]. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2019; (3): 108–12. Russian.