

УДК 591.398: 612.821.2: 616-089.811



Цупиков О. М.^{1,2,3}, Кирик В. М.², Рибачук О. А.^{1,2,3}, Побережний П. А.², Мамчур А. А.²,
Бутенко Г. М.², Півнева Т. А.^{1,2,3}, Скибо Г. Г.^{1,2,3}

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ

²Державна Ключова лабораторія, Київ

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ

e-mail: oleg_tsupikov@mail.ru

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НЕЙРАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА КОГНІТИВНІ ФУНКЦІЇ МИШЕЙ ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

РЕЗЮМЕ

Дослідження було спрямоване на з'ясування впливу трансплантації нейральних прогеніторних клітин (НПК), ізольованих з фетального гіпокампа, на когнітивні функції експериментальних тварин після глобальної короткотривалої ішемії головного мозку. Ішемічне ушкодження головного мозку у мишей лінії *FVB* «дикого» типу моделювали шляхом двосторонньої оклюзії загальних сонних артерій протягом 20 хв. НПК виділяли з гіпокампів мишей лінії *FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J*, трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (GFP). GFP-позитивні НПК стереотаксично трансплантували у гіпокамп експериментальних тварин через 24 години після ішемії-реперфузії. Когнітивні функції оцінювали за допомогою водного лабіринту *Morris*. Результати дослідження показали, що глобальна короткотривала ішемія головного мозку призводила до порушення когнітивних функцій мишей. Стереотаксична трансплантація НПК сприяла відновленню просторової пам'яті у експериментальних тварин після ішемічного ушкодження мозку. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що трансплантація НПК може мати терапевтичний ефект при лікуванні наслідків ішемічного інсульту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ішемія мозку, гіпокамп, когнітивні функції, нейральні стовбурові клітини, трансплантація.

Ішемічні ураження головного мозку посідають одне з провідних місць серед причин інвалідності та смертності в осіб похилого віку. За даними ВООЗ, інсульт є другою за частотою після серцево-судинної патології причиною смертності. У зв'язку з підвищенням рівня захворюваності атеросклерозом, артеріальною гіпертензією, цукровим діабетом, ішемічний інсульт все частіше зустрічається і у людей працездатного віку, а гостра гіпоксично-ішемічна енцефалопатія у новонароджених може стати причиною розвитку дитячого церебрального паралічу [12, 22]. Відомо, що мозковий інсульт призводить до низки емоційних розладів (дратівливість, підвищення збудливості й тривожності та ін.) [3]. На експериментальних моделях глобальної церебральної ішемії було показано, що ішемічне ушкодження мозку у тварин викликає порушення пам'яті та здатності до навчання, гіпертермію, значне збільшення локомоторної активності [1, 14, 23].

Припускають, що наслідки ішемічного ушкодження нервової тканини можуть бути компенсовані за рахунок активації власних репаративних механізмів або корекції за допомогою різних терапевтичних методів [18]. Останнім часом активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії для лікування ішемічних і дегенеративних захворювань нервової системи [28]. Як діючий агент, планується використання стовбурових клітин з різних дже-

рел та різного ступеня диференціювання – від ембріональних і фетальних клітин до клітин дорослого організму [19, 25]. В основу цих досліджень покладено теоретичні та експериментальні розробки, що вказують на здатність стовбурових клітин диференціюватися в нейрональні або гліальні елементи, компенсуючи тим самим функцію загинувших клітин. Наприклад, використання фетальних нейральних стовбурових клітин (НСК) передбачає їх диференціювання в спеціалізовані клітини центральної нервової системи [8, 13]. Під час ембріогенезу НСК знаходяться в шлунковій зоні нервової трубки і здатні диференціюватися в усі типи клітин, які необхідні для формування центральної нервової системи. Вважалося, що нейрогенез відбувається лише під час ембріонального розвитку організму. Дослідження останніх років показали, що нові нейрони постійно утворюються з НСК протягом усього життя [7, 29]. Такий нейрогенез у дорослому віці відбувається в певних ділянках мозку, а саме: субгранулярній зоні (SGZ) зубчастої фасції гіпокампа та субвентрикулярній зоні (SVZ) латеральних шлуночків.

Відомо також, що стовбурові клітини здатні розрізняти ділянки ушкодженої тканини, мігрувати у ці зони та диференціюватися у певний тип клітин, необхідний для відновлення втраченої функції [6, 11, 30, 31]. Для дослідження можливого регенеративного потенціалу НСК

широко використовують різні моделі ішемічного пошкодження мозку з подальшою їх трансплантацією [7, 16, 21].

Проте впровадження в клінічну практику методик трансплантації стовбурових клітин має базуватися на глибокому розумінні механізмів їх функціонування та достатньому експериментальному матеріалі. Вивчення позначеного кола питань можливе в умовах експериментальної трансплантації із залученням адекватних моделей патології у лабораторних тварин. Ішемічне ураження головного мозку у мишей в експерименті дозволяє змоделювати наслідки ішемічного інсульту в людини, а трансплантація клітин різного походження з різним потенціалом диференціювання має на меті вивчення їх регенеративного потенціалу та загальних закономірностей функціонування у відновних процесах після ішемічного ушкодження [4, 9, 10].

Виходячи з вищеведеного, метою даної роботи було дослідження впливу трансплантації фетальних нейральних прогеніторних клітин на когнітивні функції експериментальних тварин після глобальної короткотривалої ішемії головного мозку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasburg, 1986), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, від 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

У нашому дослідженні ми використовували мишей лінії FVB «дикого» типу та FVB-C-Tg (GFPU) 5Nagy/J, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком (GFP). Миші були люб'язно надані Європейською молекулярно-біологічною лабораторією (Монтеротондо, Італія).

Статевозрілі миші-самці (12 тижнів постнатального розвитку) лінії FVB «дикого» типу були випадковим чином розподілені в одну з трьох груп: А – контроль (n = 5) – несправжньо-оперовані тварини без ішемії-реперфузії і без трансплантації нейральних прогеніторних клітин (НПК); В – миші (n = 13) з трансплантацією НПК після ішемії-реперфузії і С – тварини (n = 5), яким після ішемії-реперфузії робили ін'єкцію середовища, у якому культивували НПК.

ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ НПК

Миші лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенні за геном GFP, були використані як донори нейральних прогеніторних клітин. Джерелом НПК були фетальні гіпокампи тварин, виділені у стерильних умовах з мозку плодів 17-18 доби ембріонального розвитку. За допомогою Пастерівських піпеток різного діаметру фетальна нервова тканина була механічно дисоційована у середовищі Neurobasal. Після дисоціації суспензія клітин пропусклася через нейлонові клітинні фільтри (Falcon, США) з діаметром пор 40 мкм. Очищену фракцію НПК отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22%-ний розчин Percoll). Відсоток життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACSAria (Becton Dickinson, США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD).

Для аналізу фенотипу НПК використовували імуноцитохімічне фарбування клітин у культурі. Для цього свіжоізолювані клітини висівали на покривні скельця, покриті Matrigel (4•10⁵ клітин на 35-мм культуральну чашку). НПК культивували в середовищі Neurobasal (Invitrogen, США) з додаванням 20 нг/мл людського рекомбінантного FGF-2 (R&D, США). На 3-ю добу культивування, культуральне середовище замінювали охолодженим 4%-ним розчином параформальдегіду (ПФА) і після фіксації у ПФА виконували імуноцитохімічне фарбування культури клітин.

ІМУНОЦИТОХІМІЧНЕ ФАРБУВАННЯ КУЛЬТУРИ НПК

Після відмивання від ПФА культуру клітин блокували у розчині 0.1 М фосфатного буфера (pH=7,4) з додаванням 0,5%-ного бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,3%-ного Тритон X-100. Для характеристики фенотипу культури клітин використовували маркер нейральних прогеніторних клітин – нестин. Для цього культуру клітин інкубували у розчині первинних моноклональних мишачих антитіл до нестину (Chemicon, США) протягом 12 годин при +4 °С. Первинні антитіла візуалізували вторинними антимишачими антитілами, кон'югованими з флуорохромом AlexaFluor 555 (Invitrogen, США). Ядра клітин контрастували флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (Invitrogen, США). Пофарбовану культуру клітин покривали середовищем Immu-MOUNT (Thermo Scientific, США). Імуноцитохімічно забарвлену культуру НПК досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ГІПОКАМПА

Ішемічне ушкодження гіпокампа у мишей FVB «дикого» типу моделювали шляхом двосторонньої оклюзії загальних сонних артерій протягом 20 хв. Тварин було наркотизовано 2,2,2-трибромоетанолом (125-240 мг/кг, інтраперитонеально), і під операційним стереомікроскопом були відпрепаровані загальні сонні артерії та накладені на них атравматичні еластичні судинні мікрозатискачі. Через 20 хв затискачі знімали, а рану зашивали пошарово з дотриманням правил асептики. Несправжньо-оперованим тваринам контрольної групи А було виконано лише препарування артерії і вони перебували під наркозом протягом 20 хв без накладання затискачів.

ОЦІНКА РЕГІОНАЛЬНОГО МОЗКОВОГО КРОВОТОКУ

Для оцінки регіонального мозкового кровотоку (РМК) і підтвердження ішемічного стану після двосторонньої оклюзії сонної артерії використовували лазерний доплерівський флоуметр moor-VMS-LDF-1 (Moor Instruments, Великобританія). РМК контролювали до і під час оклюзії, а також відразу ж після реперфузії. Отримані дані аналізували за допомогою програмного забезпечення moorLAB (Moor Instruments, Великобританія). У подальших дослідженнях ми використовували тільки тварин, РМК яких знижувався нижче 15% від нормального базового рівня перед оклюзією.

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ГІПОКАМПАЛЬНИХ НПК

Через 24 години після ішемії-реперфузії стереотаксично трансплантували 2 мкл суспензії GFP-позитивних НПК (2-2,5•10⁵) в гіпокамп експериментальних тварин (координати від брегми: lateral ± 1,5 мм, posterior – 2,0 мм, dorsoventrally 1,7 мм) під комбінованим 2,2,2-трибромоетаноловим наркозом (125 мг/кг, інтраперитонеально). Несправжньо-оперованим тваринам робили ін'єкцію середовища культивування НПК у такі ж координати.

ПОВЕДІНКОВИЙ ТЕСТ

Для оцінки когнітивних функцій (просторова пам'ять) використовували водний лабіринт Морріса (ВЛМ). Роль ВЛМ виконував чорний круглий басейн (150 см у діаметрі та 60 см заввишки), який мистив прозору платформу з органічного скла [24]. Протягом експериментів платформа залишалася на постійному місці. Температура води підтримувалася на рівні 28 °С. Стіни басейну були позначені геометричними висококонтрастними зображеннями (квадрати, зірки,

трикутники). Такі зовнішні візуальні орієнтири сприяли формуванню у тварин уявлення про просторове розташування платформи. Траєкторія і час плавання тварини контролювалися за допомогою цифрової відеокамери. Тестування тварин у ВЛМ для перевірки їх здатності виконувати завдання, пов'язані з просторовою пам'яттю, було виконано згідно з процедурою, адаптованою для мишей [20]. Протягом чотирьох днів поспіль (з 12-ї по 15-у добу після ішемії) виконували поведінкові тести, у ході яких миші навчалися знаходити платформу, покладаючись на зовнішні візуальні орієнтири. Кожен сеанс складався з 2 циклів (по 4 спроби) на день, під час яких мишей поміщали до басейну і давали їм 60 сек для пошуку платформи. Для кожної тварини з усіх груп експерименту визначали показник «час пошуку платформи» – середній для 8 спроб час (у секундах), витрачений мишею на пошук платформи в конкретну добу дослідження. Якщо протягом 60 сек миша не знаходила платформу, то її саджали на платформу для запам'ятовування місця її розташування. На п'ятий день тестування (16-а доба після ішемії), прозора платформа була занурена на кілька мм від поверхні води, і кожну мишу поміщали до басейну для знаходження прихованої платформи.

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

Статистичну обробку даних виконували з використанням програмного забезпечення *Statistica* (версія 5, *StatSoft*). Значення наведені у вигляді середнього та стандартної похибки середнього. Непараметричний критерій Колмогорова-Смірнова був використаний для оцінки відмінностей між значеннями.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення фенотипу культури гіпокампа нейральних прогеніторних клітин ми використовували метод імуноцитохімії. Імуноцитохімічний аналіз показав, що на 3-ю добу культивування НПК переважно мали округлу або біполярну форму і тонкі відростки; переважна більшість (95,2%) клітин експресувала маркер незрілих клітин – нестин (рис. 1), який є характерним для типу-2 прогеніторних клітин гіпокампа [17]. Ці дані свідчать про те, що клітини, які ми використовували для трансплантації, мали властивості нейральних прогеніторних клітин.

Вплив ішемічного ушкодження головного мозку на когнітивні функції і можливий нейропротекторний ефект трансплантації нейральних стовбурових клітин у нашій роботі були оцінені за допомогою поведінкового тесту – водний лабіринт Морріса (ВЛМ).

Тварин з кожної експериментальної групи тестували протягом 5 днів, починаючи з 12-ї доби після операції. Час, витрачений на пошук платформи протягом перших 4 днів тестування, знизився у тварин усіх експериментальних груп. Незважаючи на зменшення часу, витраченого на пошук платформи в усіх групах, цей параметр в групі тварин з ішемією був значно більший, ніж у несправжньо-оперованих мишей (контроль) та у групі тварин з ішемією плюс трансплантація НПК. У тварин контрольної групи час пошуку платформи становив $35,3 \pm 3,4$ сек на 12-у добу, а потім зменшувався до $20,3 \pm 2,1$ сек на 15-у добу (рис. 2). У порівнянні з контрольними, ішемізовані тварини мали більш високі показники, що свідчило про дефіцит просторової пам'яті і здатності до навчання. Час пошуку платформи у цій групі тварин також зменшувався з 12-ї доби до 15-ї доби і становив $48 \pm 2,7$ сек і $32 \pm 2,3$ сек, відповідно (рис. 2).

У групі тварин з трансплантацією НПК після ішемічного ушкодження мозку спостерігався більш швидкий регрес когнітивних порушень, зокрема зниження дефіциту просторової пам'яті й здатності до навчання. Час пошуку у цій групі зменшувався з 12-ї доби до 15-ї доби і становив $42 \pm 1,5$ сек і $22 \pm 1,0$ сек, відповідно (рис. 2).

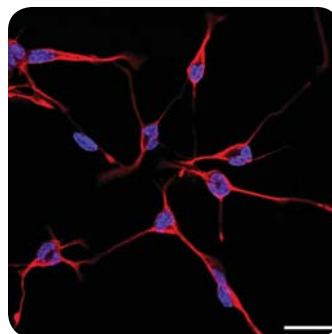


Рис. 1. Імуноцитохімічне фарбування культури нейральних стовбурових клітин на нестин. Більшість клітин були імунопозитивні на нестин (червоний колір). Ядра контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). Шкала = 20 мкм.

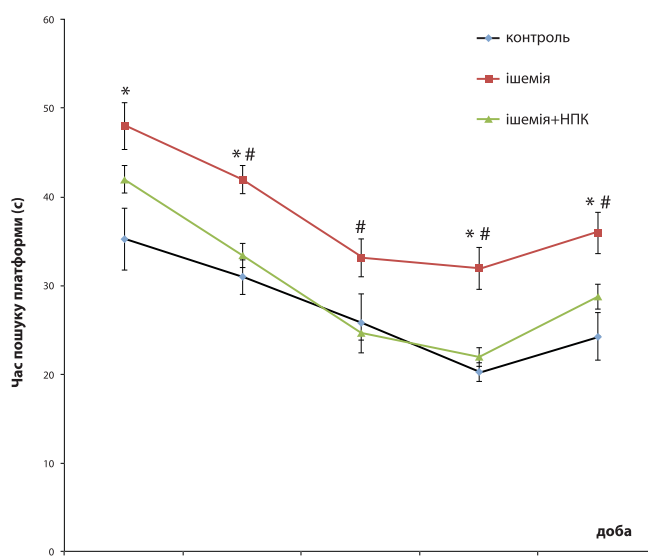


Рис. 2. Час пошуку платформи у водному лабіринті Морріса. Графік демонструє середній час пошуку платформи тваринами у несправжньо-оперованій групі (контроль), ішемічній (ішемія) та групі ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). * – $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою, # – $P < 0,05$ порівняно з групою тварин з ішемією плюс трансплантація НПК.

На 16-у добу, коли платформа була занурена під поверхню води, час пошуку платформи збільшився в усіх групах тварин і становив $24,3 \pm 2,7$ сек, $36 \pm 2,3$ сек і $28,8 \pm 1,4$ сек у контрольних, ішемізованих та групі з ішемією плюс трансплантація НПК відповідно.

Не існувало жодних статистично достовірних відмінностей між контрольними тваринами і групою «ішемія плюс трансплантація НПК» у всі часові інтервали.

Для оцінки когнітивних функцій експериментальних тварин було розроблено багато поведінкових тестів, але водний лабіринт, розроблений Моррісом, є одним з найбільш широко використовуваних поведінкових тестів для вивчення просторового навчання і пам'яті [24, 27]. Успішність виконання тваринами тесту ВЛМ пов'язують із довгостроковою потенціацією (LTP) і функцією NMDA-рецепторів, що робить цей тест основним підходом у вивченні нейронних мереж гіпокампа [2, 15]. Результати нашого дослідження вказують на те, що короткотривала глобальна церебральна ішемія призводила до порушення просторового навчання у піддослідних тварин. Ми спостерігали відновлення таких когнітивних функцій вже через два тижні після трансплантації НПК. Навіть якщо два тижні достатньо для диференціації трансплантованих прогеніторних клітин у нейрони та гліальні клітини, цього терміну недостатньо для інтеграції донорських клітин в існуючі нейронні мережі гіпокампа реципієнта [26].

Ми вважаємо, що відновлення просторового навчання і пам'яті в експериментальних тварин може бути пов'язано з секрецією трофічних та мітогенних факторів трансплантованими клітинами, що сприяло виживанню пошкоджених клітин і відновленню втрачених ними функцій. Кілька досліджень показали, що відновлення неврологічного статусу ішемізованих тварин у ранній період після трансплантації стовбурових клітин швидше за все пов'язано не з заміною пошкоджених клітин новими трансплантованими, а із секрецією донорськими клітинами різноманітних факторів росту [5, 32].

ВИСНОВКИ

СТЕРЕОТАКСИЧНА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ НЕЙРАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН СПРИЯЄ ВІДНОВЛЕННЮ КОГНІТИВНИХ ФУНКЦІЙ (ПРОСТОРОВОЇ ПАМ'ЯТІ) У МИШЕЙ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ, ЗМОДЕЛЬОВАНОГО ШЛЯХОМ ДВОСТОРОННЬОЇ ОКЛЮЗІЇ ЗАГАЛЬНИХ СОННИХ АРТЕРІЙ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Babcock A. M., Baker D. A., Lovce R. Locomotor activity in the ischemic gerbils // *Brain Res.* – 1993. – **625**. – P. 351-354.
2. Bannerman D. M., Good M. A., Butcher S. P. et al. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade // *Nature.* – 1995. – **378**. – P. 182-186.
3. Caeiro L., Ferro M.J., Albuquerque R. et al. Delirium in the first days of acute stroke // *J. Neurol.* – 2004. – **251**. – P. 171-178.
4. Carmichael S.T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose // *NeuroRx.* – 2005. – **2**, № 3. – P. 396-409.
5. Chen J., Zhang Z. G., Li Y. et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats // *Circ. Res.* – 2003. – **4**. – P. 692-699.
6. Darsalia V., Kallur T., Kokaia Z. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum // *Eur. J. Neurosci.* – 2007. – **26**. – P. 605-614.
7. Gage F. H. Transplantation in the future // *Prog. Brain Res.* – 2012. – **201**. – P. 7-13.
8. Gelati M., Profico D., Progetti-Pensi M. et al. Culturing and expansion of «clinical grade» precursors cells from the fetal human central nervous system // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – **1059**. – P. 65-77.
9. Ginsberg M.D., Busto R. Rodent models of cerebral ischemia // *Stroke.* – 1989. – **20**, № 12. – P. 1627-1642.
10. Graham S. M., McCullough L. D., Murphy S. J. Animal Models of Ischemic Stroke: Balancing Experimental Aims and Animal Care // *Comp. Med.* – 2004. – **54**, № 5. – P. 486 – 496.
11. Guzman R., Bliss T., De Los Angeles A. et al. Neural progenitor cells transplanted into the uninjured brain undergo targeted migration after stroke onset // *J. Neurosci. Res.* – 2008. – **86**. – P. 873 – 82.
12. Hadjiev D. I., Mineva P. P., Vukov M. I. Multiple modifiable risk factors for first ischemic stroke: a population-based epidemiological study // *Eur. J. Neurol.* – 2003. – **10**, № 5. – P. 577 – 582.
13. Hsu Y. C., Lee D. C., Chiu I. M. Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors // *Cell Transplant.* – 2007. – **16**, № 2. – P. 133-150.
14. Ide T., Morikawa E., Kirino T. An immunosuppressant, FK506, protects hippocampal neurons from forebrain ischemia in the Mongolian gerbil // *Neurosci. Lett.* – 1996. – **204**. – P. 157-160.
15. Jeffery K. J., Morris R. G. Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze // *Hippocampus.* – 1993. – **3**. – P. 133-140.
16. Jenny B., Kanemitsu M., Tsupykov O. et al. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential // *Stem Cells.* – 2009. – **27**, № 6. – P. 1309-1317.
17. Kempermann G., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus // *Trends Neurosci.* – 2004. – **27**. – P. 447-452.
18. Kollmar R., Schwab S. Ischaemic stroke: acute management, intensive care, and future perspectives // *Br. J. Anaesth.* – 2007. – **99**, № 1. – P. 95-101.
19. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // *Neurology.* – 2000. – **55**, № 4. – P. 565-569.
20. Lelong V., Dauphin F., Boulouard M. RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat // *Neuropharmacology.* – 2001. – **41**. – P. 517-522.
21. Lindvall O., Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders // *Nature.* – 2006. – **441**, № 7097. – P. 1094-1096.
22. Marret S., Vanhulle C., Laquerriere A. Pathophysiology of cerebral palsy // *Handb. Clin. Neurol.* – 2013. – **111**. – P. 169-176.
23. Matsuda S., Wen T.-C., Morita F. et al. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils // *Neurosci. Lett.* – 1996. – **204**. – P. 109-112.
24. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat // *J Neurosci Methods.* – 1984. – **11**. – P. 47-60.
25. Savitz S. I., Dinsmore J. H., Wechsler L. R. et al. Cell therapy for stroke // *NeuroRx.* – 2004. – **1**, № 4. – P. 406-414.
26. Tsupykov O. M., Pivneva T. A., Poddubna A. O. et al. Migration and differentiation of transplanted fetal neurogenic cells in animals with brain ischemia // *Fiziol. Zh.* – 2009. – **55**, № 4. – P. 41-49.
27. Vorhees C. V., Williams M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nat. Protoc.* – 2006. – **1**, № 2. – P. 848-58.
28. Williams B. A., Keating A. Cell therapy for age-related disorders: myocardial infarction and stroke – a mini-review // *Gerontology.* – 2008. – **54**, № 5. – P. 300-311.
29. Wong A. M., Hodges H., Horsburgh K. Neural stem cell grafts reduce the extent of neuronal damage in a mouse model of global ischaemia // *Brain Res.* – 2005. – **1063**, № 2. – P. 140-50.
30. Yin W., Ma L., Zhang J. et al. The migration of neural progenitor cell mediated by SDF-1 is NF- κ B/HIF-1 α dependent upon hypoxia // *CNS Neurosci. Ther.* – 2013. – **19**, № 3. – P. 145-53.
31. Yuan T., Liao W., Feng N. H. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurological function in a rat model of middle cerebral artery occlusion // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. – **4**, № 3. – P. 73-83.
32. Zhao L. X., Zhang J., Cao F. et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection // *Exp. Neurol.* – 2004. – **4**. – P. 396-406.