

УДК 616.831/832-089:611.018.82.018.013:616-089.811

О.А. Рибачук<sup>1,2,3\*</sup>, В.М. Кирик<sup>3</sup>, О.М. Цупиков<sup>1,2,3</sup>, Г.М. Бутенко<sup>3</sup>, Г.Г. Скибо<sup>1,2,3</sup>, Т.А. Півнева<sup>1,2,3</sup>**Вплив екзогенних нейральних стовбурових клітин на стан нервової тканини після ішемічного пошкодження in vitro<sup>#</sup>**

UDC 616.831/832-089:611.018.82.018.013:616-089.811

O. A. Rybachuk<sup>1,2,3\*</sup>, V.M. Kyryk<sup>3</sup>, O.M. Tsypukov<sup>1,2,3</sup>, G.M. Butenko<sup>3</sup>, G.G. Skybo<sup>1,2,3</sup>, T.A. Pivneva<sup>1,2,3</sup>**Exogenous Neural Stem Cells Affect the Post-Ischemic Nerve Tissue In Vitro<sup>#</sup>**

**Ключові слова:** нейральні стовбурові клітини, органотипова культура гіпокампа, киснево-глюкозна депривація, трансплантація клітин, імуногістохімічне фарбування.

**Ключевые слова:** нейральные стволовые клетки, органотипическая культура гиппокампа, кислородно-глюкозная депривация, трансплантация клеток, иммуногистохимическое окрашивание.

**Key words:** neural stem cells, organotypic hippocampal culture, oxygen-glucose deprivation, grafting, immunohistochemical staining.

В останні роки актуальним є вивчення патофізіології ішемічного інсульту мозку. Сучасні погляди на чинники критичного рівня кровотоку та ішемічної напівтіні змістили напрямки досліджень з циркуляторних і метаболічних механізмів пошкодження мозкової тканини на клітинні та молекулярні [1]. Існує багато методів лікування інсульту, але всі вони недосконалі. На сьогодні значну увагу приділяють клітинній терапії. Результатом міжнародної програми з вивчення потенціалу стовбурових клітин, у тому числі й нейральних, може бути значний прогрес у лікуванні нейродегенеративних захворювань [6].

Відомо, що після ішемії (модель чотирьохсудинної оклюзії у щурів) у зоні СА1 гіпокампа спостерігається втрата 90–95% пірамідних нейронів. Показано, що після трансплантації нейральних стовбурових клітин (НСК) у гіпокамп щура виживало 1–3% трансплантованих клітин і 3–9% з них експресували нейрональний маркер NeuN. Було також зазначено, що NeuN-позитивні нащадки трансплантованих НСК відповідали за покращення показників просторової орієнтації тварин [12].

Трансплантація НСК після оклюзії сонної артерії призводила до зменшення об'єму зони інфаркту та суттєвого покращення моторної, чутливої та когнітивної функції експериментальних тварин. За допомогою імуноелектронної мікроскопії встановлено, що молоді

Recently, the investigation of cerebral ischemic stroke pathophysiology has remained relevant. Contemporary conception for origins of blood flow critical level and ischemic penumbra shifted the direction of investigations from circulatory and metabolic mechanisms of the injuries towards cellular and molecular ones [1]. The stroke is treated using many methods, unfortunately these are not perfect. To date, much attention is paid to cell-based therapy. Existing international project targeted to explore the potential of stem cells, including neural ones, may result in a significant progress in the treatment of neurodegenerative diseases [6].

It is known that ischemia (four-vessel occlusion model in rats) in hippocampal CA1 area results in loss of 90–95% pyramidal neurons. It was shown that after transplantation of neural stem cells (NSCs) into the rat hippocampus, 1–3% of transplanted cells survived and 3–9% of them expressed neuronal marker NeuN. It was also noted that NeuN<sup>+</sup> offspring of transplanted NSC contributed to the improvement of the spatial orientation of the animals [12].

Transplantation of NCSs after carotid artery occlusion resulted in an infarction volume reduction and significantly improved motor, cognitive and sensitive functions in experimental animals. Immunoelectron microscopical study revealed that young neurons, being the descendants of transplanted cells, formed synaptic contacts with neurocytes of recipient tissue [5].

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

<sup>2</sup>Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології, м. Київ

<sup>3</sup>ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», м. Київ

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Богомольця 4, м. Київ, 01024;  
електронна пошта: oks-ribachuk@yandex.ru

<sup>#</sup>Це дослідження було представлено на мінісимпозіумі «День стовбурової клітини», що відбувся 24 травня 2013 року в м. Києві.

Надійшла 15.06.2013  
Прийнята до друку 01.12.2013

Проблеми криобіології и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 363–367.  
© 2013 Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України

<sup>1</sup>Bohomolets Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Molecular and Cell Biology, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

4, Bohomolets str., Kyiv, 01024;  
e-mail: oks-ribachuk@yandex.ru

<sup>#</sup>This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24<sup>th</sup> of May, 2013.

Received June, 15, 2013  
Accepted December, 1, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 363–367.  
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

нейрони – нащадки трансплантованих клітин – утворювали синаптичні контакти з нейронами реципієнтної тканини [5].

Таким чином, трансплантацію нейральних клітин при ішемічному пошкодженні головного мозку можна розглядати як один із найбільш дієвих методів усунення когнітивного дефіциту та відновлення втрачених функцій.

З метою подальшого вивчення механізмів дії НСК на стан нервової тканини після ішемічного пошкодження в цій роботі було заплановано оцінити *in vitro* рівень пошкодження нейронів та активацію гліальних клітин зони CA1 гіпокампа після короткотривалої киснево-глюкозної депривації, а також дослідити вплив трансплантації НСК в органотипову культуру гіпокампа на стан пошкодженої нервової тканини.

*Життєздатні зрізи гіпокампа* виділяли з 8–9-денних мишей лінії FVB та культивували за методом L. Stoppini [8]. Протягом 5–7 днів культивування тканини повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення, та досягали стабільного стану. Товщина зрізів зменшувалася з 350–400 до 250–300 мкм.

*Модель ішемічного пошкодження нервової тканини in vitro* – киснево-глюкозна депривація (КГД). Для створення моделі КГД зрізи утримували впродовж 10 хвилин у спеціальній камері (з температурою 35°C), в якій кисень повітря замінено на азот, а в середовищі культивування глюкозу – на сахарозу. Надалі зрізи повертали на 2 години до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація).

*Виділення та внесення (трансплантація) нейральних прогеніторів на органотипову культуру гіпокампа.* У стерильних умовах з гіпокампа 16–17-денних плодів мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за GFP, виділяли НСК. Очищену фракцію НСК отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22%-й розчин Percoll). Відсоток життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлуориметра-сортера «FACSAria» («Becton Dickinson», США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD). Через 2 години після КГД/реоксигенації  $10^5$  НСК наносили на органотипову культуру гіпокампа. Раніше показано, що це може бути адекватною моделлю трансплантації [2], далі ми називатимемо такі клітини трансплантованими.

*Імуногістохімічне фарбування культивованих зрізів гіпокампа.* Для ідентифікації нейронів та клітин глії використовували подвійне імуногістохімічне фарбування антитілами до GFAP (1:1500, «DAKO», Данія); NeuN (1:1000, «Chemicon», Велика Британія); GFP (1:1000, «Molecular Probes Inc.», США) протягом 24 годин. Після відмивання у фосфатному буферному розчині (ФБР) зрізи обробляли протягом 1 годи-

Thus, transplantation of neural cells at cerebral ischemic injury could be one of the most effective methods for eliminating cognitive deficits and functional rehabilitation.

This study was conducted to proceed revealing of the mechanisms underlying the action of the NSCs on the state of neural tissue after ischemic injury, and in particular to evaluate *in vitro* the injury of neurons and glial cells in hippocampal CA1 area after a short-term oxygen-glucose deprivation, as well as to investigate how the introduction of NSCs into organotypic hippocampal culture following the injury affects its state.

*Viable hippocampal sections* were procured from 8–9-day-old FVB mice and cultured according L. Stoppini [8]. After 5–7 days of culture the tissues became completely free of cells damaged during isolation procedure, and reached a steady state. Slice thickness decreased from 350–400 down to 250–300 microns.

*In vitro model of neural tissue ischemic damage: oxygen-glucose deprivation (OGD).* To perform OGD the slices were maintained for 10 min in a special chamber (with temperature of 35°C), where air oxygen was replaced by nitrogen, and glucose in the culture medium was changed to sucrose. Thereafter the slices were transferred back to normal culture conditions for two hours (normoxic reoxygenation).

*Isolation and application (grafting) of neural progenitors onto organotypic hippocampal culture.* Neural stem cells were isolated under sterile conditions from the hippocampi of 16–17-day-old fetuses of FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J GFP transgenic mice. Enriched fraction of the NSCs was obtained by centrifugation of the cell suspension in the density gradient (22% Percoll solution). The percentage of viable cells in the suspension was assessed by flow cytometry using FACSAria sorter (Becton Dickinson, USA) after incubation with 7-aminoactinomycin D (7-AAD). In two hours following OGD/reoxygenation  $10^5$  NSCs were applied onto organotypic hippocampal culture. Such an experimental approach was shown recently as a reliable model of ‘direct’ transplantation [2], hereinafter we would designate these cells as grafted ones.

*Immunohistochemical staining of cultured hippocampal slices.* Neurons and glial cells were identified using double immunohistochemical staining for 24 hours with antibodies to GFAP (1:1500, DAKO, Denmark); NeuN (1:1000, Chemicon, UK); GFP (1:1000, Molecular Probes Inc., USA). The sections were then washed in phosphate buffered saline (PBS) and treated for 1 hour with a mixture of secondary Alexa Fluor 555 (1:1000), Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647 (1:1000) conjugated antibodies (all by Invitrogen, USA). After washing with FBS the cultures were fixed with cover slip in fluorescence mounting medium (Dako, Denmark). Analysis of immunohistochemical staining of hippocampal slices



ни сумішшю вторинних Alexa Fluor-555-кон'югованих (1:1000), Alexa Fluor-488-кон'югованих та Alexa Fluor-647-кон'югованих антитіл (1:1000; всі «Invitrogen», США). Після відмивання у ФБР культури фіксували покривним склом у спеціальному середовищі для флуоресцентних препаратів («Dako», Данія). Аналіз імуногістохімічного фарбування зрізів гіпокампа проводили за допомогою конфокального мікроскопа «FluoView FV1000» («Olympus Inc.», США).

Усі експерименти проводили з дотриманням біоетичних норм та правил біологічної безпеки.

Проведені дослідження показали, що після експериментальної киснево-глюкозної депривації в органотиповій культурі гіпокампа мишей спостерігалось ушкодження пірамідних нейронів зони СА1 гіпокампа разом із активацією гліальних клітин. Ступінь імунореактивності нейронів та астроцитів і їх локалізація в зоні СА1 гіпокампа суттєво залежали від терміну постішемичного періоду. На 3-, 7- та 14-ту добу після КГД усі структури нейропіля зони СА1 гіпокампа були зміненими. Кількість пірамідних нейронів у *str. pyramidale* зони СА1 візуально зменшилась вдвічі на 14-ту добу культивування після ішемичного пошкодження. Між нейронами спостерігалися виникнення порожнин та збільшення міжклітинного простору (рисунок, А, В, С). Утворення чисельних порожнин у *str. pyramidale* та реструктуризація компактного розташування пірамідних нейронів безпосередньо пов'язані з загибеллю частини нейронів, що може відбуватися як некротичним, так і апоптотичним шляхами [11]. Реактивний астрогліоз спостерігався вже на 3-тню добу після КГД. Усі структури нейропіля зони СА1 гіпокампа були сильно вакуолізовані, переважно через наявність великої кількості набряклих відростків астроцитів (рисунок А, В, С). Гіпертрофовані соми астроцитів, які є показником піку реактивного астрогліоза [10], були чітко помітні на 7-му добу культивування та, в основному, розташовувались у *str. pyramidale* гіпокампа (рисунок, В).

Через 2 години реоксигенації після КГД свіжовиділені GFP-позитивні НСК наносили на культивовані органотипові зрізи гіпокампа. Відсоток життєздатних клітин (7-AAD<sup>-</sup>) становив 89,8–93,5%. Вміст GFP-позитивних клітин серед життєздатних у даній фракції дорівнював 97,5–99,6%.

На 3-тню добу після трансплантації GFP-позитивні НСК вбудовувались у нейропіль гіпокампа, їх вигляд змінювався. Спостерігалась поява радіальних відростків, які відходили від соми клітини. Аналіз конфокальних зображень зрізів після подвійного імуногістохімічного фарбування на GFP (маркер трансплантованих стовбурових клітин) та NeuN (нейрони) на 3-тню добу після трансплантації не виявив колокалізації флуоресценції цих маркерів, що вказувало на те, що на цьому етапі трансплантовані клітини не містили

was performed using FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus Inc., USA).

All the experiments were performed in compliance with bioethical and biosafety regulations.

The performed studies have shown that experimental oxygen-glucose deprivation led to appearance of damaged pyramidal neurons in hippocampal CA1 area and signs of glial cells activation. The intensity of neurons and astrocytes immunoreactivity and their localization in the hippocampal CA1 area depended significantly on the post-ischemia term. On the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day after OGD all the neuropile structures of hippocampal CA1 area were altered. The number of pyramidal neurons in CA1 area *str. pyramidale* reduced twice on the 14<sup>th</sup> day of culture following ischemic injury. The neurons were interleaved with voids; the inter-cell distances were increased (Figure A, B, C). Appearance of numerous spaces in *str. pyramidale* and reorganization of normal compact arrangement of pyramidal neurons was directly related to the death of the neurons, which might occur by both necrotic and apoptotic pathways [11]. Reactive astrogliosis was observed even on the 3<sup>rd</sup> day after OGD. All the neuropile structures of the hippocampal CA1 area were significantly vacuolized, mainly due to the numerous swollen processes of astrocytes (Figure A, B, C). Hypertrophic astrocyte somas, characteristic to the peak reactive astrogliosis [10], were clearly visible on the 7<sup>th</sup> day of culture, and located mainly in *str. pyramidale* of the hippocampal CA1 area (Figure B).

In two hours after OGD/reoxygenation, freshly isolated GFP<sup>+</sup> NSCs were applied onto cultured hippocampal slices. The percentage of viable cells (7AAD<sup>-</sup>) was 89.8–93.5%. The content of GFP<sup>+</sup> cells among viable ones made 97.5–99.6%.

On the 3<sup>rd</sup> day after the grafting, the GFP<sup>+</sup> NSCs have been integrated into hippocampal neuropile, their shapes were changed. We observed radial processes emerged from the cell soma. Analysis performed in confocal images of slices subjected to double immunohistochemical staining for GFP (a marker of transplanted stem cells) and NeuN (neurons) on the 3<sup>rd</sup> day after NCSs grafting showed no significant colocalization of mentioned fluorescent markers, indicating the absence of mature neuron specific proteins in the grafted cells at this observation term (Figure D)

On the 7<sup>th</sup> day of observation the shape of GFP<sup>+</sup> NSCs has changed even more. Analysis of confocal images revealed colocalization of GFP and NeuN fluorescence in the hippocampal CA1 area (Figure E), which allowed to assume that the GFP<sup>+</sup> NSCs did not only integrate into the recipient tissue and migrated to the injury site, but differentiated to mature neurons as well.

The number of GFP-positive cells differentiated into neurons increased to the 14<sup>th</sup> day following NSCs grafting into organotypic hippocampal culture (Figure F). It should be noted, that GFP<sup>+</sup> cells acquired the phenotype

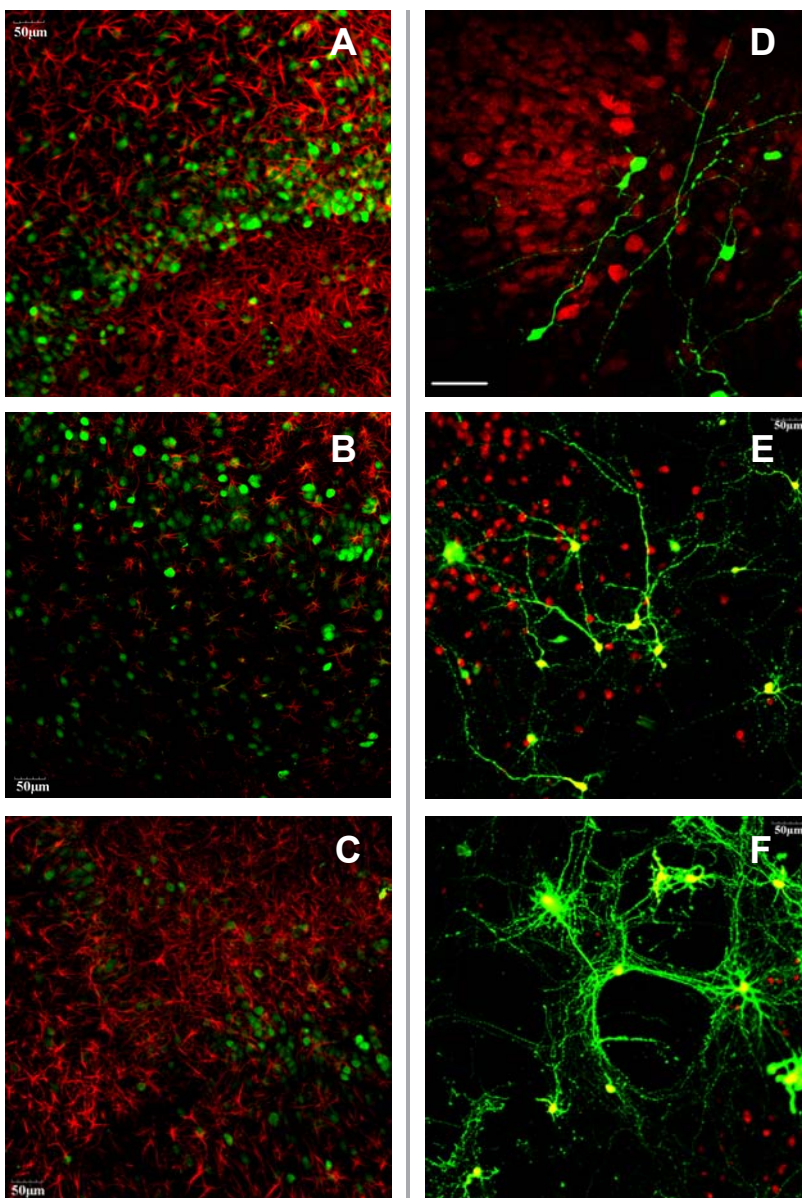
білків зрілих нейронів, специфічних для маркерного барвника NeuN (рисунки, D).

На 7-му добу спостереження морфологічний вигляд GFP-позитивних НСК змінився ще більше. Аналіз конфокальних зображень виявив колокалізацію позитивного забарвлення маркерами GFP та NeuN (рисунки, E), це дає можливість говорити про те, що GFP-позитивні НСК не лише інтегрувалися в тканину реципієнта та мігрували в місця пошкодження, але й диференціювалися у зрілі нейрони.

Кількість GFP-позитивних клітин, які диференціювалися в нейрони, збільшилася на 14-ту добу після внесення НСК до органотипової культури (рисунки, F). Слід зазначити, що GFP-позитивні клітини набували фенотип зрілих нейронів. Зокрема, ці клітини характеризувалися розвинутою сомою та розгалуженими дендритами.

Таким чином, показано, що GFP-позитивні НСК, трансплантовані в органотипову культуру гіпокампа після КГД, диференціювалися в нейрони. Це свідчить про те, що трансплантовані клітини можуть реагувати на сигнали мікрооточення тканини-реципієнта, які регулюють клітинну диференціацію та визначають напрямок міграції [3, 7]. Новоутворені (GFP-позитивні) нейрони розміщувались саме в проміжках між нейронами тканини-реципієнта, що виникли після ішемічного пошкодження. Ми припускаємо, що трансплантовані НСК можуть замінювати втрачені нейрони тканини-реципієнта після моделювання ішемічного пошкодження мозку. Крім того, спостерігалось зниження рівня активації гліальних клітин – зменшувались вакуолізація структур нейропіля зони СА1 гіпокампа та кількість набряклих відростків астроцитів.

Трансплантація НСК до органотипової культури гіпокампа в нашій моделі мала нейропротекторну дію. Точний механізм дії екзогенних НСК на ішемізований мозок невідомий. Але ми припускаємо, що покращення морфофункціонального стану ішемізованої тканини відбувається саме завдяки активації синаптогенезу, нейрогенезу або нейропротекції за рахунок ростових факторів [4, 9].



Зона СА1 гіпокампа в різні терміни після киснево-глюкозної депривації та трансплантація нейральних стовбурових клітин: **A, B, C** – зона СА1 гіпокампа після КГД на 3-тю (A), 7-му (B) та 14-ту (C) добу; подвійне імуногістохімічне фарбування, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія; зелений колір – NeuN-позитивні ядра нейронів; червоний колір – GFAP-позитивні астроцити; **D, E, F** – зона СА1 гіпокампа після КГД та трансплантації НСК на 3-тю (D), 7-му (E) та 14-ту (F) добу; подвійне імуногістохімічне фарбування, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія; червоний колір – NeuN-позитивні ядра нейронів; зелений колір – GFP-позитивні трансплантовані НСК. Масштабна лінійка – 50 мкм.

Hippocampal CA1 area at different terms following oxygen-glucose deprivation and application of neural stem cells: **A, B, C** – hippocampal CA1 area following OGD on 3<sup>rd</sup> (A), 7<sup>th</sup> (B) and 14<sup>th</sup> (C) day; double immunohistochemical staining; laser scanning confocal microscopy; green color denotes NeuN<sup>+</sup> neuronal nuclei; red color denotes GFAP<sup>+</sup> astrocytes; **D, E, F** – hippocampal CA1 area following OGD and NSCs application on 3<sup>rd</sup> (A), 7<sup>th</sup> (B) and 14<sup>th</sup> (C) day; double immunohistochemical staining; laser scanning confocal microscopy; red color denotes NeuN<sup>+</sup> neuronal nuclei; green color denotes GFP<sup>+</sup> grafted NSCs. Bar 50  $\mu$ m.

of mature neurons. In particular, these cells were characterized by well developed soma and branched dendrites.

Thus the GFP<sup>+</sup> NSCs grafted into the hippocampal organotypic culture after OGD have been differentiated



## Литература

1. Asiedu-Gyekye I., Vaktorovich A. The "no-reflow" phenomenon in cerebral circulation // *Med. Sci. Monit.* – 2007. – Vol. 9, №11. – P. 394–397.
2. Daviaud N., Garbayo E., Schiller P.C. et al. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies // *Exp. Neurol.* – 2013. – Vol. 248, №. – P. 429–440.
3. Gu H., Yu S., Gutekunst C., et. al. Inhibition of the Rho signaling pathway improves neurite outgrowth and neuronal differentiation of mouse neural stem cells // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 5, №1. – P. 11–20.
4. Kokaia Z., Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2003. – Vol.13, №1. – P. 127–132.
5. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // *Neurology.* – 2000. – Vol. 55, №4. – P. 565–569.
6. Miller R., Bai L. Translating stem cell therapies to the clinic // *Neurosci Lett.* – 2012. – Vol. 519, N2. – P. 87–92.
7. Rosenblum S., Wang N., Smith T. et al. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43, №6. – P. 1624–1631.
8. Stoppini L., Buchs P., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J. Neurosci. Meth.* – 1991. – Vol. 37, №2. – P. 173–182.
9. Tsupykov O.M., Pivneva T.A., Poddubna A.O. et. al. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals // *Int. J. Phys. Pathophys.* – 2010. – Vol. 1, №1. – P. 25–34.
10. Wagner D.-C., Scheibe J., Glocke I. et. al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.).* – 2013. – Vol. 73, №1. – P. 79–87.
11. Zeng Y.-S., Xu Z.-C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia // *Neurosci Res.* – 2000. – Vol. 37. – P. 113–125.
12. Zhu J. M., Zhao Y.Y., Chen S.D. et. al. Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia // *J. Int. Med. Res.* – 2011. – Vol. 39, №2. – P. 488–498.

into neurons. This may suggest that grafted cells could respond to signals of recipient tissue microenvironment, triggering cell differentiation and determining the direction of migration [3, 7]. Newly formed (GFP<sup>+</sup>) neurons were located exactly in the spaces between neurons of the hippocampal tissue resulted from ischemic injury. Thereby the grafted NSCs might likely replace the recipient tissue neurons being lost after experimental cerebral ischemic injury. In addition, a decrease in the level of glial cells activation was observed: the vacuolization of hippocampal CA1 zone and the number of swollen astrocyte processes were reduced.

Grafting of NSCs into organotypic hippocampal culture in our model had a neuroprotective effect. It is unclear how the exogenous NSCs affected the post-ischemic brain. However, we assume that improving of post-ischemic tissue morpho-functional state was due to activation of synaptogenesis, neurogenesis and neuroprotection caused by growth factors [4, 9].

## References

1. Asiedu-Gyekye I., Vaktorovich A. The "no-reflow" phenomenon in cerebral circulation // *Med. Sci. Monit.* – 2007. – Vol. 9, N11. – P. 394–397.
2. Daviaud N., Garbayo E., Schiller P.C. et al. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies // *Exp. Neurol.* – 2013. – Vol. 248. – P. 429–440.
3. Gu H., Yu S., Gutekunst C., et. al. Inhibition of the Rho signaling pathway improves neurite outgrowth and neuronal differentiation of mouse neural stem cells // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 5, N1. – P. 11–20.
4. Kokaia Z., Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2003. – Vol.13, N1. – P. 127–132.
5. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // *Neurology.* – 2000. – Vol. 55, N4. – P. 565–569.
6. Miller R., Bai L. Translating stem cell therapies to the clinic // *Neurosci Lett.* – 2012. – Vol. 519, N2. – P. 87–92.
7. Rosenblum S., Wang N., Smith T. et al. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43, N6. – P. 1624–1631.
8. Stoppini L., Buchs P., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J. Neurosci. Meth.* – 1991. – Vol. 37, N2. – P. 173–182.
9. Tsupykov O.M., Pivneva T.A., Poddubna A.O. et. al. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals // *Int. J. Phys. Pathophys.* – 2010. – Vol. 1, N1. – P. 25–34.
10. Wagner D.-C., Scheibe J., Glocke I. et. al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.).* – 2013. – Vol. 73, N1. – P. 79–87.
11. Zeng Y.-S., Xu Z.-C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia // *Neurosci Res.* – 2000. – Vol. 37. – P. 113–125.
12. Zhu J. M., Zhao Y.Y., Chen S.D. et. al. Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia // *J. Int. Med. Res.* – 2011. – Vol. 39, N2. – P. 488–498.

