

А.В. Кураєва
С.І. Савосько



Національний медичний
університет імені О.О.
Богомольця
Київ, Україна

Надійшла: 12.09.2023
Прийнята: 25.09.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.68-75>

УДК 616.231: 616.24-001

ДЕКСАМЕТАЗОН ТА ГРАНУЛОЦИТАР- НИЙ КОЛОНІЄСТИМУЛЮЮЧИЙ ФАК- ТОР ВПЛИВАЮТЬ НА МОРФОЛОГІЮ ПЕРИГЕМАТОМНОЇ ДІЛЯНКИ У МОЗКУ ЩУРІВ З ЛОКАЛЬНИМ ГЕМОРАГІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ

Kuraieva A.V. , Savosko S.I.  ✉ Dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor affect the morphology of the perihematomal area in the brain of rats with local hemorrhagic stroke. National Medical University named after O.O. Bogomolets, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Functional tests, morphological features of the perihematomal area, dynamics and intensity of migration of cells with a pro-inflammatory phenotype are considered to be the defining indicators for evaluating the effects of drugs on animal models of stroke. **Objective.** The purpose of the research was to investigate the dynamics of changes in the functional state of rats with a stroke and the migration of CD44+ cells into the perihematomal area after the administration of dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor. **Methods.** Unilateral hemorrhagic stroke was simulated in rats; dexamethasone, growth factor (rHuG-CSF) and their combination were injected subcutaneously on days 1, 2 and 3 of the experiments. The results of the "inverted screen test" and "platform test" were evaluated, the volume of the hematoma was measured morphometrically, CD44+ cells were detected immunohistochemically in the perihematomal area of the brain, and their migration activity was scored on a 3-point scale. **Results.** After simulating a stroke in rats, test results deteriorated sharply after 1 and 3 days, and partial recovery was observed after 10 days. The strength of the grasping reflex in the "inverted screen test" significantly decreased, and the time to perform the "platform test" increased. The results were characterized by the weak correlation between passing the "inverted test" and "platform test" and hematoma volume. Dexamethasone affected the development of cell reactions in the perihematomal area by delaying the migration of CD44+ cells and the elimination of blood cells by macrophages, and the growth factor promoted the infiltration of CD44+ cells in the first 3 days of the experiment. **Conclusion.** Functional tests made it possible to quantitatively assess the manifestations of neurological deficits (grasping reflex, forelimb strength) in animals that simulated a stroke without the appearance of limb paresis. CD44+ cell migration to the perihematomal area is potentially associated with remodeling of damaged brain tissue and hematoma elimination. The effect of dexamethasone was reflected in the delay in the recovery of limb function and the migration of CD44+ cells into the hemorrhage, while the growth factor contributed to the earlier appearance of CD44+ cells.


Key words: dexamethasone, granulocyte colony-stimulating factor, stroke, behavioral tests, hematoma volume, CD44+ cells, correlation analysis.

Citation:

Kuraieva AV, Savosko SI. [Dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor affect the morphology of the perihematomal area in the brain of rats with local hemorrhagic stroke]. Morphologia. 2023;17(3):68-75. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.68-75>

 Kuraieva A.V. 0000-0002-6242-7881

 Savosko S.I. 0000-0001-5145-2195

✉ s.i.savosko@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Геморагічний інсульт є тяжким ураженням мозку з проявами неврологічного дефіциту та когнітивними порушеннями [1]. Сучасна фармакологія досягла значних успіхів у розробці нових лікарських засобів, які потенційно можуть мати позитивні ефекти у лікуванні інсульту. Лікарські

засоби мають бути оцінені на ефективність, токсичність, взаємодію з іншими препаратами та інші ефекти. З цією метою були створені тваринні моделі геморагічного інсульту, такі як внутрішньомозковий крововилив викликаний введенням у мозок крові, або локальною деструкцією тканини мозку механічним чином або

введенням колагенази [2,3]. Гризуни є найбільш широко використовуваним модельним об'єктом через простоту роботи з ними, високу і швидку відтворюваність популяції в лабораторних умовах, можливість створення нокаутних ліній, тому миші і щури стали основним видом лабораторних тварин у дослідженні інсульту [4].

Важливим етапом роботи у дослідженнях з тваринними моделями інсульту є оцінка функціональних змін. Залежно від мети дослідження, може бути оцінена моторна функція, дослідницька поведінка, пам'ять і складніше оцінити сенсорні зміни. Для об'єктивного тлумачення результатів критичним є зменшення впливу суб'єктивної оцінки дослідника, наприклад коли оцінюються зміни за якісними характеристиками, а не у кількісному вимірі.

Крововилив можна відтворити у різних ділянках головного мозку щурів. Виживаність та зміни функції будуть залежати від локалізації та об'єму ураження мозку [5]. Не існує універсального тесту або шкали для оцінки функціонального стану тварин, оскільки наслідки моделювання інсульту визначаються багатьма чинниками. Малі за об'ємом ураження можуть не позначитись на значній втраті функції (наприклад, парез кінцівки) і шкали по оцінці неврологічного дефіциту не дозволяють одержати бажаного результату. У цьому дослідженні ми описуємо результати тестування загальної слабкості у тварин з інсультом згідно «інвертованого тесту» та удосконаленої альтернативи цього тесту «вихід на платформу». Аналіз залежності стану тварин від об'єму крововиливу та клітинні реакції у перигематомній ділянці значною мірою обумовлюють можливість використання морфологічних даних для оцінки впливу лікарських засобів. Перспективним є вплив на ендогенні стовбурові клітини та запальні реакції, що в комбінації може потенційно змінити гістогенетичні закономірності ремоделювання ураженої ділянки мозку [6,7].

Мета – дослідити динаміку змін функціонального стану щурів з інсультом та міграції CD44+ клітин у перигематомну ділянку після фармакокорекції.

Матеріали та методи

Модель інсульту. Щурам самцям лінії Вістар (маса $205,6 \pm 7,1$ г) моделювали внутрішньомозкову гематому у правій внутрішній капсулі головного мозку. Маніпуляції з тваринами проведено під наркозом (тіопентал натрію, 50 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Координати введення аутологічної крові у головний мозок розраховували за стереотаксичним атласом Paxinos G. і Watson C. (2006) (L=3.0-4.0; H=4.0-6.0; AP=-1.0-3.0) [8]. Здійснювали розріз попередньо поголеної шкіри, робили трепанаційний отвір діаметром 1,0 мм, вводили аутологічну кров в об'ємі 0,02 мл (без коагулянтів, шприцем 1,0 мл), голку залишали зафіксованою, не виводили з мозку,

через 10 хвилин вводили кров повторно в тому ж об'ємі, Після цього голку вилучали, рану зашивали поліамідним філаментом 2 USP і зрошували повідон-йодом.

Тварин рандомно розділили на 4 групи по 24 у кожній: 1) щури з інсультом (ІНС), 2) щури з інсультом та введенням дексаметазону (ІНС/Д), 3) щури з інсультом та введенням гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору (ІНС/Ф), 4) щури з інсультом та комбінованим введенням досліджуваних лікарських засобів (ІНС/Д+Ф). Дексаметазон («Лекхім», Україна) вводили у дозі 10 мг/кг, а фактор росту (rHuG-CSF, Sanofi) у дозі 50 мкг/кг, підшкірно через 1, 2 та 3 доби експерименту один раз на добу.

На 1, 3 та 10 добу після моделювання геморагічного інсульту проведено оцінку функціонального показника щурів, яким моделювали геморагічний інсульт. В якості функціональної проби обрано тест «інвертований тест» та «вихід на платформу».

«Інвертований тест». Щурів поміщали на металеву сітку 30×40 см (вікно сітки 1 см, сітка оточена загорожею висотою 10 см) сітку перевертали і щури перебували у положенні спиною до низу. Тварини утримуються за сітку до виснаження. Час висіння фіксується як латентний період (сек).

«Вихід на платформу». Щурів поміщали на металеву сітку 30×40 см (вікно сітки 1 см, сітка без бортів, на зверху сітки платформа з дерева, пластика тощо), перевертали і щури перебували у положенні спиною до низу. Тварини спершу утримуються, далі переміщуються на верх сітки з платформою. Час виходу тварин з положення на спині на платформу фіксується як латентний період (сек). Фіксуються випадки невиконання тесту.

Виведення з експериментів. Через 1, 3 та 10 діб після моделювання інсульту щурів виводили з експерименту з розрахунку по 8 тварин на кожен термін спостереження (без урахування летальності). Тварин наркотизували (тіопентал натрію, 50 мг/кг, внутрішньоочеревинно) і здійснювали інтракардіальну перфузію (спершу фізіологічним розчином в об'ємі 200 мл, потім 10% розчином формаліну у розведенні на фізіологічному розчині у об'ємі 200 мл). Головний мозок щурів був вилучений для оцінки об'єму гематоми та гістологічного дослідження.

Об'єм гематоми. Головний мозок щурів фронтально розрізали з кроком у 2 мм. Зрізи, у який виявлено крововилив, сканували і за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) вимірювали площу. Площу множили на товщину зрізів мозку, щоб отримати загальний об'єм гематоми [9,10].

Імуногістохімічне дослідження. Зразки мозку зневоднювали у ізопропанолі (три серії, 99,8% розчин), хлороформі і ущільнювали у па-

рафіні (три серії, по 60 хв). Із парафінових блоків виготовляли фронтальні зрізи товщиною 4 мкм. Мікропрепарати забарвлювали гематоксиліном та еозином. CD44+ клітини виявляли імуногістохімічним методом. Використано мишаче моноклональне антитіло проти CD44 (Abcam, ab238464, США) у розведенні 1:200, час інкубації 20 хв при 24°C, час інкубації з вторинним антитілом 10 хв. Візуалізацію реакції здійснювали на основі реакції з діамінобензидином (EnVision FLEX; Dako, Glostrup, Данія). Мікропрепарати досліджували під мікроскопом Olympus BX51 і фотографували цифровою камерою Olympus C3040ZOOM за допомогою програмного забезпечення Olympus DP-Soft 3.2 (Olympus, Токіо, Японія).

Активність міграції CD44+ клітин оцінювали активність 3-бальною шкалою, де 1 бал наявні поодинокі імунопозитивні клітини, 2 бали виявлено групи клітин навколо гематоми, 3 бали встановлено множинні скупчення у/та навколо гематоми.

Статистичні дослідження. Статистичну обробку даних проводили у програмі StatPlus (ver. 7.0, AnalystSoft Inc.). Нормальність розподілу даних у групах порівняння визначали за критерієм Колмогорова-Смирнова. Вірогідну різницю між групами визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з поправкою Бонферонні. Визначали коефіцієнт рангової кореляції Спірмена. Відмінності між

групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Біоетика. Експерименти з лабораторними тваринами проводили відповідно до Директиви ЄС 2010/63/ЄС для експериментів на тваринах та Національного Інституту здоров'я догляд та використання лабораторних тварин (NIH Publications No. 8023, перегляд 1978 року). Дослідження було затверджено на Біоетичній комісії та етики наукових досліджень у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця (протокол №160 від 26.09.2022 р).

Результати та їх обговорення

У щурів з інсультом різко зменшились результати функціональних тестів порівняно з даними до моделювання внутрішньомозкового крововиливу. Сила хапального рефлексу у «інвертованому тесті» достовірно зменшилась, а час виконання тесту «вихід на платформу» збільшився. У групі ІНС встановлено достовірне збільшення латентного періоду ($p < 0,05$) через 10 діб після моделювання інсульту, що оцінено як прояв спонтанного функціонального відновлення. У групі ІНС/Д не виявлено різниці результатів між термінами проходження тесту. У групі ІНС/Ф через 10 діб відмічено тенденцію покращення, а у групі ІНС/Д+Ф різниця між першим та третім терміном спостереження досягла достовірної різниці, збільшення латентного періоду ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1
Результати оцінки функціонального стану щурів з інсультом за тестом «інвертований тест» (ІТ) «вихід на платформу» (ВП) (Me[Q1-Q3])

Група тварин	Тест	Термін		
		1 доба	3 доба	10 доба
К	ІТ	215,1[170.6-235.7]		
	ВП	5.0[4.7-6.0]		
ІНС	ІТ	18.3[7.0-27.7]*	10.0[7.5-12.5]*	51.2[25.7-60.2]*,**,‡
	ВП	15.0[9.5-18.2]*	11.7[10.0-13.0]*	15.3[10.0-13.3]*
ІНС/Д	ІТ	10.3[7.3-18.7]*	10.3[8.3-15.0]*	8.3[7.5-10.8]*
	ВП	9.3[7.7-13.2]	8.8[6.7-10.3]	8.3[7.3-10.7]
ІНС/Ф	ІТ	15.2[10.2-18.1]*	12.8[8.9-38.2]*	23.3[14.3-27.0]*
	ВП	11.5[7.7-16.9]*	9.8[7.5-12.2]	8.2[7.4-10.7]
ІНС/Д+Ф	ІТ	15.2[7.5-23.5]*	17.8[13.7-25.0]*	39.8[26.2-62.9]*,**
	ВП	7.6[6.5-19.2]	12.3[10.3-17.2]*	11.5[8.4-15.5]

Примітка: * $p < 0,05$ до контролю; ** $p < 0,05$ до 1 доби; ‡ $p < 0,05$ до 3 доби

У тесті «вихід на платформу» час виконання тесту був достовірно довшим у групі ІНС у три терміни спостереження, у групі ІНС/Ф через 1 добу після інсульту, у групі ІНС/Д+Ф через 3 доби. Загальною тенденцією було збільшення часу переходу на платформу. Результати функціональних тестів свідчать про гіршу результативність виконання тестів тваринами з інсультом. Результати кореляційного аналізу на 1 добу після

моделювання інсульту вказують на слабку негативну залежність між об'єм гематоми та результатами тестування за «інвертованим тестом» ($r = -0,29$, $p = 0,03$) і слабку залежність з часом виконання тесту «вихід на платформу» ($r = 0,46$, $p = 0,01$). З часом відбувалось часткове відновлення функціонального стану тварин. Інвертований тест показав більшу чутливість щодо оцінки рівня загального соматичного стану щурів: вто-

ми, загальної слабкості, функції передньої кінцівки.

Проведено аналіз морфологічних особливостей крововиливу та його об'єму. Крововилив виявлено у ділянці мозку, яка мала внутрішню капсулу та росто-латеральну зону таламусу (Рис. 1). Середній об'єм гематом не відрізнявся

між групами порівняння, у динаміці експерименту також не виявлено статистично значущої різниці (Рис. 2). Згідно стереотаксичного атласу гематоми межували з сенсомоторною корою, ядрами таламуса, структурами смугастого тіла та білого шару.

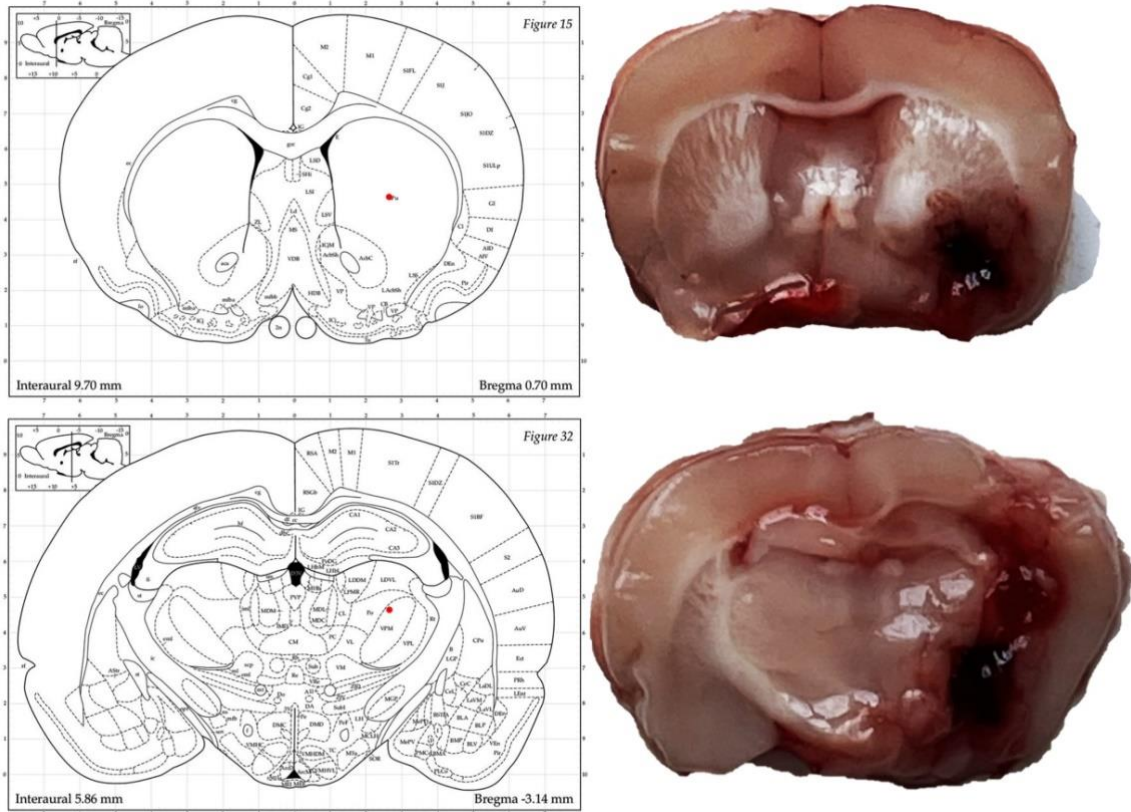


Рис. 1 Фронтальні зрізи головного мозку щура з гематомою та карта структур головного мозку зі стереотаксичного атласу.

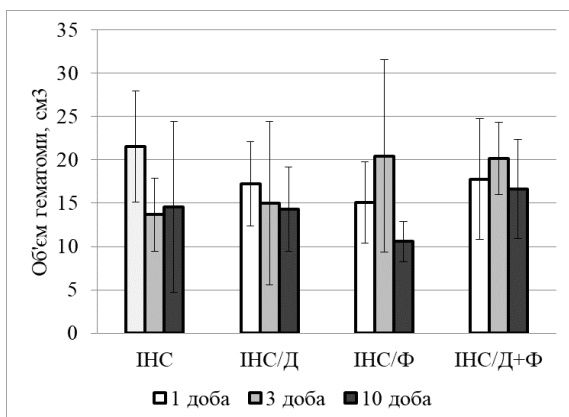


Рис. 2. Об'єм гематом у правій гемісфері мозку щурів через 1, 3 та 10 діб після введення аутологічної крові ($M \pm m$).

Об'єм крововиливу позначився на летальності тварин (табл. 2). Зареєстровано випадки невиконання тваринами тестів (табл. 2). Так, успішність тесту «вихід на платформу» у чотирьох групах була наступною: через 1 добу після інсульту у 73,9%, 76,1%, 100% і 82,6% тварин, через 3 доби – 92,8%, 76,9%, 93,3% і 100%, через 10 діб – 100%, 83,3%, 83,3% і 100% (табл. 2). У групі ІНС встановлено вищу динаміку летальності за 10-денний термін.

За результатами гістологічних досліджень встановлено наступні морфологічні зміни у ділянці крововиливу: 1 доба – виявлено тільки крововилив; 3 доба – з'являються поодинокі мононуклеарні клітини або їх невеликі групи; 10 доба – ознаки елімінації крововиливу і інфільтрація лімфоцитів, моноцитів/макрофагів, ангиогенез. Імуногістохімічним методом виявлено появу поодиноких CD44+ клітин спершу у перигематомній тканині мозку, а через 3 та 10 діб після введення аутологічної крові мала місце активна інфільтрація імунопозитивних клітин (Рис. 3).

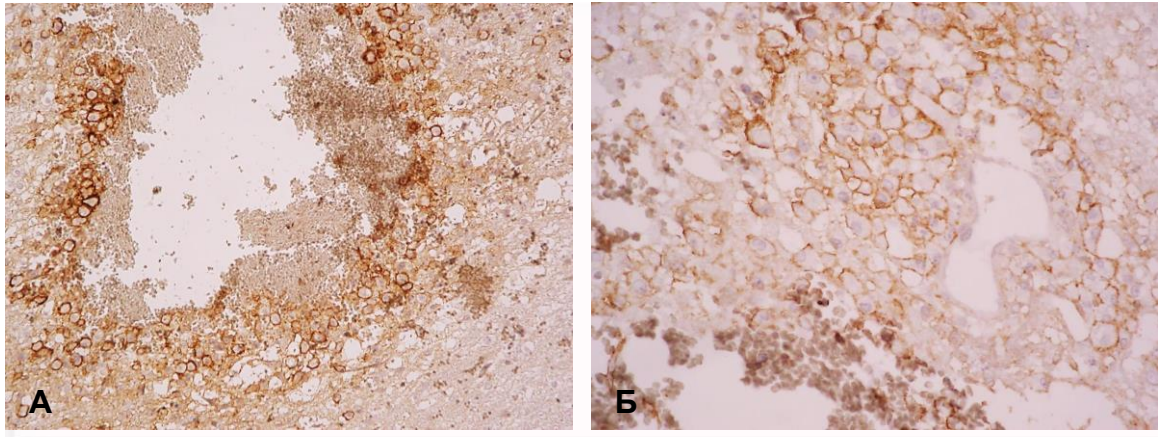


Рис. 3. CD44+ клітини навколо крововиливу через 3 доби після введення аутологічної крові у мозок щурів. Імуногістохімічне забарвлення з гематоксиліном Гілла. А ×200, Б ×400.

Таблиця 2
Успішність виконання тесту «вихід на платформу» через 1, 3 та 10 діб після моделювання інсульту з урахуванням летальності тварин

Група	Термін тест+ (N щурів на термін дослідження)		
	1 доба	3 доба	10 доба
ІНС (n=24)	17(23)	13(14)	3(3)
ІНС/Д (n=24)	16(21)	10(13)	5(6)
ІНС/Ф (n=24)	23(23)	14(15)	5(6)
ІНС/Д+Ф (n=24)	19(23)	16(16)	5(5)

Примітка: в дужках вказано кількість тварин на добу експерименту після виведення тварин на кожен термін спостереження та після виключення з аналізу летальних випадків.

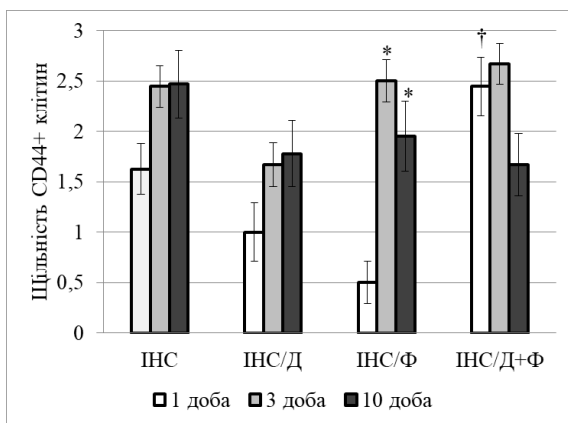


Рис. 4. Активність міграції CD44+ клітин за 3-бальною шкалою до ділянки крововиливу через 1, 3 та 10 діб після введення аутологічної крові у праву гемісферу мозку щурів (M±m). * p<0,05 до 1 доби; † p<0,05 до групи ІНС/Д на 1 добу.

У групі ІНС/Д CD44+ клітин з меншою інтенсивністю мігрували до перигематомного регіону, а елімінація формених елементів крові макрофагами була затриманою. Дексаметазон позначився на відтермінуванні клітинних реакцій, які пов'язані з участю клітин з прозапальним фенотипом у ремоделюванні крововиливу. Тенденцію до більш ранньої появи CD44+ клітин навколо гематоми встановлено у групі ІНС/Д+Ф (Рис. 4).

Щоб зрозуміти головну тенденцію появи CD44+ клітин навколо крововиливу було виключено з аналізу фактор введення лікарських засобів (об'єднали варіаційні ряди груп) і провели кореляцію між об'ємом крововиливу і даними за 3-бальною шкалою оцінки щільності досліджуваних клітин. Ранговий кореляційний аналіз за критерієм Спірмена показав сильний позитивний зв'язок між активністю міграції CD44+ клітин та об'ємом гематоми через 3 доби після введення аутологічної крові і тенденцію залежності через 10 діб (1 доба $r=0,04$ $p=0,86$; 3 доба $r=0,65$ $p<0,01$; 10 доба $r=0,38$ $p=0,09$). Таким чином, об'єм крововиливу у значній мірі визначав інфільтрацію CD44+ клітин у перифокальну ділянку крововиливу.

На основі даних, які одержані за результатами гістологічних, імуногістохімічних та функціональних досліджень, сформовано заключення про те, що існує зв'язок між клітинними реакціями навколо крововиливу, морфологією крововиливу та рівнем функції у тварин з інсультом. Виявлено тенденцію того, що дія дексаметазону у досліджуваній дозі може мати негативні ефекти щодо динаміки відновлення після інсульту. Візуально неврологічний дефіцит може виявлятися як обмежена моторна активність або значний парез кінцівки, що є результатом ураження різних структур мозку і корелює зі ступенем ушкодження. «Інвертований тест» характеризує загальну соматичну активність, м'язову силу, хапальний і орієнтаційний рефлекс [11]. Тест є

методом вибору для оцінки стану тварин, у яких після ураження мозку погіршились поведінка і соматичний стан, без ознак парезу кінцівки. Ми показали, що «інвертований тест» є більш чутливим методом оцінки функції передньої кінцівки, ніж тест «вихід на платформу». Але другий тест має вищу чутливість щодо негативного результату, тобто невиконання тесту. Відмічено, що тварини, які показали негативний результат тесту, або у динаміці мали мізерні значення латентного періоду гинули у терміні 12-36 годин. У такому контексті ця частина тесту є прогностичною щодо динаміки летальності дослідних тварин із значним ураженням мозку.

Другим важливим результатом роботи є те, що активність інфільтрації CD44+ клітин мала позитивну кореляцію з об'ємом крововиливу. Розглядається гіпотеза, що навколо крововиливу в певній мірі відбувається конкуренція між клітинами з прозапальним фенотипом та астроцитами, які формують гліальний рубець. Існує погляд, що астроцити проявляють реактивні зміни для обмеження перифокальної тканини від цитотоксичного впливу продуктів некрозу та гемолізу [12]. Швидка елімінація клітинного детриту може сприяти збереженню умовно неушкодженої тканини мозку навколо крововиливу і опосередковано вплинути на морфологію гліального рубця. У цих реакціях можуть бути задіяні CD44+ клітин оскільки цей поверхневий маркер є рецептором до гіалуронану і необхідний клітинам з прозапальним фенотипом для міграції до ушкоджених тканин [13]. Його експресують макрофаги моноцитарного походження [14], клітини мікроглії [15] та нейтрофіли при запаленні [16], деякі субпопуляції Т-лімфоцитів та мезенхімальні стовбурові клітини [17]. Подібно до наших результатів, міграцію CD44+ клітин впродовж тривалого часу спостерігали після ішемічного інсульту [18]. Разом з тим, дексаметазом пригнічував появу CD44+клітин, але стимулював астрогліоз та появу CD146+ клітин у віддаленому періоді і їх участь у ангіогенезі [19,20]. Виявлені у цьому дослідженні зміни міграції CD44+ клітин можуть розглядатись як ще одні ефекти дексаметазону на клітинні реакції у перигематомній ділянці ушкодженого мозку. Роль гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору росту у цих змінах

ще потребують досліджень, але той факт, що функція передніх кінцівок була кращою і поява CD44+ клітин мала тенденцію до збільшення є підґрунтям до оцінки позитивного ефекту фактору на регіональні зміни навколо гематоми, як і при комбінації фактору з дексаметазоном.

Висновки

1. Тести «інвертований тест» та «вихід на платформу» дали можливість кількісно оцінити зміни функціональних показників (хапальний рефлекс, сила передньої кінцівки) у тварин, яким моделювали інсульт, без появи парезу кінцівки. Результати тестувань у гострому періоді залежали від ступеня ураження мозку і об'єму гематоми.

2. До перигематомної ділянки мозку щурів з інсультом мігрували CD44+ клітини, які гіпотетично мають зв'язок з клітинними реакціями, що пов'язані з ремоделюванням ураженої тканини мозку та елімінацією крововиливу.

3. Дія дексаметазону позначилась у тенденції до пригнічення міграцію CD44+ клітин до крововиливу у перші 3 доби інсульту і затримки спонтанного відновлення функції кінцівки тварин з інсультом, тоді як гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор сприяв появі клітин з досліджуваним імунотипом.

Перспективи подальших розробок

Результати досліджень відкривають перспективи у вивченні закономірностей розвитку тканинних реакцій у перифокальній ділянці інсульту, зокрема розвитку гліального рубця, запального процесу та ангіогенезу, участь клітин різкого імунотипу у цих змінах та їх конкурентні взаємодії.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено за підтримки МОЗ України в рамках програми фундаментальних досліджень «Вивчити особливості відновлювальних процесів у головному мозку та нервовому стовбурі при модуляції накопичення та диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин» (номер державної реєстрації 0123U101051).

Літературні джерела References

1. Rost NS, Meschia JF, Gottesman R, Wruck L, Helmer K, Greenberg SM. Cognitive impairment and dementia after stroke: design and rationale for the DISCOVERY study. *Stroke*. 2021;52(8):499-516. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.031611.

2. Bai Q, Sheng Z, Liu Y, Zhang R, Yong VW, Xue M. Intracerebral haemorrhage: from clinical

settings to animal models. *Stroke Vasc Neurol*. 2020;5(4):388-395. DOI: 10.1136/svn-2020-000334.

3. Oliynyk TM, Savosko SI, Ryzha AO, Tchaikovsky YuB. [Ultrastructural changes in the motor cortex of rats with stroke. *Herald of problems of biology and medicine*]. 2017;3(2):92-98. Ukrainian. DOI: 10.26724/2079-8334-2019-1-67-

4. Ruan J, Yao Y. Behavioral tests in rodent models of stroke. *Brain Hemorrhages*. 2020;1(4):171-184. DOI: 10.1016/j.hest.2020.09.001.
5. Li Y, Zhang J. Animal models of stroke. *Animal Model Exp Med*. 2021;4(3):204-219. DOI: 10.1002/ame2.12179.
6. Xiao Y, Peperzak V, van Rijn L, Borst J, de Bruijn JD. Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;4(5):374-386. DOI: 10.1002/term.250.
7. Wang H, Pang B, Li Y, Zhu D, Pang T, Liu Y. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2012;14(4):423-430. DOI: 10.3109/14653249.2011.652735.
8. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier, 2006. available from: <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/?ml=&ap=-2&dv=>
9. Song EC, Chu K, Jeong SW, Jung KH, Kim SH, Kim M, Yoon BW. Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2003;34(9):2215-2220. DOI: 10.1161/01.STR.0000088060.83709.2C.
10. Jung KH, Chu K, Jeong SW, Han SY, Lee ST, Kim JY, Kim M, Roh JK. HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery, suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(7):1744-1749. DOI: 10.1161/01.STR.0000131270.45822.85.
11. Madiha S, Batool Z, Tabassum S, Liaquat L, Sadir S, Shahzad S, Naqvi F, Saleem S, Yousuf S, Nawaz A, Ahmad S, Sajid I, Afzal A, Haider S. Quercetin exhibits potent antioxidant activity, restores motor and non-motor deficits induced by rotenone toxicity. *PLoS One*. 2021;16(11):258928. DOI: 10.1371/journal.pone.0258928.
12. Begum G, Song S, Wang S, Zhao H, Bhuiyan MH, Li E, Nepomuceno R, Ye Q, Sun M, Calderon MJ, Stolz DB, St Croix C, Watkins SC, Chen Y, He P, Shull GE, Sun D. Selective knockout of astrocytic Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 reduces astrogliosis, BBB damage, infarction, and improves neurological function after ischemic stroke. *Glia*. 2018;66(1):126-144. DOI: 10.1002/glia.23232.
13. Sladek Z, Rysanek D. Expression of macrophage CD44 receptor in the course of experimental inflammatory response of bovine mammary gland induced by lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. *Res Vet Sci*. 2009;86(2):235-240. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.07.016.
14. Zhou L, Hao Q, Sugita S, Naito Y, He H, Yeh CC, Lee JW. Role of CD44 in increasing the potency of mesenchymal stem cell extracellular vesicles by hyaluronic acid in severe pneumonia. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):293. DOI: 10.1186/s13287-021-02329-2.
15. Kang WS, Choi JS, Shin YJ, Kim HY, Cha JH, Lee JY, Chun MH, Lee MY. Differential regulation of osteopontin receptors, CD44 and the alpha(v) and beta(3) integrin subunits, in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2008;1228:208-216. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.06.106.
16. Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*. 2005;201(8):1183-1189. DOI: 10.1084/jem.20042014.
17. Baaten BJ, Tinoco R, Chen AT, Bradley LM. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front Immunol*. 2012;3:23. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00023.
18. Sawada R, Nakano-Doi A, Matsuyama T, Nakagomi N, Nakagomi T. CD44 expression in stem cells and niche microglia/macrophages following ischemic stroke. *Stem Cell Investig*. 2020;7:4. DOI: 10.21037/sci.2020.02.02.
19. Kuraieva A, Savosko S, Chaikovskiy Y, Bashyrova O, Makarenko O. Dexamethasone prolongs the duration of astrogliosis in the rat brain following intracerebral hemorrhage. *Fiziol. Zh*. 2022;68(3):50.
20. Kuraieva AV, Savosko SI, Grabovoy AN, Makarenko OM. [Dexamethasone modulates the migration of non-resident cells to the perifocal area of the blood in the brain]. In: [The All-Ukrainian scientific and practical conference with international participation is dedicated to the memory of the corresponding member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Doctor of Medicine, professor Yu.B. Tchaikovskiy "Tissue reactions in the norm, experiment and clinic"; 2023 June 8-9; Kyiv, Ukraine]. *USMYJ*; 2023:90-91. Ukrainian.

Курасва А.В., Савосько С.І. Дексаметазон та гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор впливають на морфологію перигематомної ділянки у мозку щурів з локальним геморагічним інсультом.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Визначальними показниками для оцінки ефектів лікарських засобів на тваринних моделях інсульту вважають функціональні тести, морфологічні особливості перигематомної ділянки, динаміка та інтенсивність міграції клітин з прозапальним фенотипом. **Мета.** Дослідити динаміку змін функціонального стану щурів з інсультом та міграції CD44⁺ клітин у перигематомну ділянку після введення дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору. **Методи.** У щурів моделювали односторонній геморагічний інсульт, підшкірно вводили дексаметазон, фактор росту (rHuG-CSF)

та їх комбінацію на 1, 2 і 3 добу дослідів. Оцінювали результати тестів «інвертований тест» та «вихід на платформу», морфометрично вимірювали об'єм гематоми, імуногістохімічно виявляли CD44+ клітини у перигематомній ділянці мозку, активність їх міграції оцінювали за 3-бальною шкалою. **Результати.** Після моделювання інсульту у щурів різко погіршились результати тестувань через 1 та 3 доби, а через 10 діб спостерігали часткове відновлення. Сила хапального рефлексу у «інвертованому тесті» достовірно зменшилась, а час виконання тесту «вихід на платформу» збільшився. Результати проходження «інвертованого тесту» та тесту «вихід на платформу» характеризувались залежністю слабкої та середньої сили щодо об'єму гематоми. Дексаметазон вплинув на розвиток клітинних реакцій у перигематомній ділянці через затримку міграції CD44+ клітин та елімінації формених елементів крові макрофагами, а фактор росту сприяв інфільтрації CD44+ клітин у перші 3 доби дослідів. **Висновки.** Функціональні тести дали можливість кількісно оцінити прояви неврологічного дефіциту (хапальний рефлекс, сила передньої кінцівки) у тварин, яким моделювали інсульт, без появи парезу кінцівки. Міграція CD44+ клітини до перигематомної ділянки потенційно пов'язана з ремоделюванням пошкодженої тканини мозку та елімінацією гематоми. Дія дексаметазону позначилась у затримці відновлення функції кінцівки та міграції CD44+ клітин до ділянки крововиливу, тоді як фактор росту сприяв більш ранній появі CD44+ клітин.

Ключові слова: дексаметазон, гранулоцитарний колоніестимулюючий фактор, інсульт, поведінкові тести, об'єм гематоми, CD44+ клітини, кореляційний аналіз.