

УДК 615.361.018.8.013.014.41:616.831-005.1

В.В. Лебединец, Л.В. Останкова, Т.Г. Дубрава*, Н.А. Бондарович*,
М.В. Останков*, Д.В. Лебединец, А.Н. Гольцев**

*Центральная клиническая больница ГП «Укрзалізниця», г. Харьков
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Приведены результаты экспериментального исследования по применению криоконсервированной кордовой крови человека (кККЧ) для коррекции иммунной системы у крыс линии Вистар с индукцией ишемического инсульта (ИИ), который моделировали окклюзией средней мозговой артерии в левом полушарии головного мозга. Исследование проведено на 147 здоровых крысах-самцах. Клеточную суспензию кККЧ вводили внутривенно через 6 ч после окклюзии средней мозговой артерии. Животные были разделены на группы: 1-я – интактные (контроль); 2-я – с индукцией ИИ, без лечения; 3-я – ИИ, лечение кККЧ; 4-я – ИИ, лечение кККЧ с церебролизин; 5-я – ИИ, лечение церебролизин. Показано, что у животных в остром периоде ИИ (1-е, 3-и сутки) имеются признаки дисрегуляции и иммунодефицита. Изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов заключаются в дефиците Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), увеличении количества естественных киллеров (CD16⁺) и уменьшении – Т-регуляторов (CD4⁺/CD25⁺). При применении кККЧ с церебролизин для лечения ИИ у крыс в большей степени, чем при применении только кККЧ или церебролизина, восстанавливались показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета. На 7-е сутки увеличивалось количество CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺-клеток, снижалась активность CD16⁺-клеток и уменьшалась концентрация циклических иммунных комплексов. К этому сроку у животных данной группы восстанавливались интегративная деятельность мозга и неврологический статус.

Ключевые слова: ишемический инсульт, церебролизин, криоконсервированная кордовая кровь, иммунный и неврологический статус.

Ишемический инсульт (ИИ) является наиболее частым видом цереброваскулярных заболеваний [1, 2]. В его патогенезе принимают участие иммунные механизмы (аутоиммунная агрессия, локальная воспалительная реакция) [3–7].

Современные исследования терапии цереброваскулярных заболеваний и в частности ишемии мозга связаны с применением нейротропных препаратов: «Фенотропил», «Холин», «Церебролизин» и др., действие которых направлено на репарацию нервной ткани [8–13], а также иммуномодуляторов, которые способны снизить воспалительную реакцию [14–16].

В настоящее время ведется поиск новых подходов к лечению острого церебрального инсульта. Клеточные технологии позволяют разрабатывать принципиально новые подходы к лечению ИИ [16–19]. В качестве агентов для клеточной терапии могут быть использованы клетки кордовой (пуповинной) крови человека (ККЧ) [19–25]. Благодаря многокомпонентному клеточному составу, наличию в ККЧ мезенхимальных стволовых клеток, способных дифференцироваться *in vitro* в нейроны, астроциты и олигодендроциты [16, 17, 24, 25], а также комплекса биологически активных соединений [13, 22, 26] нами предпринята попытка применения

© В.В. Лебединец, Л.В. Останкова, Т.Г. Дубрава и др., 2015

криоконсервированной ККЧ (кККЧ) для лечения больных с ИИ.

Преимущество применения кККЧ связано с возможностью ее сертификации, длительного хранения в жизнеспособном состоянии и применения в клинике по мере необходимости. Однако для этого необходимо экспериментальное обоснование применения кККЧ в клинике.

Цель настоящей работы – оценить влияние иммунокорректирующей терапии введением криоконсервированной кордовой крови у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом.

Материал и методы. Экспериментальная работа выполнена на 147 крысах-самцах линии Вистар 6-месячного возраста, массой 180–200 г в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2010). Ишемический инсульт был смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) в левом полушарии по методу [27], позволяющему получить стандартное повреждение, которое распространяется на неокортекс. Крыс наркотизировали кетамином (125 мг/кг) интраперитонеально.

Кордовую кровь человека криоконсервировали в одноразовых пластиковых пробирках («Nunc», США) на программном замораживателе в аутоплазме [28]. Образцы кККЧ хранили при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в низкотемпературном банке ИПКиК НАН Украины. В день эксперимента образцы с суспензией клеток кККЧ оттаивали на водяной бане при температуре $40\text{--}41\text{ }^{\circ}\text{C}$ [9]. Криоконсервированную кордовую кровь человека вводили крысам внутривентриально через 6 ч после СМАо по $0,5\text{ мл}$ ($5 \cdot 10^6$ клеток). Церебролизин в дозе $0,1\text{ мл}$ на 100 г массы животного вводили внутривентриально в течение 3 дней.

Крысы были разделены на пять групп: 1-я – интактные ($n=7$); 2-я – с индукцией ИИ ($n=35$); 3-я – ИИ + кККЧ ($n=35$); 4-я – ИИ + кККЧ + церебролизин ($n=35$); 5-я – ИИ + церебролизин ($n=35$).

Проводили поведенческое и неврологическое тестирования животных на 7-е сутки развития ИИ и после лечения. В клеточном звене иммунитета исследовали субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток

селезенки методом проточной цитофлуориметрии с применением моноклональных антител к CD3-, CD4-, CD8-, CD25-молекулам (BD, США). В гуморальном звене иммунитета определяли концентрацию циклических иммунных комплексов (ЦИК) методом спектрофотометрии. Анализ проводили на 3-и, 7-е, 14-е и 28-е сутки развития ИИ и после лечения.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0.

Результаты и их обсуждение. Диагностика иммунных нарушений имеет большое значение при развитии ИИ, поскольку отображает степень иммунодефицита на начальных стадиях заболевания, а также динамику, наблюдаемую в процессе лечения [4, 15, 29].

В ходе иммунологического исследования было показано, что у крыс с индукцией ИИ наблюдается развитие дисфункционального состояния в КЗИ. Количество общих Т-лимфоцитов (CD3⁺) уменьшалось уже на 1-е сутки, а к 7-м суткам эти изменения были значительными, их количество было в 5 раз меньше, чем у контрольных животных (табл. 1, рис. 1). Такая же закономерность характерна для показателей Т-хелперов (CD4⁺) и Т-супрессоров/цитотоксических клеток (CD8⁺). Количество CD4⁺-клеток к 7-м суткам уменьшилось почти в 6 раз, а CD8⁺-клеток – в 2 раза, что отражалось на показателях иммунорегуляторного индекса (ИРИ), который был достоверно выше контрольных значений в 2 раза. Данные изменения свидетельствуют о выраженном дисрегуляторном сдвиге тех клеток, которые участвуют в реализации иммуновоспалительной реакции. Отмечалось значительное увеличение популяции естественных киллеров (CD16⁺) на 1-е сутки (табл. 1, рис. 1). Такая активация естественных киллеров в 1-е сутки развития ИИ может быть связана с компенсаторными реакциями организма в ответ на супрессорный фактор, каким является индукция ИИ. Начиная с 3-х суток количество естественных киллеров (CD16⁺) и Т-регуляторов (CD4⁺/CD25⁺) у всех крыс группы 2 уменьшалось и не восстанавливалось на 28-е сутки (табл. 1, рис. 1). Такое уменьшение количества Т-регуляторов указывает на неспособность организма животного про-

Таблиця 1. Показатели клеточного звена иммуни

Группа животных	Срок исследования, сутки	Популяционный	
		CD3 ⁺	CD4 ⁺
Контроль		20,4±2,2	16,7±0,9
ИИ	1-е	10,3±0,7*	8,7±0,6*
	3-и	8,2±0,6*	6,0±0,4*
	7-е	4,1±0,3*	2,9±0,2*
	28-е	16,2±1,8*	10,4±0,8*
ИИ + кККЧ	1-е	12,5±0,9*#	10,1±0,7*#
	3-и	13,9±1,0*#	9,9±0,6*#
	7-е	11,0±0,8*#	10,1±0,4*#
	28-е	20,1±0,9#	16,2±0,4#
ИИ + кККЧ + церебролизин	1-е	14,4±0,8*	13,1±0,9**@
	3-и	16,2±1,1**@	12,0±0,8**@
	7-е	13,3±0,9**@	11,8±0,7**@
	28-е	21,4±4,3#@	17,0±5,3#@
ИИ + церебролизин	1-е	11,0±0,8*	10,0±0,7**@
	3-и	10,3±0,9**@	7,3±0,6**@
	7-е	6,2±0,8**@	7,2±0,7**@
	28-е	16,8±1,2**@	12,4±1,4**

Примечание. Достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с показателями животных: Здесь и в табл. 2.

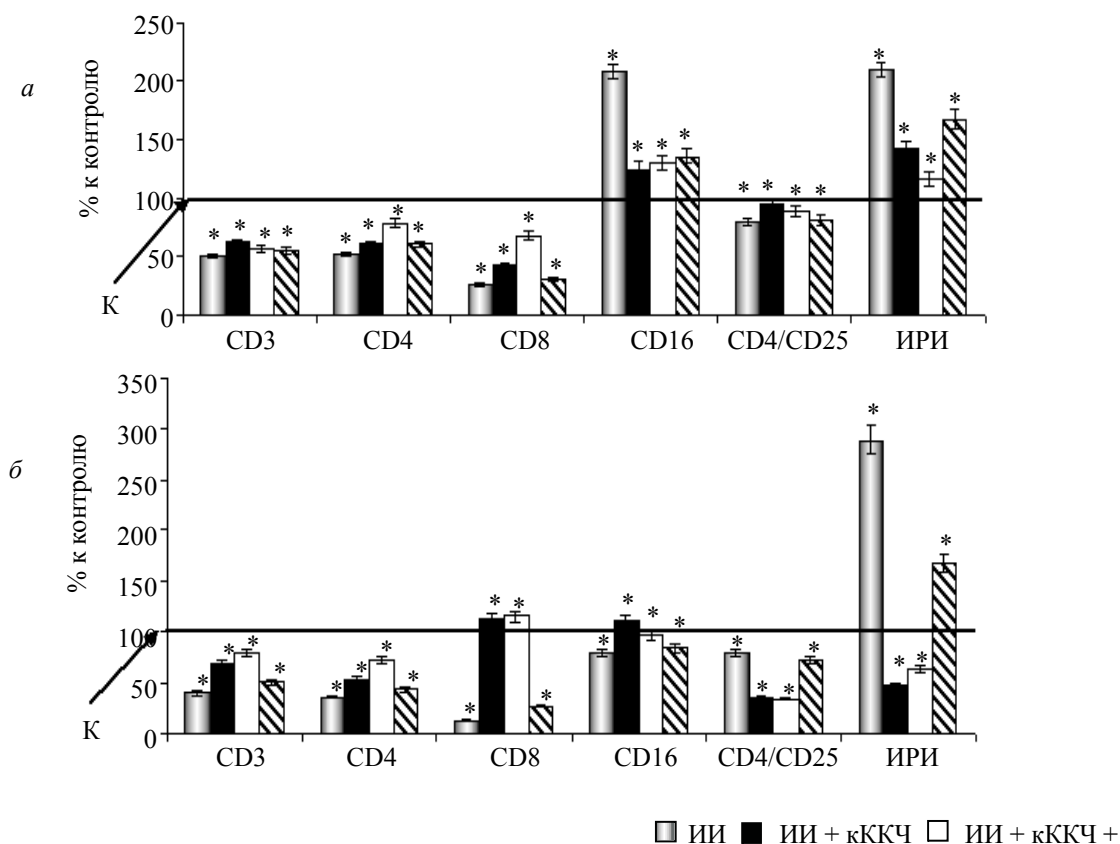
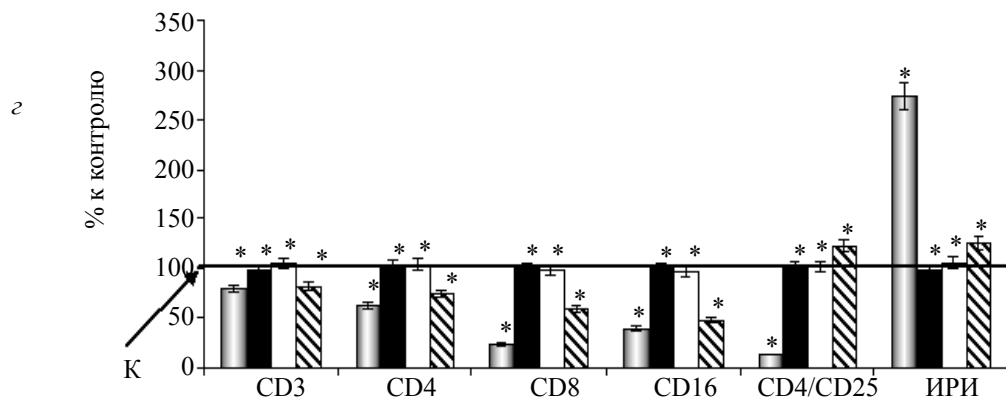
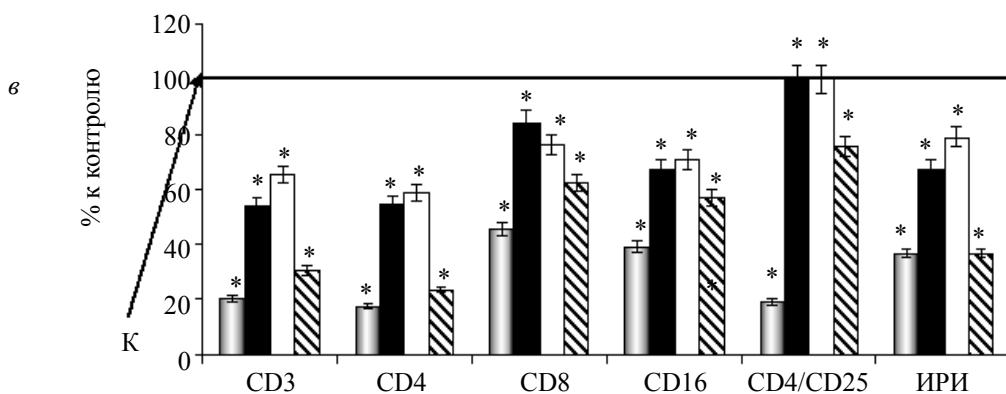


Рис. 1. Показатели клеточного звена иммунитера у крыс на 1-е (а), 3-и (б),

тата у крыс с индукцией ИИ до и после лечения, %

состав клеток селезенки			
CD8 ⁺	CD16 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ⁺	ИРИ
8,8±1,5	12,5±0,9	5,3±0,5	1,9±0,3
2,2±0,2*	26,1±1,8*	26,1±1,8*	4,0±0,3*
1,1±0,1*	1,1±0,1*	10,0±0,7*	3,4±0,2*
0,8±0,1*	0,8±0,1*	4,9±0,3*	1,0±0,1*
2,0±1,2*	2,0±1,2*	5,0±0,1*	0,7±0,1*
3,7±0,3**	14,5±1,1**	4,5±0,3#	2,7±0,2**
8,9±0,7*	11,7±1,0#	4,7±0,3#	1,1±0,1**
7,4±0,5#	8,4±0,6**@	5,3±0,4#@	1,4±0,1**
8,5±1,2#	12,4±0,5#	5,0±0,2#	1,9±0,8#
6,0±0,4**@	16,2±1,1**	4,7±0,3#	2,2±0,2#@
10,1±0,7*	12,1±0,8#@	5,0±0,4#@	1,2±0,1**@
6,7±0,5**@	8,8±0,6**@	5,3±0,4#@	1,8±0,4#@
8,7±1,0#@	12,0±0,4#@	5,2±0,4#@	1,9±0,3#
2,7±0,3**@	17,0±1,2**	2,9±1,0#	2,8±1,5#
2,3±0,6**@	10,6±0,7**@	4,0±0,3**@	3,2±0,3**@
3,5±0,4**@	7,1±0,5**@	4,0±0,3**	2,1±0,2**
5,2±0,8**	6,0±1,0**	3,3±0,7**	1,95±0,2#

* контрольных; # группы 2; @ группы 3; ^ группы 4 в соответствующий срок.



церебролизин ИИ + церебролизин

7-е (a) и 28-е (z) сутки развития ИИ и после лечения

тивостоять иммуновоспалительной реакции при развитии данной патологии.

В результате применения препарата «Церебролизин» (группа 5) немного улучшились показатели общих Т-лимфоцитов (CD3⁺), которые оставались на стабильно более низком уровне во все сроки наблюдения. Количество Т-хелперов (CD4⁺) также было больше, чем у животных без лечения ($p < 0,5$). Такие же изменения претерпевали и показатели естественных киллеров и Т-регуляторов. Количество Т-супрессоров/цитотоксических клеток также увеличилось к 7-м суткам, что и обусловило снижение ИРИ (табл. 1, рис. 1).

Благодаря применению кККЧ для лечения ИИ (группа 3) улучшились показатели общих Т-лимфоцитов (CD3⁺), регуляторных Т-хелперов (CD4⁺) и Т-супрессоров/цитотоксических клеток (CD8⁺), в наибольшей степени приближались к контролю показатели ИРИ на 7-е сутки. Подобным образом после такой терапии изменялось и количество естественных киллеров и Т-регуляторов (табл. 1, рис. 1).

Включение в комплексную терапию ИИ кККЧ с церебролизинем сопровождалось улучшением показателей клеточного звена иммунитета у животных группы 4 уже с 1-х суток. Показатели у крыс этой группы на 1-е, 3-и сутки были достоверно выше, чем у животных группы 3 (табл. 1, рис. 1). Полученные данные указывают на то, что применение кККЧ с церебролизинем в большей степени препятствует возникновению иммунодефицита, повышая противовоспалительный потенциал организма. В большей степени восстанавливались показатели общих Т-лимфоцитов (CD3⁺), регуляторных Т-хелперов (CD4⁺) и Т-супрессоров/цитотоксических клеток (CD8⁺) у крыс на 7-е сутки. Приближались к контрольным значениям показате-

ли ИРИ. Подобным образом после такой терапии изменялось и количество естественных киллеров и Т-регуляторов (табл. 1, рис. 1).

Следует отметить, что на 7-е сутки у животных, которых лечили только введением кККЧ (группа 3), показатели достоверно не отличались от показателей группы 4 (табл. 1, рис. 1). Из регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов наибольшую чувствительность к иммунокорректирующему действию введенных клеток кККЧ проявляли Т-супрессоры (CD8⁺). К 3-м, 7-м суткам их количество у крыс групп 3 и 4 достоверно превышало ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно) аналогичные показатели у животных групп 2 и 5 и было достоверно больше контроля ($p < 0,001$), табл. 1, рис. 1.

Таким образом, применение кККЧ с церебролизинем или без него является эффективным методом лечения ИИ в условиях эксперимента. Осуществляя корректирующее влияние на клеточное звено иммунитета организма, данная терапия приближает к контрольным значениям общую популяцию Т-лимфоцитов и восстанавливает общую функцию регуляторных субпопуляций Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических клеток, нормализуя ИРИ на 7-е сутки.

Полученные данные указывают на то, что применение кККЧ с церебролизинем препятствует развитию иммунодефицита, повышая противовоспалительный потенциал организма животного.

Параллельно с изменениями в клеточном звене иммунитета происходили изменения и в гуморальном звене, проявившиеся увеличением концентрации ЦИК. Степень выраженности содержания в сыворотке крови ЦИК, что является следствием воспаления, у крыс при развитии ИИ и после лечения была разная (табл. 2, рис. 2). Так, у животных группы 2 на

Таблица 2. Содержание ЦИК в сыворотке крови у крыс с индукцией ИИ до и после лечения

Группа животных	Срок исследования, сутки			
	1-е	3-и	7-е	28-е
Интактные (контроль)	20,8±1,2			
ИИ	97,2±2,3*	187,2±3,1*	290,3±9,3*	153,0±7,9*
ИИ + кККЧ	69,2±3,4**	58,4±2,7**	31,0±2,1**	30,4±3,1**
ИИ + кККЧ + церебролизин	68,2±2,6**@	58,0±1,2**@	30,0±1,8**@	30,3±3,0**@
ИИ + церебролизин	68,9±3,4**@	95,6±4,8**@	69,3±3,5**@	38,0±1,9**@

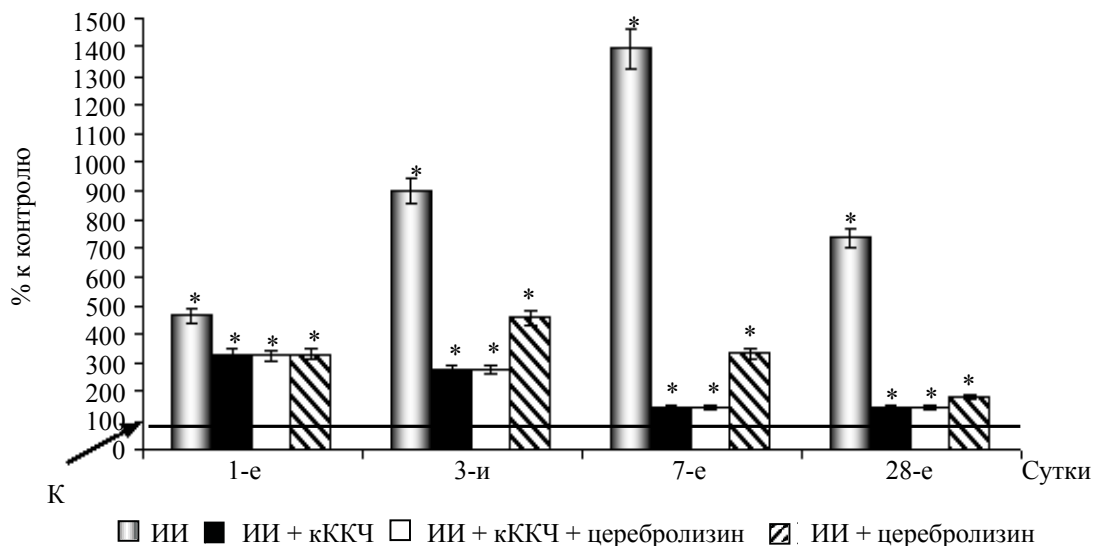


Рис. 2. Концентрация ЦИК в сыворотке крови у крыс с развитием ИИ до и после лечения

7-е сутки после развития ИИ концентрация ЦИК в крови была в 2,9 раза больше контрольных значений. Применение церебролизина приводило к снижению показателей ЦИК, однако данный показатель был выше контроля. У крыс группы 4 количество ЦИК в крови уменьшилось и практически соответствовало контролю. У животных группы 3 количество ЦИК во все сроки наблюдения было меньше, чем в группах 2 и 5, но больше, чем в группе 4.

Неврологический статус коррелировал с восстановлением иммунного статуса и зависел от проводимого лечения. Оценив неврологический статус, мы определили положительное влияние введенных клеток кККЧ на весь организм крыс в группе 3 и в еще большей степени в группе 4. Восстановление не-

врологического статуса по 6 тестам на 7-е сутки после СМАо у крыс в этих группах проходило соответственно в 1,6 и 1,8 раза быстрее, чем у крыс в группах 2 и 5 (табл. 3). Так, у крыс групп 3 и 4 значительно снизился уровень тревожности, восстанавливалась симметричность реакций на раздражение левой и правой стороны туловища и использование конечностей.

Были исследованы поведенческие характеристики в тестах «Открытое поле» и «Крестообразный лабиринт», результаты представлены в табл. 4. Показано, что восстановление активности и ориентации в экспериментальной установке у крыс после введения кККЧ более выражено и происходит быстрее, чем у животных, которых лечили только

Таблица 3. Оценка неврологического статуса у крыс на 7-е сутки после развития ИИ и лечения, баллы

Группа животных	Тесты оценки неврологического статуса						Сумма баллов
	1	2	3	4	5	6	
Интактные (контроль)	3	3	3	3	3	3	18
ИИ	1,60±0,09*	1,0±0,4*	1,0±0,2*	0,7±0,1*	2,1±0,3*	2,0±0,2*	8,4±1,3*
ИИ + кККЧ	2,5±0,5 [#]	2,2±0,2 ^{**}	2,3±0,2 ^{**}	2,2±0,1 ^{**}	2,4±0,2*	2,6±0,2 ^{**}	14,2±1,3*
ИИ + кККЧ + церебролизин	2,7±0,2 [#]	2,6±0,2 ^{#@}	2,4±0,2 ^{**}	2,3±0,3 ^{**}	2,60±0,08 ^{**}	2,80±0,09 [#]	15,4±1,1*
ИИ + церебролизин	2,0±0,2 ^{**#^}	1,2±0,2 ^{*@}	1,1±0,3 ^{*@^}	0,9±0,1 ^{*^}	2,2±0,1 ^{*^}	2,1±0,1 ^{*@^}	9,5±1,0*

Примечания: 1. 1 – спонтанная активность; 2 – симметричность использования конечностей при движении; 3 – симметричность использования передних конечностей, когда животное имело опору только на них; 4 – симметричность использования конечностей для схватывания сетчатой поверхности; 5 – реакция на раздражение проприорецепторов туловища; 6 – реакция на прикосновение к вибриссам.

2. Достоверные (p<0,05) различия по сравнению с показателем животных: * контрольных; [#] группы 2; [@] группы 3; [^] группы 4.

Таблица 4. Оценка интегративной деятельности мозга у крыс на 7-е сутки после развития ИИ и лечения

Группа животных	Локомоторная активность животных в тесте «Открытое поле» по количеству пробегов	Исследовательская деятельность животных в тесте «Крестообразный лабиринт» по количеству выглядываний
Интактные (контроль)	68,79±4,74	5,25±0,38
ИИ	29,23±2,04*	3,19±0,22*
ИИ + кККЧ	33,54±2,35*	4,96±0,33 [#]
ИИ + кККЧ + церебролизин	36,12±2,46*	5,10±0,36 [#]
ИИ + церебролизин	31,16±2,18*	4,17±0,29* ^{#@^}

Примечание. Достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с показателем животных: * контрольных; [#] группы 2; @ группы 3; ^ группы 4.

церебролизин. Сочетанное применение кККЧ с церебролизин для лечения ИИ приводило к улучшению результатов тестирования у крыс относительно показателя тех, которых лечили кККЧ (табл. 4).

Выводы

1. Общая картина изменений в иммунной системе у животных в остром периоде ишемического инсульта (1-е, 3-и сутки) представлена сочетанием признаков дизрегуляции и иммунодефицита клеточного звена иммунитета.

2. Изменения фенотипического состава лимфоцитов характеризуются дефицитом популяций CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-клеток, снижением содержания естественных киллеров, что можно расценивать как проявление иммунодефицита в клеточном звене иммунитета.

3. Изменения в гуморальном звене иммунитета, проявившиеся увеличением концентрации циклических иммунных комплексов, являются следствием воспаления у крыс при развитии ишемического инсульта.

4. Включение криоконсервированной кордовой крови человека в сочетании с церебролизин в терапию ишемического инсульта обеспечивало в большей степени, чем применение только церебролизина или только криоконсервированной кордовой крови человека, восстановление субпопуляционного состава у крыс с ишемическим инсультом, увеличивая процент CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-клеток, естественных киллеров, CD4⁺/CD25⁺ (Т-регуляторов)-клеток и уменьшая концентрацию циркулирующих иммунных комплексов на 7-е сутки.

Список литературы

1. Дусчанов Ш. Б. Иммунологическая и клиническая эффективность применения инстенона при острых нарушениях мозгового кровообращения / Ш. Б. Дусчанов, Г. С. Рахимбаева // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – Т. 7, № 1. – С. 13–16.
2. Яхно Н. Н. Инсульт как медико-социальная проблема / Н. Н. Яхно, Б. С. Виленский // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 12. – С. 807–815.
3. Жулай Г. А. Оценка иммунного статуса у больных сосудистыми заболеваниями головного мозга / Г. А. Жулай, А. В. Чуров, П. Н. Кравченко // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12, № 3. – С. 83–85.
4. Лабораторные животные / [Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б. В.]. – К. : Вища школа, 1983. – 252 с.
5. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте / И. Б. Соколова, Н. Н. Зинькова, А. А. Билибина [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – № 2. – С. 54–62.
6. Цимбалюк В. І. Порушення цитокіно-імунного статусу у хворих з наслідками ішемічного інсульту в різні періоди реабілітації / В. І. Цимбалюк, М. С. Бровченко // Укр. мед. часопис. – 2006. – Т. 53, № 3. – С. 141–144.

7. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М. : Медицина, 2001. – 328 с.
8. Виничук С. М. Поиск новых подходов к лечению острого ишемического инсульта / С. М. Виничук, М. М. Прокопів, Т. М. Черенько // Український неврологічний журнал. – 2010. – № 1. – С. 8–19.
9. Виноградов О. И. Применение холина альфосцерата (глиатилин) у пациентов с ишемическим инсультом / О. И. Виноградов, В. Д. Даминов, Н. В. Рыбалко // Журнал неврологии и психиатрии. – 2013. – № 1. – С. 43–45.
10. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимальных стволовых клеток / Н. Н. Зинькова, Е. Г. Гилерович, И. Б. Соколова [и др.] // Цитология. – 2007. – № 7. – С. 566–575.
11. Никонов В. В. Острый ишемический инсульт: сравнительная эффективность цитиколинов / В. В. Никонов, И. С. Зозуля, Т. В. Мироненко // Медицина неотложных состояний. – 2012. – № 3 (42). – С. 28–31.
12. Роль аутоиммунных механизмов в повреждающем действии ишемии / В. И. Скворцова, В. В. Шерстнев, М. А. Грудень [и др.] // Инсульт. – 2001. – № 1. – С. 46–52.
13. Albumin induces neuroprotection against ischemic stroke by altering Toll-like receptor 4 and regulatory T cells in mice / M. Wang, Y. Wang, J. He [et al.] // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. – 2013. – V. 12, № 2. – P. 220–227.
14. Волошина И. Н. Состояние нейроиммунной активации у больных, перенесших ишемический инсульт / И. Н. Волошина // Международный неврологический журнал. – 2011. – Т. 46, № 8. – С. 22–26.
15. Герасимова М. М. Клинико-иммунологические аспекты влияния фенотропила на последствия церебрального инсульта / М. М. Герасимова, Л. В. Чичановская, Л. А. Слезкина // Журнал неврологии и психиатрии. – 2005. – № 5. – С. 63–64.
16. Ребенко Н. М. Клинико-иммунологические особенности у больных в остром периоде ишемического инсульта : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14.00.13 «Нервные болезни» / Н. М. Ребенко. – Новосибирск, 2004. – 24 с.
17. Современные возможности терапии мозгового инсульта. В прицеле – нейропротекция / М. М. Одинак, С. Н. Янишевский, Н. В. Цыган [и др.] // Обзорение психиатрии и медицинской психологии. – 2012. – № 4. – С. 98–102.
18. Сухих Г. Т. Мезенхимальные стволовые и прогениторные клетки. Биологические свойства и перспективы использования / Г. Т. Сухих // Физиологический журнал. – 2007. – № 53 (1). – С. 62–76.
19. Оценка безопасности терапии мононуклеарными клетками аллогенной пуповинной крови нейродегенеративных заболеваний / О. Г. Хурцилава, А. Б. Смолянинов, Е. В. Жаров [и др.] // АГ-инфо. – 2010. – № 4. – С. 3–5.
20. Гольцев А. Н. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика / А. Н. Гольцев, Т. А. Калиниченко // Проблемы криобиологии. – 1998. – № 1. – С. 3–24.
21. Cryopreservation of hematopoietic stem cells / D. Berz, E. M. McCormack, E. S. Winer [et al.] // American Journal of Hematology. – 2007. – V. 6, № 82. – P. 463–472.
22. Assessment of neuroprotective effects of human umbilical cord blood mononuclear cell subpopulations in vitro and in vivo / J. Boltze, D. M. Reich, S. Hau [et al.] // Cell Transplant. – 2012. – V. 21, № 4. – P. 723–737.
23. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats / J. Chen, P. R. Sanberg, Y. Li [et al.] // Stroke. – 2001. – V. 32, № 11. – P. 2682–2688.
24. Intravenous administration of human umbilical cord blood-derived AC133⁺ endothelial progenitor cells in rat stroke model reduces infarct volume: magnetic resonance imaging and histological findings / A. Iskander, R. A. Knight, Z. G. Zhang [et al.] // Stem Cells Transl. Med. – 2013. – V. 2, № 9. – P. 703–714.

25. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia / J. Y. Lim, C. H. Jeong, J. A. Jun [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2011. – V. 2, № 5. – P. 38.

26. Штрох В. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммунофлуоресценции / В. Штрох, И. Эммарх // *Иммунологические методы* / [под ред. Г. Фримеля]. – М. : Медицина, 1987. – С. 244–248.

27. Зиганшина Л. Е. Церебролизин в лечении острого ишемического инсульта / Л. Е. Зиганшина, Т. Р. Абакумова // *Вестник РАМН*. – 2013. – № 1. – С. 21–29.

28. Патент № 31847А Україна, МПК А01N1/02. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові / Цуцаєва А. О., Грищенко В. І., Кудокоцева О. В. та ін. – Заявл. 05.11.98 ; опубл. 15.12.2000. Бюл. № 7.

29. Жданов Г. Н. Оценка роли аутоиммунной воспалительной реакции в патогенезе церебральной ишемии / Г. Н. Жданов, М. М. Герасимова // *Неврологический вестник. Журнал им. В. М. Бехтерева*. – 2003. – Т. 35 (3–4). – С. 13–17.

В.В. Лебединець, Л.В. Останкова, Т.Г. Дубрава, Н.О. Бондарович, М.В. Останков, Д.В. Лебединець, А.М. Гольцев

ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ ДЛЯ КОРИГУВАННЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ В МОДЕЛІ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Наведено результати експериментального дослідження щодо застосування кріоконсервованої кордової крові людини (кККЛ) для корекції імунної системи у щурів лінії Вістар з індукцією ішемічного інсульту (ІІ), який моделювали оклюзією середньої мозкової артерії у лівій півкулі головного мозку. Дослідження проведено на 147 здорових щурах-самцях. Клітинну суспензію кККЛ вводили внутрішньоочеревинно через 6 год після оклюзії середньої мозкової артерії. Тварини були розподілені на групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – з індукцією ІІ; 3-тя – ІІ та лікування кККЛ; 4-та – ІІ та лікування кККЛ з церебролізином; 5-та – ІІ та лікування церебролізином. Показано, що у тварин у гострому періоді ІІ (1-ша, 3-тя доби) є ознаки дисрегуляції та імунодефіциту. Зміни в субпопуляційному складі лімфоцитів полягають у дефіциті Т-лімфоцитів (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), збільшенні кількості природних кілерів (CD16⁺) і зменшенні – Т-регуляторів (CD4⁺/CD25⁺). При застосуванні кККЛ з церебролізином для лікування ІІ у щурів більшою мірою, ніж при застосуванні тільки кККЛ або церебролізину, відновлювались показники клітинної та гуморальної ланок імунітету. На 7-му добу збільшувалась кількість CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺-клітин, знижувалась активність CD16⁺-клітин і концентрація циклічних імунних комплексів. До цього терміну у даних тварин відновлювались інтегративна діяльність мозку та неврологічний статус.

Ключові слова: ішемічний інсульт, церебролизин, кріоконсервована кордова кров, імунний і неврологічний статус.

V.V. Lebedinets, L.V. Ostankova, T.G. Dubrava, N.A. Bondarovich, M.V. Ostankov, D.V. Lebedinets, A.N. Goltsev

USE OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD TO CORRECT IMMUNE SYSTEM IN A MODEL OF ISCHEMIC STROKE

The results of a pilot study on using the human cryopreserved cord blood of the person (HCB) to correct the immune system indices in Wistar rats with the induced ischemic stroke (IS) have been presented. The IS was simulated by occlusion of the middle cerebral artery in the left hemisphere of the brain. The study was performed in 147 healthy male rats. The cell suspension of HCB was intraperitoneally administered in 6 h after the occlusion of the middle cerebral artery. The animals were divided into groups: 1st – intact (control); 2nd – those with IS induction; 3rd – IS and treatment with HCB; 4th – IS and treatment with Cerebrolysin and HCB; 5th – IS and treatment with Cerebrolysin. It has been shown, that in the animals in an acute period of the IS (1st, 3rd day), there are the signs of dysregulation and immunodeficiency. The changes in lymphocyte subpopulations is related to the deficit of T-lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), rise in the number of natural killer cells (CD16⁺) and T-regulators

reduction (CD4⁺/CD25⁺). Application of HCB with Cerebrolysin when treating IS in rats restores the indices of cell and humoral immunity link to a greater extent than the use of only HCB or Cerebrolysin. To day 7 we observed an increase in the number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺-cells, reduction in the activity of CD16⁺ cells and the concentration of the CIC. By this time in these animals there was marked a recovery of integrative activity of the brain and neurological status.

Keywords: *ischemic stroke, Cerebrolysin, cryopreserved cord blood, immune and neurological status.*

Поступила 16.11.15