

УДК 57.086.132:611.018.53.618.48:616.831-005.1

В.В. Лебединець^{1,2}, Л.В. Останкова¹, М.О. Бондарович¹,
О.Д. Луценко^{1,3*}, Д.В. Лебединець², І.Г. Гриша¹,
М.В. Останков¹, К.Ю. Пархоменко⁴, А.М. Гольцев^{1,3}

Ліофілізований лейкоконцентрат кордової крові людини в лікуванні ішемії головного мозку у щурів

UDC 57.086.132:611.018.53.618.48:616.831-005.1

V.V. Lebedinets^{1,2}, L.V. Ostankova¹, M.O. Bondarovich¹,
O.D. Lutsenko^{1,3*}, D.V. Lebedinets², I.G. Grisha¹,
M.V. Ostankov¹, K.Yu. Parkhomenko⁴, A.M. Goltsev^{1,3}

Lyophilized Human Cord Blood Leukoconcentrate to Treat Brain Ischemia in Rats

Реферат: У роботі представлено дані експериментальних досліджень про вплив ліофілізації на збереження структурно-функціональних характеристик клітин лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛККЛ). Показано, що ліофілізація ЛККЛ (пЛККЛ) забезпечувала збереження в гетерогенній популяції ЛККЛ клітин з імунomodulatory потенціалом. У системі *in vivo* на експериментальній моделі ішемічного інсульту (ІІ) було встановлено рівнозначну імунокоригувальну дію пЛККЛ і кріоконсервованого ЛККЛ (кЛККЛ) внаслідок ішемічного пошкодження головного мозку. Показано, що включення пЛККЛ у схему лікування ішемії головного мозку сприяло покращенню показників вмісту ІФН- γ^+ і ІЛ-10⁺-клітин селезінки, а також показників адгезивної і фагоцитарної активності клітин перитоніальної порожнини щурів з ІІ. Ефективність застосування пЛККЛ і кЛККЛ під час ІІ можна пов'язати з реалізацією терапевтичного ефекту присутніми серед них клітинами і медіаторами, що включають багатовекторні регуляторні системи, які забезпечують підтримку гомеостатичної сталості організму (імунної, ендокринної, нервової).

Ключові слова: ліофілізація, кріоконсервування, лейкоконцентрат кордової крові людини, ішемічний інсульт, імунна система, інтерферон- γ , інтерлейкін-10, адгезивна активність, фагоцитарна активність.

Abstract: The paper outlines the experimental data on the impact of lyophilization on preservation of structural and functional characteristics of cells from human cord blood leucoconcentrate (HCBL). Lyophilization of HCBL was shown to ensure the preservation of cells with immune modulating potential in a heterogeneous population of HCBL. Lyophilized HCBL (IHCBL), to the same extent as cryopreserved one (cHCBL), revealed an equal immune correcting effect during ischemic brain injury *in vivo* in the experimental model of ischemic stroke (IS). The inclusion of IHCBL in therapy of brain ischemia demonstrated the improved indices of IFN- γ^+ and IL-10⁺ spleen cells, adhesive and phagocytic activity of peritoneal cavity cells in rats with IS. The efficiency of using both IHCBL and cHCBL during IS may be associated with the implementation of therapeutic effect by presented among them cells and mediators, including multi-vector regulatory systems that maintain homeostatic stability of the body (immune, endocrine, nervous ones).

Key words: lyophilization, cryopreservation, human cord blood leucoconcentrate, ischemic stroke, immune system, interferon- γ , interleukin-10, adhesive activity, phagocytic activity.

Останнім часом використання кріоконсервованої кордової крові набуває поширення як метод лікування важких патологій [27], зокрема й ішемічного інсульту (ІІ) [13, 26]. Перспектива успішного використання кордової крові людини (ККЛ) визначається присутністю в ній різних клітинно-гуморальних субстанцій із широким спектром біологічної дії. Необхідність тривалого зберігання ККЛ зумовлює важливість

Recently, the use of cryopreserved cord blood becomes more common way to treat severe pathologies [24], including the ischemic stroke (IS) [15, 21]. The prospect of successful use of human cord blood (HCB) is determined by the presence in it of various cellular and humoral substances with a wide range of biological activities. The need for HCB long-term storage determines the importance of designing the technologies for

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

³Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України, Харків

⁴КУОЗ «Обласна клінічна лікарня — Центр екстреної медичної допомоги і медицини катастроф»

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

³ Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

⁴ Municipal Health Care Institution 'Regional Clinical Hospital – Center for Emergency Care and Disaster Medicine', Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

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

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 28.07.2020

Прийнята до друку 14.12.2021

Received 28, July, 2020

Accepted 14, December, 2021

© 2022 V.V. Lebedinets, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

розроблення технологій довгострокового її зберігання в низькотемпературних банках [4, 10, 19]. На сьогодні питання про можливість і необхідність використання в медичній практиці ліофілізованих системних біопрепаратів є актуальним [6, 8]. У попередніх роботах було вивчено структурно-функціональні характеристики клітинних елементів ККЛ у вигляді лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛККЛ) після ліофілізації за розробленою раніше технологією [1–3]. На нашу думку, ліофілізований ЛККЛ (ЛЛККЛ) може зайняти гідне місце в ряду лікувальних препаратів II. Важливим фактором обґрунтування можливого клінічного застосування ЛЛККЛ є всебічне вивчення механізму його дії під час лікування II.

Відомо, що II супроводжується порушенням нейроімунного гомеостазу мозку, центральної регуляції функцій імунної системи, що призводить до ініціації та агравації запальних процесів як в тканинах головного мозку, так і в організмі в цілому [16]. Цитокіни відіграють ключову роль у розвитку запальної реакції. Запуск цієї реакції значною мірою пов'язаний з виробленням певних цитокінів макрофагами та іншими локально розташованими або мігруючими клітинними елементами [9, 25]. Макрофаги є ланкою вродженого імунітету. На сьогодні активно вивчається їх вплив на розвиток різних захворювань (інсульт, інфаркт міокарда тощо).

У даному дослідженні було проведено порівняльну оцінку імунокоригувальної та церебропротекторної дії ЛЛККЛ із кріоконсервованим і нативним ЛККЛ, а також з введенням церебраліну.

Мета роботи – оцінка структурних і функціональних характеристик лейкоконцентрату кордової крові людини після ліофілізації та кріоконсервування порівняно з контролем, а також обґрунтування можливості застосування ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини як імунокоректора під час лікування ішемічного інсульту.

Матеріали та методи

Експерименти були проведені на 6-місячних щурах-самцях лінії Вістар, масою 180–200 г ($n = 62$). Дизайн експерименту відповідає Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21. 02. 2006) та «Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і дозволений комітетом з біо-

its long-term storage at low-temperature banks [7, 11, 26]. To date, of topicality is the question about a potential and necessary use of the lyophilized systemic biological preparations in medical practice [6, 8]. In our previous work, we have studied the structural and functional characteristics of HCB cell elements as the human cord blood leukoconcentrate (HCBL) after lyophilization by our technology [2–4]. We believe that the lyophilized HCBL (IHCBL) may occupy a worthy place among numerous therapeutic drugs for IS. An important factor to substantiate a feasible clinical application of IHCBL is a comprehensive study of its mechanism of action during IS therapy.

The ischemic stroke is known to be accompanied by disorder in neuro-immune homeostasis of brain, central regulation of immune system functions, resulting in initiation and aggravation of inflammatory processes both in brain tissues and the whole body as well [18]. Cytokines play a key role in development of inflammatory response, the trigger of which is mostly associated with production of certain cytokines by macrophages and other cell elements placed locally or migrating [10, 20]. Macrophages are the innate immunity component, and their impact on progression of different diseases (stroke, myocardial infarction, *etc.*) is being actively studied today.

In this study, the immune-correcting and cerebral protective effects of IHCBL, cryopreserved and native HCBLs, as well as Cerebrolysin administration, were comparatively evaluated.

The research aim was to access the structural and functional characteristics of human cord blood leukoconcentrate after lyophilization and cryopreservation *vs.* the control, as well as to substantiate a possible application of lyophilized human cord blood leukoconcentrate as an immune correcting agent in ischemic stroke therapy.

Materials and methods

Experiments were carried out in Wistar male rats aged 6 months and weighing 180–200 g ($n = 62$). The design of the experiment complied with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ (No. 3447-IV of February 21, 2006) and the ‘European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986), and approved by the Bioethics Committee at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of



етики ІПКіК НАН України (протокол № 7 від 26.02.2019).

Кордову кров отримували за інформованої згоди породіллі безпосередньо після народження дитини. Після цього флакони з кордовою кров'ю транспортували і зберігали при температурі 4°C. Лейкоконцентрат отримували з кордової крові шляхом пасивної седиментації еритроцитів в аутоплазмі у градієнті щільності з додаванням поліглюкіну («Біохімік», Росія). Ліофілізацію проводили на сублімаційній установці «УЗВ-2» (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) за методом А.М. Гольцева і співавт. [3]. Зразки лЛККЛ зберігали за температури 4°C. У день експерименту зразки лЛККЛ регідратували додаванням у флакони 1 мл фізіологічного розчину. Кріоконсервували ЛККЛ у пластикових пробірках (Nunc, США) об'ємом 1,8 мл на програмному заморозувачі «УОП-06» (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) за методом А.О. Цуцаєвої та співавт. [19]. Зразки кЛККЛ зберігали у рідкому азоті (при -196°C) в низькотемпературному банку ІПКіК НАН України. В день експерименту їх відігрівали на водяній бані за температури 40–41°C. У зразках ЛККЛ до і після консервування визначали кількість ядерних клітин у геманалізаторі «Abacus» (Diatron, Австрія). Життєздатність оцінювали методом суправітального фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього (ТС) [14, 17] і методом проточної цитофлуориметрії «FACS Calibur» (BD Bioscience, США) з використанням пропідій йодиду. Під час оцінювання життєздатності клітин методом проточної цитофлуориметрії частину клітин залишали в якості негативного контролю (незабарвлені клітини). Цитологічне дослідження проводили на мазках-відбитках, забарвлених Азур-ІІ еозином за Романовським-Гімзою в світловому мікроскопі «Primo Star» (Carl Zeiss, Німеччина); $\times 900$ (масляна імерсія) [15]. Популяцію стовбурових кровотвірних клітин у складі ЛККЛ оцінювали з використанням FITC-мічених моноклональних антитіл до CD34-молекули (BD Pharmingen, США). У якості ізотипового контролю до антитіл використовували FITC-мічені IgG відповідного класу. Вміст кровотвірних попередників визначали на 8-у добу після культивування за кількістю колонієутворювальних одиниць (КУОк) в інвертованому мікроскопі «Axiovert 40C» (Carl Zeiss, Німеччина) $\times 70$. Клітини культивували в концентрації 1×10^5 кл/мл за температури 37°C в атмосфері повітря з 5% CO₂ при 95% вологості [20].

Ukraine (IPCC of the NAS of Ukraine) (protocol No. 7 of February 26, 2019).

Cord blood was taken with the informed consent of woman in labor immediately after child birth. Then the vials with cord blood were transported and stored at 4°C. The leukoconcentrate was procured from cord blood in autoplasm by passive erythrocyte sedimentation in a density gradient supplemented with Polyglucinum (Biokhimik, Russia). Lyophilization was carried out with a sublimation unit 'UZV-2' (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the IPCC of the NAS of Ukraine) according to the method, designed by A.M. Goltsev *et al.* [4]. The lHCBL specimens were stored at 4°C. The day of the experiment performance, the lHCBL specimens were rehydrated by supplementing 1 ml of saline to the vials. The HCBL was cryopreserved in 1.8 ml plastic tubes (Nunc, USA) with programmable freezer UOP-06 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPCC of the NAS of Ukraine) according to the method designed by A.A. Tsutsaieva *et al.* [26]. The cHCBL specimens were stored in liquid nitrogen (at -196°C) at low-temperature bank at the IPCC of the NAS of Ukraine. The day of the experiment performance, they were warmed in a water bath at 40–41°C. The number of nucleated cells was determined in HCBL specimens with Abacus hematology analyzer (Diatron, Austria) prior to and after preservation. Viability was assessed by supravital staining with 0.2% trypan blue (TB) solution [16, 19] and with FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, USA) using propidium iodide (PI). When evaluating cell viability by flow cytometry, some cells were taken as a negative control (unstained cells). Cytology was done in touch smears stained with azur-II eosin by Romanowsky-Giemsa using Primo Star light microscope (Carl Zeiss, Germany); $\times 900$ (oil immersion) [17]. The population of hematopoietic stem cells (HSCs) within HCBL was assessed using FITC-labeled monoclonal antibodies to CD34 molecule (BD Pharmingen, USA). The FITC-labeled IgGs of the corresponding class were used as isotype control to antibodies. The content of hematopoietic precursors was determined by the number of colony-forming units (CFUs) to day 8 after culture using inverted microscope Axiovert 40C (Carl Zeiss, Germany) $\times 70$. Cells were cultured at a concentration of 1×10^5 cells/ml at 37°C, 5% CO₂ at 95% air humidity [23].

The IS was simulated by the middle cerebral artery occlusion [27]. To anaesthetize, the Ke-



Моделювали ІІ шляхом оклюзії середньої мозкової артерії [11]. Для знеболювання використовували кетонал (ЛЕК d.d., Словенія) 5 мл/кг маси підшкірно, місцеве знеболювання проводили за допомогою 2%-го розчину новокаїну («Дарниця», Україна) 50 мл/кг маси підшкірно. Через 6 годин після оклюзії середньої мозкової артерії щурам у черевну порожнину вводили 5×10^6 клітин ЛККЛ в об'ємі 0,5 мл. Під час вибору дози ЛККЛ і місця його введення враховували дані експериментальних робіт, у яких використовували цей біоматеріал [7, 12]. У якості контролю застосовували церебролізін (EVER Neuro Pharma, Австрія) з концентрацією 215,2 мг/мл, який розчиняли у фізіологічному розчині *ex tempore* і вводили протягом 3-х діб також у черевну порожнину в дозі 0,1 мл на 100 г маси тварини.

Щурів було розподілено на 6 груп: 1 – інтактні (контроль; $n = 7$); 2 – щури з ІІ ($n = 11$); 3 – щури з ІІ, яким вводили лЛККЛ (ІІ + лЛККЛ; $n = 11$); 4 – щури з ІІ, яким вводили кЛККЛ (ІІ + кЛККЛ; $n = 11$); 5 – щури з ІІ, яким вводили нативний ЛККЛ (ІІ + нативний ЛККЛ; $n = 11$); 6 – щури з ІІ, яким вводили церебролізін (ІІ + церебролізін; $n = 11$).

У тварин контрольної та дослідних груп оцінювали вміст цитокінів (ІФН- γ , ІІ-10) у клітинах селезінки методом проточної цитофлуориметрії та фагоцитарну й адгезивну активність клітин (макрофагів) перитоніальної порожнини (ПП) [14]. Усі дослідження проводили в динаміці розвитку ІІ і після лікування на 1-, 3-, 7- і 28-у доби.

Статистичне оброблення результатів дослідження проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» (StatSoft, США). Значущість відмінностей для непараметричних кількісних змінних двох вибірок оцінювали за ранговим U-критерієм Манна-Вітні, відмінності вважали значущими при $p < 0,05$. Під час множинних порівнянь, представлених у таблицях, використовували ранговий аналіз варіацій за Краскелом-Воллісом, в разі отримання значущої різниці проводилося парне порівняння груп із використанням тесту Манна-Вітні з поправкою Бонферроні при оцінці значень p .

Результати та обговорення

Під час обґрунтування можливості застосування будь-яких препаратів клітинної і тканинної терапії необхідно оцінити їхні структурні та функціональні характеристики після впливу консервування [5]. Так, у зразках ЛККЛ (до і після ліофілізації або кріоконсервуван-

тонал (ЛЕК d.d., Slovenia) 5 ml/kg body weight was used subcutaneously. Local anesthesia was done with 2% Novocaine solution (Darnitsa, Ukraine) 50 ml/kg body weight subcutaneously. In 6 hrs after middle cerebral artery occlusion, the rats were injected with 5×10^6 cells of HCBL in 0.5 ml volume into abdominal cavity. The data of experimental research, where this biomaterial was applied, were taken into consideration when selecting the HCBL dose and injection site [9, 14]. Cerebrolysin (EVER Neuro Pharma, Austria) at a concentration of 215.2 mg/ml, dissolved in saline *ex tempore* and injected into abdominal cavity at a dose of 0.1 ml per 100 g of animal weight for 3 days, was used as a control.

Rats were divided into 6 groups: the Group 1 comprised the intact animals (control; $n = 7$); in the Group 2 were rats with IS ($n = 11$); the Group 3 consisted of rats with IS injected with lHCBL (IS + lHCBL; $n = 11$); the animals with IS received cHCBL (IS + cHCBL; $n = 11$) made the Group 4; the rats with IS, administered with native HCBL (IS + native HCBL; $n = 11$) represented the Group 5; the rats with IS treated with Cerebrolysin (IS + Cerebrolysin; $n = 11$) were in the Group 6.

In animals of the control and experimental groups, the content of cytokines (IFN- γ , IL-10) in spleen cells, and phagocytic and adhesive activity of cells (macrophages) of peritoneal cavity (PC) were assessed by flow cytometry [16].

All the studies were carried out in dynamics of IS development and to days 1, 3, 7 and 28 after treatment.

The experimental results were statistically processed using Statistica 6.0 software (StatSoft, USA). The significance of differences for nonparametric quantitative variables of two samples was assessed by the Mann-Whitney U-rank test, the differences were considered significant at $p < 0.05$. During the multiple comparisons presented in the Tables, the Kruskal-Wallis rank analysis of variation was used, in case of a significant difference, the groups were pairwise compared using the Mann-Whitney U test with a Bonferroni correction for p values assessment.

Results and discussion

When substantiating the possibility of using any preparations of cell and tissue therapy, their structural and functional characteristics should be evaluated after exposure to preservation

ня) проводили дослідження схоронності морфофункціональних характеристик клітин. Показано, що кількість ядерних клітин у зразках лЛККЛ знижувалася в середньому на 17%; у зразках кЛККЛ – на 11% порівняно з контролем. Життєздатність клітин, оцінена методом забарвлення ТС, у зразках лЛККЛ знижувалася в середньому на 43%; у зразках кЛККЛ – на 35% порівняно з контролем. Після забарвлення пропідій йодидом (PI), цей показник був дещо нижчим: у зразках лЛККЛ – 47%, а у кЛККЛ – 49% від контролю (табл. 1).

Під час оцінювання збереженості гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) за фенотиповими ознаками (CD34⁺-клітин) і проліферативною активністю *in vitro* (кількість колонієутворювальних одиниць в культурі) було показано, що значущих відмінностей порівняно з контролем у зразках лЛККЛ і кЛККЛ не було виявлено (табл. 1).

Особливо суттєвим є забезпечення схоронності в лЛККЧ або кЛККЧ T_{per}^{reg}-клітин (CD4⁺CD25⁺-клітини), які мають важливе значення для роботи імунної системи, оскільки підтримують периферійну аутоолерантність і супресують активацію та експансію потенційно патогенних аутореактивних Т-клітин, присутніх

[5]. For example, the integrity of morphological and functional characteristics of cells (prior to and after lyophilization or cryopreservation) was studied in HCBL specimens. The lHCBL and cHCBL specimens showed a decrease in nucleated cell number by 17 and 11% on average, respectively, vs. the control. Cell viability, measured by TB staining in lHCBL and cHCBL specimens reduced on average by 43 and 35%, respectively, as compared with the control. When used the PI staining, this index was somewhat lower: 47 and 49% in lHCBL and cHCBL specimens, respectively, vs. the control (Table 1).

When evaluating the integrity of HSCs by phenotypic characteristics (CD34⁺ cells) and proliferative activity *in vitro* (the number of colony-forming units in culture), no significant differences in lHCBL and cHCBL vs. the control were revealed (Table 1).

Of especial importance is to ensure the survival of T_{per}^{reg} cells (CD4⁺CD25⁺ cells) within lHCBL or cHCBL, which are essential for immune system functioning as they provide peripheral autotolerance and suppress the activation and expansion of potentially pathogenic autoreactive T cells, which are normally presented in the immune system. According to our data, the

Таблиця 1. Показники структурно-функціональних характеристик ЛККЛ до і після ліофілізації та кріоконсервування, Ме [25; 75%]

Table 1. Indices of structural and functional characteristics of HCBL prior to and after lyophilization and cryopreservation, Me [25; 75%]

Показники Indices	Нативний ЛККЛ Native HCBL	Ліофілізований ЛККЛ Lyophilized HCBL	Кріоконсервований ЛККЛ Cryopreserved HCBL	<i>p</i> за критерієм Манна-Вітні <i>p</i> by Mann-Whitney test
ЯВК NCs	1,8 [1,8; 1,8]	1,5 [1,5; 1,5]	1,6 [1,6; 1,7]	<i>p</i> ₁₋₂ = 0,016 <i>p</i> ₁₋₃ = 0,095 <i>p</i> ₂₋₃ = 0,222
ТС TB	97,0 [94,0; 98,0]	55,0 [53,0; 57,0]	63,0 [62,0; 64,0]	<i>p</i> ₁₋₂ = 0,008 <i>p</i> ₁₋₃ = 0,008 <i>p</i> ₂₋₃ = 0,016
PI	93,0 [92,0; 95,0]	44,0 [43,0; 47,0]	46,0 [45,0; 48,0]	<i>p</i> ₁₋₂ = 0,008 <i>p</i> ₁₋₃ = 0,008 <i>p</i> ₂₋₃ = 0,548
T _{per} ^{reg} T _{reg}	0,3 [0,3; 0,3]	0,4 [0,4; 0,4]	0,4 [0,4; 0,4]	<i>p</i> ₁₋₂ = 0,008 <i>p</i> ₁₋₃ = 0,008 <i>p</i> ₂₋₃ = 1,000
ГСК HSCs	3,9 [3,9; 3,9]	3,4 [3,3; 3,4]	3,1 [3,1; 3,2]	<i>p</i> ₁₋₂ = 0,016 <i>p</i> ₁₋₃ = 0,016 <i>p</i> ₂₋₃ = 0,095
КУОк CFUs	2,1 [1,8; 2,2]	2,0 [1,5; 2,4]	2,1 [1,5; 2,3]	<i>p</i> ₁₋₂ = 1,000 <i>p</i> ₁₋₃ = 1,000 <i>p</i> ₂₋₃ = 1,000

Примітка: виділені жирним шрифтом зміни при *p* < 0,01 вважали значущими.

Note: considered significant changes at *p* < 0.01 are presented in bold.



Таблиця 2. Клітинний склад ЛККЛ до і після ліофілізації та кріоконсервування, Ме [25; 75%]
Table 2. HCBL cell composition prior to and after lyophilization and cryopreservation, Me [25; 75%]

Клітинні елементи Cell elements	Нативний ЛККЛ Native HCBL	Ліофілізований ЛККЛ Lyophilized HCBL	Кріоконсервований ЛККЛ Cryopreserved HCBL	<i>p</i> за критерієм Манна-Вітні <i>p</i> by Mann-Whitney test
Недиференційовані бласти, % Undifferentiated blasts, %	10,0 [9,0; 11,0]	19,0 [19,0; 19,0]	16,0 [16,0; 17,0]	$p_{1-2} = 0,008$ $p_{1-3} = 0,008$ $p_{2-3} = 0,016$
Еритробласт, % Erythroblast, %	14,0 [14,0; 16,0]	14,0 [12,0; 14,0]	14,0 [13,0; 15,0]	$p_{1-2} = 0,222$ $p_{1-3} = 0,421$ $p_{2-3} = 0,548$
Нормобласт, % Normoblast, %	25,0 [23,0; 26,0]	28,0 [27,0; 29,0]	25,0 [24,0; 26,0]	$p_{1-2} = 0,056$ $p_{1-3} = 0,690$ $p_{2-3} = 0,151$
Мієлобласт, % Myeloblast, %	10,0 [9,0; 10,0]	1,0 [1,0; 2,0]	4,0 [4,0; 4,0]	$p_{1-2} = 0,008$ $p_{1-3} = 0,008$ $p_{2-3} = 0,008$
Лімфоцит, % Lymphocyte, %	30,0 [34,0; 35,0]	30,0 [30,0; 31,0]	33,0 [33,0; 33,0]	$p_{1-2} = 0,095$ $p_{1-3} = 0,310$ $p_{2-3} = 0,095$
Апоптоз, % Apoptosis, %	-	-	-	-
Зруйновані клітини, % Destroyed cells, %	6,0 [6,0; 7,0]	8,0 [8,0; 8,0]	7,0 [7,0; 7,0]	$p_{1-2} = 0,016$ $p_{1-3} = 0,095$ $p_{2-3} = 0,095$

Примітка: виділені жирним шрифтом зміни при $p < 0,01$ вважали значущими.

Note: considered significant changes at $p < 0.01$ are presented in bold.

у нормі в імунній системі. За нашими даними кількість T_{reg} -клітин у контрольному ЛККЧ становила 0,3%, після ліофілізації або кріоконсервування показник збільшився в 1,3 рази. Ми вважаємо, що кількість цих клітин після ліофілізації або кріоконсервування може збільшуватися як внаслідок загибелі інших популяцій клітин, так і в результаті вивільнення внутрішньоклітинного рецептора CD25 на поверхню мембрани. Таким чином, збагачення T_{reg} ЛККЛ після ліофілізації або кріоконсервування може обумовлювати більш високий терапевтичний потенціал введеного лейкоконцентрату.

Цитологічне дослідження клітинного складу зразків ЛККЛ виявило значуще зниження кількості мієлобластів у зразках ЛККЛ порівняно з контролем. При цьому в зразках ЛККЛ і кЛККЛ морфологічно збереженими були недиференційовані бласти, еритро- та нормобласти і лімфоцити (табл. 2).

З огляду на той факт, що ЛККЛ буде використовуватися як імунокоректор у щурів із П, було проведено дослідження його коригувального впливу на зміну рівня цитокінів ІФН- γ і ІЛ-10 у клітинах селезінки, а також на фагоцитарну

number of T_{reg} cells in the control HCBL made 0.3%, but after lyophilization or cryopreservation this index increased by 1.3 times. We believe that the number of these cells after either lyophilization or cryopreservation may augment both due to the death of other cell populations and a release of CD25 intracellular receptor on membrane surface as well. Thus, the HCBL enrichment with T_{reg} after lyophilization or cryopreservation may stipulate a higher therapeutic potential of administered leukoconcentrate.

Cytology of cell composition of HCBL specimens revealed a significant decrease in the myeloblast number in IHCBL specimens as compared with the control. Herewith the undifferentiated blasts, erythro- and normoblasts, and lymphocytes were morphologically preserved in IHCBL and cHCBL specimens (Table 2).

Bearing in mind the fact of using IHCBL as an immune correcting agent in rats with IS, its correcting effect on a change in IFN- γ and IL-10 cytokine level in spleen cells, as well as on phagocytic and adhesive activity when compared to cHCBL and control HCBL, was studied.

і адгезивну активність порівняно з кЛККЛ і контрольним ЛККЛ.

Робота імунної системи у фізіологічному стані забезпечується балансом про- і протизапальних цитокінів [21]. Відомо, що ІФН- γ є прозапальним цитокіном і найпотужнішим активатором функції макрофагів [24]. Концентрація клітин ІФН- γ^+ в селезінці щурів при ІІ (група 2) значуще ($p < 0,001$) підвищувалася вже на 1-у добу після індукції патології. У той самий час у тварин після введення свіжовиділе-

The function of immune system in physiological state is ensured by the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines [25]. The IFN- γ is known to be a pro-inflammatory cytokine and a powerful activator of macrophage function [13]. The IFN- γ^+ cell concentration in rat spleen during IS (Group 2) increased significantly ($p < 0.001$) even to day 1 after pathology induction. At the same time, the animals after receiving fresh and cryopreserved HCBL (Groups 3–5) showed a decrease in IFN- γ^+ cells down to the control level

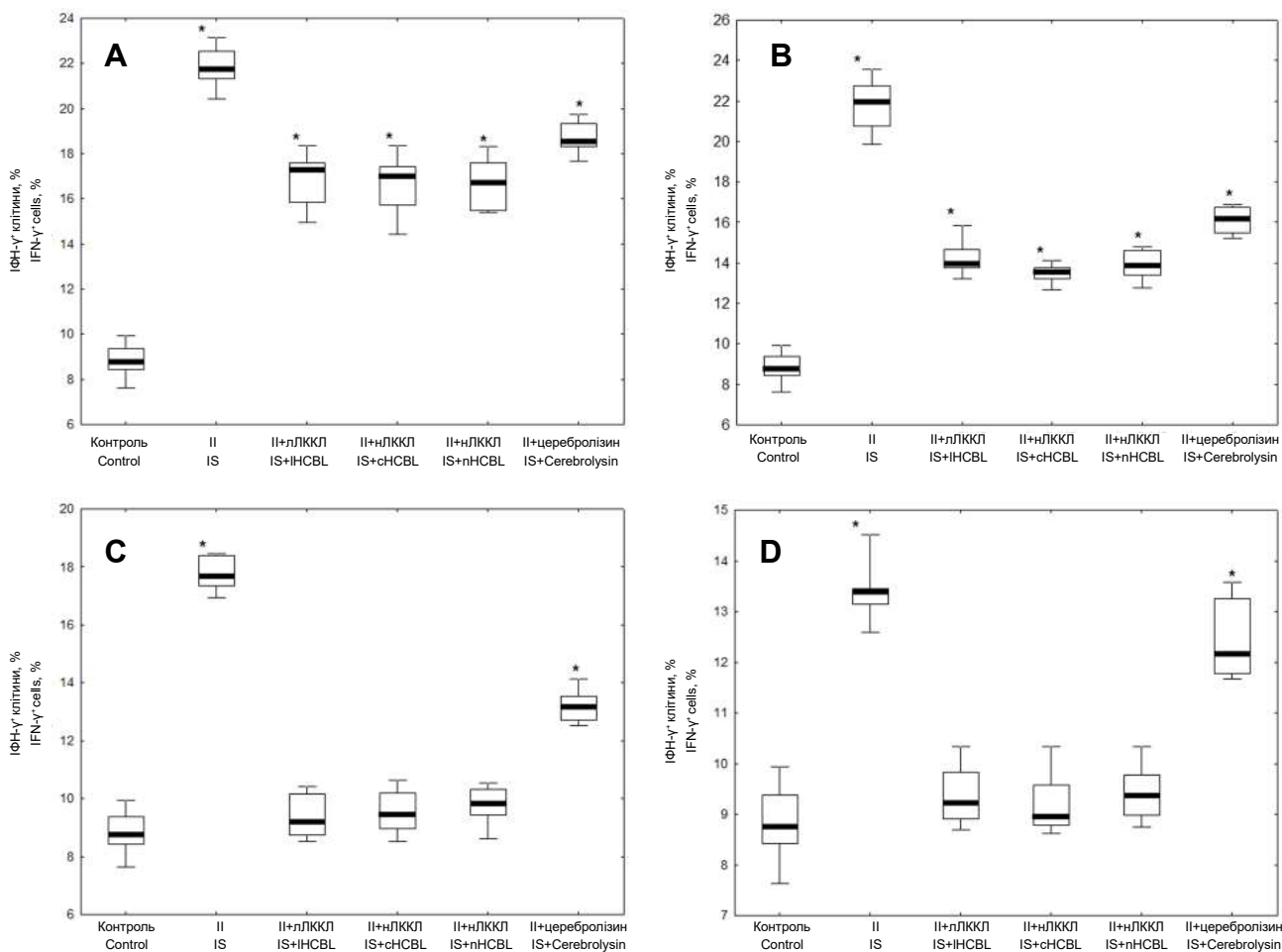


Рис. 1. Показники вмісту ІФН- γ у щурів з ІІ і після лікування на 1-у (А), 3-ю (В), 7-у (С) і 28-у (D) доби спостереження; * — $p < 0,05$ порівняно з контролем. Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у перцентиліям відповідно; довжина стовпчика — межквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні й максимальні значення.

Fig. 1. Indices of IFN- γ content in rats with IS and post therapy to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation; * — $p < 0.05$ as compared with the control. The upper and lower limits of columns correspond to the 75th and 25th percentiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

ного і кріоконсервованого ЛККЛ (групи 3–5) спостерігали зниження клітин ІФН- γ^+ до рівня контролю вже на 7-у добу. Цей факт свідчить про участь ЛККЛ як протизапального агента в зниженні запальної реакції, індукованої розвитком ІІ. Істотно, що стандартне лікування

even to day 7. This fact testifies to the involvement of HCBL as an anti-inflammatory agent in reduction of inflammatory response, induced by IS development. Notably, that the standard IS therapy with Cerebrolysin provided no such a decrease in IFN- γ^+ cell level to day 7, and it remained in-

II церебралізином не забезпечувало такого зниження рівня клітин ІФН- γ^+ на 7-у добу, і він залишався під-вищеним і на 28-у добу, але був нижчим, ніж у нелікованих щурів із II (рис. 1).

Аналіз результатів оцінювання показника ІЛ-10, який належить до цитокінів із вираженим протизапальним ефектом [18, 23] показав, що у щурів із II, концентрація ІЛ-10⁺-клітин у селезінці була знижена на усіх термінах спостереження порівняно з групою інтактних тварин. Після лікування щурів введенням

creased to day 28, but lower vs. the untreated rats with IS (Fig. 1).

Analysis of the assessment results of IL-10 index, referred to cytokines with a pronounced anti-inflammatory effect [22, 12] showed a decreased concentration of IL-10⁺ spleen cells in rats with IS throughout the observation period as compared with the intact animals. After treating rats with IHCBL and cHCBL, the concentration indices of IL-10⁺ cells were approaching the control values even to day 7, and matched these values to day 28 (Fig. 2).

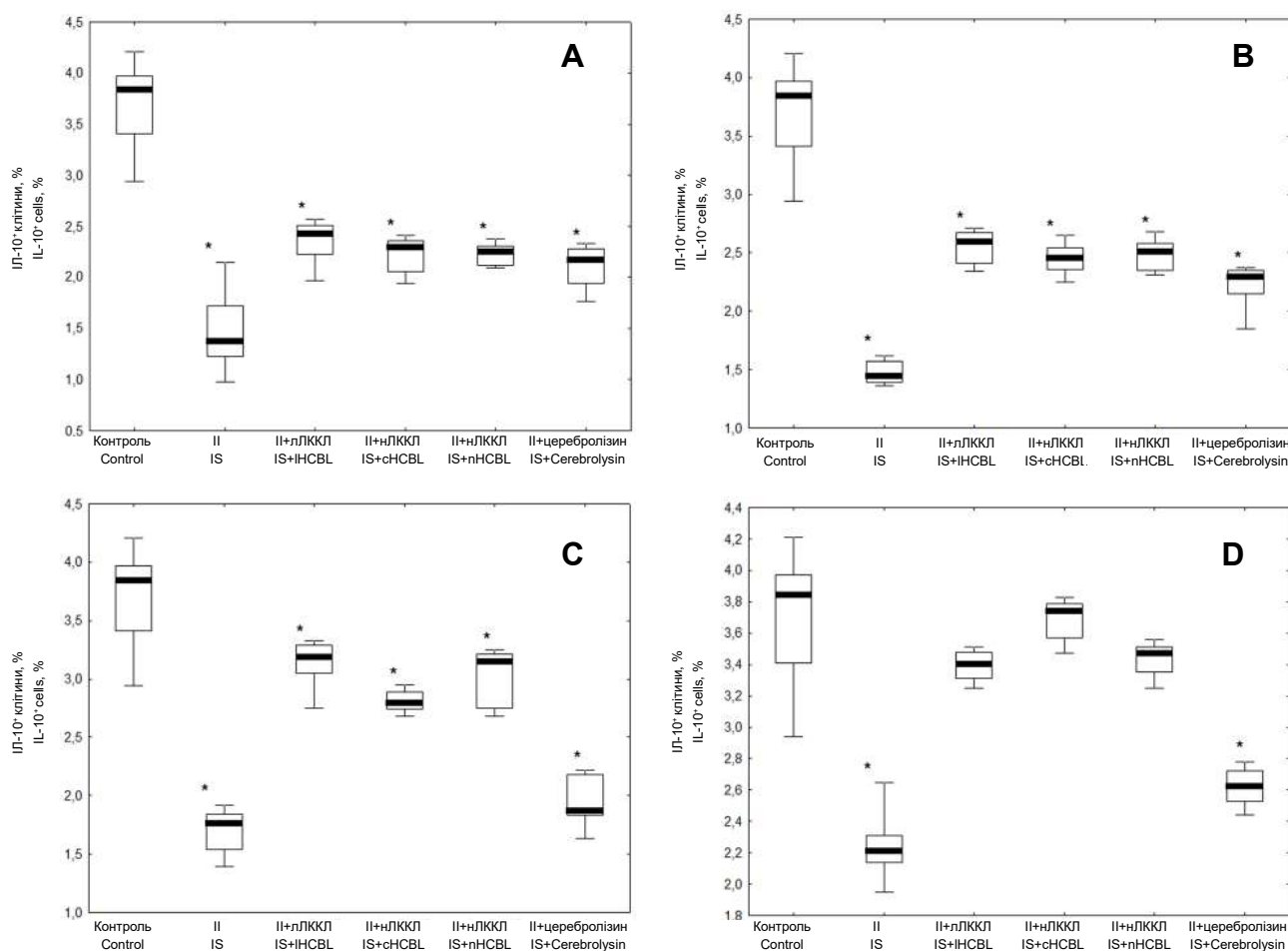


Рис. 2. Показники вмісту ІЛ-10 у щурів з II і після лікування на 1-у (А), 3-ю (В), 7-у (С) і 28-у (D) доби спостереження; * — $p < 0,05$ порівнянно з контролем. Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у процентилям відповідно; довжина стовпчика — межквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні й максимальні значення.

Fig. 2. Indices of IL-10 content in rats with IS and after therapy to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation; * – $p < 0.05$ as compared with the control. The upper and lower limits of columns correspond to the 75th and 25th percentiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

лЛККЛ і кЛККЛ концентрація клітин ІЛ-10⁺ вже на 7-у добу наближалася до контрольних значень, а на 28-у добу відповідала цим значенням (рис. 2).

Thus, the revealed changes in cell content, including pro-inflammatory IFN- γ and anti-inflammatory IL-10, may suggest the presence of the mechanisms through which the HCBL im-

Таким чином, виявлені зміни вмісту клітин, які включають в себе прозапальний ІФН- γ і протизапальний ІЛ-10, можуть свідчити про наявність механізмів, через які реалізується імунокоригувальна дія ЛККЛ у лікуванні П.

Цікавим є той факт, що локальне запалення, яке розвивається в тканині мозку при П, впливає на стан «віддалених» ділянок імунної системи, до якої належить і ПП [22]. Так, у

immune correcting effect is implemented during IS treatment.

Of interest is the fact that the local inflammation, developing in brain tissue during IS affects the state of 'distant' sites of immune system, which include PC [1]. For example, in rats with IS the cell number in PC decreased from day 1 to day 3, that was likely due to the enhancement of their adhesion under developing inflammation. To day 7, these in-

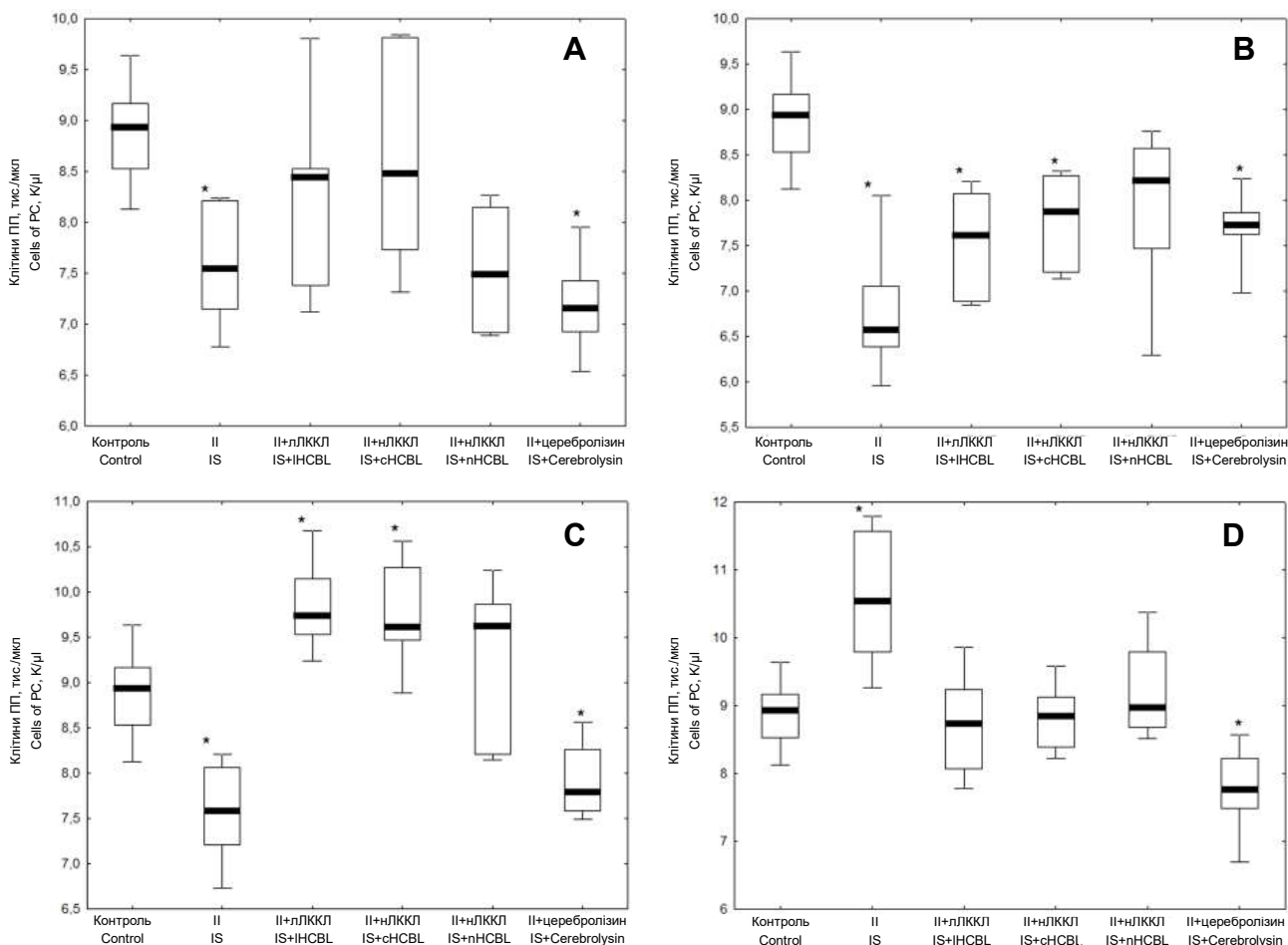


Рис. 3. Показники кількості клітин ПП у щурів з П і після лікування на 1-у (А), 3-ю (В), 7- (С) і 28-у (D) доби спостереження; * — $p < 0,05$ порівняно з контролем. Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у перцентілям відповідно; довжина стовпчика — межквартільний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні й максимальні значення.

Fig. 3. Indices of PC cell number in rats with IS and post therapy to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation; * — $p < 0.05$ as compared with the control. The upper and lower limits of columns correspond to the 75th and 25th percentiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

щурів з П з 1-ї по 3-ю добу зменшувалася кількість клітин у ПП, що можливо пов'язано з посиленням їх адгезії в умовах запалення, яке розвивається. На 7-у добу ці показники залишалися нижче від контрольних. Не виключена ймовірність міграції клітин у зону запалення,

indices remained below the control. The possibility of cell migration into the inflammation area, *i. e.* to the brain, was not excluded. This process was dynamic, as evidenced by an increased cell number in PC and an elevated degree of their adhesion to day 28 (Fig. 3, 4).

тобто в мозок. Даний процес мав динамічний характер, про що свідчило збільшення кількості клітин у ПП і підвищення ступеня їх адгезії на 28-у добу (рис. 3, 4). Введення ЛККЛ у всіх його формах сприяло підвищенню кількісних і якісних характеристик клітин ПП вже на 7-у добу після введення. Тим не менш, ці показники після введення ЛККЛ мали односторонні зміни, зокрема перевищення контрольних значень у цей період, і відповід-

The HCBL administration in all its forms enhanced the quantitative and qualitative characteristics of PC cells even to day 7 after introduction. However, after HCBL administration these indices were changed unidirectionally, in particular, they exceeded the control values within this period and corresponded to the control ones to day 28 (Fig. 3, 4). We assumed that an increase in these cells number to day 7 after biomaterial introduction was likely due

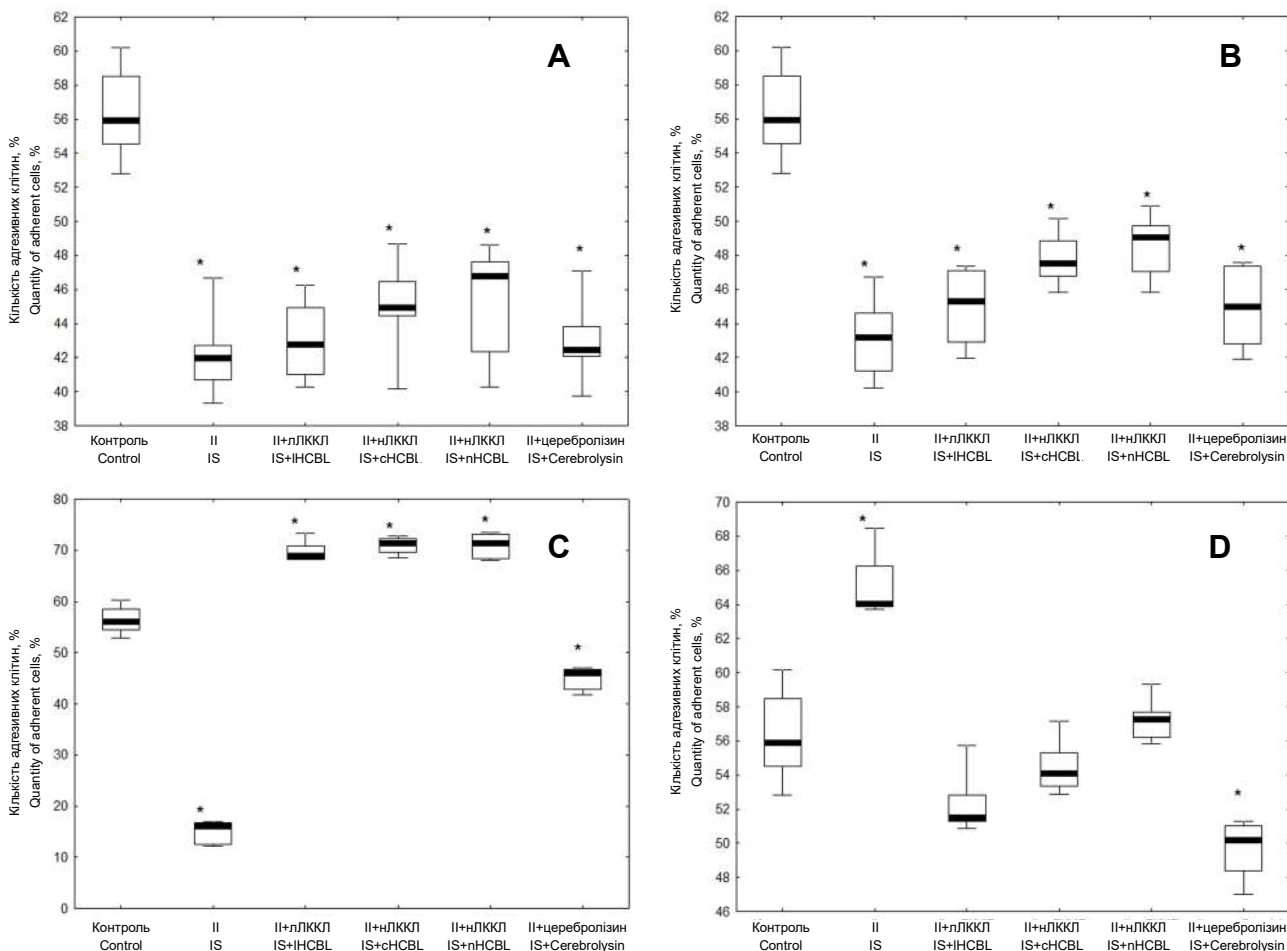


Рис. 4. Показники кількості адгезивних клітин у щурів з ІІ і після лікування на 1-у (А), 3-ю (В), 7- (С) і 28-у (D) добу спостереження; * — $p < 0,05$ порівняно з контролем. Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у процентилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні й максимальні значення.

Fig. 4. Indices of adhesive cell number in rats with IS and post treatment to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation; * – $p < 0.05$ as compared with the control. The upper and lower limits of columns correspond to the 75th and 25th percentiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

ність контрольним показникам на 28-у добу (рис. 3, 4). Ми припускаємо, що збільшення кількості цих клітин на 7-у добу після введення біоматеріалу може бути пов'язано з виробленням клітинами ЛККЛ цитокінів, які здатні стимулювати проліферативну активність

to the cytokines' production by HCBL cells, which were able to stimulate a proliferative activity of PC cells, and because of their survival after lyophilization and cryopreservation.

Changes in functional potential of PC cells were revealed when studying their phagocytic activity

клітин перитоніальної порожнини, і їх збереженням після ліофілізації і кріоконсервування.

Зміни функціонального потенціалу клітин ПП були отримані і під час дослідження їхньої фагоцитарної активності. Так, було встановлено, що індекс фагоцитозу і фагоцитарне число знижувалися вже на 1-у добу після ініціації

as swell. Thus, a decrease in phagocytic index and phagocytic number was observed even to day 1 after IS initiation, and these indices were almost twice lower than the control to day 7. These changes may result from the migration of cells with phagocytic activity to the inflammation source (brain tissues). Although there were no significant changes in phagocytic activity of PC cells after

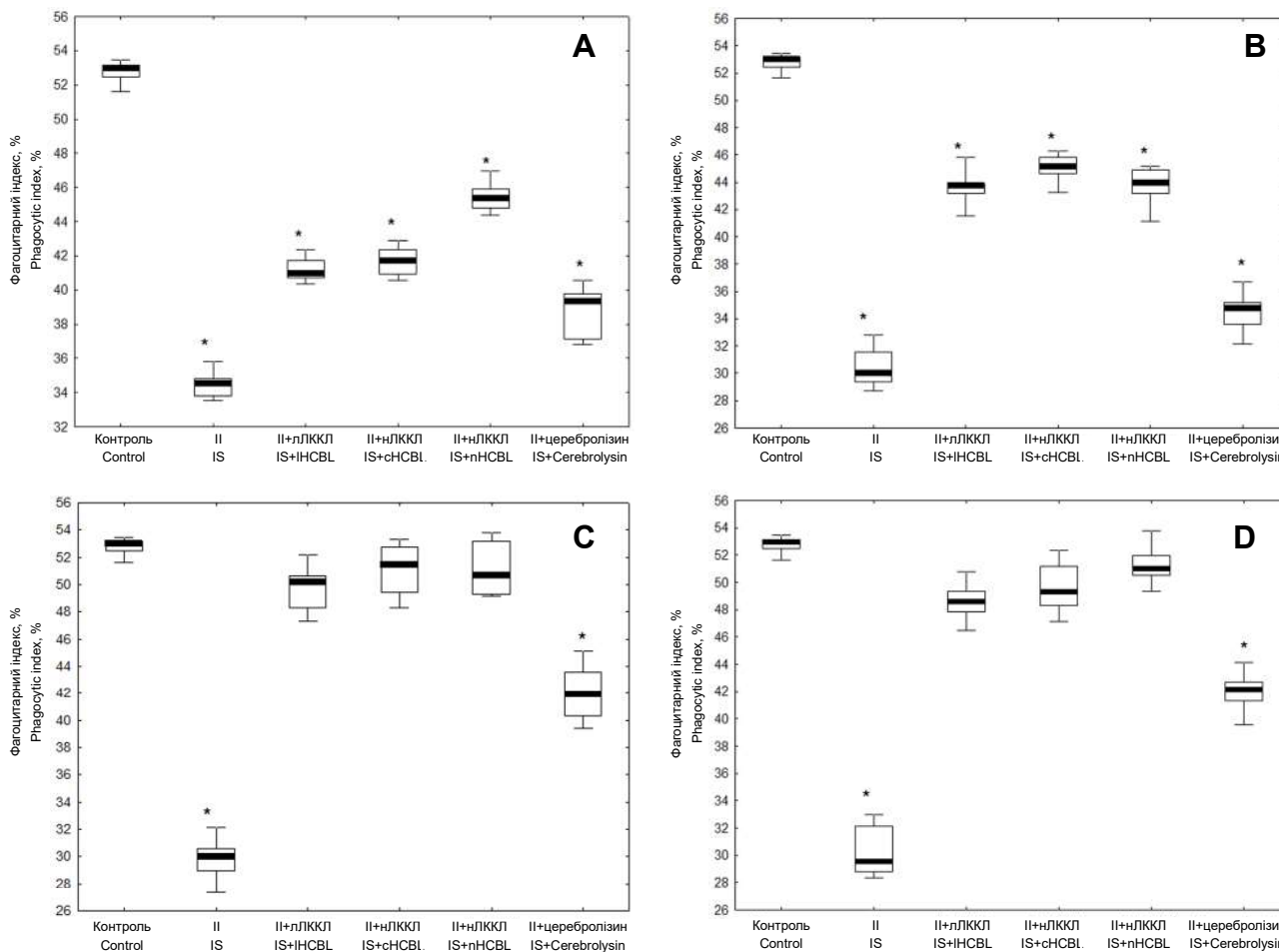


Рис. 5. Показники фагоцитарного індексу клітин ПП у щурів з ІІ і після лікування на 1-у (А), 3-ю (В), 7- (С) і 28-у (D) доби спостереження; * — $p < 0,05$ при порівнянні з контролем. Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у перцентиліям відповідно; довжина стовпчика — межквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні й максимальні значення.

Fig. 5. Phagocytic index of PC cells in rats with IS and post therapy to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation; * — $p < 0.05$ as compared with the control. The upper and lower limits of columns correspond to the 75th and 25th percentiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

II, а до 7-ї доби ці показники були майже вдвічі нижчими від контролю. Вказані зміни можуть бути викликані міграцією клітин з фагоцитарною активністю до джерела запалення (тканин головного мозку). Фагоцитарна активність клітин ПП після введення ЛККЛ (групи 3–5) істотно не змінювалася на 1-у й 3-ю доби, проте значно перевищувала таку

HCBL administration (Groups 3–5) to days 1 and 3, it considerably exceeded that in animals of Groups 2 and 6. The administered HCBL showed a significant therapeutic effect to days 7 and 28 (Fig. 5, 6). This may proceed due to a stimulating impact of the complex of biologically active substances produced by HCBL on cell elements with functional activity of macrophages.



у тварин груп 2 і 6. Суттєвий лікувальний ефект від введених ЛККЛ спостерігали на 7- і 28-у доби (рис. 5, 6). Це може бути пов'язано зі стимулювальним впливом комплексу біологічно активних речовин, які продукуються ЛККЛ, на клітинні елементи з функціональною активністю макрофагів.

Conclusions

1. The presented here way for HCBL lyophilization ensured the survival of cells with immune modulating potential (T_{reg} , $CD34^+$) in heterogeneous population of HCBL.

2. An equal immune correcting action of IHCBL and cHCBL was revealed in experimental ani-

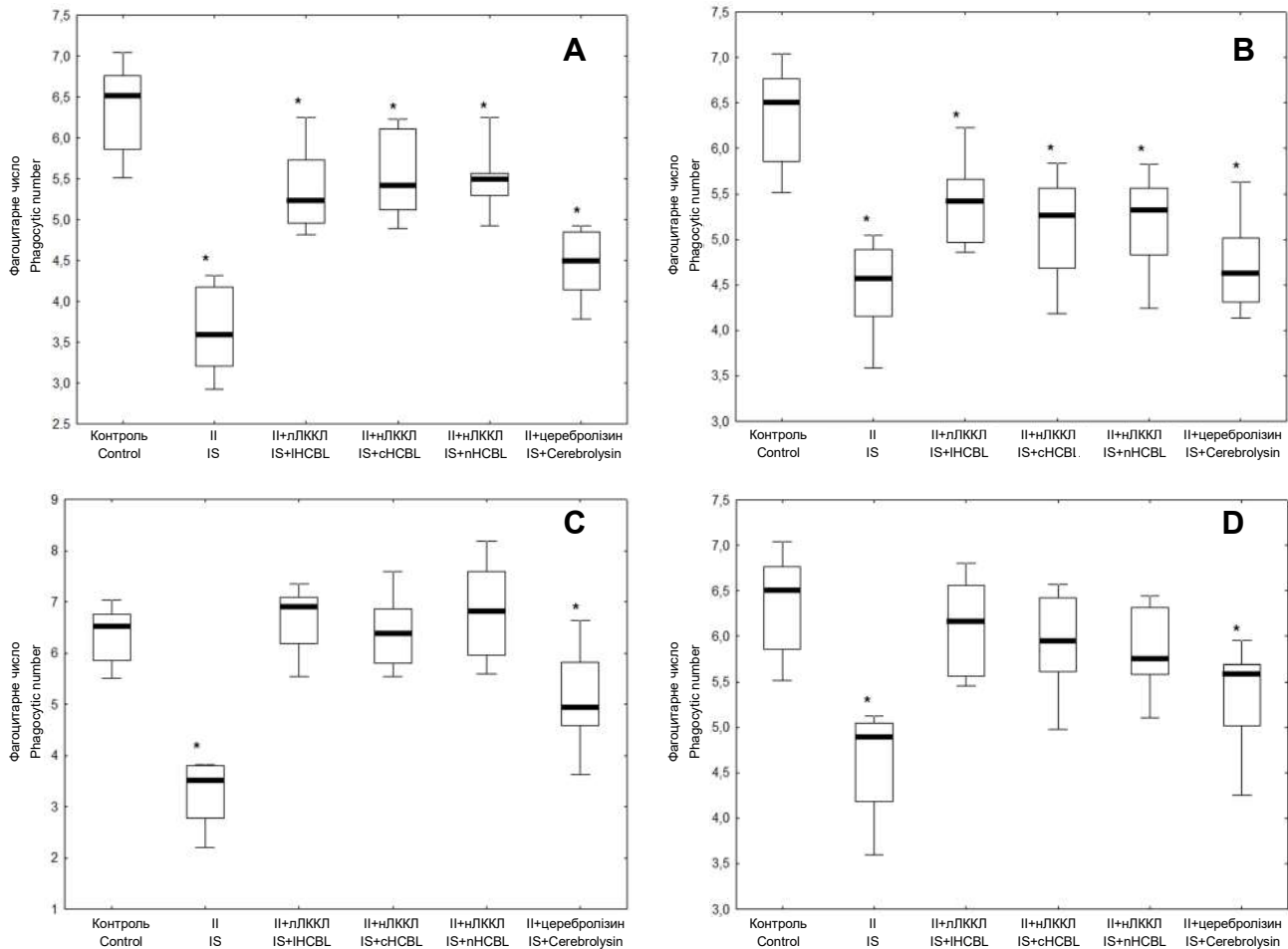


Рис. 6. Показники фагоцитарного числа клітин ПП у щурів з ІІ і після лікування на 1-у (А), 3-ю (В), 7-у (С) і 28-у (D) доби спостереження; * — $p < 0,05$ порівняно з контролем. Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у перцентиліям відповідно; довжина стовпчика — межквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні й максимальні значення.

Fig. 6. Indices of phagocytic number of PC cells in rats with IS and post therapy to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation; * — $p < 0.05$ as compared with the control. The upper and lower limits of columns correspond to the 75th and 25th percentiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

Висновки

1. Представлений спосіб ліофілізації ЛККЛ забезпечує збереження в гетерогенній популяції ЛККЛ клітин з імуномодулювальним потенціалом (T_{per} , $CD34^+$).

2. Встановлено рівнозначну імунокоригувальну дію лЛККЛ і кЛККЛ під час ішемічного пошкодження головного мозку у експериментальних тварин, що пов'язано з виробленням

mals during ischemic brain injury, that was associated with the HCBL cell production of cytokines, able to stimulate a proliferative activity of peritoneal cavity cells.

3. The HCBL inclusion to treat cerebral ischemia in experimental animals improved the indices of $IFN-\gamma^+$ and $IL-10^+$ spleen cell content, and those of adhesive and phagocytic activity of the peritoneal cavity cells.

клітинами ЛККЛ цитокінів, які здатні стимулювати проліферативну активність клітин перитоніальної порожнини.

3. Включення ЛККЛ у схему лікування ішемії головного мозку експериментальних тварин сприяє покращенню показників вмісту ІФН- γ^+ і ІЛ-10 $^+$ -клітин селезінки, показників адгезивної і фагоцитарної активності клітин перитоніальної порожнини.

Література

1. Гольцев АМ, Мосійчук ВВ, Гольцев КА, та ін., винахідники; Інститут Проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 117780U, 10. 07. 2017.
2. Гольцев АМ, Сокіл ЛВ, Стецішин ВГ, та ін., винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 125846. 25. 05. 2018.
3. Гольцев АМ, Тараннік ГК, Гриша ІГ, та ін., винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 113006. 10. 01. 2017.
4. Гольцев АН, Волина ВВ, Останков МВ, и др. Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядродержащих клеток лейкоконцентрата кордовой крови человека. Проблемы кріобіології. 2010; 20(1): 66–72.
5. Гольцев АН, Луценко ЕД, Останков МВ. Действие различных режимов криоконсервирования на проявление иммуномодулирующей активности плаценты при развитии адьювантного артрита. Проблемы кріобіології. 2008; 18(4): 456–8.
6. Гольцев АН Стецішин ВГ, Останкова ЛВ, и др. Влияние лиофилизированной кордовой крови на структуру матки крыс с герпесвирусной инфекцией. В: Матеріали другої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології»; 10–12 жовтня 2018, Дніпро, Україна. Дніпро; 2018. С. 159–60.
7. Гольцев КА, Останков МВ, Кожина ОЮ, и др. Применение криоконсервированной кордовой крови в комплексной терапии острого гнойного перитонита. Научные ведомости белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. 2013; (18): 114–9.
8. Гольцев КА, Пархоменко КЮ, Криворучко ІА, и др. Лечение перитонита лиофилизированной кордовой кровью (экспериментальное исследование) В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку»; 19-20 вересня 2019, Харків, Україна. Харків; 2019. С. 286–8.
9. Гончар ІА, Степанова ЮІ, Прудывус ІС. Биохимические предикторы и маркеры инфаркта головного мозга. Минск: БелМАПО; 2013. 512 с.
10. Грищенко ВІ, Гольцев АН. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения. Проблемы кріобіології. 2002; (1): 54–85.
11. Западнюк ІП, Западнюк ВІ, Захарія ЕА, и др. Лабораторные животные. Киев: Вища школа; 1983. 252 с.

References

1. Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Expert Rev Neurother*. 2015; 15(5): 523–31.
2. Goltsev AM, Mosiychuk VV, Goltsev KA, et al. inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Patent of Ukraine 117780U, 2017 July 10. Ukrainian.
3. Goltsev AM, Sokil LV, Stetsishin VG, et al. inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Patent of Ukraine 125846, 2018 May 25. Ukrainian.
4. Goltsev AM, Taranik GC, Grisha IG, et al. inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Patent of Ukraine 113006, 2017 Jan 10. Ukrainian.
5. Goltsev AN, Lutsenko ED, Ostankov MV. Effect of different cryopreservation regimens on manifestation of immune modulating activity of placenta at development of adjuvant arthritis. *Problems of cryobiology*. 2008; 18(4): 456–8.
6. Goltsev AN, Stetsishin VG, Ostankova LV, et al. [The effect of lyophilized cord blood on the structure of the uterus of rats with herpesvirus infection.] In: [Proceedings of the second All-Ukrainian scientific-practical conference with international participation «Theory and practice of modern morphology»]; 2018 June 10–12 Dnipro, Ukraine. Dnipro; 2018. p. 159–60. Ukrainian.
7. Goltsev AN, Volina VV, Ostankov MV, et al. Effect of cryopreservation on functional properties of human cord blood leukoconcentrate nucleated cells. *Problems of cryobiology*. 2010; 20 (1): 66–72.
8. Goltsev KA, Parkhomenko KYu, Krivoruchko IA, et al. [Treatment of peritonitis with lyophilized cord blood (experimental study)] In: [Proceedings of the scientific-practical conference with international participation, dedicated to the 20th anniversary of the founding of the Day of the Pharmaceutical Worker of Ukraine. Modern pharmacy: history, realities and prospects of development; 2019 September 19–20 Kharkiv, Ukraine. Kharkiv; 2019. p. 286–8.
9. Goltsev KA, Ostankov MV, Kozhina OYu, et al. [Application of cryopreserved cord blood in combined therapy of acute purulent peritonitis.] *Scientific Bulletins of the Belgorod State University*. 2013; (18): 114–9. Russian.
10. Gontschar IA, Stepanova JI, Prudyvus IS. [Biochemical predictors and markers of ischemic stroke]. *Minsk: Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education*; 2013. 512 p. Russian.
11. Grischenko VI, Goltsev AN. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application. *Problems of Cryobiology*. 2002; (1): 54–85.
12. Javidi E, Magnus T. Autoimmunity after ischemic stroke and brain injury. *Front Immunol*. [Internet]. 2019 Apr 2 [cited 2020 June 15]; 10:686. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00686/full>
13. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*. [Internet]. 2020 Sep 29 [cited 2021 June 15]; 8:49. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-020-00228-x>
14. Koval AK, Ostankov MV, Bondarovich NA, et al. Effect of cryopreserved cord blood on functional state of dendritic cells of rat skin with atopic dermatitis. *Probl. Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(2): 159.
15. Lebedinets VV, Ostankova LV, Dubrava TG, et al. [Use of cryopreserved cord blood to correct immune system in a model of ischemic stroke]. *Medytsyna Sogodni i Zavtra*. 2015; 69(4): 20–9. Russian.
16. Menshikov VV. [Laboratory methods for research in clinics]. Moscow: Meditsina, 1987. P. 123–5. Russian.



12. Коваль АК, Останков МВ, Бондарович НА, и др. Влияние криоконсервированной кордовой крови на функциональное состояние дендритных клеток кожи крыс с атопическим дерматитом. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(2): 159.
13. Лебединец ВВ, Останкова ЛВ, Дубрава ТГ, и др. Применение криоконсервированной кордовой крови для коррекции иммунной системы в модели ишемического инсульта. Медицина сьогодні і завтра. 2015; (4): 20–9.
14. Меньшиков ВВ. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Москва: Медицина, 1987. с. 123–5.
15. Меркулов ГА. Курс патогистологической техники. Ленинград: Медгиз; 1969. 423 с.
16. Мищенко ТС. Епідеміологія неврологічних захворювань в Україні. Нейро - News. 2008; (3): 107.
17. Пастер ЕУ, Овод ВВ, Позур ВК, и др. Иммунология: Практикум. Київ: Вища школа; 1989. 304 с.
18. Серебrennikova СН, Семинский ИЖ, Семенов НВ, и др. Интерлейкин-1, интерлейкин-10 в регуляции воспалительного процесса. Сибирский медицинский журнал. 2012; (8): 5–7.
19. Цуцаева АО, Грищенко ВІ, Кудокотсева ОВ, та ін. винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові. Патент України № 31847А, 15. 12. 2000.
20. Шерешков СИ. Культивирование гемопоэтических клеток на полутвердых питательных средах. Лабораторное дело. 1974; (3): 146–50.
21. Шипулин ВМ, Чумакова СП, Погонченкова ДА, и др. Дисбаланс цитокинов и численность неклассических моноцитов в крови при сердечной недостаточности ишемического генеза. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2020; 24(1): 45–53.
22. Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. Expert Rev Neurother. 2015; 15(5): 523–31.
23. Javidi E, Magnus T. Autoimmunity after ischemic stroke and brain injury. Front Immunol. [Internet]. 2019 Apr 2 [cited 2020 June 15]; 10:686. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00686/full>.
24. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. Biomark Res [Internet]. 2020 Sep 29 [cited 2021 June 15]; 8:49. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-020-00228-x>
25. Petrovic-Djergovic D, Goonewardena SN, Pinsky DJ. Inflammatory disequilibrium in stroke. Circ Res. 2016; 119(1): 142–58.
26. Sanberg PR, Ehrhart J. A hallmark clinical study of cord blood therapy in adults with ischemic stroke. Cell Transplant. 2019; 28(9-10): 1329–32.
27. Shearer WT, Lubin BH, Cairo MS, et al. Cord blood banking for potential future transplantation. Pediatrics [Internet]. 2017 Nov 20 [cited 2020 June 15]; 140(5): e20172695. Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/140/5/e20172695.long>
17. Merkulov GA. [The course in pathological histology technique]. Leningrad: Medgiz; 1969. 423 p. Russian.
18. Mishchenko TS. [Epidemiology of neurological diseases in Ukraine]. Neyro-News. 2008; (3): 107. Ukrainian.
19. Paster EU, Gadfly BB, Pozur VK, et al. [Immunology laboratory course]. Kyiv: Vyscha shkola; 1989. 304 p. Russian.
20. Petrovic-Djergovic D, Goonewardena SN, Pinsky DJ. Inflammatory disequilibrium in stroke. Circ Res. 2016; 119(1): 142–58.
21. Sanberg PR, Ehrhart J. A hallmark clinical study of cord blood therapy in adults with ischemic stroke. Cell Transplant. 2019; 28(9-10): 1329–32.
22. Serebrennikova SN, Seminsky IZh, Semenov NV, et al. [Interleukin-1, interleukin-10 in regulation of inflammatory process]. Siberian Medical Journal. 2012; (8): 5–7. Russian.
23. Shereshkov SI [Culturing of hemopoietic cells on semisolid nutrient media]. Laboratornoe delo. 1974; (3): 146–50. Russian.
24. Shearer WT, Lubin BH, Cairo MS, et al. Cord blood banking for potential future transplantation. [Internet] Pediatrics. 2017 Nov [cited 2020 June 15]; 140(5): e20172695. Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/140/5/e20172695.long>
25. Shipulin VM, Chumakova SP, Pogonchenkova DA, et al. [Interleukin-10 and non-classical monocytes as biomarkers of ischemic cardiomyopathy]. Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya. 2020; 24(1): 45–53. Russian.
26. Tsutsaieva AO, Hryshenko VI, Kudokotseva OV, et al., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method for cryopreservation of hemopoietic cells of cord blood]. Patent of Ukraine 31847A, 2000 December 15. Ukrainian.
27. Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zakharia EA, et al. [Laboratory animals]. Kyiv: Vyscha shkola, 1983. 252 p. Russian.