

UDC 636.7.09:616.993.192.6–085:615.38

В.В. Лебединець<sup>1,3</sup>, П.В. Останкова<sup>1</sup>, М.О. Бондарович<sup>1</sup>,  
Д.В. Лебединець<sup>3</sup>, М.В.Останков<sup>1</sup>, О.Д. Луценко<sup>1,2\*</sup>, І.Г. Гриша<sup>1</sup>, А.М. Гольцев<sup>1,2</sup>

## Вплив ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини на стан імунної системи щурів з ішемічним інсультом

UDC 636.7.09:616.993.192.6–085:615.38

V.V. Lebedynets<sup>1,3</sup>, L.V. Ostankova<sup>1</sup>, M.O. Bondarovich<sup>1</sup>,  
D.V. Lebedynets<sup>3</sup>, M.V. Ostankov<sup>1</sup>, O.D. Lutsenko<sup>1,2\*</sup>, I.G. Grisha<sup>1</sup>, A.M. Goltsev<sup>1,2</sup>

## Lyophilized Human Cord Blood Leukoconcentrate Affects Immune System of Rats with Ischemic Stroke

**Реферат:** Цереброваскулярна патологія, особливо гострі порушення мозкового кровообігу, є однією з найскладніших проблем медицини. У зв'язку з цим актуальним залишається пошук ефективних методів лікування нейродегенеративних захворювань. На експериментальній моделі ішемічного інсульту (ІІ) у порівняльному аспекті досліджували вплив ліофілізованого (ЛЛККЛ) та криоконсервованого (КЛККЛ) лейкоконцентратів кордової крові людини на гуморальну і клітинну ланки імунітету. Ішемічний інсульт моделювали у 6-місячних щурів лінії Вістар шляхом оклюзії середньої мозкової артерії. Тваринам внутрішньочеревинно вводили КЛККЛ і ЛЛККЛ по 0,5 мл у дозі  $5 \times 10^6$  клітин через 6 годин після закінчення операції. Визначали склад популяції та субпопуляції лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), вміст загальних імуноглобулінів і циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові. На експериментальній моделі ІІ показано, що як ліофілізація, так і криоконсервування ЛККЛ забезпечували збереження імуномодуючого потенціалу клітин, що було підтверджено в системі *in vivo*. Встановлено рівнозначну коригувальну дію ЛЛККЛ і КЛККЛ на показники клітинної та гуморальної ланок імунітету за розвитку ІІ. Включення до базової терапії ІІ ЛЛККЛ і КЛККЛ сприяло більш швидкому відновленню показників імунної системи тварин, яке співставне з використанням нативного ЛККЛ.

**Ключові слова:** ліофілізація, криоконсервування, лейкоконцентрат кордової крові людини, ішемічний інсульт, імунна система, циркулюючі імунні комплекси.

**Abstract:** Cerebrovascular pathology, especially acute cerebrovascular accident is among the most complicated issues in medicine. Therefore, the search for efficient ways to treat neurodegenerative diseases has still remained topical. In experimental model of ischemic stroke (IS), the impact of lyophilized and cryopreserved human cord blood leukoconcentrate (IHCBL and cHCBL, respectively) on immune system humoral and cell components has been comparatively studied. The ischemic stroke was simulated in 6-month-old Wistar rats by occlusion of the middle cerebral artery. The IHCBL and cHCBL were administered intraperitoneally at a dose of 0.5 ml of  $5 \times 10^6$  cells in 6 hrs after surgery (occlusion). In blood serum, the populations and subpopulations of lymphocytes (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), the content of total immunoglobulins and circulating immune complexes were determined. The experimental model of IS showed both lyophilization and cryopreservation of HCBL to ensure the preservation of immunomodulatory potential of cells, that was confirmed *in vivo*. An equivalent corrective effect of IHCBL and cHCBL on indices of immune system cell and humoral components during IS development has been established. The inclusion of IHCBL, as well as cHCBL and native HCBL in basic therapy of IS promoted a more rapid recovery of the immune system indices in animals.

**Key words:** lyophilization, cryopreservation, human cord blood leukoconcentrate, ischemic stroke, immune system, circulating immune complexes.

Гостре порушення мозкового кровообігу — актуальна медико-соціальна проблема. Частота інсультів у різних країнах світу коливається від 150 до 740 випадків на 100 000 населення [14]. Наразі у зв'язку зі старінням населення, тобто збільшенням у популяції осіб похилого віку, кіль-

Cerebrovascular accident is an urgent medical and social problem. The stroke frequency in different countries varies from 150 to 740 cases per 100,000 population [10]. Currently, the number of stroke patients is augmenting annually with the people aging, *i. e.* an increase in older persons

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>2</sup> Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України, Харків, Україна

<sup>3</sup> Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

\*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

Надійшла 25.11.2020

Прийнята до друку 07.09.2022

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Academy of Medical Sciences of Ukraine and Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup> V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

\*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

Received 25, November, 2020

Accepted 07, October, 2022

кість хворих на інсульт підвищується з кожним роком. Серед пацієнтів з цією патологією спостерігається висока летальність та інвалідизація [12, 16].

Доведено, що у патогенезі ішемічного інсульту (ІІ) значуще місце займають імунні механізми, які надалі призводять до дисрегуляції імунної системи (ІС), що проявляється в розбалансуванні взаємодії клітинної та гуморальної ланок імунітету [10, 13]. При цьому встановлено, що «класична» медикаментозна терапія не завжди сприяє репарації пошкодженої нервової тканини та відновленню ІС хворого на ІІ [18].

Враховуючи вищевикладене, очевидно є необхідність застосування для лікування ІІ препаратів з потенціалом надсистемної регуляторної активності [2]. Сироватка та плазма кордової крові містять репродуктивні імуномодулятори, цитокіни, адгезивні компоненти, увесь спектр гормонів, що притаманний організму новонародженого, ростові та антипроліферативні фактори, гемопоетичні та адаптогенні, опіюїдні (ендорфіни, енкефаліни) пептиди, мікроелементи, вітаміни. Варто зазначити, всі вказані речовини кордової крові знаходяться в збалансованих співвідношеннях і є біологічно активним комплексом, необхідним для організму, який розвивається. Крім того, після введення в дорослий організм з патологією він сприяє нормалізації обміну речовин [17, 23]. Наявність у кордовій крові мезенхімальних і «подібних до ембріональних» плюрипотентних стовбурових клітин, а також гемангіобластів відкриває перспективи щодо її ефективного застосування у відновленні ушкодженої тканини нервової системи хворих на ІІ [25]. Таким чином, лейкоконцентрат кордової крові людини (ЛККЛ) може бути універсальним матеріалом для регенеративних і репаративних процесів в організмі [19, 24]. Він має високий проліферативно-диференціальний потенціал, застосовується для корекції імунодефіцитних станів, лікування онкологічної патології та вважається перспективним засобом для збільшення тривалості життя людини.

Для довгострокового зберігання ЛККЛ використовують криоконсервування з подальшим його перенесенням в низькотемпературні банки, що забезпечують схоронність структурно-функціональних характеристик клітин на близькому до початкового рівні [1]. Однак більш економічним вважається метод ліофілізації, який не потребує застосування хімічних консервантів [6, 7].

У даному дослідженні для лікування ІІ використовували криоконсервований (кЛККЛ) та ліофілізований (лЛККЛ) лейкоконцентрати кордової крові людини як потенційні коректори

within population. High mortality and disability rates are observed among the patients with this pathology [1, 18].

The immune mechanisms were proven to play a significant role in ischemic stroke (IS) pathogenesis, which further resulted in the immune system dysregulation, manifested in the imbalanced interaction between cell and humoral links of the immunity [16, 19]. Herewith, the 'standard' drug therapy was established as not always ensuring the repair of damaged nerve tissue and immune system restoration in IS patients [3].

Bearing in mind the mentioned above, the need to apply the drugs with potential of suprasystemic regulatory activity for IS therapy is obvious [5]. Cord blood serum and plasma contain reproductive immune modulators, cytokines, adhesive components, the entire range of hormones inherent in newborn body, growth and antiproliferative factors, hematopoietic and adaptogenic, opioid (endorphins, enkephalins) peptides, microelements, vitamins. Notably, that all the specified substances of cord blood are in balanced proportions, being a biologically active complex necessary for developing organism. Moreover, it ensures the metabolism normalization when introduced into an adult organism with pathology [2, 22]. The presence of mesenchymal and 'embryonic-like' pluripotent stem cells in cord blood, as well as hemangioblasts, opens up new opportunities for its efficient use in restoring the injured tissue of nervous system in patients with IS [25]. Thus, the HCBL may be a universal material for regenerative and reparative processes in a body [8, 23]. It possesses a high proliferative and differentiating potentials, being applied for correction of immunodeficiency states, in therapy of oncology pathology, and may be considered as a promising mean to increase the human life expectancy.

The cryopreservation is generally used for the HCBL long-term storage, followed by its transfer into low temperature banks, where the preservation of structure and functions of cells at a level close to the initial one is provided [4]. However, the lyophilization, not requiring the chemical preservative use, is considered to be more cost-efficient [11, 12].

In this study, the cryopreserved and lyophilized human cord blood leukoconcentrates (cHCBL and lHCBL, respectively) were used for IS therapy, as potential correctors of the state of immune system cell and humoral components in experimental animals.

The research aim was a comparative study of the impact of lyophilized and cryopreserved human



стану клітинної та гуморальної ланок ІС експериментальних тварин.

Мета роботи — дослідження у порівняльному аспекті впливу ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини та кріоконсервованого лейкоконцентрату кордової крові людини на гуморальну та клітинну ланки імунітету щурів з експериментальною моделлю ішемічного інсульту.

### Матеріали і методи

Експерименти проводили на 6-місячних щурах-самцях масою 180–200 гр ( $n = 62$ ) відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Експериментальну частину роботи виконували відповідно до висновку комітету з біоетики (Протокол № 7 від 26.02. 2019) Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України, м. Харків).

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 кордової крові людини отримували за методом В.В. Лебединця та співавт. [8]. Лейкоконцентрат отримували з кордової крові шляхом пасивної седиментації еритроцитів в аутоплазмі у градієнті щільності з додаванням поліглюкіну. Розливали нативний ЛККЛ (нЛККЛ) по 1 мл у стерильні пеніцилінові флакони і проводили ліофілізацію за методом А.М. Гольцева та співавт. [3] з використанням сублімаційної установки «УЗВ-2» (СКТБ з ДВ при ІПКіК НАН України). Зразки нЛККЛ зберігали при 4°C. Регідратували нЛККЛ з поступовим додаванням фізіологічного розчину у флакони 1 мл протягом 10 хв, обережно перемішували для виключення спінювання. Кріоконсервували ЛККЛ (кЛККЛ) в одноразових пластикових пробірках (Nunc, США) на програмному заморозувачі «УОП-06» (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) за методом А.О. Цуцаєвої та співавт. [15]. Зразки кЛККЛ зберігали при –196°C у низькотемпературному банку ІПКіК НАН України. Відтавали кЛККЛ на водяній бані за температури 40–41°C. Визначали кількість ядерних клітин у 1 мл суспензії ЛККЛ за допомогою геманалізатора «Abacus» (Abacus, Австрія). Життєздатність клітин оцінювали методом суправітального забарвлення 0,2%-м розчином трипанового синього [9] та методом точної цитофлуориметрії на установці «FACS

cord blood leukoconcentrates on humoral and cell components of immune system in rats with experimental model of ischemic stroke.

### Materials and methods

Experiments were carried out in 6-month-old male rats weighing 180–200 g ( $n = 62$ ) in accordance 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). Experimental part of research was agreed with the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (IPCC of the NAS of Ukraine) (protocol No. 7 of February 26, 2019).

The cord blood was procured with an informed consent of women in labour immediately after child birth. Then the vials with cord blood were transported and stored at 4°C. Leukoconcentrate from human cord blood was obtained by the method of V.V. Lebedynets *et al.* [13] via passive erythrocyte sedimentation in a density gradient supplemented with Polyglucinum. Native HCBL (nHCBL) was poured into sterile penicillin vials (by 1 ml) and lyophilized according to the method of A.M. Goltsev *et al.* using the sublimation unit 'UZV-2' (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the IPCC of the NAS of Ukraine) [6]. The HCBL specimens were stored at 4°C. They were rehydrated by gradual supplement of 1 ml of saline into the vials for 10 min, then carefully mixed to exclude foaming. The HCBL was cryopreserved (cHCBL) in disposable plastic tubes (Nunc, USA) with programmable freezer 'UOP-06' (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the IPCC of the NAS of Ukraine) by the method of A.O. Tsutsaieva *et al.* [21]. The cHCBL specimens were stored at –196°C at the low-temperature bank of the IPCC of the NAS of Ukraine. The cHCBL was warmed in a water bath at 40–41°C. The amount of nucleated cells in 1 ml of HCBL suspension was determined with 'Abacus' hematology analyzer (Diatron, Austria). Cell viability was assessed by supravital staining with 0.2% trypan blue solution [14] and with FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, USA) using propidium iodide.

Ischemic stroke was simulated in animals by the middle cerebral artery (MCA) occlusion [24, 10]. To anaesthetize, the Ketonal (LEK d.d., Slovenia) 5 ml/kg body weight was used subcutaneously,



Calibur» (BD Bioscience, США) з використанням пропідій йодиду.

Ішемічний інсульт у тварин моделювали шляхом оклюзії середньої мозкової артерії (СМАо) [5, 14]. Для знеболювання використовували кетонал (ЛЕК d.d., Словенія) 5 мл/кг маси підшкірно, для місцевого знеболювання — 2%-й розчин новокаїну («Дарниця», Україна) 50 мл/кг маси підшкірно. Через 6 годин після СМАо шурам внутрішньочеревинно вводили ЛККЛ у дозі 0,5 мл  $5 \times 10^6$  клітин. Під час вибору дози ЛККЛ та місця його введення враховували дані експериментів, у яких використовували ці клітини [4, 7]. Контрольним препаратом був церебролізін (215,2 мг/мл, EVER NeuroPharma GmbH, Австрія), який розводили фізіологічним розчином *ex tempore* і вводили внутрішньочеревинно в дозі 0,1 мл на 100 г маси тварини протягом 3-х діб.

Тварин розподілили на групи: 1 — інтактну (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 нЛККЛ (ІІ + нЛККЛ,  $n = 11$ ); 6 — щури з ІІ, яким вводили церебролізін (ІІ + церебролізін,  $n = 11$ ).

У тварин контрольної та всіх дослідних груп оцінювали показники функціонального стану ІС. У клітинній ланці імунітету (КЛІ) визначали субпопуляційний склад клітин селезінки методом прямої імунофлуоресценції на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» (BD Bioscience) з використанням антищурячих флуоресцеїн-ізоціанат мічених моноклональних антитіл (ФІТЦ МАТ) (BD Pharmingen, США) до CD3 (загальні Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (Т-супресори), CD16 (натуральні кілери (НК)).

Для кількісної оцінки Т-регуляторних клітин (Трег) використовували МАТ до CD4 і CD25 (rIL-2) (BD Pharmingen, США). У всіх випадках оцінювання застосовували відповідний ізотиповий контроль. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення «WinMDI 2.8» (J. Trotter, Scripps Research Institute, США). Для оцінки гуморальної ланки імунітету (ГЛІ) у сироватці крові визначали циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) спектрометричним методом та імуноглобуліни (IgG, IgA, IgM) за методом Манчіні [11]. Усі дослідження проводили в динаміці розвитку ІІ та після лікування на 1, 3, 7 і 28-у доби.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми «Statistica» (StatSoft, США). Значущість відмінностей для непараметричних кількісних змінних двох вибірок оцінювали за ранговим U-критерієм Манна-

and 2% Novocaine solution (Darnitsa, Ukraine) 50 ml/kg body weight was administered subcutaneously for local anesthesia. When selecting the HCBL dose and the injection site, we bore in mind the findings, where these cells were applied [7, 12]. The control drug was Cerebrolysin (215.2 mg/ml, EVER NeuroPharma, Austria) dissolved in saline *ex tempore* and injected intraperitoneally at a dose of 0.1 ml per 100 g of animal weight for 3 days.

Rats were divided into the following groups: group 1 was the intact animals (control,  $n = 7$ ); groups 2 consisted of rats with IS ( $n = 11$ ); in groups 3 were rats with IS, injected with IHCBL (IS + IHCBL,  $n = 11$ ); group 4 comprised the rats with IS, received cHCBL (IS + cHCBL,  $n = 11$ ); group 5 was the rats with IS, administered with nHCBL (IS + nHCBL,  $n = 11$ ); the animals with IS, injected with Cerebrolysin (IS + Cerebrolysin,  $n = 11$ ) made group 6.

Indices of functional state of the immune system were evaluated in the animals of control and all the experimental groups. In cell component of the immune system (CCIS), the subpopulation composition of spleen cells was determined by direct immunofluorescence with FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, USA) using anti-rat fluorescein isothiocyanate labeled monoclonal antibodies (FITC MAT) (BD Pharmingen, USA) to CD3 (total T-lymphocytes), CD4 (T-helpers), CD8 (T-suppressors), CD16 (natural killers (NK)).

Monoclonal antibodies to CD4 and CD25 (rIL-2) (BD Pharmingen, USA) were used to quantify the T-regulatory cells (Treg). An appropriate isotype control was used in all the evaluation cases. Data were analyzed using WinMDI 2.8 software (J. Trotter, Scripps Research Institute, USA). To assess the humoral component of the immune system (HCIS) in blood serum, the circulating immune complexes (CICs) were detected by spectrophotometry and the immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) were done by the Mancini method [17]. All the experiments were conducted in dynamics of IS development and after therapy to days 1, 3, 7 and 28.

The research results were statistically processed using Statistica software (StatSoft, USA). The significance of differences for non-parametric quantitative variables of two samples was evaluated by the Mann-Whitney U-rank test, differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

The study of CCIS status in the IS rats showed the total number of T-lymphocytes (CD3<sup>+</sup>), T-helper



Вітні, відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

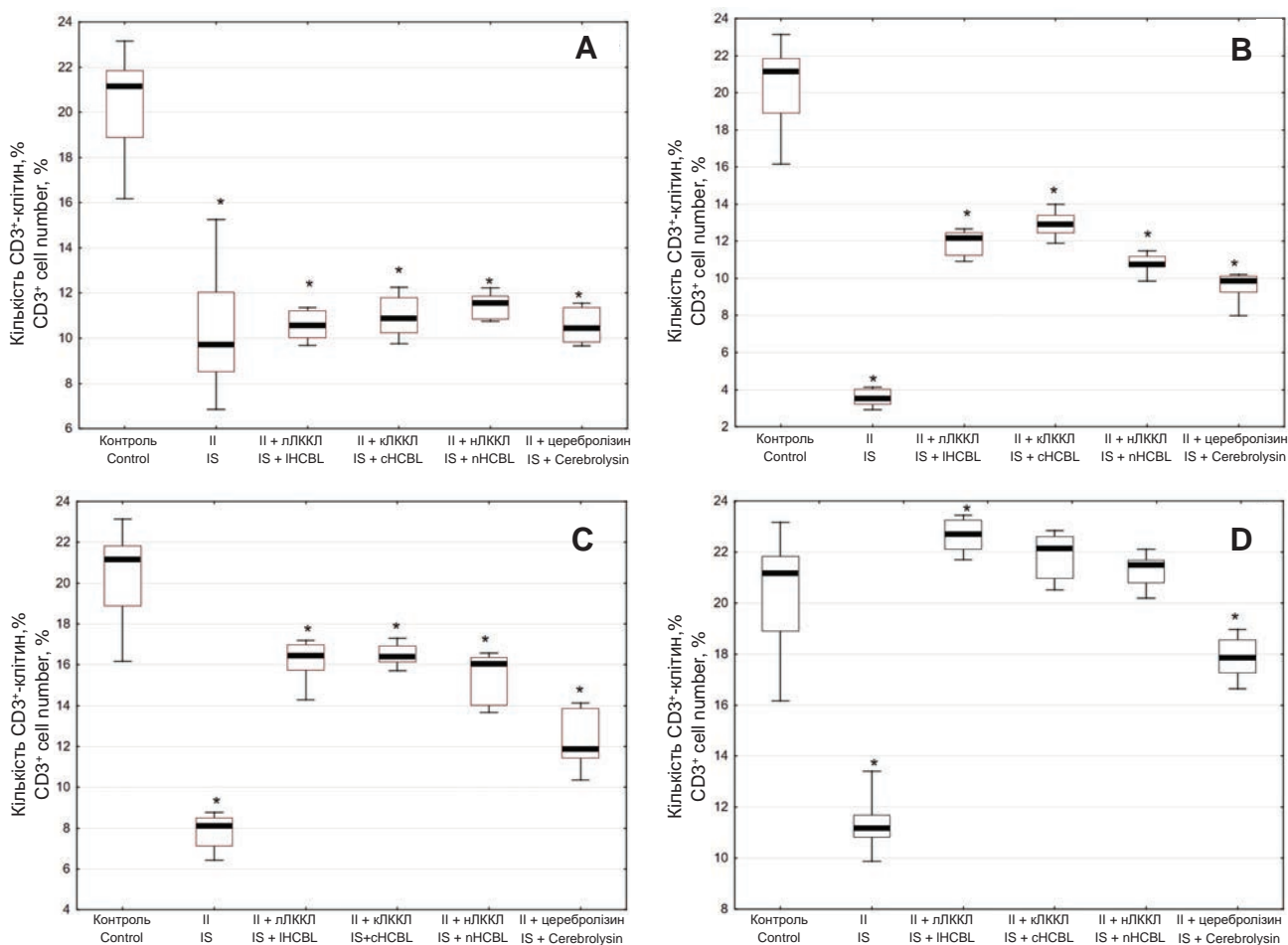
### Результати та обговорення

Дослідження стану КЛІ щурів з ІІ показало, що протягом усіх термінів спостереження значуще зменшувалася загальна кількість Т-лімфоцитів ( $CD3^+$ ), Т-хелперів ( $CD4^+$ ), Т-супресорів та/або цитотоксичних ( $CD8^+$ ). Аналогічна тенденція спостерігалася відносно НК ( $CD16^+$ ) та Трег клітин ( $CD4^+CD25^+$ ) з 3-ї доби спостереження і не відновлювалася до 28-ї доби (рис. 1–5).

Виявлені зміни показників КЛІ свідчать про виражений розвиток дисрегуляторного стану ІС щурів з ІІ. Показано, що за умов ІІ виникають деякі ознаки аутоімунних захворювань (АІЗ) [20, 23], що узгоджується з нашими даними про

( $CD4^+$ ), T-suppressor and/or cytotoxic ( $CD8^+$ ) to significantly decrease throughout the all observation periods. A similar tendency was observed for NK ( $CD16^+$ ) and Treg cells ( $CD4^+CD25^+$ ) from the day 3 of observation and it did not restore until day 28 (Figs. 1–5).

The revealed changes in CCIS indices testified to a pronounced development of dysregulatory state of the immune system in IS rats. Certain signs of autoimmune diseases (AID) were shown to appear under IS conditions [9, 22], which was consistent with our data on a decreased content of Treg cells. This indicated the body's inability to resist the autoimmune response development. Among the mechanisms underlying the immune deficiency development, one cannot exclude severe stress and the associated redistri-



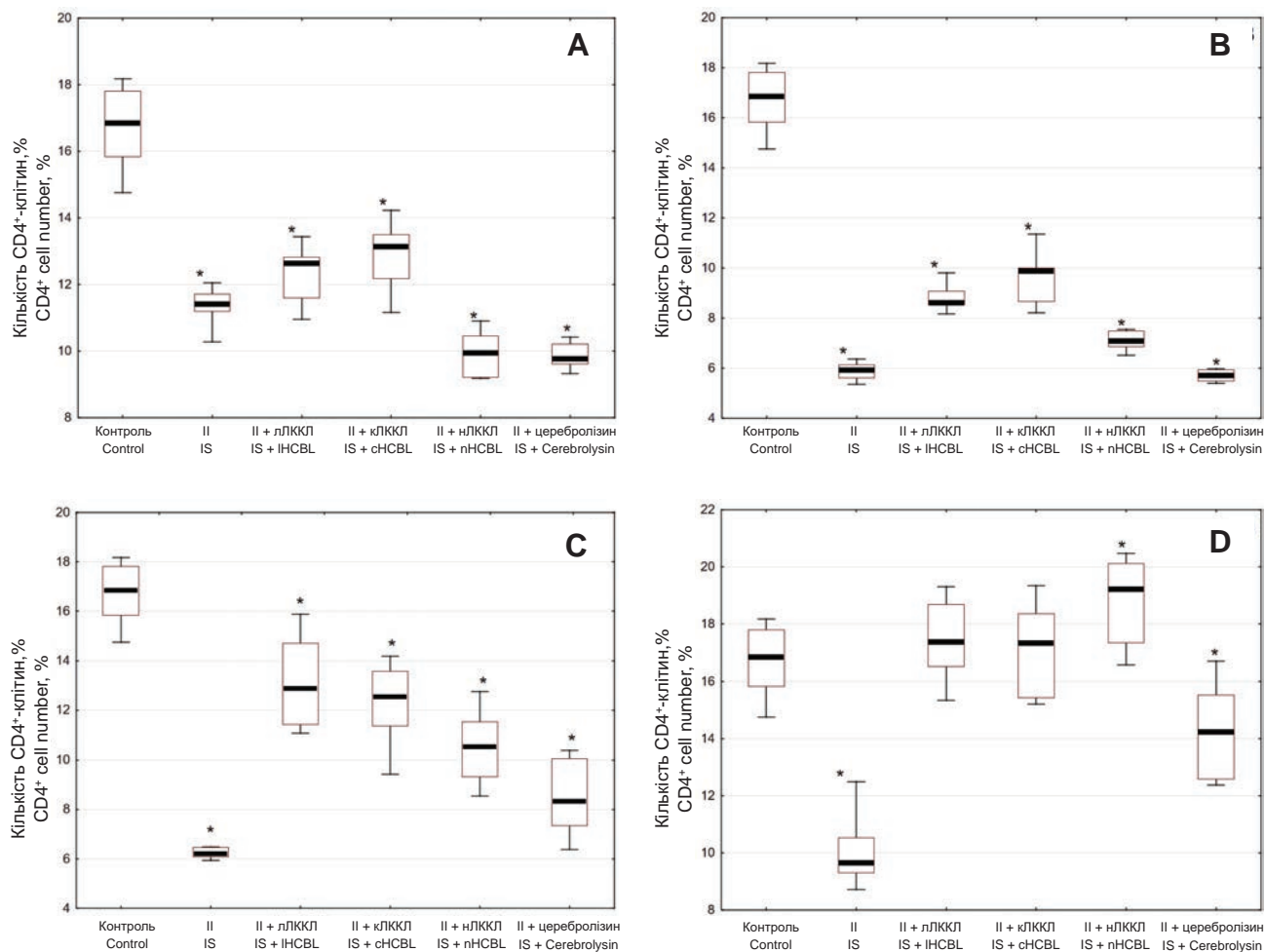
**Рис. 1.** Кількість  $CD3^+$ -клітин у щурів з ІІ та після лікування на 1 (A), 3 (B), 7 (C) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 1.**  $CD3^+$  cell number in rats with IS and after therapy to days 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.



зниження вмісту Трег клітин. Це вказує на нездатність організму протистояти розвитку аутоімунних реакцій. Серед механізмів, які лежать в основі розвитку імунодефіциту, не можна виключати важкий стрес та пов'язані з ним перерозподіл і фіксацію лімфоцитів у лімфоїдних органах, затримку виходу їх клітин-поперед-

bution and fixation of lymphocytes in lymphoid organs, delay in the release of their progenitor cells from the bone marrow, glucocorticoid-induced apoptosis of T lymphocytes [20]. Inclusion into the IS therapy of both lHCBL and cHCBL, as well as nHCBL was accompanied by improvement of CCIS indices. For example, starting from



**Рис. 2.** Кількість CD4<sup>+</sup>-клітин у щурів з ІІ та після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

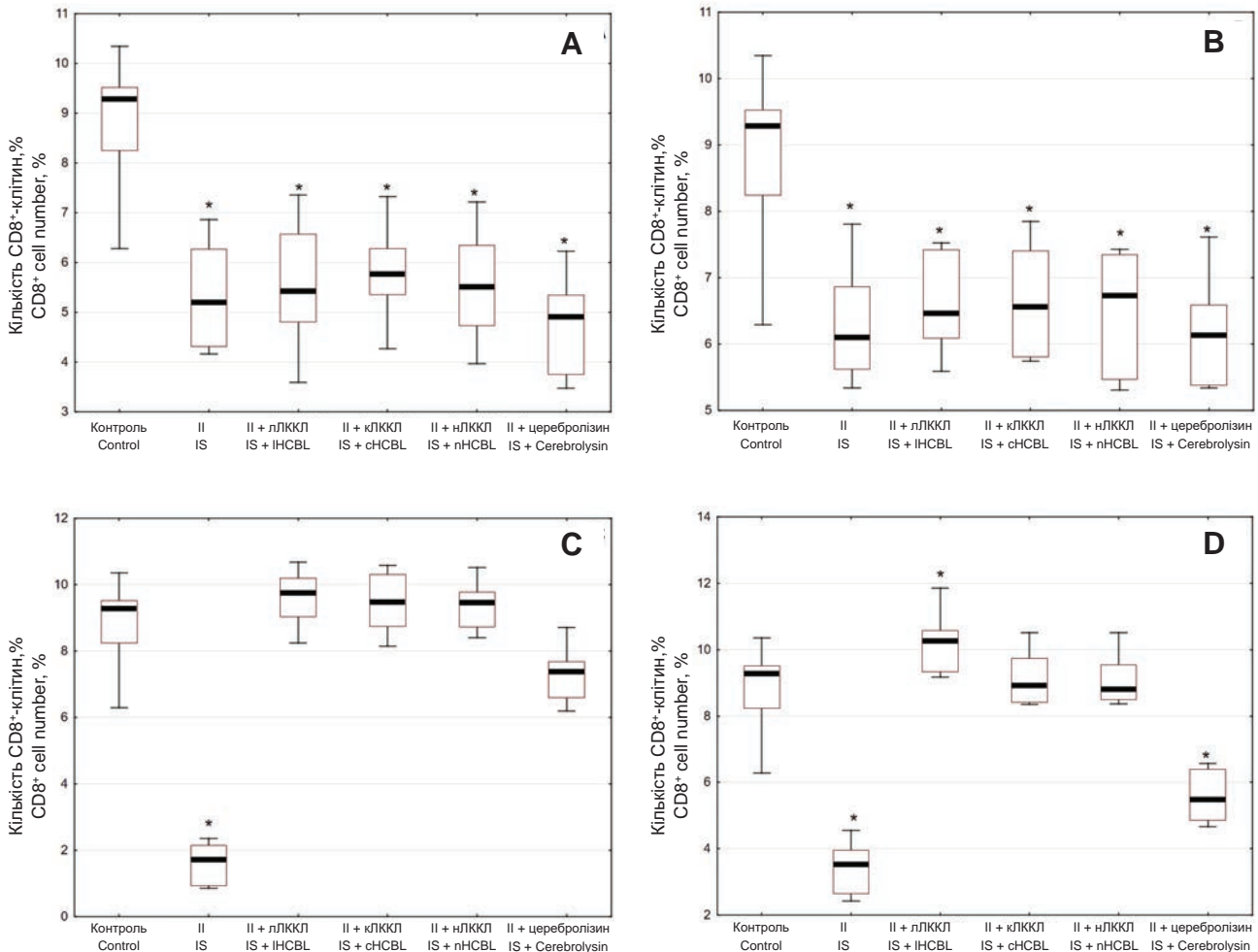
**Fig. 2.** CD4<sup>+</sup> cell number in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

ників із кісткового мозку, глюкокортикоїд-індукований апоптоз Т-лімфоцитів [22]. Включення до терапії ІІ лЛККЛ, також як і кЛККЛ та нЛККЛ, супроводжувалося поліпшенням показників КЛІ. Так, з 3-ї доби у тварин груп 3–5 відносна й абсолютна кількість Т-лімфоцитів була значуще більшою ( $p < 0,05$ ), ніж у щурів з ІІ (група 2) та після лікування церебрוליном (гру-

day 3, the relative and absolute number of T-lymphocytes was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the animals of groups 3–5 than in IS rats (group 2) and after therapy with Cerebrolysin (group 6) (see Fig. 1). Between the regulatory subpopulations of T-lymphocytes, the T-helpers showed the highest sensitivity to immune correcting effect of the administered HCBL, which number was

па б) (див. рис. 1). З регуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів найбільшу чутливість до імунокоригуючої дії введених ЛККЛ проявляли Т-хелпери, кількість яких на 3 та 7-у доби була значуще більшою, ніж у щурів з ІІ та після лікування церебролізином ( $p < 0,001$ ) (див. рис. 2). Початково зменшена кількість Т-супресорів та/або цито-

significantly higher to days 3 and 7 than in IS rats and after Cerebrolysin therapy ( $p < 0.001$ ) (see Fig. 2). The initially reduced number of T-suppressor and/or cytotoxic cells had a tendency to increase to day 7 of observation after administering all the HCBL types to rats (groups 3–5) and, conversely, it tended to decrease after therapy



**Рис. 3.** Кількість CD8<sup>+</sup>-клітин у щурів з ІІ та після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 3.** CD8<sup>+</sup> cell number in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

токсичних клітин мала тенденцію до збільшення на 7-у добу дослідження після введення щурам усіх видів ЛККЛ (групи 3–5) і, навпаки, до зниження після лікування церебролізином (група 6) (див. рис. 3). Нормалізацію кількості НК (CD16<sup>+</sup>) і Трег клітин (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) спостерігали у щурів груп 3–5 з 3-ї доби з досягненням контрольних значень на 28-у добу (див. рис. 4, 5).

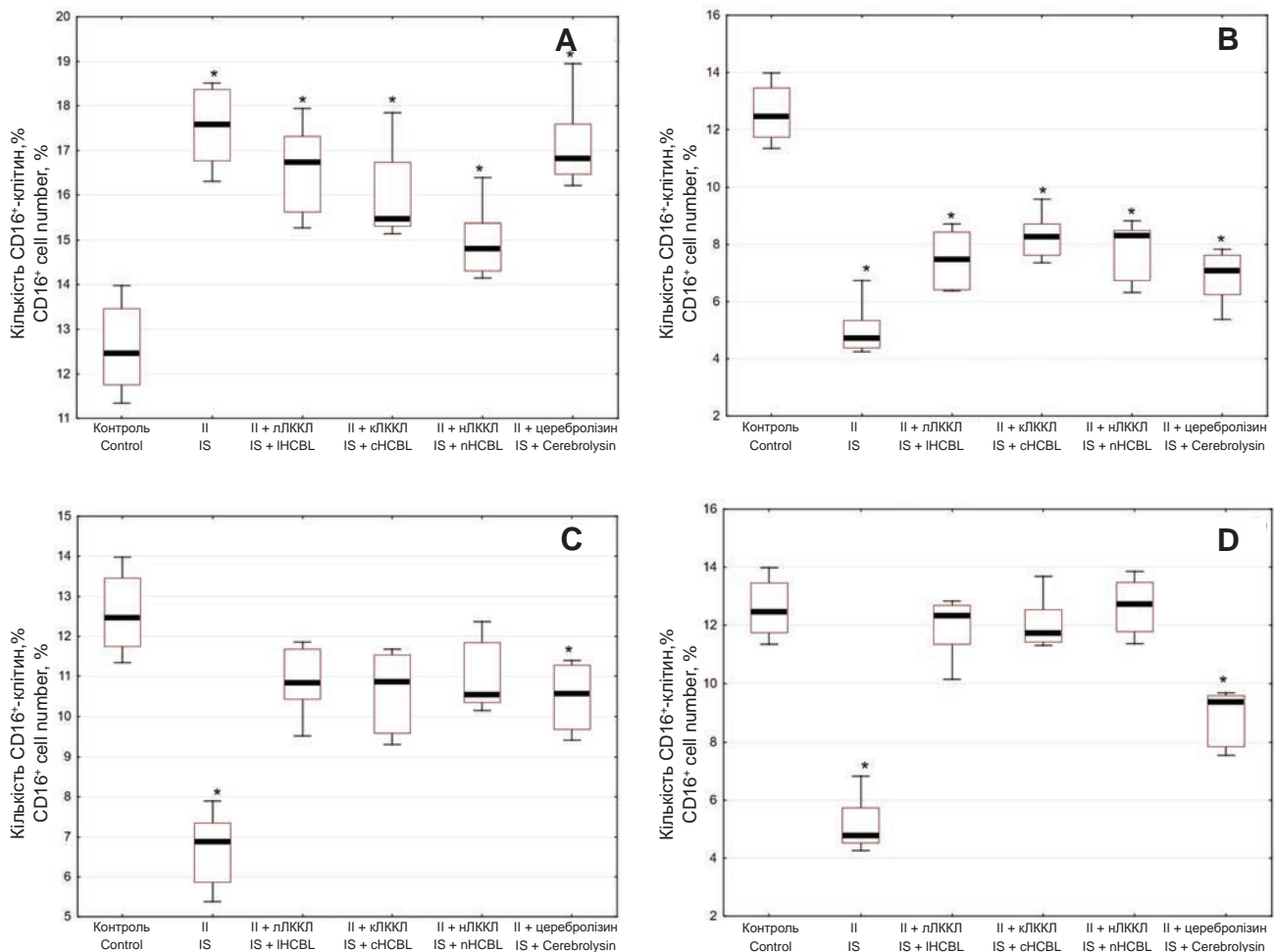
with Cerebrolysin (group 6) (Fig. 3). The normalization of NK (CD16<sup>+</sup>) and Treg cell (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) number was observed in rats of groups 3–5 starting from day 3 by reaching control values to day 28 (see Figs. 4, 5).

These findings on normalizing the number of the studied populations of the immune system cells in animals after IS therapy showed the use

Отримані дані щодо нормалізації кількості досліджуваних популяцій клітин ІС у тварин після лікування ІІ вказують на те, що застосування ЛЛККЛ або кЛККЛ, як й нЛККЛ, перешкоджає виникненню у них імунодефіциту та підвищує протизапальний потенціал організму.

of either ІНСВЛ or сНСВЛ as well as нНСВЛ to prevent the immunodeficiency occurrence in them and improve the anti-inflammatory potential of the body.

The analysis of humoral immunity indices in rats with ІС and after therapy with Cerebrolysin



**Рис. 4.** Кількість CD16<sup>+</sup>-клітин у щурів з ІІ та після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75-му та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 4.** CD16<sup>+</sup> cell number in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* — as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

Аналіз показників гуморальної ланки імунітету щурів з ІІ та після лікування церебролізином виявив значуще зниження рівня імуноглобулінів ІgА, ІgМ, ІgG з 1-ї по 7-у доби і незначуще його підвищення на 28-у добу дослідження порівняно з контролем (рис. 6–8). У тварин, яких лікували ЛККЛ (групи 3–5), вказані імуноглобуліни до 3-ї доби були зниженими, але на 7-у добу наближалися до контрольних значень. На 28-у до-

revealed a significant decrease in immunoglobulins ІgА, ІgМ, ІgG indices from day 1 to 7 and their insignificant rise to day 28 of observation as compared with the control (Figs. 6–8). In the animals treated with ІНСВЛ (groups 3–5), the specified immunoglobulins were reduced until day 3, but they approached the control values to day 7. To day 28, the ІgА and ІgG concentrations did not differ from the control, but



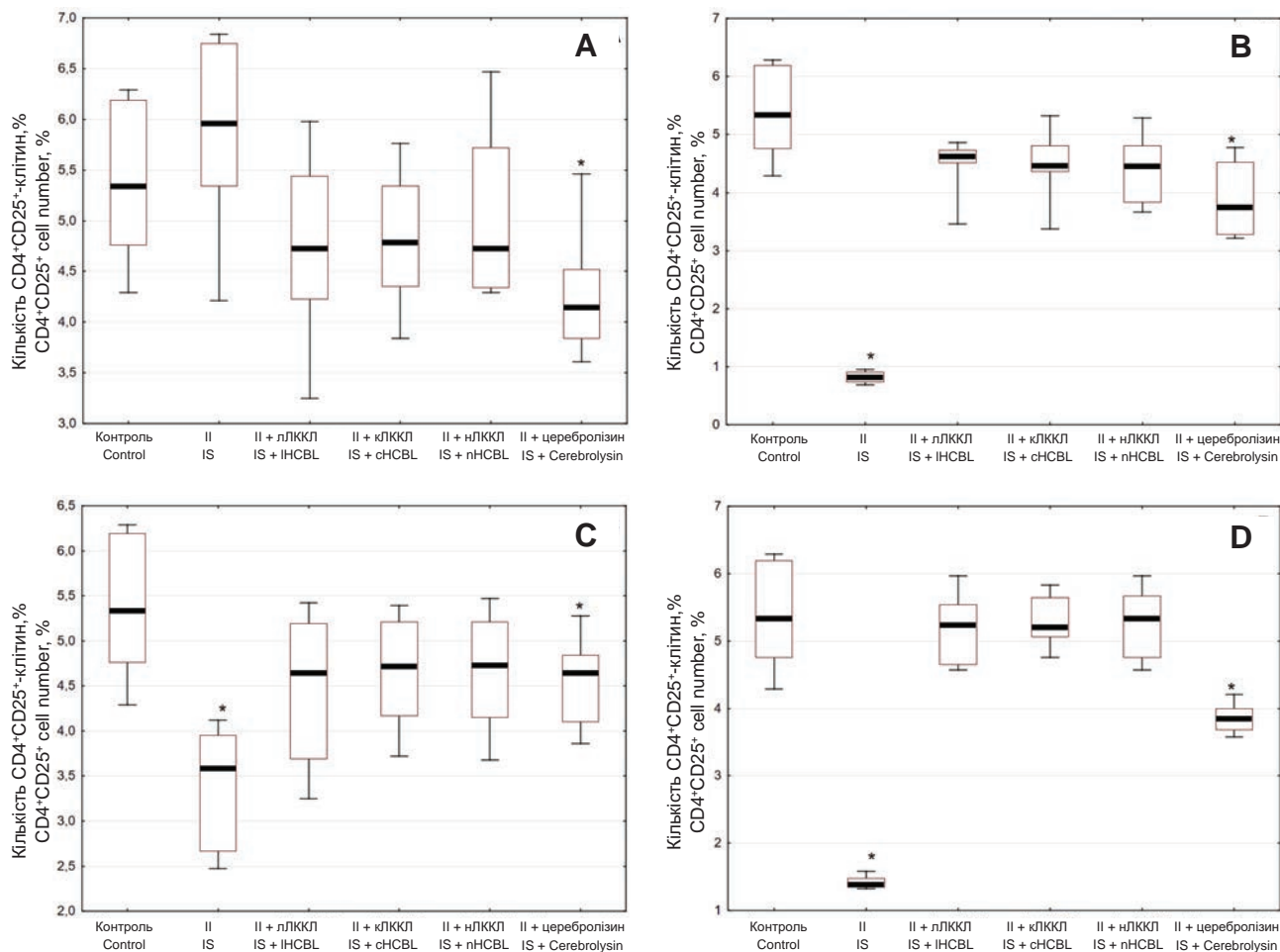


бу концентрація IgA і IgG значуще не відрізнялася від контролю, а IgM була значуще вище контролю ( $p < 0,001$ ).

Результати дослідження рівня ЦІК у сироватці крові щурів з ІІ показали, що в усі терміни спостереження цей показник перевищував значення в контрольній групі (рис. 9). Застосування

IgM was significantly higher vs. the control ( $p < 0.001$ ).

The results of study of CICs level in blood serum of IS rats showed this index as exceeding the value in the control group during the entire period of observation (Fig. 9). The use of Cerebrolysin for IS therapy caused a significant



**Рис. 5.** Кількість CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітин у щурів з ІІ та після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 5.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell number in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

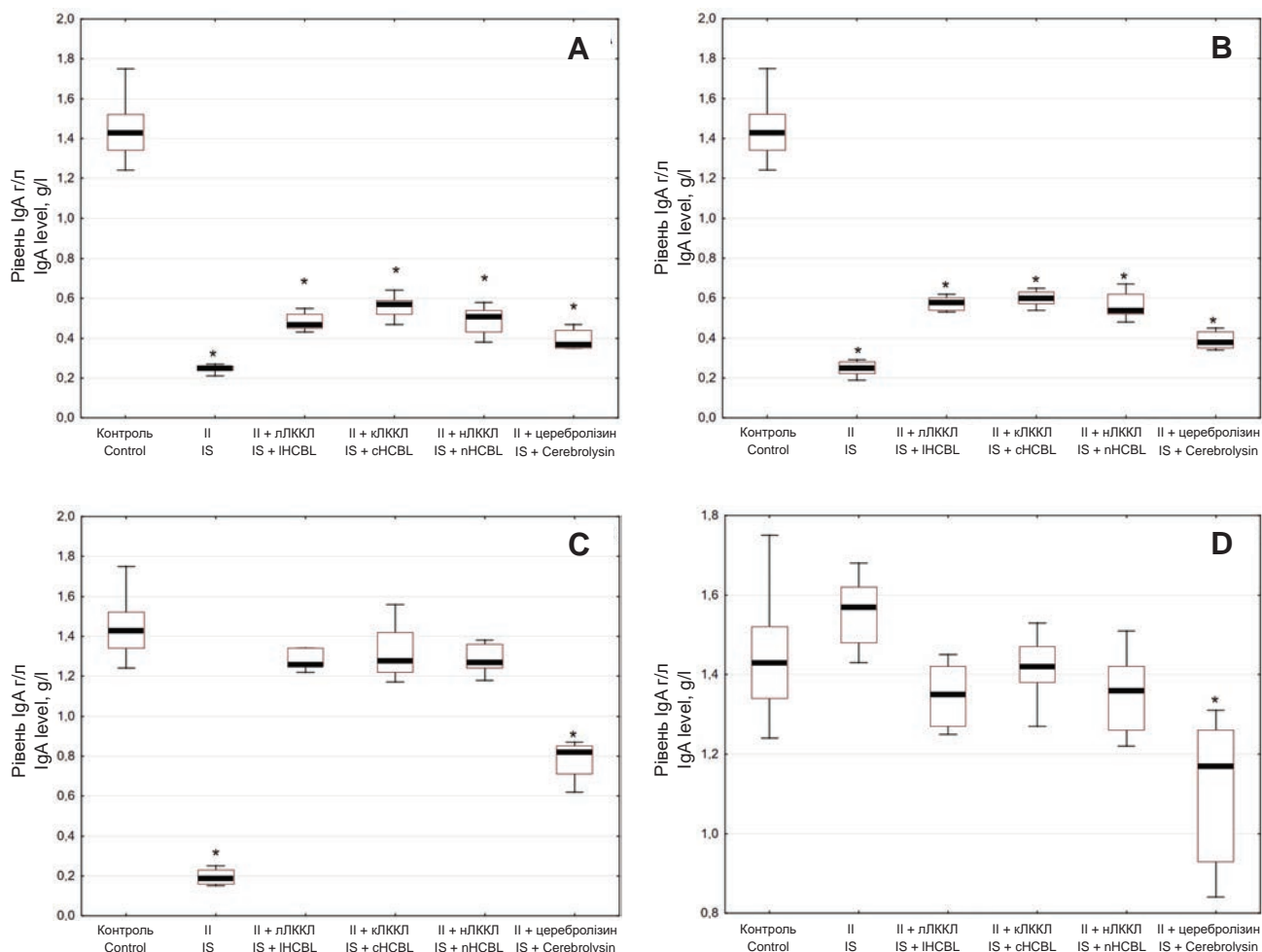
церебролізіну для лікування ІІ викликало значуще зниження вмісту ЦІК на 7-у добу, але на 28-у добу він перевищував значення контролю. У щурів, яких лікували введенням нЛККЛ, кЛККЛ, лЛККЛ (групи 3–5), на 7-у добу істотно знижувалися показники ЦІК у крові, а на 28-у добу вони наближалися до контролю (рис. 9). Факт зниження рівня ЦІК після лікування ЛККЛ може вказувати про стимуляцію виведення ЦІК із

decrease in CICs content to day 7, but it exceeded the control value to day 20. In the rats treated with the nHCBL, cHCBL, lHCBL (groups 3–5), the CICs indices in blood were significantly reduced to day 7 and approached the control to day 28 (Fig. 9). The fact of a decrease in CICs level after HCBL therapy may suggest the stimulation of CICs release from the body of IS animals by macrophage-phagocytic system.

організму тварини з ІІ макрофагально-фагоцитарною системою.

Ми припускаємо, що зниження концентрації імуноглобулінів у крові при ІІ може бути пов'язано з їхньою участю в формуванні ЦІК, рівень яких у крові за цих умов підвищується. Вірогідно, це є наслідком порушення функції гематоенцефалічного бар'єра, що призводить до

We assume that a decrease in immunoglobulins' concentration in blood during IS may be explained by their participation in CICs formation, the level of which in the blood increases under these conditions. This is likely due to the blood-brain barrier dysfunction, leading to appearance of autoantigens, through which the CICs are formed [15]. A decrease in CICs level in blood



**Рис. 6.** Показники рівня ІgА в сироватці крові у щурів з ІІ і після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні тамаксимальні значення.

**Fig. 6.** IgA level in blood serum of rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

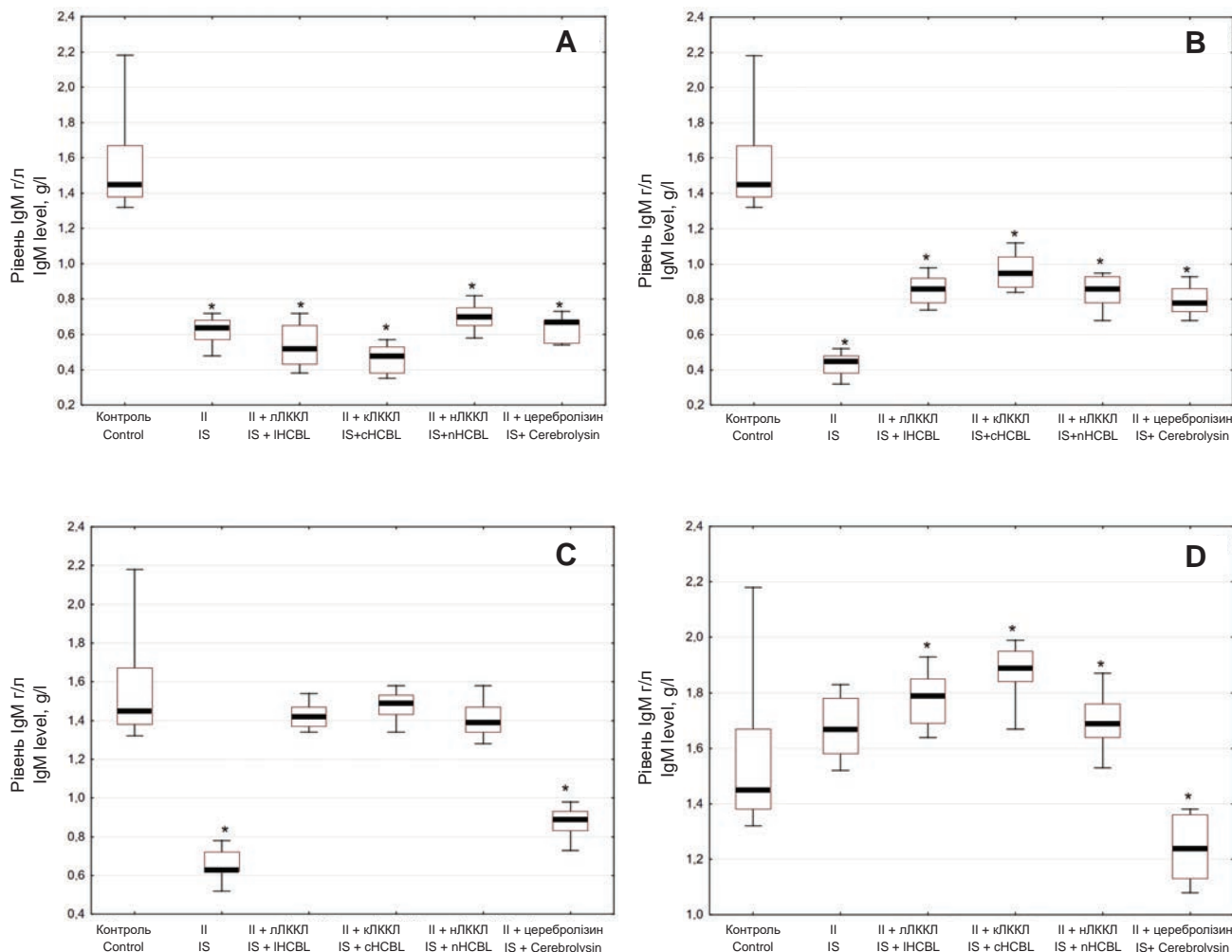
появи аутоантигенів, завдяки яким формуються ЦІК [21]. Зниження рівня ЦІК у крові лікованих тварин, окрім стимуляції функції макрофагально-фагоцитарної системи, може бути пов'язано з відновленням гематоенцефалічного бар'єра, що сприяє зменшенню рівня аутоан-

of treated animals, in addition to macrophage-phagocytic function stimulation, may be associated with the blood-brain barrier restoration, thereby contributing to the autoantigen level lowering and, in turn, increasing the immunoglobulin concentration in blood plasma.

тигенів та, в свою чергу, збільшує концентрацію імуноглобулінів у плазмі крові.

Таким чином, у роботі продемонстровано результати лікування тварин з ІІ введенням лЛККЛ або кЛККЛ, які свідчать про активацію резидент-

Thus, in this study, we have shown the treatment outcome in animals with IS, administered either with lHCBL or cHCBL, testifying to the activation of resident and pro-inflammatory cells, involved from the periphery (microglia and T-lymphocytes).



**Рис. 7.** Показники рівня ІgМ у сироватці крові щурів з ІІ та після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 7.** IgM level in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

них і залучених із периферії прозапальних клітин (мікроглія та Т-лімфоцити). Проведена терапія зменшувала ступінь імуносупресії, сприяла відновленню показників клітинної та гуморальної ланок імунітету.

Встановлено, що при ІІ у відповідь на пошкодження нервової тканини в крові підвищується рівень ЦІК, що викликає аутоімунні ускладнення

The implemented therapy mitigated the degree of immune suppression, contributed to restoration of cell and humoral immunity indices.

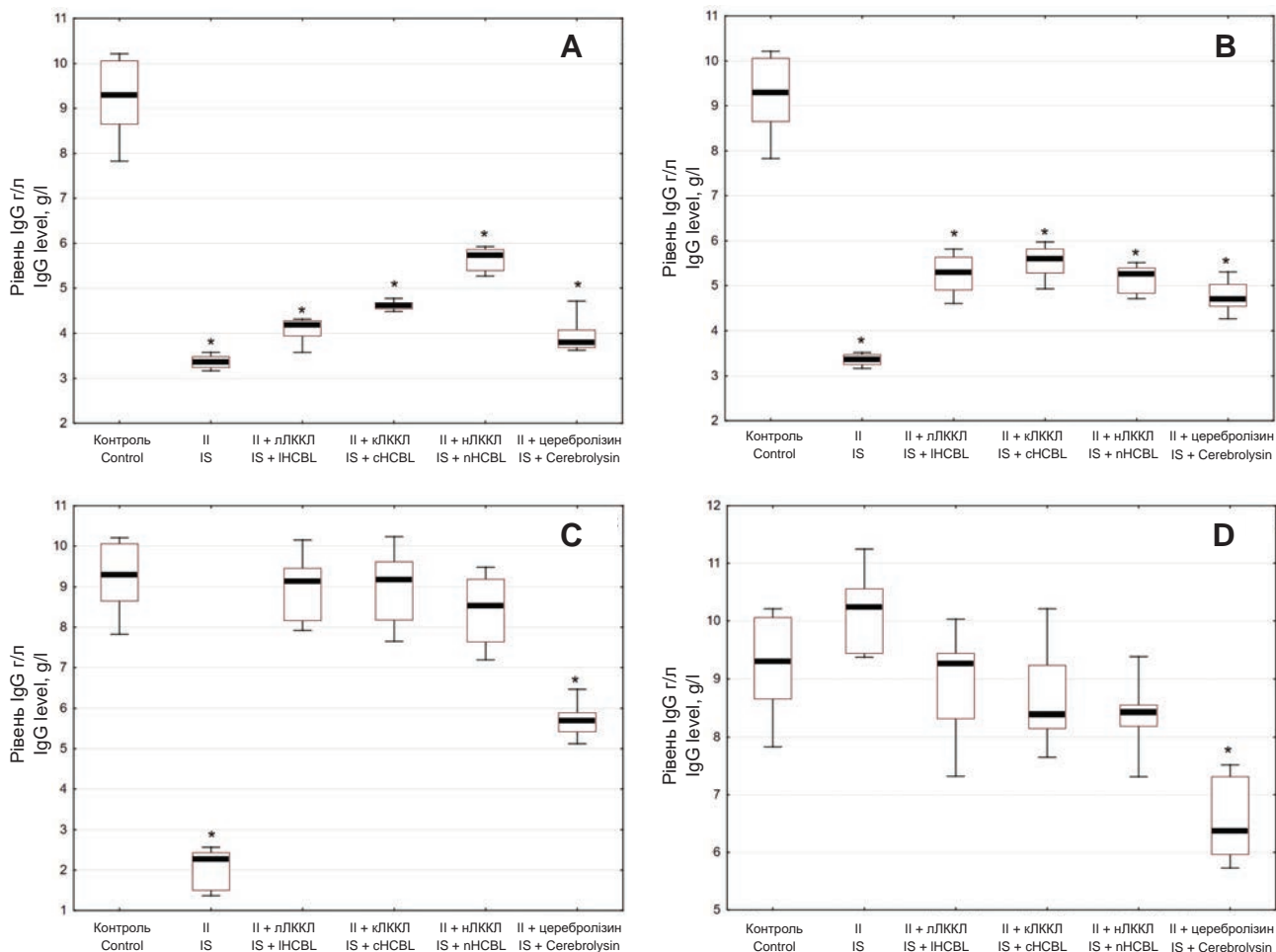
The CICs level was established to increase in blood during IS in response to nerve tissue damage, thereby inducing the autoimmune complications [22]. Administration of either lHCBL or cHCBL, as well as nHCBL to ani-

[23]. Введення тваринам лЛККЛ або кЛККЛ, як і нЛККЛ, сприяло зниженню активації гуморальної ланки імунітету.

Таким чином, на підставі отриманих експериментальних результатів можна рекомендувати використання як ліофілізованого, так і кріоконсервованого лейкоконцентрату кордової крові для

ensured a decrease in humoral immunity activation.

Thus, proceeding from our findings, both lyophilized and cryopreserved cord blood leukoconcentrates may be recommended to apply in clinical practice for ischemic stroke therapy.



**Рис. 8.** Показники рівня IgG у сироватці крові щурів з ІІ та після лікування на 1 (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75 та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 8.** IgG level in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* – as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75th and 25th quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

лікування ішемічного інсульту в клінічній практиці.

### Висновки

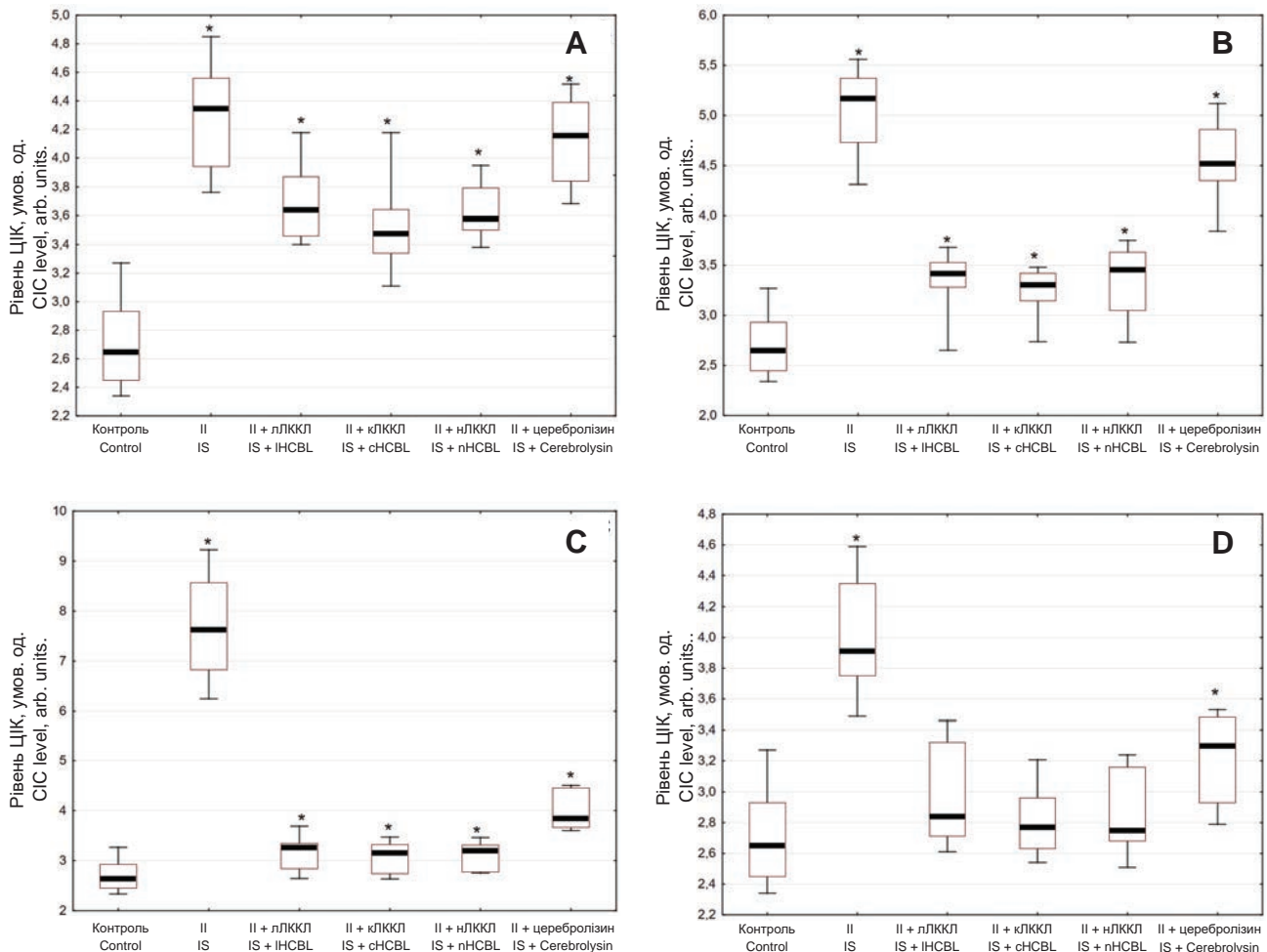
1. Встановлено рівнозначну імунокоригуючу дію ліофілізованого та кріоконсервованого лейкоконцентратів кордової крові у лікуванні ішемічного пошкодження головного мозку,

### Conclusions

1. An equivalent immune correcting effect of lyophilized and cryopreserved cord blood leukoconcentrates in ischemic stroke therapy, comparable with the effect of administered native HCBL, has been established.

2. Introduction of lyophilized and cryopreserved cord blood leukoconcentrates was proven to





**Рис. 9.** Вміст ЦІК у сироватці крові щурів з ІІ та після лікування на 1-у (А), 3 (В), 7 (С) і 28-у (D) доби спостереження: \* — порівняно з контролем;  $p < 0,05$ . Верхня і нижня стовпчиків відповідають 75- та 25-му квантилям відповідно; довжина стовпчика — міжквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика — медіана; планки похибки — мінімальні та максимальні значення.

**Fig. 9.** CIC level in rats with IS and after therapy to day 1 (A), 3 (B), 7 (C) and 28 (D) of observation: \* — as compared with the control;  $p < 0.05$ . The upper and lower limits of the columns correspond to the 75<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> quartiles, respectively; column length is an interquartile range; horizontal line of column is the median; error bars are the minimum and maximum values.

яка співставна з впливом уведення нативного ЛККЛ.

2. Доведено, що введення ліофілізованого і кріоконсервованого лейкоконцентратів кордової крові прискорюють одужання тварин з експериментальним ішемічним інсультом шляхом відновлення показників гуморальної та клітинної ланок імунітету.

## Література

1. Гольцев АН, Волина ВВ, Останков МВ, и др. Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядродержащих клеток лейкоконцентрата кордовой крови человека. Проблемы криобиологии. 2010; 20 (1): 66–72.
2. Гольцев АН, Калиниченко ТА. Пуловинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клини-

accelerate the recovery of animals with experimental ischemic stroke via restoring the indices of immune system humoral and cell components.

## References

1. Baccetto LS, Lehmann C. Microcirculatory changes in experimental models of stroke and CNS-injury induced immunodepression. [Internet] Int J Mol Sci. 2019 Oct 19 [cited 2020 June 15]; 20(20): E5184. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5184>.
2. Belderbos ME, Levy O, Meyaard L, Bont L. Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013; 24(2): 102–13.
3. Dhir N, Medhi B, Prakash A, et al. Pre-clinical to clinical translational failures and current status of clinical trials in



- ческого применения. Часть II. Иммунологическая характеристика. Проблемы криобиологии. 1998; (1): 3–24.
3. Гольцев АМ, Мосійчук ВВ, Гольцев КА, та ін. винахідники; Інститут Проблем криобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 117780U, 10.07.2017.
  4. 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): 114–19.
  5. Западнюк ИП, Западнюк ВИ, Захария ЕА, Западнюк БВ. Лабораторные животные. Киев: Вища школа; 1983. 252 с.
  6. Коваль АК, Луценко ЕД, Гриша ИГ, и др. Влияние лиофилизации на сохранность структурно-функциональных характеристик лейкоконцентрата кордовой крови человека. Проблемы криобіології і кріомедицини. 2019; 29 (4): 333–43.
  7. Коваль АК, Останков МВ, Бондарович НА, и др. Влияние криоконсервированной кордовой крови на функциональное состояние дендритных клеток кожи крысы с atopическим дерматитом. Проблемы криобіології і кріомедицини. 2018; 28 (2): 159.
  8. Лебединець ВВ, Останкова ЛВ, Бондарович МО, та ін. Ліофілізований лейкоконцентрат кордової крові людини в лікуванні ішемії головного мозку у щурів. Проблемы криобіології і кріомедицини. 2022; 32 (1): 44–57.
  9. Меньшиков ВВ. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Москва: Медицина, 1987. 368 с.
  10. Овселян ЛМ, Казарян ГС, Зангинян АВ, Захарян ГВ. Анализ уровня экспрессии генов Т-клеток и окислительные процессы при инсульте. Медицинская иммунология. 2019; 21 (2): 251–6.
  11. Пастер ЕУ, Овод ВВ, Позур ВК, Вихоть НЕ. Иммунология: Практикум. Київ: Вища школа; 1989. 304 с.
  12. Сапон НА, Никифорова АН. Влияние факторов доступности медицинской помощи на уровень смертности от инсульта. Український нейрохірургічний журнал. 2016; (2): 54–62.
  13. Серебренникова СН, Семинский ИЖ, Семенов НВ, Гузовская ЕВ. Интерлейкин-1, интерлейкин-10 в регуляции воспалительного процесса. Сибирский медицинский журнал. 2012; (8): 5–7.
  14. Хамитова АР, Рахимкулов АС, Борисова НА, Хужин ИУ. Анализ частоты сосудистых заболеваний головного мозга в Салаватском и Караидельском районах Башкортостана. Медицинский вестник Башкортостана. 2014; 9(6): 89–92.
  15. Цуцаева АО, Грищенко ВІ, Кудокоцева ОВ, та ін. винахідники; Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові. Патент України № 31847А, 15.12.2000.
  16. Vaccetto LS, Lehmann C. Microcirculatory changes in experimental models of stroke and CNS-injury induced immunodepression. [Internet] Int J Mol Sci. 2019 Oct 19 [cited 2020 June 15]; 20(20): E5184. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5184>.
  17. Belderbos ME, Levy O, Meyaard L, Bont L. Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013; 24(2):102–13.
  18. Dhir N, Medhi B, Prakash A, et al. Pre-clinical to clinical translational failures and current status of clinical trials in stroke therapy: a brief review. *Curr Neuropharmacol*. [Internet]. 2020 Jan 14 [cited 2020 June 15]; 18(1): 596–612. Available from: <http://www.eurekaselect.com/178306/article>.
  19. Harris DT, Badowski M, Ahmad N, Gaballa MA. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7(9): 1311–22.
  20. 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>.
  - stroke therapy: a brief review. *Curr Neuropharmacol*. [Internet]. 2020 Jan 14 [cited 2020 June 15]; 18(1): 596–612. Available from: <http://www.eurekaselect.com/178306/article>.
  4. 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.
  5. Goltsev AN, Kalinichenko TA. Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part II. Immunologic characteristics. *Problems of Cryobiology*. 1998; (1): 3–21.
  6. 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]. Ukrainian patent N 117780U, 2017 July 10. Ukrainian.
  7. Goltsev KA, Ostankov MV, Kozhina OYu, et al. Application of cryopreserved cord blood in combined therapy of acute purulent peritonitis. *Scientific Bulletins. Medicine. Pharmacy*. 2013; (18): 114–9.
  8. Harris DT, Badowski M, Ahmad N, Gaballa MA. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7(9): 1311–22.
  9. 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>.
  10. Khamitova AR, Rakhimkulov AS, Borisova NA, Khuzhin IU. [Analysis of the incidence of cerebrovascular diseases in Salavatsky and Karaidelsky district of Bashkortostan]. *Bashkortostan Medical Journal*. 2014; 9(6): 89–92. Russian.
  11. Koval AK, Lutsenko ED, Grisha IG, et al. Impact of lyophilisation on integrity of structural and functional characteristics of human cord blood leukoconcentrate. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29 (4): 333–43.
  12. Koval AK, Ostankov MV, Bondarovich NA, et al. Effect of cryopreserved cord blood on functional state of dendritic cells of rat skin with atopіc dermatitis. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28 (2): 159.
  13. Lebedinets VV, Ostankova LV, Bondarovich MO, et al. Lyophilized human cord blood leukoconcentrate in complex treatment of rat brain ischemia. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2022; 32 (1): 44–57.
  14. Menshikov VV [Laboratory methods for research in clinics]. Moscow: Meditsina, 1987. P. 123–5. Russian.
  15. Nian K, Harding IC, Herman IM, Ebong EE. Blood-brain barrier damage in ischemic stroke and its regulation by endothelial mechanotransduction. *Front Physiol*. 2020 Dec 22 [cited 2020 June 15]; 11: 605398. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.605398/full>
  16. Ovsepyan LM, Kazaryan GS, Zanginyan AV, Zakharyan GV. [Analysis of the expression level of T cell genes and oxidative processes in stroke]. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2019; 21 (2): 251–6. Russian.
  17. Paster EU, Gadfly BB, Pozur VK, Vikhot NE. [Immunology laboratory course]. Kyiv: Vyscha shkola; 1989. 304 p. Russian.
  18. Sapon N, Nikiforova A. [Correlation between access to health care and stroke mortality]. *Ukrainian Neurosurgical Journal*, 2016, (2): 54–62. Russian.
  19. Serebrennikova SN, Seminsky IZh, Semenov NV, Guzovskaya EV. [Interleukin-1, interleukin-10 in regulation of inflammatory process]. *Siberian Medical Journal*. 2012; (8): 5–7. Russian.
  20. Tarkowski E, Naver H, Wallin BG, et al. Lateralization of T-lymphocyte responses in patients with stroke. Effect of sympathetic dysfunction? *Stroke*. 1995; 26(1): 57–62.
  21. Tsutsaieva AO, Hryshchenko VI, Kudokotseva OV, et al. inventors; Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method for cryopreservation of hemopoietic cells of cord blood] Ukraine patent N 31847A, 2000 Dec. 15. Ukrainian.



21. Nian K, Harding IC, Herman IM, Ebong EE. Blood-brain barrier damage in ischemic stroke and its regulation by endothelial mechanotransduction. *Front Physiol.* 2020 Dec 22 [cited 2020 June 15]; 11: 605398. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.605398/full>
22. Tarkowski E, Naver H, Wallin BG, et al. Lateralization of T-lymphocyte responses in patients with stroke. Effect of sympathetic dysfunction? *Stroke.* 1995; 26(1): 57–62.
23. Tsygan NV, Trashkov AP, Litvinenko IV, et al. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? *Front Med.* 2019 Aug; [cited 2020 June 15]; 13(4): 420–6. Available from: <https://journal.hep.com.cn/fmd/EN/10.1007/s11684-019-0688-6>
24. Yoo J, Kim HS, Seo JJ, et al. Therapeutic effects of umbilical cord blood plasma in a rat model of acute ischemic stroke. *Oncotarget.* 2016; 7(48): 79131–40.
25. Zhao J, Chen N, Shen N, et al. Transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to treat a rat model of traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2012; 7(10): 741–8.
22. Tsygan NV, Trashkov AP, Litvinenko IV, et al. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? *Front Med.* 2019 Aug; [cited 2020 June 15]; 13(4): 420–6. Available from: <https://journal.hep.com.cn/fmd/EN/10.1007/s11684-019-0688-6>
23. Yoo J, Kim HS, Seo JJ, et al. Therapeutic effects of umbilical cord blood plasma in a rat model of acute ischemic stroke. *Oncotarget.* 2016; 7(48): 79131–40.
24. Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zakharia EA, Zapadnyuk BV. [Laboratory animals]. Kiev: Vyscha shkola, 1983. 252 p. Russian.
25. Zhao J, Chen N, Shen N, et al. Transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to treat a rat model of traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2012; 7(10): 741–8.