

УДК 615.361.018.8.013.014.41:616.831-005.1

А.Н. ГОЛЬЦЕВ\*, Д.В. ЛЕБЕДИНЕЦ, Е.А. ПОРОЖАН

**Влияние криоконсервированных клеток  
эмбрионального мозга на медиаторы воспаления  
при экспериментальном ишемическом инсульте**

UDC 615.361.018.8.013.014.41:616.831-005.1

A.N. GOLTSEV\*, D.V. LEBEDINETS, Ye. A. POROZHAN

**Influence of Cryopreserved Embryonic Brain Cells  
to Inflammation Mediators at Experimental Ischemic Insults**

Изучали содержание интерферона- $\gamma$  (ИФ- $\gamma$ ) и интерлейкина-10 (ИЛ-10), про- и противовоспалительных цитокинов в крови крыс с ишемическим инсультом (ИИ) и после лечения внутривенным введением криоконсервированных клеток эмбрионального мозга (КЭМ). На основании полученных данных сделан вывод, что для профилактики и лечения ИИ необходимо провести терапевтическую коррекцию, направленную на модуляцию воспалительного иммунного ответа организма на уровне экспрессии цитокинов.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, интерферон- $\gamma$ , интерлейкин-10, криоконсервированные клетки эмбрионального мозга.

Вивчали вміст інтерферону- $\gamma$  (ІФ- $\gamma$ ) і інтерлейкіну-10 (ІЛ-10), про- та протизапальних цитокинів у крові щурів з ішемічним інсультом і після лікування внутрішньовенним введенням криоконсервованих клітин ембріонального мозку. На основі отриманих даних зроблено висновок, що для профілактики і лікування ішемічного інсульту необхідно провести терапевтичну корекцію, спрямовану на модуляцію запальної імунної відповіді організму на рівні експресії цитокинів.

**Ключові слова:** ішемічний інсульт, інтерферон- $\gamma$ , інтерлейкін-10, криоконсервовані клітини ембріонального мозку.

Contents of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-10, pro- and anti-inflammatory cytokines in blood rats with an ischemic insults (II) and after treatment by intravenous injection of cryopreserved embryonic brain cells (CEBC) were studied. On the basis of the received data it is concluded, that for preventive maintenance and treatment of II it is necessary to carry out the therapeutic correction directed to modulation of inflammatory immune response of an organism at cytokine expression level.

**Key-words:** ischemic insult, interferon- $\gamma$ , interleukin-10, cryopreserved embryonic brain cells.

Острое нарушение мозгового кровообращения приводит к развитию стойкого очагового неврологического дефицита [8]. Частыми причинами ишемических инсультов (ИИ) являются врожденные пороки сердца, ревматические пороки, бактериальные эндокардиты, а также аномалии сонных, позвоночных, подключичных артерий (перегиб, дисплазия, патологическая извитость). На развитие заболевания влияют неспецифические церебральные васкулиты, наблюдаемые у пациентов с аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка, узелковый периартериит) [1].

В последние годы было установлено, что лечение ИИ целесообразно проводить клетками эмбрионального мозга (КЭМ) в режиме “скорой помощи”, для обеспечения которого необходим

низкотемпературный банк, позволяющий длительно сохранять КЭМ в жизнеспособном состоянии [2].

После окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) лабораторным животным (мышам и крысам) в место повреждения тканей головного мозга или в кровоток вводили: нейроны головного мозга плода [12], клетки пуповинной крови [15], мезенхимальные стволовые клетки (МСК), дифференцированные *in vitro* в нейрональном направлении [13], а также недифференцированные сингенные или ксеногенные МСК как нативные [11], так и криоконсервированные [10]. При этом во всех исследованиях была получена положительная динамика восстановления мозговых структур и (или) поведенческого и неврологического статуса животных.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-57-91, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373  
5791, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Несмотря на имеющиеся в литературе сведения о развитии и лечении ИИ, лишь в немногочисленных исследованиях отмечается роль иммунологического процесса и феномена локального воспаления в патогенезе острого периода ИИ [1, 6]. Недостаточно изучена роль про- и противовоспалительных цитокинов при цереброваскулярной патологии. Особую актуальность приобретает иммунологический мониторинг в первые часы и дни ИИ, который позволяет судить о тяжести поражения, прогнозировать дальнейшее течение и исход инсульта. Не выяснены механизмы межклеточного взаимодействия контактного типа в периферической крови в формировании инфаркта мозга. Не разработана эффективная иммуномодулирующая терапия, которая может обеспечить снижение летальности, инвалидизации, улучшение качества жизни пациентов и направленная на уменьшение выраженности локальной воспалительной реакции, аутоиммунной агрессии. Все это свидетельствует об актуальности проводимого экспериментального исследования.

Цель работы – изучение содержания про- и противовоспалительных цитокинов, С-реактивного белка в динамике острого периода ИИ и после его лечения криоконсервированными КЭМ.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 26 шестимесячных крысах-самцах линии Вистар, массой 180–200 г. ИИ был смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) в левом полушарии общепринятым способом [5]. Крыс наркотизировали кетамин (125 мг/кг) интраперитонеально. Суспензию КЭМ получали в стерильных условиях путем гомогенизации мягких тканей мозга плодов (11 суток гестации) крыс после декапитации их под легким эфирным наркозом. Криоконсервировали КЭМ на программном замораживателе УООП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) под защитой криопротектора ДМСО 10%-й концентрации по методу [2], отогревали на водяной бане при 41 °С. Вводили криоконсервированные (кКЭМ) или нативные КЭМ (нКЭМ) внутривенно по 0,5 мл ( $8 \times 10^6$  клеток) через 6 ч после СМАо. Животные были разделены на 4 группы: 1 – интактные (n=5); 2 – с ИИ (n=7); 3 – с ИИ + введение кКЭМ (n=7); 4 – с ИИ + введение нКЭМ (n=7). Иммунологическое исследование проводили в крови крыс методом проточной цитофлуориметрии, используя моноклональные антитела Mouse Anti-Rat IFN- $\gamma$ , IL-10 (BD, США). Определяли концентрацию С-реактивного белка (С-РБ) [6]. Все животные были декапитированы под легким эфирным наркозом на 1, 3 и 7-е сутки после инициации ИИ и лечения.

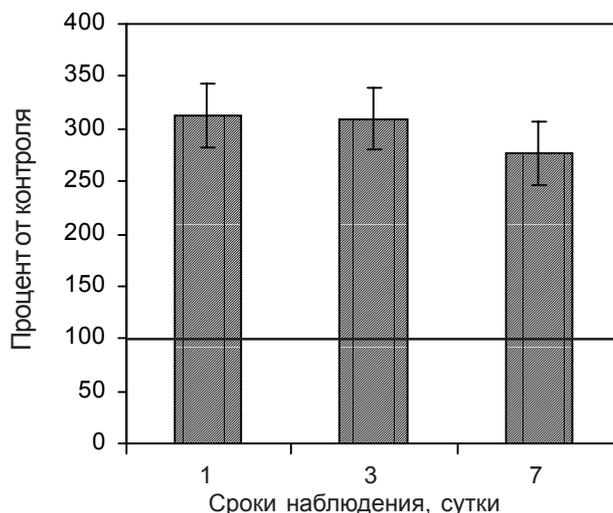


Рис.1. Динамика содержания провоспалительного цитокина ИФ- $\gamma$  в крови крыс с ИИ: ▨ – ИФ- $\gamma$ ; — – контроль.

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрическим методом Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

Изучение иммунологических показателей в остром периоде ИИ позволило выявить достоверное ( $p < 0,001$ ) повышение количества клеток с рецептором к ИФ- $\gamma$  в 1-е сутки по сравнению с контрольной группой. Определение их концентрации в динамике ИИ показало незначительное снижение уровня данного цитокина к 7-м суткам (рис. 1), что, вероятно, свидетельствует о его пусковой роли в инициации воспалительного процесса.

Высокий уровень клеток крови с рецептором к ИФ- $\gamma$  в остром периоде ИИ, вероятно, способствует прогрессированию атерогенеза и развитию хронической ишемизации головного мозга с формированием энцефалопатии.

Вместе с тем результаты экспериментальных исследований позволяют предположить, что прогрессирование повреждения зоны пенумбры может происходить не только под влиянием абсолютного увеличения концентрации провоспалительных цитокинов, но и вследствие недостатка противовоспалительных цитокинов.

Определение содержания клеток с рецептором к ИЛ-10 в крови выявило значительную вариабельность их концентрации в 1-е сутки ИИ, что, вероятно, отражает полиморфизм состояния иммунологической реактивности организма животного по отношению к патологическому процессу. По результатам исследования все животные были поделены на 2 группы (рис. 2). У крыс I группы содержание ИЛ-10 было ниже контрольных зна-

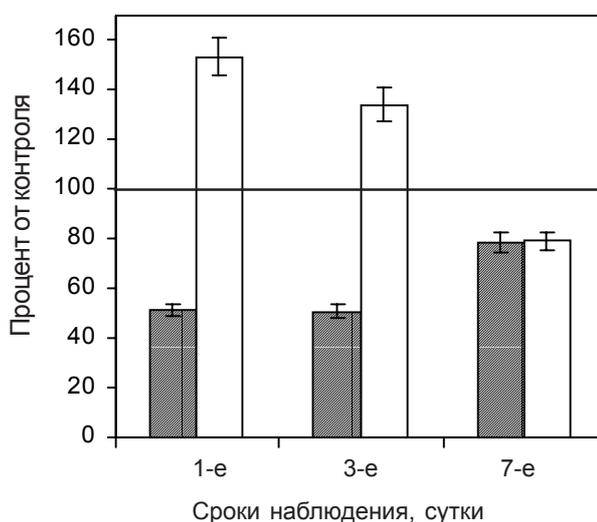
чений. Для II группы характерно увеличение этого показателя уже в 1-е сутки (рис. 2).

У всех животных отмечалось повышение ИЛ-10 в крови лишь к концу острого периода ИИ, тогда как увеличение концентрации ИФ- $\gamma$  – уже в первые часы заболевания. Такое различие, по-видимому, отражает особенности их активации в ответ на острую фокальную ишемию. Анализ полученных результатов свидетельствует о значимости высокого уровня провоспалительных и дефицита противовоспалительных цитокинов в развитии иммунной воспалительной реакции в очаге ишемии и в дополнительном повреждении ткани головного мозга.

Ретроспективное изучение зависимости иммунологических показателей от исхода ИИ и степени восстановления нарушенных неврологических функций к концу острого периода позволило установить прогностическую значимость их величин как в 1-е сутки, так и в динамике заболевания до 7-х суток.

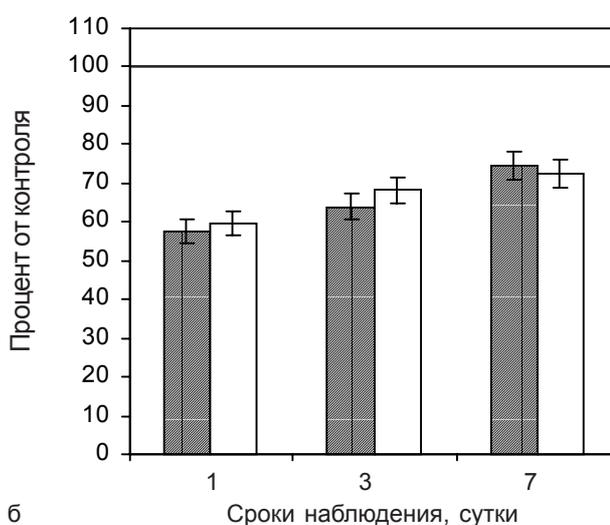
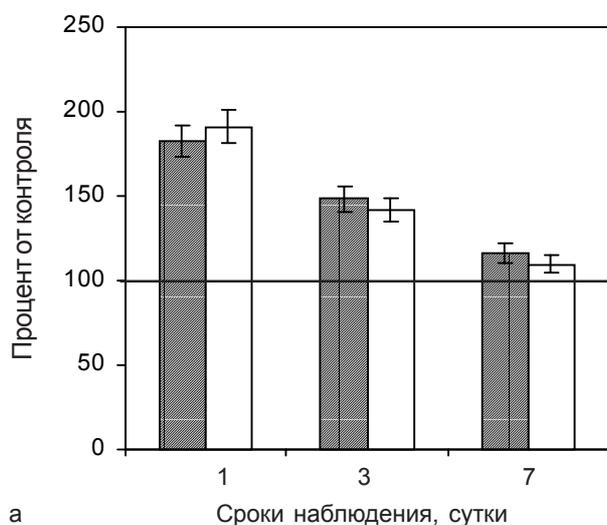
Доказательством развития воспалительного процесса в 1-е сутки ИИ явилось обнаружение положительных результатов при исследовании С-РБ в сыворотке крови (от + до ++). Исследование, проведенное на 7-е сутки ИИ, также выявило положительный результат (+).

Острота патологического процесса и развитие локального воспаления в зоне ишемии подтверждается палочкоядерным сдвигом ( $12,5 \pm 3,25\%$ ) нейтрофилов на фоне нормального уровня лейкоцитов ( $4,5 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ ). Такое увеличение содержания палочкоядерных форм в 1-е сутки, вероятно, отражает не только иммунное воспаление, но и реакцию организма на стрессовую ситуацию, показывая остроту развития патологического процесса. Была установлена положительная корреляция между час-



**Рис. 2.** Динамика содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в крови крыс с ИИ: ▨ – I группа; □ – II группа; — — контроль.

тотой повышения уровня ИФ- $\gamma$  и палочкоядерными нейтрофилами ( $r = 0,51 \pm 0,09$ ), с одной стороны, и ИФ- $\gamma$  и С-РБ ( $r = 1,0$ ), с другой, то есть при сопоставлении полученных результатов была обнаружена прямая положительная связь между показателями воспалительных реакций. Вместе с тем концентрация ИЛ-10 имела отрицательную корреляцию с содержанием С-РБ ( $r = 0,51$ ), что свидетельствует об интенсивности воспалительного ответа на фоне недостатка факторов защиты мозга. На основании полученных данных было показано, что отсутствие клеток с рецептором к ИЛ-10 в крови или низкое их содержание в динамике ИИ позволяют прогнозировать неблагоприятное течение инсульта с летальным исходом. Проведенное исследование продемонстрировало значимость дефицита противовоспалительных цитокинов в патогенезе ИИ и формировании инфарктных изменений.



**Рис. 3.** Содержание провоспалительного – ИФ- $\gamma$  (а) и противовоспалительного ИЛ-10 (б) цитокинов в крови крыс после лечения: ▨ – нКЭМ; □ – кКЭМ; — — контроль.

У крыс, которым были введены кКЭМ, в той же степени как и нативные, наблюдали снижение реакции локального воспаления, о чем свидетельствовало уменьшение клеток с рецептором к ИФ- $\gamma$  и повышение к ИЛ-10 на 7-е сутки (рис. 3).

Вероятно, КЭМ синтезируют вещества, активирующие процессы регенерации, в результате чего появляются новые кровеносные сосуды и нервные клетки в месте возникновения инсульта, что способствует восстановлению функций головного мозга и устраняет неврологические симптомы болезни [4].

При исследовании С-РБ у всех крыс после лечения как криоконсервированными, так и нативными КЭМ, была выявлена его слабо положительная реакция только на 7-е сутки.

Проведенное исследование выявило взаимосвязь между различными маркерами иммунного воспаления и их ролью в патогенезе острой фокальной ишемии головного мозга. ИФ- $\gamma$ , являясь главным раннедействующим медиатором первичного иммунного ответа на антиген, активирует иммунную реакцию и, регулируя функцию Т- и В-лимфоцитов, запускает аутоиммунную реакцию. Как было установлено нами ранее [7], концентрация общих Т-лимфоцитов снижалась уже на 1-е сутки, а к 7-м суткам эти изменения были значительными. Такая же закономерность наблюдалась и при исследовании субпопуляции  $T_x$  и  $T_c$ , что приводило к существенному увеличению иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Данные изменения свидетельствуют о выраженном дисрегуляторном сдвиге тех клеток, которые участвуют в реализации иммуновоспалительной реакции.

## Выводы

В остром периоде ИИ определяется цитокиновый дисбаланс, причем соотношение про- и противовоспалительных цитокинов зависит от степени тяжести заболевания: чем выше уровень про- и ниже противовоспалительных цитокинов, тем тяжелее клинические проявления за счет локального воспаления. Снижение провоспалительных цитокинов к концу острого периода инсульта может свидетельствовать об их пусковой роли в развитии иммунного ответа.

Проведенное исследование показало, что введение кКЭМ, как и нКЭМ, устраняет дисбаланс цитокинов вследствие достоверного уменьшения уровня индукторов воспаления, повышения содержания противовоспалительных и уменьшения провоспалительных цитокинов, что приводит к угнетению локальной воспалительной реакции на 7-е сутки.

## Литература

1. Герасимова М.М., Чичановская Л.В., Слезкина Л.А. Клинико-иммунологические аспекты влияния фенотропила на последствия церебрального инсульта // Журн. неврологии и психиатрии.– 2005.– Т.5.– С.63–64.
2. Гольцев А.М., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1.– С. 46–50.
3. Жданов Г.Н. О связи течения ишемического инсульта головного мозга с содержанием интерлейкина-10 в сыворотке крови больных // Иммунология.– 2006.– №1.– С. 48–49.
4. Жданов Г.Н., Герасимова М.М. Оценка роли аутоиммунной воспалительной реакции в церебральной ишемии // Невролог. вестник им. Бехтерева.– Казань.– 2003.– Т.35, вып.3-4.– С. 13–17.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные.– Киев: Вища школа, 1983.– 252 с.
6. Иммунология. Практикум /Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть.– Киев: Вища школа, 1989.– 304 с.
7. Лебединец Д.В., Гольцев А.Н. Криоконсервированные эмбриональные нервные клетки в терапии острого периода ишемического инсульта // Пробл. криобиологии.– 2008.– Т. 18, №1.– С. 27–33.
8. Федин А.И. Современная концепция патогенеза и лечения острой ишемии мозга: Материалы научно-практической конференции «Лечение ишемии мозга».– М., 2001.– С. 5–23.
9. Цимбалюк В.І., Бровченко М.С. Порушення цитокинового статусу у хворих з наслідками ішемічного інсульту в різні періоди реабілітації // Укр. мед. часопис.– 2006.– Т. 53, №3.– С. 141–144.
10. Borlongan C.V., Tajima Y., Trojanowski J.Q et al. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats // Exp. Neurol.– 1999.– Vol. 152, N2.– P. 231–240.
11. Chen J., Zhang Z.G., Li Y. et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats // Circ. Res.– 2003.– Vol. 92, N6.– P. 579–582.
12. Jeong S.W., Chu K., Jung K.H. et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage // Stroke.– 2003.– Vol. 34, N9.– P. 2258–2263.
13. Kang S.K., Lee D.H., Bae Y.C. et al. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats // Exp. Neurol.– 2003.– Vol. 183, N2.– P. 355–366.
14. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // Neurology.– 2001.– Vol. 56, N6.– P. 821–822.
15. Willing A.E., Lixian J., Milliken M. et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke // J. Neurosci. Res.– 2003.– Vol. 73, N3.– P. 296–307.

Поступила 21.07.2008