

Криоконсервированные эмбриональные нервные клетки в терапии острого периода ишемического инсульта

UDC 615.361.018.8.013.014.41:616.831-005.1

D.V. LEBEDINETS, A.N. GOLTSEV*

Cryopreserved Embryonic Nerve Cells in Therapy of Ischemic Insult Acute Period

Понимание основных механизмов трансформации обратимых гемодинамических, клеточных и молекулярных изменений, манифестируемых стойким очаговым морфологическим дефектом – инфарктом мозга [5, 6, 11, 12, 13], является основным этапом исследования процессов повреждения ткани мозга при острой церебральной ишемии (ишемический инсульт – ИИ). Установлено, что в патогенезе острого периода ИИ наряду с глутамат-кальциевым каскадом и феноменом эксайтотоксичности важную роль играют иммунологические механизмы [6, 7, 12]. Указанные биохимические процессы запускают механизмы вторичного повреждения, среди которых наиболее важными являются реакции локального воспаления, создающие базу аутоиммунной агрессии [7]. Несмотря на обширный клинический и экспериментальный материал [3, 5-7, 12, 14, 16, 17], в литературе упоминаются лишь единичные исследования, посвященные роли иммуновоспалительного процесса острого периода в патогенезе ИИ [7, 9, 14]. В свете новых диагностических технологий открывается перспектива изучения иммунологических критериев идентификации и дифференциальной диагностики ишемического инсульта [7, 9, 12, 14]. Это позволит повысить эффективность практически отсутствующей иммуномодулирующей терапии, направленной на уменьшение реакции локального воспаления и минимизации аутоиммунной агрессии, снизить степень инвалидности и летальность, улучшить качество жизни пациентов. Следовательно, приведенные выше факты свидетельствуют об актуальности такого рода исследований.

Цель работы – изучение иммунологических аспектов ишемического инсульта и обоснование возможности проведения иммуномодулирующей терапии введением криоконсервированных эмбриональных нервных клеток.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-57-98, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Research of brain tissue damage processes under acute cerebral ischemia (ischemic insult: II) was marked by a new stage of understanding the main transformation mechanisms of reversible hemodynamic, cell and molecular changes, manifesting in a resistant focal morphological defect: brain infarct [5, 6, 11, 12, 13]. Immunological mechanisms along with glutamate-calcium cascade and excitotoxicity phenomenon were established to play an important role in the II acute period pathogenesis [6, 7, 12]. The mentioned biochemical processes trigger the secondary damage mechanisms, among which the most important are the local inflammation responses, creating the base for autoimmune aggression [7]. In spite of a huge clinical and experimental material [3, 5-7, 12, 14, 16, 17] there are reported only single researches, covering the role of immune inflammatory process of acute period in II pathogenesis [7, 9, 14]. In the light of new diagnostic technologies the perspective of studying the immunological criteria of identification and differential diagnostic of ischemic insult is getting open [7, 9, 12, 14]. In its turn, this will enable to enhance the efficiency of practically absent immune modulating therapy, oriented to a decrease in local inflammatory response and minimisation of autoimmune aggression, that as a result will enable to reduce the disability degree and lethality, to improve life quality in patients. So, the mentioned above data testify to the actuality of such kind of research.

This research was aimed to study the immunological aspects of ischemic insult and substantiation of possible immune modulating therapy performance by introducing cryopreserved embryonic nerve cells.

Materials and methods

Experiments were carried-out in 180-200 g⁷ Wistar male rats (n=50) of 4-5 months old. Brain ischemic insult was experimentally modelled by medial cerebral

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 5789, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 50 4–5-месячных крысах-самцах линии Вистар, массой 180–200 г. Экспериментально ишемический инсульт головного мозга был смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) в левом полушарии общепринятым способом [8]. Этот метод позволяет получить стандартное повреждение, которое распространяется на неокортекс. Крыс наркотизировали кетамин (125 мг/кг) интраперитонеально. Во время операции и до выхода из наркоза температуру тела животных поддерживали на уровне 37°C. Операционную рану послойно ушивали.

Суспензию эмбриональных нервных клеток (ЭНК) получали после декапитации в стерильных условиях путем гомогенизации мягких тканей мозга плодов крыс 15 суток гестации. ЭНК криоконсервировали на программном замораживателе УОП-6 СКТБ и ОП ИПКиК НАНУ под защитой криопротектора ДМСО в 10%-й концентрации по методу [4]. Оттаивание – при 41°C на водяной бане. Введение криоконсервированных ЭНК (кЭНК) или нативных ЭНК (нЭНК – контроль) осуществляли в хвостовую вену крыс через 6 ч после СМАо. Всех животных разделили на 4 группы: 1 – интактные (n = 5); 2 – ИИ (n = 15); 3 – ИИ + введение кЭНК (n = 15); 4 – ИИ + введение нЭНК (n = 15). Всех животных декапитировали под легким эфирным наркозом на 1-, 3- и 7-е сутки после инициации ИИ и лечения.

Иммунный статус (ИС) оценивали по следующим критериям: определение общего количества Т-лимфоцитов (CD3), Т-хелперов (CD4) и Т-супрессоров (CD8) (T_h и T_s), естественных киллеров – ЕК (CD16) и В-лимфоцитов (CD72) в селезенке крыс с помощью метода прямой мембранной иммунофлуоресценции [15] на цитометре (FACS Calibur), используя соответствующие антикрысиние ФИТЦ – меченные моноклональные антитела (МАТ) (BD, США) к CD3-, CD4-, CD8-, CD16- и CD72-структурам; определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови животных по методу [13]; определение количества клеток в перитонеальной полости (ПП) и их способность к адгезии по методу [10]; определение фагоцитарной активности клеток ПП методом [1]. Эти методы позволяют судить о функциональном состоянии системы мононуклеарных фагоцитов (МФС) организма. Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом статистического анализа (t-критерий Стьюдента) или непараметрическим методом Манна-Уитни. В качестве критерия статистической достоверности различий принимали уровень 95% ($p < 0,05$) [2].

artery occlusion (MCAo) in left hemisphere according to the standard method [8]. This method enables to obtain quite a standard damage, spreading over neocortex. Rats were intraperitoneally narcotised with ketamine (125 mg/kg). During operation and prior to anesthesia recovery the animal body temperature was maintained at 37°C. Operational wound was sutured layer by layer.

Embryonic nerve cells (ENCs) suspension was derived under sterile conditions by homogenising brain soft tissues of 15 gestation days' rat fetuses after decapitation. ENCs were cryopreserved with UOP-6 programmed freezer (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) under 10% DMSO protection as reported in the paper [4]. Thawing was done at 41°C on water bath. Introduction of either cryopreserved embryonic nerve cells (cENCs) or native (nENCs – control) ones was realised into a rat's caudal vein 6 hours after MCAo. All animals were divided into 4 groups: the 1st group comprised the intact ones, n=5; in the 2nd were animals with II, n=15; the 3rd one consisted of those with II + cENCs introduction, n=15; in the 4th were those with II + nENCs introduction, n=15. All animals were decapitated under light ether narcosis after II initiation and treatment to the 1st, 3rd, 7th days.

Immune status (IS) was assessed according to the following criteria: determination of total number of T lymphocytes (CD3), T-helpers (CD4) and T-suppressors (CD8) (T_h and T_s); natural killers (NK) (CD16) and B lymphocytes (CD72) in rat spleen by the method of a direct membrane immune fluorescence [15] with cytometer (FACS Calibur), using the corresponding anti-rat FITS-labelled monoclonal antibodies (MAB) (BD, USA) to CD3, CD4, CD8, CD16 and CD72 structures. Circulating immune complexes (CIC) in animal blood serum were determined by the method [13]. Number of cells in peritoneal cavity (PC) and their capability to adhere were detected by the method reported in the paper [10]. Phagocyte activity of PC cells was determined using the method [1]. These methods enable the judging about a functional state of mononuclear phagocyte system (MPS) of an organism.

The results obtained were statistically processed either with parametric method of statistical analysis (Student t-criterion) or Mann-Whitney's non-parametric one. The level of 95% ($p < 0.05$) was admitted as the criterion of statistical significance of differences.

Results and discussion

In the II pathogenesis an important role belongs to the local inflammation responses. The very they, by manifesting in the certain form and different extent,

Результаты и обсуждение

В патогенезе ИИ важную роль играют реакции локального воспаления. Именно они, манифестируясь в определенной форме и разной степени, являются пусковым механизмом присоединяющихся в дальнейшем аутоиммунных реакций *in situ*. Полученные нами результаты действительно свидетельствуют о том, что после индукции ИИ наблюдается развитие дисфункционального состояния клеточного и гуморального звена иммунитета, а также системы мононуклеарных фагоцитов. Наиболее выраженным изменением в гуморальном звене иммунной системы (ИС) было повышение содержания ЦИК уже с 1-х суток индукции ИИ, которое к 7-м суткам существенно увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 1). После введения кЭНК или нЭНК показатели содержания ЦИК были увеличенными во все сроки наблюдения, превышая контрольные значения, но были значительно ниже при сравнении с показателями у животных I группы (рис. 1). Данный факт свидетельствует о том, что введенный биоматериал уже с 1-х суток исследования способствовал выведению ЦИК из организма.

Рассматривая участие МФС, которая, как известно, реализует важную функцию организма – выведение патогенных веществ, формируемых в процессе развития патологии и, в частности ЦИК, было показано, что локальное воспаление мозга при ИИ распространяется на весь организм, вовлекая и клетки ПП. В ней процент фагоцитирующих клеток (ФИ) и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) снижались уже на 1-е сутки

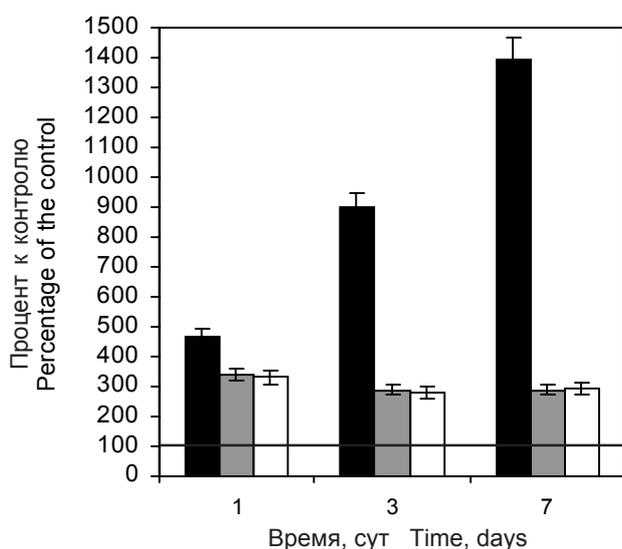


Рис. 1. Показатели содержания ЦИК в сыворотке крови крыс с ИИ до и после лечения. ■ – ИИ; ■ – ИИ+кЭНК; □ – ИИ+нЭНК; — – контроль.

Fig. 1. Indices of CIC content in blood serum of rats with II prior to and after treatment. ■ – II; ■ – II+cENCs; □ – II+nENCs; — – control.

are the trigger mechanism of joining later autoimmune responses *in situ*. Our results really testify to the fact that after II induction there is observed the development of dysfunctional state of cell and humoral immunity link, as well as mononuclear phagocyte system. The most manifested change in humoral link of immune system was an increase in CIC content even from the 1st day of II induction, which considerably increased to the 7th day compared to the control (Fig. 1). After cENCs or nENCs introduction the indices of CIC content were increased within the all observation terms, by exceeding the control values, but remaining significantly lower than the indices in the 1st group's animals (Fig. 1). This fact testifies that the introduced biomaterial even from the 1st day of observation contributed to CIC removal from an organism.

By considering the participation of mononuclear phagocyte system (MPC), which is known as realising an important organism function: release of pathogenic substances, being formed within pathology development and, particularly CIC, it was demonstrated that a local brain inflammation at II was spread onto the whole organism, involving PC cells, as well. The number of phagocytizing cells (PI) and phagocytosis completion index (PCI) reduced in it even to the 1st day of II development, and to the 7th day they were almost twice lower compared to the control. However an absorption activity of each phagocyte (PI) within the whole observation terms remained almost unchanged (Fig. 2). Even if a functional activity of PC cells after either cENC or nENCs introduction was slightly lower than the control, it significantly exceeded that in animals of the 1st group, especially to the 7th day (Fig. 2).

Immune inflammatory processes are known as realising under interaction of all links of immune system (IS), involving other system of an organism (in this case vessel epithelium). Adhesion molecules (VCAM, ICAM, LFA etc.) participate in this process [17]. Both the expression degree of these molecules and expressing them cell number are determined by the character of cytokine profile of an organism, dependent on the development degree of this process and on therapy performed. Thus, under II development there is a decrease in a number and adhesion degree of PC cells, that is especially manifested to the 3rd day. The introduction of either cENCs or nENCs recovered this function to the 3rd day but exceeded the control values to the 7th day (Fig. 3).

MPC cells, being the one of leading factors in realising the immune inflammatory process, are known to predict the function of both humoral and cell IS links. A change in MPC functional activity and indices of humoral links at II involve the changes in cell link. This fact was traced when studying the phenotype characteristics of the principal populations of IS cell link. The concentration of general T-lymphocyte was established

развития ИИ, а к 7-м суткам почти вдвое по сравнению с контролем. Однако поглотительная активность каждого фагоцита (ФЧ) во все сроки наблюдения почти не изменялась (рис. 2). Функциональная активность клеток ПП после введения кЭНК или нЭНК была несколько ниже контроля, однако значительно превышала таковую у животных 1 группы, особенно на 7-е сутки (рис. 2).

Известно, что иммунновоспалительные процессы реализуются при взаимодействии всех звеньев ИС, вовлекая другие системы организма (в данном случае эпителий сосудов мозга). В этом процессе принимают участие молекулы адгезии (VCAM, ICAM, LFA и др.) [17]. Экспрессия этих молекул, как и количество клеток их экспрессирующих, определяется характером цитокинового профиля организма, который зависит от степени развития данного процесса и от проводимой терапии. Так, при развитии ИИ уменьшается количество клеток в ПП и снижается степень их адгезии, что особенно проявляется на 3-е сутки. Введенные кЭНК или нЭНК восстанавливали данную функцию на 3-е сутки, а к 7-м – превышали контрольные значения (рис. 3).

Известно, что клетки МФС, являясь одним из ведущих факторов в реализации иммунновоспалительного процесса, определяют функцию как гуморального, так и клеточного звена ИС. Изменения функциональной активности МФС и показателей гуморального звена при ИИ влекут за собой нарушения состояния клеточного звена. Этот факт был прослежен при исследовании фенотипических

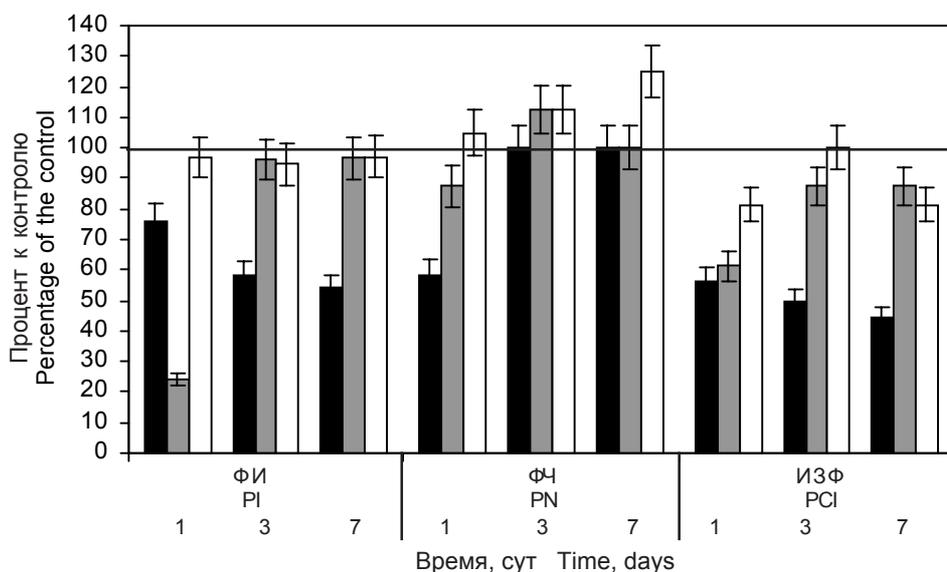


Рис. 2. Показатели фагоцитарной активности клеток ПП с ИИ до и после лечения. ■ – ИИ; ▒ – ИИ+ кЭНК; □ – ИИ+нЭНК; — – контроль.

Fig. 2. Indices of phagocyte activity of PC cells in rats with II prior to and after treatment. ■ – II; ▒ – II+cENCs; □ – II+nENCs; — – control.

to reduce even to the 1st day but to the 7th one these changes were significant. The same regularity was observed when studying the sub-populations T_h and T_s as well, that resulted to a considerable increase in immune regulatory index (IRI). These changes testify to a manifested dysregulatory shift of these cells, participating in realisation of immune inflammatory response. The NK number to the 1st day was significantly increased by reducing to the 3rd and especially 7th day. Such NK activation may be related

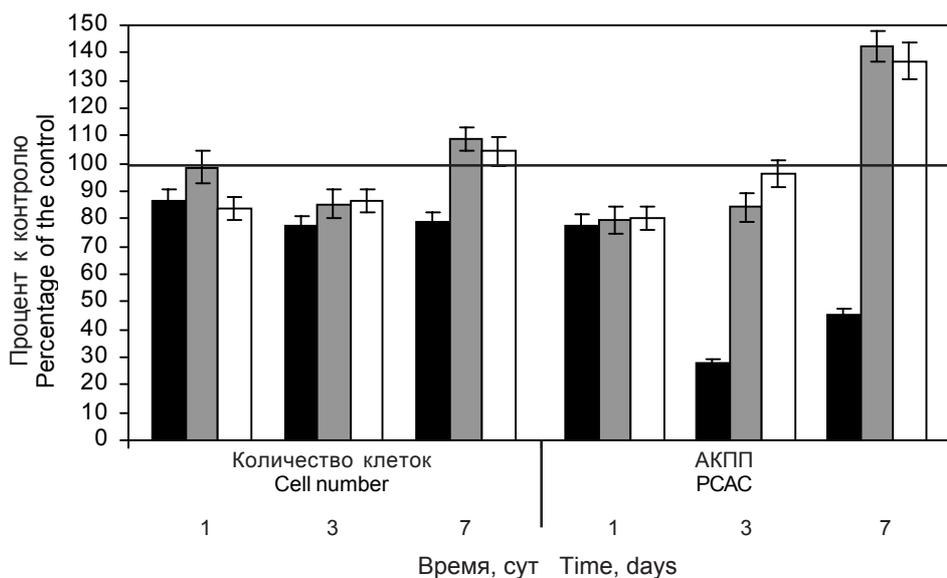


Рис. 3. Показатели адгезивной активности клеток ПП с ИИ до и после лечения. ■ – ИИ; ▒ – ИИ+ кЭНК; □ – ИИ+нЭНК; — – контроль.

Fig. 3. Indices of adhesive activity of PC cells in rats with II prior to and after treatment. ■ – II; ▒ – II+cENCs; □ – II+nENCs; — – control.

Показатели клеточного звена иммунитета крыс с ИИ до и после лечения
Indices of cell link of immunity of rats with И prior to and after treatment

Популяции и субпопуляции клеток Cell populations and subpopulations	Группы животных Animal groups									
	1			2			3			
	Время, сут Time, days									
Интактные животные (контроль) Intact animals (control)	1	3	7	1	3	7	1	3	7	
CD3 /общие Т-лимфоциты CD3/total T-lymphocytes	10,3±0,6 ¹	8,2±0,5 ¹	4,1±0,18 ¹	14,1±1,2 ^{1,2}	16,2±1,2 ^{1,2}	13,2±1,4 ^{1,2}	12,5±1,4 ¹	13,9±1,1 ^{1,2}	11,0±0,7 ^{1,2}	
CD4 / Т-хелперы CD4/T-helper	8,7±0,4 ¹	6,8±0,3	6,8±0,3 ¹	2,9±0,2 ¹	13,15±1,10 ^{1,2,3}	12,0±0,9 ^{1,2,3}	9,8±0,5 ^{1,2,3}	10,1±0,85 ¹	8,9±0,4 ^{1,2}	
CD8/Т- супрессоры/цитотоксические CD8/Т-suppressors/cytotoxic	2,2±0,12 ¹	1,00±0,08 ¹	0,4±0,03 ¹	6,0±0,4 ^{1,2,3}	10,1±1,2 ²	6,7±0,4 ²	3,65±0,7 ^{1,2}	9,9±0,2 ^{1,2}	7,4±0,2 ^{1,2}	
CD72/ В-лимфоциты CD72/ B-lymphocytes	62,3±3,8	63,7±4,9	60,2±3,6	60,0±4,7	61,3±3,9	62,4±3,6	65,5±4,7	65,3±3,9	63,8±3,8 ²	
CD16 / ЕК CD16/NK-cells	26,1±3,2 ¹	10,1±2,8	4,90±0,26 ¹	14,7±1,6 ²	10,2±0,7 ^{2,3}	8,8±4,1	18,0±2,1 ^{1,2}	13,7±0,9	8,4±0,5 ^{1,2}	
ИРИ* CD4/CD8 IRI* CD4/CD8	4,1±0,2 ¹	6,8±0,4 ¹	7,2±0,6 ¹	2,19±0,40 ²	1,19±0,09 ^{1,2,3}	1,46±0,07 ^{2,3}	2,77±0,40 ²	0,90±0,30 ²	0,82±0,30 ^{1,2}	

Примечание: * – ИРИ – иммунорегуляторный индекс (отношение CD4⁺ к CD8⁺ клеткам). Достоверные различия (p<0,05) в сравнении: ¹ – с контролем; ² – группой 1; ³ – с группой 3.
Notes: * IRI (immune regulatory index) is the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ cells. Differences are statistically significant (p<0.05) compared to the: ¹ – control; ² – 1st group; ³ – 3rd group within corresponding terms.

характеристик основных популяций клеточного звена ИС. Было установлено, что 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_H и T_C , что приводило к существенному увеличению иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Данные изменения свидетельствуют о выраженном дисрегуляторном сдвиге тех клеток, которые участвуют в реализации иммунновоспалительной реакции. Количество ЕК на 1-е сутки значительно увеличивается, снижаясь на 3-е и особенно на 7-е сутки (таблица). Такая активация ЕК может быть связана с компенсаторными реакциями организма в ответ на супрессорный фактор, каким является индукция ИИ. Изменения в клеточном звене ИС были не существенными на 1-3-е сутки наблюдения, а к 7-м суткам приближались к контролю.

Таким образом, применение кЭНК или нЭНК является эффективным методом лечения ИИ в условиях эксперимента. Осуществляя корректирующее влияние на звенья ИС организма, данная терапия нормализует фагоцитарную активность клеток МФС, существенно снижает содержание в крови ЦИК. Приближает к контрольным значениям общую популяцию Т-лимфоцитов и восстанавливает общую функцию регуляторных субпопуляций T_H и T_C , что нормализует ИРИ.

Литература

1. Александров М.Т., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело.– 1988.– №9.– С. 30–33.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.– Л.: Медицина, 1962.– 180 с.
3. Гехт В.В., Гусев Е.И., Боголепова А.Н., Алферова В.В. Принципы реабилитации и фармакотерапии больных инсультом в восстановительном периоде // Материалы VIII Всероссийского съезда неврологов.– Казань, 2001.– С. 220.
4. 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.
5. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга.– М.: Медицина, 2001.– 328 с.
6. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Современные представления о лечении острого церебрального инсульта // Consilium Medicum.– 2000.– Т. 2, №2.– Р. 60–65.
7. Жданов Г.Н., Герасимова М.М. Оценка роли аутоиммунной воспалительной реакции в патогенезе церебральной ишемии // Неврологический вестник. Журнал им. В.М. Бехтерева.– Казань.– 2003.– Т. 35, Вып. 3-4.– С. 13–17.
8. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные.– Киев: Вища шк., 1983.– 252 с.
9. Зозуля Ю.П., Лисяний М.И. Нейрогенный иммунодефицит при вогнищевих ураженнях головного мозку та його клінічне

to the compensatory responses of an organism to a suppressive factor, that is the II induction. Changes in cell IS link were insignificant to the 1st-3rd observation days and approached the control to the 7th one.

Thus, either cENCs or nENCs application is an efficient method for II treatment under experimental conditions. By realising a correcting effect on organism's IS links this therapy normalises a phagocyte activity of MPS cells and considerably reduces the CIC in blood, approaches the T lymphocyte total population to the control values and recovers general function of regulatory subpopulations of T_H and T_S by normalising IRI.

References

1. Aleksandrov M.T., Kudryavitskiy A.I., Rumyantseva E.G. et al. Computing method for absolute indices of phagocytosis // Lab. Delo.– 1988.– N9.– P.30–33.
2. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statistical methods in microbiological research.– Leningrad: Meditsina, 1962.– 180 p.
3. Gekht V.V., Gusev E.I., Bogolepova A.N., Alferova V.V. Rehabilitation principles and phamacotherapies for patients with insult within recovery period // Proc. of VIII All-Russian Meeting of Neurologists.– Kazan, 2001.– P. 220.
4. Goltsev A.N., Gurina T.M., Babenko N.N. Effect of different cryopreservation regiments on some characteristics of embryonic nerve cells // Problems of Cryobiology.– 2003.– N1.– P. 46–50.
5. Gusev E.I., Skvortsova V.I. Brain ischemia.– Moscow: Meditsina, 2001.– 328 p.
6. Gusev E.I., Skvortsova V.I. Current notions about treatment of acute cerebral insult // Consilium Medicum.– 2000.– Vol. 2, N2.– P. 60-65.
7. Zhdanov G.N., Gerasimova M.M. Estimation of the role of autoimmune inflammatory response in cerebral ischemia pathogenesis // Neurological bull. V.M. Bekhterev's Journal.– Kazan.– 2003.– Vol. 35, Issue 3-4.– P. 13–17.
8. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratory animals.– Kiev: Vyscha shkola, 1983.– 252 p.
9. Zozulya Yu. P., Lysyanyy M.I. Neurogenic immune deficiency under focal brain damages and its clinical significance // Journal of Academy of Medical Sciences of Ukraine.– 1998.– Vol. 4, N1.– P. 44–46.
10. Immunology. Laboratory manual / E.U. Paster, V.V. Ovod, V.K. Pozur, N.E. Vikhot'.– Kiev: Vyscha shkola, 1989.– 304 p.
11. Pivneva T.A., Tsupikov O.M., Skibo G.G. Morphological changes in GFAP and IBA-1 positive cells of SF-1 hippocampus area after global cerebral ischemia in sand eels // International Congress "Neuroscience for medicine and physiology".– Sudak, 2008.– P. 231–232.
12. Suslina Z.A., Vereschagin N.V., Piradov M.A. Subtypes of ischemic disorders of brain blood circulation: diagnostics and treatment // Consilium Medicum.– 2001.– Vol. 3, N5.– P. 26–28.
13. Struchkov P.V., Konstantinova N.A., Levrentyev V.V. et al. Screening-test for estimation of pathogenic properties of immune complexes // Lab. Delo.– 1985.– N7.– P. 410–413.
14. Fedin A.I. Current concept of pathogenesis and treatment of acute brain ischemia // Proceedings of scientific and practical conference "Brain ischemia treatment".– Moscow, 2001.– P. 5–23.
15. Shtrokh V., Emmarkh I. Determination of cell markers with membrane fluorescence method // Edit. by G. Frimmel.– Moscow: Meditsina, 1987.– P. 244–248.

- значення // Журн. АМН України.– 1998.– Т. 4, №1.– С. 44–63.
10. *Иммунология. Практикум* / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть.– Киев: Вища шк., 1989.– 304 с.
 11. *Пивнева Т.А., Цуликов О.М., Скибо Г.Г.* Морфологические изменения GFAP и IBA-1 позитивных клеток СФ-1 зоны гиппокампа после глобальной церебральной ишемии у песчанок // International Congress "Neuroscience for Medicine and Psychology".– Судак, 2008.– Р. 231–232.
 12. *Суслина З.А., Верещагин Н.В., Пирадов М.А.* Подтипы ишемических нарушений мозгового кровообращения: диагностика и лечение // Consilium Medicum.– 2001.– Т. 3, №5.– Р. 26–28.
 13. *Стручков П.В., Константинова Н.А., Лаврентьев В.В. и др.* Скрининг-тест для оценки патогенных свойств иммунных комплексов // Лаб. дело.– 1985.– №7.– С. 86–92.
 14. *Федин А.И.* Современная концепция патогенеза и лечения острой ишемии мозга // Материалы научно-практической конференции «Лечение ишемии мозга».– Москва, 2001.– С. 5–23.
 15. *Штрох В., Эммарх И.* Определение клеточных маркеров методом мембранной иммунофлуоресценции В кн: Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля.– М.: Медицина, 1987.– С. 244–248.
 16. *Цимбалюк В.І., Бровченко М.С.* Порушення цитокіно-імунного статусу у хворих з наслідками ішемічного інсульту в різні періоди реабілітації // Укр. мед. часопис.– 2006.– Т. 53, №3.– С. 141–144.
 17. *Pasceri V., Willerson J.T., Yeh E.T.* Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells // Circulation.– 2000.– Vol. 102, N18.– P. 2165–2168.

Accepted in 13.05.2008

Поступила 13.05.2008