

Гладких Федір Володимирович,
доктор філософії в галузі охорона здоров'я за спеціальністю «Медицина»,
старший науковий співробітник,
Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва
Національної академії медичних наук України»;
докторант медичного факультету,
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України
fedir.hladykikh@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>
м. Харків, Україна

Лядова Тетяна Іванівна,
доктор медичних наук, професор,
професор кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології,
декан медичного факультету,
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України
t.lyadova@karazin.ua
<https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>
м. Харків, Україна

Порівняльна характеристика антифлогістичної активності кріоекстрактів біологічних тканин та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин на моделі аутоімунного артриту

Вступ. Ревматоїдний артрит (РА) є хронічним аутоімунним захворюванням, яке характеризується прогресуючим симетричним запальним ураженням суглобів, яке призводить до руйнування хряща та ерозії кісток. Деформація та руйнування суглобів при РА можуть призводити до незворотних фізичних вад, які погіршують якість життя пацієнтів і можуть слугувати підґрунтям загострення супутніх захворювань та спричинити ранню смерть. Соціальними проблемами, пов'язаними з РА, є збільшення соціально-економічного тягаря, погіршення працездатності та зниження соціальної адаптації.

Мету дослідження – провести порівняльну оцінку протизапальної активності (ПЗА) кріоекстрактів плаценти (КЕП) і селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК) на моделі експериментального аутоімунного артриту.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації. Ад'ювантний артрит (АА) моделювали субплантарним введенням шурам («0» день експерименту) повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на шура. На «0» (вихідні показники), 14 та 28 дні експерименту оцінювали розвиток запальної реакції за динамікою об'єму кінцівки (у мл).

Результати досліджень та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що введення ПАФ призвело до статистично вірогідного ($p=0,009$) збільшення об'єму ураженої кінцівки на 14 день експерименту у 2 рази та більше (від +100,9% до +124,5%) у всіх тварин зі змодельованим АА, відносно вихідних показників. Досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби володіють протизапальною активністю на моделі ад'ювантного артриту у шурів на що вказувало зменшення об'єму ушкодженої кінцівки на 28 день експерименту відносно показників на 14 день відповідно на 25,1% при застосуванні КЕП, на 20,0% при застосуванні КЕС та на 22,0% при застосуванні КС-МСК.

Висновки. За величиною протизапальної активності при експериментальному ревматоїдному артриті досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності: КЕП (ПЗА=56,5%) > КС-МСК (ПЗА=47,3%) > КЕС (ПЗА=43,3%).

Ключові слова: безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби, аутоімунні захворювання, кріоекстракт селезінки, кріоекстракт плаценти, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин.

Hladykikh Fedir Volodymyrovych, PhD in Health Care (Medicine), Senior Research Fellow, State Organization “Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”; Doctoral student of the Faculty of Medicine, V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, fedir.hladykikh@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, Kharkiv, Ukraine

Liadova Tetyana Ivanivna, Doctor of Medical Sciences (DSci, PhD), Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Dean of the Medical Faculty, V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, t.lyadova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>, Kharkiv, Ukraine

Comparative characteristics of the antiphlogistic activity of cryoextracts of biological tissues and the conditioned medium of mesenchymal stem cells on the model of autoimmune arthritis

Introduction. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by progressive symmetrical inflammatory joint damage that leads to cartilage destruction and bone erosion. Deformation and destruction of joints in RA can lead to irreversible physical disabilities that impair the quality of life of patients and can serve as a basis for exacerbation of concomitant diseases and cause early death. Social problems associated with RA include increased socioeconomic burden, reduced work capacity, and reduced social adaptation.

The purpose of the study is to conduct a comparative assessment of the anti-inflammatory activity (AIA) of cryoextracts of the placenta (CEP) and spleen (CES) and the conditioned medium of mesenchymal stem cells (CM-MSK) on a model of experimental autoimmune arthritis.

Materials and methods. Experimental studies were conducted on 42 male shuras weighing 200–220 g in accordance with the basic bioethical norms of the Helsinki Declaration of the World Medical Association. Adjuvant arthritis (AA) was modeled by subplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA) into the hind right limb at the rate of 0.1 ml per rat. On «0» (initial indicators), 14 and 28 days of the experiment, the development of the inflammatory reaction was evaluated by the dynamics of the volume of the limb (in ml).

Research results and their discussion. The conducted study showed that the introduction of CFA led to a statistically significant ($p=0.009$) increase in the volume of the affected limb on the 14th day of the experiment by 2 times or more (from +100.9% to +124.5%) in all animals with simulated AA, relative to the initial indicators. The studied cell-free cryopreserved biological agents have anti-inflammatory activity in the model of adjuvant arthritis in rats, which was indicated by a decrease in the volume of the damaged limb on the 28th day of the experiment relative to the indicators on the 14th day, respectively, by 25.1% when using CEP, by 20.0% when application of CES and by 22.0% when applying CM-MSK.

Conclusions. According to the amount of anti-inflammatory activity in experimental rheumatoid arthritis, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence: CEP (AIA=56.5%) > CM-MSK (AIA=47.3%) > CES (AIA=43.3%).

Key words: cell-free cryopreserved biological agents, autoimmune diseases, spleen cryoextract, placenta cryoextract, mesenchymal stem cell conditioned medium.

Вступ. Ревматоїдний артрит (РА) це хронічне аутоімунне захворювання, яке характеризується прогресуючим симетричним запальним ураженням суглобів, що супроводжується руйнування хряща та ерозією кісток [1]. Деформація та руйнування суглобів при РА можуть призводити до незворотних фізичних вад, які погіршують якість життя пацієнтів і можуть слугувати підґрунтям загострення супутніх захворювань та спричинити ранню смерть. Соціальними проблемами, пов'язаними з РА, є збільшення соціально-економічного тягаря, погіршення працездатності та зниження соціальної адаптації [2, 3].

Розвиток РА вимагає двох окремих факторів: (1) генетичної схильності пацієнта, яка обумовлює генерацію аутореактивних Т- і В-клітин, та (2) тригерної події, такої як вірусні або бактеріальні інфекції чи пошкодження тканин, забезпечуючи активацію згенерованих аутореактивних лімфоцитів, що призводить до порушення толерантності та подальшого руйнування тканин/органів [4]. Характерне запалення суглобів при РА ініціюється та підтримується складною взаємодією між різними підтипами дендритних клітин, Т-клітинами, макрофагами, В-клітинами, нейтрофілами, фібробlastами та остеокластами [4]. Хронічне запальне середовище в ураженому суглобі, у свою чергу, призводить до розширення синовіальної оболонки, що називається «паннусом», який проникає у навколосуглобову кістку в місці з'єднання хряща та кістки, що призводить до ерозії кістки та деградації хряща [5]. Синовіальну тканину у пацієнтів з РА можна розглядати як третинну лімфоїдну тканину або ектопічну лімфоїдну структуру. Її структура нагадує вторинну лімфоїдну тканину, де відбувається диференціація Т-клітин і В-клітин [6].

Сучасне стандартне лікування РА включає застосування нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ), які в основному використовуються для контролю болю та запалення, глюкокортикоїдів та протиревматичних препаратів, що модифікують захворювання (DMARD).

[7]. Метою лікування у хворих на РА є досягнення станів клінічної, структурної та функціональної ремісії. **Клінічна ремісія** характеризується станом, коли зникнення запальних реакцій підтверджується за допомогою клінічних бальних шкал. **Структурна ремісія** – це стан, коли прогресування деструкції суглоба майже зупинене. **Функціональна ремісія** – стан, коли фізичні функції більше не знижуються. Навіть коли завдяки терапевтичному втручанню досягнута клінічна ремісія, все ще може відбуватися прогресування суглобової деструкції, що в деяких випадках призводить до функціонального погіршення. Тому важливо досягти всіх трьох станів ремісії [1].

Зважаючи на чисельні побічні ефекти та небажані лікарські реакції при застосуванні НПЗЗ, глюкокортикоїдів та інших препаратів для лікуванні хворих на РА, залишається актуальним завданням сучасної медицини пошук нових підходів до протизапальної та знеболуючої терапії при вказаній патології. Останні десятиліття особливу увагу дослідників та практикуючих лікарів привертає можливість застосування засобів біологічної терапії. Враховуючи обмеження класичних препаратів від РА, сучасна клітинна терапія на основі мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) може розглядатися як альтернативна стратегія. МСК привернули увагу вчених і клініцистів завдяки своїй здатності до самовідновлення, регенерації тканин та органів, а також сильними імуносупресивними властивостям. Ці характеристики дозволяють пригнічувати активність прозапальних клітин як вродженої, так й адаптованої імунної системи [8]. Трансплантація МСК виявилася ефективною в лікуванні РА шляхом зменшення запалення суглобів, ерозії кісток і деструкції та полегшення утворення паннуса через імунну регуляцію та протизапальну дію [9]. Як відомо, МСК продукують трансформуючий фактор росту- β , фактор росту гепатоцитів, простагландин Е2 (PGE2), розчинну форму білка HLA-G5, індоламін-2,3-діоксигеназу,

оксид азоту (NO) та інтерлейкін-10, які беруть участь у регуляції та пригніченні запальних реакцій [10]. Для подальшого покращення протизапальних властивостей МСК для клітинної терапії можна успішно застосувати праймінг або прекондичіонування. Такий підхід дозволяє використовувати біоактивні речовини (цитокіни та фактори росту), агоністи імунних рецепторів, гіпоксію та 3D культивування [11]. Обмеження, пов'язані з трансплантацією, спонукали дослідників до пошуку шляхів біологічної терапії без використання клітинних препаратів – так звана **безклітинна біологічна терапія (cell-free biological therapy)**. Зважаючи, що біологічні засоби на відміну від препаратів хімічного синтезу потребують особливих вимог виготовлення та зберігання в подальшому доцільно застосовувати більш вичерпний термін, який враховує можливість їх довготривалого зберігання у низькотемпературному середовищі – **безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ)**. До числа БКБЗ належать, зокрема, кріоекстаркт плаценти (КЕП), кріоекстракт селезінки (КЕС), кондиціоноване середовище МСК (КС-МСК) та ін.

Мета дослідження – провести порівняльну оцінку антифлогістичної активності кріоекстрактів плаценти і селезінки та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин на моделі експериментального аутоімунного артриту.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальне дослідження проведено на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації. Для моделювання експериментального РА – ад'ювантного артриту (АА) у щурів використовували повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ), який вміщує безводний ланолін, вазелінову олію та вбиту нагріванням вакцину БЦЖ (*від BCG – Bacillus Calmette-Guerin*) [12, 13]. Вазелінова олія, яка використовується в ПАФ, забезпечує три специфічні механізми дії: (1) створення депо антигену з повільним вивільненням, (2) забезпечення транспорту антигену через лімфатичну систему до дрекуючих лімфатичних вузлів та селезінки, де створюються локалізовані невеликі антигенні депо та (3) взаємодія з антигенпрезентуючими клітинами, включаючи фагоцити, макрофаги та дендритні клітини [13]. Модель експериментального РА – АА у щурів, має всі морфофункціональні ознаки РА та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. АА моделювали субплантарним веденням щуром («0» день експерименту) ПАФ (*Thermo Fisher Scientific, США*) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [14].

Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили внутрішньом'язово (в/м) з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та 26 дні. У якості референс-препарату використано НПЗЗ – диклофенак натрію (ДН), який вводили в/м в дозі, яка дорівнювала ED_{50} за протизапальною активністю – 8,0 мг/кг [14, 15]. Зазначена доза відповідає разовій дозі для людини 88 мг (1,25 мг/кг), що узгоджується з клінічними рекомендаціями про використання ДН у хворих по 75–100 мг/добу [15].

Щурів розподіляли на 6 груп:

I (негативний контроль) – інтактні щури (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

II – щури зі змодельованим АА (n=7) без лікування (контрольна група), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг;

III – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили референс-препарат ДН в дозі 8,0 мг/кг [14];

IV – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [16];

V – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [17];

VI – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [18, 19].

На «0» (вихідні показники), 14 та 28 дні експерименту оцінювали розвиток запальної реакції за динамікою об'єму кінцівки (у мл), яку визначали за допомогою електронних ваг (*Radwag WLC 0.2/C/1, Польща*) та ємкості з рідиною. Об'єм кінцівки визначали за об'ємом рідини, яку виміщувала кінцівка при зануренні [20]. У якості рідини обрано воду. Враховуючи, що за температури 14–17°C щільність води становить 0,998–0,999 г/мл, об'ємні показники зануреної кінцівки тварини умовно прирівнювали значення маси води, що виміщувалась: 1 г = 1 мл.

Протизапальну активність (ПЗА, %) в динаміці набряку кінцівки у щурів розраховували за формулою:

$$ПЗА = \frac{\Delta V_{\text{п контрольної групи}} - \Delta V_{\text{п дослідної групи}}}{\Delta V_{\text{п контрольної групи}}} \cdot 100\%$$

де ПЗА – протизапальна активність, %;

$\Delta V_{\text{п}}$ – приріст об'єму ушкодженої кінцівки щурів в день п відносно вихідних показників, %.

Технологія отримання КЕП. Етап 1 (підготовка матеріалу). Плаценту після операції кесарів розтин відмивали від крові у 0,9% розчину NaCl, відділяли амніотичну оболонку, розділяли на фрагменти масою 5–10 г, промивали 5–6 разів 0,9% розчином NaCl та занурювали на 15 хв у флакони із трикомпонентним розчином натрію хлориду (NaCl), антибіотика та диметилсульфоксиду (ДМСО) [21]:

1) NaCl.....	9,0 мг/мл	(0,9 %)
2) Канаміцин.....	1,25 мг/мл	(0,125 %)
3) ДМСО.....	20,0 мг/мл	(2,0 %)

Етап 2 (дія ультранизькими (–80°C, –196°C) температурами). Фрагменти плаценти поміщали у флакон з 0,9% розчину NaCl у співвідношенні 1:1, додавали кріопротектор ДМСО (5,0%) та заморожували зі швидкістю охолодження 1°C / хв до –80°C. Через 30 хв. зразки та розморожували на водяній бані з температурою 37–40°C до повного відтавання. Після розморожування фрагменти плацентарної тканини піддавали ще двом послідовним циклам заморожування до –196°C, витримці 30 хв у парах рідкого азоту та розморожували на водяній бані [16, 21].

Етап 3 (водно-сольова екстракція). Для видалення кріопротектора ДМСО заморожені після три-

разового заморожування (-80°C , -196°C , -196°C) фрагменти плацентарної тканини занурювали у розчин сахарози після чого переносили у флакон із 0,9% розчином NaCl та збовтували впродовж 1–2 хв, після чого зливали надосад та доливали нову порцію фізіологічного розчину. Цю процедуру повторювали 5–6 разів після чого тканину механічно диспергували у гомогенізаторі та додавали 0,9% розчин NaCl у співвідношенні 1:2, витримували 24 год при температурі 4°C та центрифугували 15–20 хв при 4000 об/хв. Одержаний надосад фільтрували через міліпорові фільтри (діаметр пор 0,22 мкм), отримуючи водно-сольовий екстракт плаценти – КЕП, який стандартизували за вмістом білка (1,5 мг/мл), який визначали спектрофотометрично ($\lambda = 540 \text{ нм}$) [16, 21]. Стандартизований КЕП фасували в ампули по 1,8 мл та зберігали у рідкому азоті при -196°C [21].

Препарат КЕП вводили щурам внутрішньом'язово (в/м) у дозі 2,5 мл/кг, що відповідає 0,5 мл/200 г маси тіла щура (з урахування, що середня маса щура становить 200–240 г). Перед застосуванням КЕП разову дозу екстемпорально (*ex tempore* – за потребою) розводили у фізіологічному розчині з розрахунку 0,1 мл 0,9% розчину NaCl /100 г маси тіла щура [21].

Технологія одержання КЕС. Етап 1 (підготовка матеріалу). Селезінку свиней розділяли на дрібні фрагменти масою 5–10 г та тричі відмивали 0,9% розчином NaCl у співвідношенні 1:10.

Етап 2 (дія низькими (-70°C) та ультранизькими (-196°C) температурами). До фрагментів селезінки додавали у співвідношенні 1:1 розчин кріопротектора поліетиленоксиду з молекулярною масою 1500 Да у концентрації 10%. Після еквілібрації у розчині кріопротектора фрагменти селезінки заморожували зі швидкістю охолодження $1^{\circ}\text{C} / \text{хв}$ до -70°C з наступним зануренням у рідкий азот (-196°C) [22].

Етап 3 (водно-сольова екстракція). Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою $37-40^{\circ}\text{C}$ та відмивали від кріопротектора фізіологічним розчином. Для одержання водно-сольових екстрактів фрагменти селезінки інкубували у 0,9% розчині NaCl впродовж 90 хв за температури $22-24^{\circ}\text{C}$. Для видалення термолабільних протеїнів супернатант прогрівали на водяній бані з температурою $37-40^{\circ}\text{C}$ 15 хв та очищали, пропускаючи через фільтрувальний папір [23, 24, 25]. КЕС стандартизували за вмістом білка (0,1 мг/мл), який визначали спектрофотометрично [26].

Препарат КЕС з вмістом білків 0,1 мг/мл вводили щурам в/м у дозі 5,0 мл/кг маси тіла щура, що відповідає 1 мл/200 г [26].

Технологія одержання КС-МСК. КС отримували під час культивування нативних культур МСК в умовах газового інкубатора (37°C , 5% CO_2). КС збирати після 3 пасажу, коли клітинний ріст переходив до стаціонарної фази. Стадію стаціонарного росту стабільної лінії МСК, коли настає дозрівання КС, оцінювали за формуванням конфлюентного шару клітин за допомогою інвертованого мікроскопа. КС-МСК порційно заморожували та зберігали при -20°C [27]. Препарат КС-МСК вводили щурам в/м у дозі 0,6 мл/кг маси тіла щура [18, 19, 27].

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel». Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. Співставлення показників однієї групи при повторюваних вимірюваннях за різних умов експерименту проводили за непараметричним T-критерієм Вілкоксона. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді " $M \pm m$ " ($M \pm SE$), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ:), де 95% ДІ: – 95% довірчий інтервал [28, 29, 30].

Результати дослідження та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що введення ПАФ призвело до статистично вірогідного ($p=0,009$) збільшення об'єму ураженої кінцівки на 14 день експерименту у 2 рази та більше (від +100,9% до 124,5%) у всіх тварин зі змодельованим АА, відносно вихідних показників (табл. 1). Отримані результати узгоджувались з даними літератури [31].

У тварин контрольної групи (щури з АА без лікування) об'єм ураженої кінцівки на 28 день експерименту становив $3,01 \pm 0,06$ (95% ДІ: 2,90–3,13) мл, що статистично вірогідно ($p < 0,01$) на 106,9% перевищувало вихідні показники у тварин цієї групи на «0» день.

П'ятиразове введення КЕП з 14 по 28 дні експерименту призвело до статистично вірогідного ($p < 0,01$) зниження об'єму ушкодженої кінцівки на 25,1% відносно показників на 14 день. Середній об'єм кінцівки у щурів IV групи на 28 день становив відповідно $2,43 \pm 0,10$ (95% ДІ: 2,22–2,63) мл, що на 19,7% ($p < 0,001$) було нижче за показники тварин контрольної групи ($3,01 \pm 0,06$) у аналогічний строк дослідження (див. табл. 1).

Беручи до уваги зазначені зміни у щурів контрольної групи та дані тварин, які отримували КЕП, нами проведено розрахунок ПЗА КЕП, яка на 28 день становила відповідно:

$$\begin{aligned} \text{ПЗА}_{\text{КЕП}} &= \Delta V_{28 \text{ контроль}} - \Delta V_{28 \text{ КЕП}} = \\ &= 106,9\% - 50,4\% = 56,5\% \end{aligned}$$

За величиною ПЗА КЕП лише на 12,3% поступався за вказаним видом активності референс-препарату ДН, ПЗА якого становила відповідно:

$$\begin{aligned} \text{ПЗА}_{\text{ДН}} &= \Delta V_{28 \text{ контроль}} - \Delta V_{28 \text{ ДН}} = \\ &= 106,9\% - 38,1\% = 68,8\% \end{aligned}$$

Отримані дані узгоджуються з даними попередніх досліджень щодо здатності КЕП посилювати ПЗА НПЗЗ за їх комбінованого нарізного введення, що може бути опосередковане сумациєю ПЗА обох препаратів [32].

На тлі введення КЕС об'єм ушкодженої кінцівки у щурів з АА на 28 день експерименту статистично вірогідно ($p < 0,01$) зменшився на 20,0% відносно показників на 14 день та становив відповідно $2,57 \pm 0,11$

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на величину набряку кінцівки у шурів з АА, мл ($M \pm m$, 95 % ДІ, n=42)

Строк	I (1) група Інтактні шури	II (2) група Контроль (АА без лікування)	III (3) група АА + ДН	IV (4) група АА + КЕП	V (5) група АА + КЕС	VI (6) група АА + КС-МСК	Рівень статистичної вірогідності [%]							
							P ₂₋₁	P ₃₋₂	P ₄₋₂	P ₅₋₂	P ₆₋₂	P ₄₋₃	P ₅₋₃	P ₆₋₃
«0» день	1,51±0,06 (95 % ДІ: 1,40-1,63)	1,46±0,05 (95 % ДІ: 1,36-1,55)	1,50±0,11 (95 % ДІ: 1,28-1,72)	1,61±0,07 (95 % ДІ: 1,48-1,75)	1,57±0,10 (95 % ДІ: 1,38-1,77)	1,56±0,06 (95 % ДІ: 1,45-1,67)	0,5 [3,8%]	0,7 [2,9%]	0,1 [10,8%]	0,3 [7,8%]	0,2 [6,9%]	0,4 [7,6%]	0,6 [7,4%]	0,7 [3,8%]
	1,57±0,06 (95 % ДІ: 1,45-1,70) P ₁₀ = 0,1 [3,8%] ¹⁰	3,27±0,08 (95 % ДІ: 3,12-3,42) P ₁₀ = 0,009 [124,5%] ¹⁰	3,26±0,08 (95 % ДІ: 3,10-3,42) P ₁₀ = 0,009 [117,1%] ¹⁰	3,24±0,08 (95 % ДІ: 3,10-3,39) P ₁₀ = 0,009 [100,9%] ¹⁰	3,21±0,07 (95 % ДІ: 3,07-3,36) P ₁₀ = 0,009 [104,5%] ¹⁰	3,19±0,11 (95 % ДІ: 2,97-3,40) P ₁₀ = 0,009 [104,6%] ¹⁰	< 0,001 [108,2%]	0,9 [0,4%]	0,8 [0,9%]	0,6 [1,7%]	0,5 [2,6%]	0,9 [0,4%]	0,7 [1,3%]	0,6 [2,2%]
14 день	1,60±0,06 (95 % ДІ: 1,49-1,71) P ₁₀ = 0,07 [5,7%] ¹⁰	3,01±0,06 (95 % ДІ: 2,90-3,13) P ₁₀ < 0,01 [106,9%] ¹⁰	2,07±0,19 (95 % ДІ: 1,70-2,44) P ₁₀ = 0,01 [38,1%] ¹⁰	2,43±0,10 (95 % ДІ: 2,22-2,63) P ₁₀ < 0,01 [50,4%] ¹⁰	2,57±0,11 (95 % ДІ: 2,35-2,80) P ₁₀ < 0,01 [63,6%] ¹⁰	2,49±0,08 (95 % ДІ: 2,32-2,65) P ₁₀ = 0,01 [59,6%] ¹⁰	< 0,001 [88,4%]	< 0,001 [31,3%]	< 0,001 [19,7%]	< 0,001 [14,7%]	< 0,001 [17,5%]	0,04 [24,1%]	0,07 [20,0%]	
28 день	P ₁₄ = 0,09 [1,8%] ¹⁴	P ₁₄ = 0,01 [7,9%] ¹⁴	P ₁₄ = 0,01 [36,4%] ¹⁴	P ₁₄ < 0,01 [25,1%] ¹⁴	P ₁₄ < 0,01 [20,0%] ¹⁴	P ₁₄ = 0,01 [22,0%] ¹⁴								

Примітки.

- 1) P₂₋₁ – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
- 2) [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
- 3) індексами ^{1, 2, 3, 4, 5, 6} вказано номер групи, між показниками яких проведено зрівняння;
- 4) індексами ^{10, 14} вказано строки дослідження, з показниками яких проведено зрівняння в динаміці.

(95% ДІ: 2,35–2,80) мл, що на 63,6% перевищувало вихідні показники тварин цієї групи на «0» день (1,57±0,10 (95% ДІ: 1,38–1,77) мл). Таким чином ПЗА КЕС становила: ПЗАКЕС = ΔV28 контроль – ΔV28 КЕС = 106,9% – 63,6% = 43,3%.

КС-МСК проявляло більш виразку ПЗА, ніж КЕС. Так об'єм ушкодженої кінцівки на 28 добу експерименту статистично вірогідно ($p < 0,01$) зменшився на 22,0% відносно показників на 14 день (див. табл. 1), що на 59,6% перевищувало вихідні показники, відповідно ПЗА становила:

$$\text{ПЗАКС-МСК} = \Delta V28 \text{ контроль} - \Delta V28 \text{ КС-МСК} = 106,9\% - 59,6\% = 47,3\%.$$

Висновки

1. Досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби володіють протизапальною активністю на моделі ад'ювантного артриту у щурів на що

Інформація про конфлікт інтересів. Автори рукопису свідомо засвідчують відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чії продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Інформація про фінансування. Робота не отримувала фінансування видатками Державного бюджету України. Всі автори гарантують, що вони не отримували жодних винагород у будь-якій формі, здатних вплинути на результати роботи.

Особистий внесок кожного автора у виконання роботи:

Гладких Ф.В. – ідея та концепція роботи, формулювання мети роботи, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих результатів та їх статистичне опрацювання, написання тексту статті;

Лядова Т.І. – участь в аналізі отриманих результатів, участь у розробці дизайну дослідження, редагування тексту статті.

ЛІТЕРАТУРА

- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
- Hladkykh FV. Current understanding of the immunological basis of rheumatoid arthritis: from post-translational modification of proteins to the use of disease-modifying antirheumatic drugs. *Eastern Ukrainian medical journal* 2023;11(4):326-336. [https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11\(4\):326-336](https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11(4):326-336)
- Maeda K, Yoshida K, Nishizawa T, Otani K, Yamashita Y, Okabe H, Hadano Y, Kayama T, Kurosaka D, Saito M. Inflammation and Bone Metabolism in Rheumatoid Arthritis: Molecular Mechanisms of Joint Destruction and Pharmacological Treatments. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2871. <https://doi.org/10.3390/ijms23052871>
- Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020;9(4):880. <https://doi.org/10.3390/cells9040880>
- Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*. 2018;320(13):1360-1372. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.13103>
- Wu F, Gao J, Kang J, Wang X, Niu Q, Liu J, Zhang L. B Cells in Rheumatoid Arthritis : Pathogenic Mechanisms and Treatment Prospects. *Front Immunol*. 2021;12:750753. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750753>
- Mueller AL, Payandeh Z, Mohammadkhani N, Mubarak SMH, Zakeri A, Alagheband Bahrami A, Brockmueller A, Shakibaei M. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. *Cells*. 2021;10(11):3017. <https://doi.org/10.3390/cells10113017>
- Sarsenova M, Issabekova A, Abisheva S, Rutskaia-Moroshan K, Ogay V, Saparov A. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11592. <https://doi.org/10.3390/ijms222111592>
- Liu H, Li R, Liu T, Yang L, Yin G, Xie Q. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2020;11:1912. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01912>
- Uccelli A, de Rosbo NK. The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: mode of action and pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1351:114-26. <https://doi.org/10.1111/nyas.12815>
- Lee BC, Kang KS. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):397. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01920-3>
- Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947;1:291–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
- Harold F. Stils, adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants, *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 2005;46(3):280–93. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>

14. Stefanov OV, ed. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
15. Hladkykh FV. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization. Vinnytsia: Tvoty; 2022. 216 p. <https://doi.org/10.46879/2022.1>
16. Shepitko VI. Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs: dissertation. Doctor of Medicine: special. 14.01.35 – Cryomedicine, Kharkiv, 2004. 326 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>
17. Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin: thesis. biol. n.: in specialty 03.00.19 – Cryobiology, Kharkiv, 2016. 162 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>
18. Golubinskaya PA, Sarycheva MV, Dolzhikov AA, Bondarev VP, Stefanova MS, Soldatov VO, Nadezhdin SV, Korokin MV, et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(6):416-425. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
19. Globa VYu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. Thesis in specialty 222 – Medicine, Kharkiv, 2021. 156 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>
20. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnian S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;43(1):11–4. [http://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00089-7](http://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00089-7)
21. Prokopyuk OS. Placenta cryopreservation and determination of the mechanisms of its influence on the body of recipients of late ontogenesis (experimental study): Thesis in specialty 14.01.35 – Cryomedicine, Kharkiv, 2011. 351 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0514U000218/>
22. Galchenko SE, Shkodovska NY, Sandomirsky BP, Hryshchenko VI. Patent of Ukraine No. 64381. Method of obtaining extracts of xenogenic organs. Application No. 2003054649. Submitted on May 22, 2003; Publ. 16.02.2004. Bul. No. 2.
23. Galchenko SE. Extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans: procurement and biological effect. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2005;15(3):403-406.
24. Bespalova IG, Rogoza LA, Galchenko SY, Sandomirsky BP. Extracts of cryopreserved fragments of pig spleen and piglet skin affect the healing of cold wounds in rats. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2015;25(2):151-161. <https://doi.org/10.15407/cryo25.02.151>
25. Sandomirsky BP, Galchenko SE, Bizov VV. etc. Preparation, cryopreservation and clinical use of pig spleen fragments and their extract: Methodological recommendations. Ministry of Health of Ukraine; Center for transplantation of organs, tissues and cells; Kharkiv, 2001. 9 p.
26. Olefirenko LLC. The effect of cryodestruction, extracts of the liver and spleen on regenerative processes in the liver in experimental cirrhosis. Thesis in specialty 14.01.35 – Cryomedicine, Kharkiv, 2008. 101 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0408U004142/>
27. Nesteruk GV, Alabedalkarim NM, Kolot NV, Komaromi NA, Protsenko OS, Legach EI. The effect of conditioned media from glial cell cultures on the reproductive system of female rats of different ages. *Problems of endocrine pathology*. 2022;79(2):88-96. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2022.2.13>
28. Zar JH. *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014; 960 p.
29. Tripathy JP. Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health*. 2013;42(12):1478–9.
30. Yan F, Robert M, Li Y. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2017;9(5):157–63.
31. Ekambaram S, Perumal SS, Subramanian V. Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. *BMC Complement Altern Med*. 2010 Oct 13;10:56. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-56>
32. Hladkykh FV. Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium on background of its combined use with cryopreserved placenta extract in experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021;31(4):364-367. <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>