

УДК 615.361+615.324+576.5+616-002

DOI <https://doi.org/10.32782/health-2024.1.4>

ВПЛИВ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА ВМІСТ ОКРЕМИХ ЕЙКОЗАНОЇДІВ У ЩУРІВ ЗІ ЗМОДЕЛЬОВАНИМ АД'ЮВАНТОМ ФРЕЙНДА АРТРИТОМ

Гладких Федір Володимирович,
доктор філософії у галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина»,
старший науковий співробітник
Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва
Національної академії медичних наук України»;
докторант медичного факультету
Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна
ORCID: 0000-0001-7924-4048

Лядова Тетяна Іванівна,
доктор медичних наук, професор,
професор кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології,
декан медичного факультету
Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна
ORCID: 0000-0002-5892-2599

Ревматоїдний артрит визначається як запальне системне хронічне аутоімунне захворювання, яке проявляється у вигляді інфільтрації імунних клітин, гіперплазії синовіальної оболонки, утворення паннусу та деструкції суглобового хряща й кісткової тканини. Незважаючи на простоту визначення, запалення – це складна система клітинних та молекулярних подій для отримання специфічних часових і просторових реакцій. Ендогенні біоактивні ліпіди є основними медіаторами гомеостазу, а також гострих і хронічних запальних процесів, беручи участь у ініціації, підтримці, а також у регресі запалення.

Мета роботи – охарактеризувати вплив кріоекстрактів плаценти (КЕП) та селезінки (КЕС), а також кондіціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК) на вміст простагландину (ПГ) E2, тромбоксану (Тх) B2 та лейкотрієну (ЛТ) B4 у сироватці крові на моделі ад'ювантного артриту (АА) у щурів.

Експериментальні дослідження проведено на 42 щурах-самцях масою 200–220 г. АА у щурів має всі морфологічно-функціональні ознаки РА у людини та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. АА моделювали субплантарним введенням щурам («0» день експерименту) повного ад'юванту Фрейнда (ПАФ) у задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура. Лікування АА проводилося з 14-го по 28-й день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили з інтервалом два дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та 26 дні.

Установлено, що розвиток АА у щурів супроводжувався зростанням рівня ПГЕ2 на 34,7% ($p < 0,01$), ТхB2 – на 72,4% ($p < 0,001$) та ЛТВ4 – на 74,7% ($p < 0,001$) відносно показників інтактних тварин, що підтверджувало імунозапальний характер змодельованої патології. На тлі застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів, як і референс-препарату диклофенаку натрію, відзначалося зниження рівня всіх досліджуваних ейкозаноїдів.

Таким чином, застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів призвело до зниження рівня досліджуваних ейкозаноїдів у сироватці крові щурів з АА на 28-й день експерименту. Найвиразніші зміни відзначено на тлі введення КС-МСК: рівень ПГЕ2 знизився на 24,8% ($p < 0,05$), ТхB2 – на 30,3% ($p < 0,01$) та ЛТВ4 – на 25,6% ($p < 0,01$) відносно показників щурів з АА без лікування.

Ключові слова: кріоекстракт плаценти, кріоекстракт селезінки, кондіціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин, простагландини, тромбоксан, лейкотрієни, аутоімунні захворювання.

Fedir Hladkykh, Tetyana Liadova. Effect of cell-free cryopreserved biological agents on the content of individual eicosanoids in rats with freund's adjuvant modeled arthritis

Rheumatoid arthritis is defined as an inflammatory systemic chronic autoimmune disease that manifests as immune cell infiltration, synovial hyperplasia, pannus formation, and destruction of articular cartilage and bone tissue. Despite its simple definition, inflammation is a complex system of cellular and molecular events, based on a cascade of mediators to obtain specific temporal and spatial responses. Endogenous bioactive lipids are the main mediators of homeostasis, as well as acute and chronic inflammatory processes, participating in the initiation, maintenance, and regression of inflammation.

The aim of the work is to characterize the effect of cryoextracts of the placenta (CEP) and spleen (CES), as well as the conditioned medium of mesenchymal stem cells (CM-MSC) on the content of prostaglandin (PG) E2, thromboxane (Tx) B2 and leukotriene (LT) B4 in blood serum on the model of adjuvant arthritis (AA) in shures.

Experimental studies were conducted on 42 male rats weighing 200–220 g. AA in rats has all the morphofunctional signs of RA in humans and is accompanied by a typical reaction, the main link of which is T-cell immunity. 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. AA treatment was carried out from 14 to 28 days. CEP, CES and CM-MSC were injected intramuscularly with an interval of 2 days (a total of 5 injections), on days 14, 17, 20, 23 and 26, respectively.

The development of AA in rats was accompanied by an increase in the level of PGE2 by 34.7% ($p < 0.01$), TxB2 by 72.4% ($p < 0.001$) and LTB4 by 74.7% ($p < 0.001$) compared to the indicators of intact animals, which confirmed the immunoinflammatory nature of the simulated pathology. Against the background of the use of cell-free cryopreserved biological agents, as well as the reference drug diclofenac sodium, a decrease in the level of all studied eicosanoids was noted.

The use of cell-free cryopreserved biological agents led to a decrease in the level of the studied eicosanoids in the blood serum of AA rats on the 28th day of the experiment. The most pronounced changes were noted against the background of the introduction of CM-MSC – the level of PGE2 decreased by 24.8% ($p < 0.05$), TxB2 by 30.3% ($p < 0.01$) and LTB4 by 25.6% ($p < 0.01$) relative to the parameters of rats with AA without treatment.

Key words: placenta cryoextract, spleen cryoextract, conditioned medium of mesenchymal stem cells, prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, autoimmune diseases.

Вступ. Ревматоїдний артрит (РА) визначається як запальне системне хронічне аутоімунне захворювання, яке проявляється у вигляді інфільтрації імунних клітин, гіперплазії синовіальної оболонки, утворення паннусу та деструкції суглобового хряща й кісткової тканини [1]. Незважаючи на простоту визначення, запалення – це складна система клітинних та молекулярних подій, в основі яких – каскад для отримання специфічних часових і просторових реакцій [2; 3].

Як відомо, ендогенні біоактивні ліпіди є основними медіаторами гомеостазу, а також гострих і хронічних запальних процесів, беручи участь у ініціації, підтримці, а також у регресії запалення. Ендогенні ліпідні медіатори здійснюють безліч внутрішньоклітинних та позаклітинних ефектів на всі клітини, особливо на ендотеліальні клітини, клітини вродженої та адаптивної імунної системи та тканинспецифічні клітини. Біоактивні ліпіди відповідно до їхніх біохімічних функцій поділяють на класичні ейкозаноїди, специфічні медіатори, лізоглїцерофосфоліпіди, сфінголіпіди та ендоканабіноїди [2].

Біологічно активні насичені киснем поліненасичені жирні кислоти, які утворюються з арахідонової кислоти (АК), отримали назву ейкозаноїди. Добре відомо, що ейкозаноїди діють переважно аутокринним та/або паракринним чином, що зумовлено коротким періодом їх напіввиведення. Вони беруть участь у гомеостазі, а також у ініціації, підтримці та регресії запалення. Синтез усіх ейкозаноїдів базується на гідролізі АК мембранних гліцерофосфоліпідів, що каталізуються цитозольною фосфоліпазою А2 та після вивільнення метаболізується трьома основними шляхами: циклооксигеназами (ЦОГ), ліпоксигеназами (ЛОГ) та цитохромом Р450, що визначає три основні класи ейкозаноїдів [2–4]. ЦОГ забезпечує синтез простагландинів (ПГ), простациклі-

нів та тромбоксанів (Тх), а ЛОГ реалізує синтез лейкотрієнів (ЛТ) та гідроксиейкозатетраїноїдів (НЕТЕ) і ліпоксинів (рис. 1).

Простаноїди, включаючи ПГ, такі як ПГД2, ПГЕ2, ПГІ2 та ПГF2 α , сьогодні є центральним предметом дослідження серед ейкозаноїдів, особливо у світлі здатності нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) блокувати їх синтез шляхом ковалентного інгібування ЦОГ [2]. Відомо, що ПГ індукують хронічне запалення через п'ять основних механізмів:

- 1) посилення каскаду вивільнення прозапальних цитокінів [6];
- 2) посилення відповіді вродженого імунітету на молекулярні структури, пов'язані з патогенами та пошкодженнями (РАМР і DAMP) [7];
- 3) активація специфічних прозапальних підмножин Т-хелперних клітин, наприклад Th1 та Th17 [8];
- 4) залучення імунних клітин, пов'язаних із хронічним запаленням (наприклад, макрофагів, Т- та В-клітин), шляхом синергічної дії з хемокінами [9];
- 5) збільшення кількості прозапальних генів, індукованих цитокінами.

Беручи до уваги ключову роль ейкозаноїдів у розвитку запалення, зокрема при РА, увагу дослідників усе частіше привертають пошук та вивчення нових підходів до селективної модуляції активності окремих сигнальних молекул – похідних АК. Нашу увагу як інноваційного підходу до лікування системних аутоімунних захворювань, зокрема РА, привернуло застосування сучасних біотехнологічних засобів, які не містять клітин – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), які, за даними літератури, можуть володіти протизапальною та іншими видами біологічної дії [10; 11].

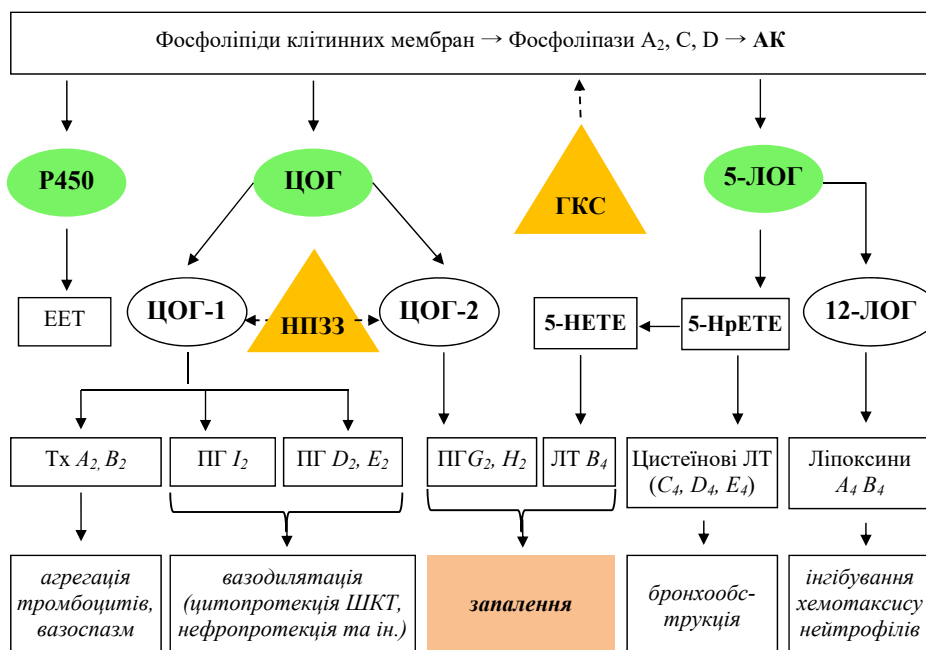


Рис. 1. Каскад АК та біологічні ефекти ейкозаноїдів [5]

Примітки. ГКС – глюкокортикостероїди; ЕЕТ – епоксиейкозатетраєнові кислоти; ЛОГ – ліпооксигеназа; ЛТ – лейкотрієни; Н(р)ЕТЕ – гідроксиейкозатетраєнова кислота; НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби; ПГ – простагландини; P450 – цитохром P450; TxA_2 – тромбоксан A_2 ; ЦОГ – циклооксигеназа

Простаноїди, включаючи ПГ, такі як ПГ D_2 , ПГ E_2 , ПГ I_2 та ПГ $F_2\alpha$, сьогодні є центральним предметом дослідження серед ейкозаноїдів, особливо у світлі здатності нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) блокувати їх синтез шляхом ковалентного інгібування ЦОГ [2]. Відомо, що ПГ індукують хронічне запалення через п'ять основних механізмів:

1) посилення каскаду вивільнення прозапальних цитокінів [6];

2) посилення відповіді вродженого імунітету на молекулярні структури, пов'язані з патогенами та пошкодженнями (PAMP і DAMP) [7];

3) активація специфічних прозапальних підмножин Т-хелперних клітин, наприклад Th1 та Th17 [8];

4) залучення імунних клітин, пов'язаних із хронічним запаленням (наприклад, макрофагів, Т- та В-клітин), шляхом синергічної дії з хемокінами [9];

5) збільшення кількості прозапальних генів, індукованих цитокінами.

Беручи до уваги ключову роль ейкозаноїдів у розвитку запалення, зокрема при РА, увагу дослідників усе частіше привертають пошук та вивчення нових підходів до селективної модуляції активності окремих сигнальних молекул – похідних АК. Нашу увагу як інноваційного підходу до лікування системних аутоімунних захворювань,

зокрема РА, привернуло застосування сучасних біотехнологічних засобів, які не містять клітин – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), які, за даними літератури, можуть володіти протизапальною та іншими видами біологічної дії [10; 11].

Мета дослідження – охарактеризувати вплив кріоекстрактів плаценти та селезінки, а також кондиціонованого середовища МСК на вміст простагландину E_2 , тромбоксану B_2 та лейкотрієну B_4 у сироватці крові на моделі ад'ювантного артриту у щурів.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах масою 200–220 г відповідно 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) [12; 13]. Як відомо, АА у щурів має усі морфофункціональні ознаки РА у людини та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. АА моделювали субплантарним введенням щурам («0» день експерименту) ПАФ (Thermo Fisher Scientific, США) у задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [14].

Лікування АА проводилося з 14-го по 28-й день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили в/м з інтервалом два дні (усього п'ять ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та 26 дні. Як референс-препарат використано НПЗЗ – диклофенак натрію (ДН), який вводили внутрішньом'язово (в/м) у дозі 8,0 мг/кг [14; 15]. Щурів розподіляли на шість 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 у 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 28-му добу експерименту тварин виводили з експерименту, відбирали зразки змішаної (венозної та артеріальної) крові. У сироватці крові імуноферментним методом [20] за допомогою наборів для імуноферментного аналізу (*Neogen Corporation, США*) визначали вміст ПГ Е2 (ELISA Kit-404110), Тх В2 (ELISA Kit 405110) та ЛТ В4 (ELISA Kit 406110).

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 з 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 із 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 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 розморожені після триразового 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 і 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 ($\lambda = 540$ 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 урахуванням, 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°C/хв до –70°C із подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C) [22].

Етап 3 (водно-сольова екстракція). Матеріал відігривали на водяній бані з температурою 37–40°C та відмивали від кріопротектора фізіо-

логічним розчином. Для одержання водно-солевих екстрактів фрагменти селезінки інкубували у 0,9% розчині NaCl упродовж 90 хв за температури 22–24°C. Для видалення термолабільних протеїнів супернатант прогрівали на водяній бані з температурою 37–40°C 15 хв та очищали, пропускаючи через фільтрувальний папір [23–25]. КЕС стандартизували за вмістом білка (0,1 мг/мл), який визначали спектрофотометрично [26].

Препарат КЕС з умістом 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% CO₂). КС збирати після третього 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 у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро – Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. За нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Стьюдента. 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. За ненормального розподілу отриманих величин дані представлені у вигляді Me [LQ; UQ], де Me – медіана, [LQ; UQ] – верхня межа нижнього квантиля (lower quartile – LQ) та нижня межа верхнього квантиля (upper quartile – UQ) [28–30].

Результати дослідження та їх обговорення. Установлено, що на 28-му добу експерименту у щурів з АА відзначалося значне статистично вірогідне зростання рівня всіх досліджуваних ейкозаноїдів у сироватці периферичної крові. Так, у нелікованих тварин з АА на 28-й день рівень ПГЕ2 був вищим ($p < 0,01$) на 34,7%, рівень ТхВ2 був вищим ($p < 0,001$) на 72,4%, а рівень ЛТВ4 був вищим ($p < 0,001$) на 74,7% за показники інтактних

тварин (табл. 1). Як відомо, ПГЕ2 є основним ПГ, який синтезується у т. ч. хондроцитами та синовіальними фібробластами, а його біосинтез може бути посилений прозапальними цитокінами [31]. Е. Ferrante та співавт. встановили, що біосинтез ТхА2, який контролювали за допомогою аналізу рівня ТхВ2 – стабільного продукту неферментативної гідратації ТхА2, у пацієнтів із РА був значно вищий, аніж у здорових добровольців [32]. За даними [33], ЛТВ4 відіграє важливу роль в індукції болю та ушкодженні кісток при РА, а також призводить до посиленого вивільнення прозапальних цитокінів.

На тлі застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів, як і референс-препарату ДН, відзначалося зниження рівня всіх досліджуваних ейкозаноїдів. Найвиразніше зниження рівня ПГЕ2 показано на тлі застосування КС-МСК: указаний показник статистично вірогідно ($p < 0,05$) був нижчим на 24,8% відносно показників тварин контрольної групи та на 7,1% був нижчим за показники тварин, яким вводили ДН (табл. 1). На тлі застосування КЕС та КЕП рівень ПГЕ2 мав тенденцію до зниження відносно показників щурів з АА без лікування, проте ці зміни не досягли рівня статистичної значущості.

Серед досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів найвиразніший вплив на рівень ТхВ2 установлено на тлі введення КС-МСК. У щурів, які отримували похідне культивування МСК, рівень ТхВ2 статистично вірогідно ($p < 0,01$) був нижчим на 30,3% відносно нелікованих тварин з АА на 28-й день експерименту, що лише на 7,2% було нижчим за показники щурів з АА, які отримували ДН (табл. 1).

Зміни з боку рівня ЛТВ4 у сироватці периферичної крові щурів з АА продемонстрували, що найвиразніше зниження вказаного лейкотрієну відзначалося на тлі застосування КС-МСК (25,6%).

Висновки

1. Розвиток АА у щурів супроводжувався зростанням рівня ПГЕ2 на 34,7% ($p < 0,01$), ТхВ2 – на 72,4% ($p < 0,001$) та ЛТВ4 – на 74,7% ($p < 0,001$) відносно показників інтактних тварин, що підтверджувало імунозапальний характер змодельованої патології.

2. Застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів призвело до зниження рівня досліджуваних ейкозаноїдів у сироватці крові щурів з АА на 28-й день експерименту. Найвиразніші зміни відзначено на тлі введення КС-МСК: рівень ПГЕ2 знизився на 24,8%

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на вміст простагландину E2, тромбоксану B2 та лейкотрієну B4 у сироватці крові щурів з АА на 28-й день експерименту, пг/мл ($M \pm m$, 95 % ДІ, n=42)

Досліджуваний показник, одиниці вимірювання	Умови експерименту					
	I (1) група	II (2) група	III (3) група	IV (4) група	V (5) група	VI (6) група
	Інтактні щури	Контроль (АА без лікування)	АА + ДН	АА + КЕП	АА + КЕС	АА + КС-МСК
n	7	7	7	7	7	7
Простагландин E2, пг/мл	840 [785; 890]	1210 [915; 1285] $p_1 < 0,01$ [34,7%]	980 [965; 1050] $p_2 = 0,4$ [19,0%]	990 [820; 1185] $p_2 = 0,2$ [18,2%] $p_3 = 0,5$ [1,0%]	1000 [940; 1265] $p_2 = 0,5$ [17,4%] $p_3 = 0,4$ [2,0%]	910 [880; 1005] $p_2 < 0,05$ [24,8%] $p_3 < 0,05$ [7,1%]
Тромбоксан B2, пг/мл	249±17 (95 % ДІ: 215–282)	429±32 (95 % ДІ: 367–491) $p_1 < 0,001$ [72,4%]	279±13 (95 % ДІ: 253–304) $p_2 < 0,001$ [35,0%]	301±21 (95 % ДІ: 260–343) $p_2 < 0,01$ [29,7%] $p_3 = 0,4$ [8,2%]	341±22 (95 % ДІ: 299–384) $p_2 < 0,05$ [20,3%] $p_3 < 0,05$ [22,6%]	299±15 (95 % ДІ: 270–327) $p_2 < 0,01$ [30,3%] $p_3 = 0,3$ [7,2%]
Лейкотрієн B4, пг/мл	243±17 (95 % ДІ: 209–277)	424±19 (95 % ДІ: 387–461) $p_1 < 0,001$ [74,7%]	349±20 (95 % ДІ: 309–388) $p_2 = 0,018$ [17,8%]	371±19 (95 % ДІ: 334–409) $p_2 = 0,018$ [12,5%] $p_3 = 0,4$ [6,6%]	406±32 (95 % ДІ: 344–468) $p_2 = 0,6$ [4,4%] $p_3 = 0,2$ [16,4%]	316±29 (95 % ДІ: 258–373) $p_2 = 0,01$ [25,6%] $p_3 = 0,4$ [9,4%]

Примітки:

p_1 – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;

[%] – значення розбіжностей показників у відсотках;

Індексом i_1, i_2, i_3 вказано номер групи, з показниками якої проведено зрівняння.

($p < 0,05$), ТхB2 – на 30,3% ($p < 0,01$) та ЛТВ4 – на 25,6% ($p < 0,01$) відносно показників щурів з АА без лікування.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати про здатність застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засо-

бів нормалізувати рівень окремих ейкозаноїдів (ПГЕ2, ТхB2, ЛТВ4) у периферичній крові щурів з експериментальним ревматоїдним артритом вказують на доцільність поглибленого вивчення протизапальної активності кріоекстрактів плаценти та селезінки, а також КС-МСК.

ЛІТЕРАТУРА

- Huang J., Fu X., Chen X., Li Z., Huang Y., Liang C. Promising Therapeutic Targets for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2021. № 12. P. 686155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.686155>
- Chiurchiù V., Leuti A., Maccarrone M. Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Front Immunol.* 2018. № 9. P. 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00038>
- Artru F., McPhail M.J.W., Triantafyllou E., Trovato F.M. Lipids in Liver Failure Syndromes: A Focus on Eicosanoids, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and Lysophospholipids. *Front Immunol.* 2022. № 13. P. 867261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867261>
- Dennis E.A., Norris P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015. № 15(8). P. 511–523. <https://doi.org/10.1038/nri3859>
- Hladkykh F.V., Chyzh M.O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a modern understanding of the mechanisms of damage to the digestive tract, the shortcomings of pathogenetic drugs and prospects for biological therapy of NSAID-induced esophagogastrocolonopathy. *Gastroenterology.* 2020. № 4. P. 253–266. <https://doi.org/10.22141/2308-2097.54.4.2020.216714>
- Honda T., Segi-Nishida E., Miyachi Y., Narumiya S. Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 2006. № 203(2). P. 325–335. <https://doi.org/10.1084/jem.20051310>
- Hirata T., Narumiya S. Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol.* 2012. № 116. P. 143–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00005-3>

8. Chen Q., Muramoto K., Masaaki N., Ding Y., Yang H., Mackey M., Li W., Inoue Y., et al. A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br J Pharmacol.* 2010. № 160(2). P. 292–310. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00647.x>
9. Aoki T., Narumiya S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2012. № 33(6). P. 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.004>
10. Hladkykh F.V. 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). P. 364–367. <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>
11. Hladkykh F.V. 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). P. 326–336. [https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11\(4\):326-336](https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11(4):326-336)
12. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology.* 1947. № 1. P. 291–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
13. 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). P. 280–293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
14. Stefanov O.V., ed. *Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations.* Kyiv: Avicenna. 2001. 527 p.
15. Hladkykh F.V. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization. *Vynnytsia: Tvoty.* 2022. 216 p. <https://doi.org/10.46879/2022.1>
16. Shepitko V.I. 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.ukrntei.ua/searchdoc/0504U000610/>
17. Bepalova I.G. 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.ukrntei.ua/searchdoc/0416U004539/>
18. Golubinskaya P.A., Sarycheva M.V., Dolzhikov A.A., Bondarev V.P., Stefanova M.S., Soldatov V.O., Nadezhdin S.V., Korokin M.V., 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). P. 416–425. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
19. Globa V.Yu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. Thesis in specialty 222 – Medicine, Kharkiv, 2021. 156 p. <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0821U100913/>
20. Fereidoni M., Ahmadiani A., Semnani S., Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 2000. № 43(1). P. 11–14. [http://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00089-7](http://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00089-7)
21. Prokopyuk O.S. 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.ukrntei.ua/searchdoc/0514U000218/>
22. Galchenko S.E., Shkodovska N.Y., Sandomirsky B.P., Hryshchenko V.I. 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 S.E. Extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans: procurement and biological effect. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2005. № 15(3). P. 403–406.
24. Bepalova I.G., Rogoza L.A., Galchenko S.Y., Sandomirsky B.P. 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). P. 151–161. <https://doi.org/10.15407/cryo25.02.151>
25. Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Byzov V.V. 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 L.C. 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.ukrntei.ua/searchdoc/0408U004142/>
27. Nesteruk G.V., Alabedalkarim N.M., Kolot N.V., Komaromi N.A., Protsenko O.S., Legach E.I. 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). P. 88–96. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2022.2.13>
28. Zar J.H. *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014; 960 p.
29. Tripathy J.P. Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health.* 2013. № 42(12). P. 1478–1479.
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). P. 157–163.
31. Fattahi M.J., Mirshafiey A. Prostaglandins and rheumatoid arthritis. *Arthritis.* 2012. № 2012. P. 239310. <https://doi.org/10.1155/2012/239310>
32. Ferrante E., Vazzana N., Santilli F., Di Cicco M., Lauriti C., Di Battista L., Ciabattini G., Di Matteo L., Davi G. Determinants of thromboxane biosynthesis in rheumatoid arthritis: Role of RAGE and oxidant stress. *Free Radic Biol Med.* 2010. № 49(5). P. 857–864.

33. Zheng L.X., Li K.X., Hong F.F., Yang S.L. Pain and bone damage in rheumatoid arthritis: role of leukotriene B4. *Clin Exp Rheumatol.* 2019. № 37(5). P. 872–878.

REFERENCES

- Huang, J., Fu, X., Chen, X., Li Z., Huang Y., Liang C. (2021). Promising Therapeutic Targets for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*, 12, 686155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.686155>
- Chiurchiù, V., Leuti, A., Maccarrone, M. (2018). Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Front Immunol*, 9, 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00038>
- Artru, F., McPhail, M.J.W., Triantafyllou, E., Trovato, F.M. (2022). Lipids in Liver Failure Syndromes: A Focus on Eicosanoids, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and Lysophospholipids. *Front Immunol*, 13, 867261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867261>
- Dennis, E.A., Norris, P.C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 511–523. <https://doi.org/10.1038/nri3859>
- Hladkykh, F.V., Chyzh, M.O. (2020). Nesteroidni protyzapalni zasoby: suchasne uiavlennia pro mekhanizmy ushkodzhennia travnoho traktu, nedoliky preparativ patohenetychnoho likuvannia ta perspektyvy biolohichnoi terapii NPZZ-indukovanoi ezofahohastroenterokolonopatii [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a modern understanding of the mechanisms of damage to the digestive tract, the shortcomings of pathogenetic drugs and prospects for biological therapy of NSAID-induced esophagogastroenterocolonopathy]. *Gastroenterology*, 4, 253–266. <https://doi.org/10.22141/2308-2097.54.4.2020.216714> [In Ukrainian].
- Honda, T., Segi-Nishida, E., Miyachi, Y., Narumiya, S. (2006). Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 203(2), 325–335. <https://doi.org/10.1084/jem.20051310>
- Hirata, T., Narumiya, S. (2012). Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol*, 116, 143–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00005-3>
- Chen, Q., Muramoto, K., Masaaki, N., Ding, Y., Yang, H., Mackey, M., Li, W., Inoue, Y., et al. (2010). A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br J Pharmacol*, 160(2), 292–310. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00647.x>
- Aoki, T., Narumiya, S. (2012). Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 33(6), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.004>
- Hladkykh, F.V. (2021). Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium on background of its combined use with cryopreserved placenta extract in experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 31(4), 364–367. <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>
- Hladkykh, F.V. (2023). Suchasne uiavlennia pro imunolohichne pidgruntia revmatoidnoho artrytu: vid posttranslatsiinoi modyfikatsii bilkiv do zastosuvannia protyrevmatychnykh preparativ, shcho modyfikuiut [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*, 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) [In Ukrainian].
- Freund, J. (1947). Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*, 1, 291–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
- Harold, F. (2005). Stils, adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants, *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 46(3), 280–293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
- Stefanov, O.V., ed. *Doklinichni doslizhennia likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations]. Kyiv: Avicenna. 2001, 527 p. [In Ukrainian].
- Hladkykh, F.V. (2022). Nesteroidni protyzapalni zasoby: terapevtychni ta nebazhani efekty, shliakhy yikh optymizatsii [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization]. *Vinnytsia: Tvoty*, 216 p. <https://doi.org/10.46879/2022.1> [In Ukrainian].
- Shepitko, V.I. (2004). *Strukturno-funktsionalni pokaznyky kriokonservovanoi pechinky i vplyv yii transplantatsii na morfofunktsionalnyi stan riadu vnutrishnikh orhaniv* [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, 326 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/> [In Ukrainian].
- Bespalova, I.G. (2016). *Peptydnyi sklad ta biolohichna diia ekstraktiv kriokonservovanykh frahmentiv selezinky svynei ta shkiry porosiat* [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, 162 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/> [In Ukrainian].
- Golubinskaya, P.A., Sarycheva, M.V., Dolzhikov, A.A., Bondarev, V.P., Stefanova, M.S., Soldatov, V.O., Nadezhdin, S.V., Korokin, M.V., et al. (2020). Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*, 8(6), 416–425. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
- Globa, V.Yu. (2021). *Zastosuvannia kriokonservovanykh kultur klityn ta neirotrofichnykh faktoriv pry eksperymentalnii infravezikalnii obstruktsii* [Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction]. Thesis in specialty 222 – Medicine, Kharkiv, 156 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/> [In Ukrainian].

20. Fereidoni, M., Ahmadiani, A., Semnani, S., Javan, M. (2000). An accurate and simple method for measurement of paw edema. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 43(1), 11–14. [http://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00089-7](http://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00089-7)
21. Prokopyuk, O.S. (2011). Kriokonservuvannia platsenty ta vyznachennia mekhanizmiv yii vplyvu na orhanizm retsypientiv piznoho ontogenezu (eksperymentalne doslidzhennia) [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, 351 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0514U000218/> [In Ukrainian].
22. Galchenko, S.E., Shkodovska, N.Y., Sandomirsky, B.P., Hryshchenko, V.I. (2004). 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. [In Ukrainian].
23. Galchenko, S.E. (2005). Extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans: procurement and biological effect. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 15(3), 403–406.
24. Bepalova, I.G., Rogoza, L.A., Galchenko, S.Y., Sandomirsky, B.P. (2015). Extracts of cryopreserved fragments of pig spleen and piglet skin affect the healing of cold wounds in rats. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 25(2), 151–161. <https://doi.org/10.15407/cryo25.02.151>
25. Sandomirsky, B.P., Galchenko, S.E., Byzov, V.V. (2001). Pryhotuvannia, kriokonservuvannia ta klinichne vykorystannia frahmentiv selezinky svynei ta yikh ekstraktu: Metodychni rekomendatsii [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, 9 p. [In Ukrainian].
26. Olefirenko, L.C. (2008). Vplyv kriodestruksii, ekstraktiv pechinky i selezinky na vidnovni protsesy v pechyntsi pry eksperymentalnomu tsyrozi [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, 101 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0408U004142/> [In Ukrainian].
27. Nesteruk, G.V., Alabedalkarim, N.M., Kolot, N.V., Komaromi, N.A., Protsenko, O.S., Legach, E.I. (2022). The effect of conditioned media from glial cell cultures on the reproductive system of female rats of different ages. *Problems of endocrine pathology*, 79(2), 88–96. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2022.2.13>
28. Zar, J.H. (2014). *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood, 960 p.
29. Tripathy, J.P. (2013). Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health*, 42(12), 1478–1479.
30. Yan, F., Robert, M., Li Y. (2017). Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 9(5), 157–163.
31. Fattahi, M.J., Mirshafey, A. (2012). Prostaglandins and rheumatoid arthritis. *Arthritis*, 2012, 239310. <https://doi.org/10.1155/2012/239310>
32. Ferrante, E., Vazzana, N., Santilli, F., Di Cicco, M., Lauriti, C., Di Battista, L., Ciabattoni, G., Di Matteo, L., Davi, G. (2010). Determinants of thromboxane biosynthesis in rheumatoid arthritis: Role of RAGE and oxidant stress. *Free Radic Biol Med*, 49(5), 857–864.
33. Zheng, L.X., Li, K.X., Hong, F.F., Yang, S.L. (2019). Pain and bone damage in rheumatoid arthritis: role of leukotriene B4. *Clin Exp Rheumatol*, 37(5), 872–878.