

DOI: <https://doi.org/10.26565/2312-5675-2024-24-02>

УДК: 632.938+616.832-004.2+612.821+612.833.81+615.324+615.832.98+576.5



## Оцінка орієнтовно-дослідницької активності щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі введення безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів

Гладких Ф.В.<sup>1,2</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна  
Міністерства освіти і науки України, Харків, Україна

<sup>2</sup>Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва  
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

## Evaluation of tentative and research activity in rats with experimental allergic encephalomyelitis against the administration of cell-free cryopreserved biological agents

Hladkykh F.V.<sup>1,2</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University  
of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine  
<sup>2</sup>State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology  
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

### Ключові слова:

аутоімунні захворювання, розсіяний склероз, алергічний енцефаломієліт, орієнтовно-дослідницька активність, відкрите поле, кріоекстракт плаценти, кріоекстракт селезінки, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин.

### Для кореспонденції:

Гладких Федір Володимирович  
Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва  
Національної академії медичних наук України», відділ радіології;  
вул. Григорія Сковороди, буд. 82,  
м. Харків, Україна, 61024;  
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

© Гладких Ф.В., 2024

### РЕЗЮМЕ

**Актуальність.** На сьогодні в Україні проживає 20924 людини зі встановленим діагнозом розсіяний склероз (РС). Класичною моделлю РС у лабораторних тварин виступає експериментальний алергічний енцефаломієліт (АЕМ). У якості нової стратегії лікування РС нашу увагу привернуло застосування сучасних біотехнологічних засобів, які не містять клітин – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК).

**Мета роботи** – охарактеризувати орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі введення безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (КЕП, КЕС та КС-МСК).

**Матеріали та методи.** Дослідження проведено на 42 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200–220 г. АЕМ моделювали шляхом введення щурам підшкірно в основу хвоста енцефалітогенної емульсії у дозі 1,0 мл/кг маси тіла. Енцефалітогенну емульсію для щурів готували за методикою Нефьодова О.О. та співавт. (2017 р.). Емульсія складалась з повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) та гомогенату аlogenного головного мозку у співвідношенні 1:1. Лікування АЕМ проводилось з 12 по 20 день експерименту. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили через день в/м (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні. У якості референс-препарату використано глюкокортикоїд метилпреднізолон (МП). Поведінкові реакції тварин досліджували у тесті «відкрите поле». Для дослідження поведінкових реакцій щурів по черзі поміщали в центр квадратної платформи та впродовж 3 хвилин реєстрували поведінкові реакції, які обраховували як суму епізодів за типом активності: рухова активність (кількість квадратів, у які зайшла тварина); дослідницька активність (сумарна кількість підйомів на задні кінцівки та кількість зазирань та/або обнюхань «нірок»).

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що введення енцефалітогенної емульсії призвело до виразних розладів орієнтовно-дослідницької активності у щурів. На 12-ту добу експерименту відмічалось статистично вірогідне ( $p = 0,009$ ) зниження на 78,8% рухової активності та статистично вірогідне ( $p < 0,01$ ) зниження дослідницької активності щурів з АЕМ на 78,0% відносно вихідних показників. Зниження рухової активності тварин з АЕМ вочевидь обумовлене руховими розладами, які як відомо характерні для хворих на РС. На 21-й день експерименту у щурів контрольної групи з АЕМ без лікування відмічено відносний регрес порушень орієнтовно-дослідницької активності, проте досліджувані показники залишались значно нижчими за їх вихідні значення. Аналіз відновлення рухової активності на 21-й день експерименту у щурів з АЕМ показав, що найвиразніше

зазначений показник зростав на тлі п'ятиразового введення КС-МСК ( $p < 0,01$ ), а найменше ( $p < 0,01$ ) рухова активність відновились у щурів, яким вводили КЕС. Дослідження дослідницької активності щурів з АЕМ показало, що введення досліджуваних біологічних препаратів привело до відновлення зазначеного спектра активності у щурів на 21-й день експерименту. Встановлено, КС-МСК та КЕС перевищували ефективність МП за здатністю відновлювати дослідницьку активність щурів з АЕМ, що може вказувати на їх не лише протизапальну активність, а і можливу нейропротективну дію на моделі досліджуваного аутоімунного нейродегенеративного захворювання.

**Висновки.** За здатністю відновлювати рухову активність (відсоток змін показника на 21-шу добу відносно показника на 12-ту добу) при АЕМ у щурів досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності: КС-МСК (368,6%) > КЕП (286,1%) > КЕС (102,0%). За здатністю відновлювати дослідницьку активність у щурів з АЕМ на 21-й день експерименту досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності (відсоток змін показника на 21-шу добу відносно показника на 12-ту добу): КС-МСК (347,1%;  $p < 0,01$ ) > КЕС (186,2;  $p < 0,01$ ) > КЕП (131,8%;  $p < 0,01$ ).

#### Для цитування:

Гладких Ф.В. Оцінка орієнтовно-дослідницької активності щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі введення безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів. *Психіатрія, неврологія та медична психологія*. 2024. Т. 11, № 2(24). С. 124–137. DOI: <https://doi.org/10.26565/2312-5675-2024-24-02>

#### Key words:

autoimmune diseases, multiple sclerosis, allergic encephalomyelitis, tentative research activity, open field, placenta cryoextract, spleen cryoextract, conditioned medium of mesenchymal stem cells.

#### For correspondence:

*Hladkykh Fedir Volodymyrovych*  
State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Radiology Department, 82 Hryhoriia Skovorody Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;  
e-mail: [fedir.hladkykh@gmail.com](mailto:fedir.hladkykh@gmail.com)

© *Hladkykh F.V.*, 2024

#### ABSTRACT

**Background.** Today, 20,924 people with a diagnosis of multiple sclerosis (MS) live in Ukraine. Experimental allergic encephalomyelitis (AEM) is a classical model of MS in laboratory animals. As a new strategy for the treatment of MS, our attention was drawn to the use of modern biotechnological means that do not contain cells – placenta cryoextract (CEP), spleen cryoextract (CES) and conditioned medium of mesenchymal stem cells (MSC-CM).

**Purpose** – to characterize the tentative research activity of rats with experimental allergic encephalomyelitis against the background of the introduction of cell-free cryopreserved biological agents (CEP, CES and MSC-CM).

**Materials and Methods.** The study was conducted on 42 non-linear laboratory male rats weighing 200–220 g. AEM was modeled by injecting rats with an encephalitogenic emulsion subcutaneously at the base of the tail at a dose of 1.0 ml/kg of body weight. Encephalitogenic emulsion for rats was prepared according to the method by O.O. Nefiodov and al. (2017). The emulsion consisted of Complete Freund's Adjuvant (CFA) and allogeneic brain homogenate in a 1:1 ratio. AEM treatment was carried out from the 12<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> day of the experiment. CcEP, CES and MSC-CM were administered every other day intramuscularly (a total of 5 injections), on days 12, 14, 16, 18 and 20, respectively. The glucocorticoid methylprednisolone (MP) was used as a reference drug. Behavioral responses of animals were studied in the «open field» test. To study behavioral reactions, rats were placed in the center of a square platform one by one, and behavioral reactions were recorded for 3 minutes, which were calculated as the sum of episodes by activity type: motor activity (number of squares entered by the animal); exploratory activity (total number of rear-limb climbs and number of peeks and/or sniffs at «burrows»).

**Results.** It was established that the introduction of an encephalitogenic emulsion from an allogeneic brain homogenate and CFA in a ratio of 1:1 led to pronounced disorders of orientation-research activity in rats on the 12<sup>th</sup> day of the experiment. The development of AEM in rats was accompanied by pronounced disorders of orientation and research activity. On the 12<sup>th</sup> day of the experiment, a statistically significant ( $p = 0.009$ ) decrease in motor activity by 78.8% and a statistically significant ( $p < 0.01$ ) decrease in exploratory activity of rats with AEM by 78.0% relative to baseline values were observed. On the 21<sup>st</sup> day of the experiment, the rats of the control group with AEM without treatment showed a relative regression of disorders of orientational research activity, however, the studied indicators remained significantly lower than their initial values. The analysis of the recovery of motor activity on the 21<sup>st</sup> day of the experiment in rats with AEM showed that the most clearly indicated indicator increased against the background of five-time introduction of MSC-CM ( $p < 0.01$ ), and the least ( $p < 0.01$ ) motor activity was restored in rats, which was administered CES. A study of the research activity of rats with AEM showed that the introduction of the studied biological drugs led to the restoration of the indicated spectrum of activity in rats on the 21<sup>st</sup> day of the experiment. It was found that MSC-CM and CES exceeded the effectiveness of MP in terms of the ability to restore the research activity of rats with AEM, which may indicate not only their

anti-inflammatory activity, but also a possible neuroprotective effect on the model of the studied autoimmune neurodegenerative disease.

**Conclusions.** According to the ability to restore locomotor activity (% of changes in the indicator at 21 days compared to the indicator at 12 days) in AEM in rats, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence: MSC-CM (368.6%) > CEP (286.1%) > CES (102.0%). According to the ability to restore research activity in rats with AEM on the 21st day of the experiment, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be placed in the following sequence (% changes in the indicator on the 21st day relative to the indicator on the 12th day): MSC-CM (347.1%;  $p < 0, 01$ ) > CES (186.2;  $p < 0.01$ ) > CEP (131.8%;  $p < 0.01$ ).

#### For citation:

Hladkykh FV. Evaluation of tentative and research activity in rats with experimental allergic encephalomyelitis against the administration of cell-free cryopreserved biological agents. *Psychiatry, Neurology and Medical Psychology*. 2024;11(2(24)):124–137. DOI: <https://doi.org/10.26565/2312-5675-2024-24-02>

#### ВСТУП

Запалення, демієлінізація, гліоз і втрата нейронів є компонентами розсіяного склерозу (РС) – хронічного аутоімунного захворювання, яке уражує центральну нервову систему (ЦНС) [1]. РС часто називають хворобою «1000 облич», що пов'язано зі значною кількістю симптомів, які можуть виникати – розлади зору, рухові порушення, дисфункція сечового міхура та сексуальна дисфункція, когнітивні симптоми, втома та ін. [2].

Дані нейроімунологічного реєстру MSBase (<https://www.msbase.org/>) показують, що кількість людей із РС у всьому світі зростає з 2,3 мільйони у 2013 році до 2,8 мільйони у 2020 році та 2,9 у 2023 році. На сьогоднішній день в Україні проживає 20924 людини зі встановленим діагнозом РС, у Польщі – 51000, у Німеччині – 280000, у Великобританії – 133780 (<https://www.atlasofms.org/>) [3].

Етіологія РС є багатогранною, та включає екологічні, інфекційні (наприклад, вірус Епштейна–Барра та ін.), генетичні, харчові (наприклад, дефіцит вітаміну D) та епігенетичні компоненти. Прогресування РС тісно пов'язане із запальною демієлінізацією, однак прогресуюча нейродегенерація може відбуватися й окремо від гострого запалення і характеризується втратою аксонів і атрофією білої та сірої речовини [4].

Класичною моделлю РС у лабораторних тварин виступає експериментальний алергічний енцефаломієліт (АЕМ), який базується на імунізації аутоантигенами, отриманими з ЦНС, емульгованими в сильних імунних ад'ювантах, сприяючи тим самим активації Т-клітин CD4 та індукції аутоантитіл. Показано, що інтерферон- $\gamma$ -секретуючі Th1 та інтерлейкін-17-секретуючі Th17 клітини, а також гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, що продукують підгрупи Т-клітин CD4, відіграють ключову патогенну роль у запуску АЕМ [2].

У міру розвитку клінічного розуміння перебігу РС розширювалася й різноманітність доступних методів лікування. У центрі уваги всіх існуючих методів лікування РС – боротьба із запальним процесом [1]. На сьогодні існують різні терапевтичні стратегії для лікування людей з рецидивуючим ремітуючим РС, включаючи імуномодулятори, імунодепресанти та біологічні препарати [5].

Останніми роками імуносупресивні властивості мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) були про-

#### INTRODUCTION

Inflammation, demyelination, gliosis, and neuronal loss constitute the hallmark features of multiple sclerosis (MS), a chronic autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS) [1]. MS is often referred to as the disease of «1000 faces» due to its diverse array of symptoms, including visual disturbances, movement disorders, bladder and sexual dysfunction, cognitive impairments, and fatigue, among others [2].

According to data from the MSBase Neuroimmunology Registry (<https://www.msbase.org/>), the global prevalence of MS has risen from 2.3 million in 2013 to 2.8 million in 2020 and reached 2.9 million in 2023. As of current statistics, there are 20,924 individuals diagnosed with MS in Ukraine, 51,000 in Poland, 280,000 in Germany, and 133,780 in Great Britain (<https://www.atlasofms.org/>) [3].

The etiology of MS is multifaceted, involving environmental factors, infectious agents (such as Epstein–Barr virus), genetic predisposition, nutritional influences (such as vitamin D deficiency), and epigenetic mechanisms. Disease progression in MS is primarily associated with inflammatory demyelination, although progressive neurodegeneration can manifest independently of acute inflammation, characterized by axonal loss and the atrophy of both white and gray matter [4].

A classic model used to study multiple sclerosis (MS) in laboratory animals is experimental allergic encephalomyelitis (EAE). This model involves immunization with CNS-derived autoantigens combined with strong immune adjuvants, which promotes activation of CD4 T-cells and induction of autoantibodies. Key pathogenic roles in EAE initiation have been attributed to interferon- $\gamma$ -secreting Th1 cells, interleukin-17-secreting Th17 cells, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing CD4 T-cell subsets [2].

As clinical understanding of MS has advanced, so too have treatment options. Currently, the primary focus of MS treatments is on combating the inflammatory processes [1]. Various therapeutic strategies exist for treating relapsing-remitting MS, including immunomodulators, immunosuppressants, and biologics [5].

In recent years, mesenchymal stem cells (MSCs) have garnered attention for their immunosuppressive properties demonstrated in preclinical studies and trials involving inflammatory and autoimmune diseases. New findings suggest that the immunomodulatory effects

демонстровані в доклінічних дослідженнях і випробуваннях запальних і аутоімунних захворювань. Нові дані свідчать про те, що імуномодулюючий ефект МСК пов'язаний насамперед з паракринним шляхом [6–8]. У якості нової стратегії лікування РС нашу увагу привернуло застосування сучасних біотехнологічних засобів, які не містять клітин – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондіціонованого середовища МСК (КС-МСК), які за даними літератури мають протизапальну активність [9].

**Мета роботи** – охарактеризувати орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі введення безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (КЕП, КЕС та КС-МСК).

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 42 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200–220 г. До початку експерименту щури впродовж 14-ти діб перебували в умовах карантину, після чого проводилась рандомізація на групи по 7 особин в кожній із подальшим утриманням в умовах стандартного водно-харчового раціону з вільним доступом до води та їжі [10]. Всі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами виконано з урахуванням вимог «Good Laboratory Practice», відображених в настанові «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затвердженої Законом України наказом Міністерства охорони здоров'я України № 95 від 16 лютого 2009 р. і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях від 18 березня 1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, наказу Міністерства охорони здоров'я України від 14 грудня 2009 р. № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

У якості безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів у роботі використано КЕП, КЕС та КС-МСК, які зберігалися у низькотемпературному середовищі. КЕП, КЕС та КС-МСК використано у дозах, які за даними літератури проявляли терапевтичний ефект при експериментальному (клінічному) застосуванні. Узагальнення відомостей про досліджування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ) наведено у табл. 1.

Експериментальний АЕМ є аутоімунною моделлю поствакцинальних і парайфекційних енцефаломієлітів та РС, яка дозволяє вивчити не тільки хронічну форму демієлінізуючих захворювань, але й гострі реактивні форми енцефаломієлітів [16]. Біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни при АЕМ мають принципову схожість з аналогічними змінами, що супроводжують аутоімунні демієлінізуючі ураження нервової системи в клініці, що дає підставу вважати експериментальний алергічний енцефаломієліт адекватною та оптимальною моделлю [17, 18].

of MSCs primarily occur through paracrine mechanisms [6–8]. A novel approach for MS treatment involves cell-free biotechnological products such as cryoextract of placenta (CEP), cryoextract of spleen (CES), and conditioned medium from MSCs (MSC-CMs), which have been reported to possess anti-inflammatory activity [9].

**Objective** – of this study is to characterize preliminary research involving rats with experimental allergic encephalomyelitis treated with cell-free cryopreserved biological agents (CEP, CES, and MSC-CMs).

## MATERIALS AND METHODS

The study involved 42 non-linear laboratory male rats weighing between 200–220 g. Prior to commencement of the experiment, the rats underwent a 14-day quarantine period. Subsequently, randomization placed them into groups of 7 individuals each, housed under standard conditions with ad libitum access to food and water [10].

All experimental procedures on laboratory animals adhered to «Good Laboratory Practice» guidelines as outlined in the instruction «Medicinal products. Proper laboratory practice,» approved by the Law of Ukraine under Ministry of Health Order No. 95, dated February 16, 2009. The study also complied with the fundamental principles of the Council of Europe Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, March 18, 1986, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of the EU dated September 22, 2010, concerning the protection of animals used for scientific purposes, and Ministry of Health of Ukraine Order No. 944, dated December 14, 2009, «On approval of the Procedure for conducting preclinical study of medicinal products and examination of materials of preclinical study of medicinal products» as well as the Law of Ukraine No. 3447-IV, dated February 21, 2006, «On the protection of animals from cruel treatment.»

The cell-free cryopreserved biological agents (CEP, CES, and MSC-CM) utilized in the study were stored at low temperatures. These agents were administered at doses previously demonstrated to have therapeutic efficacy in experimental (clinical) applications, as per literature findings. Table 1 provides a summary of information regarding the cell-free cryopreserved biological agents studied (CEP, CES, and MSC-CM).

Experimental AEM is an autoimmune model of post-vaccinal and parainfectious encephalomyelitis and MS, which allows studying not only the chronic form of demyelinating diseases, but also acute reactive forms of encephalomyelitis [16]. Biochemical, immunological, and morphological changes in AEM are fundamentally similar to similar changes accompanying autoimmune demyelinating lesions of the nervous system in the clinic, which gives reason to consider experimental allergic encephalomyelitis as an adequate and optimal model [17, 18].



**Таблиця 1.** Дозовий режим та стандартизація використаних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів  
**Table 1.** Dose regimen and standardization of used cell-free cryopreserved biological agents

Безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби Cell-free cryopreserved biological agents	Доза для щурів, мл/кг Dose for rats, ml/kg	Стандартизація / Standardization				Посилання Reference
		Предмет стандартизації Subject to standardization	Вміст на 1,0 мл безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів, мг/мл Content per 1.0 ml of cell-free cryopreserved biological agents, mg/ml	Вміст на 1,0 кг маси тіла, мг/кг Content per 1.0 kg of body weight, mg/kg	Вміст на 0,2 кг маси тіла, мг Content per 0.2 kg of body weight, mg	
Кріоекстракт плаценти Placenta cryoextract	2,5	загальний білок general protein	1,5	3,75	0,75	[11]
Кріоекстракт селезінки Spleen cryoextract	5,0		0,1	0,50	0,10	[12, 13]
Кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин Conditioned medium of mesenchymal stem cells	0,6	галектин-1 galectin-1	$6,0 \times 10^{-9}$	$3,60 \times 10^{-9}$	$0,72 \times 10^{-9}$	[14, 15]

За даними [17, 18] АЕМ, як і РС, супроводжується порушенням проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) і його функціональним ослабленням, периваскулярною запальною інфільтрацією в ЦНС, розвитком процесу демієлінізації, пошкодженням олігодендроцитів і аксонів, локальною активацією гліальних клітин [19]. Активовані Т-клітини (CD4+), інші лімфоцити і макрофаги мігрують в ЦНС через пошкоджений ГЕБ. Продукція лімфоцитами і гліальними клітинами запальних факторів зумовлює формування вогнищ запалення, демієлінізацію і фагоцитоз залишків мієліну [20]. На ранніх стадіях гострої форми експериментального АЕМ запальні цитокіни [21] і хемокіни [22] можуть ініціювати токсичний ефект щодо олігодендроцитів, який, імовірно, опосередковується дією ФНП- $\alpha$  або вільних радикалів; підвищення рівня останніх зумовлено надмірною активністю NO-синтази [23]. Макрофаги, які проникають в тканини ЦНС, можуть фагоцитувати мієлін і синтезувати фактори, потенційні небезпечні для мієлінових оболонки [24].

АЕМ моделювали шляхом введення щурам підшкірно в основу хвоста енцефалітогенної емульсії у дозі 1,0 мл/кг маси тіла. Емульсія складалась з повного ад'юванта Фрейнда – ПАФ (Thermo Fisher Scientific, США) та гомогенату алогенного головного мозку у співвідношенні 1:1 [10, 18].

ПАФ вміщує вакцину БЦЖ (від BCG – Bacillus Calmette–Guerin) або полісахариди, отримані з мікобактерій туберкульозу (Mycobacterium tuberculosis), складні жирні кислоти (деривати ланоліну), олії та емульгатор у співвідношенні: 10 мл ПАФ = 5 мл безводного ланоліну + 15 мл вазелінової олії + 50 мг вбитої нагріванням вакцини БЦЖ. ПАФ вважають «золотим стандартом» ад'ювантів і жоден ад'ювант не перевершує загальні імуностимулюючі властивості ПАФ [25–28].

ПАФ являє собою емульсію типу «вода в маслі», яка не розділяється на масляну та водну фази під час тривалого зберігання. Вазелінова олія, яка використовується в ПАФ, забезпечує такі три специфічні механізми дії: (1) створення депо антигену з повільним вивільненням, (2) забезпечення транспорту антигену через лімфатичну систему до дренуючих лімфатичних вузлів та селезінки, де

According to [17, 18], AEM, like MS, is accompanied by a violation of the permeability of the blood-brain barrier (BBB) and its functional weakening, perivascular inflammatory infiltration in the CNS, the development of the demyelination process, damage to oligodendrocytes and axons, and local activation of glial cells [19]. Activated T-cells (CD4+), other lymphocytes and macrophages migrate into the CNS through the damaged BBB. The production of inflammatory factors by lymphocytes and glial cells leads to the formation of foci of inflammation, demyelination and phagocytosis of myelin remnants [20]. In the early stages of the acute form of experimental AEM, inflammatory cytokines [21] and chemokines [22] can initiate a toxic effect on oligodendrocytes, which is probably mediated by the action of TNF- $\alpha$  or free radicals; an increase in the level of the latter is caused by excessive activity of NO synthase [23]. Macrophages that penetrate CNS tissues can phagocytose myelin and synthesize factors that are potentially dangerous for myelin sheaths [24].

AEM was modeled by injecting encephalitogenic emulsion at the dose of 1.0 ml/kg of body weight into rats subcutaneously at the base of the tail. The emulsion consisted of Complete Freund's Adjuvant – CFA (Thermo Fisher Scientific, USA) and allogeneic brain homogenate in a ratio of 1:1 [10, 18].

CFA contains BCG vaccine (BCG – Bacillus Calmette–Guerin) or polysaccharides obtained from Mycobacterium tuberculosis, complex fatty acids (lanolin derivatives), oils and emulsifier in the ratio: 10 ml of CFA = 5 ml of anhydrous lanolin + 15 ml petroleum jelly + 50 mg of heat-killed BCG vaccine. CFA is considered the «gold standard» of adjuvants, and no adjuvant surpasses the general immunostimulatory properties of CFA [25–28].

CFA is a water-in-oil emulsion that does not separate into oil and water phases during long-term storage. The petroleum jelly used in CFA provides the following three specific mechanisms of action: (1) creation of a slow-release antigen depot, (2) transport of the antigen through the lymphatic system to the draining lymph nodes and spleen, where localized small antigen depots are created, and (3) interaction with antigen-presenting cells, including phagocytes, macrophages, and DC [28].

створюються локалізовані невеликі антигенні депо та (3) взаємодія з антигенпрезентуючими клітинами, включаючи фагоцити, макрофаги та ДК [28].

Енцефалітогенну емульсію для щурів готували за методикою Нефьодова О.О. та співавт. (2017 р.) [29, 30]. Алогенний головний мозок механічно диспергували при кімнатній температурі у гомогенізаторі впродовж 3 хв у холодному буферному розчині (0,175 М КСІ + 0,125трис-НСІ, рН=7,4) з розрахунку 33,5 мг тканини мозку + 0,05 мл буфера/100 г маси тіла щура. Розчин антигену, отриманий з гомогенату алогенного головного мозку та ПАФ у співвідношенні 1:1 «переганяли» з шприца в шприц через перехідник до загуснення емульсії, якість якої контролювали нанесенням краплі на поверхню крижаної дистильованої води. Крапля стабільної водно-масляної емульсії короткочасно занурювалась, після чого, не розтікаючись, плавала на поверхні води [18]. Перебіг АЕМ відбувається у три стадії [27]:

1 – відтворення клонів антигенспецифічних Т- і В-лімфоцитів;

2 – міграція антигенспецифічних Т-лімфоцитів у тканини ЦНС із загального кровотоку, пряма цитотоксична дія, продукція цитокінів;

3 – перерозподіл клітинних популяцій, загибель і міграція антигенспецифічних Т-лімфоцитів з ЦНС. Період клінічного одужання тварин, що вижили.

Лікування АЕМ проводилось з 12-го по 20-й день експерименту. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили через день в/м (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні. У якості референс-препарату використано глюкокортикоїд з мінімальним мінералокортикоїдним ефектом – метилпреднізолон (МП), який вводили в/в в дозі 3,4 мг/кг [31]. МП є базовим препаратом у лікуванні загострень РС, оскільки пригнічує утворення нових вогнищ демієлінізації шляхом уповільнення активації та проліферації Т-лімфоцитів, індукції їх апоптозу у периферичній крові та паренхімі мозку, зменшення утворення анти-тіл, а також зниження проникності гематоенцефалічного бар'єру [32].

Дослідження ефективності безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів при АЕМ проведені на щурах-самцях, розподілених на 6 груп:

I (негативний контроль) – інтактні щури (n = 7), яким на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

II – щури зі змодельованим АЕМ (n = 7) без лікування (контрольна група), яким на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг;

III – щури зі змодельованим АЕМ (n=7), яким на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту в/м вводили референс-препарат МП в дозі 3,4 мг/кг [31];

IV – щури зі змодельованим АЕМ (n = 7), яким на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [11];

V – щури зі змодельованим АЕМ (n = 7), яким на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [13];

VI – щури зі змодельованим АЕМ (n = 7), яким на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [14, 15].

Поведінкові реакції тварин (рухову, дослідницьку та емоційну активність) досліджували у тесті «відкрите

Encephalitogenic emulsion for rats was prepared according to the method of O.O. Nefiodova et al. (2017) [29, 30]. The allogeneic brain was mechanically dispersed at room temperature in a homogenizer for 3 min in a cold buffer solution (0.175 M KCl + 0.125 Tris-HCl, pH=7.4) at the rate of 33.5 mg of brain tissue + 0.05 ml of buffer/100 g body weight of the rat. The antigen solution obtained from the homogenate of the allogeneic brain and CFA in a ratio of 1:1 was «distilled» from syringe to syringe through the adapter to thicken the emulsion, the quality of which was controlled by placing a drop on the surface of ice-cold distilled water. A drop of a stable water-oil emulsion was immersed for a short time, after which, without spreading, it floated on the surface of the water [18]. The course of AEM occurs in three stages [27]:

1 – reproduction of clones of antigen-specific T- and B-lymphocytes;

2 – migration of antigen-specific T-lymphocytes into the tissues of the central nervous system from the general bloodstream, direct cytotoxic effect, production of cytokines;

3 – redistribution of cell populations, death and migration of antigen-specific T-lymphocytes from the CNS. Period of clinical recovery of surviving animals.

AEM treatment was carried out from the 12<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> day of the experiment. CEP, CES and KS-MSK were administered every other day by intramuscular injection (total of 5 injections), on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days, respectively. As a reference drug, a glucocorticoid with minimal mineralocorticoid effect was used – methylprednisolone (MP), which was administered intravenously at a dose of 3.4 mg/kg [31]. MP is a basic drug in the treatment of MS exacerbations, as it inhibits the formation of new foci of demyelination by slowing down the activation and proliferation of T-lymphocytes, inducing their apoptosis in the peripheral blood and brain parenchyma, reducing the formation of antibodies, as well as reducing the permeability of the blood-brain barrier [32].

Studies of the effectiveness of cell-free cryopreserved biological agents in AEM were conducted on male sheep, divided into 6 groups:

I (negative control) – intact rats (n = 7), which on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup>, and 20<sup>th</sup> days of the experiment were injected intramuscularly with a 0.9% NaCl solution at a dose of 1.0 ml/kg of rat body weight;

II – rats with simulated AEM (n = 7) without treatment (control group), which were injected with a 0.9% solution intramuscularly on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the experiment NaCl in a dose of 1.0 ml/kg;

III – rats with simulated AEM (n=7), which on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup>, and 20<sup>th</sup> days of the experiment were injected intravenously with the reference drug MP in a dose of 3.4 mg/kg [31];

IV – rats with simulated AEM (n = 7), which on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the experiment were injected intramuscularly with CEP at a dose of 2.5 ml/kg [11];

V – rats with simulated AEM (n = 7), which on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the experiment were injected intramuscularly with CES at a dose of 5.0 ml/kg [13];

VI – rats with simulated AEM (n = 7), which on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the experiment were injected intramuscularly with KS-MSK at a dose of 0.6 ml/kg [14, 15].

поле», який базується на конфлікті інстинктивної мотивації до дослідження нового оточення і тенденції до мінімізації можливої небезпеки з його боку.

Устаткування тесту «відкрите поле» для щурів являє собою освітлену білу квадратну платформу на ніжках розміром 80×80 см, обмежену вертикальними стінками висотою 40 см. Підлога платформи розкреслена на 16 однакових квадратів розміром 20×20 см з отворами («нірками») діаметром 3,5 см у центрі кожного квадрата. Для дослідження поведінкових реакцій щурів по черзі поміщали в центр квадратної платформи та впродовж 3 хвилин реєстрували поведінкові реакції, які обраховували як суму епізодів за типом активності [10, 18, 33]: рухова активність (кількість квадратів, у які зайшла тварина); дослідницька активність (сумарна кількість підйомів на задні кінцівки та кількість зазірань та/або обнюхувань «нірок»).

Поведінкові реакції щурів оцінювали на «0» (вихідний стан), 12-й та 21-й дні експерименту.

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel 2010». Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро–Вілкі (Shapiro–Wilk test,  $n < 50$ ). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (Levene's test). Для оцінки значущості виявлених відмінностей досліджуваних показників за різних умов експерименту проводили статистичний аналіз з використанням параметричних критеріїв.

При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Стюдента. Співставлення показників однієї групи при повторюваних вимірюваннях за різних умов експерименту проводили за непараметричним T-критерієм Вілкоксона (Wilcoxon T test). Отримані значення порівнювали з критичними при рівні вірогідності вище 95,0% ( $p < 0,05$ ), вище 99,0% ( $p < 0,01$ ), вище 99,5% ( $p < 0,005$ ) та вище 99,9% ( $p < 0,001$ ) та робили висновок про ймовірність похибки.

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: 5–95%), де 95% ДІ: – 95% довірчий інтервал (Confidence interval – CI) [34–36].

Behavioral reactions of animals (motor, exploratory and emotional activity) were studied in the «open field» test, which is based on the conflict of instinctive motivation to explore a new environment and the tendency to minimize possible danger from it.

The apparatus of the open field test for rats is an illuminated white square platform on legs measuring 80×80 cm, bounded by vertical walls 40 cm high. The floor of the platform is laid out into 16 identical squares of size 20×20 cm with holes («burrows») of diameter 3.5 cm in the center of each square. To study behavioral reactions, rats were placed in the center of a square platform one by one, and behavioral reactions were recorded for 3 minutes, which were calculated as the sum of episodes by activity type [10, 18, 33]: motor activity (the number of squares the animal entered); exploratory activity (total number of rear-limb climbs and number of peeks and/or sniffs of «burrows»).

Behavioral responses of rats were evaluated at «0» (initial state), 12<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the experiment.

The statistical processing of the obtained results was carried out using the Microsoft Office Excel 2010 application program for working with electronic spreadsheets. The nature of the distribution of values in each group of the sample population was assessed using the Shapiro–Wilk W-criterion (Shapiro–Wilk test,  $n < 50$ ). Homogeneity of variances was determined by Levene's test. Statistical analysis was performed using parametric criteria to assess the significance of the identified differences in the studied indicators under different conditions of the experiment.

With a normal distribution of independent values, differences between groups were determined in pairs using the Student's t-test. Comparison of indicators of one group during repeated measurements under different experimental conditions was performed using the non-parametric Wilcoxon T-test. The obtained values were compared with the critical ones at a probability level higher than 95.0% ( $p < 0.05$ ), higher than 99.0% ( $p < 0.01$ ), higher than 99.5% ( $p < 0.005$ ) and higher than 99.9% ( $p < 0.001$ ) and concluded about the probability of error.

Digital data in the case of a normal distribution of values are given in the form « $M \pm m$ » ( $M \pm SE$ ), where  $M$  is the arithmetic mean,  $m$  (SE) is the standard error of the arithmetic mean or  $M$  (95% CI: 5–95%), where 95% CI – 95% confidence interval [34–36].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

## RESULTS AND DISCUSSION

Встановлено, що введення енцефалітогенної емульсії з гомогенату алогенного головного мозку та ПАФ у співвідношенні 1:1 призвело до виразних розладів орієнтовно-дослідницької активності у щурів на 12-ту добу експерименту, що узгоджувалось з даними літературних джерел щодо клінічних проявів експериментального АЕМ [37].

Так, встановлено, що у щурів з АЕМ без лікування (контрольна група) на 12-й день експерименту відмічалось статистично вірогідне ( $p=0,009$ ) зниження на 78,8% рухової активності відносно вихідних показників у тесті «відкрите поле» (табл. 2). Зниження рухової активності тварин з АЕМ вочевидь зумовлене руховими розладами, які як відомо характерні для хворих на РС. Найбільш поширені рухові розлади, описані при РС,

It was established that the introduction of an encephalitogenic emulsion, consisting of an allogeneic brain homogenate and CFA in a 1:1 ratio, led to significant impairments in exploratory activity in rats by the 12<sup>th</sup> day of the experiment. This finding aligns with data from the literature regarding the clinical manifestations of experimental AEM [37].

Specifically, in rats with AEM that received no treatment (control group), a statistically significant decrease ( $p=0.009$ ) in motor activity by 78.8% relative to baseline levels was observed on the 12<sup>th</sup> day of the experiment in the «open field» test (Table 2). The reduction in motor activity in AEM rats is likely due to motor disorders, which are known to be characteristic of patients with MS. The most common motor disorders described in MS

включають синдром неспокійних ніг, тремор, атаксію, паркінсонізм, пароксизмальні дискінезії, хорею та балізм, міокімію обличчя, включаючи геміфаціальний спазм і спастичну паретичну геміфаціальну контрактуру, тики та туретизм. Анатомічна основа деяких із цих розладів недостатньо вивчена, однак зв'язок між ними та РС підтверджується клінічними та нейровізуалізаційними даними [38].

include restless legs syndrome, tremor, ataxia, parkinsonism, paroxysmal dyskinesias, chorea and balismus, facial myokymia (including hemifacial spasm and spastic parietic hemifacial contracture), tics, and Tourettism. The anatomical basis of some of these disorders is not well understood, but their association with MS is supported by clinical and neuroimaging data [38].

**Таблиця 2.** Вплив КС-МСК, КЕС та МП на рухову активність щурів з АЕМ у тесті «відкрите поле», абс. (M ± m, 95% ДІ, n=42)  
**Table 2.** The effect of KS-MSK, CES and MP on motor activity of rats with AEM in the «open field» test, abs. (M ± m, 95% CI, n=42)

Строк / Term		«0» день / «0» day	12-й день / 12 <sup>th</sup> day	21-й день / 21 <sup>st</sup> day
I група Group 1	Інтактні щури tact rats	28,3±1,1 (95% CI: 26,2–30,4)	27,9±1,2 (95% CI: 25,5–30,3) p <sub>d0</sub> = 0,4 [1,5%] <sup>d0</sup>	29,0±1,7 (95% CI: 25,7–32,3) p <sub>d0</sub> = 0,3 [2,5%] <sup>d0</sup> p <sub>d14</sub> = 0,2 [4,1%] <sup>d12</sup>
II група Group 2	Контроль (алергічний ефенцефаломієліт без лікування) CONTROL (allergic encephalomyelitis without treatment)	28,9±0,8 (95% CI: 27,2–30,5)	6,1±0,8 (95% CI: 4,6–7,7) p <sub>d0</sub> = 0,009 [78,7%] <sup>d0</sup>	14,3±1,1 (95% CI: 12,2–16,4) p <sub>d0</sub> < 0,01 [50,5%] <sup>d0</sup> p <sub>d14</sub> < 0,01 [132,6%] <sup>d12</sup>
III група Group 3	Алергічний ефенцефаломієліт + метилпреднізолон/ Allergic encephalomyelitis + methylprednisolone	29,6±1,5 (95% CI: 26,7–32,4)	7,9±0,6 (95% CI: 6,8–8,9) p <sub>d0</sub> = 0,009 [73,4%] <sup>d0</sup>	27,0±1,8 (95% CI: 23,5–30,5) p <sub>d0</sub> = 0,18 [8,7%] <sup>d0</sup> p <sub>d14</sub> < 0,01 [243,6%] <sup>d12</sup>
IV група Group 4	Алергічний ефенцефаломієліт + кріоекстракт плаценти Allergic encephalomyelitis + placenta cryoextract	28,7±1,3 (95% CI: 26,2–31,2)	25,6±1,5 (95% CI: 22,7–28,5)	28,1±1,5 (95% CI: 25,1–31,1)
V група Group 5	Алергічний ефенцефаломієліт + кріоекстракт селезінки Allergic encephalomyelitis + spleen cryoextract	5,1±0,6 (95% CI: 4,0–6,3) p <sub>d0</sub> = 0,009 [82,1%] <sup>d0</sup>	7,3±0,3 (95% CI: 6,7–7,8) p <sub>d0</sub> = 0,009 [71,5%] <sup>d0</sup>	5,0±0,3 (95% CI: 4,4–5,6) p <sub>d0</sub> = 0,009 [82,2%] <sup>d0</sup>
VI група Group 6	Алергічний ефенцефаломієліт + кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбрових клітин Allergic encephalomyelitis + conditioned environment of mesenchymal stem cells	19,9±1,6 (95% CI: 16,8–22,9) p <sub>d0</sub> < 0,01 [30,8%] <sup>d0</sup> p <sub>d14</sub> < 0,01 [286,1%] <sup>d12</sup>	14,7±1,3 (95% CI: 12,2–17,3) p <sub>d0</sub> < 0,01 [42,5%] <sup>d0</sup> p <sub>d14</sub> < 0,01 [102,0%] <sup>d12</sup>	23,4±2,4 (95% CI: 18,7–28,1) p <sub>d0</sub> < 0,01 [16,8%] <sup>d0</sup> p <sub>d14</sub> < 0,01 [368,6%] <sup>d12</sup>
Рівень статистичної вірогідності, Level of statistical probability, [%]	p <sub>2-1</sub>	0,7 [2,0%]	< 0,001 [77,9%]	< 0,001 [50,7%]
	p <sub>3-2</sub>	0,7 [2,5%]	0,1 [27,9%]	< 0,001 [89,0%]
	p <sub>4-2</sub>	0,9 [0,5%]	0,3 [16,3%]	< 0,001 [39,0%]
	p <sub>5-2</sub>	0,1 [11,4%]	0,2 [18,6%]	0,8 [3,0%]
	p <sub>6-2</sub>	0,7 [2,5%]	0,2 [18,6%]	< 0,01 [64,0%]
	p <sub>4-3</sub>	0,7 [2,9%]	< 0,01 [34,5%]	0,01 [26,5%]
	p <sub>5-3</sub>	0,1 [15,1%]	0,4 [7,3%]	< 0,001 [45,5%]
	p <sub>6-3</sub>	0,5 [4,8%]	< 0,01 [36,4%]	0,26 [13,2%]

**Примітки:** p<sub>2-1</sub> – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;  
 [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;  
 Індексами 1, 2, 3, 4, 5, 6 вказано номер групи, між показниками яких проведено порівняння;  
 Індексами d0, d12 вказано строки дослідження, з показниками яких проведено порівняння в динаміці.

**Notes:** p<sub>2-1</sub> – level of statistical probability of discrepancy of indicators;  
 [%] – value of indicator discrepancies in percentage;  
 Indices 1, 2, 3, 4, 5, 6 indicate the number of the group whose indicators were compared;  
 Indices d0, d12 indicate the terms of the study, the indicators of which were compared in terms of dynamics.



Рухові розлади у щурів супроводжувались статистично вірогідним ( $p < 0,01$ ) зниженням дослідницької активності на 78,0% відносно вихідних показників – сумарні кількість підйомів на задні кінцівки та кількість зазирань та/або обнюхувань «нірок» у щурів з АЕМ на 12-й день дослідження в середньому становила  $4,1 \pm 0,9$  епізодів (табл. 3).

Motor disorders in the rats were accompanied by a statistically significant decrease ( $p < 0.01$ ) in exploratory activity by 78.0% relative to baseline levels. The total number of rear-limb lifts and the number of peeks and/or sniffs of the «kidneys» in rats with AEM averaged  $4.1 \pm 0.9$  episodes on the 12<sup>th</sup> day of the study (Table 3).

**Таблиця 3.** Вплив КС-МСК, КЕС та МП на дослідницьку активність щурів з АЕМ у тесті «відкрите поле», абс. ( $M \pm m$ , 95% ДІ,  $n = 42$ )  
**Table 3.** The effect of KS-MSK, CES and MP on the exploratory activity of rats with AEM in the «open field» test, abs. ( $M \pm m$ , 95% CI,  $n = 42$ )

Строк / Term		«0» день / «0» day	12-й день / 12 <sup>th</sup> day	21-й день / 21 <sup>st</sup> day
I група Group 1	Інтактні щури tact rats	18,0±1,4 (95% CI: 15,2–20,8)	19,1±1,4 (95% CI: 16,4–21,9) $p_{d0} = 0,37$ [6,3%] <sup>d0</sup>	20,3±1,9 (95% CI: 16,6–24,0) $p_{d0} = 0,1$ [12,7%] <sup>d0</sup> $p_{d14} = 0,2$ [6,0%] <sup>d12</sup>
II група Group 2	Контроль (алергічний ефенцефаломієліт без лікування) CONTROL (allergic encephalomyelitis without treatment)	18,9±1,5 (95% CI: 15,9–21,8)	4,1±0,9 (95% CI: 2,4–5,9) $p_{d0} < 0,01$ [78,0%] <sup>d0</sup>	5,3±0,9 (95% CI: 3,6–7,0) $p_{d0} < 0,01$ [72,0%] <sup>d0</sup> $p_{d14} = 0,18$ [27,6%] <sup>d12</sup>
III група Group 3	Алергічний ефенцефаломієліт + метилпреднізолон/ Allergic encephalomyelitis + methylprednisolone	20,1±1,8 (95% CI: 16,6–23,7)	5,1±1,1 (95% CI: 2,9–7,4) $p_{d0} < 0,01$ [74,5%] <sup>d0</sup>	14,3±1,3 (95% CI: 11,7–16,9) $p_{d0} = 0,03$ [29,1%] <sup>d0</sup> $p_{d14} < 0,01$ [177,8%] <sup>d12</sup>
IV група Group 4	Алергічний ефенцефаломієліт + кріоекстракт плаценти Allergic encephalomyelitis + placenta cryoextract	16,6±1,8 (95% CI: 13,0–20,2)	6,3±0,6 (95% CI: 5,2–7,4) $p_{d0} < 0,01$ [62,1%] <sup>d0</sup>	14,6±1,5 (95% CI: 11,6–17,5) $p_{d0} = 0,12$ [12,1%] <sup>d0</sup> $p_{d14} < 0,01$ [131,8%] <sup>d12</sup>
V група Group 5	Алергічний ефенцефаломієліт + кріоекстракт селезінки Allergic encephalomyelitis + spleen cryoextract	19,7±1,6 (95% CI: 16,6–22,8)	4,1±0,8 (95% CI: 2,6–5,7) $p_{d0} < 0,01$ [79,0%] <sup>d0</sup>	11,9±1,4 (95% CI: 9,1–14,6) $p_{d0} < 0,01$ [39,9%] <sup>d0</sup> $p_{d14} < 0,01$ [186,2%] <sup>d12</sup>
VI група Group 6	Алергічний ефенцефаломієліт + кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбцових клітин Allergic encephalomyelitis + conditioned environment of mesenchymal stem cells	18,1±1,3 (95% CI: 15,5–20,8)	4,9±0,4 (95% CI: 4,1–5,6) $p_{d0} < 0,01$ [73,2%] <sup>d0</sup>	21,7±1,1 (95% CI: 19,6–23,8) $p_{d0} < 0,01$ [19,7%] <sup>d0</sup> $p_{d14} < 0,01$ [347,1%] <sup>d12</sup>
Рівень статистичної вірогідності, Level of statistical probability, [%]	$p_{2-1}$	0,7 [4,8%]	< 0,001 [78,4%]	< 0,001 [73,9%]
	$p_{3-2}$	0,6 [6,8%]	0,5 [24,1%]	< 0,001 [170,3%]
	$p_{4-2}$	0,4 [12,1%]	0,1 [51,7%]	< 0,001 [175,5%]
	$p_{5-2}$	0,7 [4,5%]	1,0 [0%]	0,002 [124,3%]
	$p_{6-2}$	0,7 [3,8%]	0,5 [17,2%]	< 0,001 [310,8%]
	$p_{4-3}$	0,2 [17,7%]	0,4 [22,2%]	0,8 [2,0%]
	$p_{5-3}$	0,9 [0%]	0,5 [19,4%]	0,2 [17,0%]
	$p_{6-3}$	0,4 [9,5%]	0,8 [5,6%]	< 0,001 [52,0%]

**Примітки:**  $p_{2-1}$  – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;  
 [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;  
 Індексами 1, 2, 3, 4, 5, 6 вказано номер групи, між показниками яких проведено порівняння;  
 Індексами d0, d12 вказано строки дослідження, з показниками яких проведено порівняння в динаміці.

**Notes:**  $p_{2-1}$  – level of statistical probability of discrepancy of indicators;  
 [%] – value of indicator discrepancies in percentage;  
 Indices 1, 2, 3, 4, 5, 6 indicate the number of the group whose indicators were compared;  
 Indices d0, d12 indicate the terms of the study, the indicators of which were compared in terms of dynamics.

На 21-й день експерименту у щурів контрольної групи з АЕМ без лікування відмічено відносний регрес порушень орієнтовно-дослідницької активності, проте досліджувані показники залишались значно нижчими за їх вихідні значення. Так, рухова активність щурів з АЕМ на 21-й день експерименту статистично вірогідно ( $p < 0,01$ ) вдвічі поступалась вихідним показником у тварин відповідної групи, але в той же час на 132,6% статистично вірогідно ( $p < 0,01$ ) перевищувала показники на 12-й день експерименту та становила відповідно в середньому  $14,3 \pm 1,1$  квадратів, у які зайшла тварина (див. табл. 2).

Дослідницька активність у тварин контрольної групи в динаміці розвитку АЕМ відновлювалась значно меншою мірою. Встановлено, що на 21-й день експерименту сумарна дослідницька активність щурів зросла ( $p = 0,18$ ) лише на 27,6% відносно показників на 12-й день (див. табл. 3).

У якості референс-препарату у дослідженні використано сильнодіючий глюкокортикостероїд із широкою терапевтичною дією, який є «золотим стандартом» при лікуванні цілої низки запальних та аутоімунних захворювань. Відомо, що у пацієнтів з РС внутрішньовенне лікування метилпреднізолоном модулює профілі експресії генів CD4+ Т-лімфоцитів, воно також може індукувати розширення Трег-клітин і зменшувати секрецію прозапальних цитокінів, таким чином полегшуючи перебіг захворювання [39]. Метилпреднізолон у п'ять разів сильніший за своїми протизапальними властивостями, порівняно з гідрокортизоном, з мінімальною мінералокортикоїдною активністю, порівняно з останнім [40].

Встановлено, що п'ятиразове введення МП (на 12-й, 14-й, 16-й, 18-й та 20-й дні експерименту) у щурів з АЕМ привело до відновлення рухової активності у щурів на 21-й день експерименту – вказаний показник статистично вірогідного ( $p < 0,01$ ) зріс у 3,4 рази відносно показників на 12-й день, та становив відповідно  $27,0 \pm 1,8$  квадратів, у які зайшла тварина, що лише на 8,7% було нижче ( $p = 0,18$ ) за вихідні показники (див. табл. 2).

Дослідницька активність щурів з АЕМ відновлювалась меншою мірою, ніж рухова активність – сумарна кількість епізодів дослідницької активності на тлі введення МП на 21-й день експерименту статистично вірогідно ( $p < 0,01$ ) зросла у 2,8 рази відносно показників на 12-й день експерименту та становила  $14,3 \pm 1,3$  епізодів в середньому (див. табл. 3).

На тлі застосування всіх досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів у щурів з АЕМ відмічалась тенденція до відновлення як рухової, так і дослідницької активності тварин у тесті «відкрите поле».

Аналіз відновлення рухової активності на 21-й день експерименту у щурів з АЕМ показав, що найвиразніше значення показників зростає на тлі п'ятиразового введення КС-МСК ( $p < 0,01$ ), а найменше ( $p < 0,01$ ) рухова активність відновилась у щурів, яким вводили КЕС. За здатністю відновлювати рухову активність (відсоток змін показника на 21-шу добу відносно показника на 12-ту добу) при АЕМ у щурів досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності: КС-МСК (368,6%) > КЕП (286,1%) > КЕС (102,0%). Варто зазначити, що на тлі застосування КС-МСК рухова активність щурів з АЕМ найвиразніше від-

On the 21st day of the experiment, the rats in the control group with AEM (without treatment) showed a partial regression of impairments in exploratory activity, but the observed indicators remained significantly lower than their initial values. Motor activity in these rats was statistically significantly ( $p < 0.01$ ) lower by half compared to their initial levels. However, it was significantly higher by 132.6% ( $p < 0.01$ ) compared to the 12<sup>th</sup> day of the experiment, with an average of  $14.3 \pm 1.1$  squares entered (Table 2).

Exploratory activity in the control group animals showed a much lesser degree of recovery. By the 21<sup>st</sup> day, total exploratory activity increased by only 27.6% ( $p = 0.18$ ) compared to the 12<sup>th</sup> day indicators (Table 3).

As a reference drug in the study, a potent glucocorticosteroid, known as the «gold standard» in treating various inflammatory and autoimmune diseases, was used. Intravenous methylprednisolone (MP) treatment in MS patients is known to modulate gene expression profiles of CD4+ T-lymphocytes, induce the expansion of Treg cells, and reduce pro-inflammatory cytokine secretion, thus ameliorating the disease course [39].

Methylprednisolone is five times stronger than hydrocortisone in its anti-inflammatory properties, with minimal mineralocorticoid activity [40].

It was established that five administrations of MP (on the 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup>, and 20<sup>th</sup> days of the experiment) in rats with AEM led to the recovery of motor activity by the 21<sup>st</sup> day. The motor activity significantly increased ( $p < 0.01$ ) by 3.4 times compared to the 12<sup>th</sup> day, averaging  $27.0 \pm 1.8$  squares entered, which was only 8.7% lower ( $p = 0.18$ ) than the initial indicators (Table 2).

The exploratory activity of rats with AEM was restored to a lesser extent than the motor activity – the total number of episodes of exploratory activity against the background of the introduction of MP on the 21<sup>st</sup> day of the experiment statistically significantly ( $p < 0.01$ ) increased by 2.8 times compared to the indicators on the 12<sup>th</sup> day experiment and was  $14.3 \pm 1.3$  episodes on average (see Table 3).

Against the background of the use of all investigated cell-free cryopreserved biological agents in rats with AEM, a tendency to restore both motor and exploratory activity of animals in the «open field» test was noted.

The analysis of the recovery of motor activity on the 21<sup>st</sup> day of the experiment in rats with AEM showed that the most clearly indicated indicator increased against the background of the five-time introduction of MSC-CM ( $p < 0.01$ ), and the least ( $p < 0.01$ ) motor activity was restored in rats injected with CES. According to the ability to restore motor activity (percentage of changes in the indicator on the 21<sup>st</sup> day relative to the indicator on the 12<sup>th</sup> day) with AEM in rats, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence: KS-MSC (368.6%) > CEP (286.1%) > CES (102.0%). It is worth noting that against the background of the use of MSC-CM, the motor activity of rats with AEM was most clearly restored to the level of initial indicators and was smaller ( $p < 0.01$ ) by only 16.8%, respectively  $28.1 \pm 1.5$  squares per «0» day and  $23.4 \pm 2.4$  squares on the 21<sup>st</sup> day of the experiment (see Table 2). At the same time, all studied biological agents were inferior in their ability to restore the motor activity of rats with AEM on the 21<sup>st</sup> day of the experiment to the reference drug methylprednisolone. Thus, CES was inferior by 45.5% ( $p < 0.001$ ) in the

новлювалась до рівня вихідних показників та була меншої ( $p < 0,01$ ) лише на 16,8%, відповідно  $28,1 \pm 1,5$  квадратів на «0» день та  $23,4 \pm 2,4$  квадратів на 21-й день експерименту (див. табл. 2). В той же час, усі досліджувані біологічні засоби поступались за здатністю відновлювати рухову активність щурів з АЕМ на 21-й день експерименту референс-препарату метилпреднізолу. Так, КЕС на 45,5% ( $p < 0,001$ ) поступалося за здатністю відновлювати рухову активність МП, а КС-МСК поступалося найменше – лише на 13,2 ( $p = 0,26$ ) показникам щурів, яким вводили МП (див. табл. 2).

Дослідження дослідницької активності щурів з АЕМ показало, що введення досліджуваних біологічних препаратів приводило до відновлення зазначеного спектра активності у щурів на 21-й день експерименту. Встановлено, КС-МСК та КЕС перевищували ефективність МП за здатністю відновлювати дослідницьку активність щурів з АЕМ, що може вказувати на їх не лише протизапальну активність, а й можливу нейропротективну дію на моделі досліджуваного аутоімунного нейродегенеративного захворювання.

За здатністю відновлювати дослідницьку активність у щурів з АЕМ на 21-й день експерименту досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності (відсоток змін показника на 21-шу добу відносно показника на 12-ту добу): КС-МСК (347,1%;  $p < 0,01$ ) > КЕС (186,2;  $p < 0,01$ ) > КЕП (131,8%;  $p < 0,01$ ).

## ВИСНОВКИ

Розвиток АЕМ у щурів супроводжувався виразними розладами орієнтовно-дослідницької активності. На 12-ту добу експерименту вимічалось статистично вірогідне ( $p = 0,009$ ) зниження на 78,8% рухової активності, та статистично вірогідне ( $p < 0,01$ ) зниженням дослідницької активності щурів з АЕМ на 78,0%, відносно вихідних показників.

За здатністю відновлювати рухову активність (відсоток змін показника на 21-шу добу відносно показника на 12-ту добу) при АЕМ у щурів досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності: КС-МСК (368,6%) > КЕП (286,1%) > КЕС (102,0%).

За здатністю відновлювати дослідницьку активність у щурів з АЕМ на 21-й день експерименту досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби можна розташувати у такій послідовності (відсоток змін показника на 21-шу добу відносно показника на 12-ту добу): КС-МСК (347,1%;  $p < 0,01$ ) > КЕС (186,2;  $p < 0,01$ ) > КЕП (131,8%;  $p < 0,01$ ).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Haki M., Al-Biati H.A., Al-Tameemi Z.S., Ali I.S., Al-Hussainy H.A. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. *Medicine (Baltimore)*. 2023. Vol. 103(8). e37297 p. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000037297>
2. Engelhardt B., Comabella M., Chan A. Multiple sclerosis: Immunopathological heterogeneity and its implications. *European journal of immunology*. 2022. Vol. 52(6). P. 869–881. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.202149757>
3. Гладких Ф.В. Роль аутоімунних процесів при демієлінізуючих захворюваннях нервової системи: фокус на розсіяний склероз. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2023. № 19(7). С. 223–232. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.22141/2224-0713.19.7.2023.1026>

ability to restore the motor activity of MP, and MSC-CM was the least inferior – only by 13.2 ( $p = 0.26$ ) to the indicators of rats injected with MP (see table. 2).

A study of the research activity of rats with AEM showed that the introduction of the studied biological drugs led to the restoration of the specified spectrum of activity in rats on the 21<sup>st</sup> day of the experiment. It was found that KS-MSK and CES exceeded the effectiveness of MP in terms of the ability to restore the research activity of rats with AEM, which may indicate not only their anti-inflammatory activity, but also a possible neuroprotective effect on the model of the studied autoimmune neurodegenerative disease.

According to the ability to restore research activity in rats with AEM on the 21<sup>st</sup> day of the experiment, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence (percentage of changes in the indicator on the 21<sup>st</sup> day relative to the indicator on the 12<sup>th</sup> day): MSC-CM (347.1%;  $p < 0.01$ ) > CES (186.2;  $p < 0.01$ ) > CEP (131.8%;  $p < 0.01$ ).

## CONCLUSIONS

The development of AEM in rats was accompanied by pronounced disorders of orientation and research activity. On the 12<sup>th</sup> day of the experiment, a statistically significant ( $p = 0.009$ ) decrease in motor activity by 78.8% was observed, and a statistically significant ( $p < 0.01$ ) decrease in exploratory activity of rats with AEM by 78.0%, relative to the initial indicators.

According to the ability to restore motor activity (percentage of changes in the indicator on the 21<sup>st</sup> day relative to the indicator on the 12<sup>th</sup> day) in AEM in rats, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence: MSC-CM (368.6%) > CEP (286.1%) > CES (102.0%).

According to the ability to restore research activity in rats with AEM on the 21<sup>st</sup> day of the experiment, the investigated cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence (percentage of changes in the indicator on the 21<sup>st</sup> day relative to the indicator on the 12<sup>th</sup> day): MSC-CM (347,1%;  $p < 0.01$ ) > CES (186.2;  $p < 0.01$ ) > CEP (131.8;  $p < 0.01$ ).

## REFERENCES

1. Haki M, Al-Biati HA, Al-Tameemi ZS, Ali IS, Al-Hussainy HA. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. *Medicine (Baltimore)*. 2023;103(8):e37297. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000037297>
2. Engelhardt B, Comabella M, Chan A. Multiple sclerosis: Immunopathological heterogeneity and its implications. *European journal of immunology*. 2022;52(6):869–81. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.202149757>
3. Hladkykh FV. The role of autoimmune processes in demyelinating diseases of the nervous system: focus on multiple sclerosis. *International Journal of Neurology*. 2023;19(7):223–32. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.22141/2224-0713.19.7.2023.1026>

- Amin M., Hersh C.M. Updates and advances in multiple sclerosis neurotherapeutics. *Neurodegenerative disease management*. 2023. Vol. 13(1). P. 47–70. DOI: <https://doi.org/10.2217/nmt-2021-0058>
- Gonzalez-Lorenzo M., Ridley B., Minozzi S., Del Giovane C., Peryer G., Piggott T. Immunomodulators and immunosuppressants for relapsing-remitting multiple sclerosis: a network meta-analysis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2024. Vol. 1(1). CD011381 p. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011381.pub3>
- Shen Z., Huang W., Liu J., Tian J., Wang S., Rui K. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*. 2021. Vol. 12. 749192 p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.749192>
- Гладких Ф.В. Перспективи застосування імуномодуляторів у лікуванні хворих на аутоімунних захворювань: фокус на екстракти біологічних тканин (кріоекстракт плаценти та кріоекстракт селезінки). *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2023. № 4. С. 29–46. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.37321/immunology.2023.4-04>
- Гладких Ф.В. Мезенхімальні стовбурові клітини: екзосоми та кондиціоновані середовища як інноваційні стратегії у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. *Клінічна та профілактична медицина*. 2023. № 6(28). С. 121–130. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
- Гладких Ф.В., Ядлова Т.І. Порівняльна характеристика антифлогістичної активності кріоекстрактів біологічних тканин та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин на моделі аутоімунного артриту. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія «Медицина»*. 2024. № 1(69). С. 53–59. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.32782/2415-8127.2024.69.9>
- Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 527 с. (In Ukrainian).
- Шепітько В.І. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої печінки і вплив її трансплантації на морфологічний стан ряду внутрішніх органів: дис. ... д.мед.н.: 14.01.35. Харків, 2004. 326 с. URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0504U000610/>
- Олефіренко О.О. Вплив кріодеструкції, екстрактів печінки і селезінки на відновні процеси в печінці при експериментальному цирозі: дис. ... к. мед. н. 14.01.35. Харків, 2008. 101 с. URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0408U004142/>
- Беспалова І.Г. Пептидний склад та біологічна дія екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят: дис. ... к. біол. н. 03.00.19. Харків, 2016. 162 с. URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0416U004539/>
- Golubinskaya P.A., Sarycheva M.V., Dolzhikov A.A., Bondarev V.P., Stefanova M.S., Soldatov V.O. 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. Vol. 8(6). P. 416–425. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
- Глоба В.Ю. Застосування кріоконсервованих культур клітин та нейротрофічних факторів при експериментальній інфравезикальній обструкції. Харків, 2021. 156 с. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0821U100913/>
- Степанова Т.Ю. Ефективність та деякі механізми дії аміксіну за експериментального алергічного енцефаломієліту. дис.: ... к.біол.н. 14.03.05. 2013. 155 с. URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0413U002176/>
- Pivneva T.A. Mechanisms underlying the process of demyelination in multiple sclerosis. *Neurophysiology*. 2009. Vol. 5. P. 365–373. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11062-010-9114-z>
- Нефьодов О.О. Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. дис.: ... д.мед.н. 14.03.05. 2017. 373 с. URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0517U000776/>
- Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Current Opinion in Neurology*. 2008. 21(3): P. 242–247. DOI: <https://doi.org/10.1097/wco.0b013e3282fee94a>
- Boccaccio G.L., Steinman L. Multiple sclerosis: from a myelin point of view. *Journal of Neuroscience Research*. 1996. Vol. 45(6). P. 647–654. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547)
- Kalman B., Lublin F.D. Immunotherapy in neuroimmunologic diseases. London: Martin Dunitz, 1998.
- Ransohoff R.M. Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997. Vol. 62(5). P. 645–652. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.62.5.645>
- Ding M., Zhang M., Wong J.L., Rogers N.E., Ignarro L.J., Voskuhl R.R. Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *Journal of Immunology*. 1998. Vol. 160(6). P. 2560–2564.
- Pender M.P. Demyelination and neurological signs in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*. 1987. Vol. 15(1). P. 11–24. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(87\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(87)90003-8)
- Vogel H.G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. 2071 p.
- Amin M, Hersh CM. Updates and advances in multiple sclerosis neurotherapeutics. *Neurodegenerative disease management*. 2023;13(1):47–70. DOI: <https://doi.org/10.2217/nmt-2021-0058>
- Gonzalez-Lorenzo M, Ridley B, Minozzi S, Del Giovane C, Peryer G, Piggott T. Immunomodulators and immunosuppressants for relapsing-remitting multiple sclerosis: a network meta-analysis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2024;1(1):CD011381. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011381.pub3>
- Shen Z, Huang W, Liu J, Tian J, Wang S, Rui K. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*. 2021;12:749192. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.749192>
- Hladkykh FV. Prospects for the use of immunomodulators in the treatment of patients with autoimmune diseases: focus on extracts of biological tissues (placenta cryoextract and spleen cryoextract). *Immunology and allergology: science and practice*. 2023;4:29–46. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.37321/immunology.2023.4-04>
- Hladkykh FV. Mesenchymal stem cells: exosomes and conditioned media as innovative strategies in the treatment of patients with autoimmune diseases. *Clinical and preventive medicine*. 2023;6(28):121–30. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
- Hladkykh FV, Lyadova TI. Comparative characteristics of antiphlogistic activity of cryoextracts of biological tissues and conditioned medium of mesenchymal stem cells on the model of autoimmune arthritis. *Scientific Bulletin of Uzhhorod University. «Medicine» series*. 2024;1(69):53–9. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.32782/2415-8127.2024.69.9>
- Stefanov OV. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna; 2001:527. (In Ukrainian).
- Shepitko VI. Structural and functional indicators of a cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs [dissertation]. Kharkiv, 2004:326. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0504U000610/>
- Olefirenko OO. The effect of cryodestruction, liver and spleen extracts on regenerative processes in the liver in experimental cirrhosis [dissertation]. Kharkiv, 2008:101. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0408U004142/>
- Bespalova IG. Peptide composition and biological effect of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin [dissertation]. Kharkiv, 2016:162. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0416U004539/>
- Golubinskaya PA, Sarycheva MV, Dolzhikov AA, Bondarev VP, Stefanova MS, Soldatov VO 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):416–25. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
- Globo VU. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. Kharkiv, 2021:156. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0821U100913/>
- Stepanova TU. Effectiveness and some mechanisms of action of amiksin in experimental allergic encephalomyelitis [dissertation]. 2013:155. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0413U002176/>
- Pivneva TA. Mechanisms underlying the process of demyelination in multiple sclerosis. *Neurophysiology*. 2009;5:365–73. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11062-010-9114-z>
- Nefyodov OO. Pharmacological analysis of neuroprotection under conditions of experimental allergic encephalomyelitis [dissertation]. 2017:373. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrntei.ua/searchdoc/0517U000776/>
- Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Current Opinion in Neurology*. 2008;21(3):242–7. DOI: <https://doi.org/10.1097/wco.0b013e3282fee94a>
- Boccaccio GL, Steinman L. Multiple sclerosis: from a myelin point of view. *Journal of Neuroscience Research*. 1996;45(6):647–54. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547)
- Kalman B, Lublin FD. Immunotherapy in neuroimmunologic diseases. London: Martin Dunitz, 1998.
- Ransohoff RM. Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997;62(5):645–52. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.62.5.645>
- Ding M, Zhang M, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Voskuhl RR. Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *Journal of Immunology*. 1998;160(6):2560–4.
- Pender MP. Demyelination and neurological signs in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*. 1987;15(1):11–24. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(87\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(87)90003-8)
- Vogel HG. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008:2071.



26. Stills H.F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *International League of Associations of Rheumatologists Journal*. 2005. Vol. 46(3). P. 280–293. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
27. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947. Vol. 1. P. 291–308. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
28. 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. Vol. 46(3). P. 280–293. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
29. Нефьодов О.О., Мамчур В.И., Харченко В.Ю. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. № 4(114). С. 205–208. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vpbm\\_2014\\_4%282%29\\_46](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vpbm_2014_4%282%29_46)
30. Нефьодов О.О., М'ясоєд Ю.П., Соломенко М.В., Великородна-Танасійчук О.В., Баклунов В.В., Адегова Л.Я. Ефективність моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту як експериментальної моделі розсіяного склерозу. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021. № 6(34). С. 57–65. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/ujmbs\\_2021\\_6\\_6\\_8](http://nbuv.gov.ua/UJRN/ujmbs_2021_6_6_8)
31. Нефьодов О.О., Мамчур В.И. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGH-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу. *Буковинський медичний вісник*. 2015. № 19(3). С. 114–117. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/bumv\\_2015\\_19\\_3\\_30](http://nbuv.gov.ua/UJRN/bumv_2015_19_3_30)
32. Черненко М.С., Вовк В.І. Розсіяний склероз: сучасні підходи до патогенетичної терапії. *Міжнародний медичний журнал*. 2015. № 21(1). С. 58–62. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mmzh\\_2015\\_21\\_1\\_14](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mmzh_2015_21_1_14)
33. Дейко Р.Д. Експериментальне вивчення церебропротекторних та психотропних властивостей нових циклічних і лінійних олигопептидів. дис: ... к. фарм. н. 14.03.05. 2017. 258 с. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0418U002231/>
34. Zar JH. *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014. 960 p.
35. Tripathy J.P. Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health*. 2013. Vol. 42(12). P. 1478–1479.
36. 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. Vol. 9(5). P. 157–163.
37. Пічкур Л.Д., Семенова В.М., Величко О.М., Вербовська С.А., Єгорова Д.М., Акінола С.Т., Васлович В.В. Оптимізація моделювання експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2017. № 4(77). С. 4–14. (In Ukrainian).
38. Ghosh R., Roy D., Dubey S., Das S., Benito-León J. Movement Disorders in Multiple Sclerosis: An Update. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2022. Vol. 12. 14 p. DOI: <https://doi.org/10.5334/tohm.671>
39. Wang Z., Zheng G., Li G., Wang M., Ma Z., Li H., Wang X.Y., Yi H. Methylprednisolone alleviates multiple sclerosis by expanding myeloid-derived suppressor cells via glucocorticoid receptor  $\beta$  and S100A8/9 up-regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020. Vol. 24(23). P. 13703–13714. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15928>
40. Ocejó A., Correa R. Methylprednisolone. 2022 Dec 11. *Treasure Island (FL)*: StatPearls Publishing; 2024. URL: <https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/48408>
26. Stills HF. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *International League of Associations of Rheumatologists Journal*. 2005;46(3):280–93. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
27. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947;1:291–308. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
28. 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. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
29. Nefyodov OO, Mamchur VY, Kharchenko VY. Modeling and assessment of the course of experimental allergic encephalomyelitis. *Herald of problems of biology and medicine*. 2014;4(114):205–8. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vpbm\\_2014\\_4%282%29\\_46](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vpbm_2014_4%282%29_46)
30. Nefyodov OO, Myasoed YuP, Solomenko MV, Velikorodna-Tanasiichuk OV, Baklunov VV, Adeгова LY. Effectiveness of modeling experimental allergic encephalomyelitis as an experimental model of multiple sclerosis. *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports*. 2021;6(34):57–65. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/ujmbs\\_2021\\_6\\_6\\_8](http://nbuv.gov.ua/UJRN/ujmbs_2021_6_6_8)
31. Nefyodov OO, Mamchur VY. Changes in nociceptive potential and PGH-synthetase activity under the conditions of the experimental equivalent of multiple sclerosis. *Bukovyna Medical Herald*. 2015;19(3):114–7. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/bumv\\_2015\\_19\\_3\\_30](http://nbuv.gov.ua/UJRN/bumv_2015_19_3_30)
32. Chernenko ME, Vovk VI. Multiple sclerosis: modern approaches to pathogenetic therapy. *International Medical Journal*. 2015;21(1):58–62. (In Ukrainian). URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mmzh\\_2015\\_21\\_1\\_14](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mmzh_2015_21_1_14)
33. Dayko RD. Experimental study of cerebroprotective and psychotropic properties of new cyclic and linear oligopeptides [dissertation]. 2017;258. (In Ukrainian). URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0418U002231/>
34. Zar JH. *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014;960.
35. Tripathy JP. Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health*. 2013;42(12):1478–9.
36. 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.
37. Pichkur LD, Semenova VM, Velichko OM, Verbovska SA, Yehorova DM, Akinola ST, Vaslovych VV. Optimization of modeling of experimental allergic encephalomyelitis with a chronic relapsing course. *Experimental and clinical medicine*. 2017;4(77):4–14. (In Ukrainian).
38. Ghosh R, Roy D, Dubey S, Das S, Benito-León J. Movement Disorders in Multiple Sclerosis: An Update. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2022;12:14. DOI: <https://doi.org/10.5334/tohm.671>
39. Wang Z, Zheng G, Li G, Wang M, Ma Z, Li H, Wang XY, Yi H. Methylprednisolone alleviates multiple sclerosis by expanding myeloid-derived suppressor cells via glucocorticoid receptor  $\beta$  and S100A8/9 up-regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020;24(23):13703–14. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15928>
40. Ocejó A, Correa R. Methylprednisolone. 2022 Dec 11. *Treasure Island (FL)*: StatPearls Publishing; 2024. URL: <https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/48408>

#### Перспективи подальших досліджень

Результати дослідження вказують на доцільність подальших поглиблених досліджень нейропротективних властивостей досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів при аутоімунних нейродегенеративних захворюваннях.

#### Prospects for further research

The results of this study indicate the need for further in-depth investigation into the neuroprotective properties of the cell-free cryopreserved biological agents under examination in autoimmune neurodegenerative diseases.

#### Конфлікт інтересів

Автор рукопису свідомо засвідчує відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями.

#### Conflict of interest

The author certifies that there is no actual or potential conflict of interest regarding the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, or other organizations.

#### Інформація про фінансування

Робота не отримувала фінансування видатками Держаного бюджету України.  
Дослідження проведене в рамках відомчої науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології

#### Funding information

This work was not funded by the State Budget of Ukraine.  
The study was conducted within the framework of the departmental research project of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology at V.N. Karazin Kharkiv

Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликаний бактеріями, вірусами, вірусно-бактеріальними асоціаціями при гострому, затяжному та хронічному перебігу хвороби та удосконалення тактики лікування», номер державної реєстрації 0123U105022, термін виконання: 2023–2028 рр., керівник – завідувачка кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, кандидат медичних наук, доцент О.В. Волобуєва.

National University, under the Ministry of Education and Science of Ukraine. The project, titled «Study of the role of immune, autoimmune, and metabolic disorders in the pathogenesis and consequences of the infectious process caused by bacteria, viruses, and viral-bacterial associations in the acute, prolonged, and chronic course of the disease, and improvement of treatment tactics» is registered under state number 0123U105022, the project is scheduled from 2023–2028 and is managed by the head of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, candidate of medical sciences, Associate Professor O.V. Volobueva.

## ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Гладких Федір Володимирович** – кандидат медичних наук (доктор філософії в галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина»), докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; старший науковий співробітник групи променевої патології і паліативної медицини Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»; вул. Григорія Сковороди, буд. 82, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

моб.: +38 (099) 782-78-72

**Внесок автора:** ідея та дизайн роботи, виконання експериментальних досліджень, статистична обробка отриманих результатів, написання тексту статті.

**Hladkykh Fedir Volodymyrovych** – Doctor of Philosophy (PhD) in Health Care in specialty «Medicine», Doctoral student (Doctor of Sciences) of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; Senior Research fellow Department of Radiation Pathology and Palliative Medicine State Organization «Grigoriev Institute for medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 82 Hryhoriia Skovorody Str., Kharkiv, 61024, Ukraine;

e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

tel.: +38 (099) 782-78-72

**Author's contribution:** the idea and design of the work, performing experimental studies, statistical processing of the obtained results, writing the text of the article.

Рукопис надійшов  
*Manuscript was received*  
03.03.2024

Отримано після рецензування  
*Received after review*  
06.04.2024

Прийнято до друку  
*Accepted for printing*  
10.05.2024

Опубліковано  
*Published*  
28.06.2024