

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АУТОІМУННОМУ АРТРИТІ

^{1,2} ГЛАДКИХ Ф.В., ¹ ЛЯДОВА Т.І.

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України,
м. Харків, Україна

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

Актуальність. З моменту відкриття мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) у 1968 році, Friedenstein A.J. та співав. у 1970 р., клітинна терапія показала величезний потенціал у лікуванні різноманітних захворювань [1]. У 1996 р. Haynesworth S.E. та співав. вперше висунули гіпотезу про паракринний механізм ефективності МСК [2]. В подальшому було показано, що препарати на основі МСК, широко відомі як «безклітинна терапія», мають менший ефект імуногенності та довший термін зберігання, ніж препарати клітинної терапії [3].

На сьогоднішній день безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ) є одним з найбільш перспективних сучасних підходів до лікування аутоімунних захворювань (АІЗ) [4, 5]. Окрім безклітинних похідних МСК, таких як екзосоми та кондиціоновані середовища МСК (КС-МСК) та ін., до числа БКБЗ належать кріоекстраговані імуномодулятори на основі тимуса, селезінки, плаценти, лімфатичних вузлів та ін. біологічних тканин, які не містять клітин [6].

Кріоекстракт плаценти (КЕП) та кріоекстракт селезінки (КЕС) вперше отримано науковцями Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, які розробили та впровадили в практику унікальну методику його тривалого зберігання у низькотемпературному середовищі [7-10]. У роботі [6] наведено найактуальніші дані щодо встановлених біологічних властивостей зазначених кріоекстрактів, а також щодо їх імуномодельючого потенціалу у лікуванні АІЗ.

За даними дослідників, поширеність АІЗ різко зростає у багатьох частинах світу, ймовірно, в результаті зміни впливу факторів навколишнього середовища. Сучасні дані вказують на те, що причинами цього зростання є значні зміни у якості продуктів харчування, ксенобіотики,

забруднення повітря, інфекції, спосіб життя, стрес, зміна клімату та ін. [11]. Одним із найпоширеніших АІЗ виступає ревматоїдний артрит (РА) – хронічне запальне системне аутоімунне захворювання, пов'язане з проліферацією синовіальної тканини, утворенням пануса, руйнуванням хряща та системними ускладненнями [12]. Наразі досягнуто глибокого розуміння патологічних механізмів автореактивних CD4+ Т-клітин, В-клітин, макрофагів, запальних цитокінів, хемокінів і аутоантитіл, які викликають РА, незважаючи на те, що ще багато чого належить з'ясувати [12].

Впродовж останніх 30 років науковці активно вивчали варіації поширеності та захворюваності на РА. Ці дослідження продемонстрували, що РА є глобальною хворобою, поширеною в усьому світі, незалежно від раси, статі, етнічної приналежності, національності, віку тощо. Однак результати вимірювання поширеності та захворюваності відрізняються залежно від характеристик населення та змінюються з часом [13].

На сьогоднішній день вчені та клініцисти провели велику кількість клінічних випробувань цілої низки препаратів у лікуванні РА. Деякі з цих препаратів схвалені для щоденної клінічної практики. В першу чергу для зняття болю, набряку та зменшення запалення використовуються нестероїдні протизапальні препарати (НПЗЗ), зокрема диклофенак натрію (ДН), ібупрофен, декскетопрофен та ін. НПЗЗ реалізують свою дію шляхом пригнічення ферментативної активності циклооксигенази (ЦОГ), яка бере участь у синтезі простагландинів (ПГ). Інгібування ЦОГ-2 НПЗЗ блокує вироблення ПГ у місцях запалення, тоді як інгібування ЦОГ-1 в інших тканинах (тромбоцитах і слизовій оболонці шлунка і дванадцятипалої кишки) призводить до побічних ефектів НПЗЗ, таких як кровотеча та виразка

шлунково-кишкового тракту [14]. Ще одним різновидом потужних протизапальних препаратів виступають кортикостероїди, однак їх побічні ефекти включають нудоту, біль у животі, виразки, остеопороз, діабет та ін. [15]. Інноваційним підходом до лікування хворих РА виступає використання БКБЗ [6].

Блокада сигналізації прозапальними цитокинами, такими як фактор некрозу пухлини (ФНП) та інтерлейкін-6 (ІЛ-6), за допомогою моноклональних антитіл кардинально змінила результати лікування пацієнтів, хворих на РА, але при цьому справжня ремісія досі залишається недосяжна для більшості пацієнтів. Повторити навіть такий рівень успіху в клініці виявилось складним завданням при випробуваннях альтернативних агентів, наприклад, блокування ІЛ-1, ІЛ-17 та сімейства ІЛ-12/23 при РА, незважаючи на їхню привабливість як терапевтичні мішені [16, 17, 18].

Мета: охарактеризувати вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (КЕП, КЕС та КС-МСК) на рівень прозапальних цитокинів на моделі ад'ювантного артриту у щурів.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження, проведені у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження». Дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200-220 г, рандомізованих на 6 груп:

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

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

III – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили референс-препарат ДН в дозі 8,0 мг/кг [19];

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 [20];

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 [21];

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 [22, 23].

АА у щурів моделювали субплантарним введенням щурам повного ад'юванта Фрейнда (Thermo Fisher Scientific, США) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [19]. День введення вважали «0» днем експерименту.

На 28-му добу експерименту щурів виводили з експерименту під наркозом та відбирали зразки змішаної крові після декапітації тварин у центрифужні пробірки. Сироватку відділяли центрифугуванням впродовж 15 хв при 3000 об/хв.

Вміст протизапальних цитокинів (ІЛ-1 β , ІЛ-17 та ФНП- α) визначали імуноферментним методом за допомогою стандартних наборів для імуноферментного аналізу згідно інструкції виробника («Neogen Corporation», США) та виражали у пг/мл.

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-Вілка (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 або непараметричних критеріїв. При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. При ненормальному розподілі принаймні однієї з груп незалежних величин відмінності між ними визначали попарно за непараметричним ранговим U-критерієм Манна-Уїтні (Mann-Whitney). 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). При ненормальному розподілі отриманих величин дані представлено 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) [24-26].

Результати дослідження та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що на 28-й день експерименту у нелікованих щурів з АА (контрольна група) відмічалось зростання вмісту прозапальних цитокинів у сироватці периферичної крові. Так, вміст ІЛ-1 β статистично вірогідно зріс ($p < 0,001$) у 2,4 рази, вміст ІЛ-17 зріс ($p < 0,001$) у 2,2 рази, а вміст ФНП- α зріс ($p < 0,001$) у 3,0 рази відносно показників інтактних щурів у аналогічні строки дослідження (табл. 1).

Встановлені зміни у профілі ІЛ-1 β , ІЛ-17 та ФНП- α узгоджуються з даними літератури [16] про концентраційні зміни у ряді циркулюючих цитокинів, які з певною послідовністю спостері-

галися до появи симптомів у тих, у кого згодом розвивається РА, порівняно зі здоровими людьми. До них належать, зокрема, ФНП, ІЛ-6, ІЛ-1β

та/або ІЛ-1, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ)), а також ІЛ-4, ІЛ-12, ІЛ-17 та ін. (рис. 1) [16].

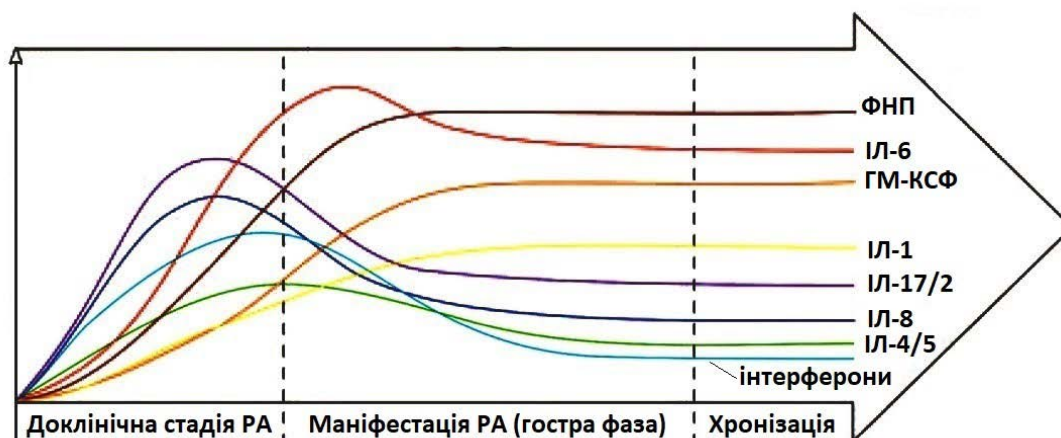


Рис. 1. Динаміка вмісту циркулюючих цитокінів при розвитку ревматоїдного артриту (модифіковано за [16])

На тлі застосування референс-препарату ДН відмічено статистично вірогідне зниження ($p < 0,001$) на 49,4% вмісту ІЛ-1β та ФНП-β на 31,0% відносно показників щурів контрольної групи (див. табл. 1).

ІЛ-1, як відомо, є головним цитокіном локального та системного запалення. ІЛ-1β є продуктом моноцитів крові, тканинних макрофа-

гів та дендритних клітин. Етапом, що обмежує швидкість виробництва ІЛ-1β, є транскрипція, але мРНК ІЛ-1β вимагає додаткового сигналу для синтезу. Стимулом може бути мікробний продукт, або цитокіни, такі як ФНП-α, ІЛ-18, ІЛ-1α, які самі індукують ІЛ-1β. Фактично, індукція ІЛ-1 сама по собі є частиною механізму «автозапалення» [27].

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів з АА на 28-й день експерименту, пг/мл ($M \pm m$ (95 % ДІ) або Me [LQ; UQ], $n=42$)

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
Інтерлейкін 1β, пг/мл	35 [30; 34]	83 [80; 89] $p_1 < 0,001$ [137,1%]	42 [35; 47] $p_2 < 0,001$ [49,4%]	74 [60; 87] $p_2 = 0,1$ [10,8%] $p_3 < 0,01$ [76,2%]	48 [38; 54] $p_2 < 0,001$ [42,2%] $p_3 = 0,2$ [14,3%]	55 [42; 60] $p_2 < 0,001$ [31,0%] $p_3 = 0,1$ [25,7%]
Інтерлейкін 17, пг/мл	20,9±2,1 (95 % ДІ: 16,8–24,9)	45,4±2,3 (95 % ДІ: 41,0–49,9) $p_1 < 0,001$ [117,8%]	41,1±3,2 (95 % ДІ: 34,9–47,4) $p_2 = 0,3$ [9,4%]	32,4±2,9 (95 % ДІ: 26,7–38,1) $p_2 < 0,01$ [28,6%] $p_3 = 0,1$ [21,2%]	50,9±1,9 (95 % ДІ: 47,2–54,5) $p_2 = 0,1$ [11,9%] $p_3 < 0,05$ [23,6%]	38,9±3,5 (95 % ДІ: 32,0–45,7) $p_2 = 0,1$ [14,5%] $p_3 = 0,6$ [5,6%]
Фактор некрозу пухлин α, пг/мл	45,4±4,1 (95 % ДІ: 37,5–53,4)	136,7±5,8 (95 % ДІ: 125,4–148,0) $p_1 < 0,001$ [200,9%]	94,3±6,0 (95 % ДІ: 82,6–106,0) $p_2 < 0,001$ [31,0%]	79,7±4,4 (95 % ДІ: 71,1–88,4) $p_2 < 0,001$ [41,7%] $p_3 = 0,07$ [15,5%]	120,9±6,1 (95 % ДІ: 108,8–132,9) $p_2 = 0,08$ [11,6%] $p_3 = 0,009$ [28,2%]	63,6±3,0 (95 % ДІ: 57,8–69,4) $p_2 < 0,001$ [53,5%] $p_3 < 0,001$ [32,6%]

Примітки: p_1 – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників; [%] – значення розбіжностей показників у відсотках; Індексами 1, 2, 3 вказано номер групи, з показниками якої проведено порівняння.

ФНП, в свою чергу, теж відіграє життєво важливу роль у типовій імунній відповіді через регуляцію низки шляхів, що охоплюють запальну реакцію з участю вродженого імунітету, а також клітинну активацію з подальшою проліферацією та запрограмованою загибеллю чи некрозом клітин. Як і можна було очікувати, з таким широким спектром клітинних ефектів і складними сигнальними шляхами, ФНП відіграє важливу роль у розвитку цілої низки хвороб, зокрема при РА, анкілозуючому спондиліті, хворобі Крона та ін. [28].

Таким чином, здатність ДН неспецифічно пригнічувати запалення цілком узгоджується з отриманим нами даними про зменшення концентрації ІЛ-1 β та ФНП- α .

Застосування БКБЗ за аналогічним до ДН режимом введення у щурів з АА призвело до зниження вмісту досліджуваних прозапальних цитокінів, що узгоджувалось зі встановленими раніше протизапальними властивостями КЕП, КЕС та КС-МСК [29, 30].

Проведені експериментальні дослідження показали, що найвиразніше зменшення вмісту ІЛ-1 β відмічено на тлі застосування КЕС – рівень вказаного цитокіну становив 48 пг/мл, що на 42,2% ($p < 0,001$) було нижче за показники щурів з АА без лікування, у яких досліджуваний показник становив 83 пг/мл (див. табл. 1). Варто зазначити, що за здатністю знижувати вміст ІЛ-1 β у щурів з АА КЕС поступався за ефективністю ДН – на тлі введення останнього вміст вказаного ІЛ був нижче на 14,3% ($p = 0,2$). Загалом, за здатністю знижувати вміст циркулюючого ІЛ-1 β на моделі АА, досліджувані препарати можна розташувати у наступній послідовності (за % відносно показників нелікованих тварин з АА): ДН (49,9%; $p < 0,001$) > КЕС (42,2%; $p < 0,001$) > КС-МСК (31,0%; $p < 0,001$) > КЕП (10,8%; $p = 0,1$).

Привертає увагу, що виявлене зниження ІЛ-1 β на моделі АА у щурів різнилось з попередніми даними про величину протизапальної активності БКБЗ. Так, за величиною протизапальної активності при експериментальному РА досліджувані БКБЗ були розташовані у такій послідовності: КЕП (ПЗА=56,5%) > КС-МСК (ПЗА=47,3%) > КЕС (ПЗА=43,3%) [29]. Такі розбіжності дозволяють нам зробити висновок, що досліджувані нами БКБЗ мають різну виразність впливу на прозапальні цитокіни, що є одним із механізмів їх протизапальної активності.

Аналізуючи дані табл. 1, можна дійти висновку, що найбільше зниження вмісту ІЛ-17 відмічалось на тлі застосування КЕП – рівень вказаного цитокіну був на 28,6% нижче ($p < 0,01$) за показники нелікованих тварин та становив 32,4 \pm 2,9 пг/мл. Як відомо, ІЛ-17 бере участь у

розвитку як доклінічної фази РА, так і хронічного РА, сприяючи активації фібробластоподібних синовіоцитів, остеокластогенезу, рекрутуванню та активації нейтрофілів, макрофагів та В-клітин [31]. Було показано, що синергізм між ІЛ-17 та ФНП- α активує вироблення прозапальних медіаторів, таких як ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, та матриксних металопротеїназ, сприяючи прогресуванню раннього запалення до хронічного артриту [32, 33].

Також нами встановлено, що за здатністю впливати на вміст циркулюючого ФНП- α , найвиразніші зміни відмічено на тлі застосування КС-МСК (див. табл. 1). Показано, що на тлі введення КС-МСК рівень ФНП- α статистично вірогідно ($p < 0,001$) був нижчим на 53,5% за показники тварин контрольної групи та становив 63,6 \pm 3,0 пг/мл.

Висновки:

Встановлено, що у щурів з АА відмічалось зростання вмісту прозапальних цитокінів: вміст ІЛ-1 β статистично вірогідно зріс ($p < 0,001$) у 2,4 рази, вміст ІЛ-17 зріс ($p < 0,001$) у 2,2 рази, а вміст ФНП- α зріс ($p < 0,001$) у 3,0 рази відносно показників інтактних щурів у аналогічні строки дослідження.

За здатністю знижувати вміст циркулюючого ІЛ-1 β на моделі АА досліджувані БКБЗ можна розташувати у наступній послідовності (за % відносно показників нелікованих тварин з АА): КЕС (42,2%; $p < 0,001$) > КС-МСК (31,0%; $p < 0,001$) > КЕП (10,8%; $p = 0,1$).

Співставляючи раніше отримані дані про протизапальну активність досліджуваних БКБЗ та результатів дослідження вмісту прозапальних цитокінів у щурів на тлі АА, можна зробити висновок, що одним із провідних механізмів протизапальної активності КЕП виступає модуляція вмісту ІЛ-17. Зміна концентрації ФНП- α ймовірно відіграє провідну роль у протизапальній активності КС-МСК, а протизапальна дія КЕС вірогідно опосередкована впливом останнього на вміст ІЛ-1 β .

Прикінцеві твердження

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України «Вивчення ролі імунних, автоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликані 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 – завідувач кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, к.мед.н., доцент Волобуєва О.В.).

Перспективи подальших досліджень.

Результати проведеного дослідження дозволили встановити провідні механізми протизапальної активності досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів на моделі експериментального автоімунного артриту – модуляція вмісту ІЛ-17 для КЕП, зниження концентрації циркулюючого ФНП- α для КС-МСК та вплив вмісту ІЛ-1 β для КЕС. Отримані дані слугують підґрунтям подальших досліджень ефективності КЕП, КЕС та КС-МСК на інших моделях автоімунних захворювань з виразним запальним компонентом.

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

Інформація про фінансування. Робота не отримувала фінансування видатками Державного бюджету України.

Внесок авторів: Гладких Ф.В. – ідея роботи, розробка концепції дослідження, формулювання мети роботи, проведення експериментальних досліджень, написання тексту рукопису, формулювання висновків. **Лядова Т.І.** – участь в обговоренні отриманих результатів, редагування тексту статті.

Relationship with academic programs, plans and themes. The article is a fragment of the planned research project of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology of V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Health of Ukraine «Study of the role of immune, autoimmune and metabolic disorders in the pathogenesis and consequences of the infectious process caused by bacteria, viruses, viral-bacterial associations in the acute, prolonged and chronic course of the disease and improvement of treatment tactics» (state registration number 0123U105022, deadline: 2023-2028, head – head of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Doctor of Medicine, Associate Professor O.V. Volobuieva).

Prospects for further research. The results of the study allowed us to establish the leading mechanisms of the anti-inflammatory activity of the investigated cell-free cryopreserved biological agents on the model of experimental autoimmune arthritis - modulation of the content of IL-17

for CES, a decrease in the concentration of circulating TNF- α for MSC-CM and the influence of the content of IL-1 β for CES. The obtained data serve as the basis for further studies of the effectiveness of CEP, CES and MSC-CM in other models of autoimmune diseases with a pronounced inflammatory component.

Conflict of interests. The authors of the manuscript consciously certify the absence of actual or potential conflicts of interest regarding the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, other organizations whose products, services, financial support may be related to the subject of the provided materials or who sponsored the conducted research.

Funding information. The work was not financed by the State Budget of Ukraine.

Contribution of the authors: Hladkykh F.V. – the idea of the work, the development of the research concept, the formulation of the purpose of the work, conducting experimental research, writing the text of the manuscript, formulating the conclusions. Liadova T.I. – participation in the discussion of the obtained results, editing of the text of the article.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393-403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x. PMID: 5523063.
2. *Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI.* Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 1996 Mar;166(3):585-92. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585::AID-JCP13>3.0.CO;2-6. PMID: 8600162.
3. *Tan MI, Alfarafisa NM, Septiani P, Barlian A, Firmansyah M, Faizal A, Melani L, Nugrahapraja H.* Potential Cell-Based and Cell-Free Therapy for Patients with COVID-19. *Cells.* 2022 Jul 27;11(15):2319. doi: 10.3390/cells11152319. PMID: 35954162; PMCID: PMC9367488.
4. *Гладких ФВ.* Безклітинні біологічні засоби: фокус на кондиціоновані середовища мезенхімальних стовбурових клітин. *Одеський медичний журнал.* 2023;185(4):75–82. DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>. [Hladkykh FV. Cell-free biologics: focus on mesenchymal stem cell conditioned media. *Odesa Medical Journal.* 2023;185(4):75–82. DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>]

5. *Гладких ФВ*. Мезенхімальні стовбурові клітини: екзосоми та кондиціоновані середовища як інноваційні стратегії у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. Клінічна та профілактична медицина. 2023;6(28):121-130. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>. [Hladkykh FV. Mesenchymal stem cells: exosomes and conditioned media as innovative strategies in the treatment patients with autoimmune diseases. *Clinical and Preventive Medicine*. 6(28):121-130. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>]
6. *Гладких ФВ*. 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;4:29-46. DOI: <https://doi.org/10.37321/immunology.2023.4-04>. [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. DOI: <https://doi.org/10.37321/immunology.2023.4-04>]
7. *Гольцев АН*, ред. Плацента: криоконсервация, клиническое применение. Харьков; 2013. 268 с. [Goltsev AM, ed. Placenta: cryopreservation, clinical application. Kharkiv; 2013. 268 p.]
8. *Кошурба ІВ, Гладких ФВ, Чиж МО*. Кріоекстракт плаценти – перший український біотехнологічний противиразкових засіб (огляд літератури та власних досліджень). Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я. 2023; 1 (10): 32-40. <https://doi.org/10.32689/2663-0672-2023-1-4> [Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Placenta cryoextract is the first Ukrainian biotechnological anti-ulcer agent (review of the literature and own research). *Modern medicine, pharmacy and psychological health*. 2023; 1 (10): 32-40. <https://doi.org/10.32689/2663-0672-2023-1-4>]
9. *Грищенко Ві, Морозова ТФ, Воротилін ОМ, Моїсєєв ВО, Гольцнв АМ, Грищенко ОВ, Прокопюк ОС, Оїпіна ОВ, Ходькл ОТ*. Приготування та зберігання кріоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання (методичні рекомендації). Харків. 1997. 19 с. [Hryshchenko VI, Morozova TF, Vorotilin OM, Moiseev VO, Goltsnv AM, Hryshchenko OV, Prokopyuk OS, Oipina OV, Khodkl OT. Preparation and storage of cryopreserved placenta suspension for clinical use (methodological recommendations). Kharkiv. 1997. 19 p.]
10. *Гальченко СЄ*. Кріоконсервування фрагментів органів ссавців і біологічна дія одержаних з них водно-солевих екстрактів : д.б.н.: спец. 03.00.19 – Кріобіологія: захищена 2007-05-22. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. 0507U000372. [Halchenko SE. Cryopreservation of fragments of mammalian organs and the biological action of water-salt extracts obtained from them: d.b.n.: spec. 03.00.19 - Cryobiology: protected 2007-05-22. Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. 0507U000372.]
11. *Miller FW*. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Curr Opin Immunol*. 2023 Feb;80:102266. doi: 10.1016/j.coi.2022.102266. Epub 2022 Nov 26. PMID: 36446151; PMCID: PMC9918670.
12. *Jang S, Kwon EJ, Lee JJ*. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 14;23(2):905. doi: 10.3390/ijms23020905. PMID: 35055087; PMCID: PMC8780115.
13. *Safiri S, Kolahi AA, Hoy D, Smith E, Bettampadi D, Mansournia MA, Almasi-Hashiani A, Ashrafi-Asgarabad A, Moradi-Lakeh M, Qorbani M, Collins G, Woolf AD, March L, Cross M*. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann Rheum Dis*. 2019 Nov;78(11):1463-1471. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215920. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31511227.
14. *Гладких ФВ*. Противиразковая активность кріоекстракту плаценти при експериментальному індометацин-індукованому ульцерогенезі. Львівський медичний часопис. 2021;27(3-4):67-82. <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.067> [Hladkykh FV. Antiulcer activity of placenta cryoextract in experimental indomethacin-induced ulcerogenesis. *Lviv Medical Journal*. 2021;27(3-4):67-82. <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.067>]
15. *Huang J, Fu X, Chen X, Li Z, Huang Y, Liang C*. Promising Therapeutic Targets for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2021 Jul 9;12:686155. doi: 10.3389/fimmu.2021.686155. PMID: 34305919; PMCID: PMC8299711.
16. *Ridgley LA, Anderson AE, Pratt AG*. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol*. 2018 Mar;30(2):207-214. doi: 10.1097/BOR.0000000000000470. PMID: 29206659; PMCID: PMC5805125.

17. Blanco FJ, Mricke R, Dokoupilova E, Codding C, Neal J, Andersson M, Rohrer S, Richards H. Secukinumab in Active Rheumatoid Arthritis: A Phase III Randomized, Double-Blind, Active Comparator- and Placebo-Controlled Study. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Jun;69(6):1144-1153. doi: 10.1002/art.40070. Epub 2017 May 3. PMID: 28217871.
18. Smolen JS, Agarwal SK, Ilivanova E, Xu XL, Miao Y, Zhuang Y, Nnane I, Radziszewski W, Greenspan A, Beutler A, Baker D. A randomised phase II study evaluating the efficacy and safety of subcutaneously administered ustekinumab and guselkumab in patients with active rheumatoid arthritis despite treatment with methotrexate. *Ann Rheum Dis.* 2017 May;76(5):831-839. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209831. Epub 2017 Jan 13. PMID: 28087506; PMCID: PMC5530337.
19. Стефанов ОВ, ред. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 527 с. [Stefanov OV, ed. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.]
20. Шепітько ВІ. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої печінки і вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів: дис. д.мед.н.: спец.. 14.01.35 – Кріомедицина, Харків, 2004. 326 с. Режим доступу: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/> [Shepitko VI. Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs: dissertation. Doctor of Medicine: special.. 14.01.35 – Cryomedicine, Kharkiv, 2004. 326 p. Access mode: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>]
21. Беспалова ІГ. Пептидний склад та біологічна дія екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят: к.б.н.: спец. 03.00.19 – Кріобіологія: захищена 2016-10-25. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. 0416U004539. [Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin: Ph.D.: spec. 03.00.19 - Cryobiology: protected 2016-10-25. Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. 0416U004539.]
22. Golubinskaya PA, Sarycheva MV, Dolzhikov AA, Bondarev VP, Stefanova MS, Soldatov VO, Nadezhdin SV, Korokin MV, et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology.* 2020;8(6):416–25. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
23. Глоба ВЮ. Застосування кріоконсервованих культур клітин та нейротрофічних факторів при експериментальній інфравезикальній обструкції. Ис. PhD: спец. 222 – Медицина, Харків, 2021. 156 с. Режим доступу: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/> [Globa VYu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. Fig. PhD: specialist 222 – Medicine, Kharkiv, 2021. 156 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>]
24. Zar JH. Biostatistical analysis (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014; 960 p.
25. Tripathy JP. Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health.* 2013;42(12):1478–9.
26. 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.
27. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 2013 Dec 15;25(6):469–84. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.008. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24275598; PMCID: PMC3953875.
28. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res.* 2019 Jan 28;8:F1000 Faculty Rev-111. doi: 10.12688/f1000research.17023.1. PMID: 30755793; PMCID: PMC6352924.
29. Гладких ФВ, Лядова ТІ. 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):53–59. DOI: <https://doi.org/10.32782/2415-8127.2024.69.9>. [Hladkikh 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):53–59. DOI: <https://doi.org/10.32782/2415-8127.2024.69.9>]
30. Гладких ФВ, Лядова ТІ. Вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів на вміст окремих ейкозаноїдів у щурів зі змоде-

льованим ад'ювантом Фрейнда артритом. Health & Education. 2024;1:32–40. DOI: <https://doi.org/10.32782/health-2024.1.4>. [Hladkikh FV, Lyadova TI. Effect of cell-free cryopreserved biologics on individual eicosanoid content in rats with Freund's adjuvant modeled arthritis. Health & Education. 2024;1:32–40. DOI: <https://doi.org/10.32782/health-2024.1.4>]

31. *Lubberts E.* The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Jul;11(7):415-29. doi: 10.1038/nrrheum.2015.53. Epub 2015 Apr 28. Erratum in: *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Oct;11(10):562. doi: 10.1038/nrrheum.2015.128. PMID: 25907700.
32. *Paulissen SM, van Hamburg JP, Davelaar N, Asmawidjaja PS, Hazes JM, Lubberts E.* Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *J Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):1364-72. doi: 10.4049/jimmunol.1300274. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23817417.
33. *Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, Grasso G, La Barbera L, Ciccia F, Guggino G.* Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview. *Front Immunol.* 2021 Feb 22;12:637829. doi: 10.3389/fimmu.2021.637829. PMID: 33692806; PMCID: PMC7937623.

РЕЗЮМЕ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АУТОІМУННОМУ АРТРИТІ

^{1,2} ГЛАДКИХ Ф.В., ¹ ЛЯДОВА Т.І.

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України,
м. Харків, Україна

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

Актуальність. За даними багатьох дослідників, поширеність аутоімунних захворювань (АІЗ) різко зростає у багатьох частинах світу, ймовірно, в результаті зміни впливу факторів навколишнього середовища. Безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ) є одним з найбільш перспективних сучасних підходів до лікування АІЗ. Окрім безклітинних похідних мезенхімільних стовбурових клітин (МСК), таких як екзосоми та кондиціоновані середовища МСК (КС-МСК), до числа БКБЗ належать кріоекстраговані імуномодулятори на основі тимуса, селезінки, плагенти, лімфатичних вузлів та ін. біологічних тканин, які не містять клітин. Блокада сигналізації прозапальними цитокінами,

такими як фактор некрозу пухлини (ФНП) та інтерлейкін-6 (ІЛ-6), за допомогою моноклональних антитіл кардинально змінила результати лікування пацієнтів із важким РА, але при цьому справжня ремісія досі залишається недосяжна для більшості хворих. Повторити навіть такий рівень успіху в клініці виявилось складним у випробуваннях альтернативних агентів, наприклад, блокування ІЛ-1 β , ІЛ-17 та сімейства ІЛ-12/23 при ревматоїдному артриті (РА), незважаючи на їхню привабливість як терапевтичні мішені.

Мета: охарактеризувати вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та КС-МСК на рівень прозапальних цитокінів на моделі ад'юваного артриту (АА) у щурів.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проведені у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження». Дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200-220 г. АА у щурів моделювали субплантарним введенням щурам повного ад'юванта Фрейнда (Thermo Fisher Scientific, США) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура. День введення вважали «0» днем експерименту. На 28-му добу експерименту щурів виводили з експерименту. Вміст протизапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-17 та ФНП- α) визначали імуноферментним методом за допомогою стандартних наборів для імуноферментного аналізу згідно інструкцій виробника («Neogen Corporation», США) та виражали у пг/мл.

Результати та обговорення. Проведене дослідження показало, що на 28-й день експерименту у нелікованих щурів з АА (контрольна група) відмічалось зростання вмісту прозапальних цитокінів у сироватці периферичної крові. Так, вміст ІЛ-1 β статистично вірогідно зріс ($p < 0,001$) у 2,4 рази, вміст ІЛ-17 зріс ($p < 0,001$) у 2,2 рази, а вміст ФНП- α зріс ($p < 0,001$) у 3,0 рази відносно показників інтактних щурів у аналогічні строки дослідження. Проведені експериментальні дослідження показали, що найвиразніше зменшення вмісту ІЛ-1 β відмічено на тлі застосування КЕС – рівень вказаного цитокіну становив 48 пг/мл, що на 42,2% ($p < 0,001$) було нижче за показники щурів з АА без лікування, у яких досліджуваний показник становив 83 пг/мл (див. табл. 1). Варто зазначити, що за здатністю знижувати вміст ІЛ-1 β у щурів з АА КЕС поступався за ефективністю диклофенак натрію – на тлі введення останнього вміст вказаного ІЛ був нижче на 14,3% ($p = 0,2$). Загалом, за здатністю знижувати вміст циркулюючого ІЛ-1 β на моделі АА, досліджувані препарати можна розташувати у наступній послідовності (за % відносно показників нелікованих тварин з АА): диклофенак натрію (49,9%; $p < 0,001$) > КЕС (42,2%; $p < 0,001$) > КС-МСК (31,0%; $p < 0,001$) > КЕП (10,8%; $p = 0,1$). Найбільше зниження вмісту ІЛ-17 відмічалось на тлі застосування КЕП – рівень вказаного цитокіну був на 28,6% нижче ($p < 0,01$) за показники нелікованих тварин та становив

32,4±2,9 пг/мл. Встановлено, що на тлі введення КС-МСК рівень ФНП-α статистично вірогідно (p<0,001) був нижчим на 53,5%, а показник тварин контрольної групи становив 63,6±3,0 пг/мл.

Висновки. Співставлення раніше отриманих даних про протизапальну активність досліджуваних БКБЗ та одержаних результатів дослідження вмісту прозапальних цитокінів у щурів на тлі АА дозволили зробити висновок, що одним із провідних механізмів протизапальної активності КЕП виступає модуляція вмісту ІЛ-17, модуляція концентрації ФНП-α ймовірно відіграє провідну роль у проти-запальній активності КС-МСК, а протизапальна дія КЕС вірогідно опосередкована впливом останнього на вміст ІЛ-1β.

Ключові слова: автоімунні захворювання, кріоекстракт плаценти, кріоекстракт селезінки, кондиціоноване середовище, мезенхімальні стовбурові клітини, запалення, цитокіни, інтерлейкіни, ад'ювантний артрит.

SUMMARY

STUDY OF THE EFFECT OF CELL-FREE CRYOPRESERVED BIOLOGICAL AGENTS ON THE LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ARTHRITIS

^{1,2}HLADKYKH F.V., LIADOVA T.I.

¹V.N. Karazin Kharkiv National University
of the Ministry of Education and Science of Ukraine,
Kharkiv, Ukraine

²State of Organization "Grigoriev Institute for Medical Radiology
and Oncology of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine",
Kharkiv, Ukraine

Background. According to many researchers, the prevalence of autoimmune diseases (AID) is increasing dramatically in many parts of the world, probably as a result of changing exposure to environmental factors. Cell-free cryopreserved biological agents (CFCBA) are one of the most promising modern approaches to the treatment of AID. In addition to cell-free mesenchymal stem cell (MSC) derivatives such as exosomes and MSC-conditioned medium (MSC-CM), CFCBA include cryo-extracted immunomodulators based on thymus, spleen, placenta, lymph nodes, etc. biological tissues that do not contain cells. Blockade of signaling by pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6) using monoclonal antibodies has dramatically changed treatment outcomes for patients with severe RA, but true remission is still elusive for most patients. Replicating even this level of success in the clinic has proven difficult in trials of alternative agents, such as blocking IL-1β, IL-17, and the IL-12/23 family in rheumatoid arthritis (RA), despite their attractiveness as therapeutic targets.

Goal: to characterize the effect of cell-free cryopreserved biological agents – placenta cryoextract (CEP), spleen cryoextract (CES) and MSC-CM on the level of proinflammatory cytokines in a model of adjuvant arthritis (AA) in rats.

Materials and Methods. Experimental studies were conducted in accordance with the basic bioethical norms of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association «Ethical principles of medical research with the participation of a person as an object of research». The studies were conducted on 42 male rats weighing 200-220 g. AA in rats was simulated by subplantar administration of complete Freund's adjuvant (Thermo Fisher Scientific, USA) into the hind right limb at the rate of 0.1 ml per rat. The day of introduction was considered «0» as the day of the experiment. On the 28th day of the experiment, rats were removed from the experiment. The content of anti-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-17 and TNF-α) was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay method using standard enzyme-linked immunosorbent assay kits according to the manufacturer's instructions (Neogen Corporation, USA) and expressed in pg/ml.

Results and their discussion. The conducted study showed that on the 28th day of the experiment, an increase in the content of pro-inflammatory cytokines in the peripheral blood serum was noted in untreated rats with AA (control group). Thus, the content of IL-1β increased statistically significantly (p<0.001) by 2.4 times, the content of IL-17 increased (p<0.001) by 2.2 times, and the level of TNF-α increased (p<0.001) by 3.0 times relative to the indicators of intact rats during the same period of the study. The conducted experimental studies showed that the most pronounced decrease in the content of IL-1β was noted against the background of the use of CES – the level of this cytokine was 48 pg/ml, which was 42.2% (p<0.001) lower than the indicators of rats with AA without treatment, in which the investigated indicator was 83 pg/ml (see Table 1). It is worth noting that the ability to reduce the content of IL-1β in rats with AA CES was inferior to the effectiveness of diclofenac sodium – against the background of the introduction of the latter, the content of the indicated IL was lower by 14.3% (p=0.2). In general, according to the ability to reduce the content of circulating IL-1β in the AA model, the studied drugs can be arranged in the following sequence (in % relative to the indicators of untreated animals with AA): diclofenac sodium (49.9%; p<0.001) > CES (42.2%; p<0.001) > MSC-CM (31.0%; p<0.001) > CEP (10.8%; p=0.1). The greatest decrease in the IL-17 content was observed against the background of the use of CEP – the level of this cytokine was 28.6% lower (p<0.01) than that of untreated animals and was 32.4±2.9 pg/ml. It was established that against the background of the introduction of MSC-CM, the level of TNF-α was statistically significantly (p<0.001) lower by 53.5%, while the indicators of animals of the control group were 63.6±3.0 pg/ml.

Conclusions. Comparison of the previously obtained data on the anti-inflammatory activity of the investigated CFCBA and the obtained results of the study of the content of pro-inflammatory cytokines in rats on the background of AA, it can be concluded that one of the leading mechanisms of the anti-inflammatory activity of CEP is the modulation of the content of

IL-17, the modulation of the concentration of TNF- α probably plays a leading role in anti-inflammatory activity of MSC-CM, and the anti-inflammatory effect of CES is probably mediated by the effect of the latter on IL-1 β content.

Key words: autoimmune diseases, placenta cryoextract, spleen cryoextract, conditioned medium, mesenchymal stem cells, inflammation, cytokines, interleukins, adjuvant arthritis.

АВТОРСЬКА ДОВІДКА

• Гладких Федір Володимирович

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 відділу променевої патології та паліативної медицини Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»
Адреса: Майдан Свободи, буд. 6, м. Харків, 61022, Україна;
вул. Григорія Сковороди, буд. 82, м. Харків, 61024, Україна
Тел.: +38 (099) 782-78-72
E-mail: fedir.hladykh@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>
Scopus: www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57226085532
Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/1507258>

• Лядова Тетяна Іванівна

Доктор медичних наук, професорка кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, декан медичного факультету, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України
Адреса: Майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, 61022, Україна
Тел.: +38 (050) 692-56-41
E-mail: t.lyadova@karazin.ua
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>
Scopus: www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57205369365
Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/rid/DWD-6225-2022>

• Hladykh 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"
Address: 6 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine;
82, Hryhoriya Skovorody Str., Kharkiv, 61024, Ukraine
Tel.: +38 (099) 782-78-72
E-mail: fedir.hladykh@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>
Scopus: www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57226085532
Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/1507258>

• Liadova Tetyana Ivanivna

Doctor of medical sciences (DSci, PhD), Professor of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Dean of the medical faculty, V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine
Address: 4 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine
Tel.: +38 (050) 692-56-41
E-mail: t.lyadova@karazin.ua
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>
Scopus: www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57205369365
Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/rid/DWD-6225-2022>

Стаття надійшла до редакції 03.05.2024 р.