

© 2024 by the author(s).

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



How to cite / Як цитувати статтю: Hladkykh FV, Liadova TI. Characterization of the effect of acellular cryopreserved biological agents on the levels of anti-inflammatory and regulatory cytokines in experimental autoimmune arthritis. *East Ukr Med J.* 2024;12(4):937-945

DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2024;12\(4\):937-945](https://doi.org/10.21272/eumj.2024;12(4):937-945)

ABSTRACT

Fedir Volodymyrovych Hladkykh

<https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

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

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

Tetyana Ivanivna Liadova

<https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>

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

CHARACTERIZATION OF THE EFFECT OF ACELLULAR CRYOPRESERVED BIOLOGICAL AGENTS ON THE LEVELS OF ANTI-INFLAMMATORY AND REGULATORY CYTOKINES IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ARTHRITIS

Background. The pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) involves a complex cascade of cytokines that trigger the proliferation of synovial cells and cause damage to both cartilage and bone. In recent years, particular attention has been drawn to research focused on exploring the potential use of acellular cryopreserved biological agents (CBAs) for optimizing RA therapy.

Objective. The paper aims to characterize the effect of CBAs – placental cryoextract (PCE), spleen cryoextract (SCE), and conditioned medium from mesenchymal stem cells (MSC-CM) on cytokine levels in an adjuvant arthritis (AA) model.

Methods. Experimental studies were conducted on 42 male rats weighing 200–220 g. AA was modeled by administering complete Freund's adjuvant. On day 28 of the experiment, mixed blood samples were collected. The levels of interleukins (IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. It was found that on day 28 of the experiment, during AA development, there was a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the levels of anti-inflammatory cytokines – IL-4 by 94.9% and IL-10 by 150.7%, as well as an increase in the levels of regulatory cytokines – IL-2 by 233.3% ($p < 0.001$) and IL-6 by 167.7% ($p < 0.001$) compared to the intact rats. The administration of the studied cryoextracts had a pronounced effect on the levels of anti-inflammatory cytokines in AA rats. Specifically, following PCE administration, IL-4 levels decreased ($p = 0.004$) by 31.3%, and after SCE administration, IL-10 levels decreased ($p = 0.02$) by 20.5% compared to untreated AA rats. The most pronounced effect on the levels of regulatory cytokines was observed with the use of MSC-CM in AA rats. IL-2 levels decreased ($p = 0.003$) by

21.5% compared to untreated AA animals.

Conclusions. It was established that the administration of CBAs influences the levels of anti-inflammatory and regulatory cytokines in AA rats, indicating their potential in the therapy of autoimmune diseases. The results showed a decrease in the levels of anti-inflammatory cytokines, particularly IL-4 and IL-10, as well as a reduction in the levels of the regulatory cytokine IL-2 after the administration of CBAs, suggesting their modulatory effect on the immune response.

Keywords: systemic autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, interleukins, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Corresponding author: Fedir Volodymyrovych Hladkykh, V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine; State Organization "Grigoriev Institute for medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Федір Володимирович Гладких
<https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>
Харківський національний
університет імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки
України, м. Харків, Україна;

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

Тетяна Іванівна Лядова
<https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>
Харківський національний
університет імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки
України, м. Харків, Україна

ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЛИВУ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА РІВЕНЬ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ТА РЕГУЛЯТОРНИХ ЦИТОКІНІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АУТОІМУННОМУ АРТРИТІ

Актуальність. Патогенез ревматоїдного артриту (РА) включає складний каскад цитокінів, які ініціюють проліферацію синовіальних клітин та викликають пошкодження як хряща, так і кістки. В останні роки особливу увагу привертають результати досліджень, спрямованих на вивчення можливостей застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ) для оптимізації терапії РА.

Мета. Охарактеризувати вплив БКБЗ – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК) на рівень цитокінів на моделі ад'ювантного артриту (АА).

Методи. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г. АА моделювали ведення повного ад'юванта Фрейнда. На 28 добу експерименту відбирали зразки змішаної крові. Вміст інтерлейкінів (ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6 та ІЛ-10) визначали імуноферментним методом.

Результати. Встановлено, що на тлі розвитку АА у щурів на 28 день експерименту відмічено статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання вмісту протизапальних цитокінів – ІЛ-4 на 94,9% та ІЛ-10 на 150,7%, а також підвищення рівня регуляторних цитокінів – ІЛ-2 на 233,3% ($p < 0,001$) та ІЛ-6 на 167,7% ($p < 0,001$) відносно показників інтактних щурів. Введення досліджуваних кріоекстрактів мало виразний вплив на рівень протизапальних цитокінів у щурів з АА. Так, на тлі введення КЕП рівень ІЛ-4 знизився ($p = 0,004$) на 31,3%, а на тлі введення КЕС – рівень ІЛ-10 знизився ($p = 0,02$) на 20,5% відносно показників щурів з АА без лікування. Найвиразніший вплив на рівень регуляторних цитокінів встановлено на тлі застосування КС-МСК при АА у щурів. Так рівень ІЛ-2 знизився ($p = 0,003$) на 21,5% відносно показників нелікованих тварин з АА.

Висновки. Встановлено, що введення БКБЗ впливає на рівень протизапальних та регуляторних цитокінів у щурів з АА, що

свідчить про їхній потенціал у терапії аутоімунних захворювань. Результати показали зниження рівня протизапальних цитокінів, зокрема ІЛ-4 та ІЛ-10, а також зменшення рівня регуляторного цитокіну ІЛ-2 після введення БКБЗ, що вказує на їхній модуляційний вплив на імунну відповідь.

Ключові слова: системні аутоімунні захворювання, ревматоїдний артрит, інтерлейкіни, імуноферментний аналіз.

Автор, відповідальний за листування: Федір Володимирович Гладких, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, м. Харків, Україна; Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

ВСТУП

Запальні артрити – це група ревматичних захворювань, що характеризуються запаленням синовіальної оболонки суглобів та низкою системних проявів. Ревматоїдний артрит (РА), псоріатичний артрит та анкілозуючий спондиліт є найбільш поширеними підтипами запального артриту [1]. РА характеризується хронічним запаленням суглобової оболонки, синовіальною гіперплазією та прогресуючою деградацією хряща та кістки, що спричиняє прогресуюче ураження суглобів і може призвести до довічної інвалідності. Хорі з РА зазвичай відмічають біль у суглобах, припухлість, чутливість і скутість, особливо вранці, їм також доводиться справлятися з втомою та депресією, оскільки хвороба становить велике особисте та соціальне навантаження [2].

Цитокінопоередкований шлях є центральним у патогенезі РА. В ураженому суглобі Т-клітини та інші інфільтровані імунні клітини, пов'язані із захворюванням, вивільняють різноманітні цитокіни, які є важливими медіаторами клітинної диференціації, запалення, імунної патології та імунної відповіді [3]. Залучення фактору некрозу пухлин (TNF)- α та інтерлейкіну (ІЛ)-6 відіграє чи не найважливішу роль у розвитку РА, але останні дослідження показали, що й інші цитокіни, такі як ІЛ-7, ІЛ-17, ІЛ-21, ІЛ-23, гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулюючий фактор (GM-CSF), ІЛ-1 β , ІЛ-18, ІЛ-33 та ІЛ-2 також відіграють певну роль [4, 5].

Патогенез РА включає складну мережу різних цитокінів і клітин, які запускають проліферацію синовіальних клітин і викликають пошкодження як хряща, так і кістки. Цитокіни, як правило, секретуються імунними клітинами для організації різноманітних клітинних функцій, таких як клітинна диференціація, активація, міграція, виживання або проліферація паракринним або аутокринним

способом. Оскільки вони виявляють плеiotропні ефекти та можуть або діяти синергетично або поділяти ефекти один з одним, точне регулювання їх взаємодії має першорядне значення для належної підтримки імунної системи та гомеостазу організму. Їх вплив на розвиток РА добре задокументовано, а деякі докази навіть показують, що підмножина цитокінів вже є незбалансованою ще до клінічного початку захворювання [6].

На ранній стадії розвитку РА антитіла до цитрулінованого пептиду (АСРА) утворюють імунний комплекс і активують макрофаги для секреції прозапальних цитокінів, таких як TNF та ІЛ-6. Крім того, клітини Th17, стимульовані власним антигеном, секретують ІЛ-17 [5]. Прозапальні цитокіни, такі як TNF, ІЛ-6 та ІЛ-17, активують синовіальні фібробласти, які виділяють різні патогенні молекули, включаючи ІЛ-6, GM-CSF і матриксну металопротеїназу (MMP), що призводить до збагачення прозапальних цитокінів. TNF та ІЛ-17 синергічно індукують патогенні молекули РА. Крім того, різні сигнали, такі як ІЛ-2 від клітин Т-хелперів (Th) 17, ІЛ-7 від запаленої тканини та ІЛ-33 від ендотелію або синовіальних фібробластів, можуть активувати вроджені лімфоїдні клітини групи 2 (ILC2) для вивільнення GM-CSF, які діють у хронічній фазі. Ці подразники індукують рецепторний активатор ліганду NF- κ B (RANKL) на фібробластах і індукують остеокласти із зовнішніх або внутрішніх макрофагів. RANKL зв'язується зі своїм рецептором RANK і активує c-Jun через мітоген-активовану протеїнкіназу (MAPK) і c-Fos через NF- κ B. Нарешті, він активує ядерний фактор активованих Т-клітин c1 (NFATc1), щоб індукувати диференціювання остеокластів, які відіграють роль у резорбції кісток [4, 5].

В останні роки особливу увагу привертають результати досліджень, спрямованих на вивчення можливостей застосування безклітинних

кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ) для оптимізації терапії різних аутоімунних захворювань, зокрема РА. БКБЗ, такі як екзосоми, отримані з мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), а також кріоконсервовані екстракти органів або окремих тканин ссавців, демонструють обнадійливі результати в контексті зниження запальних процесів та полегшення больового синдрому [7, 8, 9]. Проте наявні дослідження не дають повного уявлення про механізми, через які БКБЗ можуть регулювати рівень протизапальних та регуляторних цитокінів в умовах аутоімунного артриту. Зважаючи на це, виникає потреба у додаткових дослідженнях, що дозволять глибше зрозуміти ефект цих засобів на молекулярному рівні, особливо в контексті зменшення хронічного запалення та корекції дисбалансу цитокінів, характерного для аутоімунних захворювань. Особливої уваги заслуговує дослідження впливу БКБЗ на рівень протизапальних цитокінів (ІЛ-2 та ІЛ-4) та на рівень регуляторних цитокінів (ІЛ-6 та ІЛ-10). Так, ІЛ-2 і ІЛ-4 стимулюють активність Т-лімфоцитів та інших імунних клітин, що сприяє розвитку аутоімунної відповіді. ІЛ-6 і ІЛ-10, з іншого боку, регулюють запалення та імунний баланс, що може впливати на перебіг захворювання. Моніторинг рівня цих цитокінів дозволяє оцінити ступінь запалення та ефективність терапії, що допомагає коригувати лікування і знижувати ризик ускладнень.

Мета дослідження – характеристика впливу БКБЗ (кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища МСК) на рівень протизапальних та регуляторних цитокінів на моделі ад'ювантного артриту (АА) у щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у повній відповідності до чинних вітчизняних та міжнародних нормативно-правових актів: Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р. (зі змінами); Наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» № 249 від 01.03.2012 р.; Наказу Міністерства охорони здоров'я України «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» № 944 від 14.12.2009 р.; Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (м. Київ, 2001 р.); Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту і

Ради Європейського Союзу «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою» (м. Брюссель, 2010 р.); Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986 р.) та ін. Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комісією з питань етики та біоетики медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України (витяг з протоколу № 17 від 2 жовтня 2023 р.). До початку експерименту щури впродовж 14 діб перебували в умовах карантину (СТ-Н МОЗ України 42-6.0:2008 «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика») після чого проводилась рандомізація на групи по 7 особин в кожній із подальшим утриманням в умовах стандартного водно-харчового раціону з вільним доступом (*ad libitum*) до води та їжі.

АА моделювали субплантарним веденням щуром повного ад'юванта Фрейнда (*Thermo Fisher Scientific, США*) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура («0» день експерименту) [10]. Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили в/м з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та 26 дні. У якості референс-препарату використано ДН, який вводили внутрішньом'язово (в/м) в дозі, яка дорівнювала ED_{50} за протизапальною активністю – 8,0 мг/кг [9]. Зазначена доза відповідає разовій дозі для людини 88 мг (1,25 мг/кг), що узгоджується з клінічними рекомендаціями про використання ДН у хворих по 75–100 мг/добу при його тривалому застосуванні.

Щурів розподіляли на 6 груп:

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

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

III – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили референс-препарат ДН в дозі 8,0 мг/кг [9];

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 [11];

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 [12];

VI – шури 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 [13].

На 28 добу експерименту щурів виводили з експерименту під інгаляційним наркозом та відбирали зразки змішаної крові після декапітації тварин у центрифужні пробірки. Сироватку відділяли центрифугуванням впродовж 15 хв при 3000 об/хв. Вміст цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6 та ІЛ-10) 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-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 або непараметричних критеріїв. При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. 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±m" (M±SE), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95 % ДІ: 5 % – 95 %), де 95 % ДІ: – 95 % довірчий інтервал.

РЕЗУЛЬТАТИ

Дослідження показало, що на тлі розвитку АА у щурів на 28 день експерименту відмічено статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання вмісту ІЛ-4 на 94,9% та зростання рівня ІЛ-10 на 150,7% відносно показників інтактних щурів. Обидва вказаних цитокіни належать до групи з переважно протизапальною дією. Крім того, встановлено зростання рівня ІЛ-2 на 233,3% ($p < 0,001$) та підвищення рівня ІЛ-6 на 167,7% ($p < 0,001$) відносно показників інтактних щурів (табл. 1).

Зростання протизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10 узгоджується з даними літературних джерел [14] та в світлі попередніх досліджень [8] вказує на непропорційне зростання прозапальних (ІЛ-1β та ІЛ-17) та досліджуваних протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів з АА.

На тлі застосування референс-препарату ДН виявлене виразне статистично вірогідне ($p < 0,001$) зниження вмісту протизапального ІЛ-4 на 41,7% відносно показників щурів з АА без лікування (див. табл. 1). Привертає увагу, що на тлі застосування досліджуваних БКБЗ відмічено менш виразне зниження зазначеного цитокіну. Так, на тлі введення КС-МСК рівень ІЛ-4 у щурів з АА залишався незмінним, а на тлі введення КЕС – рівень ІЛ-4 мав тенденцію до зниження ($p = 0,3$) лише на 11,3% відносно показників нелікованих тварин. Найвиразніше рівень ІЛ-4 знизився на тлі введення КЕП – на 31,3% ($p = 0,004$) відносно показників щурів контрольної групи та становив $11,3 \pm 1,1$ пг/мл (табл. 1).

Оцінка рівня протизапального ІЛ-10 показала що застосування всіх БЕБЗ мало місце, за аналогією до впливу на рівень ІЛ-4, менш виразне зниження ІЛ-10 на тлі введення біологічних препаратів ніж на тлі застосування референс-препарату ДН. Проте, на відміну від зміни з боку ІЛ-4, рівень якого у щурів з АА найвиразніше знизився на тлі введення КС-МСК, встановлено, що рівень ІЛ-10 найвиразніше статистично вірогідно ($p = 0,002$) знизився на тлі введення КЕС – на 20,5% відносно показників нелікованих тварин та становив $39,3 \pm 1,9$ пг/мл, що на 26,1% ($p = 0,004$) перевищувало показники групи щурів, яким вводили референс-препарат ДН. Слід зазначити, що введення ДН призвело до найбільшого зниження вмісту ІЛ-10 у щурів з АА. Зазначений цитокін статистично вірогідно ($p < 0,01$) знизився на 37,0% відносно рівня у нелікованих тварин. На тлі введення КС-МСК та КЕП щурам з АА рівень ІЛ-10 мав тенденцію до зниження ($p > 0,05$) відповідно на 9,5% та 12,1% відносно показників щурів контрольної групи. Дослідження впливу БКБЗ на рівень регуляторних цитокінів показало, що введення кріоекстрактів не призводило до значної зміни вмісту ІЛ-2 ($p > 0,05$), в той час як застосування КС-МСК у щурів з АА призвело до статистично вірогідного ($p < 0,01$) зниження рівня ІЛ-2 на 10,0%, що в 2 рази перевищувало аналогічні зміни на тлі введення референс-препарату ДН (табл. 1).

В той же час встановлено, що за здатністю вливати на вміст ІЛ-6 всі досліджувані БКБЗ поступались за активністю реферанс-препарату ДН. Так, на тлі введення КС-МСК рівень ІЛ-6 знизився ($p = 0,003$) на 21,5%, на тлі введення КЕП – знизився ($p = 0,02$) на 17,6%, а на тлі ведення КЕС – мав тенденцію ($p = 0,06$) до зниження на 12,4% відносно показників нелікованих щурів з АА. В той же час на тлі введення ДН у щурів з АА рівень ІЛ-6 статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизився на 57,7% відносно рівня нелікованих тварин (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на вміст окремих цитокінів у сироватці крові щурів з АА на 28 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
<i>n</i>	7	7	7	7	7	7
Інтерлейкін 4, пг/мл	8,4±0,8 (95 % ДІ: 6,9–10,0)	16,4±0,9 (95 % ДІ: 14,7–18,1) $p_1 < 0,001$ [94,9%]	9,6±0,5 (95 % ДІ: 5,8–10,6) $p_2 < 0,001$ [41,7%]	11,3±1,1 (95 % ДІ: 9,0–13,5) $p_2 = 0,004$ [31,3%] $p_3 = 0,2$ [17,9%]	14,6±1,3 (95 % ДІ: 12,0–17,2) $p_2 = 0,3$ [11,3%] $p_3 = 0,004$ [%]	16,4±1,6 (95 % ДІ: 13,3–19,6) $p_2 = 1,0$ [0%] $p_3 = 0,002$ [71,6%]
Інтерлейкін 10, пг/мл	19,7±1,8 (95 % ДІ: 16,1–23,3)	49,4±1,6 (95 % ДІ: 46,2–52,7) $p_1 < 0,001$ [150,7%]	31,1±1,3 (95 % ДІ: 28,6–33,7) $p_2 < 0,001$ [37,0%]	43,4±2,4 (95 % ДІ: 38,8–48,1) $p_2 = 0,06$ [12,1%] $p_3 < 0,001$ [39,4%]	39,3±1,9 (95 % ДІ: 35,6–43,0) $p_2 = 0,002$ [20,5%] $p_3 = 0,004$ [26,1%]	45,4±2,4 (95 % ДІ: 41,4–49,5) $p_2 = 0,1$ [9,5%] $p_3 < 0,001$ [45,9%]
Інтерлейкін 2, пг/мл	60 [53; 63]	200 [195; 238] $p_1 < 0,001$ [233,3%]	190 [125; 200] $p_2 = 0,037$ [5,0%]	200 [180; 225] $p_2 = 0,2$ [0%] $p_3 = 0,1$ [5,3%]	190 [180; 205] $p_2 = 0,1$ [5,0%] $p_3 = 0,2$ [0%]	180 [155; 190] $p_2 < 0,01$ [10,0%] $p_3 = 0,5$ [5,3%]
Інтерлейкін 6, пг/мл	54,4±2,9 (95 % ДІ: 48,8–60,0)	145,7±5,1 (95 % ДІ: 135,6–155,8) $p_1 < 0,001$ [167,7%]	61,6±4,4 (95 % ДІ: 52,9–70,2) $p_2 < 0,001$ [57,7%]	120,0±8,1 (95 % ДІ: 104,1–135,9) $p_2 = 0,02$ [17,6%] $p_3 < 0,001$ [94,9%]	127,7±7,1 (95 % ДІ: 113,8–141,6) $p_2 = 0,06$ [12,4%] $p_3 < 0,001$ [107,4%]	114,4±6,4 (95 % ДІ: 101,9–127,0) $p_2 = 0,003$ [21,5%] $p_3 < 0,001$ [85,8%]

Примітки.

1. $p1$ – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
2. [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
3. Індексами 1, 2, 3 вказано номер групи, з показниками якої проведено зрівняння

ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження узгоджуються з даними літературних джерел та вказують на полівекторність дії досліджуваних БКБЗ. Так, за даними *Isomäki P. та співавт.* [14] в активній стадії РА рівень протизапального цитокіну ІЛ-4 занадто низький, тому він може бути не в змозі протидіяти шкідливому впливу прозапальних цитокінів. *Taki H. та співавт.* [15] виявили, що ІЛ-4 може збільшити ймовірність синовіальної дилатації через антиапоптоз. *Krabben A. та співавт.* [16] вказали, що зміни генів ІЛ-4 та ІЛ-4R тісно пов'язані з тяжкістю ураження суглобів при РА [17].

За даними [18] ІЛ-4 та ІЛ-10 були протестовані на їх протизапальну та хондропротекторну дію для лікування РА, однак результати були суперечливими. ІЛ-10 має деякі прозапальні властивості, включаючи стимуляцію активності В-клітин і регуляцію Fc-

рецепторів на антигенпрезентуючих клітинах, що за певних умов може протидіяти його сильним протизапальним властивостям. Це разом із коротким періодом напіврозпаду ІЛ-10 було запропоновано як потенційне пояснення дещо невтішних результатів. Як *in vitro*, так і *in vivo* було показано, що ІЛ-10 активує рецептори Fc на міелоїдних клітинах у пацієнтів з РА, які отримували ІЛ-10. Тим не менш, в експериментальних моделях *in vitro* та *in vivo* ІЛ-10 та ІЛ-4 сильно запобігав індукованій запаленням дегенерації хряща.

Останні дослідження продемонстрували плейотропію ІЛ-2 – він одночасно активує Т-клітини для стимулювання імунної відповіді та сприяє проліферації регуляторних Т-клітин (Treg) для контролю запальної відповіді та підтримки імунної толерантності як цитокіну, необхідного для розвитку клітин Treg і гомеостазу [19]. За даними *Li B. Та*

співавт. [3] моніторинг рівня ІЛ-2 у сироватці має важливе клінічне значення для пацієнтів з РА, оскільки рівні ІЛ-2 не лише відображають ступінь запалення, активність захворювання, артралгію та вироблення аутоантител, але також відображають імунний дисбаланс Th17/Treg у пацієнтів.

Вплив ІЛ-6 на імунну систему особливо цікавий – його дія очевидна як на вроджений, так і на набутий імунітет. З точки зору вродженого імунітету, ІЛ-6 відповідає за дозрівання запального інфільтрату, сприяючи міграції нейтрофілів та інфільтрації мононуклеарних клітин. Він також діє як хеморецептор для моноцитів у місці запалення [20], тоді як з точки зору набутого імунітету ІЛ-6 також виявляє свою дію як на Т-клітини, так і на В-клітини [21].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що на тлі розвитку АА у щурів на 28 день експерименту відмічено

статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання вмісту протизапальних цитокінів – ІЛ-4 на 94,9% та ІЛ-10 на 150,7%, а також підвищення рівня регуляторних цитокінів – ІЛ-2 на 233,3% ($p < 0,001$) та ІЛ-6 на 167,7% ($p < 0,001$) відносно показників інтактних щурів.

2. Введення досліджуваних кріоекстрактів мало виразний вплив на рівень протизапальних цитокінів у щурів з АА. Так, на тлі введення КЕП рівень ІЛ-4 знизився ($p = 0,004$) на 31,3%, а на тлі введення КЕС – рівень ІЛ-10 знизився ($p = 0,02$) на 20,5% відносно показників щурів з АА без лікування.

3. Найвиразніший вплив на рівень регуляторних цитокінів встановлено на тлі застосування КС-МСК при АА у щурів. Так рівень ІЛ-2 знизився ($p = 0,003$) на 21,5% відносно показників нелікованих тварин з АА.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Є доцільним проведення подальших поглиблених досліджень механізмів модуляції імунної відповіді за допомогою БКБЗ. Оцінка довгострокових ефектів застосування БКБЗ на різні стадії розвитку РА і в комбінації з іншими терапевтичними методами може відкрити нові можливості для оптимізації лікування.

ВКЛАД АВТОРІВ

Гладких Ф.В. – ідея, концепція та дизайн дослідження, виконання експериментальних досліджень, статистична обробка отриманих результатів, написання основного тексту, формулювання висновків;

Лядова Т.І. – участь в обговоренні отриманих результатів, редагування тексту статті.

ДЖЕРЕЛА ФІНАНСУВАННЯ

Автори не отримували фінансової підтримки.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність потенційного конфлікту інтересів щодо дослідження, авторства та публікації цієї статті.

ЗВ'ЯЗОК НАУКОВИМИ ТЕТАМИ/РОБОТАМИ

Робота виконана в рамках відомчої науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України «Вивчення ролі імунних, аутоімунних 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 – завідувача кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, к мед. н., доцент Волобуєва О.В.).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis. *Cells*. 2021 Nov 3;10(11):3000. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113000>. PMID: 34831223; PMCID: PMC8616130.
- Jacques C, Floris I, Lejeune B. Ultra-low dose cytokines in rheumatoid arthritis, three birds with one stone as the rationale of the 2LARTH® micro-immunotherapy treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jun 23;22(13):6717.

- DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22136717>. PMID: 34201546; PMCID: PMC8268272.
3. Li B, Guo Q, Wang Y, Su R, Gao C, Zhao J, Li X, Wang C. Increased serum interleukin-2 levels are associated with abnormal peripheral blood natural killer cell levels in patients with active rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2020 Sep 15;2020:6108342. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/6108342>. PMID: 33013198; PMCID: PMC7512106.
 4. Hladkykh FV. Current understanding of the immunological basis of rheumatoid arthritis: from post-translational protein modification to the use of disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2023;11(4):326–336. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11\(4\):326-336](https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11(4):326-336).
 5. Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Oct 10;22(20):10922. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222010922>. PMID: 34681582; PMCID: PMC8539723.
 6. Ridgley LA, Anderson AE, Pratt AG. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? *Current Opinion in Rheumatology*. 2018 Mar;30(2):207-214. DOI: <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000470>. PMID: 29206659; PMCID: PMC5805125.
 7. Chyzh MO, Halchenko SYe, Hladkykh FV, Byzov VV, Rohoza LA, Belokhchina IV, Sleta IV. Acellular cryopreserved biological agents: technology of production and composition. Vynnytsia: TVORY; 2024. 264 p. DOI: <https://doi.org/10.46879/2024.1>.
 8. Hladkykh FV, Liadova TI. Study of the effect of acellular cryopreserved biological agents on the levels of pro-inflammatory cytokines in experimental autoimmune arthritis. *Immunology and Allergology: Science and Practice*. 2024;2:28–37. DOI: <https://doi.org/10.37321/immunology.2024.2-04>.
 9. Hladkykh FV, Liadova TI. Analgesic potential of cryoextracts of biological tissues and conditioned medium from mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune arthritis. *Odesa Medical Journal*. 2024;186(1):35–41. DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-1-6>.
 10. Hladkykh FV. Freund's adjuvant is a classic of vaccine adjuvants and the basis of experimental immunology. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine*. 2024;32(3):414–439. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-10>.
 11. 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*. 14.01.35 – Cryomedicine, Kharkiv, 2004. 326 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>
 12. Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin. *Dissertation*. 03.00.19 – Cryobiology, Kharkiv, 2016. 162 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>
 13. Golubinskaya PA, Sarycheva MV, Dolzhikov AA, Bondarev VP, Stefanova MS, Soldatov VO, Nadezhdin SV, Korokin MV, et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(6):416-425. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
 14. Isomäki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of Medicine*. 1997 Dec;29(6):499-507. DOI: <https://doi.org/10.3109/07853899709007474>. PMID: 9562516.
 15. Taki H, Sugiyama E, Kuroda A, Mino T, Kobayashi M. Interleukin-4 inhibits interleukin-11 production by rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)*. 2000 Jul;39(7):728-31. DOI: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/39.7.728>. PMID: 10908690.
 16. Krabben A, Wilson AG, de Rooy DP, Zhernakova A, Brouwer E, Lindqvist E, Saxne T, Stoeken G, van Nies JA, Knevel R, Huizinga TW, Toes R, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH. Association of genetic variants in the IL4 and IL4R genes with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis & Rheumatology*. 2013 Dec;65(12):3051-7. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.38141>. PMID: 23983153.
 17. Yu C, Liu C, Jiang J, Li H, Chen J, Chen T, Zhan X. Gender differences in rheumatoid arthritis: Interleukin-4 plays an important role. *Journal of Immunology Research*. 2020 Dec 24;2020:4121524. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4121524>. PMID: 33426089; PMCID: PMC7781692.
 18. Helvoort EM, van der Heijden E, van Roon JAG, Eijkelkamp N, Mastbergen SC. The role of interleukin-4 and interleukin-10 in osteoarthritic joint disease: A systematic narrative review. *Cartilage*. 2022 Apr-Jun;13(2):19476035221098167. DOI: <https://doi.org/10.1177/19476035221098167>. PMID: 35549461; PMCID: PMC9251827.
 19. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, Gasteiger G, Feng Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature Immunology*. 2016 Nov;17(11):1322-1333. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.3540>. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27595233; PMCID: PMC5071159.
 20. Wright HL, Cross AL, Edwards SW, Moots RJ. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jul;53(7):1321-31. DOI: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu035>. Epub 2014 Mar 7. PMID: 24609058.
 21. Pandolfi F, Franza L, Carusi V, Altamura S, Andriollo G, Nucera E. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jul 23;21(15):5238. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155238>. PMID: 32718086; PMCID: PMC7432115.

Received 05.11.2024

Accepted 12.12.2024

Одержано 05.11.2024

Затверджено до друку 12.12.2024

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

ГЛАДКИХ Федір Володимирович – доктор філософії в галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина», докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, 61022, Україна; старший науковий співробітник відділу променевої патології та паліативної медицини, Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Григорія Сковороди, буд. 82, м. Харків, 61024, Україна.

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, 4 Svobody Square, Kharkiv, 61022, 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; tel.: [+38 \(099\) 782-78-72](tel:+380997827872), e-mail: fedir.hladkykh@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, професор, професор кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, декан медичного факультету, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, 61022, Україна;

LIADOVA Tetyana Ivanivna – Doctor of medical sciences (DSci, PhD), Professor, Professor of the 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, 4 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine; tel.: [+38 \(050\) 692-56-41](tel:+380506925641), 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>.