

UDK 616.72-002.77.092.9:577.112.6:611.018.5.088:618.48+615.361:615.451.1: 618.46]:57.086.13

А.М. Гольцев<sup>1, 2\*</sup>, О.Д. Луценко<sup>1</sup>, К.Є. Ямпольська<sup>1</sup>, Ю.О. Гаєвська<sup>1</sup>,  
М.О. Бондарович<sup>1</sup>, Л.В. Останкова<sup>1</sup>, Л.В. Сокіл<sup>1</sup>, Л.В. Степанюк<sup>1</sup>, І.Г. Гриша<sup>1</sup>

## Корекція цитокінового профілю при аутоімунних захворюваннях кріоконсервованими продуктами ембріофетоплацентарного комплексу

UDC 616.72-002.77.092.9:577.112.6:611.018.5.088:618.48+615.361:615.451.1: 618.46]:57.086.13

A.M. Goltsev<sup>1, 2\*</sup>, O.D. Lutsenko<sup>1</sup>, K.Ye. Yampolska<sup>1</sup>, Yu.O. Gaevska<sup>1</sup>,  
M.O. Bondarovich<sup>1</sup>, L.V. Ostankova<sup>1</sup>, L.V. Sokil<sup>1</sup>, L.V. Stepaniuk<sup>1</sup>, I.G. Grisha<sup>1</sup>

## Correction of Cytokine Profile in Autoimmune Diseases with Cryopreserved Embryofetoplacental Complex Products

**Реферат:** У роботі подано експериментальне обґрунтування можливості корекції цитокінового профілю організму для зниження запалення у мишей з ад'ювантним артритом шляхом комбінованого застосування ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛЛККЛ) та кріоекстракту плаценти людини (кЕПЛ). Ад'ювантний артрит викликали у мишей лінії СВА/Н. На 7-у добу після індукції патології тваринам вводили ЛЛККЛ та кЕПЛ окремо або у комбінації. На 14 і 28-у доби спостереження терапевтичну дію проявляли всі введені продукти. На 28-у добу спостереження ефективність комбінованої дії обраних продуктів була вище порівняно з монотерапією в 3,1 і 2,5 рази (відповідно) в результаті їх синергії відносно зниження індексу артриту, концентрації ФНП $\alpha$ , впливу ЛЛККЛ на рівень ІФН $\gamma$  і кЕПЛ на рівень ІЛ-6.

**Ключові слова:** ад'ювантний артрит, цитокіни, ліофілізація, лейкоконцентрат кордової крові людини, кріоекстракт плаценти.

**Abstract:** In this work, we experimentally substantiated the possibility of correcting the cytokine profile to reduce the inflammation in mice with adjuvant arthritis (AA) via combined use of lyophilized human cord blood leukoconcentrate (IHCBL) and cryopreserved human placental extract (cHPE). Adjuvant arthritis was modelled in CBA/H mice. To day 7 after pathology induction, the animals were injected with IHCBL and cHPE singly or in combination. To days 14 and 28 of observation, all the introduced products showed a therapeutic effect. To 28 day of observation, the efficiency of combined use of IHCBL and cHPE was 3.1 and 2.5 times higher vs. the monotherapy (respectively), likely resulting from their synergy in respect to a decrease in arthritis index, TNF $\alpha$  concentration, impact of IHCBL and cHPE on IFN $\gamma$  and IL-6 levels.

**Key words:** adjuvant arthritis, cytokines, lyophilization, human cord blood leukoconcentrate, placental cryoextract.

Важлива роль у хронізації, прогресуванні суглобового запалення та подальшому розвитку аутоімунної реакції у хворих на ревматоїдний артрит (РА) належить цитокіновому дисбалансу (надлишкової продукції інтерлейкінів (ІЛ) ІЛ-1, ІЛ-6, фактору некрозу пухлини  $\alpha$  (ФНП $\alpha$ )) та синергічному пригніченню ІЛ-4, ІЛ-10. Інтерферон  $\gamma$  (ІФН $\gamma$ ) також розглядається як прозапальний цитокін, який опосередковує аутоімунні процеси шляхом активації макрофагів і регуляції їх відповіді з залученням Т-хелперів типу 1 (Тх1) [13]. Відомо, що ІЛ-2 володіє прозапальною дією при РА, забезпечує зростання і диференціювання Т- і В-лімфоцитів, стимулює ІФН $\gamma$ , разом з ІЛ-12 спрямовує розвиток наївних Тх у бік Тх1. Остан-

Cytokine imbalance (an excess production of interleukins (IL) IL-1, IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) and a synergic suppression of IL-4, IL-10 are crucial in chronicity and progression of joint inflammation, and further development of autoimmune reaction in the patients with rheumatoid arthritis (RA). Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) is also considered as a pro-inflammatory cytokine which mediates the autoimmune processes via macrophage activation and regulation of their response by involving T-helper type 1 (Th1) [18]. It is well known that IL-2 has a pro-inflammatory effect in RA, ensures growth and differentiation of T- and B-lymphocytes, stimulates IFN $\gamma$ , and together with IL-12 directs the naive Th development towards Th1. Recently,

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

<sup>2</sup> Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України, Харків

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: cryopato@gmail.com

Надійшла 15.03.2021

Прийнята до друку 18.05.2022

© 2022 A.N. Goltsev, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: cryopato@gmail.com

Received 15, March, 2021

Accepted 18, May, 2022

нім часом у дослідженнях патогенезу РА значна увага приділяється вивченню субпопуляції Th17-клітин, що продукують прозапальний ІЛ-17А, який разом з ІЛ-1 і ФНП $\alpha$  впливає на р38-МАПК-каскад, викликаючи гіперпродукцію прозапальних цитокінів синовіоцитами. При цьому накопичено дані щодо неоднозначної ролі ІФН $\gamma$  під час розвитку запалення. Так, у хворих на РА з гепатитом В, С показано пригнічення продукції ІФН $\alpha$  та ІФН $\gamma$ . Нормальний рівень інтерферонів у таких пацієнтів був критерієм ефективності терапії і, як правило, він збігався з поліпшенням перебігу РА [1].

Визначення цитокінів у розвитку РА важливе для розроблення й проведення антицитокінової терапії [13], яка спрямована на швидке усунення симптомів РА, коли застосування цитостатиків є неефективним. При цьому безпека такого лікування залишається предметом обговорення через виникнення у пацієнтів тяжких ускладнень з боку дихальної системи та шкіри. Крім того, у хворих із гепатотропною інфекцією проведення описаної тактики лікування РА як інтеркурентного захворювання неможливе, оскільки передбачається тривале застосування нестероїдних протизапальних засобів, що володіють гепатотоксичністю і активують хронічні або гострі інфекційні процеси.

З оглядом на вищевикладене увагу клініцистів привертає комбінована терапія (засоби, які містять декілька субстанцій з різною за механізмом дії біологічною активністю і впливають на відмінні патогенетичні складові хвороби). Такими властивостями володіють продукти ембріофетоплацентарного комплексу (ПЕФПК): кордова кров людини (ККЛ), зокрема, лейкоконцентрат кордової крові людини (ЛККЛ) та кріоконсервований екстракт плаценти людини (кЕПЛ). Результати попередніх досліджень показали, що препарати на основі ККЛ і плаценти мають противірусну активність, модулюють функції імункомпетентних клітин, коригують цитокіновий статус організму. Сьогодні розглядається можливість використання в якості профілактичного та/або терапевтичного підходу ККЛ та гуморальних субстанцій плаценти (хемокінів і цитокінів), які проявляють противірусну активність у координації з імунною системою пацієнтів з COVID-19 [4].

Включення ККЛ до протоколів імунотерапії вимагає створення її запасів у кріобанках за допомогою методів заморожування та ліофілізації. На сьогодні доказано ефективність використання кріоконсервованої ККЛ та її компонентів у профілактиці грипу (штам А/Вікторія (H3N2)) і представлено механізми реалізації її противірус-

much attention has been paid to study the Th17 cell subpopulation, producing the proinflammatory IL-17A, which, together with IL-1 and TNF $\alpha$ , affects the p38-MAPK cascade via inducing the proinflammatory cytokine hyperproduction by synovocytes. Herewith, the findings on an ambiguous role of IFN $\gamma$  in inflammation development have been accumulated. For example, the RA patients with hepatitis B and C showed the inhibition of IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  production. In these patients, a normal level of interferons was the criterion for therapy efficiency and generally coincided with the RA course improvement [2].

Cytokine detection in RA development is important to design and implement the anti-cytokine therapy [18], aimed at a rapid elimination of RA symptoms when the applied cytostatics are inefficient. However, the safety of such treatment remains a subject of discussion due to severe respiratory and skin complications in patients. In addition, the described tactics of RA therapy as an intercurrent disease in the patients with a hepatotropic infection is impossible, since it assumes a long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs being hepatotoxic and able to activate either chronic or acute infectious processes.

Proceeding from the mentioned above the attention of clinicians is focused at a combined therapy (medicines containing several substances with various biological activity in terms of mechanism of action and affecting different pathogenetic components of the disease). Such properties are specific to the products of embryofetoplacental complex (PEFPC) such as: human cord blood (HCB), in particular human cord blood leukoconcentrate (HCBL) and cryopreserved human placental extract (cHPE). Previous findings showed antiviral activity the HCB and placenta-based preparations to have, modulate the functions of immune competent cells, and correct the body's cytokine status. Today, the possibility of using HCB and humoral placental substances (chemokines and cytokines), exhibiting antiviral activity in coordination with the immune system in the COVID-19 patients, is being considered as a preventive and/or therapeutic approach [5].

The inclusion of HCB in the immunotherapy protocols requires creating its stocks in cryobanks using the freezing and lyophilization techniques. To date, the efficiency of applying cryopreserved HCB and its components in prevention of influenza (strain A/Victoria (H3N2)) has been proven, and the mechanisms of its antiviral activity have been presented [13]. The possibilities of the correcting the clinical and immunological indices of skin in the patients with allergic dermatitis after ap-



ної активності [10]. Показана можливість корекції клініко-імунологічних показників шкіри у хворих на алергічний дерматит ліофілізованим ЛККЛ (ЛЛККЛ) [9].

У науковій літературі поряд з терапевтичною дією клітин ККЛ доведено протизапальну, імуномодулювальну, імуносупресивну активність продуктів, отриманих з плаценти [2, 15]. На моделі гострої реакції «трансплантат проти хазяїна» встановлено імуносупресивну дію екстракту плаценти [2]. Показано ефективність застосування безклітинного препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» (ДП Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України) для нормалізації рівня протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) у пацієнтів з хронічними запальними захворюваннями органів малого таза [5].

Таким чином, загальні і специфічні властивості ЛЛККЛ та КЕПЛ обумовлюють їх комбіноване використання для підвищення протизапальної дії шляхом цитокінової регуляції на моделі ад'ювантного артриту (АА).

Мета роботи — експериментальне обґрунтування можливості корекції цитокінового профілю організму для зниження запалення у тварин з ад'ювантним артритом шляхом комбінованого застосування ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини та кріоконсервованого екстракту плаценти людини.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на 8–10-місячних мишах лінії СВА/Н масою 18–20 г. Робота виконувалась відповідно до Закону України «Про охорону тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Експерименти були дозволені комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

Ад'ювантний артрит індукували у мишей субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) у дозі 0,05 мл/мишу [12]. Розвиток АА визначали за набряком суглоба дослідної кінцівки і оцінювали за індексом артриту (ІА), який обчислювали як відношення довжини кола суглоба дослідної кінцівки (в сантиметрах) до показника контрольного суглоба.

Кордову кров людини і плаценту отримували за інформованою згодою породіллі безпосередньо після народження дитини в пологовому будинку. Після цього флакони з кордовою кров'ю транспортували і зберігали при температурі 4°C.

plying the lyophilized HCBL (IHCBL) has been shown [12].

In scientific reports, along with a therapeutic effect of HCB cells, the anti-inflammatory, immune modulatory, and immune suppressive activities of the placenta-derived products have been proven [4, 21]. An immunosuppressive effect of placental extract was established in the model of acute graft-versus-host disease [4]. The efficiency of application of cell-free preparation 'Cryocell-Placental Cryoextract' (SI Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine) as for normalizing the level of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) has been proven in the patients with chronic pelvic inflammatory diseases [7].

Thus, the general and specific features of IHCBL and cHPE stipulate their combined use to increase an anti-inflammatory effect through the cytokine regulation in adjuvant arthritis (AA) model.

The research aim was to experimentally substantiate the possibility to correct the body's cytokine profile in order to reduce the inflammation in animals with adjuvant arthritis through the combined use of the lyophilized human cord blood leukoconcentrate and cryopreserved human placental extract.

### Materials and methods

The research was carried out in 8–10-month-old CBA/H mice weighing 18–20 g. The work was performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV of February 21, 2006) and the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine.

Adjuvant arthritis was induced in mice by subplantar administration of Freund's complete adjuvant (FCA) at a dose of 0.05 ml/mouse [17]. The AA development was determined by swelling of experimental limb joint and assessed by the arthritis index (AI), calculated as the ratio of joint circumference of studied limb (in centimeters) to the index of control joint.

Human cord blood and placenta were procured with the informed consent of woman in labor immediately after child birth at the maternity hospital. Afterwards, the vials with cord blood were transported and stored at 4°C. The HCB leukoconcentrate was obtained in autoplasm by passive erythrocyte sedimentation in a density gradient supplemented



Лейкоконцентрат ККЛ отримували в аутоплазмі шляхом пасивної седиментації еритроцитів у градієнті щільності з додаванням поліглюкіну («Біохімік», Росія). Суспензію клітин лейкоконцентрату розливали по 1 мл у стерильні пеніцилінові флакони, які розташовували в сублимаційній установці УЗВ-2 (ДВ Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України), і проводили ліофілізацію [9]. Для ліофілізації зразків лейкоконцентрату ККЛ застосовували наступний режим: охолодження зі швидкістю 0,5 град/хв від кімнатної температури (18–22°C) до –28°C і подальше 10-годинне висушування у вказаній установці. Зразки досушували протягом 2 годин у тій самій установці при 15°C. Температуру висушування контролювали мідь-константовою термopарою. Залишковий тиск у камері відповідав 1,32 Па. Залишкова вологість у ліофілізованих зразках складала (5,03 ± 0,51)%. Для регідратації ЛЛККЛ у флакони додавали 1 мл фізіологічного розчину і періодично обережно перемішували.

Кріоконсервованний екстракт плаценти людини отримували згідно з рекомендаціями, запропонованими О.С. Прокопюк та співат. [15]. Для отримання кЕПЛ з ділянок материнської поверхні плаценти відокремлювали фрагменти масою 100 г, поміщали у флакон з середовищем 199 (співвідношення 1:1), заморожували до –80°C за допомогою програмного заморожувача ЗП-10 (ДВ Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України) та витримували 30 хв. Зразки відігрівали до 25°C. За вказаної температури добавляли 1/3 об'єму фізіологічного розчину («Юрія-Фарм», Україна) і механічно диспергували в гомогенізаторі. Отриману масу плаценти витримували при 4°C протягом 20 годин, після чого центрифугували 30 хв при 1075g. Отриманий надосамок фільтрували, розливали в кріопробірки об'ємом 1,8 мл і заморожували в рідкому азоті. Розморожування кЕПЛ здійснювали при 40°C.

На 7-у добу після індукції АА у хвостову вену мишей вводили ЛЛККЛ та кЕПЛ окремо або в комбінації. Вибір дози введених ПЕФПК ґрунтувався на результатах попередніх досліджень їх імуномодульовальної активності [2, 9]. Експериментальні тварини були розділені на 6 груп (по 5–7 особин у кожній): контрольна — інтактні тварини; АА — тварини з індукцією АА; АА + ЛЛККЛ — тварини з індукцією АА, яким вводили  $5 \times 10^5$  клітин ЛЛККЛ у 0,1 мл аутоплазми донора ККЛ; АА + кЕПЛ — тварини з індукцією АА, яким вводили 0,3 мл кЕПЛ; АА + (ЛЛККЛ + кЕПЛ) — тварини з індукцією АА, яким вводили 0,1 мл ЛЛККЛ і 0,3 мл кЕПЛ; АА + преднізолон — тварини, яким

with Polyglucinum (Biokhimik, Russia). The cell suspension of leukoconcentrate was poured into sterile penicillin vials by 1 ml, later placed into a sublimation unit UZV-2 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the IPCC of the NAS of Ukraine) and lyophilized [12]. To lyophilize the HCB leukoconcentrate specimens, the following regimen was used: cooling with 0.5 deg/min from room temperature (18–22°C) down to –28°C and subsequent 10-hour drying in the mentioned unit. The specimens' drying was completed within 2 hrs with the same unit at 15°C. The drying temperature was controlled by a copper-constantan thermocouple. Residual pressure in the chamber corresponded to 1.32 Pa. Residual moisture in lyophilized specimens was (5.03 ± 0.51)%. For IHCBL rehydration, the vials were supplemented with 1 ml of physiological saline and gently stirred occasionally.

Cryopreserved human placental extract was procured according to the recommendations of O.S. Prokopyuk *et al.* [21]. To obtain the cHPE, 100 g fragments were separated from the areas of maternal surface of the placenta, placed into a vial with medium 199 (ratio 1:1), frozen down to –80°C using ZP-10 programmable freezer (Special Designing and Technical Bureau at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine) and kept for 30 min. The specimens were warmed up to 25°C. At the specified temperature, 1/3 of volume of physiological saline (YURiA-PHARM, Ukraine) was added and dispersed mechanically in a homogenizer. The resulting mass of the placenta was kept at 4°C for 20 hrs, then it was centrifuged for 30 min at 1075g. The obtained supernatant was filtered, poured into 1.8 ml cryotubes and frozen in liquid nitrogen. The cHPE was warmed at 40°C.

To day 7 after AA induction, the IHCBL and cHPE were administered singly or in combination into the tail vein of mice. The choice of the injected PEFPC dose was based on previous findings of their immune modulatory activity [4, 12]. Experimental animals were divided into 6 groups (5–7 individuals each): the control – intact animals; AA – animals with induced AA; AA+IHCBL – animals with induced AA, injected with  $5 \times 10^5$  of IHCBL cells in 0.1 ml of donor HCB autoplasm; AA + cHPE – animals with induced AA, received 0.3 ml of cHPE; AA + (IHCBL + cHPE) – animals with induced AA, injected with 0.1 ml of IHCBL and 0.3 ml of cHPE; AA + prednisolone – animals administered with 1 mg/kg of prednisolone intramuscularly every three days within three weeks.

The absolute leukocyte count in peripheral blood of animals was determined in Goryaev's chamber. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was evaluated



вводили 1 мг/кг преднізолону внутрішньом'язово кожні три дні протягом трьох тижнів.

Абсолютну кількість лейкоцитів у периферичній крові тварин визначали в камері Горяєва. Швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) оцінювали в апараті Панченкова [11]. Циркуючі імунні комплекси (ЦІК) визначали в сироватці крові за допомогою спектрофотометра «Lambda» (Perkin Elmer, США) на довжині хвилі 280 нм методом преципітації в 3 або 4%-у розчині поліетиленгліколю (ПЕГ) з м. м. 6000 і виражали у вигляді коефіцієнта розміру ЦІК, який розраховували як відношення концентрації білка в імунних комплексах (C4/C3) [16].

У сироватці крові тварин оцінювали концентрацію цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-17А, ІФН $\gamma$ , ФНП $\alpha$ ) за допомогою реагентів «BD Cytometric Bead Array CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit» (BD Pharmingen, США) на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» (BD Biosciences, США) відповідно до рекомендацій виробника.

Для інтегральної оцінки терапевтичної ефективності ЛЛККЛ і кЕПЛ використовували показник сумарного ступеня відхилення (ССВ), який визначали за формулою:

$$CCV = \sum : 100,$$

де  $\sum$  — сума значень відхилення від контролю за всіма даними на 14 і 28-у доби розвитку патології [3]. При цьому вважали, що чим ССВ ближче до 0, тим вища ефективність лікування.

Отримані дані статистично обробляли за допомогою програми «Statistica 12.0» (Statsoft, США). Визначені показники мали розподіл, який відрізнявся від нормального, тому проводили аналіз з обчисленням медіани (Me) і кватилів (25 та 75-го процентилів). У дослідженні проводили множинні порівняння, для цього використовували Н-критерій Краскела-Волліса. Якщо цей критерій дозволяв виявити різницю між групами, додатково проводилися попарні порівняння груп між собою з застосуванням тесту Данна. Значущість відмінностей у групах було прийнято за  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

У результаті експерименту було встановлено, що 14 і 28-а доби відповідали періоду вираженої клінічної картини АА. На 14-у добу у тварин з АА спостерігали розвиток стійкої місцевої запальної реакції у вигляді набряку суглоба враженої кінцівки, порушення показників периферичної крові — розвиток лейкоцитозу, про що свідчило значуще підвищення ШОЕ, ЦІК (таблиця).

by the Panchenkov's device [16]. Circulating immune complexes (CICs) were detected in blood serum using the Lambda spectrophotometer (Perkin Elmer, USA) at 280 nm wavelength by the precipitation method in 3 or 4% solution of polyethylene glycol (PEG) with molecular weight 6000 and expressed as the coefficient of CICs size, calculated as the ratio of protein concentration in immune complexes (C4/C3) [22].

The concentration of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) was assessed in animal blood serum using the reagents 'BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit' (BD Pharmingen, USA) with flow cytometer 'FACS Calibur' (BD Biosciences, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations.

For comprehensive evaluation of therapeutic efficiency of IHCBL and cHPE, the index of total degree of deviation (TDD) was used, which was determined by the following formula:

$$TDD = \sum : 100,$$

where  $\sum$  was the sum of deviation values from the control according to the whole data to days 14 and 28 of pathology development [6]. Herewith, it was assumed that the closer the TDD to 0, the higher the treatment efficiency.

The data obtained were statistically processed using the Statistica 12.0 software (Statsoft, USA). The determined indices had the distribution that differed from normal, so the analysis with calculation of the median (Me) and quartiles (25 and 75 percentiles) was carried out. Multiple comparisons were done in this study using the Kruskal-Wallis H-test. If this criterion enabled to identify the difference between the groups, they were additionally pairwise compared with each other using the Dunn index. The significance of differences in groups was accepted only at the level of statistical significance  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

As a result of the experiment, the days 14 and 28 were established as corresponded to the period of the pronounced clinical evidence of AA. To day 14, the AA animals showed the development of persistent local inflammatory reaction in the form of joint edema of the affected limb, the disorder of peripheral blood parameters, *i. e.* the leukocytosis development, as evidenced by a significant increase in ESR and CICs (Table). An imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines, *i. e.* a two-fold increase in TNF $\alpha$  and IL-6 concentration, and a 1.4 decrease in IL-10 level as compared with



Клініко-лабораторні показники і концентрація цитокінів (пг/мл) у сироватці крові тварин з АА до та після введення лЛККЛ і кЕПЛ, Ме [25; 75%] (n = 5)

Clinical and laboratory indices and cytokine concentration (pg/ml) in blood serum of AA animals prior to and after ІНСВЛ and сНРЕ administration, Ме [25; 75%] (n = 5)

Показник Index	Строки спостереження, доба Observation term, day	Групи тварин Animal groups						Значущі зміни при $p < 0,05$ за критерієм Данна Significant changes at $p < 0.05$ by Dunn index
		Контроль Control	АА	АА + лЛККЛ АА + ІНСВЛ	АА + кЕПЛ АА + сНРЕ	АА + лЛККЛ + кЕПЛ АА + ІНСВЛ + сНРЕ	АА + преднізолон АА + prednisolone	
Індекс артриту Arthritis index	14	1	1,6 <sup>^</sup> [1,4; 1,8]	1,4 [1,3; 1,5]	1,5 [1,4; 1,6]	1,3* × [1,2; 1,4]	1,2 * [1,0; 1,4]	p 1-2=0,01 p 2-5, p 2-6, p 4-5=0,008
	28		1,5 <sup>^</sup> [1,3; 1,7]	1,3* [1,2; 1,4]	1,4 [1,3; 1,5]	1,3* [1,1; 1,5]	1,1 * 0,9; 1,3]	p 1-2, p 2-3, p 2-5, p 2-6=0,008
Лейкоцити × 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes × 10 <sup>9</sup> /l	14	4,8 [4,3; 5,3]	6,3 <sup>^</sup> [5,7; 6,8]	7,6 [7,3; 7,8]	2,8 ** [2,5; 3,2]	2,6*0 [2,5; 2,8]	3,0* § [2,9; 3,2]	p 1-2, p 2-4, p 2-6, p 3-4, p 5-6=0,008; p 2-5=0,01; p 3-5=0,001
	28		11,9 <sup>^</sup> [11,3; 12,3]	12,0 [11,2; 12,9]	8,4 ** [8,0; 8,7]	8,3 *0 [7,8; 8,9]	10,9 § [10,2; 11,7]	p 1-2=0,002; p 2-4, p 2-5, p 3-4, p 4-5, p 5-6=0,008
ШОЕ, мм/годину ESR, mm/hr	14	1 [0,5; 1,5]	3,0 <sup>^</sup> [2,5; 3,5]	2,0 * [1,5; 2,5]	1,0** [0,5; 1,5]	1,5* [1,0; 2,0]	1,0* [0,5; 1,5]	p 1-2=0,04; p 2-3, p 2-5, p 3-4=0,008; p 2-4, p 2-6=0,03
	28		3,0 <sup>^</sup> [2,5; 3,5]	1,5 * [1,0; 2,0]	2,5 [1,5; 3,5]	1,0* × [0,5; 1,5]	1,0* [0,5; 1,5]	p 1-2, p 2-3, p 2-5, p 2-6, p 4-5=0,008
ЦІК CICs	14	1,1 [1; 1,2]	1,43 <sup>^</sup> [1,1; 1,7]	1,2* [0,7; 1,7]	1,26 ** [0,7; 1,8]	2,2 *0 × [1,8; 2,6]	0,45* § [0,2; 1,8]	p 1-2, p 2-3, p 2-4, p 2-5, p 2-6, p 3-4, p 3-5, p 4-5, p 5-6=0,008
	28		1,42 <sup>^</sup> [1,2; 1,6]	1,2* [1,1; 1,3]	1,3 <sup>#</sup> [1,2; 1,4]	0,8*0 × [0,7; 0,9]	1,2* § [1,1; 1,3]	p 1-2, p 2-3, p 2-5, p 2-6, p 3-4, p 3-5, p 4-5, p 5-6=0,008
ФНПҮ TNF $\gamma$	14	15,1 [ 8,9; 21,4]	29,74 <sup>^</sup> [19,4; 40,2]	25,3 [16,5; 31,1]	39,9 #1 [27,8; 52,1]	61,5 *0 × [49,0; 74,1]	45,4* [29,3; 61,6]	p 1-2, p 2-5, p 2-6, p 2-4, p 3-5, p 4-5=0,008
	28		37,6 [25,2; 50,1]	27,0 * [18,9; 36,2]	14,3*# [10,9; 17,8]	7,8 *0 × [6,7; 8,8]	53,1* § [40,4; 65,9]	p 1-2, p 2-3, p 2-4, p 2-6, p 3-4, p 3-5=0,008; p 2-5=0,014, p 5-6=0,001
ІЛ-6 IL-6	14	7,07 [5,7; 9,5]	14,9 <sup>^</sup> [9,9; 19,7]	49,3 * [37,0; 61,7]	21,2*# [15,7; 26,8]	8,24*0 × [7,7; 9,4]	14,4 [11,1; 17,6]	p 1-2, p 2-3, p 2-4, p 2-5, p 3-4, p 4-5=0,008; p 3-5=0,002
	28		32,42 <sup>^</sup> [24,6; 40,3]	46,1* [40,2; 52,1]	7,7*# [6,6; 8,9]	0,4*0 × [0,3; 0,6]	18,2 * § [14,4; 22,2]	p 1-2, p 2-3, p 2-4, p 2-6, p 5-6=0,008; p 2-5=0,003; p 3-4=0,04; p 3-5=0,0002



Показник Index	Строки спостере- ження, доба Observation term, day	Групи тварин Animal groups						Значущі змі- ни при $p < 0,05$ за кри- терієм Данна Significant changes at $p < 0.05$ by Dunn index
		Контроль Control	AA	AA + лЛККЛ AA + IHCBL	AA + кЕПЛ AA + cHPE	AA + лЛККЛ + кЕПЛ AA + IHCBL + cHPE	AA + предні- золон AA + prednisolone	
ІФНУ IFN $\gamma$	14	5,2 [3,6; 7,4]	4,3 ^ [3,5; 4,7]	64,79 * [52,4; 89,3]	7,93*# [7,4; 8,5]	13,9 *0 × [12,7; 15,8]	4,4 § [3,4; 5,4]	p 1-2, p 2-3, p 2-4, p 2-5, p 3-4, p 3-5, p 4-5, p 5-6=0,008
	28		3,8 ^ [3,4; 4,2]	15,1* [13,2; 18,4]	1,4 ** [1,3; 1,6]	4,3 0 [3,8; 5,9]	6,4 [ 4,9; 7,9]	p 1-2, p 2-4, p 3-5=0,008; p 2-3=0,003; p 3-4=0,0001
ІЛ-17A IL-17A	14	3,7 [1,8; 5,8]	0,41 ^ [0,3; 0,6]	25,5 * [19,1; 31,8]	2,33 ** [1,9; 2,8]	1,13 *0 [0,8; 1,3]	5,1 * [3,4; 6,7]	p 1-2, p 2-4, p 2-5, p 3-4=0,008; p 2-3=0,0001; p 2-6=0,02; p 3-5=0,006
	28		4,4 ^ [3,1; 5,8]	3,2 * [1,5; 4,8]	0,3 ** [0,2; 0,4]	2,1*0 [1,7; 2,6]	5,3 § [4,9; 5,8]	p 1-2, p 2-5, p 3-4, p 3-5, p 5-6=0,008; p 2-4=0,02
ІЛ-2 IL-2	14	10,69 [7,4; 14,0]	5,3 ^ [3,1; 7,6]	1,66 * [1,2; 2,1]	0,28** [0,1; 0,4]	2,21 * × [1,3; 3,2]	5,0 § [3,9; 6,2]	p 1-2, p 2-3, p 2-5, p 3-4, p 4-5, p 5-6=0,008; p 2-4=0,02
	28		5,7 ^ [3,4; 8,1]	5,0 [ 3,9; 6,2]	5,5 [5,3; 5,6]	0,6*0 × [0,5; 0,7]	5,5 § [3,9; 7,2]	p 1-2, p 2-5, p 3-5, p 4-5, p 5-6=0,008
ІЛ-4 L-4	14	1,4 [0,9; 1,9]	1,3 [1,2; 1,4]	28,18 [21,6; 34,9]	0,7 ** [0,5; 0,9]	1,4 0 × [1,1; 1,7]	1,3 [0,9; 1,7]	p 2-4, p 3-5, p 4-5=0,008; p 3-4=0,0003
	28		1,2 [0,8; 1,6]	1,0 [0,6; 1,4]	0,95** [0,7; 2,0]	0,9 [0,2; 1,6]	2,6 * § [0,5; 4,8]	p 2-4, p 2-6, p 3-4, p 5-6=0,008
ІЛ-10 IL-10	14	4,3 [2,5; 6,2]	3,2^ [2,1; 3,3]	198,3* [194,3; 202,1]	38,1** [30,1; 46,2]	17,8*0 × [13,4; 22,3]	2,1 § [2,0; 2,3]	p 1-2, p 2-4, p 2-5, p 3-4, p 3-5, p 4-5, p 5-6=0,008; p 2-3=0,004
	28		2,7 ^ [1,6; 2,9]	6,5 * [5,5; 7,6]	2,6 [2,3; 2,9]	1,6*0 [1,4; 1,7]	1,6 * [0,5; 2,8]	p 1-2, p 2-3, p 2-5, p 2-6=0,008; p 3-5=0,004
ССВ TDD	14	-	3,3	2,2	1,2	2,1	1,4	-
	28	-	4,4	3,7	3,0	1,3	1,5	-

**Примітки:** ^ – різниця статистично значуща порівняно з контролем; \* – із групою AA; # – між групами AA + лЛККЛ та AA + кЕПЛ; 0 – між групами AA + лЛККЛ + кЕПЛ та AA + лЛККЛ; × – між групами AA + лЛККЛ + кЕПЛ та AA + кЕПЛ; § – між групами AA + преднізолон та AA + лЛККЛ + кЕПЛ,  $p < 0,05$ .

**Notes:** ^ – difference is statistically significant as compared with the control; \* – with AA group; # – between AA + IHCBL and AA + cHPE groups; 0 – between AA + IHCBL + cHPE and AA + IHCBL groups; × – between AA + IHCBL + cHPE and AA + cHPE groups; § – between AA + prednisolone and AA + IHCBL + cHPE groups,  $p < 0.05$ .



У сироватці крові мишей встановлено дисбаланс про- та протизапальних цитокінів: підвищення концентрації ФНП $\alpha$ , ІЛ-6 у 2 рази, зниження рівня ІЛ-10 у 1,4 раза порівняно з тваринами контрольної груп. На 28-у добу зберігалися клінічні прояви АА і посилювався дисбаланс цитокінів: підвищення концентрації ФНП $\alpha$ , ІЛ-6 у 2,5 і 4,6 раза відповідно; зниження концентрації ІЛ-10 у 1,6 раза порівняно з контролем. Істотна секреція ФНП $\alpha$ , який продукується Тх1, та ІЛ-6, який продукується Тх2, свідчила про активацію клітин-хелперів обох типів.

Результати дослідження кореляційних взаємозв'язків показали, що в умовах стійкого прояву клінічної картини АА (14 і 28-а доби) існували сильні ( $r > 0,7$ ) патогенетично значущі кореляційні зв'язки між кожним клініко-лабораторним показником та концентрацією ІЛ-10, ФНП $\alpha$ , ІФН $\gamma$ , між ІА та ІЛ-2; кількістю лейкоцитів та ІЛ-4, ІЛ-6; ШОЕ та ІЛ-2, ІЛ-4; показником ЦК та ІЛ-4, ІЛ-6. Даний факт вказує на синхронність відповіді на запалення і підтверджує розвиток у тварин вираженого системного патологічного стану.

Застосування ЛККЛ тваринам з АА викликало на 14-у добу зниження ШОЕ в 1,5 раза, рівня ЦК в 1,2 раза. Дослідження вмісту протизапальних цитокінів показало підвищення концентрації ІЛ-10 в 62 рази, ІФН $\gamma$  в 15,1 раза порівняно з тваринами групи АА. На 28-у добу терапевтичний ефект був також вираженим: зниження ІА в 1,2 раза, ШОЕ в 2 рази. Спостерігалось відновлення балансу про- та протизапальних цитокінів: зменшення концентрації ІЛ-17А і ФНП $\alpha$  в 1,4 раза; підвищення рівня ІЛ-10, ІФН $\gamma$  в 2,4 і 4 рази відповідно порівняно з тваринами групи АА. Одержані дані узгоджуються з результатами, які свідчать про коригувальний вплив кріоконсервованих препаратів ККЛ на рівень ЦК у вагітних із залізодефіцитною анемією [14], а також про протівірусну активність кріоконсервованого ЛККЛ на моделі грипозної інфекції у тварин (штам А/Вікторія/3/75 (H3N2)), що проявлялось у підвищенні продукції ІФН $\gamma$  і протівірусних антитіл [10]. Даний факт важливо враховувати під час розроблення протоколів комплексної терапії (протизапальної та протівірусної) з використанням ККЛ для хворих на РА.

Введення кЕПЛ тваринам з АА привело на 14-у добу до зменшення запального процесу: зниження кількості лейкоцитів у 2,3 раза, ШОЕ в 3 рази, нормалізація рівня ІЛ-7А. Зменшення вираженості патологічного процесу після застосування кЕПЛ було відмічено й на 28-у добу: кількість лейкоцитів зменшилася в 1,4 раза, ШОЕ — в 1,2 раза, вміст прозапальних цитокінів

the animals from the control group, was found in blood serum of mice. To day 28, the clinical manifestations of AA were persisted and the cytokine imbalance was enhanced: the concentration of TNF $\alpha$  and IL-6 increased by 2.5 and 4.6 times, respectively; the IL-10 concentration reduced by 1.6 times vs. the control. Significant secretion of TNF $\alpha$ , produced by Th1 and that of IL-6, produced by Th2 testified to the activation of helper cells of both types.

The findings of correlation relationships demonstrated the presence of strong ( $r > 0.7$ ) pathogenetically significant correlations between each clinical and laboratory index and IL-10 concentration, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , between AI and IL-2; the leukocyte count and IL-4, IL-6; ESR and IL-2, IL-4; the CICs index and IL-4, IL-6 under persistent manifestation of clinical evidence of AA (days 14 and 28). This fact suggested the synchronicity of response to inflammation and confirmed the development of a pronounced systemic pathological state in animals.

To day 14, the HCB use in AA animals caused the reduction of ESR and CICs levels in 1.5 and 1.2 times, respectively. The study of content of anti-inflammatory cytokines showed an increase in IL-10 concentration by 62 times, and IFN $\gamma$  by 15.1 times as compared with the animals from AA group. To day 28, a therapeutic effect was also pronounced, *i. e.* AI and ESR reduced by 1.2 and 2 times, respectively. The restoration of balance of pro- and anti-inflammatory cytokines was observed, *i. e.* the concentration of IL-17A and TNF $\alpha$  decreased by 1.4 times; the levels of IL-10 and IFN $\gamma$  increased by 2.4 and 4 times, respectively, vs. the animals from AA group. These findings were consistent with the results, testifying to a corrective effect of cryopreserved preparations from HCB on CICs level in pregnant women with iron-deficiency anaemia [19], as well as to an antiviral activity of cryopreserved HCB in animal model of influenza infection (strain A/Victoria/3/75 (H3N2)), manifested in an increased production of IFN $\gamma$  and antiviral antibodies [13]. This fact should be bear in mind when designing the protocols for a comprehensive (anti-inflammatory and antiviral) therapy with HCB use for RA patients.

The cHPE administration to AA animals resulted to day 14 in a decrease in inflammatory process, *i. e.* the leukocyte count and ESR reduced by 2.3 and 3 times, respectively, and the IL-7A level was normalized. A decreased severity of pathological process after applying cHPE was also revealed to day 28, namely the leukocyte count reduced by 1.4 times, ESR - by 1.2 times, the content of pro-inflammatory cytokines IL-6 – by 5.6 times,





ІЛ-6 — в 5,6 раза, ФНПа — 2,3 раза порівняно з тваринами групи АА. Даний факт може бути обумовлено залученням медіаторів кЕПЛ до інгібіції проліферації продуцентів цитокінів — CD4<sup>+</sup>-клітин. Дані зміни спостерігалися іншими авторами у процесі поліклональної стимуляції CD4<sup>+</sup>-клітин CD3/CD28 моноклональними антитілами в присутності плацентарних мезенхімальних стовбурових клітин [22].

Отримані результати узгоджуються з даними, які підтверджують уповільнення дистрофічно-деструктивних змін синовіоцитів, активацію процесів їх репарації за внутрішньосуглобового введення екстракту плаценти під час комплексного лікування хворих на РА [8]. Іншими авторами також показано, що введення препарату стандартизованого гідролізату плаценти людини значуще інгібує вироблення ФНПа і циклооксигенази-2 у макрофагах, стимульованих прозапальними ліпополісахаридами [6]. Внутрішньочеревні ін'єкції гідролізату зменшували формування гранульоми в карагінановій моделі набряку і моделюванні хронічного артрити. Гідролізат захищав від деградації хряща на моделі остеоартрити, що може бути обумовлено присутністю в гідролізаті дипептиду JBP485, який здатний знижувати рівень секреції ФНПа.

На основі вищевикладеного можна відмітити, що монотерапія кЕПЛ або лЛККЛ однаково впливає на ряд показників: на 14-у добу зниження ШОЕ і ЦІК, на 14- і 28-у доби — лейкоцитозу. Зменшення запальної реакції у вказаних варіантах терапії спостерігалось на тлі відновлення балансу про- і протизапальних цитокінів (зменшення концентрації ІЛ-6 (28-а доба), збільшення концентрації ІЛ-10 (14-а доба)).

Специфічну дію кЕПЛ встановлено у тварин групи АА + кЕПЛ, у яких на відміну від тварин групи АА + лЛККЛ показано зниження рівня ФНПа (28-а доба), що підтверджує наявність інших імуносупресивних механізмів (активація Т-регуляторних клітин (Трег), пригнічення проліферації мононуклеарів).

Комбіноване використання лЛККЛ і кЕПЛ при АА на 14-у добу супроводжувалося зниженням концентрації ІЛ-6 (в 1,8 раза), відновленням рівня ІЛ-17А. На 28-у добу істотно знижувалися рівні ФНПа — в 4,7, ІЛ-17А — 2,1, ІЛ-6 — 10,8 раза. У сукупності це відбивалося на послабленні запалення у тварин цієї групи порівняно з групою АА. Так, на 14-у добу знижувалися такі показники: ІА — в 1,2 раза, кількість лейкоцитів — 2,4 раза, ШОЕ — 2 рази. На 28-у добу терапевтичний ефект зберігався, що проявлялось у зниженні клінічних показників запалення: ІА —

and TNF $\alpha$  – by 2.3 times as compared with the animals from AA group. This fact may be stipulated by involving the cHPE mediators in proliferation inhibition of cytokine producers: CD4<sup>+</sup> cells. Other authors observed these changes during polyclonal stimulation of CD4<sup>+</sup> cells with CD3/CD28 monoclonal antibodies in the presence of placental mesenchymal stem cells [20].

These findings were consistent with the data, confirming the slowing down of dystrophic and destructive changes in synoviocytes, their activated repairation during intra-articular administration of placental extract in the combined therapy of patients with RA [10]. Other authors have also demonstrated the administration of the preparation of a standardized human placental hydrolyzate to significantly inhibit the production of TNF $\alpha$  and cyclooxygenase-2 in macrophages, stimulated by proinflammatory lipopolysaccharides [8]. Intra-abdominal injections of hydrolyzate reduced the granuloma formation in carrageenan model of edema and in chronic arthritis simulation. In osteoarthritis model, the hydrolyzate protected against cartilage degradation, likely due to the presence of dipeptide JBP485 in hydrolyzate, that was able to reduce the TNF $\alpha$  secretion level.

Based on the mentioned above, it can be pointed out that the monotherapy with cHPE or lHCBL had a similar effect on some indices, *i. e.* the ESR and CICs decreased to day 14, and leukocytosis reduced to days 14 and 28. A decreased inflammatory response in the mentioned therapies was observed together with the balance restoration of pro- and anti-inflammatory cytokines (the IL-6 concentration lowered (day 28), and that of IL-10 augmented (day 14)).

A specific effect of cHPE was found in animals from group AA+cHPE, which, in contrast to animals of AA+lHCBL group, showed a decrease in TNF $\alpha$  level (day 28), that confirmed the presence of other immunosuppressive mechanisms (activation of T-regulatory cells (Treg), inhibition of mononuclear cell proliferation).

The combined use of lHCBL and cHPE in AA to day 14 was accompanied by reduction of IL-6 concentration (by 1.8 times), and the IL-17A level recovery. To day 28, the TNF $\alpha$ , IL-17A and IL-6 levels significantly decreased by 4.7, 2.1 and 10.8 times, respectively. In total, this was evidenced in the inflammation reduction in animals from this group as compared with the AA group. For example, to day 14 the IA, leukocyte count and ESR diminished by 1.2, 2.4 and 2 times, respectively. To day 28, a therapeutic effect was kept, that was manifested in a decrease in IA, leukocyte count,



в 1,2 раза, кількості лейкоцитів — 1,4 раза, ШОЕ — 2 рази, концентрації ЦК — 1,8 раза.

Серед переваг комбінованого використання ЛККЛ та кЕПЛ перед монотерапією слід відмітити значущий ефект відносно зниження ІА (14-а доба), ШОЕ і концентрації ФНПа (28-а доба). Цей факт може свідчити про сумарний ефект та/або синергію дії введених субстанцій однаковими механізмами завдяки присутності в продуктах протизапального цитокіну ІЛ-10 та імуносупресивного фактора ТРФβ, а також їх впливу на перепрофілювання роботи імунокomпетентних клітин у бік зниження продукції запальних медіаторів.

Після комбінованого використання вказаних ПЕФПК деякі показники співпадали з тими, які були одержані після проведення монотерапії. Наприклад, кількість ЦК (28-а доба) після спільного введення ЛККЛ і кЕПЛ наближалася до показника після введення ЛККЛ, що можливо є результатом впливу саме ЛККЛ на фагоцитарну активність макрофагів. Даний ефект підтверджено даними дослідників щодо активації продуктами, отриманими з ККЛ, фагоцитів у системах *in vivo* [10] та *ex vivo* [7]. На 14 і 28-у доби кількість лейкоцитів після комбінованого використання ПЕФПК зменшувалася так само, як і після введення кЕПЛ, що свідчить про імуносупресивну дію саме екстракту.

Інша особливість комбінованого використання клітин ЛККЛ і кЕПЛ полягає в тому, що введені ПЕФПК можуть впливати на різні мішені в імунній системі реципієнтів, доповнюючи один одного. Так, на 28-у добу після застосування ЛККЛ було встановлено підвищення концентрації ІФНγ, після введення кЕПЛ — зниження ІЛ-6 порівняно з групою АА, а після їх комбінованого використання виявлено значущі зміни обох показників.

Суттєво, що саме сумісне використання ПЕФПК може обумовлювати регуляцію певних цитокінів. Зниження рівня ІЛ-6 на 14-у добу відбувалося тільки за умов спільного введення і було резистентним до монотерапії. Це припущення узгоджується з даними, які підтверджують відповідь різних субпопуляцій колонієутворюючих одиниць (КУО) на введення певного коктейлю цитокінів. Відомо, що кровотворні клітини з високим проліферативним потенціалом містять різні субпопуляції, які відповідають проліферацією: одна з них — на складний стимул (колонієстимулюючий фактор-1 (КСФ-1)+ІЛ-1+ІЛ-3+ІЛ-6), друга — на менш складний (КСФ-1+ІЛ-1+ІЛ-6) [21].

Важливо відмітити, що після проведення комбінованої терапії з використанням продуктів, що

ESR and CICs concentration by 1.2, 1.4, 2 and 1.8 times, respectively.

Among the advantages of a combined use of IHCBL and cHPE over the monotherapy, a significant effect relative to the reduction of AI (day 14), ESR and TNFα concentration (day 28) should be noted. This fact may testify to a combined effect and/or synergy of action of the administered substances through the same mechanisms due to the presence of anti-inflammatory cytokine IL-10 and immunosuppressive factor TRFβ in products, as well as their impact on re-profiling of immune competent cell activity towards a decrease in production of inflammatory mediators.

Following combined use of the mentioned PEFPC, some indices coincided with those obtained after monotherapy performance. For example, the amount of CICs (day 28) after combined administration of IHCBL and cHPE approached the value after IHCBL introduction, that might result from the impact of namely IHCBL on phagocytic activity of macrophages. This effect was confirmed by the reported data on phagocyte activation by HCB-derived products *in vivo* [13] and *ex vivo* [9]. To days 14 and 28, the leukocyte count after combined use of PEFPC decreased in the same way as after cHPE administration, thus indicated an immunosuppressive effect of the extract.

Another feature of a combined use of IHCBL and cHPE cells was that the injected PEFPC could affect different targets in recipient's immune system, by complementing each other. For example, to day 28 after IHCBL use, we revealed an increase in IFNγ concentration, and after applying cHPE there was a decrease in IL-6 as compared with the AA group, and after their combined use the significant changes in both indices were found.

Notably, that namely combined use of PEFPC may stipulate the regulation of certain cytokines. A decrease in IL-6 level to day 14 occurred only when they were administered together, and it was resistant to monotherapy. This assumption is consistent with the data confirming the response of different subpopulations of colony-forming units (CFUs) to administration of a specific cytokine cocktail. It is known that hematopoietic cells with a high proliferative potential contain different subpopulations that respond by proliferation, *i. e.* one of them responds to a complex stimulus (colony-stimulating factor-1 (CSF-1) + IL-1 + IL-3 + IL-6), another – to a less complex one (CSF-1+IL-1+IL-6) [15].

It is noteworthy, that after combined therapy with cytokines-containing products, not only the functional properties of immune competent cells in



містять цитокини, можливі зміни не тільки функціональних властивостей імункомпетентних клітин у реципієнтів, але й властивостей введеної суспензії. Такі підходи використовуються під час інфузії кріоконсервованих CD133<sup>+</sup>-клітин ККЛ у комбінації з іншими біоактивними молекулами [19] для інгібіції диференціювання кровотворних попередників, посилення міграції клітин і підвищення ефективності приживлення гемопоетичних стовбурових клітин після трансплантації. У роботах показана також ефективність використання цитокинів разом з CD34<sup>+</sup>-клітинами для експансії природніх кілерних клітин з кріоконсервованої ККЛ та їх цитотоксичних властивостей [18]. Відомо, що цитокинове середовище в умовах запалення може обумовлювати «переключення» формування Трег-клітин та Тх17. Дійсно, за відсутності певної кількості прозапальних цитокинів FOXP3 домінує над RORγT і запобігає формуванню Тх17, тобто завдяки присутності TRFβ, ІЛ-10 у кЕПЛ за умов його комбінованого використання з ЛККЛ він може визначати властивості Трег-клітин у ЛККЛ.

Звертає на себе увагу відсутність коригувального впливу введених субстанцій на продукцію ІЛ-2, що може бути пов'язано з умовами проведення досліджень (недостатня доза введеного матеріалу), існування ІЛ-2 у зв'язаній з рецепторами клітин формі [20]. Можлива також класична ауторегуляція, за якої ІЛ-2 пригнічує власну продукцію через активацію STAT5 і Blimp-1, що викликає репресію гена ІЛ-2.

Інтегральна оцінка терапевтичної ефективності ПЕФПК показала, що всі способи терапії приводили до стійкого ефекту, але на 28-у добу після комбінованого використання ЛККЛ та кЕПЛ вказаний показник був нижче ніж після монотерапії в 3,1 і 2,5 рази відповідно.

Оцінка показників тварин у групі з введенням преднізолону показала, що на 14-у добу після його введення ІА знизився в 1,3 рази, лейкоцити — 2,1 рази, ШОЕ в 3 рази, ЦІК — в 3,2 рази порівняно з групою АА. На 28-у добу ІА знизився в 1,4 рази, ШОЕ — 3 рази, ЦІК — 1,2 рази, рівень ІФНγ відновлювався до контрольних значень, а ІЛ-6 знизився в 2,4 рази відносно групи АА, що узгоджується з висновками дослідників щодо обумовленості протизапального та імунорегуляторного ефектів глюкокортикостероїдів їх впливом на систему цитокинів [17]. Сумарний ступінь відхилення у цій групі тварин підтвердив зниження запальної реакції в усі терміни спостереження, але на 28-у добу показник був вище, ніж після комбінованого введення ПЕФПК. Даний факт підтверджує переваги комбінованого введення

recipients, but those of the administered suspension may be altered. Such approaches are used during the infusion of cryopreserved HCB CD133<sup>+</sup> cells together with other bioactive molecules [11] to inhibit differentiation of hematopoietic progenitors, enhance cell migration, and increase the engraftment efficiency of hematopoietic stem cells post transplantation. The efficiency of using cytokines together with CD34<sup>+</sup> cells for expansion of natural killer cells from cryopreserved HCB and their cytotoxic properties has been reported [1]. It is known that cytokine environment under inflammation may cause the 'switching' of formation of Treg cells and Th17. Indeed, when a certain amount of pro-inflammatory cytokines is absent, the FOXP3 dominates over RORγT and prevents the Th17 formation, *i. e.* due to the presence of TRFβ and IL-10 in cHPE when used together with IHCBL it may determine the properties of Treg cells in IHCBL.

A noteworthy detail is the absence of a corrective effect of the administered substances on IL-2 production, likely due to the experiment conditions (insufficient dose of introduced material), and the existence of IL-2 in cell receptor-associated form [14]. A classical autoregulation is also possible, when IL-2 inhibits its own production through the STAT5 and Blimp-1 activation, thus causing the repression of IL-2 gene.

An integral assessment of PEFPC therapeutic efficiency showed that all treatment methods led to a sustained effect, but to day 28 after combined use of IHCBL and cHPE this index was lower than after monotherapy by 3.1 and 2.5 times, respectively.

Evaluation of parameters in animals from group with prednisolone administration showed that to day 14 after its introduction the indices of AI, leukocyte count, ESR and CICs decreased by 1.3, 2.1, 3, and 3.2 times, respectively, as compared with the AA group. To day 28, the IA, ESR and CICs reduced by 1.4, 3 and 1.2 times, correspondingly. The IFNγ level was restored up to the control values, and IL-6 decreased by 2.4 times *vs.* the AA group, that was consistent with findings of scientists about the conditioning of anti-inflammatory and immune regulatory effects of glucocorticosteroids by their impact on cytokine system [3]. The total degree of deviation in this animal group confirmed the reduction of inflammatory response throughout the all observation periods, but to day 28 the index was higher than after combined administration of PEFPC. This fact proves the advantages of combined introduction of PEFPC in suppression of immune inflammation and reduction of the level of pro-inflammatory cytokines: IL-



ПЕФПК у пригніченні імунного запалення і зниженні рівня прозапальних цитокінів — ІЛ-17, ІЛ-6, ФНП $\alpha$ . Одержані результати свідчать про протизапальну дію вивчених речовин і терапевтичну ефективність ПЕФПК, що обумовлено їх здатністю реагувати на «запит ситуації» біологічно активних речовин.

### Висновки

1. На експериментальній моделі РА людини, якою є АА, продемонстровано переваги комбінованого використання ЛІККЛ та кЕПЛ порівняно з монотерапією у відновленні клінічних показників та балансу в системі цитокінів.

2. Протизапальна дія ЛІККЛ після лікування тварин з АА виявлялася у зниженні ШОЕ та ЦІК у периферичній крові, корекцією рівня ІЛ-17А (14-а доба), ІА, ФНП $\alpha$ , підвищенням ІЛ-10, ІФН $\gamma$  (28-а доба).

3. Терапевтична дія кЕПЛ проявлялася у зменшенні показників лейкоцитозу, коефіцієнту розміру ЦІК (14 і 28-а доби), ШОЕ (14-а доба), ІЛ-6, ФНП $\alpha$  (28-а доба).

4. Сумарний ступінь відхилення показників після комбінованого використання ЛІККЛ та кЕПЛ був нижчим порівняно з монотерапією в 3,1 і 2,5 рази відповідно (28-а доба), що можливо є результатом синергії окремих продуктів відносно зниження ІА та ФНП $\alpha$ ; додаткового впливу кожного продукту на рівень різних цитокінів (ЛІККЛ — на рівень ІФН $\gamma$ , кЕПЛ — на рівень ІЛ-6 (28-доба)) і на клінічні показники: ЛІККЛ — на концентрацію ЦІК, кЕПЛ — на кількість лейкоцитів (14 і 28 доби).

### Література

1. Балабанова РМ, Братских ЕВ, Оспельникова ТП, и др. Система интерферона у больных ревматоидным артритом, инфицированных вирусами гепатита В и С. Научно-практическая ревматология. 2003; (4): 15–8.
2. Гольцев АН, Дубрава ТГ, Луценко ЕД, и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть I. Проблемы криобиологии. 1996; (4): 3–15.
3. Гольцев АМ, Останкова ЛВ, Луценко ОД, та ін., винахідники; Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб порівняльної оцінки ефективності лікування. Патент України на корисну модель № 3761, 15.12.2004.
4. Гольцев АМ, Фуллер БДж, Бондарович МО, та ін. COVID-19 – потенційна мішень для криобіології та кріомедицини. Проблеми криобіології і кріомедицини. 2020; 30(2): 107–31.
5. Грищенко НГ, Грищенко ВИ, Смольянинова ЕИ, и др. Влияние криоэкстракта плаценты на индукцию суперовуляции у лабораторных мышей с хроническим воспалением яичников. Проблемы криобиологии. 2010; 20(3): 327–37.

17, IL-6, TNF $\alpha$ . Our findings testified to an anti-inflammatory effect of the studied substances and therapeutic efficiency of PEFPC, that was stipulated by the ability of biologically active substances to respond to the ‘situation request’.

### Conclusions

1. Advantages of a combined use of IHCBL and cHPE over the monotherapy in restoring the clinical indices and balance in cytokine system have been demonstrated in AA as an experimental model for human RA.

2. Anti-inflammatory effect of IHCBL after treatment of AA animals was manifested by a decrease in ESR and CICs in peripheral blood, correction of the level of IL-17A (day 14), IA, TNF $\alpha$ , and an increase in IL-10, IFN $\gamma$  ones (day 28).

3. Therapeutic effect of cHPE occurred in reduction of leukocytosis indices, coefficient of CICs size (days 14 and 28), ESR (day 14), IL-6 and TNF $\alpha$  (day 28).

4. Total degree of deviation of the indices after combined use of IHCBL and cHPE was lower vs. the monotherapy by 3.1 and 2.5 times, respectively (day 28), likely resulted from the synergy of individual products relative to the reduction of IA, TNF $\alpha$ ; additional impact of each product on level of various cytokines (IHCBL affected IFN $\gamma$  level, cHPE did IL-6 one (day 28)) and on clinical indices: IHCBL influenced CICs concentration, cHPE did the leukocyte count (days 14 and 28)).

### References

1. Alnabhan R, Madrigal A, Saudemont A. Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines. Cytotherapy. 2015; 17(1): 73–85.
2. Balabanova RM, Bratskikh EV, Ospelnikova TP, Kiseleva V.I. [Interferon system in patients with rheumatoid arthritis infected with hepatitis B and C viruses]. Rheumatology Science and Practice. 2003; 41 (4): 15–8. Russian.
3. Chereshev VA, Gusev EYu. [Immunology of inflammation: the role of cytokines]. Medical Immunology. 2001; 3(3): 361–8. Russian.
4. Goltsev AN, Dubrava TG, Lutsenko ED, et al. A search for the methods of modification of the immune reactivity of the allomyelotransplant, which are alternative to cryopreservation. Part I. Problems of Cryobiology. 1996; (4): 3–16.
5. Goltsev AM, Fuller BJ, Bondarovich MO, et al. COVID-19 as a potential target for cryobiology and cryomedicine. Probl Cryobiol Cryomed 2020; 30(2):107–31.
6. Goltsev AM, Ostantkova LV, Lutsenko OD, et al, inventors. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [A method of comparative assessment of the effectiveness of treatment]. Patent of Ukraine 3761. 2004 Dec 15. Ukrainian.
7. Grischenko NG, Grischenko VI, Smolyaninova EI, et al. Effect of placental cryoextract on superovulation induction in mice with



6. Громова ОА, Торшин ИЮ, Диброва АВ, и др. Гидролизаты плаценты человека в реконструктивной терапии соединительной ткани хряща и суставов. Медицинский совет. 2017; (5): 178–84.
7. Гулевский АК, Горина ОЛ, Моисеева НН. Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови на фагоцитарную активность лейкоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению. Світ медицини та біології. 2011; (1): 9–14.
8. Гулида МО, Мирошниченко ЕВ, Березка НИ и др. Применение экстракта плаценты в комплексном лечении больных ревматоидным артритом. Экспериментальна і клінічна медицина. 2014; 62(1): 168–71.
9. Коваль АК, Луценко ЕД, Гриша ИГ, и др. Влияние лиофилизации на сохранность структурно-функциональных характеристик лейкоконцентрата кордовой крови человека. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29(4): 332–43.
10. Кожина ОЮ, Останков МВ, Останкова ЛВ, и др. Влияние криоконсервированной кордовой крови на активность альвеолярных макрофагов в экспериментальной модели гриппа. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013; 23 (3): 247–59.
11. Меньшиков ВВ, Делеторская ИН, Золотницкая РП. Лабораторные методы исследования в клинике. Москва: Медицина; 1987. 368 с.
12. Міщенко ОЯ, Котвіцька АА. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів. Вісник фармації. 2001; 27(3): 124–5.
13. Насонов ЕЛ. Фармакотерапия ревматоидного артрита: новая стратегия, новые мишени. Научно-практическая ревматология. 2017; 55(4): 409–19.
14. Овчинникова ОВ, Бондаренко ИА, Лазуренко ВВ, и др. Использование криоконсервированной пуповинной крови в лечении железодефицитной анемии беременных. Проблемы криобиологии. 2008; 18(3): 361–3.
15. Прокопюк ОС, Чижевский ВВ, Прокопюк ВЮ, Волина ВВ. Верификация биобезопасности криоконсервированных плацентарных объектов. В: Грищенко ВИ, Юрченко ТН, редакторы. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства и перспективы клинического применения. Харьков, 2011. С. 207–44.
16. Стручков ПВ, Константинова НА, Лаврентьев ВВ, Чучалин АГ. Скрининг-тест для оценки патогенных свойств циркулирующих иммунных комплексов. Лабораторное дело. 1985; (7): 410–2.
17. Черешнев ВА, Гусев ЕЮ. Иммунология воспаления: роль цитокинов. Медицинская иммунология. 2001; 3(3): 361–8.
18. Alnabhan R, Madrigal A, Saudemont A. Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines. Cytotherapy. 2015; 17(1): 73–85.
19. Horwitz ME, Chao NJ, Rizzieri DA, et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. J Clin Invest. 2014; 124(7): 3121–8.
20. Mantovani G, Macciò A, Astarà G, et al. Membrane-bound and soluble IL-2 receptors (p55 and p75 chains) on peripheral blood mononuclear cells from patients with solid malignancies. Cell Biophysic. 1993; 22: 79–99.
21. McNiece IK, Bertocello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). Int J Cell Cloning. 1990; 8(3): 146–60.
22. Papait A, Vertua E, Magatti M, et al. Mesenchymal stromal cells from fetal and maternal placenta possess key similarities and differences: potential implications for their applications in regenerative medicine. Cells [Internet]. 2020 Jan 6 [cited 2021 Jul 13]; 9(1): 127. Доступно на <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7017205/>
- chronic ovary inflammation. Problems of Cryobiology. 2010; 20(3): 327–37.
8. Gromova OA, Torshin IY, Dibrova EA, et al. [Human placenta hydrolyzates in reconstructive therapy of connective tissue of cartilage and joints]. Meditsinskiy sovet. 2017; (5):178–85. Russian.
9. Gulevskiy AK, Gorina OL, Moyseeva NN. [Influence of low-molecular fraction of cord blood on phagocytic activity of leukocytes, subjected to hypothermic storage]. World of Medicine and Biology. 2011; (1): 9–14. Russian.
10. Gulida MO, Miroshnichenko EV, Berezka MI, et al. [Application of placenta extract in complex treatment of patients with rheumatoid arthritis]. Experimental and Clinical Medicine. 2014; 62(1): 168–71. Russian.
11. Horwitz ME, Chao NJ, Rizzieri DA, et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. J Clin Invest. 2014; 124(7): 3121–8.
12. Koval GK, Lutsenko OD, Grisha IG, et al. Impact of lyophilisation on integrity of structural and functional characteristics of human cord blood leukoconcentrate. Probl Cryobiol Cryomed. 2019; 29(4): 332–43.
13. Kozhina OYu, Ostanokov MV, Ostanokova LV, et al. Effect of cryopreserved cord blood on activity of alveolar macrophages in experimental model of influenza. Probl Cryobiol Cryomed. 2013; 23(3): 247–59.
14. Mantovani G, Macciò A, Astarà G, et al. Membrane-bound and soluble IL-2 receptors (p55 and p75 chains) on peripheral blood mononuclear cells from patients with solid malignancies. Cell Biophysic. 1993; 22: 79–99.
15. McNiece IK, Bertocello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). Int J Cell Cloning. 1990; 8(3): 146–60.
16. Menshikov VV, Deletorskay IH, Zolotnitskay RP. [Laboratory research methods in clinic]. Moscow: Meditsina; 1987. 368 p. Russian.
17. Mischenko OY, Kotvitska AA. [Pharmacological efficiency of analbene emulsion in the model of adjuvant arthritis in rats]. Visnyk farmatsii. 2001; (3): 124–5. Ukrainian.
18. Nasonov EL. [Pharmacotherapy for rheumatoid arthritis: new strategy, new targets]. Rheumatology Science and Practice. 2017; 55(4): 409–19. Russian.
19. Ovchinnikova OV, Bondarenko IA, Lazurenko VV, et al. Application of cryopreserved cord blood in treatment of hypoferric anemia of pregnant. Problems of Cryobiology. 2008; 18 (3): 361–3.
20. Papait A, Vertua E, Magatti M, et al. Mesenchymal stromal cells from fetal and maternal placenta possess key similarities and differences: potential implications for their applications in regenerative medicine. Cells [Internet]. 2020 Jan 6 [cited 2021 Jul 13]; 9(1): 127. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7017205/>
21. Prokopyuk OS, Chizhevsky VV, Prokopyuk VYu, et al. [Verification of the biosafety of cryopreserved placental objects]. In: Grischenko VI, Yurchenko TN, editors. [Placenta: cryopreservation, structure, properties and perspectives of clinical application]. Kharkiv; 2011. P. 207–44. Russian.
22. Struchkov PV, Konstantinova NA, Lavrentev VV, Chuchalin AG. [Screening test for evaluation of pathogenic properties of circulating immune complexes]. Laboratornoye Delo. 1985; (7): 410–2. Russian.

