

## ПУПОВИННА КРОВ ЯК КОРЕКТОР ГЕМАТОЛОГІЧНИХ І ЦИТОМОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛІМФОГЕМОПОЕТИЧНИХ ОРГАНІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТОПІЧНОМУ ДЕРМАТИТІ

Г.К. Коваль<sup>1</sup>, М.О. Бондарович<sup>1\*</sup>, А.М. Гольцев<sup>1,2</sup>

<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, Україна

\*Corresponding author: nikolay.bondarovich@gmail.com

Received 1 June 2023; Accepted 22 August 2023

**Проблематика.** Атопічний дерматит (АД) – запальне захворювання шкіри, обумовлене зрушенням взаємодії клітин імунної системи та шкіри. Стероїдні протизапальні препарати, що використовуються як терапія АД, викликають чимало побічних ефектів. Тому актуальною є розробка нових природних поліфункціональних засобів з імунокоригувальною активністю.

**Мета.** Визначення зміни показників лейкоцитарної ланки периферичної крові, а також встановлення характеру цитоморфологічних змін у селезінці та лімфатичних вузлах (ЛВ) щурів з індукованим АД до та після застосування кріоконсервованих (кЛПКЛ) та ліофілізованих (лЛПКЛ) форм лейкоконцентрату пуповинної крові людини.

**Методика реалізації.** Експерименти були проведені на 6-місячних щурах лінії Вістар. Ініціювали АД шляхом втирання у шкіру спини 5%-вого спиртово-ацетонового розчину динітрохлорбензолу (ДНХБ) протягом 21-ї доби. Кожну з форм препарату (кЛПКЛ і лЛПКЛ) вводили внутрішньочеревно по 0,5 мл у дозі  $5 \times 10^6$  клітин через добу після закінчення застосування ДНХБ. Визначалися кількість лейкоцитів і співвідношення нейтрофілів та лімфоцитів (індекс Н/Л) у крові, а також цитоморфологічні характеристики селезінки та пахових ЛВ.

**Результати.** При АД спостерігали певні особливості зміни цитоморфологічних характеристик структур лімфогемopoетичного комплексу (ЛГК), а саме селезінки і ЛВ, на тлі зміни показників лейкоцитарної ланки. Найбільш істотними змінами в селезінці була перевага білої пульпи над червоною, а в ЛВ – превалювання фолікулів II та III стадій розвитку. У крові тварин з АД відзначався виражений лейкоцитоз, зростав індекс Н/Л. Показано позитивні коригувальні ефекти кЛККЧ і лЛККЧ щодо морфологічних характеристик ЛГК і зазначених показників крові.

**Висновки.** Доведено ефективність застосування кЛПКЛ і лЛПКЛ з метою корекції показників лейкоцитарної ланки крові та структурної організації лімфогемopoетичних органів при розвитку АД.

**Ключові слова:** пуповинна кров; кріоконсервування; ліофілізація; атопічний дерматит; динітрохлорбензол; нейтрофіли; лімфоцити; селезінка; лімфатичні вузли.

### Вступ

Атопічний дерматит (АД) є хронічним захворюванням, що обумовлене розвитком запального процесу в шкірі та має рецидивуючо-прогресуючий перебіг із формуванням важких форм. Звертається увага на порушення стану імунної системи (ІС) у патогенезі АД [1]. При цьому акцентується, що зазначені порушення стосуються як функціонального потенціалу імунокомпетентних клітин, так і цитоморфологічних характеристик периферичних органів (селезінки та лімфатичних вузлів) лімфогемopoетичної системи.

Характерною рисою АД є підвищення рівня сироваткового імуноглобуліну Е (IgE), сенсibilізація до алергенів, переважання цитокінів

Т-хелперів 2-го типу (Th2), збільшення кількості Т-клітин, що експресують шкірний лімфоцитарний антиген, підвищення експресії FcεR1 на запальних епідермальних дендритних клітинах (ДК), клітинах Лангерганса (КЛ) та підвищена експресія тимусного стромального лімфopoетину [1].

Раніше нами було показано, що при експериментальному АД відбувається зниження кількості загальних Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій із фенотипами CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> [2]. Зміни у субпопуляційному складі селезінки були відзначені й іншими авторами. М.У. Yun і співавт. спостерігали збільшення в селезінці мишей з АД вмісту В-лімфоцитів CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> [3]. S. Iida і співавт. при імуногістохімічному дослідженні селезінки в мишачій моделі спонтанного

дерматиту (миші KCASP1Tg) виявили зменшення кількості CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- і CD20<sup>+</sup>-клітин та збільшення кількості CD138<sup>+</sup> плазматичних клітин [4]. Y. Meng і співавт. встановили в селезінці мишей з АД збільшення кількості Th2 на тлі зниження числа Th1-клітин [5]. Зміни субпопуляційного складу також мають місце й у лімфатичних вузлах (ЛВ) тварин з АД. У роботі [6] вказується, що кількість вроджених лімфоїдних клітини 2 типу (ILC2), які є аналогом Th2-клітин, і рівень цитокінів IL-5 і IL-13 при АД збільшуються в дренажних ЛВ. M.S. Kim і співавт. виявили в ЛВ тварин з АД збільшення кількості CD4<sup>+</sup> Т-клітин, що продукують IL-4, IL-13 або IL-17 [7]. Частково ці зміни в ЛВ після індукції АД можуть відбуватися завдяки міграції зі шкіри імунокомпетентних клітин. Так, після впливу на шкіру сенсibiliзуючого агента щільність епідермальних клітин КЛ зменшується приблизно на 50 % протягом наступних 24 год, оскільки вони мігрують до дренажних регіонарних ЛВ. Під час міграції КЛ проходять процес дозрівання та набувають фенотипу функціонально зрілих ДК. Наприкінці фази сенсibiliзації в ЛВ, крові та шкірі виявляються гаптен-специфічні Т-клітини, праймовані завантаженими гаптеном ДК [8]. До міграції в ЛВ після сенсibiliзації гаптеном шкіри, крім ДК, залучаються також й інші імунокомпетентні клітини. Індукція запалення шкіри у сенсibiliзованих оксазолонем мишей дитрансгенного типу після нанесення гаптenu на поверхню шкіри посилювала міграцію циркулюючих ILC2 зі шкіри до дренажних ЛВ [9]. Субпопуляція дермальних Vg4 Т-клітин також може мігрувати до ЛВ. Міграція Т-клітин Vg4 посилюється під час інфекційних процесів у шкірі або під час контактної реакції гіперчутливості. Ці клітини характеризуються здатністю до підвищеної продукції IL-17 і значної клонональної експансії в ЛВ [10].

Своєю чергою такого роду зміни позначаються і на цитоморфологічних характеристиках органів лімфогемопоетичного комплексу (ЛГК). У більшості робіт, присвячених виявленню особливостей патогенетичних змін при АД, вказується на збільшення при цій патології маси селезінки та ЛВ [11–14]. S. Iida та співавт. однією з причин збільшення маси селезінки вважають відкладення в ній амілоїду як результат індукції запалення на фоні підвищеної продукції лімфоцитів IL-17, який відіграє патогенетичну роль при АД [4]. Як зазначили автори, відкладення амілоїду спостерігалось переважно в

крайовій зоні, яка є межею між білою та червоною пульпами. С.К. Singh і співавт. при проведенні гістологічного дослідження селезінки мишей з АД виявили типову архітектоніку тканини червоної та білої пульп [15]. Більше того, збільшення розміру селезінки відбулося на фоні збереження нормальної її мікроархітектури, що, швидше за все, є фізіологічною реакцією на потребу в клітинах крові, які беруть участь в реалізації імунних реакцій [15].

Важливою діагностичною ознакою порушення функціонування ІС при АД є зміна співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів у периферичній крові. Автори [16] виявили пряму кореляцію між співвідношенням нейтрофілів і лімфоцитів та ступенем запалення і площею ураженої шкіри. В той же час в більш ранніх роботах O. Bostan Gayret і спіавт. не виявили кореляції між співвідношенням нейтрофілів до лімфоцитів та важкістю перебігу АД [17].

Таким чином, точні механізми патогенезу АД залишаються не зовсім з'ясованими, а деякі результати мають суперечливий характер. З огляду на це лікування АД зумовлює необхідність пошуку та створення нових підходів до терапії цієї патології, заснованих на використанні поліфункціональних препаратів, що мають системний імунокоригувальний і репаративний ефект. У переліку такого роду біосубстанцій на перший план виступає потужний природний імуномодулятор – пуповинна кров людини (ПКЛ) [18–23]. Терапевтичний потенціал ПКЛ визначається унікальним складом компонентів, які містяться в ньому, а саме клітин і біоактивних субстанцій плазми, що дає змогу віднести ПКЛ до поліфункціональних препаратів з імуно- і трофікокоригувальними властивостями [22, 21]. Іншими словами, коригуючи стан ІС організму, ПКЛ забезпечує і його гомеостатичну сталість [22–24]. Дійсно, корекція стану ІС обумовлює стабілізацію систем “золотого трикутника”, а саме систем нейро-імуно-ендокринного блоку (НІЕБ) [25–27]. З урахуванням причетності до патогенезу АД центральної нервової системи [25, 28], застосування ПКЛ є патогенетично обґрунтованим для стабілізації НІЕБ і, як наслідок, лікування АД. Важливу роль у реалізації лікувального ефекту ПКЛ при АД можуть грати мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що входять до її складу [29] і чинять імуносупресивний ефект. Дійсно, в роботі N. Jung і співавт. на експериментальній моделі АД мишей було показано, що використання МСК ПКЛ пригнічувало

запальні реакції, опосередковані Т-клітинами, шляхом зниження рівнів ІЛ-22, тимусом й активацією регульованого хемокіну (TARC), TNF- $\alpha$  (маркер клітин Th1), ІЛ-4 (маркер клітин Th2) і сироваткового IgE [29].

Сьогодні з метою довгострокового зберігання ПКЛ для подальшого застосування в медичній практиці розробляються та впроваджуються методи її кріоконсервування та ліофілізації [30–32]. У зв'язку з цим увагу привертає порівняльна оцінка коригувального потенціалу кріоконсервованих (кЛПКЛ) і ліофілізованих (лЛПКЛ) форм лейкоконцентрату ПКЛ щодо деяких показників периферичної крові та цитоморфологічних характеристик органів ІС при експериментальному АД у шурів.

Метою нашого дослідження було визначення особливостей зміни показників лейкоцитарної ланки периферичної крові, а також встановлення характеру цитоморфологічних змін у селезінці та ЛВ шурів з індукованим АД після застосування кЛПКЛ і лЛПКЛ.

### Матеріали і методи

Експерименти виконувалися на щурах-самцях 6-місячного віку масою 180–200 г із додержанням правил “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях” (The European Convention, 1986 р.), а також відповідно до Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.). Експериментальна частина роботи виконана відповідно до висновку Комітету з біоетики при ІПКіК НАН України: протокол № 2 від 02.05.2023 р. Лабораторні тварини, використані в експериментальній роботі, утримувалися в умовах віварію ІПКіК НАНУ.

Пуповинна кров для експериментальних досліджень була отримана з ДП “МНЦ КіК НАН, АМН та МОЗ України”, м. Харків. Пуповинну кров отримували за інформованої згоди породіллі безпосередньо після народження дитини. Вона має сертифікат, який свідчить про стерильність цього матеріалу. Пуповинна кров людини містить гемопоетичні та мезенхімальні стовбурові клітини, а також багато біологічно активних речовин, таких як альфа-фетопротеїн, естрадіол, фолікулостимулювальний гормон, лютеїнізувальний гормон, прогестерон тощо [30, 33–36]. Лейкоконцентрат виділяли з цільної пуповинної крові людини (ЛПКЛ) в аутоплазмі шляхом відділення еритроцитів

пасивною седиментацією в градієнті щільності з додаванням поліглюкіну. ЛПКЛ розливали по 1 мл у стерильні пеніцилінові флакони, які розміщували на полиці сублімаційної установки УЗВ-2 (ОП ІПКіК НАН України), та проводили ліофілізацію за методом А.М. Гольцева та співавт. [32]. Зразки ліофілізованого лейкоконцентрату пуповинної крові людини (лЛПКЛ) зберігали за 4 °С. Регідратацію лЛПКЛ здійснювали додаванням у флакони 1 мл фізіологічного розчину протягом 10 хв, обережно перемішуючи з метою запобігання спінюванню. Кріоконсервування ЛПКЛ (кЛПКЛ) здійснювали в одноразових пластикових пробірках (“Nunc”, США) на програмному заморозувачі за методом А.А. Цуцаєвої та співавт. [37]. Перед заморожуванням клітин ПКЛ в аутоплазму вводили декстран-60 у кінцевій концентрації 1,2 %, після чого її додавали до клітин. Зразки кЛПКЛ зберігали за –196 °С у низькотемпературному банку ІПКіК НАН України. Відтавали кЛПКЛ на водяній бані за температури 40–41 °С. Визначали кількість ядерних клітин у 1 мл суспензії ЛПКЛ методом прямого підрахунку в камері Горяєва. Життєздатність оцінювали за методом проточної цитофлуориметрії (“FACS Calibur”, BD Bioscience, США) з використанням пропідій йодиду.

Ініціювали АД за методом авторів [38]. Експериментальним тваринам щодня, протягом 21 доби, в попередньо депільовані ділянки шкіри спини (3×4 см<sup>2</sup>) втирали по 0,5 мл 5 %-вого спиртово-ацетонового розчину 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ). Вибір такої моделі був обумовлений тим, що, як було показано на прикладі безшерстих гризунів, багаторазове нанесення ДНХБ на шкіру тварин протягом тривалого періоду викликає хронічну запальну реакцію з домінуванням Th2 імунної відповіді, подібну до АД людини (порівняно з іншими моделями АД гризунів) [39]. Тваринам з індукованим АД внутрішньочеревинно вводили ЛПКЛ у дозі 5×10<sup>6</sup> клітин в 0,5 мл фізіологічного розчину. Життєздатність клітин у кріоконсервованому ЛПКЛ становила 81 ± 2,3 %, а в ліофілізованому – 60 ± 3,1 %. Тваринам порівняльної групи з індукованим АД наносили на ранову поверхню мазь “Преднізолон” (ЗАТ “Біофарма”) з концентрацією 0,5 % аплікаційним способом. Усього під спостереженням перебувало 35 шурів, які були розподілені випадковим чином на 5 груп: 1 – інтактні (контроль) ( $n = 7$ ); 2 – АД без лікування ( $n = 7$ ); 3 – АД + стандартне лікування (преднізолонова мазь) ( $n = 7$ );

4 – АД + кЛПКЛ ( $n = 7$ ); 5 – АД + лЛПКЛ ( $n = 7$ ). Усі види лікування починали через добу після закінчення використання ДНХБ.

Вплив різних форм ЛПКЛ на показники крові оцінювали на 3-тю, 7-му, 14-ту добу, а цитоморфологічних характеристик органів ЛГК – на 14-ту добу після лікування.

Кров у тварин забирали одразу після декапітації. Визначення кількості лейкоцитів крові проводили протягом 60 хв після забору крові за допомогою геманалізатора (Abacus, Австрія). Клітинний склад крові оцінювали на мазках-відбитках, пофарбованих азур II-еозином за Романовським–Гімзою у світловому мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина), окуляр  $\times 10$ , об'єктив  $\times 90$ -імерсія, і виражали у відсотках. Вираховували індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів (Н/Л), який характеризує ступінь запального процесу, шляхом ділення абсолютної кількості нейтрофілів на абсолютну кількість лімфоцитів: Н/Л [40].

Оцінку цитоморфологічних характеристик селезінки та лімфатичних вузлів тварин проводили за традиційними методиками [41]. Після вилучення селезінку та лімфатичні вузли фіксували в 10 %-вому формаліні, проводили крізь спирти в наростаючій концентрації та заливали в парафін. Приготовлені зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином. Препарати переглядали у світловому мікроскопі Primo Star і фотографували за допомогою цифрової камери AxioCam 105 (Carl Zeiss, Німеччина).

Для зручності інтерпретації та обговорення отриманих результатів для показників лікованих тварин розраховували ступінь відхилення (СВ) від показників тварин з АД, які поклалися за 100 %.

Результати досліджень виражали у вигляді медіани з нижнім і верхнім квантилями (Me [LQ; UQ]) та обробляли методами непараметричної статистики за допомогою програми Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). При множинних порівняннях використовували ранговий аналіз варіацій за Краскелом–Уоллісом, відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ . У разі отримання статистично значущої різниці проводилося попарне порівняння груп із використанням тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні за оцінки значень  $p$ .

## Результати

Раніше нами було продемонстровано розвиток запальних процесів у шкірі щурів з індукцією АД та їх зниження після застосування ЛПКЛ [42]. У щурів з АД протягом 14-ї доби спостереження в крові відзначався виражений лейкоцитоз (кількість лейкоцитів на 3-тю добу експерименту перевищувала рівень контролю на 60 %, на 14-ту – на 57,6 %) (табл. 1). У процесі лікування преднізолоном кількість лейкоцитів знижувалася, однак і до кінця експерименту (14-та доба) цей показник був на 15,3 % вищим за рівень контролю.

**Таблиця 1:** Динаміка зміни кількості лейкоцитів у крові щурів з індукованим atopічним дерматитом до та після лікування, Me [LQ; UQ]

№ групи	Група тварин	Показник	Кількість лейкоцитів периферичної крові ( $\times 10^6$ /мл)		
			3-тя доба	7-ма доба	14-та доба
1	Контроль	Me [LQ; UQ]		8,5 [8,5; 9,35]	
2	АД до лікування	Me [LQ; UQ]	13,6 [12,1; 15,1] <sup>1</sup>	11,4 [9,9; 12,2] <sup>1</sup>	13,4 [11,8; 14,4] <sup>1</sup>
3	АД + стандартне лікування (преднізолонова мазь)	Me [LQ; UQ]	10,5 [9,9; 11,7] <sup>1,2</sup>	9,6 [8,7; 10,9] <sup>2</sup>	9,8 [9,7; 10,3] <sup>1,2</sup>
		СВ, %	22,8	15,8	26,9
4	АД + кЛПКЛ	Me [LQ; UQ]	9,6 [7,8; 10,3] <sup>2</sup>	8,4 [8,1; 9,2] <sup>2</sup>	8,6 [8,4; 9,1] <sup>2,3</sup>
		СВ, %	29,4	26,3	35,8
5	АД + лЛПКЛ	Me [LQ; UQ]	9,1 [8,6; 11,0] <sup>2,3</sup>	9,2 [8,6; 10,0]	8,6 [8,3; 9,4] <sup>2,3</sup>
		СВ, %	33,1	19,3	35,8

*Примітки.* АД – atopічний дерматит, кЛПКЛ – кріоконсервованний лейкоконцентрат пуповинної крові людини, лЛПКЛ – ліофілізований лейкоконцентрат пуповинної крові людини, СВ – ступінь відхилення від показників тварин з АД, які поклалися за 100 %. Відмінності достовірні ( $p < 0,01$ ) порівняно: 1 – із контролем; 2 – із групою 2; 3 – із групою 3.

Застосування як терапевтичного засобу кріоконсервованого та ліофілізованого лейкоконцентратів ПКЛ сприяло стійкій позитивній динаміці нормалізації кількості лейкоцитів у крові тварин з АД. До 14-ї доби спостереження досліджуваний показник кількості лейкоцитів крові шурів з АД, яких лікували препаратами ПКЛ, значно не відрізнявся від рівня контролю (див. табл. 1).

Як впливає з табл. 1, вже на 3-тю добу після індукції АД у крові відзначався виражений лейкоцитоз, який маніфестувався аж до 14-ї доби. Ступінь коригувального ефекту досягав максимальних значень на 3-тю добу для групи тварин, лікованих ЛЛПКЛ, на 7-му добу – для тварин, лікованих КЛПКЛ, при цьому на 14-ту добу цей показник мав рівні значення для тварин, лікованих КЛККЧ і ЛЛККЧ. У групі тварин, лікованих преднізолоновою маззю, протягом періоду дослідження цей показник поступався такому в тварин, лікованих препаратами пуповинної крові.

При оцінці клітинного складу крові нелікованих шурів з АД за мазками-відбитками на всі терміни спостереження спостерігалось виражене збільшення вмісту паличкоядерних нейтрофілів на тлі загального нейтрофілозу та зниження кількості лімфоцитів, що підтверджує експансію патологічного процесу (табл. 2, 3). Так, індекс Н/Л для групи АД становив 6,0 на 3-тю і 6,8 на 14-ту добу експерименту (при значенні контрольного показника Н/Л = 0,35), що майже в 20 разів перевищувало норму. Застосування преднізолонової мазі пригнічувало запальний процес згідно з індексом Н/Л, який становив 2,0 та 1,6 на 3-тю і 14-ту добу відповідно. Дуже істотно, що препарати ПКЛ (КЛПКЛ і ЛЛПКЛ) значимо не змінювали ступінь тяжкості АД на 3-тю добу порівняно з групою стандартного лікування (АД + преднізолон), але покращували стан тварин з АД ( $p < 0,05$ ) протягом патологічного процесу до 14-ї доби спостереження.

Відомо, що навіть локально (топографічно) імунозапальний процес, який розвивається, в організмі ссавців тварин певною мірою викликає зміни стану лімфогемопоетичного комплексу [43]. Це не дивно з урахуванням наведеної вище інформації про міграцію з вогнища запалення центральних його “гравців” у вигляді дендритних та інших імунокомпетентних клітин (ІКК) у лімфогемопоетичні структури організму [8–10]. Гістологічно-цитологічна картина селезінки та ЛВ шурів з АД підтверджує

цю тезу. При дослідженні гістологічних зрізів пахових ЛВ інтактних шурів (група 1) визначалася звичайна їхня будова. Лімфатичні вузли були покриті сполучнотканинною капсулою, без різкої межі, що переходить у навколишню пухку сполучну тканину. У капсулі в помірній кількості зустрічалися еластичні волокна та гладкі м’язові клітини. Від капсули углиб ЛВ відходили трабекули, що утворюють опорний каркас. Строма ЛВ була утворена ретикулярною тканиною. Лімфоцити утворювали різні за формою скупчення на периферії та у глибині ЛВ. У кірковій речовині ЛВ спостерігалися змінні за формою та розмірами округлоподібні скупчення лімфоцитів – вторинні вузлики або фолікули, які подекуди зливалися в маси невідзначеної форми. Всередині деяких лімфоїдних вузликів визначалися світліші ділянки – гермінативні реактивні центри (центри розмноження). При великому збільшенні було видно, що на периферії фолікулів є переважно малі лімфоцити, тоді як у реактивних центрах багато великих і середніх лімфоцитів, а також макрофагів. У глибокій зоні кори ЛВ спостерігалось щільне дифузне скупчення лімфоцитів – паракортикальна зона (тимусзалежна, або Т-зона). Від вторинних вузликів (фолікулів) і паракортикальної зони всередину відходили стрічкоподібні скупчення малих лімфоцитів (мозкові тяжі), які утворювали основу паренхіми мозкової речовини ЛВ. Між вторинними вузликами, трабекулами та мозковими тяжами було видно світліші простори, заповнені ретикулярною тканиною і невеликою кількістю лімфоцитів – синуси. Серед них виділявся крайовий синус, розташований між капсулою та вторинними вузликами, кіркові проміжні, мозкові проміжні, центральні синуси та воротний синус. У просвітах синусів виявляли нечисленні лімфоцити (рис. 1а).

При аналізі гістологічних зрізів селезінки інтактних шурів 1-ї групи порушення її нормальної будови не визначалося. Всередину від сполучнотканинної капсули відходили трабекули, які в її глибоких частинах анастомозували між собою. Співвідношення червоної та білої пульпи було зрушено у бік червоної пульпи, що складалася з ретикулярної тканини з розташованими в ній клітинними елементами крові та численними кровоносними судинами, переважно синусоїдного типу, що свідчило про нормальне кровонаповнення органа. У розташованих між синусами пульпарних тяжках виявлялися осередки плазмоцитогенезу. Сукупність

**Таблиця 2:** Динаміка зміни кількості лімфоцитів у крові щурів з індукованим atopічним дерматитом до та після лікування, Me [LQ; UQ]

№ групи	Група тварин	Показник	Термін після застосування терапевтичних препаратів		
			3-тя доба	7-ма доба	14-та доба
1	Контроль	%		73,0 [64,5; 74,5]	
		$\times 10^6/\text{мл}$		6,2 [6,1; 6,2]	
2	АД до лікування	%	12,0 [10,5; 13,0] <sup>1</sup>	12,0 [10,5; 13,0] <sup>1</sup>	12,0 [10,5; 13,0] <sup>1</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	1,6 [1,5; 1,8] <sup>1</sup>	1,4 [1,0; 1,6] <sup>1</sup>	1,6 [1,3; 1,7] <sup>1</sup>
3	АД + стандартне лікування (преднізолонова мазь)	%	33,0 [30,0; 34,5] <sup>1,2</sup>	35,0 [32,0; 37,4] <sup>1,2</sup>	36,0 [35,5; 38,5] <sup>1,2</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	3,3 [3,1; 3,6] <sup>1,2</sup>	3,4 [2,8; 4,1] <sup>2</sup>	3,7 [3,6; 3,8] <sup>1,2</sup>
4	АД + кЛПКЛ	%	44,0 [40,5; 45,5] <sup>1,2,3</sup>	48,0 [42,4; 51,3] <sup>1, 2,3</sup>	52,0 [49,5; 54,5] <sup>1,2,3</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	4,3 [3,2; 4,5] <sup>1,2</sup>	4,0 [3,4; 4,7] <sup>1,2</sup>	4,5 [4,0; 5,1] <sup>1,2,3</sup>
5	АД + лЛПКЛ	%	39 [36,5; 44,5] <sup>1,2,3</sup>	47 [42,3; 50,2] <sup>1,2,3</sup>	52,0 [46,5; 53,5] <sup>1,2,3</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	3,7 [3,5; 4,3] <sup>1,2</sup>	4,3 [3,6; 5,0] <sup>1,2,3</sup>	4,2 [4,1; 4,8] <sup>1,2,3Ф</sup>

*Примітки.* АД – atopічний дерматит, кЛПКЛ – кріоконсервованій лейкоконцентрат пуповинної крові людини, лЛПКЛ – ліофілізований лейкоконцентрат пуповинної крові людини. Відмінності достовірні ( $p < 0,01$ ) порівняно: 1 – із контролем; 2 – із групою 2; 3 – із групою 3.

**Таблиця 3:** Динаміка зміни кількості нейтрофілів у крові щурів з індукованим atopічним дерматитом до та після лікування, Me [LQ; UQ]

№ групи	Група тварин	Показник	Термін після застосування терапевтичних препаратів		
			3-тя доба	7-ма доба	14-та доба
1	Контроль	%		25,0 [21,5; 27,0]	
		$\times 10^6/\text{мл}$		2,2 [1,8; 2,5]	
2	АД до лікування	%	72,0 [65,5; 75,5] <sup>1</sup>	76,0 [70,5; 80,0] <sup>1</sup>	82,0 [74,0; 86,0] <sup>1</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	9,6 [9,1; 10,3] <sup>1</sup>	8,7 [7,0; 9,8] <sup>1</sup>	11,0 [9,6; 11,7] <sup>1</sup>
3	АД + стандартне лікування (преднізолонова мазь)	%	62,0 [58,5; 70,5] <sup>1,2</sup>	62,0 [59,6; 71,3] <sup>1,2</sup>	61,0 [54,0; 63,0] <sup>1,2</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	6,8 [5,7; 7,8] <sup>1,2</sup>	6,8 [6,0; 7,8] <sup>1,2</sup>	6,0 [5,3; 6,3] <sup>1,2</sup>
4	АД + кЛПКЛ	%	52,0 [50,0; 54,5] <sup>1,2,3</sup>	48,0 [46,0; 51,0] <sup>1,2,3</sup>	43,0 [40,0; 49,0] <sup>1,2,3</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	4,9 [4,3; 5,3] <sup>1,2,3</sup>	4,0 [3,7; 4,7] <sup>1,2,3</sup>	3,7 [3,2; 4,5] <sup>1,2,3</sup>
5	АД + лЛПКЛ	%	55,0 [51,5; 61,5] <sup>1,2,3</sup>	50,0 [48,0; 54,0] <sup>1,2,3</sup>	46,0 [43,5; 47,5] <sup>1,2,3</sup>
		$\times 10^6/\text{мл}$	5,7 [4,8; 6,1] <sup>1,2</sup>	4,6 [4,1; 5,4] <sup>1,2,3</sup>	4,1 [3,7; 4,3] <sup>1,2,3</sup>

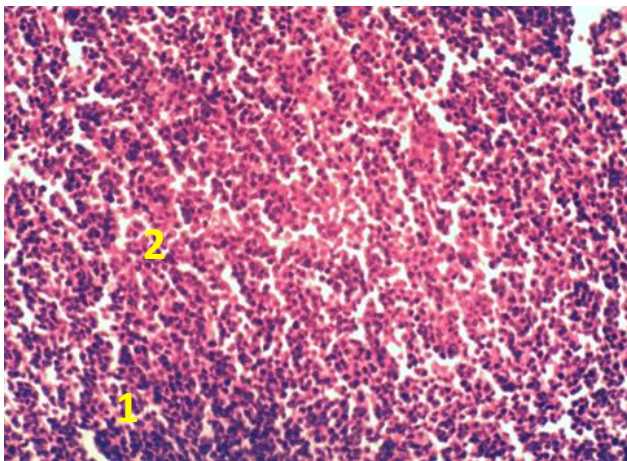
*Примітки.* АД – atopічний дерматит, кЛПКЛ – кріоконсервованій лейкоконцентрат пуповинної крові людини, лЛПКЛ – ліофілізований лейкоконцентрат пуповинної крові людини. Відмінності достовірні ( $p < 0,01$ ) порівняно: 1 – із контролем; 2 – із групою 2; 3 – із групою 3.

лімфоїдної тканини – біла пульпа – селезінки розташовувалася в адвентиції її артерій у вигляді кулястих скупчень або подовжених лімфатичних піхв (лімфатичні фолікули). У них проходили ексцентрично розташовані центральні артерії, від яких відходили гемокапіляри у напрямку до крайових синусів червоної пульпи. У лімфатичних фолікулах розрізнялися три нечітко розмежовані зони: періартеріальна (центр розмноження), мантійний шар і маргінальна зона (рис. 1б).

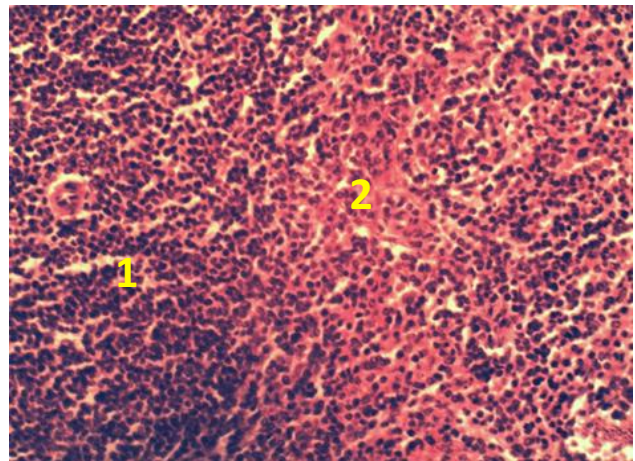
У тканині ЛВ тварин 2-ї групи на 14-ту добу спостерігалася велика кількість фолікулів II і III стадій розвитку. На II стадії в лімфа-

тичних фолікулах центри розмноження були більшими і містили більшу кількість клітин, що мітотично діляться, лімфопоетичного ряду (від 10 і більше на зрізі). Центральна частина фолікула була світлішою. На III стадії розвитку спостерігали “корону” з малих лімфоцитів навколо світлих центрів і лімфатичних фолікулів, а також деяке зниження кількості клітин, що мітотично діляться. Така будова тканини свідчила про інтенсифікацію регенеративних процесів у ЛВ (рис. 2а).

У тканині селезінки тварин 2-ї групи на 14-ту біла пульпа переважала над червоною, що свідчить про підвищену проліферативну

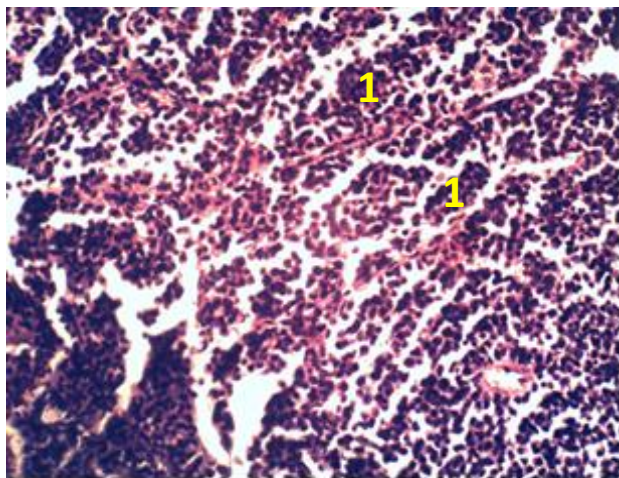


а

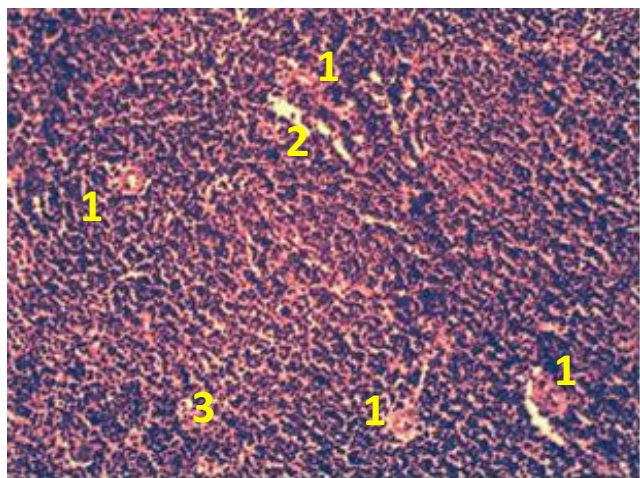


б

**Рисунок 1:** Гістологічна картина периферичних органів імунної системи інтактних шурів 1-ї групи: (а) лімфатичний вузол – фолікули паракорткальної зони (1), просвіти мозкових синусів (2),  $\times 400$ ; (б) селезінка – фолікули білої пульпи (1), червона пульпа з гемокапілярами (2),  $\times 400$ . Забарвлення гематоксиліном та еозином



а



б

**Рисунок 2:** Імунокомпетентні органи тварин 2 групи (атопічний дерматит) на 14-ту добу: (а) лімфатичний вузол – лімфатичні фолікули на II і III стадіях розвитку (1),  $\times 400$ ; (б) селезінка – переважання білої пульпи (1) над червоною (2), скупчення макрофагів (3),  $\times 200$ . Забарвлення гематоксиліном та еозином

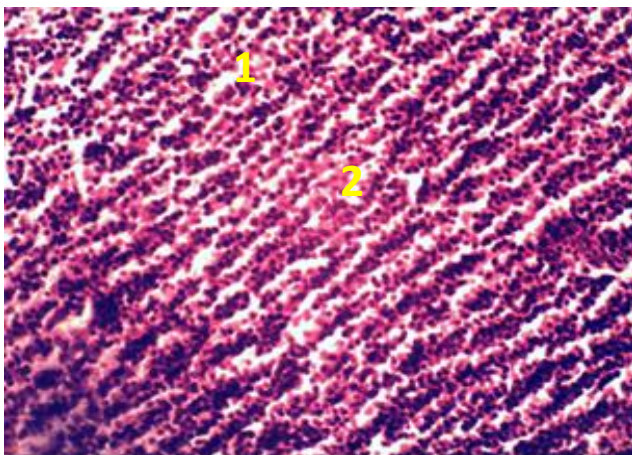
активність лімфоїдної тканини на фоні антигенного навантаження. В цих умовах у лімфатичних фолікулах добре проглядалися періартеріальні зони (центри розмноження), що займають невеликі ділянки фолікула біля артеріоли. Добре проглядався мантийний шар із шаруватим розташуванням малих Т- і В-лімфоцитів, що утворюють “корону”, розшаровану товстими ретикулярними волокнами. Крайова зона являла собою перехідну ділянку між білою та червоною пульпами. Центри розмноження фолікулів селезінки склалися з ретикулярних клітин і проліферуючих В-лімфобластів. Тут же виявлялися невеликі скупчення макрофагів. Червона пульпа займала відносно невелику площу та містила невелику кількість гемокапілярів (рис. 2б).

Гістологічне дослідження ЛВ щурів 3-ї групи (АД + преднізолон) на 14-ту добу показало переважну нормалізацію їхньої будови порівняно з 2-ю групою. Так, від сполучнотканинної капсули вглиб ЛВ відходили трабекули, що утворюють опорний каркас. Строма ЛВ складалася з ретикулярної тканини. Лімфоцити кіркової речовини ЛВ утворювали різні за формою та розмірами скупчення – вторинні вузлики чи фолікули, які подекуди зливалися в маси невизначеної форми. Усередині деяких лімфоїдних вузликів були виявлені світліші ділянки – центри розмноження, в яких розташовувалося багато великих і середніх лімфоцитів, а також макрофагів. У глибокій зоні кори ЛВ – тимусзалежної паракортикальної зони, визначалися щільні дифузні скупчення лімфоцитів –

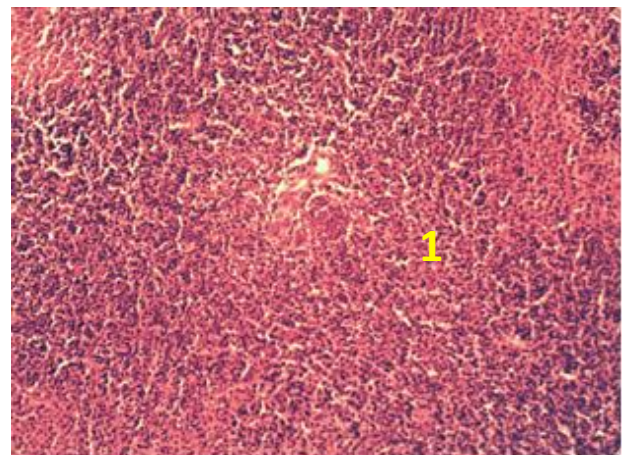
тимусзалежна паракортикальна зона. Основу паренхіми мозкової речовини ЛВ становили мозкові тяжі – скупчення малих лімфоцитів. Між фолікулами, трабекулами та мозковими тяжами були видні світліші простори – синуси (кіркові та мозкові проміжні), утворені ретикулярною тканиною, з невеликою кількістю лімфоцитів у просвіті (рис. 3а).

При гістологічному дослідженні селезінки щурів 3-ї групи до 14 діб також було виявлено тенденцію до нормалізації її будови. Трабекули селезінки, що відходять від сполучнотканинної капсули, в глибоких її частинах анастомозували між собою. Співвідношення червоної та білої пульп було зрушено у бік червоної пульпи, що складається з ретикулярної тканини з клітинними елементами крові та кровоносними судинами, переважно синусоїдного типу, що свідчило про нормалізацію кровонаповнення органу (рис. 3б). У розташованих між синусами пульпарних тяжках виявлялися осередки плазмацитогенезу. Біла пульпа селезінки розташовувалася в адвентиції її артерій у вигляді кулястих лімфатичних скупчень (фолікулів). Вони проходили центральні артерії, які розташовувалися ексцентрично. Від лімфатичних фолікулів відходили гемокапіляри до крайових синусів червоної пульпи.

На 14-ту добу в ЛВ щурів 4- і 5-ї груп спостерігалася нормалізація структурних характеристик, суттєвих відмінностей між якими не було виявлено. У корі ЛВ виявлялися лімфатичні фолікули з формуванням центрів розмноження, що складаються з молодих клітин



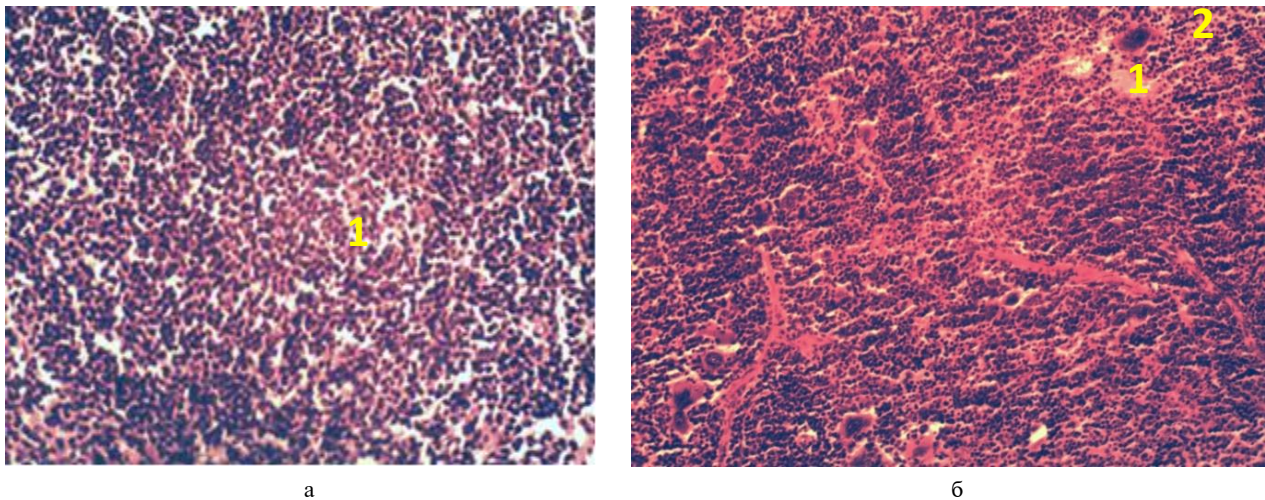
а



б

**Рисунок 3:** Імунокомпетентні органи тварин 3-ї групи (атопічний дерматит + преднізолон) на 14-ту добу: (а) лімфатичний вузол – скупчення малих лімфоцитів у мозковій речовині (1), кіркові та мозкові проміжні синуси (2),  $\times 400$ ; (б) селезінка – переважання червоної пульпи (1), нормальне кровонаповнення органа,  $\times 200$ . Забарвлення гематоксиліном та еозином





**Рисунок 4:** Імунокомпетентні органи щурів 4- та 5-ї груп на 14-ту добу після застосування кріоконсервованого та ліофілизованого лейкоконцентрату пуповинної крові людини при atopічному дерматиті: (а) лімфатичний вузол – лімфатичні фолікули з більш темними центрами розмноження (1),  $\times 400$ ; (б) селезінка – трабекули селезінки (1), округлі скупчення лімфоїдної тканини, скупчення макрофагів (2),  $\times 200$ . Забарвлення гематоксиліном та еозином

лімфоїдного ряду з базофільною цитоплазмою, в результаті чого центри ставали темнішими. Кровоносні судини та капіляри всередині мозкових тканин ЛВ були вільні від еритроцитів. Добре визначалися ретикулоендотеліальні “берегові” клітини стінки синусів (рис. 4а).

При дослідженні селезінки тварин груп 4-ї та 5-ї на 14-ту добу простежувалася чітка тенденція до нормалізації її будови. Трабекули, що відходять всередину від сполучнотканинної капсули, анастомозували між собою в її глибоких частинах. Строму пульпи селезінки становила ретикулярна тканина. Істотно, що біла пульпа переважала над червоною, підкреслюючи зміщення лімфогемопоезу в бік лімфоїдного. В адвентиції артерій, що пронизують селезінку, визначалася лімфоїдна тканина у вигляді округлих скупчень, що являють собою лімфатичні фолікули, та виявлялися скупчення макрофагів (рис. 4б).

Такі зміни цито-гістологічних характеристик селезінки та ЛВ підтверджують наявні дані [44] про системну відповідь структур лімфогемопетичного комплексу – ЛГПК на топографічно, навіть “локально” провоковані імунозапальні процеси.

У порівняльному аспекті важливо, що позитивний ефект був отриманий при застосуванні як кЛПКЛ, так і лЛПКЛ. Цей факт обґрунтовує доцільність довгострокового зберігання препаратів ПКЛ як за допомогою кріоконсервування, так і за допомогою ліофілізації

із замороженого стану. Такий біотехнологічний підхід забезпечує збереження структурно-функціональних характеристик ПКЛ, а також реалізацію нею імунокоригувального та структурнореставраційного ефекту щодо органів лімфогемопетичної системи ссавців.

### Обговорення

В експериментальній моделі АД, індукованого ДНХБ, проведено дослідження характеру та ступеня зміни цитоморфологічних характеристик органів ЛГК, показників крові й оцінено можливість їх корекції препаратами пуповинної крові, а саме лЛПКЛ і кЛПКЛ.

Існують різні експериментальні моделі АД на тваринах: спонтанно викликаний (NC/Nga миші, Flaky tail, DS-Nh тощо), моделі з використанням трансгенних тварин (з підвищеною або зниженою експресією селективних молекул), гаптен-індукований, АД HR-1 мишей, викликаний дієтою з низьким вмістом магнію та цинку, індукована вітаміном D3 модель, а також алергічні моделі (із застосуванням овалбуміна, IL-23, алергенів пилових кліщів) і комбіновані алергічні моделі АД.

Загалом вважається, що при місцевому застосуванні ДНХБ або інші хімічні речовини з подібною структурою, такі як 2,4-динітрофторбензол і пікрілхлорид, можуть формувати комплекси з різними білками шкіри з утворенням ковалентних кон'югатів і таким чином функці-

онувати як імуноген(и). ДНХБ-модифіковані макромолекули потім інтерналізуються місцевими антигенпрезентуючими клітинами, такими як клітини Лангерганса шкіри, дермальні дендритні клітини та макрофаги, процесуються та презентуються Т-клітинам для активації [45]. Хоча відомості про контактну гіперчутливість отримані в основному з мишачої моделі, шури як модель для дослідження контактної алергії також використовуються щодо вивчення залучених до патогенезу АД запальних та імунних механізмів [46]. Модель атопічного дерматиту, індукованого в шурів 2,4-динітрохлорбензолом не йде всупереч етіопатогенетичним принципам розвитку цього захворювання у людей і, як наслідок, експлуатується в багатьох експериментальних дослідженнях [47–49].

У нашому дослідженні для виявлення патологічних змін в імунній системі тварин з АД, а також імунокоригувального ефекту ПКЛ використовували:

а) показник співвідношення нейтрофілів та лімфоцитів (індекс Н/Л), який свідчить про розвиток системного запалення, що має місце при АД [16];

б) результати цито-гістологічного аналізу периферичних лімофоїдних органів – селезінки та ЛВ, що дають змогу визначити різноманітні відхилення на рівні структурної організації лімофоїдних органів та її порушення при патологічному процесі.

Продемонстровано, що, як і в роботах інших авторів [16, 35], для АД, індукованого ДНХБ, характерно порушення співвідношення формених елементів крові, а саме відношення нейтрофілів до лімфоцитів. Цей показник був підвищеним протягом усього періоду перебігу АД, який супроводжувався запальним процесом (з 3-ї по 14-ту добу). В цей період спостерігалися значний лейкоцитоз і відповідні особливості реорганізації структури ураженої області шкіри. Це узгоджується з результатами інших авторів, які в клінічних дослідженнях виявили більш високі значення відношення нейтрофілів до лімфоцитів [16]. Причому автори продемонстрували пряму кореляцію між відношенням нейтрофілів до лімфоцитів крові й інтенсивністю запального процесу [16]. Цікаво, що підвищення такого відношення спостерігається і при інших захворюваннях, асоційованих із хронічним запаленням, а саме при системному червоному вовчаку та ревматоїдному артриті [50, 51]. Y. Jiang і співавт. повідомили, що у пацієнтів з АД відношення нейтрофілів до

лімфоцитів, яке є відношенням абсолютної кількості нейтрофілів до кількості лімфоцитів у периферичній крові, мало достовірний позитивний зв'язок з індексом SCORAD, який характеризує ступінь тяжкості АД [35]. Суттєво, що зміна такого співвідношення може бути обумовлена як зниженням кількості лімфоцитів, так і підвищенням відсотка нейтрофілів у крові. Деякі автори вважають, що ступінь хоумінгу лімфоцитів у шкіру може бути дійсно достатнім, щоб викликати лімфопенію, про що свідчать випадки лімфопенії при тяжкому перебігу атопічної екземи (АД) [52, 53]. Як впливає з наших даних і даних літератури, нейтрофіліоз частіше зустрічається при важкій формі АД. Суттєво, що при високому рівні нейтрофілів підвищується індекс Н/Л [16]. Збільшення кількості нейтрофілів у крові при АД може бути пов'язане з підвищенням у крові рівня ІЛ-33. Як було показано А.І. Hueber і співавт., внутрішньодермальна ін'єкція ІЛ-33 мишам спричиняла у них псоріазоподібне нейтрофільне запалення з активацією огрядних клітин [54]. Своєю чергою огрядні клітини здатні залучати до запального процесу нейтрофіли [55]. Прозапальні цитокіни ІЛ-6 та ІЛ-8 також здатні сприяти рекрутуванню нейтрофілів у надмірній кількості [56].

Таким чином, виявлений нами перерозподіл формених елементів у крові підтверджує той факт, що запальний процес у шкірі *in situ* перетворюється з локального на системний. Локальна міжклітинна кооперація між кератиноцитами та ІКК, наприклад наївними Т-лімфоцитами, супроводжується координуючою передачею сигналів, що спричиняє до агравації патогенезу та поширення захворювання [6]. Цитокіни, що виробляються локально в шкірі, можуть досягати жирової тканини черевної порожнини через кровотік, що призводить до “спалювання” адипоцитів і вивільнення адипоцитокінів, які сприяють системному запальному каскаду [38]. Виходячи з того що запальний процес при АД має системний характер, окрім виявлених нами змін у системі крові тварин з АД, зміни також спостерігаються і в органах лімфогемопоетичної системи. Відомо, що селезінка відноситься до периферичних органів імунної системи [57] і відіграє важливу роль в імунній функції організму ссавців [58]. З огляду на це кількісна і якісна оцінка її як структурних, так і функціональних показників використовується для визначення імуномодулювальної дії ліків [59].

Згідно з отриманими нами даними, в селезінці тварин з АД біла пульпа переважала над червоною, що свідчить про подразнення лімфоїдної тканини антигенами. В попередніх дослідженнях інших авторів [60–62] також було виявлено зростання відносної площі лімфоїдної тканини білої пульпи селезінки мишей у кількох моделях АД та при інших захворюваннях шкіри. У той же час С.К. Singh і співавт. при проведенні гістологічних досліджень селезінки мишей з АД виявили на фоні збереження типової її тканинної архітектоники деяке збільшення розмірів за рахунок збільшення гемопоетичної зони червоної пульпи [15].

У наших дослідженнях привертає до себе увагу збільшення кількості та розмірів центрів розмноження лімфоїдних вузликів (фолікулів) селезінки, які склалися з ретикулярних клітин і проліферуючих В-лімфобластів. Можна припустити, що прозапальне оточення буде сприяти зміні структурно-функціональних характеристик цих клітин. IL-4 і, меншою мірою, IL-13, збільшення рівнів яких спостерігається при АД, регулюють перемикання класів імуноглобулінів і виробництво IgE плазматичними клітинами [63, 64].

М. Milovanovic і співавт. повідомляли, що IL-17A, який має патогенетичне значення при АД, сприяє виробленню IgE у В-клітинах у людей *in vitro* [65]. Підвищення рівня цього цитокіна при АД може проявлятися і стосовно структурних характеристик селезінки. S. Iida та співавт. однією з причин збільшення маси селезінки вважали відкладення в ній амілоїду як результат підвищеної продукції лімфоцитами IL-17 [4]. Не виключено, що подібні зміни IL-17A буде викликати і в інших органах. Своєю чергою це може бути поясненням підвищеного ризику розвитку дименції у пацієнтів з АД [66]. Збільшення маси селезінки при АД також може бути результатом наявності в селезінці огрядних клітин, які здатні активувати матриксні металопротеїнази шляхом індукції відкладення колагену [67].

Що стосується ЛВ, то при АД в них ми спостерігали велику кількість фолікулів II і III стадій розвитку, що може свідчити про інтенсифікацію регенеративних процесів у ЛВ. Тобто збільшення кількості клітин у ЛВ, яке спостерігали і низка інших дослідників при експериментальному АД [68, 69], не тільки є результатом міграції в ЛВ імунокомпетентних клітин [8–10], але і пов'язане з активацією в ЛВ проліферативних процесів.

Одним із головних завдань терапевтичних підходів, спрямованих на мінімізацію клінічних проявів АД, є стабілізація функції ІС з метою зниження вираженості перебігу запальних реакцій. Пуповинна кров є по суті частиною крові плоду. Пуповинна кров та її компоненти активно використовуються в сучасних медико-біотехнологічних програмах завдяки своїм лікувальним властивостям [70]. Ефективність трансфузії ПКЛ вивчали при багатьох захворюваннях, таких як гострий гнійний перитоніт, аутоімунні захворювання, рак, ниркова недостатність, діабет й інфекційні захворювання [71–74].

Оскільки ПКЛ слабо імуногенна, дуже часто вивчення її терапевтичних властивостей проводять на експериментальних тваринах з індукцією тієї чи іншої патології [75, 76]. Ризик імунного відторгнення є низьким при трансплантації ПКЛ, оскільки рівень експресії антигена HLA на мононуклеарах ПКЛ залишається низьким порівняно з клітинами, отриманими в дорослих, такими як МСК кісткового мозку [77]. Можливість використання пуповинної крові людини для клінічної та експериментальної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин була запропонована в 1972 р. [78]. Низька імуногенність клітин ПКЛ була показана в роботі J. Chen і його колег, у якій автори внутрішньовенно ввели ці клітини щурам із метою лікування ішемічного інсульту [79]. Через два тижні після введення мононуклеарів ПКЛ тваринам автори спостерігали їх наявність у головному мозку, що підтверджувало відсутність їх відторгнення організмом у цілому та здатність мігрувати в тканини патологічного осередку [80]. Автори продемонстрували терапевтичну ефективність застосування МСК пуповинної крові людини при АД від помірної до тяжкої форми. J.Y. Song і співавт. показали здатність екстракту, отриманого з МСК пуповинної крові, зменшувати клінічний прояв дерматиту і пригнічувати вироблення запальних цитокінів у шкірі мишей з АД [81]. На наш погляд, сумісне застосування ядровмісних клітин і плазми ПКЛ буде мати більш комплексний клінічний ефект, ніж застосування мезенхімальних клітин пуповинної крові людини та препаратів на їх основі. Раніше нами був показаний високий коригувальний ефект лейкоконцентрату ПКЛ відносно основних патогенетично значущих компонентів імунної системи організму тварин, що зумовлюють маніфестацію АД [2]. Це може бути пов'язано з широтою їхнього функціонального потенціалу, включаючи стимулювальний

вплив на репаративні процеси вражених клітин і тканин організму, а також імунокоригувальною дією [82, 83]. Дійсно, сироватка і плазма ПКЛ містять значну кількість імуноотропних та імунокоригувальних компонентів різної спрямованості, включаючи широкий спектр гормонів, ростових факторів, гемопоетинів і адаптогенів, опіюйдних пептидів – ендорфінів, енкефалінів, мікроелементів, вітамінів тощо [84]. Усі вони мають потужний регуляторний потенціал [85]. Найважливішим при цьому є той факт, що ступінь його реалізації істотно залежить від ступеня і характеру порушення фізіологічного стану організму. Іншими словами, потрапляючи в організм як терапевтичний засіб, цей біоматеріал буде відповідати “на запит ситуації” [27]. Тобто за будь-якої конкретної патології ця відповідь буде “специфічною”. При АД додатковим передбачуваним механізмом терапевтичної ефективності ПКЛ може бути активація “антиоксидантного каскаду” з відповідним позитивним результатом [86]. Одним із основних і важливих механізмів, що погіршує структуру та функцію епідермісу, є пошкодження кератиноцитів за рахунок високого рівня внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК) [87]. При цьому запальний процес, який супроводжується істотним підвищенням рівня АФК, здатен модифікувати структуру власного білка, роблячи його імуногенним [88]. У цих умовах формується типова картина розвитку аутоімунного процесу, що маніфестується таким захворюванням, як псоріаз [89]. З урахуванням такого механізму розвитку для лікування АД і захисту шкіри від пошкоджувального впливу АФК були запропоновані антиоксиданти. Слід зазначити, що антиоксидантну дію терапії ПКЛ спостерігали на різних моделях захворювань [90, 91], що, однак, не виключає необхідності подальших досліджень у цьому напрямі.

Повідомлялося, що терапія на основі використання стовбурових клітин ПКЛ пригнічує надмірні запальні реакції за різних аутоімунних і пов'язаних із запаленням захворювань, включаючи ішемічний інсульт, псоріатичний артрит і діабет I типу тощо [22, 23, 92, 93].

Імуномодулювальній дії ПКЛ завдячує своїм компонентним складом, включаючи різні форми ядерних клітин і гуморальних факторів із протизапальними властивостями, наприклад кателецідин, липакалін, дефенцін, ІЛ-10 тощо [94]. Вище згадувалося про здатність МСК реалізувати імуносупресивні ефекти, до того ж застосування МСК, отриманих із ПКЛ, полегшує

симптоматику АД [81]. ЛПКЛ також збагачений субпопуляцією регуляторних Т- (Tregs) і В-клітин (Bregs), які секретують протизапальний інтерлейкін-10 (IL-10), здатний блокувати імунну відповідь Т-клітин [30, 95]. Водночас ПКЛ містить ДК із більш незрілим фенотипом (tolDK) і зниженою здатністю вивільняти запальні ФНП- $\alpha$  та ІФН- $\alpha$  порівняно з ДК, що походять із периферичної крові дорослої людини [96]. Більше того, вони мали підвищену здатність індукувати диференціювання Tregs-супресорів.

Використання ЛПКЛ, що підлягали різним видам впливу ультранизьких температур – кЛПКЛ і лЛПКЛ, у комплексному лікуванні тварин, хворих на АД, корегувало порушені показники лейкоцитарної ланки периферійної крові, а також цитоморфологічні характеристики органів ЛГК. При цьому кЛПКЛ трохи запізнюється в прояві ефекту порівняно з лЛПКЛ. Це може бути пов'язано з більш високим вмістом Tregs у ліофілізованому біоматеріалі, ніж у кріоконсервованому лейкоконцентраті [30]. Проте ці два препарати ПКЛ мають суттєві переваги порівняно з терапією глюкокортикоїдами.

Виявлена здатність ЛПКЛ до зменшення дисрегуляторного стану органів ЛГК при АД є оригінальною і раніше не була описана в науковій літературі. Коригувальний вплив кріоконсервованих і ліофілізованих форм ЛПКЛ на цитоморфологічні характеристики органів ЛГК щурів з АД ми розглядаємо як доказ патогенетично обґрунтованої й таргетно спрямованої схеми експериментального лікування патології, в основі якої лежить дисрегуляторний стан ІС. Здатність цих клітин продукувати ті чи інші медіатори з регуляторно-лікувальним ефектом відносно АД є багатопрофільною і обумовлюється рівнем експансії імунозапального процесу в організмі, про що було сказано вище. Різноманіття механізмів впливу ЛПКЛ на різні ланки ІС, що причетні до патогенезу АД, забезпечувало відновлення структурно-функціональної організації периферичних органів ЛГК. Отримані нами результати довели, що такого роду і рівня активність властива саме кЛПКЛ і лЛПКЛ, оскільки після застосування глюкокортикоїдів лікувальний (коригуючий) ефект проявлявся значно меншою мірою.

Відомо, що ступінь впливу факторів кріоконсервування на біологічний об'єкт визначається умовами реалізації процесу заморожування-відігрівання [97]. Незважаючи на те що кріоконсервування і ліофілізація є “агресивними” відносно структурних і функціональних харак-

теристик клітин, ці процеси залишаються до теперішнього часу найбільш оптимальними методичними підходами до їх зберігання. Не є винятком і пуповинна кров, збереження компонентів якої забезпечують як кріоконсервування, так і ліофілізація [32, 37]. Технологічно процеси ліофілізації та кріоконсервування мають певні особливості і, відповідно, різняться за характером впливу на біооб'єкт [30, 98]. При цьому в обох випадках має місце використання ультранизьких температур. У попередніх роботах було показано, що кріоконсервовані або ліофілізовані клітини пуповинної крові за різних патологій реалізують лікувальний ефект різною мірою [2, 22]. Тобто різний вихідний стан організму з тією чи іншою патологією по-різному сприймає лікувальний вплив як кріоконсервованих, так і ліофілізованих клітин і тканин. У той же час при патології, яка експлуатується в нашій роботі (АД), стосовно певних показників показана відносна схожість коригувальної ефективності лЛПКЛ і кЛПКЛ. Односпрямованість дії лЛПКЛ і кЛПКЛ спостерігали й при лікуванні ішемічного інсульту в щурів [ 22].

Суттєво, що інтегральний лікувальний ефект обох видів біоматеріалу мав місце за різної життєздатності ліофілізованих (~60 %) і кріоконсервованих клітин (~80 %). Поясненням може бути здатність ліофілізації здійснювати перерозподіл клітинного складу з підвищенням відносної кількості Tregs-клітин із фенотипом  $CD4^+CD25^{high}$ , які мають властивість інгібувати запальний процес [99]. Не можна виключати, що терапевтичний ефект введеного ліофілізованого матеріалу може бути реалізований завдяки біологічно активним компонентам загиблих клітин. Про це свідчать результати дослідження J.Y. Song і співавт. [81], згідно з якими використання при АД екстракту, отриманого з МСК, пригнічувало клінічний прояв цієї патології, а також інгібувало продукцію запальних цитокінів у шкірі мишей з АД.

Обґрунтованість використання того чи іншого методу консервування повинно базуватися як на здатності забезпечувати схоронність біоматеріалу, так і на вирішенні економічних питань. Проблемною стороною зберігання клітин ПКЛ в умовах низькотемпературного банку за ультранизьких температур ( $-196^\circ$ ) є необхідність використання дороговартісного обладнання та рідкого азоту. При зберіганні біоматеріалу в цих умовах не виключені стрибки температури, ризику перехресної контамінації тощо. Крім того, в умовах воєнного часу дещо

проблемною є логістика рідкого азоту в низькотемпературні банки. В цьому сенсі, ліофілізація може стати більш перспективним методом довгострокового зберігання біоматеріалу. Крім того, ліофілізований біоматеріал адаптований до умов збереження за температур побутових холодильників ( $4-8^\circ\text{C}$ ), що може спростити зберігання і транспортування зразків.

Отримані експериментальні результати є обґрунтуванням доцільності подальшого втілення і вивчення в клінічній практиці ефективності застосування ЛПКЛ для лікування пацієнтів з АД.

### Висновки

При ДНХБ, індукованому АД, у крові відбувається виражений лейкоцитоз у всі строки спостереження. Такого роду зміни в крові супроводжуються зростанням індексу Н/Л, що вказує на запальну природу АД.

У тварин з АД при гістологічному аналізі ЛВ і селезінки виявлені значні зміни цитоморфологічних показників цих органів. У лімфатичних вузлах спостерігали велику кількість фолікулів II та III стадій розвитку. В селезінці біла пульпа переважала над червоною, що свідчить про підвищену проліферативну активність лімфоїдної тканини на фоні антигенного навантаження. Червона пульпа займала відносно невелику площу та містила невелику кількість гемокапілярів.

При використанні кріоконсервованого та ліофілізованого ЛПКЛ у тварин з АД спостерігали значне зниження ступеня прояву запального процесу, що свідчить про багатогранність механізму дії ЛПКЛ, включаючи імуномодульований ефект. Суттєвим є той факт, що протизапальна активність обох форм ЛПКЛ перевищує дію глюкокортикоїдів, підкреслюючи багатогранність їхньої регуляторної та імунокоригувальної активності

Отримані результати відкривають перспективи й необхідність подальших досліджень у цьому напрямі з метою розширення експериментальної бази й удосконалення клінічного застосування кЛПКЛ і лЛПКЛ з метою мінімізації перебігу АД. Видається перспективним вивчення антиоксидантних властивостей пуповинної крові на моделі АД.

### Розкриття інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів до розкриття.

## References

- [1] Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 20;21(8):2867. DOI: 10.3390/ijms21082867
- [2] Koval HK, Lutsenko OD, Bondarovich MO, Ostankov MV, Goltsev AM. The role of cord blood in the regulation of the cellular and humoral link of immunity in experimental atopic dermatitis. *Innov Biosyst Bioeng.* 2021;5(3):167-77. DOI: 10.20535/ibb.2021.5.3.238976
- [3] Yun MY, Park KS, Yoon KA, Choi HJ. Leaf extracts of *Nandina domestica* Thunb ameliorate atopic dermatitis in NC/Nga mice treated with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB). *AIMS Bioeng.* 2021;8(2):154-64. DOI: 10.3934/bioeng.2021014
- [4] Iida S, Nakanishi T, Momose F, Ichishi M, Mizutani K, Matsushima Y, et al. IL-17A is the critical cytokine for liver and spleen amyloidosis in inflammatory skin disease. *Int J Mol Sci.* 2022 May 20;23(10):5726. DOI: 10.3390/ijms23105726
- [5] Meng Y, Liu Z, Zhai C, Di T, Zhang L, Zhang L, et al. Paeonol inhibits the development of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-induced atopic dermatitis via mast and T cells in BALB/c mice. *Mol Med Rep.* 2019 Apr;19(4):3217-29. DOI: 10.3892/mmr.2019.9985
- [6] Zhou S, Li Q, Wu H, Lu Q. The pathogenic role of innate lymphoid cells in autoimmune-related and inflammatory skin diseases. *Cell Mol Immunol.* 2020 Apr;17(4):335-46. DOI: 10.1038/s41423-020-0399-6
- [7] Kim HS, Lee JH, Roh KH, Jun HJ, Kang KS, Kim TY. Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: phase I/IIa studies. *Stem Cells.* 2017 Jan;35(1):248-55. DOI: 10.1002/stem.2401
- [8] Rustemeyer T. Immunological mechanisms in allergic contact dermatitis. *Curr Treat Opt Allergy.* 2022 Jun;9(2):67-75. DOI: 10.1007/s40521-022-00299-1
- [9] Leyva-Castillo JM, Geha RS. Cutaneous type 2 innate lymphoid cells come in distinct flavors. *JID Innov.* 2021 Sep 23;1(3):100059. DOI: 10.1016/j.xjidi.2021.100059
- [10] Castillo-Gonzalez R, Cibrian D, Sanchez-Madrid F. Dissecting the complexity of  $\gamma\delta$  T-cell subsets in skin homeostasis, inflammation, and malignancy. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Jun;147(6):2030-42. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.11.023
- [11] Moon GH, Lee Y, Kim EK, Chung KH, Lee KJ, An JH. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of asiatic acid in a DNCB-induced atopic dermatitis animal model. *Nutrients.* 2021 Jul 17;13(7):2448. DOI: 10.3390/nu13072448
- [12] Zhi W, Li C, Zhang H, Zhao Y, Zong S, Liu Q, et al. Suppresses atopic dermatitis involved in multitarget mechanism using experimental and network pharmacology analysis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022 May 18;2022:8441938. DOI: 10.1155/2022/8441938
- [13] Kim DY, Jung DH, Song EJ, Jang AR, Park JY, Ahn JH, et al. D-galactose intake alleviates atopic dermatitis in mice by modulating intestinal microbiota. *Front Nutr.* 2022 Jun 21;9:895837. DOI: 10.3389/fnut.2022.895837
- [14] Choi EJ, Ryu YB, Tang Y, Kim BR, Lee WS, Debnath T, et al. Effect of cinnamamides on atopic dermatitis through regulation of IL-4 in CD4+ cells. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2019 Dec;34(1):613-9. DOI: 10.1080/14756366.2019.1569647
- [15] Singh CK, Mintie CA, Ndiaye MA, Chhabra G, Roy S, Sullivan R, et al. Protective effects of dietary grape against atopic dermatitis-like skin lesions in NC/NgaTndCrlj mice. *Front Immunol.* 2023 Jan 19;13:1051472. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1051472
- [16] Inokuchi-Sakata S, Ishiujji Y, Katsuta M, Kharma B, Yasuda KI, Tominaga M, et al. Role of eosinophil relative count and neutrophil-to-lymphocyte ratio in the assessment of severity of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2021 Jul 7;101(7):adv00491. DOI: 10.2340/00015555-3838
- [17] Gayret OB, Nacaroplu HT, Erol M, Sener A. Neutrophil-lymphocyte ratio and the platelet parameters as biomarkers of atopic dermatitis severity in children. *Iran Red Crescent Med J.* 2019;21(7):e91594. DOI: 10.5812/ircmj.91594
- [18] Tsutsayeva AO, Grischenko VI, Kudokotseva OV, Prokopyuk OS. Procurement, cryopreservation and clinical application of hematopoietic cells of human cord blood. *Kharkiv;* 2000. 18 p.
- [19] Wang J, Metheny L. Umbilical cord blood derived cellular therapy: advances in clinical development. *Front Oncol.* 2023 May 18;13:1167266. DOI: 10.3389/fonc.2023.1167266
- [20] Srivastava AK, Prabhakara KS, Kota DJ, Bedi SS, Triolo F, Brown KS, et al. Human umbilical cord blood cells restore vascular integrity in injured rat brain and modulate inflammation in vitro. *Regen Med.* 2019 May;14(4):295-307. DOI: 10.2217/rme-2018-0106
- [21] Goltsev A, Kalynychenko T. Umbilical cord blood stem cells: clinical application of allogeneic material, problems and perspectives of banking. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2020;30(3):213-35. DOI: 10.15407/cryo30.03.213
- [22] Lebedinets V, Ostankova L, Bondarovich M, Lutsenko O, Lebedinets D, Grisha I, et al. Lyophilized human cord blood leukoconcentrate to treat brain ischemia in rats. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2022;32(1):44-57. DOI: 10.15407/cryo32.01.044

- [23] Lebedynets V, Ostankova L, Bondarovykh M, Lebedynets D, Ostankov M, Lutsenko O, et al. Lyophilized human cord blood leucoconcentrate affects immune system of rats with ischemic stroke. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2022;32(4):277-91. DOI: 10.15407/cryo32.04.277
- [24] Daltro SRT, Meira CS, Santos IP, Ribeiro Dos Santos R, Soares MBP. Mesenchymal stem cells and atopic dermatitis: a review. *Front Cell Dev Biol.* 2020 May 14;8:326. DOI: 10.3389/fcell.2020.00326
- [25] Trier AM, Mack MR, Fredman A, Tamari M, Ver Heul AM, Zhao Y, et al. IL-33 signaling in sensory neurons promotes dry skin itch. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Apr;149(4):1473-80.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2021.09.014
- [26] Martínez-García MÁ, Moncayo S, Insenser M, Álvarez-Blasco F, Luque-Ramírez M, Escobar-Morreale HF. metabolic cytokines at fasting and during macronutrient challenges: influence of obesity, female androgen excess and sex. *Nutrients.* 2019 Oct 24;11(11):2566. DOI: 10.3390/nu11112566
- [27] Goltsev AN, Babenko NN. Stipulation of the possibility to use embryonic neuronal cells when treating organospecific autoimmune diseases. *Probl Cryobiol.* 2003;2:49-61.
- [28] Steinhoff M, Ahmad F, Pandey A, Datsi A, Al Hammadi A, Al-Khawaga S, et al. Neuroimmune communication regulating pruritus in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Jun;149(6):1875-98. DOI: 10.1016/j.jaci.2022.03.010
- [29] Jung N, Kong T, Yu Y, Park H, Lee E, Yoo S, et al. Immunomodulatory effect of epidermal growth factor secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on atopic dermatitis. *Int J Stem Cells.* 2022 Aug 30;15(3):311-23. DOI: 10.15283/ijsc21173
- [30] Koval GK, Lutsenko OD, Grisha IG, Sokil LV, Bondarovykh MO, Ostankov MV, et al. Impact of lyophilisation on integrity of structural and functional characteristics of human cord blood leukoncentrate. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2019; 29(4), 332-43. DOI: 10.15407/cryo29.04.332
- [31] Hare J, DeLeon PG, Pool K, Reioux D, Fontenot M, Champlin RE, et al. Optimal umbilical cord blood collection, processing and cryopreservation methods for sustained public cord blood banking. *Cytotherapy.* 2021 Nov;23(11):1029-35. DOI: 10.1016/j.jcyt.2021.05.004.
- [32] Goltsev AM, Mosiichuk VV, Goltsev KA, Tarannik HK, Sokil LV, Ostankov MV, et al., inventors; IPC&C NAS of Ukraine, assignee. Method for lyophilization of cord blood leucoconcentrate. Ukraine patent 117780U. 2017 July 10.
- [33] Gulevsky AK, Shenyavsky II, Nikolchenko AYU. [Cord blood and its components: biological features, clinical application, storage at cryobanks]. Kharkiv: Rider; 2017. 344 p. Russian.
- [34] Lipina OV, Musatova IB, Trifonov VY, Prokopyuk OS. Preparation of human cord blood serum: clinical application. *World Med Biol.* 2009;4:36-8.
- [35] Goltsev AN, Ostankova LV, Ostankov MV, Yampolska YY, Sokil LV, Grisha IG, et al. Cryopreserved human cord blood leucoconcentrate as a source of stem hematopoietic cells for cell therapy. *Klinichna Immunolohiia Alerholohiia Infektolohiia.* 2019;2:71.
- [36] Kawasaki-Oyama RS, Braile DM, Caldas HC, Leal JC, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC, et al. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque [Blood mesenchymal stem cell culture from the umbilical cord with and without Ficoll-Paque density gradient method]. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2008 Jan-Mar;23(1):29-34. Portuguese. DOI: 10.1590/s0102-76382008000100006
- [37] Tsutsaieva AO, Hryshenko VI, Kudokotseva OV, Schehlov AV, Tupchiienko HS, Prokopiuk OS, inventors; IPC&C NAS of Ukraine, assignee. Method for cryopreservation of hemopoietic cells of cord blood. Ukraine patent 31847A. 2000 Dec 15.
- [38] Zalkan PM, Ievleva EA. Experimental model of allergic dermatitis. In: Dolgov AP, Raben AS, Antonev AA, editors. *Topical issues of professional dermatology.* Moscow: Meditsyna; 1965. p. 106-12.
- [39] Matsumoto K, Mizukoshi K, Oyobikawa M, Ohshima H, Tagami H. Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Res Technol.* 2004 May;10(2):122-9. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2004.00062.x
- [40] Jiang Y, Ma W. Assessment of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in atopic dermatitis patients. *Med Sci Monit.* 2017 Mar 17;23:1340-6. DOI: 10.12659/msm.900212
- [41] Merkulov GA. Course of pathological and histological techniques. Leningrad: Medgiz; 1961. 343 p.
- [42] Koval AK, Bondarovykh NA, Ostankova LV, Yampolskaya EE, Grisha IG, Ostankov MV, et al. Influence of lyophilized cord blood leucoconcentrate on pathomorphological changes in the skin in experimental atopic dermatitis. In: *Proceedings of 110th Anniversary of the birthday of the Corresponding Member of the Academy of Medical Sciences of the SRSR Professor MN Zayka;* 2018 Jul 11-12; Poltava. p. 44.
- [43] Makalish TP. Morphofunctional features of the spleen under influence of factors of various origin. *Tavrisheskij Mediko Biologicheskij Vestnik.* 2013;16(1):265-9.

- [44] Mizutani K, Shirakami E, Ichishi M, Matsushima Y, Umaoka A, Okada K, et al. Systemic dermatitis model mice exhibit atrophy of visceral adipose tissue and increase stromal cells via skin-derived inflammatory cytokines. *Int J Mol Sci.* 2020 May 9;21(9):3367. DOI: 10.3390/ijms21093367
- [45] Zhang EY, Chen AY, Zhu BT. Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: role of specific antibodies in pathogenesis. *PLoS One.* 2009 Nov 5;4(11):e7703. DOI: 10.1371/journal.pone.0007703
- [46] Popov A, Mirkov I, Kataranovski M. Inflammatory and immune mechanisms in contact hypersensitivity (CHS) in rats. *Immunol Res.* 2012 Apr;52(1-2):127-32. DOI: 10.1007/s12026-012-8277-7
- [47] Huang C, Li S, Guo W, Zhang Z, Meng X, Li X, et al. *Cymbaria daurica* L.: A Mongolian herbal medicine for treating eczema via natural killer cell-mediated cytotoxicity pathway. *J Ethnopharmacol.* 2023 May 23;308:116246. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116246
- [48] Zhou XL, Chen LL, Wang JF. Study on the antipruritic mechanism of *Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum schini-folium* volatile oil on chronic eczema based on H1R and PAR-2 mediated GRPR pathway. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2022 Jul 1;50(4):83-96. DOI: 10.15586/aei.v50i4.486
- [49] Aierken K, Luo Y, Maiwulanjiang M, Wu T, Aisa HA. The suppressive effect of mamiran cream on atopic dermatitis-like skin lesions in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021 Nov 30;2021:2854238. DOI: 10.1155/2021/2854238
- [50] Cho J, Liang S, Lim SHH, Lateef A, Tay SH, Mak A. Neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio reflect disease activity and flares in patients with systemic lupus erythematosus - A prospective study. *Joint Bone Spine.* 2022 Jul;89(4):105342. DOI: 10.1016/j.jbspin.2022.105342
- [51] Erre GL, Paliogiannis P, Castagna F, Mangoni AA, Carru C, Passiu G, et al. Meta-analysis of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio in rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Invest.* 2019 Jan;49(1):e13037. DOI: 10.1111/eci.13037
- [52] Bakker DS, Garritsen FM, Leavis HL, van der Schaft J, Bruijnzeel-Koomen CAFM, van den Broek MPH, et al. Lymphopenia in atopic dermatitis patients treated with oral immunosuppressive drugs. *J Dermatolog Treat.* 2018 Nov;29(7):682-7. DOI: 10.1080/09546634.2018.1451619
- [53] Chan G, Wee CP, Ong PY. Complete blood count profiles in children with eczema herpeticum. *Pediatr Allergy Immunol.* 2022 Jan;33(1):e13648. DOI: 10.1111/pai.13648
- [54] Hueber AJ, Alves-Filho JC, Asquith DL, Michels C, Millar NL, Reilly JH, et al. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur J Immunol.* 2011 Aug;41(8):2229-37. DOI: 10.1002/eji.201041360
- [55] Sahu SK, Mittal SK, Foulsham W, Li M, Sangwan VS, Chauhan SK. Mast cells initiate the recruitment of neutrophils following ocular surface injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Apr 1;59(5):1732-40. DOI: 10.1167/iovs.17-23398
- [56] Vilotic A, Nacka-Aleksic M, Pirkovic A, Bojic-Trbojevic Z, Dekanski D, Jovanovic Krivokuca M. IL-6 and IL-8: an overview of their roles in healthy and pathological pregnancies. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 23;23(23):14574. DOI: 10.3390/ijms232314574
- [57] Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019 Mar 1;4(33):eaau6085. DOI: 10.1126/sciimmunol.aau6085
- [58] Crane GM, Liu YC, Chadburn A. Spleen: Development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Semin Diagn Pathol.* 2021 Mar;38(2):112-24. DOI: 10.1053/j.semdp.2020.06.003
- [59] Suttorp M, Classen CF. Splenomegaly in children and adolescents. *Front Pediatr.* 2021 Jul 9;9:704635. DOI: 10.3389/fped.2021.704635
- [60] Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med.* 2005 Aug 15;202(4):541-9. DOI: 10.1084/jem.20041503
- [61] Kastenmayer RJ, Fain MA, Perdue KA. A retrospective study of idiopathic ulcerative dermatitis in mice with a C57BL/6 background. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2006 Nov;45(6):8-12.
- [62] Zhang S, Liu X, Mei L, Wang H, Fang F. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice. *BMC Complement Altern Med.* 2016 Aug 31;16(1):334. DOI: 10.1186/s12906-016-1325-4
- [63] Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med.* 1991 Mar 1;173(3):747-50. DOI: 10.1084/jem.173.3.747
- [64] Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3730-4. DOI: 10.1073/pnas.90.8.3730
- [65] Milovanovic M, Drozdenko G, Weise C, Babina M, Worm M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol.* 2010 Nov;130(11):2621-8. DOI: 10.1038/jid.2010.175



- [66] Pan TL, Bai YM, Cheng CM, Tsai SJ, Tsai CF, Su TP, et al. Atopic dermatitis and dementia risk: A nationwide longitudinal study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021 Aug;127(2):200-5. DOI: 10.1016/j.anai.2021.03.001
- [67] Piera L, Olczak S, Kun T, Galdyszynska M, Ciosek J, Szymanski J, et al. Disruption of histamine/H3 receptor signal reduces collagen deposition in cultures scar myofibroblasts. *J Physiol Pharmacol.* 2019 Apr;70(2). DOI: 10.26402/jpp.2019.2.07
- [68] Hyung KE, Kim SJ, Jang YW, Lee DK, Hyun KH, Moon BS, et al. Therapeutic effects of orally administered CJLP55 for atopic dermatitis via the regulation of immune response. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017 May;21(3):335-43. DOI: 10.4196/kjpp.2017.21.3.335
- [69] Yagi R, Nagai H, Iigo Y, Akimoto T, Arai T, Kubo M. Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):2020-7. DOI: 10.4049/jimmunol.168.4.2020
- [70] Orlando N, Pellegrino C, Valentini CG, Bianchi M, Barbagallo O, Sparnacci S, et al. Umbilical cord blood: Current uses for transfusion and regenerative medicine. *Transfus Apher Sci.* 2020 Oct;59(5):102952. DOI: 10.1016/j.transci.2020.102952
- [71] Bianchi M, Papacci P, Valentini CG, Barbagallo O, Vento G, Teofili L. Umbilical cord blood as a source for red-blood-cell transfusion in neonatology: a systematic review. *Vox Sang.* 2018 Nov;113(8):713-25. DOI: 10.1111/vox.12720
- [72] Goltsev KA, Ovsyannikov SY, Kozhina OY, Ostankov MV, Goltsev AN. Correction of metabolic impairments with 'Cryo-cell-Hemocord' cord blood preparation during acute purulent peritonitis. *Probl Cryobiol.* 2011;21(1):96-103.
- [73] Kozhina OY, Ostankov MV, Ostankova LV, Bondarovich NA, Goltsev AN. Effect of cryopreserved cord blood on activity of alveolar macrophages in experimental model of infl uenza. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2013;23(3):247-59.
- [74] Stetsyshyn VG, Ostankova LV, Gaevska YA, Bondarovich NA, Ostankov MV, Goltsev AN. [Immune correcting of genital herpes with cryopreserved cord blood (experimental study)]. *Medysyna Sogodni i Zavtra.* 2015;69(4):56-62.
- [75] Yasuhara T, Hara K, Maki M, Xu L, Yu G, Ali MM, et al. Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med.* 2010 Apr;14(4):914-21. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00671.x
- [76] Srivastava AK, Prabhakara KS, Kota DJ, Bedi SS, Triolo F, Brown KS, et al. Human umbilical cord blood cells restore vascular integrity in injured rat brain and modulate inflammation in vitro. *Regen Med.* 2019 May;14(4):295-307. DOI: 10.2217/rme-2018-0106
- [77] Penny TR, Sutherland AE, Mihelakis JG, Paton MCB, Pham Y, Lee J, et al. Human umbilical cord therapy improves long-term behavioral outcomes following neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Front Physiol.* 2019 Mar 22;10:283. DOI: 10.3389/fphys.2019.00283
- [78] Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon (1918).* 1972 Mar;99(3):276-80.
- [79] Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke.* 2001 Nov;32(11):2682-8. DOI: 10.1161/hs1101.098367
- [80] Kim HS, Lee JH, Roh KH, Jun HJ, Kang KS, Kim TY. Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: Phase I/IIa studies. *Stem Cells.* 2017 Jan;35(1):248-55. DOI: 10.1002/stem.2401
- [81] Song JY, Kang HJ, Ju HM, Park A, Park H, Hong JS, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts ameliorate atopic dermatitis in mice by reducing the T cell responses. *Sci Rep.* 2019 Apr 29;9(1):6623. DOI: 10.1038/s41598-019-42964-7
- [82] Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front Neurosci.* 2013 Oct 24;7:194. DOI: 10.3389/fnins.2013.00194
- [83] Svidko KM, Bondarovich NA, Ostankov MV, Dyomin YuA, Goltsev AN Influence of cryopreserved cells of human cord blood on rabbit's blood in limbal stem cells deficiency. *Exp Clin Med.* 2014;62(1):36-43.
- [84] Mirazi N, Baharvand F, Moghadasali R, Nourian A, Hosseini A. Treatment with human umbilical cord blood serum in a gentamicin-induced nephrotoxicity model in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2022 Sep;45(5):2262-68. DOI: 10.1080/01480545.2021.1926475
- [85] Maharajan N, Cho GW, Choi JH, Jang CH. Regenerative therapy using umbilical cord serum. *In Vivo.* 2021;35(2):699-705. DOI: 10.21873/invivo.12310
- [86] Arien-Zakay H, Lecht S, Bercu MM, Tabakman R, Kohen R, Galski H, et al. Neuroprotection by cord blood neural progenitors involves antioxidants, neurotrophic and angiogenic factors. *Exp Neurol.* 2009 Mar;216(1):83-94. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.11.006
- [87] Ji H, Li XK. Oxidative stress in atopic dermatitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2721469. DOI: 10.1155/2016/2721469
- [88] Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev.* 2008 Jul;7(7):567-73. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.04.019

- [89] Ivert LU, Wahlgren CF, Lindeluf B, Dal H, Bradley M, Johansson EK. Association between atopic dermatitis and autoimmune diseases: a population-based case-control study. *Br J Dermatol*. 2021 Aug;185(2):335-42. DOI: 10.1111/bjd.19624
- [90] Goltsev KA, Ovsyannikov SY, Kozhina OY, Ostankov MV, Goltsev AN. Correction of metabolic impairments with "Cryo-cell-Hemocord" cord blood preparation during acute purulent peritonitis. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2011;21(1):96-103.
- [91] Lebedinets VV, Ovsyannikov SY, Ostankov MV, Bondarovich NA, Ostankova LV, Goltsev AN. Correction of metabolism disorders by cryopreserved cord blood administration in experimental model of ischemic stroke. *Belgorod State Univ Scic Bull Med Pharm*. 2015;(16):156-62.
- [92] Coutts M, Soriano R, Naidoo R, Torfi H. Umbilical cord blood stem cell treatment for a patient with psoriatic arthritis. *World J Stem Cells*. 2017 Dec 26;9(12):235-40. DOI: 10.4252/wjsc.v9.i12.235
- [93] He B, Li X, Yu H, Zhou Z. Therapeutic potential of umbilical cord blood cells for type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2015 Nov;7(6):762-73. DOI: 10.1111/1753-0407.12286
- [94] Romanov YA, Vtorushina VV, Dugina TN, Romanov AY, Petrova NV. Human umbilical cord blood serum/plasma: cytokine profile and prospective application in regenerative medicine. *Bull Exp Biol Med*. 2019 Nov;168(1):173-7. DOI: 10.1007/s10517-019-04670-2
- [95] Sarvaria A, Basar R, Mehta RS, Shaim H, Muftuoglu M, Khoder A, et al. IL-10<sup>+</sup> regulatory B cells are enriched in cord blood and may protect against cGVHD after cord blood transplantation. *Blood*. 2016 Sep 8;128(10):1346-61. DOI: 10.1182/blood-2016-01-695122
- [96] Encabo A, Solves P, Carbonell-Uberos F, Micana MD. The functional immaturity of dendritic cells can be relevant to increased tolerance associated with cord blood transplantation. *Transfusion*. 2007 Feb;47(2):272-9. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01103.x
- [97] Ostankov MV, Bondarovich NA, Rassokha IV, Goltsev AN. Character of changes of structural and functional parameters of fetal liver cells after cryopreservation depending on their gestation terms. *Probl Cryobiol*. 2008;18(3):302-5.
- [98] Kozhina OY, Ostankov MV, Grisha IG, Bondarovich NA. Effect of cryopreservation according two-stage program in high-molecular dextran solutions on cytomorphological and functional properties of human cord blood cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013;23(1):58-65.
- [99] Goltsev AM, Lutsenko OD, Ostankov MV, Sokil LV, Grisha IG, Chernyshenko LG. Features of CD25 antigen expression on cord blood cells after lyophilization. In: *p[roceedings of Conference Problems and Achievements of Modern Biotechnology; 2023 Mar 24; Kharkiv*. p. 145-6.

H.K. Koval<sup>1</sup>, M.O. Bondarovich<sup>1</sup>, A.M. Goltsev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Interdepartmental Research Center of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, AMS of Ukraine and Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

#### CORD BLOOD AS A CORRECTOR OF HEMATOLOGICAL AND CYTOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LYMPHOHEMOPOIETIC ORGANS IN EXPERIMENTAL ATOPIC DERMATITIS

**Background.** Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory skin disease caused by a shift in the interaction between cells of the immune system and the skin. Steroid anti-inflammatory drugs used to treat AD often lead to numerous side effects. Therefore, the development of new natural multifunctional preparations with immunomodulatory activity is of great importance.

**Objective.** To determine the changes in indices of the leukocytes cluster of peripheral blood and determine the peculiarities of cytomorphological changes in the spleen and lymph nodes (LN) of rats with induced AD before and after administration of cryopreserved (cHCBL) and lyophilized (IHCBL) forms of human cord blood leukoconcentrate.

**Methods.** The experiments were conducted using 6-month-old Wistar rats. AD was induced by topically applying a 5% alcohol-acetone solution of dinitrochlorobenzene (DNCB) to the skin of the rats' back for 21 days. Each form of the preparation (cHCBL and IHCBL) was administered intraperitoneally in a 0.5 ml dose containing  $5 \times 10^6$  cells, one day after the final DNCB treatment. The following parameters were assessed in the blood: leukocyte count and the neutrophil-to-lymphocyte ratio (N/L index). Cytomorphological characteristics were determined in the spleen and inguinal LN.

**Results.** In AD, specific changes in the cytomorphological characteristics of the lymphohematopoietic complex (LHC) structures, namely the spleen and LN, were observed alongside alterations in the leukocyte cluster indices. The most notable changes in the spleen included the dominance of the white pulp over the red pulp and the prevalence of follicles of stages II and III of development in the LN. Animals with AD displayed pronounced leukocytosis and an increased N/L index in their blood. The study demonstrates the positive corrective effects of cHCBL and IHCBL on the morphological characteristics of LHC and the specified blood parameters.

**Conclusions.** The effectiveness of the cHCBL and IHCBL use for correcting indices of leukocytes cluster of peripheral blood and the structural organization of lymphohematopoietic organs in the development of AD have been proven.

**Keywords:** cord blood; cryopreservation; lyophilization; atopic dermatitis; dinitrochlorobenzene; neutrophils; lymphocytes; spleen; lymph nodes.