

## РОЛЬ КОРДОВОЇ КРОВІ В РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТОПІЧНОМУ ДЕРМАТИТІ

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

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук 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 16 August 2021; Accepted 13 September 2021

**Проблематика.** Атопічний дерматит (АД) як одне з найбільш поширених захворювань аутоімунного генезу в структурі дерматологічної практики характеризується свербінням, сухістю, потовщенням шкіри, характерними висипаннями. Препаратами вибору при лікуванні АД є стероїдні протизапальні засоби. Однак серйозною проблемою гормональної терапії є розвиток небажаних побічних ефектів. Пошук ефективних методів лікування АД є актуальним завданням медицини, зокрема дерматології. Разом із тим очевидна необхідність участі у вирішенні цієї проблеми і фахівців-імунологів, які працюють у сфері застосування препаратів клітинної терапії, що діють на різні патогенетичні ланки захворювання. Розробка нових або оптимізація існуючих методів лікування АД є актуальним завданням, що стоїть перед ними.

**Мета.** Оцінка імунокорегуючого впливу ліофілізованого (ЛЛККЛ) і кріоконсервованого лейкоконцентрату кордової крові людини (КЛККЛ) на моделі АД.

**Методика реалізації.** Експерименти були проведені на 6-місячних щурах лінії Вістар. При індукції АД вогнище запалення формували на ділянці спини щурів (9–10 см<sup>2</sup>) щоденним втиранням 5%-ного спиртово-ацетонового розчину динітрохлорбензолу (ДНХБ) протягом 21-ї доби. Вводили КЛККЛ і ЛЛККЛ внутрішньочеревинно по 0,5 мл у дозі  $5 \times 10^6$  клітин через добу після закінчення застосування ДНХБ. Визначалися адгезивна і фагоцитарна активність клітин перитонеальної порожнини, рівень циркулюючих імунних комплексів, популяції та субпопуляції лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), імунорегуляторний індекс лімфоцитів, концентрації імуноглобулінів у сироватці крові.

**Результати.** Для АД, індукованого ДНХБ, характерні системні зміни імунного статусу, що виражається в змінах показників клітинного і гуморального імунітету. Виявлено найбільш принципові зміни клітинних субпопуляцій у селезінці щурів при АД: зниження кількості загальних Т-лімфоцитів і їх субпопуляцій (клітин CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup>). На цьому тлі відзначені зміни в моноцитарно-фагоцитарній, гуморальній системах імунітету. У роботі показана імунокоригуюча активність КЛККЛ і ЛЛККЛ при експериментальному АД. На тлі лікування відзначені особливості імунокоригуючого ефекту кожного з препаратів. Так, при оцінці міжгрупових значень виявлено більш виражене збільшення Т-рег у щурів 5-ї групи – 3,9 [3,8; 4,0] проти 3,2 [3,0; 3,3] у 4-й групі ( $P < 0,01$ ); рівня IgA – 1,6 [1,5; 1,7] проти 1,3 [1,2; 1,4] ( $P < 0,01$ ).

**Висновки.** ЛЛККЛ проявляє імунокоригуючу активність при лікуванні експериментального АД, що перевершує за деякими параметрами активність КЛККЛ. Це робить перспективним застосування ЛЛККЛ у клінічній практиці.

**Ключові слова:** атопічний дерматит; лейкоконцентрат кордової крові; імунна система; кріоконсервування; ліофілізація.

### Вступ

Атопічний дерматит (АД) – хронічне рецидивне алергічне захворювання шкіри, що виникає у людей із генетичною схильністю до атопії, має вікові особливості локалізації та морфології вогнищ запалення. Це захворювання характеризується ексудативними і (або) ліхеноїдними висипаннями, шкірною сверблячкою і обумовлене гіперчутливістю як до алер-

генів, так і до неспецифічних подразників [1]. При цьому деякі дослідники спостерігали асоціацію АД із розвитком аутоімунних порушень [2]. Вони це пов'язують з активацією окремих імунних механізмів, які здатні підтримувати аутоімунні порушення у пацієнтів з АД.

Провідне місце в патогенезі атопічного дерматиту належить порушенням імунного статусу. Причому ці зміни варіюють у значних межах, зачіпаючи різні ланки імунної системи [3].

У зв'язку з цим важливою діагностичною ознакою для з'ясування порушень, пов'язаних із функціонуванням імунної системи (ІС), є характер змін у клітинній і гуморальній ланках ІС [4]. В основі ураження шкіри при АД лежать імунні механізми. Так, хронічний перебіг АД супроводжується посиленою інфільтрацією шкіри різних форм Т-лімфоцитами і дендритними клітинами [5]. На цьому фоні збільшується продукція цитокінів і хемокинів у осередках запалення, спостерігається гіперплазія епідермісу. Такого роду комплексні порушення топічного імунного плацдарму супроводжуються збільшенням продукції ІgЕ, який фіксується специфічними високоафінними рецепторами на мембранах опасистих клітин і базофілів, що згодом призводить до їх активації з вивільненням медіаторів алергічного запалення – гістаміну, серотоніну та кінінів [6]. Цитокіни, що вивільняються, зумовлюють розвиток ранньої фази алергічної відповіді, що виявляється у хворих АД інтенсивним свербінням, гіперемією, висипаннями на шкірі [7]. В патогенезі розвитку захворювання лежать як місцеві, так і системні порушення імунокомпетентної сфери організму. Вказується, що дисбаланс імунорегуляторних механізмів у осіб із генетично детермінованою схильністю до розвитку atopічних захворювань призводить до виборчого апоптозу Th1-лімфоцитів і збільшення вмісту Th2-лімфоцитів [8]. У гострій фазі розвитку АД превалює продукція ІL-4 і ІL-13, що своєю чергою стимулює синтез специфічних ІgЕ-антитіл і ІL-5, який сприяє дозріванню еозинофілів і їх виходу з кісткового мозку. При хронічному перебігу АД в основному переважають активовані Th1-лімфоцити, які експресують мРНК для медіаторів, таких як  $\gamma$ -ІНФ і ІL-12 [9]. Сьогодні з'являється все більше даних про роль Т-регуляторних клітин (Т-reg) у формуванні імунної відповіді при АД [10]. Існує загальна думка, що Тreg-клітини відіграють важливу роль у контролі та пригніченні відповідей Т-клітин на алергени. В праці [11] вказується, що кількість клітин Т-reg при АД не зменшується, проте вони не можуть реалізувати імуносупресивну активність оптимальним чином.

У зв'язку з неоднозначністю, а іноді й суперечливістю даних про патогенез АД перед дослідниками стоїть важливе завдання пошуку ефективних препаратів, включаючи біологічно активні речовини, які корегують функцію імунної системи у хворих з АД [12]. Сьогодні сучасна фармація пропонує великий набір імуномодуляторів, що застосовуються при АД [13].

Це препарати тваринного, мікробного і рослинного походження, а також синтетичні агенти. У препаратів усіх цих груп ефективність не завжди висока, а результати застосування іноді суперечливі й неоднозначні. Це підкреслює необхідність подальшої розробки нових ефективних і безпечних імунотропних агентів для корекції імунокомпетентної сфери хворих АД. У зв'язку з цим неможливо не відзначити багатопрофільність імунокоригуючої активності препаратів клітинної терапії. Так, наприклад, широкого застосування при лікуванні АД набули МСК [14]. Маючи високий регенеративний і репаративний потенціал, ці клітини здатні реалізувати свій імуномодулюючий потенціал, у т.ч. й імуносупресивний [15]. Одним із перспективних напрямів у цій галузі є розробка препаратів на основі плаценти і кордової крові [16–18]. Терапевтична цінність кордової крові людини (ККЛ) визначається її унікальним складом і механізмом дії, спрямованим на нормалізацію не тільки стану ІС, а й загального гомеостазу організму [19]. Повідомлялося, що терапія з використанням клітин ККЛ застосовується за різних аутоімунних захворювань і запальних процесів мозку [20], кишківника [21], суглобів [22], діабету типу I [23]. Крім того, в низці досліджень продемонстровано здатність клітин ККЛ мінімізувати симптоми при бронхіальній астмі, а також алергічному риніті [24, 25].

Поліфункціональність лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛККЛ) у клінічній практиці визначила необхідність розробки ефективних методів його консервування (ліофілізація, кріоконсервування) з метою тривалого зберігання. При цьому важливо, що ці методи можуть виступати в ролі модифікатора стану біооб'єкта на молекулярному і клітинному рівнях, у низці випадків покращуючи його терапевтичну ефективність [26, 27]. Наприклад, метод ліофілізації здатний збагачувати ЛККЛ унікальною субпопуляцією Т-reg [27], особлива роль яких у мінімізації прояву АД була відзначена вище.

З урахуванням сказаного вище ми провели низку експериментальних досліджень для з'ясування ефективності розробленого нового терапевтичного підходу до лікування АД, акцент у яких був зроблений на характері зміни показників ІС в умовах експериментальної патології.

Метою дослідження була розробка нового терапевтичного підходу до лікування АД завдяки використанню ліофілізованого і кріоконсервованого лейкоконцентрату пуповинної крові людини з акцентом на оцінці їх імуномодулюючої активності.

## Матеріали і методи

Експерименти були виконані на щурах-самцях 6-місячного віку масою 180–200 г відповідно до правил “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях” (The European Convention, 1986), 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 № 3 від 18 травня 2021 р.). Лабораторні тварини, використані в експериментальній роботі, перебували в умовах віварію ІПКіК НАНУ.

Лейкоконцентрат виділяли з цільної кордової крові людини (ЛККЛ) відділенням еритроцитів пасивною седиментацією в градієнті щільності з додаванням поліглюкіну. ЛККЛ розливали по 1 мл у стерильні пеніцилінові флакони, які розміщували на полиці сублімаційної установки УЗВ-2 (ОП ІПКіК НАН України), після чого проводили ліофілізацію за методом А.М. Гольцева і співавт. [28]. Зразки ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини (лЛККЛ) зберігали за температури 4 °С. Регідратію лЛККЛ здійснювали додаванням у флакони 1 мл фізіологічного розчину протягом 10 хв, обережно перемішуючи з метою запобігання спінуванню. Кріоконсервування ЛККЛ (кЛККЛ) здійснювали в одноразових пластикових пробірках (Nunc, США) на програмному заморозувачі за методом А.А. Цуцаєвої і співавт. [29]. Зразки кЛККЛ зберігали за 196 °С у низькотемпературному банку ІПКіК НАН України. Відтавали кЛККЛ на водяній бані за температури 40–41 °С. Визначали кількість ядерних клітин у 1 мл суспензії ЛККЛ 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 [30]. Цей метод заснований на використанні гаптену 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ), який здатний проникати в роговий шар, верхній шар шкіри та ковалентно модифікувати ендogenous білки, які набули властивості контактних алергенів. Експериментальним тваринам щодня, протягом 21-ї доби, в попередньо депільованих ділянках шкіри спини (3×4 см<sup>2</sup>) втирали по 0,5 мл 5 %-ного спиртово-ацетонового розчину ДНХБ. Усього під спостереженням перебувало 35 щурів,

розподілених 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 + кЛККЛ ( $n = 7$ ); 5 – АД + лЛККЛ ( $n = 7$ ). Усі види лікування починали через добу після закінчення використання ДНХБ.

Імунокоригуючий ефект ЛККЛ оцінювали за ступенем відновлення показників ІС на 14-ту добу після лікування.

Кількість окремих субпопуляцій імунних клітин у селезінці оцінювали методом цитофлуориметрії, використовуючи моноклональні антитіла (МАТ), мічені ФІТЦ (BD, США) до CD3<sup>+</sup> (загальні Т-лімфоцити), CD4<sup>+</sup> (Т-хелпери (Тх)), CD8<sup>+</sup> (Т-супресори (Тс)), CD16<sup>+</sup> (природні кілери (ПК)). Крім того, розраховували імунорегуляторний індекс (ІРІ) за співвідношенням Т-хелперів і Т-супресорів (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Для кількісної оцінки Т-reg клітин використовували МАТ до CD4 і CD25 мембранних структур (BD Pharmingen, США). Імуноглобуліни тих самих ізотипів були використані як ізотипічний контроль. Флуоресценцію клітин оцінювали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD, США). Всі процедури і маніпуляції з клітинами проводили стандартним способом відповідно до вказівок фірми-виробника. Аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення WinMDI 2.8 (J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, США). У кожній пробі аналізували не менше 10 000 клітин.

У дослідженні використано забір сироватки крові, що здійснювався в пробірці, без антикоагулянта, ємністю 10 мл. В отриманих сироватках крові визначали циркулюючі імунні комплекси (ЦІК), концентрацію загального IgA та IgE. З метою виявлення рівня IgA у сироватці крові експериментальних тварин використовували метод радіальної імунодифузії за Манчіні [31]. Концентрацію загального IgE у сироватці крові щурів визначали методом імуноферментного аналізу. Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) виявляли спектрофотометрично [32].

Адгезивні властивості клітин перитонеальної порожнини (ПП) визначали в пластикових чашках (Spectar, Сербія) за температури 37 °С протягом 45 хв, після чого тричі м'яко змивали середовищем 199. Відсоток адгезивних клітин (АК) визначали як різницю між кількістю внесених клітин і кількістю клітин у супернатанті [31]. Фагоцитарну активність клітин (макрофагів) ПП оцінювали згідно з [32].

Результати досліджень виражали у вигляді медіани з нижнім та верхнім квантилями (Me [LQ; UQ]) і оброблювали з використанням методів 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 за  $P < 0,05$ . У разі отримання статистично значущої різниці проводилося попарне порівняння груп із використанням тесту Манна–Уїтні з поправкою Бонферроні при оцінці значень  $P$ .

### Результати

У ході проведеного дослідження було встановлено, що в щурів з АД на 35-ту добу з моменту індукції патології мали місце зміни кількісних показників імунокомпетентних клітин у селезінці (таблиця). Так, порівняно з групою здорових тварин спостерігалось двократне зниження кількості загальних  $CD3^+$  Т-лімфоцитів, а також зниження субпопуляцій  $CD4^+$  і  $CD8^+$  Т-лімфоцитів у 2,1 та 1,7 разу відповідно. Заслужує на увагу факт збільшення кількості Т-рег клітин на 35-ту добу з моменту індукції патології в щурів з АД на тлі зниження концентрації кілерних клітин ( $CD16^+$ ) до 11,2 [10,1; 11,7] % (проти 15,7 [14,5; 16,1] % у контролі,  $P < 0,01$ ).

Проведення стандартної терапії (АД + преднізолон) хоч і не нормалізувало, але сприяло значимому ( $P < 0,01$ ) зростанню більшості досліджуваних показників клітинного імунітету

після її проведення. Так, відзначалося підвищення ( $P < 0,01$ ) вмісту  $CD4^+$  і  $CD8^+$  субпопуляцій Т-лімфоцитів в 1,7 і 1,2 разу відносно 2-ї групи. При цьому вміст Т-регуляторних  $CD4^+CD25^+$  клітин перевершував на 24 і на 17 % відповідні значення в 1 і 2 групах. Однак слід зазначити, що після використання преднізолону кількість клітин із цитотоксичною активністю ( $CD16^+$ ) вірогідно не відрізнялася від відповідного показника групи 2 (див. таблицю).

При вивченні субпопуляційного складу клітин селезінки після введення кЛККЛ або лЛККЛ показники Т-клітинної ланки імунітету щурів нормалізувалися. Так, спостерігалось відновлення вмісту Т-лімфоцитів – ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) і показників ІРІ, вмісту клітин  $CD16^+$ . При цьому привертає до себе увагу істотне підвищення вмісту Т-рег у щурів, яких лікували лЛККЛ.

Як видно з рис. 1, індукований у такий спосіб дерматит у щурів супроводжувався підвищенням ЦІК на 17 %, що свідчить про інтенсифікацію утворення при АД комплексів антиген–антитіло. Суттєво, що стандартна терапія глюкокортикоїдами (ГК) не приводила до достовірного зниження рівня ЦІК. Концентрація ЦІК у сироватці крові у щурів груп 4 і 5 істотно знизилася (рис. 1). Так, у групі 4 рівень ЦІК знизився в 1,13 разу відносно нелікованих тварин з АД і, відповідно, достовірно не перевищував показника норми. У групі тварин, яких лікували ліофілізованим біоматеріалом, цей показник зменшився в 1,17 разу і тим самим наблизився до норми.

**Таблиця:** Показники клітинної ланки імунітету щурів з індукованим atopічним дерматитом до і після лікування, Me [LQ; UQ]

Показники, %	Групи тварин				
	Контроль	АД до лікування	АД + стандартне лікування (преднізолонова мазь)	АД + кЛККЛ	АД + лЛККЛ
	1	2	3	4	5
$CD3^+$	42,9 [41,2; 44,2]	19,3 [18,8; 21,7] <sup>1,3,4,5</sup>	27,1 [26,6; 28,5] <sup>1,2,4,5</sup>	40,8 [38,0; 42,8] <sup>1,2,3</sup>	41,9 [39,0; 43,0] <sup>1,2,3</sup>
$CD4^+$	36,5 [35,1; 38,3]	17,5 [16,3; 20,1] <sup>1,3,4,5</sup>	30,6 [28,9; 32,1] <sup>1,3,4,5</sup>	36,1 [34,1; 37,9] <sup>1,3,4,5</sup>	37,1 [34,6; 37,5] <sup>1,3,4,5</sup>
$CD8^+$	23,7 [22,3; 25,0]	14,2 [13,8; 15,5] <sup>1,3,4,5</sup>	16,9 [16,8; 17,9] <sup>1,2,4,5</sup>	23,6 [22,6; 23,9] <sup>1,2,3</sup>	23,8 [22,2; 24,7] <sup>1,2,3</sup>
$CD16^+$	15,7 [14,5; 16,1]	11,2 [10,1; 11,7] <sup>1,4,5</sup>	10,5 [9,7; 10,7] <sup>1,4,5</sup>	13,8 [13,7; 14,7] <sup>2,3</sup>	13,7 [13,4; 14,7] <sup>2,3</sup>
$CD4^+CD25^+$	3,3 [3,0; 3,3]	3,5 [3,5; 3,6] <sup>1,3,4,5</sup>	4,1 [4,0; 4,3] <sup>1,2,4</sup>	3,2 [3,0; 3,3] <sup>1,2,3,5</sup>	3,9 [3,8; 4,0] <sup>1,2,4</sup>
$CD4^+/CD8^+$ ІРІ	1,5 [1,5; 1,5]	1,2 [1,2; 1,3] <sup>1,3,4,5</sup>	1,8 [1,7; 1,8] <sup>2,5</sup>	1,5 [1,4; 1,7] <sup>2</sup>	1,5 [1,5; 1,6] <sup>2</sup>

**Примітки.** АД – atopічний дерматит, лЛККЛ – ліофілізований лейкоконцентрат кордової крові людини, кЛККЛ – кріоконсервованій лейкоконцентрат кордової крові людини. Відмінності достовірні ( $P < 0,01$ ) порівняно: 1 – із контролем; 2 – із групою 2; 3 – із групою 3; 4 – із групою 4; 5 – із групою 5 у відповідні терміни.



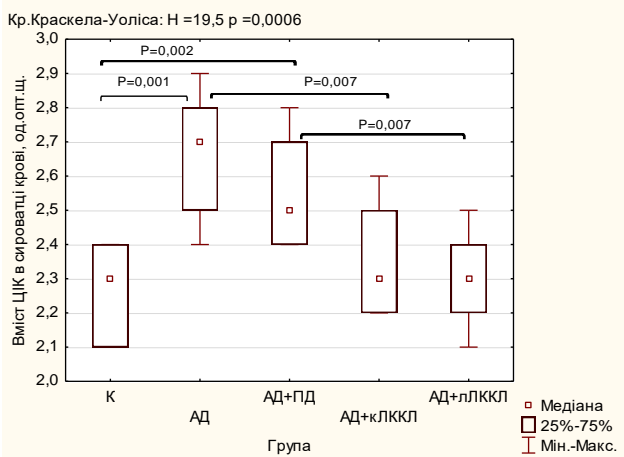
На рис. 2 продемонстровано достовірне збільшення рівня IgE у сироватці крові з АД (група 2) порівняно з інтактними тваринами. У групі 3 вихідний рівень IgE на тлі лікування достовірно не змінився. При цьому в групах 4 і 5 його рівень на 14-й день із моменту початку лікування знизився в 1,2 разу ( $P < 0,01$ ), що зумовило достовірний рівень відмінностей між 3-ю та 4 і 5-ю групами ( $P < 0,01$ ).

З рис. 3 видно, що у тварин з АД (група 2) рівень IgA був знижений у 1,8 разу і становив 0,9 [0,8; 0,9] г/л (контроль – 1,6 [1,5; 1,7] г/л) ( $P < 0,01$ ). У 3-й групі, у щурів, які отримували стандартну терапію, відзначали недостовірне збільшення показника IgA до 1,2 [1,0; 1,3] г/л. Лікування щурів указаними препаратами кордової крові (групи 4 і 5) приводило до збіль-

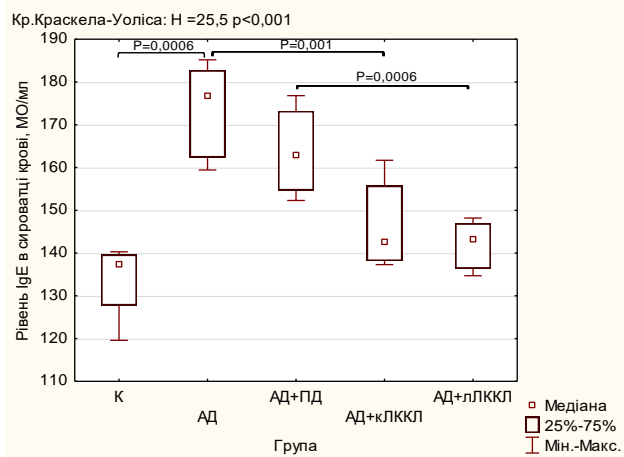
шення рівня IgA у сироватці крові, але тільки після застосування ліофілізованого біоматеріалу цей показник наближався до норми.

У моноцитарно-фагоцитарній системі (МФС) щурів із розвитком патології істотно знижувалися показники адгезивної активності клітин ПП (рис. 4). При цьому показано високу імунорегулюючу активність як кЛККЛ, так і лЛККЛ у терапії АД і в цьому випадку.

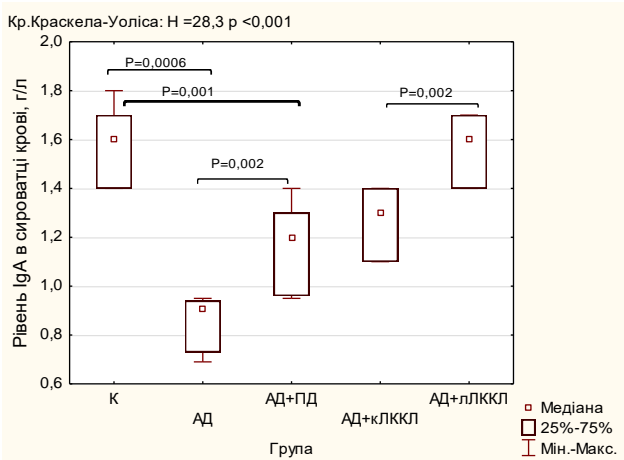
Більше того, терапевтичний ефект застосованих препаратів після ліофілізації та криоконсервування був підтверджений і корекцією показників фагоцитарної активності клітин ПП (індекс бактерицидності фагоцитів (ІБФ)). При розвитку АД цей показник був знижений на 75%. Так, якщо в групі 1 ІБФ становив 5,6 [5,5; 6,8]%, то в групі тварин з АД – 3,2 [3,1;



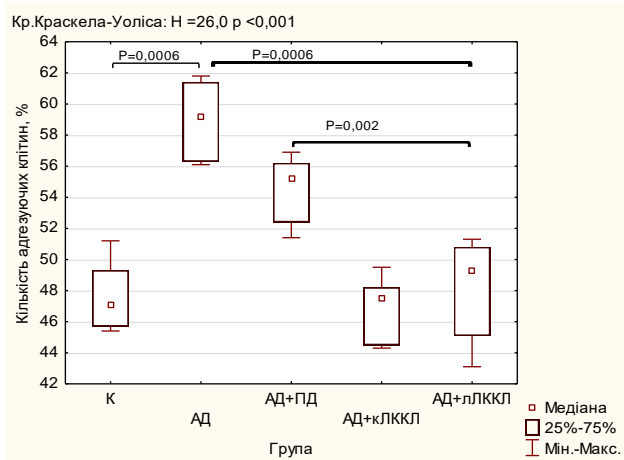
**Рисунок 1:** Вміст циркулюючих імунних комплексів щурів з індукованим atopічним дерматитом до і після лікування



**Рисунок 2:** Вміст IgE у сироватці крові щурів з індукованим atopічним дерматитом до і після лікування

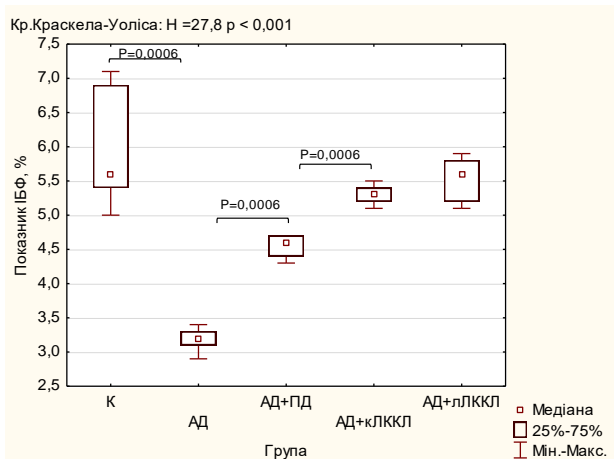


**Рисунок 3:** Вміст IgA у сироватці крові щурів з індукованим atopічним дерматитом до і після лікування



**Рисунок 4:** Кількість адгезуючих клітин у перитонеальній порожнині щурів з індукованим atopічним дерматитом до і після лікування

3,3] ( $P < 0,01$ ). Однак після лікування у всіх досліджуваних групах (групи 3–5) ІБФ збільшився порівняно з групою 2, однак вірогідна різниця відзначалася тільки щодо груп 4 та 5 (рис. 5).



**Рисунок 5:** Індекс бактерицидності фагоцитів клітин перитонеальної порожнини шурів з індукованим atopічним дерматитом до і після лікування

Таким чином, наші результати демонструють факт високого коригуючого ефекту відносно основних патогенетично значущих компонентів імунної системи організму тварин, що обумовлюють маніфестацію АД.

## Обговорення

В експериментальній моделі АД, індукованого ДНХБ, проведено дослідження характеру і ступеня зміни при цій патології клітинної та гуморальної ланок імунітету й оцінено можливість корекції цих показників препаратами кордової крові.

Продемонстровано, що для такої форми АД характерне порушення клітинної ланки імунітету, а саме зниження рівня загальних Т-лімфоцитів і їхніх субпопуляцій, натуральних кілерів, підвищення концентрації Т-рег.

Це узгоджується з результатами інших авторів, які в клінічних дослідженнях виявили більш високий вміст субпопуляції Т-рег у пацієнтів з АД порівняно зі здоровими людьми [33, 34]. На експериментальних моделях АД у тварин із сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу було також продемонстровано підвищення рівня  $CD4^+CD25^+$  клітин. Однак ці дослідження не торкалися безпосередньо субпопуляції Т-рег клітин, що експресують FOXP3 [35, 36]. На думку Е.М. Ling зі співавт. [37], збільшення Т-рег клітин, яке спостерігається у тварин із

АД, може являти собою вторинний компенсаторний механізм, що активується запаленням, викликаним алергеном кліща домашнього пилу, якого недостатньо для подолання хвороби [38]. До того ж це може бути пов'язано з переважанням серед Т-рег клітин низькофункціональної субпопуляції. Таке припущення ґрунтується на даних, отриманих М. Міуага і співавт. [39], які показали, що регуляторні  $CD4^+$  Т-лімфоцити можна розділити як мінімум на дві субпопуляції, що різняться за експресією протеїну FOXP3. Відповідно до їхніх даних, саме  $CD3^+CD4^+FOXP3^{high}$  субпопуляція представлена Т-рег, серед яких підвищений вміст проліферуючих ( $Ki-67^+$ ) і активованих ( $HLA-DR^+$ ) елементів. Більше того, з усіх Т-лімфоцитів саме  $FOXP3^{high}CD4^+$  Т-клітини характеризуються найбільш високим рівнем експресії CTLA-4-молекули, що бере участь у контролі супресорної активності Т-рег [40]. Ця особливість визначає найбільш виражену порівняно з іншими FOXP3-позитивними клітинами здатність  $CD3^+CD4^+FOXP3^{high}$  Т-рег пригнічувати активацію інших імуніцитів [39]. М. Міуага і співавт. назвали  $CD3^+CD4^+FOXP3^{high}$  Т-лімфоцити "активованими" регуляторними Т-клітинами [39]. Своєю чергою  $CD3^+CD4^+FOXP3^{dim}$  Т-лімфоцити були визначені як клітини-попередники "активованих" Т-рег. Ці клітини проявляють низьку функціональну активність [39]. Дані [39] разом із нашими даними демонструють чітку картину системного дисбалансу регуляторних клітин в ІС при розвитку, здавалося б, топічно "локалізованої" патології.

Терапевтичні підходи, спрямовані на відновлення і нормалізацію порушеної функції ІС при АД, здатні знизити вираженість протікання запальних реакцій і клінічних проявів захворювання.

Кордова (пуповинна) кров є, по суті, частиною крові плоду. Кордова кров і її компоненти активно використовуються в сучасних медико-біотехнологічних програмах завдяки своїм унікальним властивостям [41]. Останнє десятиріччя характеризується інтенсивним розвитком нового напрямку в медицині – замісної регенеративно-пластичної терапії з використанням плюрипотентних стовбурових клітин кордової крові. Високий клінічний ефект застосування ядерних клітин і рідких субстратів фетоплацентарного походження обумовлений стимулюючим впливом на функціонально неповноцінні клітини і тканини в окремих органних системах, істотною ініціацією репаративних і мета-

болічних процесів, імуностимулюючою та імунокоригуючою дією [42]. Сироватка і плазма пуповинної крові містять значну кількість імунотропних та імунокоригуючих компонентів різного походження, включаючи широкий спектр гормонів, ростових факторів, гемопоетинів і адаптогенів, опіоїдних пептидів – ендорфінів, енкефалінів, мікроелементів, вітамінів тощо. Однак незважаючи на підвищений вміст багатьох біо- та імуностимуляторів у кордовій крові, ці речовини містяться в збалансованих концентраціях і становлять біологічно активний комплекс, який необхідний для організму, що розвивається, і який нормалізує обмін речовин при введенні в дорослий патологічно змінений організм [43]. Усі вони мають потужний регуляторний потенціал [44]. Найважливішим при цьому є те, що ступінь його реалізації істотно залежить від ступеня (і характеру) порушення фізіологічного стану організму. Іншими словами, потрапляючи в організм як терапевтичний засіб, матеріал фетоплацентарного комплексу, що вводиться, буде відповідати “на запит ситуації” [45]. Іншими словами, за будь-якої конкретної патології ця відповідь буде “специфічною”.

Використання ЛККЛ у комплексному лікуванні тварин, хворих на АД, чинило коригуючий вплив на клітинну і гуморальну ланки імунітету, сприяючи відновленню показників ІС і наближаючи їх до нормативних значень. Клінічна ефективність клітин кордової крові була показана при низці аутоімунних захворювань, а також при захворюваннях, які характеризуються імунозапальним процесом [20–22]. Виявлена нами здатність ЛККЛ до зменшення прояву дисрегуляції стану ІС при АД є оригінальною і раніше не була описана в науковій літературі. Імунокоригуючий вплив кріоконсервованих і ліофілізованих ЛККЛ у щурів з АД ми розглядаємо як доказ патогенетично обґрунтованої і таргетно спрямованої схеми експериментального лікування патології, в основі якої лежить дисрегуляторний стан ІС. Здатність цих клітин продукувати ті чи інші регуляторні медіатори при лікуванні АД є багатоплановою і визначається рівнем експансії імунозапального процесу в організмі, про що було сказано вище. Різноманіття механізмів впливу ЛККЛ на різні ланки ІС, що причетні до патогенезу АД, забезпечувало корекцію і гармонізацію імунного відгуку клітинного та гуморального імунітету. Наші роботи довели, що такого роду і рівня активність властива саме ЛККЛ, оскільки піс-

ля застосування ГК лікувальний (коригуючий) ефект був виражений меншою мірою.

Неодноразово нами зазначалося, що ступінь впливу факторів кріоконсервування на біологічний об'єкт визначається умовами реалізації процесу заморожування-відігрівання [46]. У цьому випадку досить цікавими є результати порівняльної оцінки дії ліофілізованих і кріоконсервованих ЛККЛ. Як видно з отриманих нами даних, більш виражений позитивний ефект за низкою показників спостерігався у тварин, які отримували ЛККЛ. Вочевидь, відмінності, в яких проявляється модулюючий ефект ліофілізованого матеріалу (ЛЛККЛ) щодо низки показників клітинної та гуморальної ланки імунітету порівняно з кріоконсервованим (КЛККЛ), можуть бути зумовлені низкою причин. По-перше, особливою зміною після ліофілізації кількісного складу ЛККЛ. Встановлено, що деякі режими ліофілізації, в т.ч. і застосовані в цій роботі, можуть чинити селективний вплив на певні субпопуляції клітин кордової крові, підвищуючи вміст клітин Т-рег [27]. Володіючи зазначеною вище проліферативною активністю, вони при введенні в організм можуть зумовлювати збільшення пулу клітин Т-рег у селезінці при використанні ліофілізованого матеріалу в тварин із АД, чого не спостерігалося при застосуванні КЛККЛ. По-друге, різною можливістю кріоконсервування і ліофілізації змінювати профіль медіаторів, які продукуються ЛККЛ, що може відобразитися на їх терапевтичній ефективності. Взагалі отримані результати є експериментальним обґрунтуванням доцільності подальшого вивчення клінічної ефективності застосування ЛККЛ у пацієнтів з АД.

## Висновки

За результатами дослідження встановлено, що при ДНХБ, індукованому АД, відбуваються достовірні зміни Т-клітинної ланки імунітету, а саме зменшення концентрації  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD16^+$  клітин у селезінці на тлі підвищення концентрації  $CD4^+CD25^+$  клітин.

У тварин з АД виявлено порушення і в гуморальній ланці імунної системи з формуванням вторинного імунодефіциту з тенденцією до зниження рівнів IgA і переважання IgE і ЦІК. Як відомо [47], ЦІК грають важливу патогенетичну роль в індукції та підтримці імунозапального процесу в судинному ложі, маючи потенціал адгезії на ендотелії мікросудин і активуючи клітини МФС. Іншими словами, наші

результати чітко свідчать про формування імунodefіциту гуморальної ланки ІС.

Дійсно, в МФС тварин із АД було відзначено зростання числа адгезуючих клітин ПП на тлі зниження їх фагоцитарної активності.

Вельми цікаво, що підвищений рівень Т-рег клітин у селезінці тварин із АД фактично є лише специфічним маркером патології, але ці клітини не мають захисного потенціалу, що сприяє маніфестації патологічного процесу в організмі господаря, про що свідчить високий рівень ЦІК і ІgЕ у крові.

Значне зниження ступеня вираженості запального процесу при використанні препаратів кордової крові для тварин з АД свідчить про багатогранність механізму дії ЛККЛ щодо прояву імуномодулюючого ефекту на організм, що призводить до нормалізації показників імунітету з адекватним співвідношенням його основних ланок. При цьому важливо відзначити, що протизапальна активність обох форм ЛККЛ відрізняється від дії ГК.

Подальші дослідження у цьому напрямі можуть бути спрямовані на визначення особливостей морфологічного стану тканин (шкіра,

лімфотичні вузли, тимус, селезінка) при atopічному дерматиті та після використання препаратів кордової крові.

### Фінансування

Робота виконана у відділі кріопатофізіології та імунології Інституту проблем кріобіології і медицини НАН України в рамках науково-дослідної роботи “Вивчення імунокорегуючої дії сумісного використання кріоконсервованого чи ліофілізованого лейкоконцентрату кордової крові людини та препарату кріоконсервованого екстракту плаценти на експериментальних моделях аутоімунних захворювань” за кошти державного бюджету України (№ державної реєстрації 0117U000847).

### Подяки

Автори висловлюють подяку Павлу Михайловичу Зубову (відділ кріоцитології і кількісної морфології ІПКіК НАН України) за допомогу при виконанні роботи на проточному цитофлуориметрі.

### References

- [1] Schmidt AD, de Guzman Strong C. Current understanding of epigenetics in atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2021;30(8):1150-5. DOI: 10.1111/exd.14392
- [2] Narla S, Silverberg JI. Association between atopic dermatitis and autoimmune disorders in US adults and children: A cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(2):382-9. DOI: 10.1016/j.jaad.2018.09.025
- [3] Abreu D, Kim BS. Innate immune regulation of dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2021;41(3):347-59. DOI: 10.1016/j.iac.2021.04.011
- [4] Gavrilova T. Immune dysregulation in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Dermatitis*. 2018;29(2):57-62. DOI: 10.1097/DER.0000000000000340
- [5] Klaeschen AS, Nümm TJ, Herrmann N, Leib N, Maintz L, Sakai T, et al. JAK1/2 inhibition impairs the development and function of inflammatory dendritic epidermal cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Jun;147(6):2202-12.e8. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.11.041
- [6] David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1027:21-37. DOI: 10.1007/978-3-319-64804-0\_3
- [7] Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol Int*. 2017 Jul;66(3):398-403. DOI: 10.1016/j.alit.2016.12.002
- [8] Akkoc T, de Koning PJ, Rückert B, Barlan I, Akdis M, Akdis CA. Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(3):652-8.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.12.1171
- [9] Su C, Yang T, Wu Z, Zhong J, Huang Y, Huang T, et al. Differentiation of T-helper cells in distinct phases of atopic dermatitis involves Th1/Th2 and Th17/Treg. *Eur J Inflamm*. 2017;15(1):46-52. DOI: 10.1177/1721727X17703271
- [10] Li Y, Xu W, Yao J, Cheng H, Sun X, Li L. Correlation of blood FoxP3+ regulatory T cells and disease activity of atopic dermatitis. *J Immunol Res*. 2019;2019:1820182. DOI: 10.1155/2019/1820182
- [11] Agrawal R, Wisniewski JA, Woodfolk JA. The role of regulatory T cells in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:112-24. DOI: 10.1159/000323305
- [12] Ratchataswan T, Banzon TM, Thyssen JP, Weidinger S, Guttman-Yassky E, Phipatanakul W. Biologics for treatment of atopic dermatitis: current status and future prospect. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(3):1053-65. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.11.034



- [13] Yang N, Chen Z, Zhang X, Shi Y. Novel targeted biological agents for the treatment of atopic dermatitis. *BioDrugs*. 2021;35(4):401-15. DOI: 10.1007/s40259-021-00490-x
- [14] 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;8:326. DOI: 10.3389/fcell.2020.00326
- [15] Poggi A, Zocchi MR. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells: still unresolved "Yin and Yang". *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019;14(4):344-50. DOI: 10.2174/1574888X14666181205115452
- [16] Goltsev AN, Falko OV, Volina VV, Lipina OV, Prokopyuk OS, Gulevsky OK. Morphological study of liver in rats with toxic hepatitis after application of cryopreserved human cord blood serum. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018;28(1):014-8. DOI: 10.15407/cryo28.01.014
- [17] Goltsev KA, Volina VV, Kozhina OYu, Ostankov MV. Effect of cryopreserved cord blood on structure of immunocompetent and other vital organs at acute pyoperitonitis. *Probl Cryobiol*. 2011;21(4):429-44.
- [18] Kozhina OYu, Ostankov MV, Ostankova LV, Bondarovich NA, Goltsev AN. Effect of cryopreserved cord blood on activity of alveolar macrophages in experimental model of influenza. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013;23(3):247-59.
- [19] Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, Vanherberghen B, Uhlin M. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(6):691-9. DOI: 10.1080/14712598.2017.1316713
- [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;14(4):295-307. DOI: 10.2217/rme-2018-0106
- [21] Zhang J, Lv S, Liu X, Song B, Shi L. Umbilical cord mesenchymal stem cell treatment for Crohn's disease: a randomized controlled clinical trial. *Gut Liver*. 2018;12(1):73-8. DOI: 10.5009/gnl17035
- [22] Qi T, Gao H, Dang Y, Huang S, Peng M. Cervus and cucumis peptides combined umbilical cord mesenchymal stem cells therapy for rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(28):e21222.
- [23] Kassem DH, Kamal MM. Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived stem cells for diabetes mellitus: a meta-analysis study. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):484. DOI: 10.1186/s13287-020-01996-x
- [24] Kang SY, Park DE, Song WJ, Bae BR, Lee JW, Sohn KH, et al. Immunologic regulatory effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a murine ovalbumin asthma model. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(7):937-45. DOI: 10.1111/cea.12920
- [25] Kan XL, Pan XH, Zhao J, He J, Cai XM, Pang RQ, et al. Effect and mechanism of human umbilical cord mesenchymal stem cells in treating allergic rhinitis in mice. *Sci Rep*. 2020;10(1):19295. DOI: 10.1038/s41598-020-76343-4
- [26] Sirous MA, Goltsev AN, Rassokha IV, Goltsev KA. Application of cryopreserved fetal liver cells to treat autoimmune haemolytic anemia. *Probl Cryobiol*. 2010;20(2):217.
- [27] Koval GK, Lutsenko OD, Grisha IG, Sokil LV, Bondarovich MO, Ostankov MV, et al. Impact of lyophilisation on integrity of structural and functional characteristics of human cord blood leukoncentrate. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019;29(4):332-43. DOI: 10.15407/cryo29.04.332
- [28] 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 leukoconcentrate. Ukraine patent 117780U. 2017 July 10.
- [29] Tsutsaieva AO, Hryshenko VI, Kudokotseva OV, Schehlov AV, Tupchiienko HS, Prokoliuk OS, inventors; IPC&C NAS of Ukraine, assignee. Method for cryopreservation of hemopoietic cells of cord blood. Ukraine patent 31847A. 2000 Dec 15.
- [30] Zalkan PM, Ievleva EA. Experimental model of allergic dermatitis. In: Dolgov AP, Raben AS, Antonev AA, editors. *Topical issues of professional dermatology*. Moscow: Meditsina; 1965. p. 106-12.
- [31] Paster YeU, Ovod VV, Pozur VK, Vikhot' NE. [Immunology laboratory course. Kyiv: Vyshcha Shkola; 1989. 304 p.
- [32] Menshykov VV. *Laboratory research methods in the clinic*. Moscow: Meditsina; 1987. p. 123-5.
- [33] García EM, Galicia-Carreón J, Novak N. In vitro conversion into CD4+CD25+Foxp3+ induced regulatory T cells is reduced in atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(5):353-6. DOI: 10.1159/000506285
- [34] Li Y, Xu W, Yao J, Cheng H, Sun X, Li L. Correlation of blood FoxP3+ regulatory T cells and disease activity of atopic dermatitis. *J Immunol Res*. 2019 Sep 15;2019:1820182. DOI: 10.1155/2019/1820182
- [35] Olivry T, Wofford J, Paps JS, Dunston SM. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet Dermatol*. 2011;22(2):188-96. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2010.00938.x
- [36] Simpson A, Maeda S, Marsella R. Temporal dynamic changes of phenotypic expression of peripheral CD4 cells during environmental allergen challenge in an experimental model of canine atopic dermatitis: a pilot study. *J Vet Med Sci*. 2009;71(9):1177-81. DOI: 10.1292/jvms.71.1177
- [37] Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004;363(9409):608-15. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15592-X

- [38] Taylor AL, Hale J, Hales BJ, Dunstan JA, Thomas WR, Prescott SL. FOXP3 mRNA expression at 6 months of age is higher in infants who develop atopic dermatitis, but is not affected by giving probiotics from birth. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(1):10-9. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2006.00483.x
- [39] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
- [40] Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science*. 2008;322(5899):271-5. DOI: 10.1126/science.1160062
- [41] Klaihmom P, Luanpitpong S, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Waeteekul S, Terbto P, et al. Episomal vector reprogramming of human umbilical cord blood natural killer cells to an induced pluripotent stem cell line MUSIi013-A. *Stem Cell Res*. 2021;55:102472. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102472
- [42] Goltsev AM, Fuller BJ, Bondarovich MO, Babenko NM, Gaevska YuO, Buriak IA, et al. COVID-19 as a potential target for cryobiology and cryomedicine. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020;30(2):107-31. DOI: 10.15407/cryo30.02.107
- [43] 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*. 2021 May 18;1-7. DOI: 10.1080/01480545.2021.1926475
- [44] 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
- [45] Goltsev AN, Babenko NN. Stipulation of the possibility to use embryonic neuronal cells when treating organ-specific autoimmune diseases. *Probl Cryobiol*. 2003;2:49-61.
- [46] Ostantkov MV, Bondarovich NA, Rassokha IV, Goltsev AN. Substantiation of the possibility of use of embryonic nerve cells in treatment of organ-specific autoimmune diseases. *Probl Cryobiol*. 2008;18(3):302-5.
- [47] Cacheiro-Llaguno C, Parody N, Escutia MR, Carnés J. Role of circulating immune complexes in the pathogenesis of canine leishmaniasis: New players in vaccine development. *Microorganisms*. 2021 Mar 30;9(4):712. DOI: 10.3390/microorganisms9040712

А.К. Коваль<sup>1</sup>, Е.Д. Луценко<sup>1,2</sup>, Н.А. Бондарович<sup>1</sup>, М.В. Останков<sup>1</sup>, А.Н. Гольцев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, Харьков, Украина

<sup>2</sup>Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МОЗ Украины, Харьков, Украина

#### РОЛЬ КОРДОВОЙ КРОВИ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНЬЕВ ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

**Проблематика.** Атопический дерматит (АД) как одно из наиболее распространенных заболеваний аутоиммунного генеза в структуре дерматологической практики характеризуется зудом, сухостью, утолщением кожи, характерными высыпаниями. Препаратами выбора при лечении АД являются стероидные противовоспалительные средства. Однако серьезной проблемой гормональной терапии является развитие нежелательных побочных эффектов. Поиск эффективных методов лечения АД является актуальной задачей медицины, в частности дерматологии. Вместе с тем очевидна необходимость участия в решении этой проблемы и специалистов-иммунологов, которые работают в области применения препаратов клеточной терапии, действующих на различные патогенетические звенья заболевания. Разработка новых или оптимизация существующих методов лечения АД является актуальной задачей, стоящей перед ними.

**Цель.** Оценка иммунокорригирующего влияния лиофилизированного (лЛККЧ) и криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови человека (кЛККЧ) на модели АД.

**Методика реализации.** Эксперименты были проведены на 6-месячных крысах линии Вистар. При индукции АД очаг воспаления формировали на участке спины крысы (9–10 см<sup>2</sup>) ежедневным втиранием 5 %-ного спиртово-ацетонового раствора динитрохлорбензола (ДНХБ) в течение 21-х суток. Вводили кЛККЧ и лЛККЧ внутривенно по 0,5 мл в дозе 5×10<sup>6</sup> через сутки после окончания применения ДНХБ. Определялись адгезивная и фагоцитарная активность клеток перитонеальной полости, уровень циркулирующих иммунных комплексов, популяции и субпопуляции лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), иммунорегуляторный индекс лимфоцитов, концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови.

**Результаты.** Для АД, индуцированного ДНХБ, характерны системные изменения иммунного статуса, что выражается в изменениях показателей клеточного и гуморального иммунитета. Выявлены наиболее принципиальные изменения клеточных субпопуляций в селезенке крыс при АД: снижение количества общих Т-лимфоцитов и их субпопуляций (клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>). На этом фоне отмечены изменения в моноцитарно-фагоцитарной и гуморальной системах иммунитета. В работе показана эффективность применения кЛККЧ и лЛККЧ в коррекции патологических проявлений экспериментального АД. На фоне лечения отмечены особенности иммунокорригирующего эффекта каждого из препаратов. Так, при оценке межгрупповых значений выявлено более выраженное увеличение Т-гед у крыс 5-й группы – 3,9 [3,8; 4,0] против 3,2 [3,0; 3,3] в 4-й группе ( $P < 0,01$ ); уровня IgA – 1,6 [1,5; 1,7] против 1,3 [1,2; 1,4] ( $P < 0,01$ ).

**Выводы.** Таким образом, лЛККЧ проявляет иммунокорригирующую активность при лечении экспериментального АД, превосходящую по некоторым параметрам активность кЛККЧ. Это делает перспективным применение лЛККЧ в клинической практике.

**Ключевые слова:** атопический дерматит; лейкоконцентрат кордовой крови; иммунная система; криоконсервирование; лиофилизация.

A.K. Koval<sup>1</sup>, O.D. Lutsenko<sup>1,2</sup>, M.O. Bondarovykh<sup>1</sup>, M.V. Ostantkov<sup>1</sup>, A.M. Goltsev<sup>1,2</sup>

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

#### THE ROLE OF CORD BLOOD IN THE REGULATION OF THE CELLULAR AND HUMORAL LINK OF IMMUNITY IN EXPERIMENTAL ATOPIC DERMATITIS

**Background.** Atopic dermatitis (AD) as one of the most common diseases of autoimmune genesis in the structure of dermatological practice, is characterized by itching, dryness, thickening of the skin, characteristic rashes. The drugs of choice in the treatment of AD are steroidal anti-inflammatory drugs. However, the development of unwanted side effects is a serious problem attributed to using hormone therapy. The search for effective methods of treating AD is an urgent task of medicine and in particular dermatology. At the same time, there is an obvious need for the participation in the solution of this problem also of specialists-immunologists working in the field of application of cell therapy drugs, acting on various pathogenetic links of the disease. The development of new or optimization of existing methods of treating AD is the urgent task facing them.

**Objective.** Evaluation of the immunocorrective effect of lyophilized (IHCBL) and cryopreserved human cord blood leucoconcentrate (cHCBL) on a AD model.

**Methods.** The experiments were carried out on 6-month-old Wistar rats. Upon induction of AD, the inflammation focus was formed on the rat's back (9–10 cm<sup>2</sup>) by daily rubbing in a 5% alcohol-acetone solution of dinitrochlorobenzene (DNCB) for 21 days. cHCBL and IHCBL were injected intraperitoneally, 0.5 ml at a dose of  $5 \times 10^6$  cells in one day after the final DNCB treatment. The adhesive and phagocytic activity of the cells of the peritoneal cavity, the level of circulating immune complexes, the population and subpopulation of lymphocytes (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), the immunoregulatory index of lymphocytes, the concentration of immunoglobulins in the blood serum were determined.

**Results.** For AD induced by DNCB, systemic changes in the immune status are characteristic, which is expressed by changes in the parameters of cellular and humoral immunity. The most fundamental changes in cell subpopulations in spleen of rats with AD were revealed: a decrease in the number of total T-lymphocytes and their two main subpopulations (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells). Against this background, changes were noted in the monocytic-phagocytic and humoral systems of immunity. The paper shows the effectiveness of the use of cHCBL and IHCBL in the correction of pathological manifestations of experimental AD. On the background of treatment, the features of the immunocorrective effect of each of the drugs were noted. Thus, when assessing intergroup values, a more pronounced increase in T-reg was revealed in rats of the 5th group – 3.9 [3.8; 4.0] versus 3.2 [3.0; 3.3] in the 4th group ( $P < 0.01$ ); IgA level – 1.6 [1.5; 1.7] versus 1.3 [1.2; 1.4] ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions.** Thus, IHCBL exhibits immunocorrective activity in the treatment of experimental AD, surpassing in some parameters the activity of cHCBL, which is promising for its use in clinical practice.

**Keywords:** atopic dermatitis; cord blood leucoconcentrate; immune system; cryopreservation; lyophilization.