

УДК 611.018.53.088:618.48:616.5-002-056.3

Г.К. Коваль^{1*}, О.Д. Луценко¹, М.О. Бондарович¹, І.Г. Гріша¹,
Л.В. Сокіл^{1,2}, М.В. Останков¹, А.М. Гольцев^{1,2}

Терапія експериментального атопічного дерматиту кріоконсервованим і ліофілізованим лейкоконцетратами кордової крові людини

UDC 611.018.53.088:618.48:616.5-002-056.3

Н.К. Koval^{1*}, О.Д. Lutsenko¹, М.О. Bondarovich¹, І.Г. Grisha¹,
L.V. Sokil^{1,2}, M.V. Ostankov¹, A.M. Goltsev^{1,2}

Therapy With Cryopreserved and Lyophilized Cord Blood Leukoconcentrates in Experimental Atopic Dermatitis

Ключові слова: атопічний дерматит, цитокіни, кріоконсервування, ліофілізація, клітини кордової крові людини, преднізолон.

Key words: atopic dermatitis, cytokines, cryopreservation, lyophilization, human cord blood cells, prednisolone.

Атопічний дерматит (АД) є запальним захворюванням шкіри аутоімунного генезу, яке характеризується порушеннями в клітинній та гуморальній ланках імунітету [4]. Розвиток аутоімунних процесів, як правило, супроводжується зміною кількісних та якісних показників цитокінового профілю [9]. Тому очевидно є доцільність застосування препаратів з імуномодулювальною активністю, до яких можна віднести компоненти кордової крові людини.

Метою даної роботи було визначення ефективності застосування кріоконсервованих та ліофілізованих клітин кордової крові для відновлення цитокінового профілю в ексудатах «шкірного вікна» на експериментальній моделі атопічного дерматиту.

Дані експериментальні дослідження були узгоджені з комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Протокол № 5 від 16.12.2014), проведені відповідно до основних положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин,

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory skin disease of autoimmune origin, mainly characterized with various disorders of cell and humoral immunity [6]. The development of autoimmune processes is usually accompanied by change quantitative and qualitative indices of the cytokine profile [9]. Therefore, the feasibility of using drugs with immune modulatory activity, which include human cord blood components, is obvious.

This research was aimed to determine the effectiveness of using cryopreserved and lyophilized cord blood cells to restore the cytokine profile in the skin-window exudates on an experimental model of atopic dermatitis.

These experimental studies were coordinated with the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (IPCC) of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Protocol No. 5 dated 16.12.2014), conducted in accordance with the main provisions of the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (No. 3447-IV dated 21.02.2006) and the ‘European Convention for the Protection of

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України, Харків, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

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

Надійшла 07.10.2024

Прийнята до друку 21.11.2024

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**

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

Received October, 07, 2024

Accepted November, 21, 2024

які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Експерименти проводили на 6-місячних щурах-самцях ($n = 70$) лінії Вістар масою 180–200 г. Атопічний дерматит у тварин моделювали щодобовим втиранням протягом 21-ї доби у шкіру спини 5%-го спиртово-ацетонового розчину динітрохлорбензолу (ДНХБ) в один і той же час [3, 4].

Лейкоконцентрат кордової крові (ЛККЛ) отримували з цільної кордової крові людини шляхом седиментації з використанням поліглюкіну. Ліофілізований ЛККЛ (ЛЛККЛ) отримували у сублімаційній установці «УЗВ-2» (ДВ при ІПКіК НАН України, м Харків) за методом А.М. Гольцева та співавт. [2]. Для отримання кріоконсервованого ЛККЛ (кЛККЛ) використовували програмний заморожувач, заморожування ЛККЛ проводили за методом А.О. Цуцаєвої та співавт. [5].

Тварин було поділено на групи: 1 — інтактна (контроль, $n = 7$); 2 — АД без лікування ($n = 7$); 3 — стандартне лікування АД преднізолоною маззю ($n = 7$); 4 — лікування АД введенням кЛККЛ ($n = 7$); 5 — лікування АД введенням ЛЛККЛ ($n = 7$). Усі наведені вище види лікування розпочинали через добу після закінчення використання ДНХБ.

Для обґрунтування ефективності застосування ЛККЛ проводили порівняльний аналіз рівня цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10, ІФН-гамма на 7-му та 14-ту добу до та після лікування в безклітинних шкірних ексудатах за методом D.J. Marks та співавт. [8]. Після отримання супернатанта за даним методом концентрації цитокінів в ньому оцінювали з використанням наборів реагентів «ІЛ-4-ІФА-БЕСТ», «ІЛ-10-ІФА-БЕСТ», «ІФН-ІФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», РФ) на мікропланшетному фотометрі «GBG Stat Fax 2100» (Awareness Technology, США) згідно з методичними рекомендаціями виробника.

Критерієм розвитку патологічного процесу була поява набряку і вираженої еритеми на ділянці «шкіряного вікна» з подальшим утворенням щільної, прилеглої до шкіри геморагічної кірки. Тяжкість шкірних проявів оцінювали в балах: 0 — відсутність реакції; 0,5 — поява локальних осередків гіперемії; 1 — виражена гіперемія; 2 — гіперемія; 3 — різке почервоніння шкіри та набряк; 4 — утворення ерозій; 5 — формування геморагічної кірки [1].

Статистичну обробку результатів проводили методом непараметричної статистики Крускала-Уолліса з використанням програмного забезпечення Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США)

З даних, наведених у таблиці, видно, що вміст ІЛ-4 у тварин на 7-му добу після індукції

Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

Experimental investigations were carried out in 6-month-old male Wistar rats ($n = 70$) weighing 180–200 g. Atopic dermatitis in animals was modeled by daily rubbing of a 5% alcohol-acetone solution of dinitrochlorobenzene (DNCB) into the skin of the back for 21 days at the same time [5, 6].

Cord blood leukoconcentrate (CBLC) was obtained from whole human cord blood by sedimentation using polyglycine. Lyophilized CBLC (LCBLC) was obtained by means of a sublimation unit 'UZV-2' (Special Designing and Technical-Bureau at the IPCC of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv) according to the method of A.M. Goltsev *et al.* [2]. To obtain cryopreserved CBLC (cCBLC), a programmable freezer was used, the CBLC was frozen according to the method of A.O. Tsutsayeva *et al.* [8].

Animals were divided into groups: 1 – intact (control, $n = 7$); 2 – AD without treatment ($n = 7$); 3 – standard treatment of AD with prednisolone ointment ($n = 7$); 4 – treatment of AD with the introduction of cCBLC ($n = 7$); 5 – treatment of AD with the introduction of LCBLC ($n = 7$). All of the above types of treatment were started a day after the end of the use of DNCB. To substantiate the effectiveness of the use of LCBLC, the level of cytokines IL-4, IL-10, INF γ was comparatively analyzed on the 7th and 14th days before and after treatment in acellular skin exudates according to the method of D.J. Marks *et al.* [7]. After obtaining the supernatant by this method, the concentration of cytokines in it was assessed using the reagent sets 'IL-4-IFA-BEST', 'IL-10-IFA-BEST', 'IFN-IFA-BEST' (Vector-Best, Russia) with a microplate photometer 'GBG Stat Fax 2100' (Awareness Technology, USA) according to the manufacturer's methodological recommendations.

The criterion for the pathology development was the appearance of edema and pronounced erythema in the area of the skin window, with the subsequent formation of a dense, hemorrhagic crust adjacent to skin. The severity of skin manifestations was estimated in points: 0 – no reaction; 0.5 – the appearance of local foci of hyperemia; 1 – pronounced hyperemia; 2 – hyperemia; 3 – severe redness and edema; 4 – formation of erosions; 5 – hemorrhagic crust formation [1].

The results were statistically processed by the Kruskal-Wallis nonparametric statistics using the Statistica 10.0 software (StatSoft, Inc., USA).

From the data presented in the table, it is clear that the content of IL-4 in animals on the 7th day after induction of AD (group 2) was increased and



Вміст ІЛ-4, ІЛ-10 та концентрація ІФН-гамма в ексудатах «шкірного вікна» у щурів з АД до та після лікування, пг/мл
IL-4, IL-10 content and IFNG concentration in skin-window exudates in rats with AD before and after treatment, pg/ml

Група тварин Group of animals	Доба після розвитку АД 24 hrs after AD development	ІЛ-4 IL-4	ІЛ-10 IL-10	ІФН-гамма IFNG
1 (контроль) 1 (control)	–	0,29 [0,28;0,33]	6,97 [6,78;7,37]	46,50 [44,46;47,53]
2 (АД без лікування) 2 (AD with no treatment)	7	1,12 [0,96;1,29]*	21,45 [20,65;20,01]*	25,18 [23,85 28,08]*
	14	1,18 [1,08;1,29]*	11,84 [10,28;12,98]*	15,81 [15,05;16,34]*
3 (лікування АД преднізолоном) 3 (AD treatment with prednisolone)	7	0,68 [0,66;0,73]*	12,57 [11,50;13,59]*	24,12 [20,44;25,91]**
	14	0,93 [0,87;0,95]*	9,15 [8,80;9,94]**	28,73 [27,40;30,90]**
4 (лікування АД кЛККЛ) 4 (AD treatment with cCBLC)	7	0,52 [0,50;0,55]**	8,67 [8,03;8,093]**@	39,75 [38,67;41,50]**@
	14	0,41 [0,37;0,42]*	7,54 [7,37;8,09]**@	44,67 [43,92;4,47]**@
5 (лікування АД лЛККЛ) 5 (AD treatment with lCBLC)	7	0,62 [0,57;0,64]**	7,16 [6,49;7,47]**@&	38,56 [36,66;42,58]**@&
	14	0,31 [0,28;0,33]**@&	7,12 [6,95;7,19]**@&	45,79 [45,17;47,55]**@&

Примітки: Відмінності значущі ($p < 0,01$) порівняно з аналогічним показником груп тварин: * — групи 1 (інтактної); # — групи 2; @ — групи 3; & — групи 4.

Notes: Significant differences ($p < 0.01$) compared to the same index of animal groups: * – group 1 (intact); # – group 2; @ – group 3; & – group 4.

АД (група 2) був підвищеним і залишався на більш високому рівні на 14-ту добу. Також у щурів цієї групи була підвищеною концентрація ІЛ-10 порівняно з контролем, але з 7-му по 14-ту добу розвитку АД вміст прозапального медіатора зменшився в 2 рази. Вміст ІФН-гамма в шкірних ексудатах у щурів групи 2 на 7-му і 14-ту добу був знижений в 1,7 і 2,9 рази відповідно (таблиця). Відомо, що захворюванням з ознаками запалення притаманне підвищення рівня прозапальних цитокінів, однак з даних нашого дослідження видно, що для АД властиві дещо інші закономірності. Подібні результати були отримані також К. Жуо та співавт. [6] та В.А. Kallmann та співавт. [7].

У процесі лікування преднізолоном у тварин спостерігали тенденцію до нормалізації досліджуваних цитокінів як на 7-му, так і на 14-ту добу експерименту. У щурів, яких лікували введенням кЛККЛ (група 4), було відзначено позитивний ефект значущого зниження рівней ІЛ-4 і ІЛ-10, а також значущого підвищення концентрації ІФН-гамма порівняно з тваринами з АД

remained at a higher level on the 14th day. Also, the concentration of IL-10 in rats of this group was increased compared to the control, but from the 7th to the 14th day of the development of AD, this anti-inflammatory mediator decreased by 2 times. The content of IFN-gamma in skin exudates in rats of group 2 on days 7 and 14 was reduced by 1.7 and 2.9 times, respectively (Table). It is known that diseases with signs of inflammation are characterized by an increase in the level of pro-inflammatory cytokines, however, the data of our study show that AD is characterized by slightly different patterns. Similar results were also obtained by K. Jujo *et al.* [3] and B.A. Kallmann *et al.* [4].

During prednisolone treatment in animals, a tendency towards normalization of the studied cytokines was observed both on the 7th and 14th days of the experiment. In rats treated with cCBLC (group 4), a positive effect of a significant decrease in IL-4 and IL-10 levels was noted, as well as a significant increase in IFNG concentration compared with animals with AD and the group of animals treated



та групою щурів, яких лікували преднізолоном ($p < 0,01$). У тварин, яким вводили ЛЛККЛ (група 5), показники всіх цитокінів, що вивчалися, на 7-му добу наближалися до контрольних, а на 14-ту добу відповідали контрольним значенням (таблиця).

Результати вивчення тяжкості шкірних проявів у тварин досліджуваних груп показали, що АД, індукований за допомогою ДНХБ, проявлявся значними змінами шкірного покриву: гіперемією, набряком, формуванням серозно-гнійної кірки. На 7-му добу після нанесення на шкіру щурів останньої дози ДНХБ маніфестувалась картина розвиненої патології. Тяжкість запалення становила ($4,14 \pm 0,38$) бала. У тварин цієї групи без лікування до 14-ї доби спостереження відзначали зменшення тяжкості прояву запальних реакцій шкіри в середньому в 2 рази ($2,43 \pm 0,53$) бала.

Лікування тварин з АД преднізолоном супроводжувалось тенденцією до зменшення запалення шкірних покривів на 7-му добу експерименту, при цьому ступінь тяжкості шкірних проявів становив ($4,0 \pm 0,58$) бала проти ($4,14 \pm 0,38$) бала у тварин без лікування. До 14-ї доби запальний процес зменшувався ще в більшій мірі на тлі зменшення ступеня ураження шкірних покривів до ($2,14 \pm 0,38$) балів.

У тварин, які отримували у якості лікувального препарату кЛККЛ, вже на 7-му добу експерименту маніфестувався початок відновлення шкірного покриву, яке оцінювалось в ($3,71 \pm 0,49$) бала. До 14-ї доби спостереження у тварин тяжкість запальних проявів склала ($1,86 \pm 0,38$) бала.

У тварин, яких лікували ЛЛККЛ, на 7-му добу експерименту відзначалась позитивна динаміка зміни шкірного покриву. Ступінь прояву запалення шкіри значуще зменшився порівняно з контрольною групою на 10% ($3,86 \pm 0,38$ бала). На 14-ту добу показник значуще відрізнявся від такого у тварин групи з АД і склав в середньому ($2,14 \pm 0,38$) бала проти ($2,43 \pm 0,53$) бала у тварин без лікування.

Отже, у період з 7-ї по 14-ту добу розвитку АД основними змінами в цитокіновому профілі на локальному рівні можна вважати значуще підвищення вмісту ІЛ-4 та ІЛ-10 в ексудатах «шкірного вікна» по відношенню до контрольних величин ($p < 0,01$). У відношенні ключового цитокіну, що продукується Тх1 лімфоцитами, а саме ІФН-гамма, встановлено тенденцію до зниження його вмісту в ексудатах «шкірного вікна» у тварин з АД.

with prednisolone ($p < 0.01$). In animals treated with ICBLC (group 5), the indices of all studied cytokines approached control values on the 7th day, and on the 14th day they corresponded to control values (Table).

The results of studying the severity of skin manifestations in animals of the investigated groups showed that AD induced by DNCB was manifested by significant changes in skin: hyperemia, edema, and formation of serous-purulent crust. On the 7th day after the application of the last dose of DNCB to the skin of rats, a picture of advanced pathology was found. The severity of inflammation was (4.14 ± 0.38) points. In animals of this group without treatment, by the 14th day of observation, a decrease in the severity of skin inflammatory reactions was noted on average by 2 times (2.43 ± 0.53) points.

Treatment of animals with AD with prednisolone was accompanied by a tendency to reduce skin inflammation on day 7 of the experiment, while the severity of skin manifestations was (4.0 ± 0.58) points versus (4.14 ± 0.38) points in animals without treatment. By the 14th day, the inflammatory process decreased even more against the background of a decrease in the degree of damage to skin manifestations to (2.14 ± 0.38) points.

For the animals that received cCBLC as a therapeutic drug, the start of skin restoration was observed on day 7 of the experiment, which was estimated at (3.71 ± 0.49) points. By the 14th day of observation in animals, the severity of inflammatory manifestations was (1.86 ± 0.38) points.

In animals treated with ICBLC, on day 7 of the experiment, positive dynamics of skin changes were noted. The skin inflammation rate significantly decreased compared to the control group by 10% (3.86 ± 0.38) points. On the 14th day, the index significantly differed from that in animals in the AD group and averaged (2.14 ± 0.38) points versus (2.43 ± 0.53) points in animals without treatment.

So, in the period from day 7 to day 8 of AD development, the main changes in the cytokine profile at the local level can be considered a significant increase in the content of IL-4 and IL-10 in the skin-window exudates in relation to the control values ($p < 0.01$). Regarding the key cytokine produced by Th1 lymphocytes, namely IFNG, a tendency to decrease its level in the skin-window exudates in animals with AD was established.

Thus, according to the levels of cytokine and manifestation rate of skin inflammation in



Таким чином, за рівнями цитокінів та ступенем прояву запалення шкірі у тварин з atopічним дерматитом доведено ефективність застосування як ЛЛККЛ, так і КЛККЛ на відміну від стандартного лікування преднізолоном.

Література

1. Березнякова АІ, Черемісіна ВФ, Жемела ОД. Особливості стану гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом. Фізіологічний журнал. 2014; 60 (4): 50–5.
2. Гольцев АМ, Сокол ЛВ, Стецишин ВГ, Мосійчук ВВ, Бондарович МО, Гриша ІГ, Останков МВ, Луценко ОД, Останкова ЛВ, Чернишенко ЛГ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 125846. 25.05.2018.
3. Коваль Г, Бондарович М, Гольцев А. Пуповинна кров як коректор гематологічних і цитоморфологічних характеристик лімфогемопоетичних органів при експериментальному atopічному дерматиті. Innov Biosyst Bioeng. 2023; 7(3): 3–20.
4. Коваль Г, Луценко ОД, Бондарович МО, та ін. Роль кордової крові в регуляції клітинної та гуморальної ланки імунітету при експериментальному atopічному дерматиті. Innov Biosyst Bioeng. 2021; 5 (3): 167–77.
5. Цуцаєва АО, Грищенко ВІ, Кудокотсева ОВ, Щеглов АВ, Тупчиєнко ГС, Прокопчук ОС. винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові. Патент України № 31847А, 15.12.2000. 21.
6. Jujo K, Renz H, Abe J, et al. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopіc dermatitis promotes IgE synthesis. J Allergy Clin Immunol. 1992; 90(3 Pt 1): 323–31.
7. Kallmann BA, Kolb H, Huth M, et al. Interleukin-10 is a predominant cytokine in atopіc dermatitis. Arch Dermatol. 1996; 132(9): 1133–4.
8. Marks DJ, Radulovic M, McCartney S, et al. Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans. Inflamm Res. 2007; 56(4): 168–74.
9. Yamamura Y, Nakashima C, Otsuka A. Interplay of cytokines in the pathophysiology of atopіc dermatitis: insights from Murin models and human. Front Med (Lausanne) [Internet]. 2024 Mar 25 [cited 2024 Oct 1]; 11: 1342176. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2024.1342176/full>

animals with atopіc dermatitis, the effectiveness of both ICBLC and cCBLC has been proven versus the standard treatment with prednisolone.

References

1. Berezhnyakova AI, Cheremisina VF, Zhemela OD. [Cellular and humoral immunity in rats with atopіc dermatitis]. Fiziol. Zh. 2014; 60 (4): 50–55. Ukrainian.
2. Goltsev AM, Sokil LV, Stetsyshyn VG, Mosiychuk VV, Bondarovich MO, Grisha IG, Ostankov MV, Lutsenko OD, Ostankova LV, Chernyshenko LH, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, patent owner. Method of lyophilization of cord blood leukoconcentrate. Patent of Ukraine No. 125846. 05/25/2018.
3. Jujo K, Renz H, Abe J, et al. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopіc dermatitis promotes IgE synthesis. J Allergy Clin Immunol. 1992; 90(3 Pt 1): 323–31.
4. Kallmann BA, Kolb H, Huth M, et al. Interleukin-10 is a predominant cytokine in atopіc dermatitis. Arch Dermatol. 1996; 132(9):1133–4.
5. Koval H, Bondarovich M, Goltsev A. [Cord blood as a corrector of hematological and cytomorphological characteristics of lymphohematopoietic organs in experimental atopіc dermatitis]. Innov Biosyst Bioeng. 2023; 7(3): 3–20. Ukrainian.
6. Koval HK, Lutsenko OD, Bondarovich MO, et al. [The role of cord blood in the regulation of cellular and humoral immunity in experimental atopіc dermatitis]. Innov Biosyst Bioeng. 2021; 5 (3): 167–77. Ukrainian.
7. Marks DJ, Radulovic M, McCartney S, et al. Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans. Inflamm Res. 2007; 56(4): 168–74.
8. Tsutsayeva AO, Grishchenko VI, Kudokotseva OV, Shcheglov AV, Tupchienko GS, Prokopyuk OS. inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, patent holder. Method of cryopreservation of hematopoietic cells of cord blood. Patent of Ukraine No. 31847A, 15.12.2000. 21.
9. Yamamura Y, Nakashima C, Otsuka A. Interplay of cytokines in the pathophysiology of atopіc dermatitis: insights from Murin models and human. Front Med (Lausanne) [Internet]. 2024; 11: 1342176. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2024.1342176/full>

