

МЕДИЦИНА

УДК 616-002+632.938+615.451.16+576.5
DOI <https://doi.org/10.32689/2663-0672-2024-1-1>

Федір ГЛАДКИХ

доктор філософії в галузі охорона здоров'я за спеціальністю «Медицина»,
кафедра інфекційних хвороб та клінічної імунології,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України,
старший науковий співробітник відділу променевої патології та паліативної медицини,
Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва
Національної академії медичних наук України», (fedir.hladkykh@gmail.com)
ORCID: 0000-0001-7924-4048

БІОХІМІЧНА ОЦІНКА АКТИВНОСТІ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ПІД ВПЛИВОМ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА МОДЕЛІ АУТОІМУННОГО АРТРИТУ У ЩУРІВ

Актуальність теми дослідження. Добре відомо, що запалення при ревматоїдному артриті (РА) ініціюється та підтримується складною взаємодією між різними підтипами дендритних клітин, Т-клітинами, макрофагами, В-клітинами, нейтрофілами, фібробластами та остеокластами. У лікуванні РА в даний час найчастіше використовують глюкокортикостероїди, синтетичні та біологічні протиревматичні препарати, що модифікують захворювання та нестероїдні протизапальні препарати. Перспективним підходом до лікування хворих на РА виступає терапія на основі мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Іншим напрямком лікування хворих на РА виступає застосування безклітинних біотехнологічних засобів – кріоекстракту плевенти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС).

Мета роботи – охарактеризувати вплив кріоекстрактів плаценти та серезінки, а також кондиціонованого середовища МСК (КС-МСК) на активність запального процесу при ад'ювантному артриті (АА) у щурів.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації. Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили в/м з інтервалом 2 дні. На 28 добу експерименту тварин виводили з експерименту, відбирали зразки змішаної (венозної та артеріальної) крові та визначали вміст С-реактивного білка (С-РБ), активність лужної фосфатази (ЛФ) та вміст серомукоїду.

Результати та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що на 28 день експерименту у щурів з АА відмічається статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання вмісту С-РБ у 4,4 рази відносно показників інтактних щурів. Крім того у щурів з АА відмічалось підвищення активності ЛФ ($p < 0,001$) на 76,5% та зростання вмісту серомукоїду ($p < 0,035$) на 97,1% відносно показників інтактних щурів. Серед досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів найвиразніше пригнічення запального процесу на 28 добу експерименту на моделі АА у щурів відмічалось на тлі застосування КС-МСК – рівень С-РБ знизився ($p < 0,001$) на 54,5% відносно нелікованих щурів з АА, що на 16,7% ($p < 0,1$) було нижче за аналогічний показник щурів з АА, яким вводили диклофенак натрію. Досліджувані кріоекстракти поступались КС-МСК за здатністю пригнічувати інтенсивність запального процесу у щурів з АА за даними досліджуваних біохімічних показників. За здатністю зменшувати вміст С-РБ КЕС (18,2%, $p < 0,01$) поступався КЕП (27,3%, $p < 0,01$), що вказувало на більш виразні протизапальні властивості КЕП.

Висновки. Встановлено здатність досліджуваних безклітинних біологічних засобів пригнічувати активність запального процесу на моделі АА у щурів за даними біохімічних досліджень. За виразністю протизапальної активності (за зниженням рівня С-РБ), досліджувані засоби вірогідно ($p < 0,01$) можна розташувати в наступній послідовності: КС-МСК (54,5%) > КЕП (27,3%) > КЕС (18,2%).

Ключові слова: аутоімунні захворювання, біологічна терапія, мезенхімальні стовбурові клітини, кріоекстракція, біохімічні дослідження.

Fedir Hladkykh. BIOCHEMICAL EVALUATION OF THE ACTIVITY OF THE INFLAMMATORY PROCESS UNDER THE INFLUENCE OF CELL-FREE CRYOPRESERVED BIOLOGICAL AGENTS IN MODELS OF AUTOIMMUNE ARTHRITIS IN RATS

Introduction. It is well known that inflammation in rheumatoid arthritis (RA) is initiated and maintained by a complex interplay between different subtypes of dendritic cells, T cells, macrophages, B cells, neutrophils, fibroblasts and osteoclasts. Glucocorticoids, synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs are currently most commonly used in the treatment of RA. Mesenchymal stem cell (MSC) therapy is a promising approach to the treatment of RA patients. Another direction in the treatment of patients with RA is the use of cell-free biotechnological means – cryoextract of blood cells (CEP), cryoextract of the spleen (CES).

The aim of the study was to characterize the effect of cryoextracts of the placenta and seryenium, as well as the conditioned medium of MSCs (CM-MSC) on the activity of the inflammatory process in adjuvant arthritis (AA) in rats.

Materials and methods. Experimental studies were conducted on 42 male shuras weighing 200–220 g in accordance with the basic bioethical norms of the Helsinki Declaration of the World Medical Association. AA treatment was carried out from 14 to 28 days. CEP, CES and CM-MSC were administered intramuscularly with an interval of 2 days. On the 28th day of the experiment, the animals were removed from the experiment, samples of mixed (venous and arterial) blood were taken and the content of C-reactive protein (C-RP), alkaline phosphatase (AP) activity and seromucoid content were determined.

Research results and their discussion. The conducted research showed that on the 28th day of the experiment, a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the content of C-RP by 4.4 times was observed in rats with AA compared to the indicators of intact rats. In addition, rats with AA showed an increase in AP activity ($p < 0.001$) by 76.5% and an increase in seromucoid content ($p < 0.035$) by 97.1% compared to the parameters of intact rats. Among the investigated cell-free cryopreserved biological agents, the most pronounced inhibition of the inflammatory process on the 28th day of the experiment on the AA model in rats was noted against the background of the use of CM-MSC – the level of C-RP decreased ($p < 0.001$) by 54.5% compared to untreated rats with AA, which on 16.7% ($p < 0.1$) was lower than the similar indicator of rats with AA, which were injected with diclofenac sodium. The studied cryo-extracts were inferior to CM-MSC in their ability to suppress the intensity of the inflammatory process in rats with AA according to the data of the studied biochemical indicators. CES (18.2%, $p < 0.01$) was inferior to CEP (27.3%, $p < 0.01$) in its ability to reduce the content of C-RP, which indicated more pronounced anti-inflammatory properties of CEP.

Conclusions. The ability of the investigated cell-free biological agents to inhibit the activity of the inflammatory process on the AA model in rats was established according to the data of biochemical studies. According to the expressiveness of the anti-inflammatory activity (according to the decrease in the level of C-RP), the investigated means can probably ($p < 0.01$) be placed in the following sequence: CM-MSC (54.5%) > CEP (27.3%) > CES (18.2%).

Key words: autoimmune diseases, biological therapy, mesenchymal stem cells, cryoextraction, biochemical studies.

Вступ. Добре відомо, що запалення при ревматоїдному артриті (РА) ініціюється та підтримується складною взаємодією між різними підтипами дендритних клітин, Т-клітинами, макрофагами, В-клітинами, нейтрофілами, фібробластами та остеокластами. Так, запалення при РА індукують аутореактивні Th1 або Th17 Т-клітини або локально активовані антигенпрезентуючі клітини, які презентують пептиди, отримані з аутоантигену. В ураженому суглобі активовані аутореактивні Т-клітини згодом активують макрофаги та фібробласти через секрецію прозапальних медіаторів фактор некрозу пухлин (ФНП)- α , інтерлейкін (ІЛ)-17, інтерферон- γ та активатора рецептора ліганду ядерного фактора κB (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* – RANK-L). Активовані макрофаги, у свою чергу, виділяють велику кількість сильних прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6, які сприяють створенню та підтримці запального середовища. Активовані Т-клітини також допомагають аутореактивним В-клітинам, що призводить до вироблення антитіл проти цитрулінового білка та аутоантитіл до ревматоїдного фактора. Ці аутоантитіла додатково викликають запалення шляхом прямої активації макрофагів або запуску каскаду комплементу. Крім того, RANK-L, що виробляється активованими фібробластами, сприяє диференціюванню остеокластів від макрофагів. Разом із матриксними металопротеазами, остеокластами та антитілами, отриманими з фібробластів, активовані нейтрофіли опосередковують залежне від запалення руйнування хряща та ерозію кісток [12, 1, 16].

У лікуванні РА в даний час найчастіше використовують глюкокортикоїди, синтетичні та біологічні протиревматичні препарати, що модифікують захворювання (*disease-modifying antirheumatic drugs* –

DMARD) та нестероїдні протизапальні препарати (НПЗЗ). Перспективним підходом до лікування хворих на РА виступає терапія на основі мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) [14, 8]. Варто зазначити, що механізм імуномодуляції МСК регулюється як міжклітинними взаємодіями, так і паракринним ефектом через секрецію розчинних факторів. Саме тому у якості потенційного терапевтичного агента доцільно розглядати не тільки МСК, а і їх похідні, зокрема кондиціоноване середовище (КС).

Іншим напрямком лікування хворих на РА виступає застосування безклітинних біотехнологічних засобів – кріоекстракту плевренти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС), які за даними літератури чинять протизапальну дію [7, 10].

Мета дослідження – охарактеризувати вплив кріоекстрактів плаценти та селезінки, а також кондиціонованого середовища МСК на активність запального процесу при ад'ювантному артриті у щурів.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації. Для моделювання експериментального РА – ад'ювантного артрити (АА) у щурів використовували повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ) [4, 6]. Як відомо, АА у щурів має всі морфологічно-функціональні ознаки РА у людини та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. АА моделювали субплантарним веденням щурам («0» день експерименту) ПАФ (*Thermo Fisher Scientific, США*) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [17].

Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили в/м з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та

26 дні. У якості референс-препарату використано НПЗЗ – диклофенак натрію (ДН), який вводили внутрішньом'язово (в/м) в дозі 8,0 мг/кг [9]. Щурів розподіляли на 6 груп:

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

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

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

IV – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [15];

V – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [2];

VI – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [5].

На 28 добу експерименту тварин виводили з експерименту, відбирали зразки змішаної (венозної та артеріальної) крові та визначали вміст С-реактивного білка (С-РБ), активність лужної фосфатази (ЛФ) та вміст серомукоїду.

Вміст С-РБ визначали за ступенем аглютинації за допомогою латексного діагностичного тесту для виявлення С-реактивного білка в сироватці крові та виражали у мг/л [11]. **Активність ЛФ** визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на властивості ЛФ гідролізувати ефірний зв'язок у β -гліцерофосфаті з відщепленням фосфатної кислоти. Вміст фосфору, що утворився, визначають за реакцією з молібденовим реактивом у присутності аскорбінової кислоти. Активність ЛФ виражали у мкмоль / (год \times л) [3]. **Вміст серомукоїду** в сироватці крові визначали спектрофотометрично за методом Weimer H.E. та Moshin R.J., який полягає у осадженні білків сироватки крові 1,8 М розчином перхлорної кислоти (HClO₄), виділенні серомукоїду з фільтрату за допомогою фосфорно-вольфрамової кислоти та подальшому кількісному визначенні за різницею світлопоглинання при довжині хвилі $\lambda = 260$ нм і $\lambda = 280$ нм. Вміст серомукоїду виражали у ммоль/л [11].

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel». Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена.

При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді "M \pm m" (M \pm SE), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95 % ДІ:), де 95 % ДІ: – 95 % довірчий інтервал. При ненормальному розподілі отриманих величин дані представлено у вигляді Me [LQ; UQ], де Me – медіана, [LQ; UQ] – верхня межа нижнього квантиля (lower quartile – LQ) та нижня межа верхнього квантиля (upper quartile – UQ). Для графічного представлення даних обрано діаграми розмаху (box-and-whiskers diagram – «шухлядові» діаграми з «вусами») [20, 18, 19].

Результати дослідження та їх обговорення.

Проведене дослідження показала, що на 28 день експерименту у щурів з АА відмічається статистично вірогідне (p<0,001) зростання вмісту С-РБ у 4,4 рази відносно показників інтактних щурів (табл. 1). За даними Pore J.E. та співав. (2021 р.) [13] С-РБ є не тільки маркером системного запалення при РА, а є також імунним регулятором, який відіграє важливу роль у запальних шляхах, пов'язаних з РА, і сприяє атерогенним ефектам. Супутні захворювання, пов'язані із системним запаленням, є поширеними при РА, а С-РБ асоціюється з ризиком серцево-судинних захворювань, діабету, метаболічного синдрому, легеневих захворювань і депресії. Крім того у щурів з АА відмічалось підвищення активності ЛФ (p<0,001) на 76,5% та зростання вмісту серомукоїду (p<0,035) на 97,1% відносно показників інтактних щурів (рис. 1).

На тлі застосування референс-препарату ДН у щурів з АА на 28 день експерименту відмічено статистично вірогідне зниження вмісту С-РБ (p<0,01) на 45,5%, зниження активності ЛФ (p<0,001) на 26,2% та зниження вмісту серомукоїду на 21,7% (p<0,3) відносно показників щурів контрольної групи (АА без лікування).

Серед досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів найвиразніше пригнічення запального процесу на 28 добу експерименту на моделі АА у щурів відмічалось на тлі застосування КС-МСК – рівень С-РБ знизився (p<0,001) на 54,5% відносно нелікованих щурів з АА, що на 16,7% (p<0,1) було нижче за аналогічний показник щурів з АА, яким вводили ДН (див. табл. 1).

Оцінка інтенсивності запального процесу у щурів з АА на 28 день експерименту у щурів, яким вводили КС-МСК також показала, що у тварин цієї групи відмічено статистично вірогідне зниження на 38,5% активності ЛФ та зниження (p<0,035) вмісту серомукоїду на 47,8% відносно показників нелікованих щурів з АА. Варто зазначити, що зниження вказаних показників перевищувала анало-

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на біохімічні показники щурів з АА на 28 день експерименту (М ± m, 95 % ДІ, n=42)

Досліджуваний показник, одиниці вимірювання	Умови експерименту					
	I (1) група	II (2) група	III (3) група	IV (4) група	V (5) група	VI (6) група
	Інтактні щури	Контроль (АА без лікув.)	АА + ДН	АА + КЕП	АА + КЕС	АА + КС-МСК
<i>n</i>	7	7	7	7	7	7
С-реактивний білок, мг/л	5,0 [5,0; 7,0]	22,0 [22,0; 25,5] $p_1 < 0,001$ [340,0%]	12,0 [10,5; 15,5] $p_2 < 0,01$ [45,5%]	16,0 [14,0; 17,5] $p_2 < 0,01$ [27,3%] $p_3 < 0,1$ [33,3%]	18,0 [16,5; 20,5] $p_2 < 0,01$ [18,2%] $p_3 < 0,05$ [50,5%]	10,0 [8,5; 13,5] $p_2 < 0,001$ [54,5%] $p_3 < 0,1$ [16,7%]
Активність лужної фосфатази, мкмоль / (год×л)	231,4±6,3 (95 % ДІ: 219,0–243,8)	408,6±10,8 (95 % ДІ: 387,4–429,7) $p_1 < 0,001$ [76,5%]	301,4±8,3 (95 % ДІ: 285,2–317,7) $p_2 < 0,001$ [26,2%]	282,9±9,9 (95 % ДІ: 263,4–302,3) $p_2 < 0,001$ [30,8%] $p_3 < 0,18$ [6,2%]	274,3±12,9 (95 % ДІ: 249,0–299,5) $p_2 < 0,001$ [32,9%] $p_3 < 0,11$ [9,0%]	251,4±16,1 (95 % ДІ: 219,9–283,0) $p_2 < 0,001$ [38,5%] $p_3 < 0,02$ [16,6%]

Примітки.

1. p_1 – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
2. [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
3. Індексами $1, 2, 3$ вказано номер групи, з показниками якої проведено зрівняння.

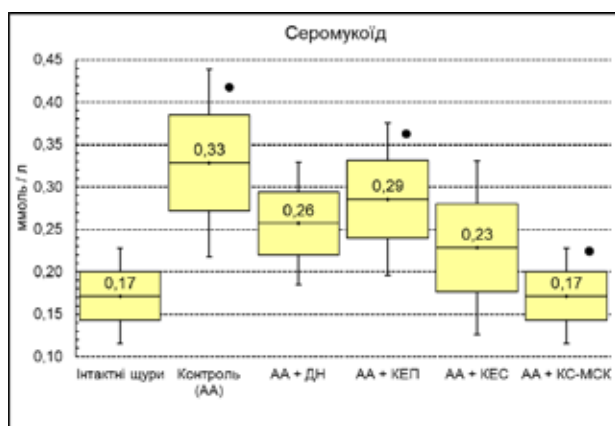


Рис. 1. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на вміст серомукоїду в сироватці крові щурів з АА на 28 день експерименту

Примітка. Розподіл величин кожної групи вибіркової сукупності нормальний. Бокси включають значення стандартної похибки середнього арифметичного, вертикальні лінії за межами боксів – 95% довірчий інтервал. Горизонтальна лінія всередині боксу – середнє арифметичне значення; ● – $p \leq 0,05$ відносно показників інтактних щурів.

гічні зміни на тлі застосування референс-препарату ДН, відповідно активність ЛФ була нижчою на 16,6% ($p < 0,02$), а рівень серомукоїду був нижчим на 33,3% ($p < 0,09$) відносно показників тварин з АА, яким вводили ДН (див. табл. 1, рис. 1).

Досліджувані кріоекстракти поступалися КС-МСК за здатністю пригнічувати інтенсивність запального процесу у щурів з АА за даними досліджуваних біохімічних показників. За здатністю зменшувати вміст С-РБ КЕС (18,2%, $p < 0,01$) поступався КЕП (27,3%, $p < 0,01$), що вказувало на більш виразні протизапальні властивості КЕП. За здатністю пригнічувати активність ЛФ у щурів з АА на 28 день експерименту досліджувані кріоекстракти проявляли співставну активність – на рівні 30,8%–32,9% ($p < 0,001$), що незначно (на 6,2%–9,0%) перевищувало активність ДН (див. табл. 1).

Висновки. Встановлено здатність досліджуваних безклітинних біологічних засобів пригнічувати активність запального процесу на моделі АА у щурів за даними біохімічних досліджень. За виразністю протизапальної активності (за зниженням рівня С-РБ), досліджувані засоби вірогідно ($p < 0,01$) можна розташувати в наступній послідовності: КС-МСК (54,5%) > КЕП (27,3%) > КЕС (18,2%).

Перспективи подальших досліджень. Встановлена здатність досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів знижувати інтенсивність запального процесу у щурів з експериментальним артритом за даними біохімічних досліджень слугує підґрунтям для подальших досліджень механізмів протизапальної активності вказаних засобів.

Список використаних джерел:

1. Aletaha D., Smolen J.S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*. 2018. № 320 (13). P. 1360–1372. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.13103>
2. Bespalova I.G. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin: thesis. biol. n.: in specialty 03.00.19 – Cryobiology, Kharkiv, 2016. 162 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>
3. Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphate with five cubic millimeters of serum. *The Journal of Biological Chemistry*. 1946;164:321–329.
4. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947. № 1. P. 291–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
5. Globa V.Yu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. Thesis in specialty 222 – Medicine, Kharkiv, 2021. 156 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>
6. Harold F. Stils, adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants, *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 2005. № 46 (3). P. 280–293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
7. Hladkykh F.V. Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium on background of its combined use with cryopreserved placenta extract in experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021. № 31 (4). P. 364–367. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>
8. Hladkykh F.V. Current understanding of the immunological basis of rheumatoid arthritis: from post-translational modification of proteins to the use of disease-modifying antirheumatic drugs. *Eastern Ukrainian medical journal* 2023. № 11(4). P. 326–336. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11\(4\):326-336](https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11(4):326-336)
9. Hladkykh F.V. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization. Vinnytsia: Tvoty; 2022. 216 p. <https://doi.org/10.46879/2022.1>
10. Hladkykh F.V., Liadova T.I. Analgesic potential of cryoextracts of biological tissues and conditioned media of mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune arthritis. *Odesa Medical Journal*. 2024. № 1 (186). P. 35–41.
11. Kumar D.V., Gill P.K. Basic concepts in clinical biochemistry: a practical guide. Springer Singapore. 2018; 175 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8186-6>.
12. Lin Y.J., Anzaghe M., Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020. № 9(4). P. 880. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9040880>
13. Pope J.E., Choy E.H. C-reactive protein and implications in rheumatoid arthritis and associated comorbidities. *Semin Arthritis Rheum*. 2021. № 51 (1). P. 219–229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.11.005>
14. Sarsenova M, Issabekova A, Abisheva S, Rutskaaya-Moroshan K, Ogay V, Saparov A. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 27;22(21):11592. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms222111592>
15. Shepitko V.I. Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs: dissertation. Doctor of Medicine: special. 14.01.35 – Cryomedicine, Kharkiv, 2004. 326 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>
16. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016. № 388 (10055). P. 2023–2038. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
17. Stefanov O.V., ed. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
18. Tripathy J.P. Secondary data analysis: ethical issues and challenges. *Iranian Journal of Public Health*. 2013. № 42 (12). P. 1478–1479.
19. Yan F, Robert M., Li Y. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2017. № 9 (5). P. 157–163.
20. Zar J.H. Biostatistical analysis (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014; 960 p.