

Гладких Ф.В.^{1,2}, Лядова Т.І.¹

**Експериментальне вивчення
нефропротекторних
властивостей кріоекстрактів
плаценти та селезінки, а також
кондиціонованого середовища
мезенхімальних стовбурових клітин
при аутоімунній мембранозній
нефропатії**

¹Харківський національний університет
імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна

²Державна установа «Інститут медичної радіології
та онкології імені С.П. Григор'єва Національної
академії медичних наук України»,
м. Харків, Україна

Hladkykh F.V.^{1,2}, Liadova T.I.¹

**Experimental study
of the nephroprotective properties
of cryoextracts of the placenta and
spleen, and the conditioned medium
of mesenchymal stem
cells on the background
of autoimmune membranous
nephropathy**

¹V.N. Karazin Kharkiv National University,
Kharkiv, Ukraine

²State Organization "Grigoriev Institute for Medical
Radiology and Oncology
of the National Academy of Medical Sciences
of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

fedir.hladkykh@gmail.com

Вступ

Мембранозна нефропатія (далі – МН) є органоспецифічним аутоімунним захворюванням, яке характеризується субепітеліальними імунними відкладеннями, розширенням базальної мембрани клубочка та дифузним пошкодженням відростків гломерулярних епітеліальних клітин (подоцитів) [1]. Термін «мембранозна нефропатія» позначає не окреме захворювання, а гістологічну картину, спільну для кількох окремих етіологій [2]. Особливості біопсії, характерні для мембранозної нефропатії, включають триаду:

(1) потовщення стінки капіляра, що візуалізується за допомогою світлової мікроскопії;

(2) електронно-щільні субепітеліальні імунні відкладення, які ідентифікуються за допомогою електронної мікроскопії;

(3) активну реакцію гранульованих периферичних капілярних петель на IgG методом імунофлюоресценції [3].

Однією із ключових передумов екстраренальної аутоімунної відповіді, яка залучає нирки, є те, що ці антигенні білки повинні експресуватися в нирках, точніше, у подоцитах [4]. Основним антигеном за МН виступає описаний у 2009 р. «рецептор фосфоліпази-A2 М-типу» (PLA2R), який належить до сімейства манозних рецепторів і є трансмембранним глікопротеїном типу I з масою 185 кДа, позаклітинна частина якого складається з N-кінцевого домену, багатого на

цистеїн (CysR або рицин B), одного домену фібронектину типу II (FnII) та лектиноподібних доменів С-типу (CTLD) [4; 5]. Вміст саме анти-PLA2R-антитіл слугує прогностичним параметром ефективності імуносупресивної терапії. Із 2014 р. також були виявлені інші цільові антигени – THSD7A, EXT1/2, NELL1, Sema3B, NCAM1, PCDH7, HTRA1 та NTNG1. Деякі із цих антигенів продемонстрували асоціації МН із деякими специфікаціями, як-от, наприклад, Sema3B, що переважає в дітей, THSD7A – у разі деяких новоутворень, EXT1/2 – із системним червоним вовчаком та іншими системними аутоімунними захворюваннями [6]. Інша ключова передумова полягає в тому, що аутоімунні індукційні явища поза нирками повинні спеціально індукувати експозицію цих антигенів, як-от конформаційні зміни, молекулярне моделювання або посилені експресія [4].

МН є рідкісним захворюванням – захворюваність у західному світі оцінюється в 1,2 випадку на 100 000 осіб/рік [7]. МН є основною причиною нефротичного синдрому в дорослих білої раси без діабету (приблизно 30%). За даними *S.A. Bobart та співавтори (2021 р.)* [8], первинна МН, пов'язана з антитілами до PLA2R, зазвичай вражає чоловіків (75% випадків) із середнім віком 52 роки. Натомість МН, пов'язана із системним аутоімунним захворюванням, частіше трапляється в жінок (81% випадків) у молодому віці. МН, асоційована зі злоякісними новоутвореннями, вражає пацієнтів старшого віку, середній вік яких становить 65 років

[6; 8]. Незважаючи на те, що МН може спонтанно регресувати без лікування, у третини пацієнтів спостерігається прогресуюча втрата функції нирок, що може розвинути до термінальної стадії ниркової недостатності в середньому через 5 років після встановлення діагнозу [2].

Патолофізіологія МН була в центрі досліджень протягом понад 50 років, і багато робіт стосуються активації шляхів комплементу в разі експериментальних захворювань і захворювань людини [2]. Сучасні концепції щодо патогенезу МН в основному походять від ранніх досліджень, проведених на моделі нефриту В.Р. Хеймана [9]. W.R. Neumann зі співавторами (1965 р.) [10] вводили неочищені екстракти нирок у поєднанні з ад'ювантом Фрейнда шурам для розвитку МН. Ця модель називається *моделлю активного нефриту Хеймана* [9]. Згодом була розроблена *модель пасивного нефриту Хеймана*, коли субфракцію проксимальних каналців шурів, названу фракцією 1А (Fx1A), виділяли та вводили вівцям для отримання антитіл, які потім вводили шурам [9].

Лікування хворих на МН має бути індивідуальним і передбачає корекцію ускладнень нефротичного синдрому, консервативну терапію для зменшення протеїнурії та нефропротекції й імуносупресію [6]. Вибір імуносупресивної схеми залежатиме від стратифікації ризику та характеристик пацієнта. Важливо підкреслити, що монотерапія стероїдами неефективна і не показана за наявності МН [6]. Незважаючи на значні досягнення у знаннях і клінічному лікуванні МН, хвороба все ще демонструє гетерогенний прогноз.

Серед пацієнтів із МН, які потребують терапевтичного втручання, лише 60% продемонстрували часткову або цілковиту ремісію протягом 24-місячного періоду лікування **ритуксимабом** [11]. Як відомо, ритуксимаб є моноклональним антитілом проти CD20, яке нині вважається терапією вибору за рефрактерних захворювань, на додаток до варіанту початкової терапії в разі середнього або високого ризику. Застосування **дексаметазону та димедролу** може знизити ризик розвитку інфекцій під час лікування ритуксимабом, проте з'являється ризик реактивації гепатиту за його наявності в анамнезі пацієнта.

Схема перорального прийому **циклофосфаміду**, комбінованого зі стероїдами, яка називається «*модифікована Понтічеллі*», використовується як терапія, якій віддають перевагу в пацієнтів із дуже високим ризиком, тобто коли спостерігається швидке зниження функції нирок і важкий нефротичний синдром [6].

Модифікована схема Понтічеллі така:

1) місяці № № 1, 3 та 5: метилпреднізолон 1 г (в/в) протягом 3 днів, потім преднізолон 0,5 мг/кг/день (перорально) протягом 27 днів;

2) місяці № № 2, 4 та 6: циклофосфамід 2,0–2,5 мг/кг/день (перорально).

Важливо зазначити, що побічними ефектами, пов'язаними із циклофосфамідом, є безпліддя, підвищена сприйнятливість до інфекцій, підвищений ризик

злоякісних новоутворень (особливо за кумулятивного рівня понад 36 грамів), рак сечового міхура та мієлодисплазія [6].

Зважаючи на чисельні побічні ефекти існуючих імуносупресивних препаратів, сучасне уявлення про імунопатогенез МН й останні досягнення в розробленні біотехнологічних імуномодуляторів, нашу увагу як потенційні засоби для лікування хворих на МН привернули **безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби** (далі – БКБЗ), зокрема кріоекстракт плаценти людини (далі – КЕП), кріоекстракт селезінки свиней (далі – КЕС) та кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин (далі – КС-МСК). За даними цілої низки досліджень [12–15], БКБЗ притаманний цілий комплекс цінних фармакологічних властивостей, які можуть чинити протективну дію за наявності аутоімунних захворювань.

Метою дослідження є надання оцінки впливу кріоекстрактів плаценти (далі – КЕП) та селезінки (далі – КЕС), а також кондиціонованого середовища МСК (далі – КС-МСК) на функціональний стан нирок шурів за наявності аутоімунного нефриту Хеймана.

Об'єкт і методи дослідження

Аутоімунний нефрит Хеймана (АИН) відтворювали за методикою Neumann W.R. та співав. [10] у модифікації шляхом введення шурам нефротропної антигенної суміші, яка складалась з повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ, *Thermo Fisher Scientific, США*) та розчину антигена, отриманого з гомогенату алогенної тканини нирок у співвідношенні 1:1 [16; 17; 19; 28]. Нирковий антиген виготовляли з коркового шару нирок у вигляді 20,0% гомогенату, до якого додавали антибіотик амікацин у дозі 2 000 ОД/мл з метою запобігання розвитку інфекції. ПАФ та нирковий антиген змішували безпосередньо перед використанням. Отриману суміш вводили тваринам у дозі 7,4 мл/кг у рівній кількості в п'ять ділянок тіла – підшкірним (далі – п/ш) у пахові та пахвові ділянки, а також внутрішньоочеревинно (далі – в/о). Через 4 тижні з метою потенціювання аутоімунного процесу введення нефротропної антигенної суміші повторювали в/о [19–22].

Досліджувані препарати вводили шурам з 60 доби експерименту [16]. БКБЗ вводили внутрішньом'язово (в/м), з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту. В якості референс-препарату обрано комбінований рослинний лікарський засіб з нефропротекторною активністю – канефрон («Конефрон® Н», *Біоноріка СЕ, Німеччина*), що містить стандартизований екстракт ВНО-1040 із трави золототисячника (*Herbae Centaurii*), кореня любистку (*Radicis Levistici*) та листя розмарину (*Foliorum Rosmarini*) [23–26]. Канефрон вводили внутрішньошлунково (далі – в/шл) на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в дозі 27 мг/кг [25], розрахованої методом Ю.Р. Риболовлева [27].

Експериментальні дослідження проведені відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1986 р.), Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту і Ради Європейського Союзу «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою» (м. Брюссель, 2010 р.), наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» № 249 від 1 березня 2012 р., наказу Міністерства охорони здоров'я України «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» № 944 від 14 грудня 2009 р., Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (м. Київ, 2001 р.).

Дослідження ефективності БКБЗ за наявності АІН проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г, рандомізованих на 6 груп:

I (негативний контроль) – інтактні щури (n=7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в/м вводили 0,9 % розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

II – щури зі змодельованим АІН (n=7) без лікування (контрольна група), яким на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в/м вводили 0,9 % розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг;

III – щури зі змодельованим АІН (n=7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в/шл вводили референс-препарат канефрон в дозі 27 мг/кг [25];

IV – щури зі змодельованим АІН (n=7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [29, 30];

V – щури зі змодельованим АІН (n=7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [31];

VI – щури зі змодельованим АІН (n=7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [32, 33].

На 70 день експерименту проводили оцінку функціонального стану нирок за умов спонтанного діурезу – щурів утримували 24 години у спеціальних обмінних клітках для збору сечі (добовий діурез, мл/1 440 хв), після чого тварин виводили з експерименту та відбирали зразки крові [34].

Вміст білка визначали спектрофотометрично за біуретовою реакцією, яка полягає в тому, що в лужному середовищі йони двохвалентного купруму (CuSO₄) взаємодіють із білками з утворенням комплексу фіолетового кольору та відновленням фосфоромолібденової кислоти тирозином і триптофаном (реакція Лоурі). Концентрацію білка визначали за світлопоглинанням за довжини хвилі $\lambda = 546$ нм. Кількісне співвідношення білкових фракцій плазми крові визначали нефелометричним методом із використанням фосфатних буферів, який ґрунтується на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують альбуміни та глобуліни з утворенням суспензії, ступінь каламутності якої визначали за світлопоглинанням за довжини хвилі $\lambda = 625$ (590–700) нм [35; 36].

Вміст креатиніну визначали спектрофотометрично за реакцією пікратів із креатиніном (реакція Яффе) у лужному середовищі з утворенням похідного 2,4,6-тринітроциклогексодієну жовто-червоного кольору. Інтенсивність забарвлення останнього прямо пропорційна концентрації креатиніну, яку вимірюють за довжини хвилі $\lambda = 530$ (500–560) нм [35; 37].

Кліренс креатиніну визначали за формулою [26]:

$$\text{Кліренс креатиніну (мл /хв)} = \frac{\text{Креатинін сечі}_{(\text{мкмоль/л})} \times \text{Добовий діурез}_{(\text{мл})}}{\text{Креатинін плазми крові}_{(\text{мкмоль/л})} \times 1440 \text{ хв}} \quad (2.1)$$

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями “Microsoft Office Excel”. Оцінку характеру розподілу величин у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро – Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. За нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. За ненормального розподілу принаймні однієї із груп незалежних величин відмінності між ними визначали попарно за непараметричним ранговим U-критерієм Манна – Уїтні (Mann – Whitney). Цифрові дані в разі нормального розподілу величин наведені у вигляді “M ± m” (M ± SE), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ: 5–95%), де 95% ДІ: – 95% довірчий інтервал (Confidence interval – CI). За ненормального розподілу отриманих величин дані представлено у вигляді Me [LQ; UQ], де Me – медіана, [LQ; UQ] – верхня межа

нижнього квартиля (lower quartile – LQ) та нижня межа верхнього квартиля (upper quartile – UQ) [38].

Результати дослідження та їх обговорення

Експериментальне дослідження показало, що на 70 день експерименту в щурів з АІМ спостерігається статистично вірогідне (p < 0,001) зниження добового діурезу із 7,0 ± 0,3 мл/добу в інтактних щурів до 3,7 ± 0,2 мл/добу в щурів контрольної групи (АІН без лікування).

Аутоімунне ураження подоцитів, зумовлене розвитком МН у щурів, призвело до статистично вірогідного (p < 0,001) зростання екскреції білка нирками, на що вказувала значна протеїнурія на рівні 28,4 ± 3,1 мг/добу (табл. 1), що в 11 разів перевищувало показники інтактних тварин (2,6 ± 0,4 мг/добу). Вказана протеїнурія є патогномонічною ознакою розвитку МН. Відомо, що конденсація актинового цитоскелета у відростках подоцитів є специфічною особливістю як людської, так і експериментальної МН [1].

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на діурез і вміст білка у крові та сечі в щурів з АПН на 70 день експерименту (M ± m (95% ДІ) або Me [LQ; UQ], n = 42)

Досліджувані показники, одиниці вимірювання	Умови експерименту					
	I (1) група	II (2) група	III (3) група	IV (4) група	V (5) група	VI (6) група
<i>n</i>	Інтактні щури 7	Контроль (АПН без лікув.) 7	АПН + канефрон 7	АПН + КЕП 7	АПН + КЕС 7	АПН + КС-МСК 7
Добовий діурез, мл/1440 хв.	7,0±0,3 (95 % ДІ: 6,4-7,5)	3,7±0,2 (95 % ДІ: 3,3-4,1) p ₁ < 0,001 [47,2%]	7,6±0,4 (95 % ДІ: 6,8-8,7) p ₂ < 0,001 [107,8%]	7,9±0,4 (95 % ДІ: 7,0-8,8) p ₂ < 0,001 [114,8%] p ₃ = 0,7 [3,4%]	7,0±0,3 (95 % ДІ: 6,5-7,6) p ₂ < 0,001 [91,1%] p ₃ = 0,2 [5,1%]	7,4±0,5 (95 % ДІ: 6,4-8,3) p ₂ < 0,001 [101,2%] p ₃ = 0,7 [3,2%]
Протеїнурія, мг/добу	2,6±0,4 (95 % ДІ: 1,7-3,4)	28,4±3,1 (95 % ДІ: 22,4-34,5) p ₁ < 0,001 [1005,6%]	13,9±1,5 (95 % ДІ: 10,9-16,9) p ₂ < 0,01 [51,3%]	11,9±0,9 (95 % ДІ: 10,2-13,5) p ₂ < 0,001 [58,3%] p ₃ = 0,3 [14,4%]	14,3±1,1 (95 % ДІ: 12,2-16,4) p ₂ < 0,001 [49,7%] p ₃ = 0,9 [3,1%]	9,7±0,9 (95 % ДІ: 7,9-11,6) p ₂ < 0,001 [65,8%] p ₃ = 0,04 [29,9%]
Концентрація загального білка в крові, г/л	75,7±2,8 (95 % ДІ: 70,3-81,1)	30,4±2,0 (95 % ДІ: 26,4-34,4) p ₁ < 0,001 [59,8%]	63,4±3,4 (95 % ДІ: 26,7-70,1) p ₂ < 0,001 [108,5%]	67,4±3,4 (95 % ДІ: 60,8-74,1) p ₂ < 0,001 [121,6%] p ₃ = 0,4 [6,3%]	69,9±2,1 (95 % ДІ: 65,7-74,0) p ₂ < 0,001 [129,6%] p ₃ = 0,13 [10,1%]	70,7±2,7 (95 % ДІ: 65,3-76,1) p ₂ < 0,001 [132,4%] p ₃ = 0,12 [11,5%]
Вміст альбумінів в крові, г/л	30 [27; 31]	12 [11; 15] p ₁ < 0,001 [60,0%]	26 [24; 29] p ₂ < 0,001 [116,7%]	24 [22; 27] p ₂ < 0,001 [100,0%] p ₃ = 0,3 [8,7%]	20 [19; 24] p ₂ < 0,001 [70,1%] p ₃ < 0,05 [20,9%]	32 [31; 35] p ₂ < 0,001 [149,4%] p ₃ = 0,1 [18,6%]

Примітки:

- 1) p₁ – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
- 2) [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
- 3) індексами _{1,2,3} вказано номер групи, з показниками якої порівняно.

Таблиця 2

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на вміст креатиніну у крові та сечі та його кліренс у щурів з АІН на 70 день експерименту ($M \pm m$ (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
<i>n</i>	7	7	7	7	7	7
Концентрація креатиніну в крові, мкмоль/л	69,4±2,6 (95 % ДІ: 64,4–74,4)	146,7±7,1 (95 % ДІ: 132,7–160,7) $p_1 < 0,001$ [111,3%]	114,9±4,1 (95 % ДІ: 106,8–123,0) $p_2 < 0,01$ [21,7%]	122,0±4,1 (95 % ДІ: 113,9–130,1) $p_2 = 0,01$ [16,8%] $p_3 = 0,3$ [6,2%]	114,4±6,1 (95 % ДІ: 102,5–126,4) $p_2 < 0,01$ [22,0%] $p_3 = 0,9$ [0,4%]	90,7±2,7 (95 % ДІ: 85,5–96,0) $p_2 < 0,001$ [38,2%] $p_3 < 0,001$ [21,0%]
Концентрація креатиніну в сечі, мкмоль/л	5857±115 (95 % ДІ: 5631–6083)	9043±319 (95 % ДІ: 8417–9668) $p_1 < 0,001$ [54,4%]	6971±416 (95 % ДІ: 6157–7786) $p_2 = 0,002$ [22,9%]	6771±452 (95 % ДІ: 5885–7658) $p_2 < 0,001$ [25,1%] $p_3 = 0,8$ [2,9%]	7457±433 (95 % ДІ: 6609–8305) $p_2 = 0,01$ [17,5%] $p_3 = 0,4$ [7,0%]	6486±577 (95 % ДІ: 5355–7616) $p_2 = 0,002$ [28,3%] $p_3 = 0,5$ [7,0%]
Кліренс креатиніну, мл/хв	0,41±0,03 (95 % ДІ: 0,36–0,47)	0,16±0,01 (95 % ДІ: 0,14–0,18) $p_1 < 0,001$ [61,4%]	0,33±0,03 (95 % ДІ: 0,26–0,39) $p_2 < 0,001$ [105,8%]	0,31±0,03 (95 % ДІ: 0,25–0,36) $p_2 < 0,001$ [92,4%] $p_3 = 0,6$ [6,5%]	0,32±0,01 (95 % ДІ: 0,29–0,35) $p_2 < 0,001$ [99,3%] $p_3 = 0,8$ [10,7%]	0,36±0,01 (95 % ДІ: 0,33–0,38) $p_2 < 0,001$ [123,4%] $p_3 = 0,4$ [8,6%]

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 порівняно.

Як зазначалось вище, рецептор М-типу для секреторної фосфоліпази А2 (PLA2R1) або тромбоспондину типу 1, що містить домен 7А (THSD7A), потенційно підтримує щільну діафрагму й адгезію подоцитів до базальної мембрани клубочка, а також бере участь у нормальному розташуванні відростків подоцитів. Анти-PLA2R1/THSD7A антитіла зв'язують подоцити, утворюючи імунні відкладення, що призводить до потовщення базальної мембрани та морфологічних змін подоцитів, зокрема і збільшення тіла клітини й ушкодження відростків подоцитів [4]. Це супроводжується різними змінами у проміжних фільтраційних щільностях, серед яких розширення, утворення оклюзійного типу з'єднань, а також зміщення та руйнування щільних діафрагм [1].

Виявлена нами в експерименті масивна протеїнурія на тлі розвитку МН призвела до виразного статистично вірогідного ($p < 0,001$) зниження концентрації загального білка у крові на 59,8% щодо показників інтактних шурів, що відбувалось переважно завдяки альбуміновій фракції – рівень альбумінів у крові статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизився на 60,0% та становив 12 [11; 15] г/л (див. табл. 1).

Застосування референс-препарату канефрону призвело до зниження екскреції білка нирками, на що вказувало статистично вірогідне ($p < 0,001$) зниження протеїнурії на 51,8% та зростання рівня загального білка у крові на 108,5% ($p < 0,001$) щодо показників шурів з АІН без лікування (див. табл. 1).

На тлі застосування досліджуваних БКБЗ спостерігалось зниження екскреції білка нирками. Так, дослідження показали, що найбільше зниження протеїнурії зазначено на тлі введення шурам з АІН КС-МСК – показник протеїнурії знизився на 65,8% ($p < 0,001$) та становив $9,7 \pm 0,9$ мг/добу, що на 29,9% перевищувало ефективність ($p = 0,04$) за аналогічним видом активності референс-препарат канефрон, на тлі застосування якого протеїнурія знизилась лише на 51,3% та становила $13,9 \pm 1,5$ мг/добу (див. табл. 1).

Зауважимо, що за здатністю підвищувати вміст загального білка у крові всі досліджувані БКБЗ перевищували за вказаним ефектом активність референс-препарату канефрону на тлі АІН у шурів (див. табл. 1). Так, на тлі введення КС-МСК рівень загального білка у крові зріс ($p < 0,001$) на 132,4%, на тлі застосування КЕС – зріс ($p < 0,001$) на 129,6%, а на тлі введення КЕП – зріс ($p < 0,001$) на 121,6% та становив $70,7 \pm 2,7$, $69,9 \pm 2,1$ та $67,4 \pm 3,4$ г/л відповідно.

Аналіз вмісту креатиніну у крові та його екскреції нирками показав, що на тлі розвитку МН в шурів відмічено статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання концентрації креатиніну у крові на 111,3% та непропорційне зростання вмісту креатиніну в сечі лише на 54,4% ($p < 0,001$) щодо показників інтактних шурів, що становило відповідно $9\ 043 \pm 319$ мкмоль/л сечі (табл. 2). Вказані зміни концентрації креатиніну зумовили статистично вірогідне ($p < 0,001$) зниження кліренсу креатиніну на 61,4%, що становило $0,16 \pm 0,01$ мл/хв (див. табл. 1).

На тлі застосування референс-препарату канефрону кліренс креатиніну статистично вірогідно ($p < 0,001$) зріс на 105,8% щодо показників нелікованих шурів з АІН. Серед досліджуваних БКБЗ КС-МСК за здатністю знижувати кліренс креатиніну в шурів з АІН перевищував показник канефрону – кліренс креатиніну статистично вірогідно ($p < 0,001$) зріс на 123,4% на тлі введення КС-МСК, тоді як на тлі застосування референс-препарату аналогічний показник зріс на 105,8% ($p < 0,001$) щодо показників шурів групи контролю.

Уведення КЕП та КЕС супроводжувались співставною з канефроном здатністю знижувати кліренс креатиніну в шурів з АІН – вказаний показник становив $0,31 \pm 0,03$ та $0,32 \pm 0,01$ мл/хв відповідно.

Перспективи подальших досліджень

Встановлена здатність досліджуваних БКБЗ нівелювати протеїнурію та відновлювати кліренс креатиніну в шурів з нефритом Хеймана слугує підґрунтям подальшого поглибленого вивчення механізмів нефропротекторної активності вказаних біологічних засобів за експериментальної мембранозної нефропатії.

Висновки

БКБЗ проявляють виразну нефропротективну активність на тлі аутоімунного нефриту Хеймана в шурів. За здатністю нівелювати протеїнурію в шурів з АІН (% щодо нелікованих шурів з АІН) досліджувані засоби можна розташувати в такій послідовності: КС-МСК (65,8%; $p < 0,001$) > КЕП (58,3%; $p < 0,001$) > КЕС (49,7%; $p < 0,001$). За здатністю відновлювати кліренс креатиніну в шурів з АІН (% щодо нелікованих шурів з АІН) досліджувані БКБЗ можна розташувати в такій послідовності: КС-МСК (123,4%; $p < 0,001$) > КЕС (99,3%; $p < 0,001$) > КЕП (92,4%; $p < 0,001$).

Література

1. Cybulsky AV, Quigg RJ, Salant DJ. Experimental membranous nephropathy redux. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005; 289 (4): 660–671. DOI: 10.1152/ajprenal.00437.2004.
2. Ma H, Sandor DG, Beck LH Jr. The role of complement in membranous nephropathy. *Seminars in Nephrology*. 2013; 33 (6): 531–542. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.004.
3. Mellors RC, Ortega LG. Analytical pathology. III. New observations on the pathogenesis of glomerulonephritis, lipid nephrosis, periarteritis nodosa, and secondary amyloidosis in man. *The American Journal of Pathology*. 1956; 32 (3): 455–499.
4. Liu W, Gao C, Liu Z, Dai H, Feng Z, Dong Z, Zheng Y, Gao Y, Tian X, Liu B. Idiopathic membranous nephropathy: glomerular pathological pattern caused by extrarenal immunity activity. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 1846. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01846.

5. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; 1572 (2–3): 364–386. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00319-7.
6. Dantas M, Silva LBB, Pontes BTM, Dos Reis MA, de Lima PSN, Moysés Neto M. Membranous nephropathy. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2023; 45 (2): 229–243. DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2023-0046en.
7. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011; 26 (2): 414–430. DOI: 10.1093/ndt/gfq665.
8. Bobart SA, Tehranian S, Sethi S, Alexander MP, Nasr SH, Moura Marta C, Vrana JA, Said S, Giesen CD, Lieske JC, Fervenza FC, de Vriese AS. A Target antigen-based approach to the classification of membranous nephropathy. *Mayo Clinic Proceedings*. 2021; 96 (3): 577–591. DOI: 10.1016/j.mayocp.2020.11.028.
9. Akiyama S, Imai E, Maruyama S. Immunology of membranous nephropathy. *F1000Res*. 2019; 8: 734. DOI: 10.12688/f1000research.17589.1.
10. Heymann W, Kmetec EP, Wilson SG, Hunter JL, Hackel DB, Okuda R, Cuppage F. Experimental autoimmune renal disease in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965; 124 (1): 310–322. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb18966.x.
11. Fervenza FC, Appel GB, Barbour SJ, Rovin BH, Lafayette RA, Aslam N, Jefferson JA, Gipson PE, Rizk DV, Sedor JR, Simon JF, McCarthy ET, Brenchley P, Sethi S, Avila-Casado C, Beanlands H, Lieske JC, Philibert D, Li T, Thomas LF, Green DF, Juncos LA, Beara-Lasic L, Blumenthal SS, Sussman AN, Erickson SB, Hladunewich M, Canetta PA, Hebert LA, Leung N, Radhakrishnan J, Reich HN, Parikh SV, Gipson DS, Lee DK, da Costa BR, Jüni P, Cattran DC. MENTOR Investigators. Rituximab or Cyclosporine in the Treatment of Membranous Nephropathy. *The New England Journal of Medicine*. 2019; 381 (1): 36–46. DOI: 10.1056/NEJMoa1814427.
12. Hladkykh FV. Evaluation of tentative and research activity in rats with experimental allergic encephalomyelitis against the administration of cell-free cryopreserved biological agents. *Psychiatry, Neurology and Medical Psychology*. 2024; 11 (2 (24)): 124–137. DOI: 10.26565/2312-5675-2024-24-02.
13. Hladkykh FV. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization. *Vynnytsia*, 2022. 216 p. DOI: 10.46879/2022.1.
14. Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Assessment of antiulcerogenic effect of cryopreserved placenta extract on the model of alcohol-prednisolone damage of the stomach. *Medical science of Ukraine*. 2022; 18 (2): 3–9. DOI: 10.32345/2664-4738.2.2022.01.
15. Hladkykh FV. Prospects for the use of immunomodulators in the treatment of patients with autoimmune diseases: focus on extracts of biological tissues (cryoextract of the placenta and cryoextract of the spleen). *Immunology and allergology: science and practice*. 2023; 4: 29–46. DOI: 10.37321/immunology.2023.4-04.
16. Shebeko SK. Experimental substantiation of the combined use of amino sugar derivatives and flavonoids in the therapy of chronic kidney disease. *Dissertation*. Kharkiv, 2017. 516 p. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0521U100125/>.
17. Deepthi R, Suhasin G. A review on animal models of chronic kidney disease – an update. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2023; 16 (3): 1319–1327. DOI: 10.13005/bpj/2711.
18. Zahraa Mohammed-Ali, Rachel E. Carlisle, Samera Nademi, Jeffrey G. Dickhout, Chapter 16 – Animal Models of Kidney Disease. 2017: 379–417. DOI: 10.1016/B978-0-12-809468-6.00016-4.
19. Jefferson JA, Pippin JW, Shankland SJ. Experimental models of membranous nephropathy. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2010; 7 (1–2): 27–33. DOI: 10.1016/j.ddmod.2010.11.001.
20. Becker GJ, Hewitson TD. Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013; 28 (10): 2432–2438. DOI: 10.1093/ndt/gft071.
21. Wang YM, Lee VWS, Wu H, Harris DCH, Alexander SI. Heymann nephritis in Lewis rats. *Current Protocols in Immunology*. 2015; 109: 1–6. DOI: 10.1002/0471142735.im1529s109.
22. Shtryhol SYu, Lisovyi VM, Zupanets IA, Shebeko SK, Maslova NF, Hozhenko AI, Kharchenko DS. Methods of experimental modeling of kidney damage for pharmacological research: methodical recommendations. Kharkiv, 2009. 48 p.
23. Podpletnia OA, Khomyak NV, Sokolova KV, Kaidash SP, Khomyak OV. Phytotherapeutic drugs with nephroprotective activity (review). *Medical perspectives*. 2017; 22 (17): 10–7. DOI: 10.26641/2307-0404.2017.1.100866.
24. Shebeko SK, Chernykh VV, Zupanets KO. Nephroprotective effect of the herbal composition BNO 2103 in rats with renal failure. *Health of Man*. 2021; 4: 48–56. DOI: 10.30841/2307-5090.4.2021.252396.
25. Monatko KV. Experimental study of the nephroprotective effect of freeze-dried watermelon powder. *Dissertation*. Kharkiv, 2014. 217 p. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0414U004729/>.
26. Borisov SO, Kolosov OM, Kostev FI, Borisov OV. Study of the functional state of the kidneys of rats with acute pyelonephritis on the background of diabetes under the conditions of drug exposure in the experiment. *Health of Man*. 2020; 72 (1): 80–83. DOI: 10.30841/2307-5090.1.2020.205494.
27. Rybolovlev YuR, Rybolovlev RS. Dosage of substances for mammals according to biological activity constants. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1979; 247 (6): 1513–1516.
28. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947; 1: 291–308. DOI: 10.1146/annurev.mi.01.100147.001451.
29. Shepitko VI. 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. *Dissertation*. Kharkiv, 2004. 326 p. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>.
30. Prokopyuk OS. Placenta cryopreservation and determination of the mechanisms of its influence on the body of recipients of late ontogenesis (experimental study). *Dissertation*. Kharkiv, 2011. 351 p. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0514U000218/>.
31. Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin. *Dissertation*. Kharkiv, 2016. 162 p. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>.
32. Golubinskaya PA., Sarycheva MV., Dolzhikov AA, Bondarev VP, Stefanova MS, Soldatov VO, Nadezhdin SV, Korokin MV, et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and

contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020; 8 (6): 416–425. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425.

33. Globa VYu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. *Dissertation*. Kharkiv, 2021. 156 p. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>.

34. Stefanov OV, ed. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna, 2001. 527 p.

35. Kamyshnikov VS. Handbook of clinical and biochemical research and laboratory diagnostics. MEDpress-inform; 2009. 896 p.

36. Lowry OH, Rosenbroun NI, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193. 265–75.

37. Jaffe M. Concerning both the precipitation caused in normal urine by picric acid and a new reaction with creatinine. *Zeitschrift Fuer Physiologische Chemie*. 1886; 10: 391–400.

38. Zar JH. Biostatistical analysis (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014; 960 p.

Мета: оцінити вплив кріоекстрактів плаценти (КЕП) та селезінки (КЕС), а також кондиціонованого середовища мезехі-мальных стовбурових клітин (КС-МСК) на функціональний стан нирок щурів за наявності аутоімунного нефриту Хеймана.

Матеріали та методи. Дослідження ефективності безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ) проведені на 42 щурах-самцях. Аутоімунний нефрит (АІН) відтворювали за методикою W.R. Heymann та співавторів. На 70 день експерименту проводили оцінку функціонального стану нирок за умов спонтанного діурезу, після чого тварин виводили з експерименту та відбирали зразки крові. Вміст білка визначали спектрофотометрично за біуретовою реакцією, креатиніну – за реакцією Яффе.

Результати. На тлі застосування досліджуваних БКБЗ спостерігалось зниження екскреції білка нирками. Так, дослідження показали, що найбільше зниження протеїнурії відмічено на тлі введення щурам з АІН КС-МСК – показник протеїнурії знизився на 65,8% ($p < 0,001$) та становив $9,7 \pm 0,9$ мг/добу, що на 29,9% перевищувало ефективність ($p = 0,04$) за аналогічним видом активності референс-препарат канефрон. Введення КЕП та КЕС супроводжувались зіставною з канефроном здатністю знижувати кліренс креатиніну в щурів з АІН – вказаний показник становив $0,31 \pm 0,03$ та $0,32 \pm 0,01$ мл/хв відповідно.

Висновки. БКБЗ проявляють виразну нефропротективну активність на тлі аутоімунного нефриту Хеймана в щурів. За здатністю нівелювати протеїнурію в щурів з АІН (% щодо нелікованих щурів з АІН) досліджувані засоби можна розташувати в такій послідовності: КС-МСК (65,8%; $p < 0,001$) > КЕП (58,3%; $p < 0,001$) > КЕС (49,7%; $p < 0,001$). За здатністю відновлювати кліренс креатиніну в щурів з АІН (% щодо нелікованих щурів з АІН) досліджувані БКБЗ можна розташувати в такій послідовності: КС-МСК (123,4%; $p < 0,001$) > КЕС (99,3%; $p < 0,001$) > КЕП (92,4%; $p < 0,001$).

Ключові слова: аутоімунний нефрит Хеймана, мембранозна нефропатія, протеїнурія, креатинін, безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби.

Purpose: the aim is to evaluate the effect of cryoextracts of the placenta (CEP) and seryozina (CES), as well as the conditioned medium of mesenchymal stem cells (MSC-CM) on the functional state of the kidneys of rats with Heiman's autoimmune nephritis.

Materials and methods. Studies of the effectiveness of cell-free cryopreserved biological agents were conducted on 42 male shurens. Heymann's autoimmune nephritis (AIN) was reproduced according to the method of Heymann W.R. and sang on the 70th day of the experiment, the functional state of the kidneys was assessed under the conditions of spontaneous diuresis, after which the animals were removed from the experiment and blood samples were taken. The protein content was determined spectrophotometrically using the biuret reaction. Creatinine content was determined spectrophotometrically by the Jaffe reaction.

Results. A decrease in the excretion of protein by the kidneys was noted on the bodies of the application of the investigated cell-free cryopreserved biological agents. Thus, studies have shown that the greatest decrease in proteinuria was observed against the background of administration of MSC-CM to rats with AIN – the rate of proteinuria decreased by 65,8% ($p < 0,001$) and amounted to $9,7 \pm 0,9$ mg/day, which is 29,9% exceeded the efficiency ($p = 0,04$) according to the similar type of activity of the reference drug canefron. The introduction of CEP and CES was accompanied by the ability to reduce creatinine clearance in rats comparable to canefron, and AIN – the specified indicator was $0,31 \pm 0,03$ ml/min and $0,32 \pm 0,01$ ml/min, respectively.

Conclusions. Cell-free cryopreserved biological agents show pronounced nephroprotective activity against the background of Heiman's autoimmune nephritis in rats. According to the ability to eliminate proteinuria in rats with AIN (% relative to untreated rats with AIN), the studied agents can be arranged in the following sequence: MSC-CM (65,8%; $p < 0,001$) > CEP (58,3%; $p < 0,001$) > CES (49,7%; $p < 0,001$). According to the ability to restore creatinine clearance in rats with AIN (% relative to untreated rats with AIN), the studied cell-free cryopreserved biological agents can be arranged in the following sequence: MSC-CM (123,4%; $p < 0,001$) > CES (99,3%; $p < 0,001$) > CEP (92,4%; $p < 0,001$).

Key words: Heymann autoimmune nephritis, membranous nephropathy, proteinuria, creatinine, cell-free cryopreserved biological agents.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflict of interest: absent.

Відомості про авторів

Гладких Федір Володимирович – доктор філософії в галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина», докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені

В.Н. Каразіна; майдан Свободи, 4, м. Харків, Україна, 61022; старший науковий співробітник відділу променевої патології та паліативної медицини Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України; вул. Григорія Сковороди, 82, м. Харків, Україна, 61024.
fedir.hladkykh@gmail.com, ORCID ID 0000-0001-7924-4048,

Scopus: www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57226085532,

Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/1507258>

Лядова Тетяна Іванівна – доктор медичних наук, професор, професор кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, декан медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна; майдан Свободи, 4, м. Харків, Україна. 61022.

t.lyadova@karazin.ua, ORCID ID 0000-0002-5892-2599,

Scopus: www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57205369365,

Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/rid/DWD-6225-2022>

Стаття надійшла до редакції 05.08.2024

Дата першого рішення 08.08.2024

Стаття подана до друку 12.09.2024