

УДК 632.938+616.61-002+615.324+615.451.16

DOI: <https://doi.org/10.22141/2307-1257.13.3.2024.465>Гладких Ф.В.^{1,2} , Лядова Т.І.¹ ¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна²ДУ «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва НАМН України», м. Харків, Україна

Стан NO-ергічного гомеостазу при експериментальному автоімунному гломерулонефриті на тлі застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів

For citation: *Роски. 2024;13(3):203-212. doi: 10.22141/2307-1257.13.3.2024.465*

Резюме. Актуальність. Разом із гідроген сульфідом (H_2S) та монооксидом вуглецю (CO) нітрогену монооксид (NO) заслужив репутацію потужного вазодилатора. NO синтезується з L-аргініну групою ферментів, які називаються NO-синтазами (NOS). NOS каталізують перетворення L-аргініну в L-цитрулін та NO. Існує три ізоформи NOS, які часто описуються на основі їх експресії в тканинах: 1) нейрональна NOS (nNOS), 2) індукцйбельна NOS (iNOS) та 3) епітеліальна NOS (eNOS). NO є життєво важливою молекулою, яка бере участь у низці сигнальних функцій у нирках та може вивільнятися різними клітинами нирок, включно з ендотеліальними та мезангіальними клітинами, а також подоцитами. Пошкодження подоцитів, опосередковане антитілами проти антигенів подоцитів, що депонуються під гломерулярними вісцеральними епітеліальними клітинами, отримало назву «мембранозна нефропатія» (МН). Як потенційні засоби для лікування хворих на МН нашу увагу привернули безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ), зокрема кріоекстракт плаценти (КЕП), кріоекстракт селезінки (КЕС) та кондіціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК). **Мета:** оцінити вплив кріоекстрактів плаценти та селезінки, а також кондіціонованого середовища МСК на стан NO-ергічної системи нирок щурів при автоімунній мембранозній нефропатії. **Матеріали та методи.** Дослідження ефективності БКБЗ при автоімунному нефриті (АІН) проведені на 42 щурах-самцях. АІН моделювали за методикою W.R. Neumann та співавт. Досліджувані препарати вводили щурам з 60-ї доби експерименту. БКБЗ вводили внутрішньом'язово, з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 60, 62, 64, 66 та 68-й дні експерименту. Активність NO-синтаз визначали спектрофотометричним методом за кількістю НАДФН₂, що окиснюється. Уміст стабільних метаболітів NO визначали спектрофотометричним методом за реакцією P. Griess у модифікації. **Результати.** Встановлено, що розвиток АІН у щурів супроводжувався розбалансуванням активності NOS у тканинах нирок. Показано, що активність iNOS статистично вірогідно ($p < 0,001$) зросла на 83,3 %. Концентрація стабільних метаболітів NO у крові щурів з АІН статистично вірогідно ($p = 0,008$) підвищилась на 68,2 %, що у 4,5 рази перевищувало зростання активності сумарної NOS. На тлі застосування досліджуваних БКБЗ відмічено зниження активності iNOS. Проведене нами дослідження продемонструвало найвираженіше зростання активності конституційних Ca_2^+ -залежних ізоформ NOS (nNOS та eNOS) на тлі введення КС-МСК. **Висновки.** За здатністю нормалізувати гіперактивність iNOS (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) досліджувані БКБЗ доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (54,5 %; $p < 0,001$) > КЕС (36,4 %; $p = 0,008$) > КЕП (31,8 %; $p = 0,04$). За здатністю нівелювати пригнічення активності sNOS у тканинах нирок (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК

© 2024. The Authors. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY, which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для кореспонденції: Гладких Федір Володимирович, доктор філософії з медицини, докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com; тел.: +380 (99) 782-78-72; старший науковий співробітник, відділення променевої патології та паліативної медицини, відділ радіології, ДУ «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва НАМН України», вул. Григорія Сковороди, 82, м. Харків, 61024, Україна
For correspondence: Fedir Hladkykh, PhD in Medicine, Doctoral Student at the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, V.N. Karazin Kharkiv National University, Maidan Svobody sq., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com; phone: +380 (99) 782-78-72; Senior Research Fellow at the Department Group of Radiation Pathology and Palliative Medicine at the Radiology Department, State Institution "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Hryhoriya Skovorody st., 82, Kharkiv, 61024, Ukraine

Full list of authors information is available at the end of the article.

(57,9 %; $p = 0,05$) > КЕП (42,4 %; $p = 0,015$) > КЕС (21,2 %; $p = 0,02$). За здатністю нормалізувати вміст стабільних метаболітів NO у крові (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) досліджувані БКБЗ доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (41,3 %; $p = 0,018$) > КЕС (25,2 %; $p = 0,1$) > КЕП (4,9 %; $p = 0,7$).

Ключові слова: аутоімунний гломерулонефрит; нефрит Хеймана; мембранозна нефропатія; нітрогену монооксид; кріоекстракт плаценти; кріоекстракт селезінки; кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин

Вступ

Газотрансмітери — це сімейство газоподібних сигнальних молекул, які виробляються ендегенним шляхом і діють на специфічні рецептори, відіграючи важливу роль у фізіологічних та патофізіологічних процесах. Разом із гідроген сульфідом (H_2S) та монооксидом вуглецю (CO) **нітрогену монооксид (NO)** заслужив репутацію потужного вазодилататора, також відомого як ендотеліальний вазорелаксуючий фактор (*endothelium-derived relaxing factor* — *EDRF*) [1].

Газотрансмітери є невеликими молекулами, що дозволяє їм легко дифундувати через біологічні мембрани, а їх висока реактивність дозволяє їм взаємодіяти з широким спектром молекулярних мішеней [2]. H_2S у високих концентраціях індукуює синтез прозапальних медіаторів (інтерлейкіни (ІЛ) 1β та ІЛ-6, фактор некрозу пухлини α (ФНП- α), простагландин E_2 та власне NO), а в низьких концентраціях проявляє цитопротекторні властивості, діючи як антиоксидант [3]. NO, який вважається одним із найбільш вивчених газотрансмітерів, на протипагу H_2S , регулює окиснювальний стрес та перекисне окиснення ліпідів у нирковій тканині та запальний процес шляхом пригнічення активності ІЛ- 1β , ІЛ-18, ІЛ-6 та ФНП- α [4]. Незважаючи на відомий токсичний ефект CO при високих рівнях, його низькі концентрації можуть мати цитопротекторний ефект. CO проявляє протизапальну дію шляхом блокування активності ФНП- α та потенціювання експресії протизапального цитокіну ІЛ-10 [5]. Встановлено, що CO бере участь в апоптотичній сигналізації; однак, як і NO, він відіграє подвійну роль у цьому складному процесі (рис. 1) [2].

Відомо, що NO синтезується з L-аргініну групою ферментів, які називаються NO-синтазами (NOS) [6, 7]. NOS каталізують перетворення L-аргініну в L-цитрулін та NO. Існує три ізоформи NOS, які часто описуються на основі їх експресії в тканинах: 1) нейрональна NOS (nNOS), 2) індукцибельна NOS (iNOS) та 3) епітеліальна NOS (eNOS) [7, 8].

Ізоформи nNOS і eNOS часто експресуються конститутивно, і їх діяльність регулюється доступністю кальцію (Ca_2^+). iNOS не залежить від внутрішньоклітинної концентрації Ca_2^+ [9]. На сьогодні є загальноприйнятою концепція поділу NOS на дві групи: **конститутивні ізоформи (cNOS)**, до яких належать nNOS, eNOS та виокремлення Ca_2^+ -незалежної **індуцибельної ізоформи** — iNOS, що вважається біологічно виправданим [8].

Активність NOS залежить від кисню і потребує L-аргініну та кількох кофакторів (кальмодулін, ні-

котинамідаденіндинуклеотидфосфат (NADPH — β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate), тетрагідробіоптерин (BH_4 — tetrahydrobiopterin), флавінаденіндинуклеотид (FAD — flavin adenine dinucleotide) та флавінмононуклеотид (FMN — flavin adenine

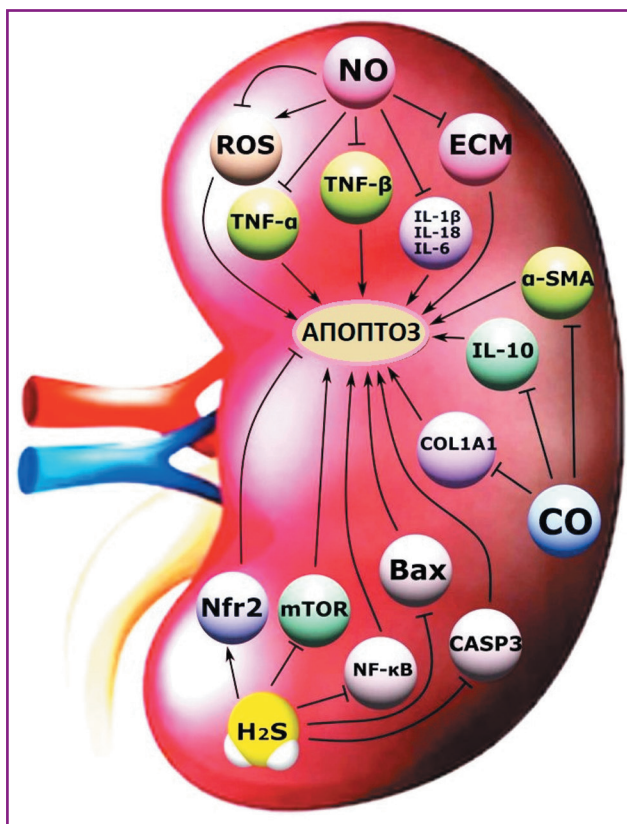


Рисунок 1. Можливі NO-, CO- та H_2S -залежні сигнальні механізми, що регулюють апоптоз у нирках (адаптовано за [2])

Примітки: стрілки з гострим кінцем — позитивна регуляція; стрілки з тупим кінцем — негативна регуляція; ROS — активні форми кисню (*reactive oxygen species*); TNF- α та TNF- β — фактори некрозу пухлини (*tumor necrosis factor*); ECM — позаклітинний матрикс (*extracellular matrix*); IL- 1β , IL-18, IL-10 та IL-6 — інтерлейкіни; α -SMA — гладком'язовий альфа-актин (*alpha smooth muscle actin*); COL1A1 — колаген 1-го типу (*collagen type I alpha 1 chain*); Bax — bcl-2-подібний білок 4 (*BCL2 associated X, apoptosis regulator*); Nfr2 — ядерний фактор, еритроїдний 2-споріднений фактор 2 (*nuclear factor, erythroid 2 like 2*); mTOR — мішень рапаміцину для ссавців (*mammalian target of rapamycin*); CASP3 — каспаза 3 (*caspase 3*); NF- κ B — ядерний фактор κ B активованих В-клітин (*nuclear factor κ B*).

mononucleotide)). NO зв'язується з відновленим гемовим сайтом (Fe_2^+) розчинної гуанілілциклази (sGC — *soluble guanylyl cyclase*), яка активує цей фермент, що призводить до утворення другого циклічного гуанозинмонофосфату (*cyclic guanosine monophosphate* — cGMP, цГМФ) з гуанозинтрифосфату (GTP — *guanosine triphosphate*) (рис. 2).

NO — це короткоживуча молекула, яка окиснюється у крові та тканинах з утворенням нітриту (NO_2), нітрату (NO_3) та інших біологічно активних форм нітрогену. Біологічна активність NO пов'язана з численними ефектами на серцево-судинну систему, нирки та процеси метаболізму, головним чином через цГМФ-залежні механізми, хоча також повідомлялося про цГМФ-незалежні механізми. Ці механізми є багатфакторними та включають модуляцію функції білка та імунних клітин, зниження сигналізації ангіотензину II типу, окисного стресу та модуляцію функції мітохондрій [10].

Ca_2^+ -залежні nNOS та eNOS зазвичай асоціюються з низькими рівнями вироблення NO, які опосередковують внутрішньоклітинні сигнальні процеси (nNOS) і судинний гомеостаз (eNOS). Вказані ізоформи (nNOS та eNOS) найчастіше зустрічаються в неімунологічних клітинах (нейронах, міоцитах, ендотеліальних клітинах тощо), і, оскільки їх продукування NO є відносно низьким, ці ізоформи вважаються менш важливими з імунологічної точки зору, ніж iNOS [8].

Високий рівень NO, що виробляється активованими макрофагами (і, ймовірно, нейтрофілами та іншими клітинами), може бути не тільки токсичним для патогенних мікроорганізмів, паразитів або пухлинних клітин, але може також завдати шкоди здоровим клітинам. *In vivo* пошкодження клітин і тканин може бути пов'язане з власне радикалом NO або взаємодією NO з $\text{O}_2^- \cdot$, що призводить до утворення пероксинітриту (ONOO^-). Переважна більшість запальних та аутоімунних захворювань характеризується великою

кількістю активованих макрофагів та нейтрофілів. Ці клітини можуть виділяти значну кількість NO, що призводить до пошкодження навколишньої тканини [7].

NO є життєво важливою молекулою, яка бере участь у низці сигнальних функцій у нирках та може вивільнятися різними клітинами нирок, включно з ендотеліальними та мезангіальними клітинами, а також подоцитами [6, 10, 11]. Таким чином, виділення NO має потенціал безпосередньо впливати на функцію клубочків та регулювати ультрафільтрацію [12]. Крім того, NO має важливе значення для ниркової гемодинаміки та регуляції артеріального тиску та відіграє важливу роль у моду-

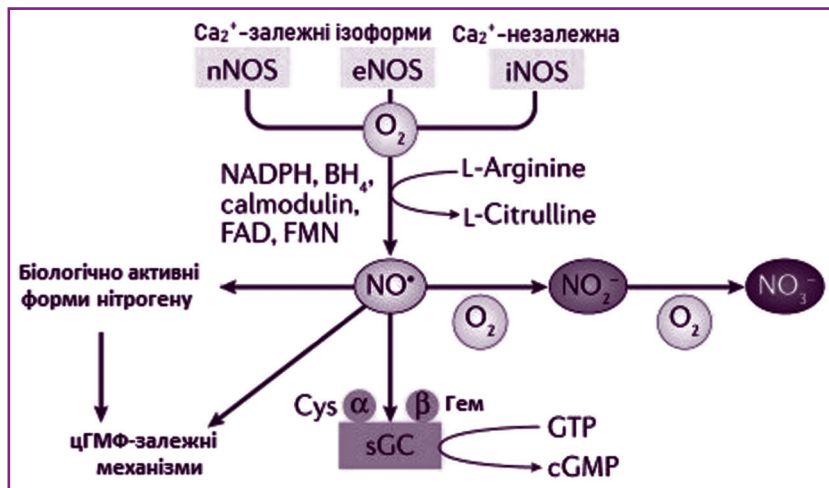


Рисунок 2. Шляхи синтезу ендогенного NO (адаптовано за [10])

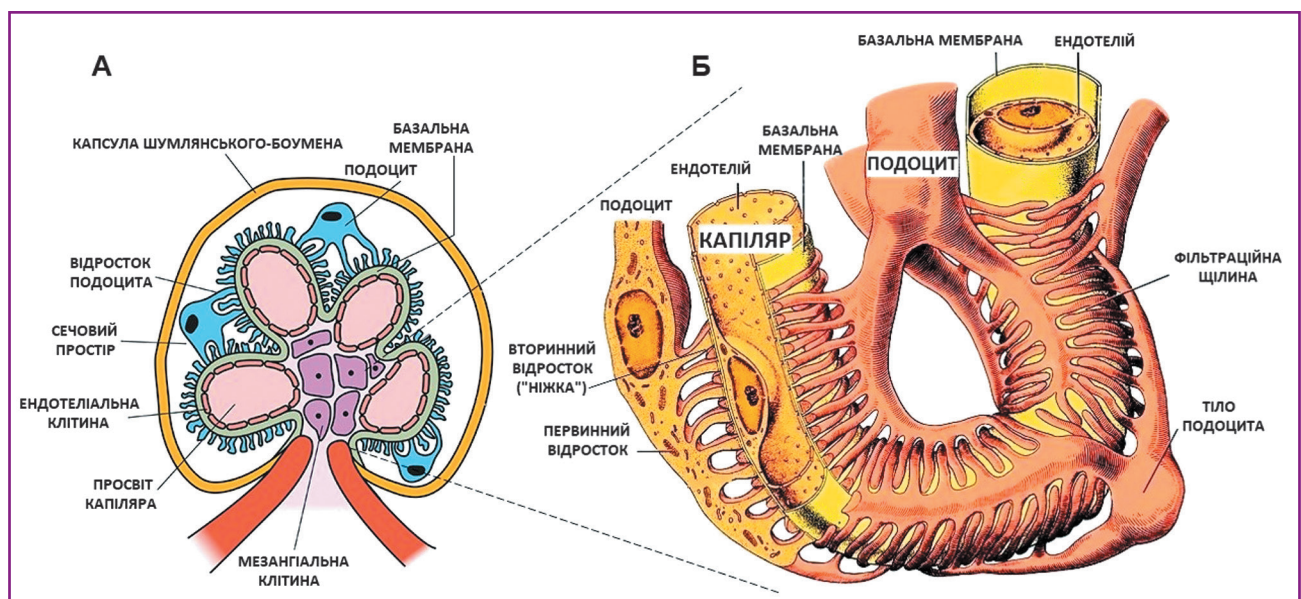


Рисунок 3. Схема будови нефрона: поперечний зріз (А) та просторова модель синтопії подоцита (Б). Адаптовано за: <https://sites.manchester.ac.uk/alport-hub/about-alport-syndrome/>

ляції діурезу, тубулогломерулярного зворотного зв'язку та реабсорбції натрію [13].

Подоцити — високоспеціалізовані клітини клубочка, що контролюють проникність бар'єра клубочкової фільтрації. Завдяки структурному складу щільної діафрагми подоцити взаємодіють з ендотеліальними та мезангіальними клітинами для координації сигналів, що модулюють клітинну адгезію та взаємодію з матриксом для підтримки та контролю клубочкової проникності. Точна регуляція та організація цитоскелетної архітектури подоцитів є важливими для підтримки фільтраційного бар'єра нирок [6].

Прямий зв'язок організації цитоскелета зі змінами у виробленні NO був раніше показаний для ендотеліальних клітин і може відігравати важливу фізіологічну та патофізіологічну роль у функції подоцитів [14]. Було встановлено, що подоцити можуть вивільняти NO у відповідь на різні опосередковані рецепторами стимули, включно з ангіотензином II типу [15], що може включати паракринну та аутокринну регуляцію подоцитів та оточуючих клубочкових клітин [6].

Подоцити вистилають зовнішню поверхню базальної мембрани клубочка. Кожен подоцит пов'язаний з більш ніж однією артеріолою, і кожна артеріола покрита більш ніж одним подоцитом. Подоцити складаються з клітинного тіла, первинних відростків і «ніжок» (рис. 3).

Відростки подоцитів містять скоротливий апарат, що включає актин, міозин, актинін, талін, вінкулін та віментин, який протидіє гемодинамічним силам клубочкових капілярів [16].

Подоцити, будучи високоспеціалізованими епітеліальними клітинами клубочка, мають важливе значення для селективної проникності бар'єра клубочкової фільтрації, допомагаючи гарантувати, що цінні молекули, як-от білки, залишаються в крові [17]. Участь у клубочковій фільтрації є основним завданням подоцитів. Клубочковий фільтрат протікає через ендотеліальний просвіт, базальну мембрану та щільні діафрагми в проміжках між відростками подоцитів. Щільні діафрагми є найважливішими функціональними елементами

тришарової фільтраційної мембрани. Відростки подоцитів складаються з багатьох білків, які утворюють взаємодіючий комплекс. Пошкодження одного з його елементів порушує функцію щільних діафрагм [16].

Ушкодження подоцитів, опосередковане антитілами проти антигенів подоцитів, що депонуються під гломерулярними вісцеральними епітеліальними клітинами, отримало назву «**мембранозна нефропатія**» (МН) [18, 19]. МН є органоспецифічним аутоімунним захворюванням, яке характеризується розширенням базальної мембрани клубочка та дифузним пошкодженням відростків подоцитів (рис. 4) [20].

Незважаючи на те, що МН може спонтанно регресувати без лікування, у третини пацієнтів спостерігається прогресуюча втрата фільтраційної функції нирок, що може прогресувати до термінальної стадії ниркової недостатності у середньому через 5 років після встановлення діагнозу [21].

Як потенційні засоби для лікування хворих на МН нашу увагу привернули безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ), зокрема кріоекстракт плаценти (КЕП), кріоекстракт селезінки (КЕС) та кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК). За даними цілої низки досліджень [23–26], БКБЗ притаманний цілий комплекс цінних фармакологічних властивостей, які можуть чинити органопротективну дію при аутоімунних захворюваннях.

Мета дослідження: оцінити вплив кріоекстрактів плаценти та селезінки, а також кондиціонованого середовища МСК на стан NO-ергічної системи нирок щурів при аутоімунній мембранозній нефропатії (нефриті Хеймана).

Матеріали та методи

Аутоімунний нефрит Хеймана (АІН) відтворювали за методикою W.R. Neumann та співавт. [27–29] у модифікації, шляхом введення щурам нефротропної антигенної суміші, яка складалась з повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ, Thermo Fisher Scientific, США) та розчину антигену, отриманого з гомогенату алогенної тка-

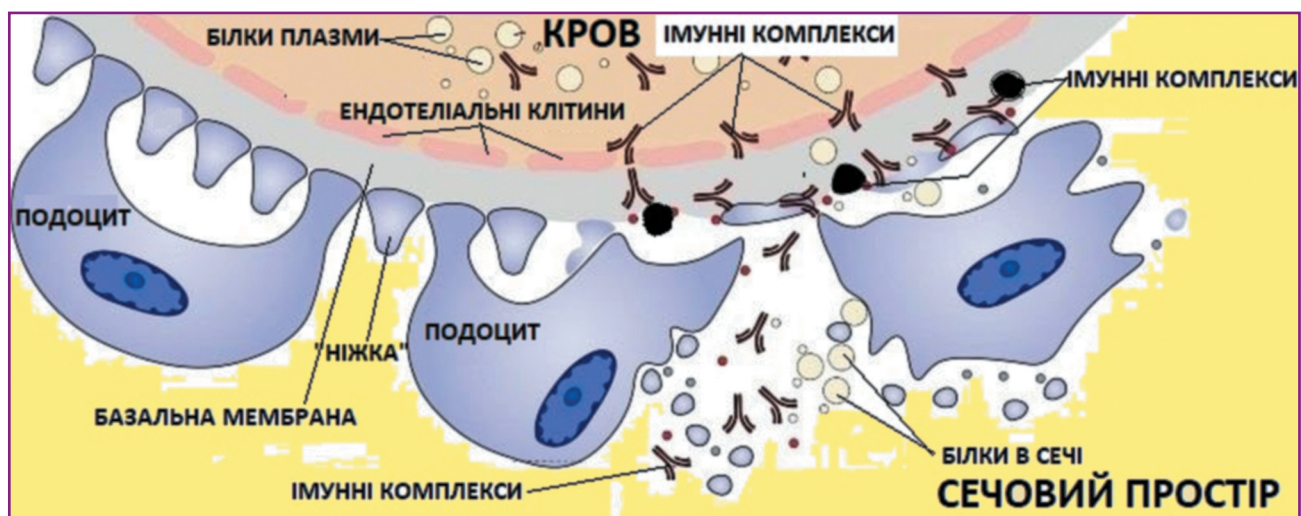


Рисунок 4. Пошкодження подоцитів при мембранозній нефропатії (адаптовано за [18])

нини нирок, у співвідношенні 1 : 1 [27, 30, 31, 39]. Нирковий антиген виготовляли з коркового шару нирок у вигляді 20,0% гомогенату, до якого додавали антибіотик амікацин у дозі 2000 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 в рівній кількості у п'ять ділянок тіла — підшкірно (п/ш) в пахові та пахові ділянки, а також внутрішньоочеревинно (в/о). Через 4 тижні з метою потенціювання автоімунного процесу введення нефротропної антигенної суміші повторювали в/о [27, 32, 33].

Досліджувані препарати вводили щурам з 60-ї доби експерименту [27]. БКБЗ вводили внутрішньом'язово (в/м), з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 60, 62, 64, 66 та 68-й дні експерименту. Як референс-препарат обрано комбінований рослинний лікарський засіб з нефропротекторною активністю — канефрон («Канефрон® Н», Біонорика СЕ, Німеччина), що містить стандартизований екстракт ВНО-1040 з трави золототисячника (*Herbae Centaurii*), кореня любистку (*Radix Levistici*) та листя розмарину (*Folium Rosmarini*) [34, 37]. Канефрон вводили внутрішньошлунково (в/шл) на 60, 62, 64, 66 та 68-й дні експерименту в дозі 27 мг/кг [35, 36], розрахованій методом Ю.Р. Риболовлева [38].

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 01.03.2012 р., наказу Міністерства охорони здоров'я України «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» № 944 від 14.12.2009 р., загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (м. Київ, 2001 р.).

Дослідження ефективності БКБЗ при 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-й 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-й 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-й дні експерименту в/шл вводили референс-препарат канефрон в дозі 27 мг/кг [36];

IV — щури зі змодельованим АІН (n = 7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68-й дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [40, 41];

V — щури зі змодельованим АІН (n = 7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68-й дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [42];

VI — щури зі змодельованим АІН (n = 7), яким на 60, 62, 64, 66 та 68-й дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [43, 44].

На 70-й день експерименту щурів виводили з експерименту. Зразки змішаної крові після декапітації тварин відбирали у центрифужні пробірки. Сироватку відділяли центрифугуванням впродовж 15 хв при 3000 об/хв.

Для отримання гомогенату тканини промивали промивали холодним (+4 °C) буферним розчином (250 ммоль сахарози, 5 ммоль Na₂EDTA, 5 ммоль трис-НСІ буферу (pH = 7,4)) та гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) у середовищі буферного розчину [45].

Активність NO-синтаз визначали спектрофотометричним методом за кількістю НАДФН₂, що окиснюється. Гомогенат інкубували 20 хв при температурі 40 °C з 1 мл реакційної суміші (при визначенні сумарної активності NOS (iNOS та cNOS): CaCl₂, трис-НСІ, MgCl₂, НАДФН⁺H⁺, L-Arg; при визначенні активності iNOS: EDTA, трис-НСІ, MgCl₂, НАДФН⁺H⁺, L-Arg). Реакцію зупиняли додаванням 0,3 мл HClO₄ та центрифугували (3000 об/хв), в надосадовій рідині визначали концентрацію НАДФН⁺H⁺, яку реєстрували за світлопоглинанням при довжині хвилі λ = 340 нм. Активність cNOS визначали як різницю NOS та iNOS. Об'єкт дослідження та одиниці вимірювання: гомогенат біологічної тканини — нмоль НАДФН₂/хв × г білка [46, 47].

Уміст стабільних метаболітів NO визначали спектрофотометричним методом за реакцією P. Griess у модифікації, що полягає у відновленні нітратів у нітрити хлоридом ванадію (III) та діазотуванням. Концентрацію NO визначали за світлопоглинанням при довжині хвилі λ = 540 нм. Об'єкт дослідження та одиниці вимірювання: сироватка крові — мкмоль/л [48].

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 — Уїлка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Стьюдента. Цифрові дані у 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), де 95% ДІ — 95% довірчий інтервал. При ненормальному розподілі принаймні однієї з груп незалежних величин відмінності між ними визначали попарно за непараметричним ранговим U-критерієм Манна — Уїтні (Mann-Whitney). При ненормальному розподілі отриманих величин дані наведено 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 подання даних обрано діаграми розмаху (box-and-whiskers diagram — «боксові» діаграми з «вусами») [49].

Результати та обговорення

Встановлено, що розвиток АІН у щурів супроводжувався розбалансуванням активності NOS у тканинах нирок. Рівень сумарної активності NOS (рис. 5) незначно знизився порівняно з показниками інтактних тварин (15,3 %; $p = 0,1$), проте співвідношення ізоформ вказаного ферменту зазнало значних зрушень. Активність iNOS статистично вірогідно ($p < 0,001$) зросла на 83,3 % та становила 2,2 [2,1; 2,9] нмоль НАДФН₂/хв × г білка, тоді як активність cNOS статистично вірогідно

($p = 0,002$) знизилась на 45,9 % відносно показників інтактних щурів (табл. 1).

Зростання активності iNOS на тлі розвитку АІН відбувається як частина швидкої початкової відповіді на імунне пошкодження при гломерулонефриті. Дослідження на моделях у гризунів показують, що це пов'язано з активацією факторів транскрипції активними формами кисню, що утворюються у відповідь на залучення Fcγ-рецептора. iNOS діє в складному середовищі серед багатьох інших медіаторів запалення, змінюючи експресію cNOS, критичного регулятора функції клубочків, і саморегулюючи його власну експресію. Поки що немає консенсусу щодо ролі високого рівня вироблення NO, створеного iNOS у клубочку, хоча багато досліджень показали, що інгібування NO може змінити рівень протеїнуриї та лейкоцитарної інфільтрації, а також інші прояви пошкодження, як-от тромбоз та проліферація [50]. За даними імуністохімічних досліджень А. Furusu та співавт. [51], iNOS локалізується в мезангіальних клітинах, клубочкових епітеліальних клітинах та інфільтруючих клітинах у клубочках хворих на гломерулонефрит, тоді як імунне забарвлення iNOS майже не проявлялось у нирках здорових добровольців.

Оцінка концентрації метаболітів NO у крові щурів з АІН продемонструвала значно більше статистично вірогідне ($p = 0,008$) підвищення вмісту NO на 68,2 % (рис. 6), що у 4,5 раза перевищувало зростання активності сумарної NOS, а це, очевидно, вказує на надходження NO з інших, ніж власне NOS-синтазної системи клітин нирок, джерел.

Зміни функції нирок, які відображаються змінами концентрації креатиніну, супроводжуватимуться змінами NO в сироватці крові [52]. Оскільки відомо, що сам сироватковий NO виводиться нирками, в основному за рахунок процесу клубочкової фільтрації зі швидкістю 20 мл/хв у людей, підвищений сироватковий NO можна сприймати як показник зниження функції нирок [52]. Великі кількості NO, отриманого з iNOS,

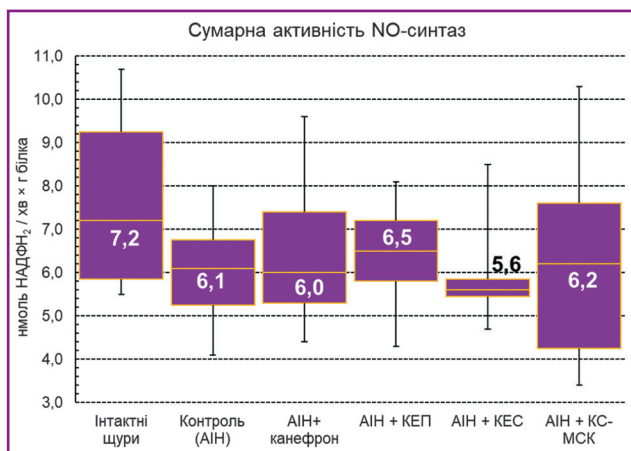


Рисунок 5. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на сумарну активність NO-синтаз у гомогенаті нирок щурів з АІН

Примітки: розподіл величин ненормальний; бокси включають результати від 25-го до 75-го перцентилу, вертикальні лінії за межами боксів — мінімальне та максимальне значення; горизонтальна лінія всередині боксу — медіана.

Таблиця 1. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на активність індукційної (iNOS) та конститутивної (cNOS) NO-синтаз у тканинах нирок щурів з АІН на 70-й день експерименту, пг/мг білка (Me [LQ; UQ], $n = 42$)

Досліджуванний 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 (АІН без лікув.)	АІН + канефрон	АІН + КЕП	АІН + КЕС	АІН + КС-МСК
n	7	7	7	7	7	7
Активність iNOS, нмоль НАДФН ₂ / хв × г білка	1,2 [0,8; 1,5]	2,2 [2,1; 2,9] $p_1 < 0,001$ [83,3 %]	1,8 [1,3; 2,1] $p_2 = 0,03$ [18,2 %]	1,5 [1,0; 2,3] $p_2 = 0,04$ [31,8 %] $p_3 = 0,3$ [16,7 %]	1,4 [0,8; 1,7] $p_2 = 0,008$ [36,4 %] $p_3 = 0,1$ [22,2 %]	1,0 [0,8; 1,2] $p_2 < 0,001$ [54,5 %] $p_3 = 0,015$ [44,4 %]
Активність cNOS, нмоль НАДФН ₂ / хв × г білка	6,1 [5,0; 7,7]	3,3 [2,9; 3,7] $p_1 = 0,002$ [45,9 %]	4,3 [3,7; 5,7] $p_2 = 0,02$ [30,3 %]	4,7 [4,2; 5,2] $p_2 = 0,015$ [42,4 %] $p_3 = 0,4$ [9,3 %]	4,0 [4,0; 4,5] $p_2 = 0,02$ [21,2 %] $p_3 = 0,4$ [7,0 %]	5,2 [3,4; 6,8] $p_2 = 0,05$ [57,9 %] $p_3 = 0,4$ [10,6 %]

Примітки: p_1 — рівень статистичної вірогідності розбіжності показників; [%] — значення розбіжностей показників у відсотках; індексами _{1,2,3} вказано номер групи, з показниками якої проведено зрівняння.

також можуть інгібувати конститутивно виражену активність NOS (eNOS та nNOS), що призводить до змін ниркової мікроциркуляції з порушенням мікросудинного гомеостазу та функції нирок [53, 54].

Дослідження показало, що застосування референс-препарату канефрону, як і досліджуваних БКБЗ, не призвело до статистично вірогідних змін з боку активності сумарної NOS у тканинах нирок щурів з АІН (рис. 5), яка залишалась нижчою за показники інтактних тварин. Однак оцінка співвідношення ізоформ NOS на тлі введення терапевтичних агентів показала статистично вірогідні зміни. Так, на тлі введення канефрону рівень iNOS у тканинах нирок щурів з АІН знизився на 18,2 % ($p = 0,03$) щодо показників інтактних тварин (табл. 1). На тлі застосування досліджуваних БКБЗ відмічено ще більше зниження активності iNOS. За вираженістю пригнічення активності iNOS (відсоток щодо показників нелікованих тварин) досліджувані БКБЗ доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (54,5 %; $p < 0,001$) > КЕС (36,4 %; $p = 0,008$) > КЕП (31,8 %; $p = 0,04$). Таким чином, показано, що введення КС-МСК супроводжувалося найвираженішим пригніченням гіперекспресії iNOS у щурів з АІН. Це узгоджується з встановленими нами раніше нефропротекторними властивостями КС-МСК. Механізм імуномодуляції на основі похідних МСК може базуватись на їх здатності зменшувати кількість дендритних клітин, що продукують прозапальний ФНП- α , інтерферон γ та ІЛ-17-продукуючі Т-клітини, а також шляхом збільшення кількості імуносупресивних ІЛ-10-продукуючих та регуляторних Т-клітин в пошкоджених нирках [55].

Крім встановленого зниження активності iNOS у тканинах нирок щурів з АІН, наше дослідження по-

казало здатність застосування БКБЗ призводити до відновлення активності sNOS. Встановлено, що досліджувані безклітинні засоби за здатністю підвищувати активність sNOS у тканинах нирок (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (57,9 %; $p = 0,05$) > КЕП (42,4 %; $p = 0,015$) > КЕС (21,2 %; $p = 0,02$).

Таким чином, проведене нами дослідження продемонструвало найвираженіше зростання активності Ca_2^+ -залежних ізоформ NOS (nNOS на eNOS) на тлі введення КС-МСК (табл. 1).

Варто зазначити, що оцінка вмісту стабільних метаболітів NO у крові показала, що статистично вірогідно ($p = 0,018$) найбільше зниження вмісту досліджуваних похідних вказаного газотрансмітера у щурів з АІН відмічалось на тлі введення КС-МСК — у тварин цієї групи рівень метаболітів NO становив $12,0 \pm 2,3$ (95% ДІ: 7,4–16,6) мкмоль/л (рис. 6).

Висновки

1. За здатністю нормалізувати гіперактивність iNOS (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) досліджувані БКБЗ доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (54,5 %; $p < 0,001$) > КЕС (36,4 %; $p = 0,008$) > КЕП (31,8 %; $p = 0,04$).

2. За здатністю нівелювати пригнічення активності sNOS у тканинах нирок (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (57,9 %; $p = 0,05$) > КЕП (42,4 %; $p = 0,015$) > КЕС (21,2 %; $p = 0,02$).

3. За здатністю нормалізувати вміст стабільних метаболітів NO у крові (відсоток щодо показників нелікованих щурів з АІН) досліджувані БКБЗ доцільно розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (41,3 %; $p = 0,018$) > КЕС (25,2 %; $p = 0,1$) > КЕП (4,9 %; $p = 0,7$).

Конфлікт інтересів. Автори рукопису свідомо за-свідчують відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чиї продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України «Вивчення ролі імунних, автоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликаний бактеріями, вірусами, вірусно-бактеріальними асоціаціями при гострому, затяжному та хронічному перебігу хвороби та удосконалення тактики лікування» (номер державної реєстрації 0123U105022, термін виконання: 2023–2028 рр., керівник — завідувача кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, к.м.н., доцент О.В. Волобуєва).

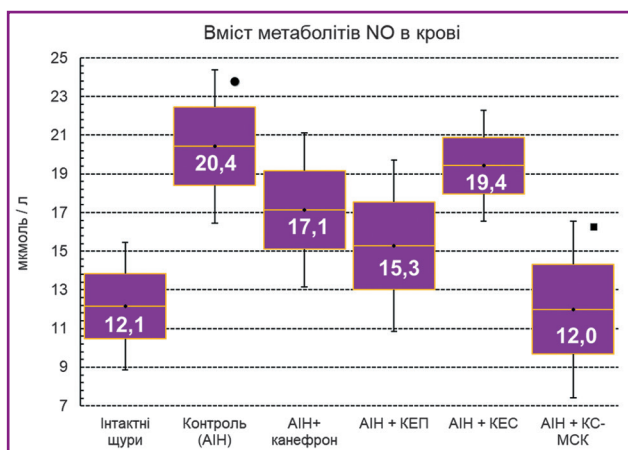


Рисунок 6. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на вміст метаболітів NO в крові щурів з АІН

Примітки: 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; • — $p < 0,05$ відносно показників інтактних щурів; ■ — $p < 0,05$ відносно показників щурів з АІН без лікування.

Інформація про фінансування. Робота не отримувала фінансування видатками Державного бюджету України.

Перспективи подальших досліджень. Результати проведеного дослідження вказують на доцільність подальшого вивчення механізмів, зокрема імуноопосередкованих, нефропротекторної активності безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів.

Внесок авторів. Гладких Ф.В. — ідея роботи, розробка концепції дослідження, формулювання мети роботи, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення даних, написання тексту рукопису; Лядова Т.І. — участь в обговоренні отриманих результатів, корегування рукопису статті.

References

- Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, et al. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 3;19(9):2605. doi: 10.3390/ijms19092605.
- Rodkin S, Nwosu C, Sannikov A, et al. The Role of Gasotransmitter-Dependent Signaling Mechanisms in Apoptotic Cell Death in Cardiovascular, Rheumatic, Kidney, and Neurodegenerative Diseases and Mental Disorders. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 23;24(7):6014. doi: 10.3390/ijms24076014.
- Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2010 May 15;12(10):1147-1154. doi: 10.1089/ars.2009.2899.
- Chiazza F, Chegaev K, Rogazzo M, et al. A nitric oxide-donor furoxan moiety improves the efficacy of edaravone against early renal dysfunction and injury evoked by ischemia/reperfusion. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:804659. doi: 10.1155/2015/804659.
- Haschemi A, Chin BY, Jeitler M, et al. Carbon monoxide induced PPAR γ SUMOylation and UCP2 block inflammatory gene expression in macrophages. *PLoS One.* 2011;6(10):e26376. doi: 10.1371/journal.pone.0026376.
- Semenikhina M, Stefanenko M, Spires DR, Ilatovskaya DV, Palygin O. Nitric-Oxide-Mediated Signaling in Podocyte Pathophysiology. *Biomolecules.* 2022 May 25;12(6):745. doi: 10.3390/biom12060745.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-837, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Mattila JT, Thomas AC. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol.* 2014 Oct 9;5:478. doi: 10.3389/fimmu.2014.00478.
- Abán CE, Accialini PL, Etcheverry T, Leguizamón GF, Martínez NA, Farina MG. Crosstalk Between Nitric Oxide and Endocannabinoid Signaling Pathways in Normal and Pathological Placentation. *Front Physiol.* 2018 Dec 4;9:1699. doi: 10.3389/fphys.2018.01699.
- Carlström M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nat Rev Nephrol.* 2021 Sep;17(9):575-590. doi: 10.1038/s41581-021-00429-z.
- Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016 Jul 20;25(3):119-146. doi: 10.1089/ars.2016.6665.
- Lee J. Nitric oxide in the kidney: its physiological role and pathophysiological implications. *Electrolyte Blood Press.* 2008 Jun;6(1):27-34. doi: 10.5049/EBP.2008.6.1.27.
- Granger JP, Alexander BT, Llinas M. Mechanisms of pressure natriuresis. *Curr Hypertens Rep.* 2002 Apr;4(2):152-159. doi: 10.1007/s11906-002-0040-3.
- Searles CD, Ide L, Davis ME, Cai H, Weber M. Actin cytoskeleton organization and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth. *Circ Res.* 2004 Sep 3;95(5):488-495. doi: 10.1161/01.RES.0000138953.21377.80.
- Palygin O, Ilatovskaya DV, Levchenko V, Endres BT, Geurts AM, Staruschenko A. Nitric oxide production by glomerular podocytes. *Nitric Oxide.* 2018 Jan 30;72:24-31. doi: 10.1016/j.niox.2017.11.005.
- Kwiatkowska E, Stefańska K, Zieliński M, et al. Podocytes-The Most Vulnerable Renal Cells in Preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 17;21(14):5051. doi: 10.3390/ijms21145051.
- Issa W, Njeim R, Carrazco A, Burke GW, Mitrofanova A. Role of the Innate Immune Response in Glomerular Disease Pathogenesis: Focus on Podocytes. *Cells.* 2024 Jul 6;13(13):1157. doi: 10.3390/cells13131157.
- Lv X, Wang J, Zhang L, et al. Canagliflozin reverses Th1/Th2 imbalance and promotes podocyte autophagy in rats with membranous nephropathy. *Front Immunol.* 2022 Dec 1;13:993869. doi: 10.3389/fimmu.2022.993869.
- Dantas M, Silva LBB, Pontes BTM, Dos Reis MA, de Lima PSN, Moysés Neto M. Membranous nephropathy. *J Bras Nefrol.* 2023 Apr-Jun;45(2):229-243. doi: 10.1590/2175-8239-JBN-2023-0046en.
- Cybulsky AV, Quigg RJ, Salant DJ. Experimental membranous nephropathy redux. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Oct;289(4):F660-671. doi: 10.1152/ajprenal.00437.2004.
- Ma H, Sandor DG, Beck LH Jr. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol.* 2013 Nov;33(6):531-542. doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.004.
- Liu W, Huang G, Rui H, et al. Course monitoring of membranous nephropathy: Both autoantibodies and podocytes require multidimensional attention. *Autoimmun Rev.* 2022 Feb;21(2):102976. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102976.
- 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):124-137. doi: 10.26565/2312-5675-2024-24-02.
- Hladkykh FV. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: ways to optimize therapeutic and side effects. *Vynnytsia: TVORY;* 2022. 216 p. Ukrainian. doi: 10.46879/2022.1.
- 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. Ukrainian. doi: 10.32345/2664-4738.2.2022.01.
- 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. Ukrainian. doi: 10.37321/immunology.2023.4-04.
- Shebeko SK. The experimental substantiation of combined application of amino sugar derivatives and flavonoids in the treatment

- of chronic kidney disease. *Dr. pharm. sci. diss. Kharkiv*; 2017. 516 p. Ukrainian.
28. 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.
 29. Mohammed-Ali Z, Carlisle RE, Nademi S, Dickhout JG. Chapter 16 - Animal Models of Kidney Disease. In: Conn MP, editor. *Animal Models for the Study of Human Disease*. 2nd ed. Oxford, UK: Academic Press; 2017. 379-417 pp. doi: 10.1016/B978-0-12-809468-6.00016-4.
 30. Jefferson JA, Pippin JW, Shankland SJ. Experimental Models of Membranous Nephropathy. *Drug Discov Today Dis Models*. 2010 Spring;7(1-2):27-33. doi: 10.1016/j.ddmod.2010.11.001.
 31. Becker GJ, Hewitson TD. Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Oct;28(10):2432-2438. doi: 10.1093/ndt/gft071.
 32. Wang YM, Lee VWS, Wu H, Harris DCH, Alexander SI. Heymann nephritis in Lewis rats. *Curr Protoc Immunol*. 2015 Apr 1;109:15.29.1-15.29.6. doi: 10.1002/0471142735.im1529s109.
 33. Shtryhgol SYu, Lisovyi VM, Zupanets IA, et al. Methods of experimental modeling of kidney damage for pharmacological research: methodical recommendations. *Kharkiv*; 2009. 48 p. Ukrainian.
 34. Podpletnyaia OA, Khomiak NV, Sokolova EV, Kaydash SP, Khomiak EV. Phytotherapeutic drugs with nephroprotective activity (review). *Med perspekt*. 2017Apr;22(1):10-19. Ukrainian. doi: 10.26641/2307-0404.2017.1.100866.
 35. 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. Ukrainian. doi: 10.30841/2307-5090.4.2021.252396.
 36. Monatko KV. Experimental study of the nephroprotective effect of freeze-dried watermelon powder. *PhD diss. Kharkiv*; 2014. 217 p. Ukrainian.
 37. 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;(1):80-83. Ukrainian. doi: 10.30841/2307-5090.1.2020.205494.
 38. Rybolovlev YuR, Rybolovlev RC. Dosing of substances for mammals by biological activity constants. *Reports of Academy of Sciences of the USSR*. 1979;247(6):1513-1516. Russian.
 39. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947;1:291-308. doi: 10.1146/annurev.mi.01.100147.001451.
 40. 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. *Dr. med. sci. diss. Kharkiv*; 2004. 326 p. Ukrainian.
 41. Prokopyuk OS. Placenta cryopreservation and determination of the mechanisms of its influence on the body of recipients of late ontogenesis (experimental study). *Dr. med. sci. diss. Kharkiv*; 2011. 351 p. Ukrainian.
 42. Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin. *PhD diss. Kharkiv*; 2016. 162 p. Ukrainian.
 43. Golubinskaya PA, Sarycheva MV, Dolzhikov AA, et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy and Pharmacology*. 2020;8(6):416-425. doi: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425.
 44. Globa VYu. Application of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. *PhD diss. Kharkiv*; 2021. 156 p. Ukrainian.
 45. Stefanov OV, editor. *Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations*. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p. Ukrainian.
 46. Hula NM, Kosiakova HV, Berdyshev AH. The effects of n-stearoylethanolamine on the NO-synthase pathway of NO generation in the aorta and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ukr Biokhim Zh (1999)*. 2007 Sep-Oct;79(5):153-158. Ukrainian.
 47. Sumbaev VV, Yasinskaya IM. The effect of DDT on the activity of nitric oxide synthase in the liver, lungs, and brain. *Contemporary problems of toxicology*. 2000;(3):3-7. Ukrainian.
 48. Griess P. Remarks on the treatise by HH Weselsky and Benedikt "On some azo compounds". *Chemische Berichte*. 1879;12(1):426-428. German. doi: 10.1002/cber.187901201117.
 49. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 5th ed. Englewood: Prentice-Hall; 2014. 944 p.
 50. Cattell V. Nitric oxide and glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2002 Mar;61(3):816-821. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00226.x.
 51. Furusu A, Miyazaki M, Abe K, et al. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1998 Jun;53(6):1760-1768. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00907.x.
 52. Meenakshi SR, Agarwal R. Nitric oxide levels in patients with chronic renal disease. *J Clin Diagn Res*. 2013 Jul;7(7):1288-1290. doi: 10.7860/JCDR/2013/5972.3119.
 53. Oliveira FRMB, Assreuy J, Sordi R. The role of nitric oxide in sepsis-associated kidney injury. *Biosci Rep*. 2022 Jul 29;42(7):BSR20220093. doi: 10.1042/BSR20220093.
 54. Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FG, Pickkers P. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2009 Nov;5(11):629-640. doi: 10.1038/nrneph.2009.155.
 55. Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, et al. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1315378. doi: 10.1155/2017/1315378.

Отримано/Received 01.08.2024

Рецензовано/Revised 11.08.2024

Прийнято до друку/Accepted 20.08.2024 ■

Information about authors

Fedir Hladkykh, PhD in Medicine, Doctoral Student at the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com; phone: +380 (99) 782-78-72; Senior Research Fellow at the Department Group of Radiation Pathology and Palliative Medicine at the Radiology Department, State Institution "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

Tetyana Liadova, MD, DSc, PhD, Professor at the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Dean of the Medical Faculty, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: t.lyadova@karazin.ua; phone: +380 (50) 692-56-41; <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>

Conflicts of interests. The author of the manuscript consciously certify the absence of actual or potential conflicts of interest regarding the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, other organizations whose products, services, financial support may be related to the subject of the provided materials or who sponsored the conducted research.

Connection of work with scientific programs, plans and topics. The article is a fragment of the planned research work of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology of V.N. Kharkiv National University. Karazin of the Ministry of Health of Ukraine "Study of the role of immune, autoimmune and metabolic disorders in the pathogenesis and consequences of the infectious process caused by bacteria, viruses, viral-bacterial associations in the acute, prolonged and chronic course of the disease and improvement of treatment tactics" (state registration number 0123U105022, deadline: 2023–2028, head — head of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Doctor of Medicine, Associate Professor O.V. Volobueva).

Information about funding. The work was not financed by the State Budget of Ukraine.

Prospects for further research. The results of the conducted research indicate the expediency of further study of mechanisms, including immune-mediated, nephroprotective activity of cell-free cryopreserved biological agents.

Authors' contribution. Hladkykh F.V. — idea of the work, development of the research concept, formulation of the purpose of the work, conducting experimental research, analysis and summarization of data, writing the text of the manuscript; Liadova T.I. — participation in the discussion of the obtained results, correction of the manuscript of the article.

F.V. Hladkykh^{1,2}, T.I. Liadova¹

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

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

The state of NOergic homeostasis in experimental autoimmune glomerulonephritis against the background of the use of cell-free cryopreserved biological agents

Abstract. Background. Along with hydrogen sulfide and carbon monoxide, nitrogen monoxide (NO) has earned a reputation as a powerful vasodilator. NO is synthesized from L-arginine by a group of enzymes called NO synthases (NOS). NOS catalyzes the conversion of L-arginine into L-citrulline and NO. There are three isoforms of NOS that are often described based on their expression in tissues: 1) neuronal NOS (nNOS), 2) inducible NOS (iNOS), and 3) epithelial NOS (eNOS). NO is a vital molecule involved in a number of signaling functions in the kidney and can be released by a variety of kidney cells, including endothelial and mesangial cells as well as podocytes. Podocyte damage mediated by antibodies against podocyte antigens deposited under glomerular visceral epithelial cells is called membranous nephropathy. Cell-free cryopreserved biological agents (CfBA) have attracted our attention as potential means for the treatment of patients with membranous nephropathy, in particular, cryoextract of human placenta, cryoextract of porcine spleen and mesenchymal stem cell-conditioned medium (MSC-CM). The purpose of the study was to assess the effect of cryoextracts of placenta (CEP) and spleen (CES), as well as MSC-CM on the state of NOergic system of the kidneys of rats with autoimmune membranous nephropathy. **Materials and methods.** Research on the effectiveness of CfBA in autoimmune nephritis (AIN) was conducted on 42 male rats. AIN was reproduced according to the method of W.R. Heymann et al. The studied drugs were administered to rats from the day 60 of the experiment. CfBA were injected intramuscularly with an interval of 2 days (total of 5 injections) on the day 60, 62, 64, 66 and 68 of the experiment, respectively. NOS activity was evaluated by the spectrophotometric method based on the amount of oxidizable NADPH₂. The content of stable NO metabolites was determined by

the spectrophotometric method according to the modified Griess test. **Results.** It was found that the development of AIN in rats was accompanied by an imbalance of NOS activity in renal tissues. The activity of iNOS was increased statistically significantly ($p < 0.001$) by 83.3 %. The concentration of stable NO metabolites in the blood of rats with AIN increased statistically significantly ($p = 0.008$) by 68.2 %, which was 4.5 times higher than an increase in total NOS activity. A decrease in the activity of iNOS was noted against the background of using the investigated CfBA. Our study demonstrated the most pronounced increase in the activity of constitutive Ca²⁺-dependent NOS isoforms (nNOS on eNOS) against the background of MSC-CM administration. **Conclusions.** Depending on the ability to normalize iNOS hyperactivity (percentage compared to the indicators of untreated rats with AIN), it is advisable to place the studied CfBA in the following sequence: MSC-CM (54.5 %; $p < 0.001$) > CES (36.4 %; $p = 0.008$) > CEP (31.8 %; $p = 0.04$). According to the ability to eliminate inhibition of constitutive NOS activity in renal tissues (percentage compared to the indicators of untreated rats with AIN), it is advisable to place them in the following sequence: MSC-CM (57.9 %; $p = 0.05$) > CEP (42.4 %; $p = 0.015$) > CES (21.2 %; $p = 0.02$). By the ability to normalize the content of stable NO metabolites in the blood (percentage compared to the indicators of untreated rats with AIN), it is advisable to place the studied CfBA in the following sequence: MSC-CM (41.3 %; $p = 0.018$) > CES (25.2 %; $p = 0.1$) > CEP (4.9 %; $p = 0.7$).

Keywords: autoimmune glomerulonephritis; Heymann nephritis; membranous nephropathy; nitrogen monoxide; placental cryoextract; spleen cryoextract; mesenchymal stem cell-conditioned medium