

# Оцінка рівня імуноглобулінів А, М і G на тлі введення безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів при експериментальному автоімунному тиреоїдиті



**Ф. В. Гладких**

*Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України  
ДУ «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва  
НАМН України», Харків*

Автоімунні захворювання (АІЗ) — це гетерогенна група з понад 100 патологічних станів, які характеризуються зміною регуляції запальних процесів проти одного або кількох автоантигенів [1]. Найпоширенішим органоспецифічним АІЗ є автоімунне захворювання щитоподібної залози (ЩЗ) [2]. Спектр АІЗ ЩЗ охоплює хворобу Грейвса-Базеда та тиреоїдит Хашимото з двома крайніми виявами клінічної картини: гіпертиреоз (у випадку хвороби Грейвса-Базеда) і гіпотиреоз (у разі тиреоїдиту Хашимото). Однак є випадки, коли за наявності тиреоїдного автоімунітету відсутні клінічні або біохімічні вияви гіпотиреозу або гіпертиреозу [1].

Багато досліджень виявили можливі причини АІЗ ЩЗ, такі як чинники генетичної сприйнятливості, дисрегуляція імунної системи, запалення, стрес та інші чинники довкілля, але їх етіологію досі активно досліджують [3].

Відомо, що гіпертиреоз розвивається через надмірне вироблення гормонів у відповідь на наявність стимулювальних антитіл до рецептора тиретропного гормону. Тиреоїдит Хашимото зазвичай характеризується наявністю тиреоїдної пероксидази та антитіл до тиреоглобуліну із супутньою інфільтрацією лімфоцитів у ЩЗ. Через руйнування клітин, що прогресує, АІЗ може призвести до субклінічного

або явного гіпотиреозу. Патофізіологія тиреоїдиту є надзвичайно складною та не повністю вивченою, в її розвитку беруть участь генетичні, екологічні та епігенетичні чинники. З огляду на зростання захворюваності та соціальної обізнаності про цю патологію існує нагальна потреба в розробці стратегій лікування, окрім традиційних підходів [4].

Використання біологічних препаратів при системних імуноопосередкованих захворюваннях різко зросло останніми роками, замінивши звичайні імуносупресивні стратегії, які характеризуються неспецифічними механізмами дії та мають серйозні побічні ефекти. Біологічні препарати вибірково діють на специфічні мішені зі значним стероїдоощадним ефектом. Нині їх використовують для індукції ремісії або лікування певних уражень органів при системних АІЗ [2, 6].

Нашу увагу привернуло застосування біотехнологічних препаратів, які не містять клітин, підданих дії низьких температур при їх отриманні (кріоекстракти) або тривалому зберіганні. Об'єктом дослідження було обрано безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ) [5] вітчизняного виробництва — кріоекстракт плаценти (КЕП), кріоекстракт селезінки (КЕС) та кондиціоноване середовище від мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК). У попередніх дослідженнях показана ефективність застосування

**Гладких Федір Володимирович**, доктор філософії в галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина», докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, ст. наук. співр. відділу променевої патології та паліативної медицини. E-mail: [fedir.hladkykh@gmail.com](mailto:fedir.hladkykh@gmail.com). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

БКБЗ при низці АІЗ — автоімунному енцефаломієліті [7], автоімунному міокардиті [8], автоімунному артриті [9], автоімунному гепатиті [10] та мембранозній нефропатії [11].

**Мета роботи** — схарактеризувати вплив кріоекстрактів плаценти та селезінки й кондиціонованого середовища від мезенхімальних стовбурових клітин на рівень імуноглобулінів А, М і G у щурів зі змодельованим автоімунним тиреоїдитом.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні дослідження проведені відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту і Ради Європейського Союзу «Про захист тварин, яких використовують із науковою метою» (Брюссель, 2010), 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 (Київ, 2001).

Автоімунний тиреоїдит (АІТ) моделювали шляхом введення щурам тиреоїдної антигенної суміші, яка містила повний ад'ювант Фрейнда (Thermo Fisher Scientific, США) та розчин антигену, отриманого з гомогенату алогенної ЩЗ у співвідношенні 1 : 1 [12, 13].

Щитоподібну залозу гомогенізували в 0,9 % розчині NaCl із розрахунку 1 мл/100 мг, фільтрували крізь капроновий фільтр та центрифугували впродовж 5 хв при 1000 об./хв. Відбирали супернатант, що містив антиген ЩЗ, який стандартизували за вмістом загального білка (1,0—1,5 мг/мл), визначений біуретовим методом [14—16]. Отриману тиреоїдну антигенну суміш вводили щурам підшкірно в основу хвоста в дозі 1,0 мл/кг маси тіла двічі з інтервалом 7 днів [14—16].

Розвиток АІТ верифікували за рівнем антитіл до тиреоглобуліну через 7 днів після другого введення тиреоїдної антигенної суміші (на 14-й день експерименту). Як референс-препарат використано синтетичну форму тироксину — левотироксин (L-тироксин), який вводили внутрішньошлунково в дозі 0,01 мг/кг

щоденно з 17-го до 26-го дня експерименту (усього 10 введень) [14—16]. У периферичних тканинах L-тироксин перетворюється на трийодтиронін і забезпечує адекватне відновлення функції ЩЗ [14—16].

Дослідження ефективності БКБЗ при АІТ проведені на 42 щурах-самцях лінії Wistar масою 200—220 г, рандомізованих на 6 груп [17]:

1 (негативний контроль) — інтактні щури (n = 7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26-й день експерименту внутрішньом'язово (в/м) вводили 0,9 % розчин NaCl у дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

2 — щури зі змодельованим АІТ (n = 7) без лікування (контрольна група), яким на 14, 17, 20, 23 та 26-й день експерименту в/м вводили 0,9 % розчин NaCl у дозі 1,0 мл/кг;

3 — щури зі змодельованим АІТ (n = 7), яким щоденно з 17-го до 26-го дня внутрішньошлунково вводили L-тироксин у дозі 0,01 мг/кг (усього 14 введень) [14];

4 — щури зі змодельованим АІТ (n = 7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26-й день експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [18];

5 — щури зі змодельованим АІТ (n = 7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26-й день експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [19];

6 — щури зі змодельованим АІТ (n = 7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26-й день експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [20, 21].

На 28-му добу експерименту тварин виводили з експерименту та відбирали зразки змішаної (венозної та артеріальної) крові. Вміст імуноглобулінів (Ig) А, М, G (мг/мл) визначали імуноферментним методом за допомогою стандартних наборів для імуноферментного аналізу (Human GmbH, Німеччина) згідно з інструкцією виробника [22].

Статистичну обробку одержаних результатів виконано 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. При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Стьюдента. Кількісні дані у разі нормального розподілу величин наведено у вигляді  $M \pm m$ , де M — середнє арифметичне значення, m — стандартна похибка середнього арифметичного, M (95 % довірчий інтервал (ДІ)) або Me (LQ; UQ), де Me — медіана, (LQ; UQ) — міжквартильний розмах [23].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показало, що в щурів контрольної групи, які не отримували лікування, рівень імуноглобулінів у сироватці крові був значно вищим, ніж в інтактних тварин, що підтверджує активність автоімунного процесу при експериментальному АІТ. Так, рівень IgA у щурів з АІТ без лікування (контрольна група) був статистично значущо ( $p < 0,001$ ) підвищений порівняно з інтактними тваринами та становив  $(8,2 \pm 0,2)$  мг/мл, що на 31,4 % більше порівняно з показниками інтактних тварин  $((6,2 \pm 0,3)$  мг/мл). Підвищений рівень IgA характерний для АІЗ, оскільки в умовах автоімунної активації спостерігається активація В-лімфоцитів і секреція антитіл до власних тканин організму, що призводить до підвищення рівня імуноглобулінів.

Рівень IgM у щурів контрольної групи, які не отримували лікування, становив 28,0 (23,5; 31,0) мг/мл. Це підвищення є типовим для автоімунних процесів, оскільки IgM є першим антитілом, яке реагує на нові антигени та бере участь в ініціації імунної відповіді. Підвищення рівня IgM також свідчить про активацію імунної системи при АІТ. Вміст IgG у щурів контрольної групи становив  $(17,4 \pm 1,0)$  мг/мл (95 % ДІ 15,4—19,4), що перевищувало показник інтактних

тварин  $((10,7 \pm 0,9)$  мг/мл). Підвищення рівня IgG є характерним для АІЗ, коли відбувається вироблення антитіл, які можуть атакувати власні тканини організму. Це свідчить про хронічну активацію імунної системи в щурів контрольної групи, що є типовим при розвитку АІТ. Таким чином, у контрольній групі спостерігалися суттєві зміни рівня імуноглобулінів, що свідчить про активний автоімунний процес.

Установлено, що рівень IgA в сироватці крові щурів з АІТ значно змінювався під впливом як БКБЗ, так і левотироксину, які застосовували в експерименті. Зареєстрували значні коливання рівня IgA залежно від терапії (таблиця), що свідчить про різну ефективність застосованих препаратів щодо корекції імунних порушень.

Застосування левотироксину сприяло статистично значущому ( $p = 0,049$ ) зниженню рівня IgA в сироватці крові на 9,4 %  $((7,4 \pm 0,3)$  мг/мл) порівняно з контрольними тваринами. Це свідчить, що левотироксин певним чином впливав на нормалізацію імунної відповіді, але ефект не був достатнім для досягнення показників інтактних тварин. Зниження рівня IgA в цій групі можна інтерпретувати як певну корекцію імунного статусу через нормалізацію тиреоїдної функції, але це також вказує на те,

Таблиця

Вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів і левотироксину на рівень імуноглобулінів у сироватці крові щурів (мг/мл) з автоімунним тиреоїдитом на 28-й день експерименту ( $n = 42$ )

Група	IgA M ± m (95 % ДІ)	IgM Me (LQ; UQ)	IgG M ± m (95 % ДІ)
1 (n = 7)	6,2 ± 0,3 (5,7—6,8)	15,0 (14,7; 15,9)	10,7 ± 0,9 (9,0—12,5)
2 (n = 7)	8,2 ± 0,2 (7,8—8,6)	28,0 (23,5; 31,0)	17,4 ± 1,0 (15,4—19,4)
Різниця щодо групи 1	31,4 %*	86,7 %*	62,7 %*
3 (n = 7)	7,4 ± 0,3 (6,9—8,0)	21,0 (20,0; 24,0)	11,3 ± 0,7 (10,0—12,6)
Різниця щодо групи 2	9,4 %***	25,0 %***	65,2 %*
4 (n = 7)	6,9 ± 0,2 (6,5—7,4)	20,0 (20,0; 21,5)	12,0 ± 1,0 (9,9—14,1)
Різниця щодо групи 2	15,5 %*	28,6 %**	31,1 %*
Різниця щодо групи 3	6,8 %	4,8 %	6,3 %
5 (n = 7)	7,6 ± 0,5 (6,6—8,6)	21,0 (19,5; 22,5)	10,0 ± 0,7 (8,6—11,4)
Різниця щодо групи 2	7,7 %	25,0 %**	42,6 %*
Різниця щодо групи 3	4,4 %	0 %	11,4 %
6 (n = 7)	6,6 ± 0,3 (6,0—7,3)	17,0 (15,0; 19,5)	9,7 ± 0,6 (8,5—11,0)
Різниця щодо групи 2	19,2 %*	39,3 %*	44,3 %*
Різниця щодо групи 3	10,8 %	19,0 %**	13,9 %

Примітка. Різниця статистично значуща: \*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,05$ .

що лише корекції рівня тиреоїдних гормонів недостатньо для нормалізації імунної відповіді.

Серед двох досліджуваних кріоекстрактів введення КЕП у щурів з АІТ призвело до більш виразного зниження рівня IgA, ніж КЕС. Так, у групі щурів, що отримували КЕП, цей показник статистично значущо ( $p < 0,001$ ) на 15,5 % був менше показників контрольної групи і становив ( $6,9 \pm 0,2$ ) мг/мл. Це зниження рівня IgA свідчить, що КЕП мав більший ефект порівняно з левотироксином. Однак вміст IgA в цій групі був вище за показники інтактних тварин, що може вказувати на те, що КЕП не повністю компенсує автоімунні порушення, які виникають у щурів з АІТ. Зниження рівня IgA на 15,5 % є доказом того, що КЕП має певну коригувальну дію на імунний статус щурів з АІТ.

Група щурів, які отримували КЕС, продемонструвала менш виразне зниження рівня IgA, ніж група, яка отримувала КЕП. Вміст IgA в сироватці крові в цій групі становив ( $7,6 \pm 0,5$ ) мг/мл, що на 7,7 % нижче за показники тварин, які не отримували лікування. Це свідчить, що, хоча КЕС має певний ефект на зниження рівня IgA, він не настільки значний, як у КЕП. Можливо, препарат КЕС менш ефективний у корекції автоімунної активації (найменше зниження рівня IgA (див. таблицю)).

Найбільше зниження вмісту IgA зареєстрували в групі щурів, які отримували КС-МСК, — ( $6,6 \pm 0,3$ ) мг/мл, що статистично значущо ( $p = 0,001$ ) на 19,2 % менше порівняно з показниками тварин групи контролю. Це вказує на те, що КС-МСК має значно більший вплив на IgA порівняно з іншими досліджуваними препаратами. Цей результат можна трактувати як найбільш виразну корекцію імунної відповіді, що свідчить про високий потенціал КС-МСК для нормалізації імунного профілю при АІТ. Імовірно, це пов'язано з виразнішим впливом цього препарату на імунну систему через його протизапальні властивості, які сприяють зменшенню надмірної продукції IgA у відповідь на автоімунне пошкодження.

Таким чином, можна стверджувати, що препарати, які застосовували в експерименті, мають різний рівень ефективності щодо корекції рівня IgA в умовах АІТ. Найбільший вплив на нормалізацію рівня IgA має КС-МСК, що вказує на його потенціал як перспективного терапевтичного засобу для лікування АІЗ. Вміст IgA в групах, які отримували КЕП і КЕС, також знижувався, що свідчить про можливість використання цих препаратів для часткової корекції імунної відповіді в разі АІТ.

Оцінка рівня IgM (див. таблицю) у сироватці крові щурів з АІТ показала, що він статистично значущо ( $p < 0,001$ ) на 86,7 % перевищував показник інтактних щурів (28,0 (23,5; 31,0) і 15,0 (14,7; 15,9) мг/мл). Це свідчить, що автоімунний процес спричинює активацію імунної системи, що виявляється підвищеною продукцією IgM. Збільшення вмісту IgM є маркером первинної імунної відповіді організму на порушення його імунної толерантності. У разі АІТ це означає, що організм активно реагує на автоагресію, що спостерігається при пошкодженні тканин ЩЗ.

Введення левотироксину в щурів з АІТ спричинило статистично значуще ( $p = 0,018$ ) зниження рівня IgM до 21,0 (20,0; 24,0) мг/мл, що на 25,0 % менше порівняно з контрольною групою. Це зниження свідчить про певний коригувальний ефект левотироксину на імунну відповідь, але рівень IgM залишався значно вищим порівняно з показниками інтактних тварин. Левотироксин допомагає знизити активність автоімунного процесу, але не може повністю зупинити його.

Іншим препаратом, дослідженим у контексті АІТ, є КЕП. У щурів, які отримували його, рівень IgM статистично значущо ( $p = 0,004$ ) знизився до 20,0 (20,0; 21,5) мг/мл, що на 28,6 % менше порівняно з контрольною групою. Це вказує на те, що КЕП має більший ефект на зниження рівня IgM порівняно з левотироксином. Імовірно, КЕП володіє не лише гормональною активністю, а й здатністю модулювати імунну відповідь, знижуючи автоімунну активацію в організмі. Однак навіть на тлі застосування КЕП рівень IgM був вищим за норму, що свідчить про недостатність цієї терапії для повного відновлення імунної толерантності.

Ще одним препаратом, який показав ефективність у зниженні рівня IgM, був КЕС. У групі щурів, які його отримували, рівень IgM знизився до 21,0 (19,5; 22,5) мг/мл, що на 25,0 % менше порівняно з контрольними тваринами. Це вказує на те, що КЕС також має імуномодулювальну активність, але її ефективність не настільки виразна, як у КЕП. Зниження рівня IgM на тлі КЕС було суттєвим, але не досягло рівня, характерного для здорових тварин.

Найбільше зниження рівня IgM зареєстрували в групі щурів, що отримували КС-МСК. У цих тварин рівень IgM знизився до 17,0 (15,0; 19,5) мг/мл, що на 39,3 % статистично значущо ( $p < 0,001$ ) менше порівняно з показниками тварин контрольної групи. Це свідчить про високу ефективність КС-МСК щодо зниження рівня IgM та корекції автоімунного процесу. Зменшення вмісту IgM на тлі застосування КС-МСК

було найбільшим серед усіх досліджених БКБЗ, що вказує на його потужний вплив на імунну систему. Препарат, імовірно, володіє імуномодулювальною дією, яка дає змогу знижувати активність автоімунного процесу, що сприяє нормалізації рівня IgM.

Отже, порівняння впливу досліджуваних препаратів на рівень IgM виявило, що КС-МСК є найефективнішим засобом із БКБЗ. Він не лише знижує рівень IgM до значень, близьких до нормальних, а й має потужний імуномодулювальний ефект, який сприяє стабілізації імунної відповіді та зменшенню автоімунної активації. Інші препарати (левотироксин, КЕП та КЕС) також продемонстрували певну ефективність щодо зниження рівня IgM, але їхній вплив був менш виразний.

Підвищення рівня IgG є класичним маркером хронічної імунної активації, яка зазвичай спостерігається при АІЗ, зокрема при АІТ. Установлено, що в щурів контрольної групи, які не отримували жодного лікування, рівень IgG був значно підвищений і становив  $(17,4 \pm 1,0)$  мг/мл. Порівняно з інтактними щурами, в яких цей показник становив  $(10,7 \pm 0,9)$  мг/мл, статистично значуще ( $p < 0,001$ ) підвищення рівня IgG на 62,7% у контрольних тварин свідчить про активний розвиток захворювання.

При застосуванні левотироксину рівень IgG знизився до  $(11,3 \pm 0,7)$  мг/мл, що на 65,2% менше порівняно з контрольною групою ( $p < 0,001$ ). Використання левотироксину допомагає відновити нормальний рівень гормонів, що регулюють метаболічні процеси в організмі. Це сприяє зменшенню запалення в ЩЗ і, відповідно, зниженню рівня IgG, що є ознакою зменшення автоімунного процесу.

Щодо досліджуваних кріоекстрактів, то їхній вплив на рівень IgG також був значим. У групі щурів, які отримували КЕП, цей показник становив  $(12,0 \pm 1,0)$  мг/мл, що на 31,1% менше, ніж у контрольних тварин ( $p < 0,001$ ). Це свідчить про деякий протизапальний ефект КЕП, що допомагає знизити рівень IgG та зменшити автоімунне ураження. Порівняно з іншими терапевтичними засобами ефект КЕП був помірним, але статистично значущим.

У групі щурів, що отримували КЕС, рівень IgG був ще нижчим —  $(10,0 \pm 0,7)$  мг/мл, що на 42,6% менше порівняно з контрольною групою ( $p < 0,001$ ). Це свідчить про виразніший ефект КЕС у зниженні рівня IgG. Установлено, що КЕС мав потужніший імуносупресивний ефект порівняно з КЕП, що дало змогу зменшити рівень антитіл і, ймовірно, поліпшити стан щурів, які страждають на АІТ.

Найбільше зниження рівня IgG зареєстроване в групі щурів, які отримували КС-МСК (див. таблицю). У цих тварин вміст IgG становив  $(9,7 \pm 0,6)$  мг/мл, що на 44,3% менше, ніж у контрольних тварин ( $p < 0,001$ ). Цей результат свідчить про дуже виразний ефект КС-МСК, що може бути пов'язано з його здатністю потужно впливати на імунну систему, знижуючи рівень автоімунної активації. Установлено, що КС-МСК може стабілізувати імунний статус, зменшуючи вміст IgG, що є важливим показником у лікуванні АІТ.

Отримані результати відкривають нові можливості для застосування кріоекстрактів у лікуванні АІТ. З огляду на їхню здатність знижувати рівень імуноглобулінів А, М та G і впливати на імунну систему, вони можуть стати важливим компонентом терапії в комплексному лікуванні АІЗ.

## ВИСНОВКИ

Лікування левотироксином мало певний ефект, але не дало змоги досягти нормалізації рівня IgA. Препарати КЕП, КЕС і КС-МСК продемонстрували здатність зменшувати вміст IgA, але КС-МСК виявився найефективнішим, знизивши цей показник на 19,2% ( $p = 0,001$ ). Це свідчить про те, що препарат КС-МСК має найвиразнішу терапевтичну дію щодо корекції імунної відповіді, пов'язаної з АІТ.

Застосування КС-МСК продемонструвало найкращі результати щодо зниження рівня IgM — на 39,9% менше показників щурів контрольної групи ( $p < 0,001$ ), що свідчить про його високу ефективність у лікуванні АІТ.

Найбільше зниження рівня IgG у сироватці крові щурів з АІТ зареєстровано на тлі введення КС-МСК —  $(9,7 \pm 0,6)$  мг/мл, що на 44,3% менше, ніж у щурів контрольної групи ( $p < 0,001$ ).

**Перспективи подальших досліджень** полягають у глибшому вивченні механізмів дії кріоекстрактів та КС-МСК щодо корекції імунних порушень при АІТ. Слід дослідити, як ці препарати впливають на інші показники імунної відповіді, такі як активація Т-клітин, продукція цитокінів та інших маркерів запалення, що дасть змогу краще зрозуміти їхні механізми дії. Необхідно провести порівняльні дослідження терапевтичних засобів для оцінки їх тривалої ефективності та безпечності, а також вивчити можливість застосування цих препаратів для лікування інших автоімунних захворювань.

**Конфлікту інтересів немає.**

## ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- Vargas-Uricoechea H. Molecular mechanisms in autoimmune thyroid disease. *Cells*. 2023;12(6):918. <https://doi.org/10.3390/cells12060918>.
- Moroncini G, Calogera G, Benfaremo D, Gabrielli A. Biologics in inflammatory immune-mediated systemic diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2017;18(12):1008-16. <https://doi.org/10.2174/1389201019666171226152448>.
- Benvenega S, Elia G, Ragusa F, et al. Endocrine disruptors and thyroid autoimmunity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020;34(1):101377. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101377>.
- Tywanek E, Michalak A, Świrski J, Zwolak A. Autoimmunity, new potential biomarkers and the thyroid gland — the perspective of Hashimoto's thyroiditis and its treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(9):4703. <https://doi.org/10.3390/ijms25094703>.
- Chyzh MO, Halchenko SE, Hladkykh FV, et al. Acellular cryopreserved biological agents: technology of production and composition analysis. *Monograph*. Vinnytsia: Tvory; 2024. 264 p. <https://doi.org/10.46879/2024.1>.
- Hladkykh FV. Modern concept of thyroid antigens and cytokines involvement in the immunopathogenesis of autoimmune thyroiditis. *Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery*. 2023;(4):22-31. <https://doi.org/10.30978/CEES-2023-4-22>.
- 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;(2):124-37. <https://doi.org/10.26565/2312-5675-2024-24-02>.
- Hladkykh FV. Characteristics of the impact of acellular cryopreserved biological agents on antioxidant-prooxidant homeostasis in heart tissues in a model of autoimmune myocarditis. *Health & Education*. 2024;(2):23-30. <https://doi.org/10.32782/health-2024.2.4>.
- Hladkykh FV, Lyadova TI. Analgesic potential of cryoextracts of biological tissues and conditioned medium of mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune arthritis. *Odessa Medical Journal*. 2024;186(1):35-41. <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-1-6>.
- Hladkykh FV, Lyadova TI, Soloviyov SO. Features of the hepatocyte cell cycle in experimental autoimmune hepatitis under the influence of cryoextracts from placenta and spleen, as well as the conditioned medium of mesenchymal stem cells. *Clinical and Preventive Medicine*. 2024;(7):24-37. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.7.2024.03>.
- Hladkykh FV, Lyadova TI. Experimental study of nephroprotective properties of cryoextracts of placenta and spleen, as well as conditioned medium of mesenchymal stem cells in autoimmune membranous nephropathy. *Ukraine. National Health*. 2024;(3):106-14. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2024.3/17>.
- Hladkykh FV. Freund's adjuvant is a classic of vaccine adjuvants and the basis of experimental immunology. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine*. 2024;(3):414-39. <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-10>.
- Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947;(1):291-308. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>.
- Kurylko YuS. Experimental determination of the impact of cord blood bio-preparations on the functional activity of the thyroid gland and immune system in rats under experimental conditions of autoimmune thyroiditis modeling. *Dissertation*. Kharkiv; 2024. 189 p. Available at: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0823U101476/>.
- Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *Journal of the American Medical Association*. 1957;164(13):1439-47. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.1957.02980130015004>.
- Kahaly GJ, Gottwald-Hostalek U. Use of levothyroxine in the management of hypothyroidism: a historical perspective. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;1054983. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1054983>.
- Stefanov OV, ed. *Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations*. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
- 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. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>.
- Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin. *Dissertation*. Kharkiv; 2016. 162 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>.
- Globa VYu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. *Dissertation*. Kharkiv; 2021. 156 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>.
- 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 & Pharmacology*. 2020;8(6):416-25. doi: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>.
- Kamyshnikov VS. *Handbook of clinical and biochemical research and laboratory diagnostics*. MEDpress-inform; 2009. 896 p.
- Zar JH. *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood; 2014. 960 p.

## РЕЗЮМЕ

Автоімунні захворювання (АІЗ) — це гетерогенна група з понад 100 патологічних станів, які характеризуються зміною регуляції запальних процесів проти одного або кількох автоантигенів. Найпоширенішим органоспецифічним АІЗ є автоімунне захворювання щитоподібної залози (ЩЗ). До АІЗ ЩЗ належать хвороба Грейвса — Базада та тиреоїдит Хашимото з двома крайніми виявами клінічної картини (гіпертиреоз та гіпотиреоз). Нами вивчено застосування біотехнологічних препаратів, які не містять клітин, підданих дії низьких температур при їх отриманні (кріоекстракти) або тривалому зберіганні. Об'єктом дослідження обрано безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ) вітчизняного виробництва — кріоекстракт плаценти (КЕП), кріоекстракт селезінки (КЕС) та кондиціоноване середовище від мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК).

**Мета роботи** — схарактеризувати вплив КЕП, КЕС та КС-МСК на рівень імуноглобулінів А, М і G у щурів зі змодельованим автоімунним тиреоїдитом (АІТ).

**Матеріали та методи.** Дослідження ефективності БКБЗ при АІТ проведені на 42 щурах-самцях лінії Wistar масою 200—220 г. Автоімунний тиреоїдит моделювали шляхом введення щурам тиреоїдної антигенної суміші, яка містила повний ад'ювант Фрейнда (Thermo Fisher Scientific, США) та розчин антигену, отриманого з гомогенату алогенної ЩЗ у співвідношенні 1:1. Щитоподібну залозу гомогенізували в 0,9% розчині NaCl із розрахунку 1 мл/100 мг, фільтрували крізь капроновий фільтр та центрифугували впродовж 5 хв при 1000 об./хв. Відбирали супернатант, що містив антиген ЩЗ, який стандартизували за вмістом загального білка (1,0—1,5 мг/мл), визначеного біуретовим методом. Рівень імуноглобулінів (Ig) А, М і G з'ясовували імуноферментним методом за допомогою стандартних наборів для імуноферментного аналізу (Human GmbH, Німеччина) згідно з інструкцією виробника.

**Результати.** Дослідження показало, що в щурів контрольної групи з АІТ рівень IgA, IgM та IgG був значно підвищений, що свідчило про активність автоімунного процесу. Застосування левотироксину, кріоекстрактів (КЕП, КЕС) та КС-МСК сприяло зниженню вмісту імуноглобулінів. Левотироксин знизив рівень IgA на 9,4%, IgM — на 25,0%, але ефект був неповним. КЕП зменшив вміст IgA на 15,5%, КЕС — на 7,7%. Найбільше зниження рівня IgA та IgM зареєстрували в групі щурів, які отримували КС-МСК (на 19,2 і 39,3% відповідно). Установлено, що КС-МСК був найефективнішим для корекції автоімунних порушень.

**Висновки.** Застосування левотироксину сприяло зниженню рівня IgA, але не його нормалізації, тоді як кріоекстракти КЕП, КЕС і КС-МСК продемонстрували здатність знижувати рівень IgA, причому КС-МСК був найефективнішим. Найвищий ефект щодо зниження рівня IgM досягнутий при застосуванні КС-МСК (на 39,9% нижчий за контрольний показник). Також КС-МСК продемонстрував найвираженіше зниження рівня IgG, зменшивши його на 44,3% порівняно з показником контрольної групи, що підтверджує високий терапевтичний потенціал цього препарату при лікуванні АІТ.

**Ключові слова:** автоімунний тиреоїдит, щитоподібна залоза, імуноглобуліни, імунологія, ендокринологія, експеримент, екстракція.

## ABSTRACT

### Assessment of immunoglobulins A, M and G levels in the context of the administration of acellular cryopreserved biological agents in experimental autoimmune thyroiditis

*F. V. Hladkykh*

*V. N. Karazin Kharkiv National University  
of the Ministry of Education and Science of Ukraine  
State Organization «Grigoriev Institute  
for Medical Radiology and Oncology of the National Academy  
of Medical Sciences of Ukraine»*

Autoimmune diseases (ADs) are a heterogeneous group of more than 100 pathological conditions characterized by altered regulation of inflammatory processes against one or more autoantigens. The most common organ-specific autoimmune disorder is autoimmune thyroid disease (AITD). The spectrum of AITD includes Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis, presenting with two extreme clinical manifestations: hyperthyroidism and hypothyroidism. Our attention was drawn to the study of biotechnological drugs that do not contain cells exposed to low temperatures during their production (cryoextracts) or during long-term storage. The object of the study was domestic acellular cryopreserved biological agents (ACBAs) — cryoextract of placenta (CEP), cryoextract of spleen (CES), and conditioned medium from mesenchymal stem cells (MSC-CM).

**Objective** — to characterize the impact of CEP, CES, and MSC-CM on the levels of immunoglobulins A, M, and G in rats with induced autoimmune thyroiditis.

**Materials and methods.** The effectiveness of ACBAs in AITD was studied on 42 male Wistar rats weighing 200—220 g. AITD was induced by administering a thyroid antigenic mixture to the rats, consisting of complete Freund's adjuvant (Thermo Fisher Scientific, USA) and an antigen solution derived from the homogenate of allogeneic thyroid glands in a 1:1 ratio. The thyroid glands were homogenized in a 0.9% NaCl solution at a ratio of 1 mL/100 mg, filtered through a capron filter, and centrifuged for 5 minutes at 1000 rpm. The supernatant containing the thyroid antigen was collected and standardized for total protein content (1—1.5 mg/mL), which was determined by the biuret method. The levels of immunoglobulins (Ig) A, M, and G were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with standard kits (Human GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions.

**Results.** In the control group, elevated levels of IgA, IgM, and IgG indicated autoimmune activity. The use of levothyroxine, cryoextracts (CEP, CES), and MSC-CM led to a decrease in these immunoglobulin levels. Levothyroxine reduced IgA by 9.4% and IgM by 25%, but the effect was incomplete. CEP reduced IgA by 15.5%, while CES reduced it by 7.7%. The greatest decrease in IgA and IgM levels was observed in the group of rats treated with MSC-CM (IgA by 19.2%, IgM by 39.3%). MSC-CM demonstrated the greatest effectiveness in correcting autoimmune disorders.

**Conclusions.** The use of levothyroxine contributed to a reduction in IgA levels but did not lead to full normalization, while cryoextracts (CEP, CES) and

MSC-CM demonstrated the greatest therapeutic potential in reducing immunoglobulin levels and correcting autoimmune thyroiditis, outperforming levothyroxine and other CBAs. The highest effect in reducing IgM levels was achieved with MSC-CM, where IgM levels were 39.9% lower than the control group. Furthermore, MSC-CM demonstrated the most pronounced reduction in IgG levels, reducing them by 44.3% compared to the control group, confirming the high therapeutic potential of this drug in the treatment of autoimmune thyroiditis.

**Keywords:** autoimmune thyroiditis, thyroid gland, immunoglobulins, immunology, endocrinology, experiment, extraction.

*Дата надходження до редакції 23.09.2024 р.*

*Дата рецензування 27.11.2024 р.*

*Дата підписання статті до друку 02.12.2024 р.*