

УДК 616.61-002+615.451.16+616-002  
DOI <https://doi.org/10.32689/2663-0672-2024-2-2>

### Федір ГЛАДКИХ

доктор філософії в галузі охорона здоров'я за спеціальністю «Медицина», докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна; старший науковий співробітник відділу променевої патології та паліативної медицини, Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», [fedir.hladkykh@gmail.com](mailto:fedir.hladkykh@gmail.com)

ORCID: 0000-0001-7924-4048

## ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АУТОІМУННОМУ НЕФРИТІ ХЕЙМАНА НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ КРІОЕКСТРАКТІВ ПЛАЦЕНТИ ТА СЕЛЕЗИНКИ, А ТАКОЖ КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОББУРОВИХ КЛІТИН

**Актуальність теми дослідження.** Серед усіх аутоімуних гломерулонефритів (ГН) ідіопатична мембранозна нефропатія (МН) є основною причиною розвитку хронічної хвороби нирок. Ідіопатична МН – це первинний мембранозний ГН, що характеризується пошкодженням подоцитів, опосередкованим антитілами проти антигенів подоцитів, що депонуються під гломерулярними вісцеральними епітеліальними клітинами для активації комплекменту. Нашу увагу у якості інноваційних біотехнологічних препаратів для лікування МН, привернули безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ) – кріоконсервовані екстракти біологічних тканин, зокрема кріоекстракт селезінки (як імунокомпетентного органа) та кріоекстракт плаценти (як ключового регулятора внутрішньоутробного розвитку плоду). Не меншої уваги вартують продукти культивування клітин – так звані кондиціоновані середовища (КС), зокрема КС, отримані з мезенхімальних стромальних клітин (КС-МСК). Попередні дослідження продемонстрували переконливі докази виразної імуномодуючої активності за інших аутоімуних захворювань, зокрема при аутоімуному артриті та алергічному енцефаломієліті та ін., у кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та КС-МСК.

**Мета роботи** – охарактеризувати вплив КЕП, КЕС та КС-МСК на функціональний стан нирок при експериментальному аутоімуному нефриті Хеймана.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження ефективності БКБЗ при аутоімуному нефриті Хеймана (АІН) проведені на 42 шурках-самцях. АІН відтворювали за методикою Neumann W.R. та співав. (1965 р.) в модифікації Віхерта А.М. (1973 р.). На 70 день експерименту проводили оцінку функціонального стану нирок за умов спонтанного діурезу, після чого тварин виводили з експерименту та відбирали зразки крові. Вміст сечовини в крові визначали спектрофотометрично за реакцією аміаку з 2-оксоголутаратом за участю глутаматгідрогенази. Вміст креатиніну в крові визначали спектрофотометрично за реакцією пікратів з креатиніном. Швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) розраховували за методикою Besseling P.J. та співав. (2021 р.).

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що на 70 день експерименту у шурів з АІН відмічалось статистично вірогідне ( $p < 0,001$ ) зниження об'єму добового діурезу на 47,2% відносно показників інтактних шурів, що становило  $3,7 \pm 0,2$  мл/добу. Біохімічні дослідження крові показали, що на тлі зниження добового діурезу у шурів з АІН відмічено статистично вірогідне ( $p < 0,001$ ) зростання концентрації креатиніну на 111,3% та сечовини на 233,3% відносно показників інтактних шурів. На тлі застосування КЕП відмічалось зниження концентрації креатиніну в крові ( $p = 0,01$ ) на 16,8%. Застосування КЕС у шурів з АІН чинило співставні за виразністю з канефроном нефропротекторні властивості, на що вказувало статистично вірогідне ( $p = 0,002$ ) зростання ШКФ на 64,3% ( $551 \pm 43$  мкл/хв) відносно показників шурів групи контролю. Найвиразніше відновлення функціонального стану нирок шурів встановлено на тлі застосування КС-МСК.

**Висновки.** Дослідження показало, що досліджувані БКБЗ володіють нефропротекторною активністю на моделі нефриту Хеймана у шурів на що вказувало відновлення функціональної активності нирок, що підтверджувалось зростання ШКФ та зниженням концентрації креатиніну та сечовини у крові шурів з АІН. За виразністю нефропротекторного ефекту (за показниками ШКФ) досліджувані БКБЗ можна розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (ШКФ:  $856 \pm 59$  мкл/хв) > КЕС (ШКФ:  $551 \pm 43$  мкл/хв) > КЕП (ШКФ:  $504 \pm 19$  мкл/хв).

**Ключові слова:** аутоімуний нефрит Хеймана, кріоекстракт плаценти, мезенхімальні стовбурові клітини, швидкість клубочкової фільтрації, креатинін.

## Fedir Hladkykh. THE FUNCTIONAL STATE OF THE KIDNEYS IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE HEYMAN NEPHRITIS AGAINST THE BACKGROUND OF THE INTRODUCTION OF CRYOEXTRACTS OF THE PLACENTA AND SPLEEN, AS WELL AS THE CONDITIONED MEDIUM OF MESENCHYMAL STEM CELLS

**Introduction.** Among all autoimmune glomerulonephritis (GN), idiopathic membranous nephropathy (MN) is the leading cause of chronic kidney disease. Idiopathic MN is a primary membranous GN characterized by damage to podocytes mediated by antibodies against podocyte antigens deposited under glomerular visceral epithelial cells to activate complement. Cell-free cryopreserved biological agents – cryopreserved extracts of biological tissues, in particular the spleen (as an immunocompetent organ) and the placenta (as a key regulator of intrauterine fetal development) have attracted our attention as innovative biotechnological drugs for the treatment of MN. Products of cell cultivation – the so-called conditioned media, in particular, conditioned media obtained from mesenchymal stromal cells (MSC-CM) – deserve no less attention. Previous studies have shown convincing evidence of distinct immunomodulating activity in other autoimmune diseases (in particular, in autoimmune arthritis and allergic encephalomyelitis, etc.) in cryoextract of the placenta (CEP), cryoextract of the spleen (CES) and MSC-CM.

**The aim** of the study is to characterize the influence of CEP, CES and MSC-CM on the functional state of kidneys in experimental autoimmune Heymann nephritis.

**Materials and methods.** Studies on the effectiveness of cell-free cryopreserved biological agents in Heymann's autoimmune nephritis (AIN) were conducted on 42 male rats. AIN was reproduced according to the method of Heymann W.R. and Sang (1965) in the modification of Wichert A.M. (1973). 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 content of urea in the blood was determined spectrophotometrically by the reaction of ammonia with 2-oxoglutarate with the participation of glutamate dehydrogenase. The content of creatinine in the blood was determined spectrophotometrically by the reaction of picrates with creatinine. Glomerular filtration rate (GFR) was calculated according to the method of Besseling P.J. and all.

**Research results and their discussion.** It was established that on the 70th day of the experiment, a statistically significant ( $p < 0.001$ ) decrease in the volume of daily diuresis by 47.2% compared to the parameters of intact rats was noted, which was  $3.7 \pm 0.2$  ml/day. Biochemical blood tests showed that against the background of a decrease in daily diuresis in rats with AIN, a statistically significant ( $p < 0.001$ ) increase in creatinine concentration by 111.3% and urea by 233.3% compared to the parameters of intact rats was noted. Against the background of the use of CEP, the lowest decrease in the concentration of creatinine in the blood ( $p = 0.01$ ) was noted – 16.8%. The use of CES in rats with AIN had nephroprotective properties comparable in expression to canefron, which was indicated by a statistically significant ( $p = 0.002$ ) increase in GFR by 64.3% ( $551 \pm 43$   $\mu$ l/min) compared to the indicators of rats in the control group. The most pronounced restoration of the functional state of the kidneys of rats was established against the background of the use of MSC-CM.

**Conclusions.** The study showed that the studied cell-free cryopreserved biological agents have nephroprotective activity against the background of Heymann's nephritis in rats, which was indicated by the restoration of the functional activity of the kidneys, which was confirmed by the increase in the gastrointestinal tract and the decrease in the concentration of creatinine and urea in the blood of rats with AIN. According to the expressiveness of the nephroprotective effect (according to GFR indicators), the studied cell-free cryopreserved biological agents can be placed in the following sequence: MSC-CM (GFR:  $856 \pm 59$  ml/min) > CES (GFR:  $551 \pm 43$  ml/min) > CEP (GFR:  $504 \pm 19$  ml/min).

**Key words:** Heymann autoimmune nephritis, placenta cryoextract, mesenchymal stem cells, glomerular filtration rate, creatinine.

**Вступ.** Загальною визначеною терміном «гломерулонефрит» (ГН, код Міжнародної класифікації хвороб N00-N01.9) на сьогодні визначається група гетерогенних імуноопосередкованих розладів, які характеризуються запаленням фільтраційних одиниць нирки (клубочків). Аналіз даних щодо епідеміології ГН у 195 країнах показав, що стандартизовані за віком показники поширеності ГН у 2019 р. на 100 тис. населення становили 0,63; захворюваність становила 9,45; рівень смертності становив 0,13 [15]. У 2023 р. **Anders H.J. та співав.** [2] запропонували класифікувати ГН на п'ять категорій відповідно до їх імунопатогенезу: (1) інфекційний, (2) аутоімунний, (3) алоімунний, (4) автозапальний та (5) моноклональний ГН (табл. 1).

**Аутоімунний ГН** характеризується адаптивною імунною відповіддю, спрямованою проти серії різних аутоантигенів, деякі з яких локалізуються виключно в нирках (антигени подоцитів та антигени базальної мембрани клубочка), тоді як інші експресуються системно, наприклад IgA (IgA-нефропатія), IgG (криоглобулінемічний ГН), нейтрофільні антигени (антинейтрофільні цитоплазматичні антитіла (*antineutrophil cytoplasmic antibody* – ANCA)) та компоненти хроматину (люпус-нефрит), і часто призводять до екстрауренальних проявів. Циркулюючі позаниркові антигени можуть спричинити ГН після потрапляння у фільтраційний бар'єр. Аутоантитіла до факторів комплексу можуть індукувати ГН шляхом індукції надлишкової активації комплексу. Аутоімунний ГН, пов'язаний із високим рівнем нефритогенних аутоантитіл, викликає

активні ураження з подальшою негайною атрофією та рубцюванням (некротизуючий та серпоподібний ГН), тоді як низькі титри антитіл і низький нефритогенний потенціал спричинюють менш активні ураження та призводять до хронічного та латентного ГН із пошкодженням, що наростає протягом тривалого часу [2].

Серед усіх аутоімунних ГН ідіопатична **мембранозна нефропатія (МН)** виступає провідною причиною хронічної хвороби нирок [27]. У розвинених країнах приблизно 75% усіх МН є ідіопатичною (або первинною); решта 20–25% є вторинними внаслідок різних патологічних станів, таких як інфекції (гепатит В, С, вірус імунодефіциту людини, малярія тощо), злоякісні новоутворення (рак легень, молочної залози, шлунка та яєчників, лімфопроліферативні захворювання тощо), системні аутоімунні захворювання (вовчак, ревматоїдний артрит тощо) або є небажаною реакцією на застосування лікарських засобів [43]. Ідіопатична МН (ІМН) – це первинний мембранозний ГН, що характеризується пошкодженням подоцитів, опосередкованим антитілами проти антигенів подоцитів, що депонуються під гломерулярними вісцеральними епітеліальними клітинами для активації комплексу. Патологічними проявами МН є дифузне потовщення базальної мембрани клубочка, поява спайкових структур, масивне відкладення електронно-щільного матеріалу під епітеліальними клітинами та гранулярне відкладення IgG та компоненту-3 системи комплексу (С3) уздовж стінки капіляра [27, 9].

Таблиця 1

## Класифікація ГН за Anders H.J. та співав. [2]

Тип ГН	Інфекційний	Аутоімунний	Алоімунний	Автозапальний	Пов'язаний з моноклональною гаммопатією
<b>Патогенез</b>	Вроджений і адаптивний захист господаря з молекулярною мімікрією або без неї	Адаптивна імунна відповідь на аутоантигени	Адаптивна імунна відповідь на донорські антигени	Вроджені порушення вродженого імунітету	Клон В-клітин, що вивільняє парaproteїн, або клон плазматичних клітин
<b>Підтипи</b>	1. Бактеріоасоційований ГН 2. Вірусоасоційований ГН 3. Паразитоасоційований ГН	1. IgA нефропатія 2. Кріоглобулінемія 3. ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibody)-асоційовані васкуліти: 3.1. мікроскопічний поліангіт 3.2. гранулематоз із поліангітом (гранулематоз Вегенера) 4. С3 (Complement 3)-ГН 5. Вовчаковий нефрит 6. Хвороба пов'язана з антитілами до базальної мембрани 7. Стероїдоочутливий нефротичний синдром <b>8. Первинний мембранозний ГН</b>	Трансплантаційна гломерулопатія	1. Сімейна середземноморська лихоманка 2. Синдром Ашерсона (catastrophic antiphospholipid syndrome – CAPS) 3. Синдром гіпер-IgD 4. Сімейна гібернічна гарячка (TRAPS) 5. С3-ГН	1. Проліферативний ГН з відкладенням моноклонального імуноглобуліну, хвороба відкладення моноклонального імуноглобуліну 2. Амлоїдоз 3. Моноклітинний фібрилярний ГН 4. Кристалоглобулін ГН 5. Імунотактоїдний ГН, кріоглобулінемія I/III 6. С3-ГН, тромботична мікроангіопатія
<b>Терапія</b>	Інфекційний контроль	Транзиторне або стійке пригнічення адаптивної імунної відповіді	Стойке пригнічення адаптивної імунної відповіді	Інгібування специфічних цитокінів або факторів комплекменту	Клон-направлена терапія

Відкладення імунних комплексів відіграє ключову роль у патогенезі ІМН [27]. Т-клітини беруть участь у розвитку ІМН, і цей механізм має тенденцію опосередковано впливати на В-клітини та гуморальний імунітет шляхом регуляції запалення [30, 49, 26]. Як відомо, Th17-тип CD4+ Т-лімфоцитів пов'язаний з тромбозом та рецидивами у пацієнтів з МН [7]. Порівняно з Th17, Th2 більш безпосередньо пов'язаний із порушеннями гуморального імунітету при ІМН, а дисбаланс поляризації Th1/Th2 відіграє важливу роль у патогенезі ІМН [25, 36, 28]. Оскільки IgG, екстрагований із сироватки пацієнтів, не лише індукуює апоптоз подоцитів, але також впливає на аутофагію подоцитів [33, 50], припускається, що дисбаланс поляризації Th1/Th2 може призвести до аномальної секреції IgG В-клітинами, що може призвести до пошкодження подоцитів [27].

Клінічні прояви ІМН неоднорідні, але більшість випадків (70–80%) проявляються непомітно та з високою 24-годинною протеїнурією (>3,5 г/24 год), пов'язаною з периферичним набряком або анасаркою та гіпоальбумінемією (<2 г/дл). Інші ознаки можуть виявлятися рідше, наприклад мікроскопічна гематурія (25–50%) та артеріальна гіпертензія (20–50%) [9]. Клінічна динаміка ІМН також неоднорідна і може представляти:

- (1) спонтанну повну ремісію (20–30% за 5 років, особливо якщо протеїнурія становить менше 8 г/добу);
- (2) часткову ремісію (20–25% за 5 років);
- (3) поступове прогресування до термінальної стадії хронічної хвороби нирок (40–50% за 10 років);
- (4) або швидко прогресуючу гостру ниркову недостатність [9, 35].

Сучасні концепції щодо патогенезу МН в основному походять від ранніх досліджень, проведених на моделі аутоімунного нефриту Хеймана [1]. Результати досліджень самої моделі нефриту Хеймана дозволили сформулювати гіпотези, які також можуть стосуватися людської МН та вже отримали окремі докази правомочності. Завдяки ретельному вивченню імунопатогенезу нефриту Хеймана на сьогодні сформульовано наступні гіпотези:

- (1) антигенний білок при МН людини експресує себе на клітинній мембрані подоцитів;
- (2) антитіла зв'язуються з білком-мішенню в основі мембрани подоцитів, таким чином утворюючи імунні відкладення *in situ*;
- (3) імунні комплекси індукують активацію комплементу, що призводить до пошкодження подоцитів;
- (4) цільові епітопи змінюються в міру прогресування захворювання [1].

Проривок у вивченні МН стало визначення у 2009 р. рецептору фосфоліпази А2 М-типу (*Anti-*

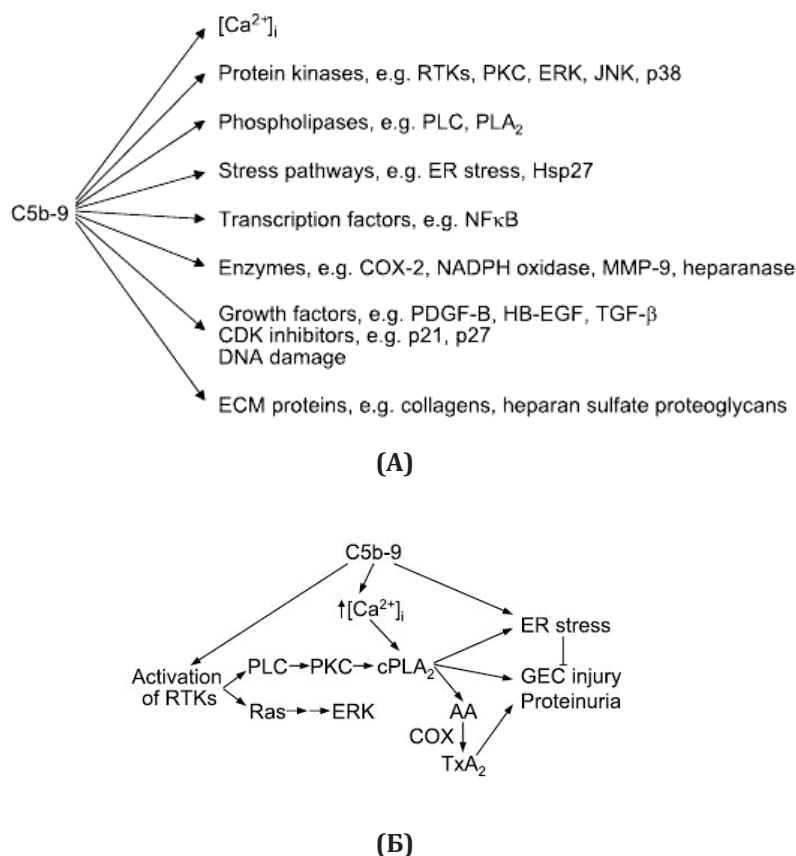
*PLA2R: Anti-Phospholipase A2 Receptor – PLA2R*) як головного цільового антигену при МН. PLA2R можна виявити приблизно у 70% пацієнтів з ІМН [11]. В експериментальній моделі нефриту Хеймана у щурів субепітеліальні відкладення утворюються *in situ*, коли циркулюючі антитіла (у результаті активної чи пасивної імунізації тварини) зв'язують внутрішній антиген у стінці капіляра клубочка. Цей антиген був ідентифікований як мегалін – глікопротеїн з масою 516 кДа, член сімейства рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, що експресується на відростках подоцитів. Попередньо сформовані циркулюючі імунні комплекси невеликого розміру можуть проходити через базальну мембрану клубочка і відкладатися під подоцитом. Утворення комплексу мембранної атаки C5b-C9 (*complement membrane attack complex – MAC*) призводить до активації факторів транскрипції, що кодуєть медіатори фіброзу та цитоскелетної перебудови подоцитів (рис. 1). Він також збільшує виробництво потенційно нефритогенних молекул, таких як активні форми кисню, прозапальні цитокіни, протеази та вазоактивні молекули [43].

Незважаючи на досягнення останніх 15 років після відкриття PLA2R, як основного аутоантигену на подоцитах при ІМН, існуючі методи лікування хворих на МН суттєво не змінилися [38].

Нашу увагу у якості інноваційних біотехнологічних препаратів для лікування МН, привернули **безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (БКБЗ) – кріоконсервовані екстракти** біологічних тканин, зокрема селезінки (як імунокомпетентного органа) та плаценти (як ключового регулятора внутрішньоутробного розвитку плоду). Не меншої уваги вартують продукти культивування клітин – так звані **кондиціоновані середовища**, зокрема кондиціоновані середовища, отримані з мезенхімальних стромальних клітин (КС-МСК). Попередні дослідження продемонстрували переконливі докази виразної імуномодельючої активності при деяких аутоімунних захворюваннях (зокрема при аутоімунному артриті та алергічному енцефаломієліті та ін.) у кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та КС-МСК [17, 20, 18, 19].

**Мета дослідження** – охарактеризувати вплив КЕП, КЕС та КС-МСК на функціональний стан нирок при експериментальному аутоімунному нефриті Хеймана.

**Матеріали та методи дослідження.** Експериментальні дослідження проведені у відповідності 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. Брюс-



**Рис. 1. Сигнальні шляхи, активовані C5b-9 у клубочкових епітеліальних клітинах (А) та механізми пошкодження епітеліальних клітин і розвитку протеїнурії (Б) [8]**

**Примітка.** [Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>]<sub>i</sub> – внутрішньоклітинна концентрація Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>; RTK – рецепторні тирозинкінази; PKC – протеїнкіназа C; ERK – кіназа, регульована позаклітинним сигналом; JNK – c-Jun N-кінцева кіназа; PLC – фосфоліпаза C; PLA-2 – фосфоліпаза A2; ER – ендоплазматичний ретикулум; Hsp – білок теплового шоку; NF-κB – ядерний фактор-κB; ЦОГ – циклооксигеназа; MMP – металопротеїназа; PDGF – тромбоцитарний фактор росту; HB-EGF – гепарин-зв'язуючий епідермальний фактор росту; TGF – трансформуючий фактор росту; CDK – циклін-залежна кіназа; ECM – позаклітинний матрикс.

сель, 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.).

**Аутоімунний нефрит Хеймана (АНХ)**, як експериментальну модель аутоімунної МН, відтворювали за методикою Neumann W.R. та співав. (1965 р.) [16] в модифікації Віхерта А.М. (1973 р.) 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 тканини нирок у співвідношенні 1:1 [39, 10, 47]. 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 – підшкірним (п/ш) в пахові та пахові ділянки, а також внутрішньоочеревинно (в/о). Через 4 тижні з метою потенціювання аутоімунного процесу введення нефротропної антигенної суміші повторювали в/о [22, 3, 46, 42].

Досліджувані препарати вводили щурам з 60 доби експерименту [39]. 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 об-

рано комбінований рослинний лікарський засіб з нефропротекторною активністю – канефрон («Конефрон® Н», Біонорика СЕ, Німеччина), що містить стандартизований екстракт ВНО-1040 з трави золототисячника (*Herbae Centaurii*), кореня любистку (*Radix Levistici*) та листя розмарину (*Foliorum Rosmarini*) [31]. Канефрон вводили внутрішньошлунково (в/шл) на 60, 62, 64, 66 та 68 дні експерименту в дозі 27 мг/кг [29], розрахованої методом Ю.Р. Риболовлева та співав. [37].

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 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/в вводили референс-препарат канефрон в дозі 27 мг/кг [29];

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 [41, 32];

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 [4];

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 [14, 13].

На 70 день експерименту проводили оцінку функціонального стану нирок за умов спонтанного діурезу – щурів утримували 24 год. у спеціальних обмінних клітках для збору сечі (добовий діурез, мл/1440 хв), після чого тварин виводили з експерименту та відбирали зразки крові [44].

**Вміст сечовини в крові** визначали спектрофотометрично за реакцією аміаку з 2-оксоглутаратом за участю глутаматгідрогенази з утворенням L-глутамінату. Швидкість зміни оптичної щільності реакційного розчину, яку вимірюють при довжині хвилі  $\lambda = 340$  нм, прямо пропорційна концентрації сечовини. Концентрацію сечовини в крові виражали у ммоль /л [23, 45].

**Вміст креатиніну в крові** визначали спектрофотометрично за реакцією пікратів з 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 при довжині хвилі  $\lambda = 530$  (500–560) нм. Концентрацію креатиніну в крові виражали у ммоль/л [23, 21].

Швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) у щурів розраховували за формулою, яка ґрунтується на показниках маси тіла, концентрації креатиніну та сечовини в плазмі крові, за методикою **Besseling P.J. та співав.** (2021 р.) [5].

При рівні креатиніну в плазмі крові  $< 52$  ммоль/л:  $ШКФ_{(мкл/хв)} = 880 \times \text{маса тіла}_{(г)}^{0,695} \times \text{концентрація креатиніну в плазмі крові}_{(ммоль/л)}^{-0,660} \times \text{концентрація сечовини в плазмі крові}_{(ммоль/л)}^{-0,391}$ .

При рівні креатиніну в плазмі крові  $\geq 52$  ммоль/л:  $ШКФ_{(мкл/хв)} = 5862 \times \text{маса тіла}_{(г)}^{0,695} \times \text{концентрація креатиніну в плазмі крові}_{(ммоль/л)}^{-1,150} \times \text{концентрація сечовини в плазмі крові}_{(ммоль/л)}^{-0,391}$  [5].

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel». Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді "M±m" (M±SE), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95 % ДІ:), де 95 % ДІ: – 95 % довірчий інтервал. Для графічного представлення даних обрано діаграми розмаху (*box-and-whiskers diagram* – «шухлядові» діаграми з «вусами») [48].

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено, що на 70 день експерименту у щурів а АІН відмічалось статистично вірогідне ( $p < 0,001$ ) зниження об'єму добового діурезу на 47,2% відносно показників інтактних щурів, що становило  $3,7 \pm 0,2$  мл/добу (табл. 2), що узгоджувалось з даними досліджень Шебеко С.К. та співав. [39]. Об'ємні показники добового діурезу у щурів з АІН повністю відновлювались на тлі застосування референс-препарату канефрону та статистично вірогідно ( $p < 0,001$ ) вдвічі перевищували показники тварин контрольної групи (див. табл. 2), що узгоджувалось з даними літератури про нефропротекторні та діуретичні властивості вказаного препарату [31, 40].

Біохімічні дослідження крові показали, що на тлі зниження добового діурезу у щурів з АІН відмічено статистично вірогідне ( $p < 0,001$ ) зростання концентрації креатиніну на 111,3% та зростання вмісту сечовини на 233,3% відносно показників інтактних щурів. Як відомо, креатинін, як метаболіт фосфокреатину, дифундує з різних тканин у кров. За фізіологічних умов він постійно виводиться нирками. Порушення клубочкової фільтрації призводить до підвищення рівня креатиніну в плазмі.

Таблиця 2

**Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на окремі показники видільної функції нирок у щурів з АІН на 70 день експерименту (M ± m (95 % ДІ), 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
<b>Інтактні щури</b>		<b>Контроль (АІНбез лікування)</b>	<b>АІН + канефрон</b>	<b>АІН + КЕП</b>	<b>АІН + КЕС</b>	<b>АІН + КС-МСК</b>
<i>n</i>	7	7	7	7	7	7
<b>Добовий діурез, мл/1440 хв.</b>	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%]
<b>Концентрація креатиніну в крові, мкмоль/л</b>	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%]
<b>Концентрація сечовини в крові, ммоль/л</b>	5,1±0,6 (95 % ДІ: 3,9-6,4)	17,1±0,9 (95 % ДІ: 15,4-18,9) $p_1 < 0,001$ [233,3%]	8,9±0,7 (95 % ДІ: 7,5-10,2) $p_2 < 0,001$ [48,3%]	9,3±0,9 (95 % ДІ: 7,6-11,0) $p_2 < 0,001$ [45,8%] $p_3 = 0,7$ [4,8%]	10,1±1,0 (95 % ДІ: 8,2-12,1) $p_2 < 0,001$ [40,8%] $p_3 = 0,3$ [14,5%]	6,7±0,8 (95 % ДІ: 5,1-8,4) $p_2 < 0,001$ [60,8%] $p_3 = 0,1$ [24,2%]

Примітки.

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

В свою чергу сечовина виробляється печінкою та виводиться нирками. Подібно до креатиніну, підвищення рівня сечовини в плазмі слугує показником зміненої функції нирок [24].

Порушення фільтраційної функції нирок у щурів зі змодельованим нефритом Хеймана знайшло своє відображення у показниках ШКФ, які було розраховано за методикою Besseling P.J. та співав. (2021 р.). Ендогенні маркери фільтрації, такі як рівні креатиніну в плазмі або сироватці, сечовина або обидва, часто використовуються як сурогат ШКФ, оскільки їх легко отримати та дозволяють проводити серійні вимірювання, хоча на них також можуть впливати інші фактори, такі як склад тіла та дієта [5]. Розрахунки показали, що у щурів з АІН відмічено статистично вірогідне ( $p < 0,001$ ) зниження ШКФ на 74,2% відносно показників інтактних щурів, що становило відповідно  $355 \pm 21$  (95% ДІ: 294–376) мкл/хв та  $1299 \pm 108$  (95% ДІ: 1088–1510) мкл/хв (рис. 2).

На тлі застосування референс-препарату канефрону рівень ШКФ статистично вірогідно ( $p < 0,001$ ) зріс на 68,8% відносно показників щурів контрольної групи та становив  $566 \pm 20$  (95% ДІ: 527–605) мкл/хв (див. рис. 2), що було обумовлено статистично вірогідним ( $p < 0,001$ ) зниженням концентрації сечовини в крові на 45,8% та вмісту креатиніну на 21,7% відносно показників тварин з АІН без лікування (див. табл. 2).

На тлі застосування КЕП відмічалось найнижче зниження концентрації креатиніну в крові ( $p = 0,01$ ) – 16,8% (див. табл. 1). В той же час, застосування вказаного кріоекстракту призвело до співставного з референс-препаратом зниження концентрації

сечовини в крові на 45,8% ( $p < 0,001$ ), що становило відповідно  $9,3 \pm 0,9$  ммоль/л (див. табл. 2). Вказане зниження концентрації креатиніну та сечовини у щурів з АІН на тлі введення КЕП обумовило зростання ШКФ на 50,5% ( $p < 0,001$ ) відносно показників нелікованих щурів контрольної групи (див. рис. 2). Варто зазначити що на тлі введення КЕП щурам зі змодельованим АІН відмічалось статистично вірогідне ( $p < 0,001$ ) збільшення добового діурезу на 114,8% відносно показників щурів контрольної групи, який становив  $7,9 \pm 0,4$  (95% ДІ: 7,0–8,8) мл/1440 хв (див. табл. 2). Отримані дані вказують на наявність діуретичного ефекту у зазначеного кріоекстракту на тлі АІН у щурів.

Отримані результати дослідження узгоджувались з літературними даними про наявність нефропротекторних властивостей у КЕП. Так, у роботах Репіна М.В. та співав. [34] встановлено відновлення кровотоку в корі нирки та призупиненні запальних процесів в нирковій інтерстиції на тлі розвитку хронічно ниркової недостатності.

Застосування КЕС у щурів з АІН чинило співставні за виразністю з канефроном нефропротекторні властивості, на що вказувало статистично вірогідне ( $p = 0,002$ ) зростання ШКФ на 64,3% ( $551 \pm 43$  мкл/хв) відносно показників щурів групи контролю (див. табл. 2). Привертає увагу, що застосування КЕС не проявляло діуретичного ефекту, на що вказував показник добового діурезу ( $7,0 \pm 0,3$  (95% ДІ: 7,0–8,8) мл/добу), який співставлявся з показниками інтактних щурів ( $7,0 \pm 0,3$  (95% ДІ: 6,4–7,5) мл/добу).

За здатністю знижувати концентрацію креатиніну в крові КЕС співставлявся за ефективністю

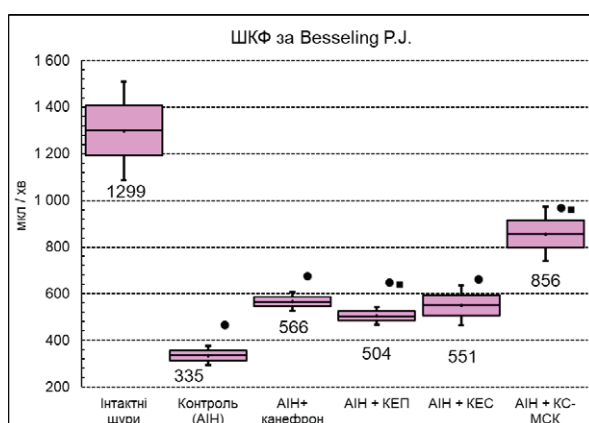


Рис. 2. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та канефрону на ШКФ за Besseling P.J. у щурів з АІН на 70 день експерименту

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



з референс-препаратом канефроном. Вказаний показник статистично вірогідно ( $p < 0,01$ ) знизився відповідно на 22,0% на тлі введення КЕП та на 21,7% на тлі введення канефрону (див. табл. 2).

Найвиразніше відновлення функціонального стану нирок щурів встановлено на тлі застосування КС-МСК. Дослідження показало, що введення КС-МСК тваринам зі змодельованим нефритом Хеймана призвело до статистично вірогідного ( $p < 0,001$ ) зниження концентрації креатиніну та сечовини в крові відповідно на 38,2% та 60,8% (див. табл. 2). Вказані зміни призвели до статистично вірогідного ( $p < 0,001$ ) зростанні ШКФ у щурів на тлі введення КС-МСК на 155,3% відносно показників щурів контрольної групи, що на 51,2% статистично вірогідно ( $p = 0,002$ ) перевищувало аналогічні ефекти референс-препарату канефрону.

**Висновки.** Дослідження показало, що досліджувані БКБЗ володіють нефропротекторною активністю на тлі нефриту Хеймана у щурів на що вказувало відновлення функціональної активності нирок, що підтверджувалось зростання ШКФ та зниженням концентрації креатиніну та сечовини у крові щурів з АІН. За виразністю нефропротекторного ефекту (за показниками ШКФ) досліджувані БКБЗ можна розташувати у наступній послідовності: КС-МСК (ШКФ:  $856 \pm 59$  мл/хв) > КЕС (ШКФ:  $551 \pm 43$  мх/хв) > КЕП (ШКФ:  $504 \pm 19$  мл/хв).

**Перспективи подальших досліджень.** Виявлені нефропротекторні властивості у досліджуваних БКБЗ при аутоімунному нейриті Хеймана слугують підґрунтям подальших поглиблених біохімічних досліджень стану ниркової тканини на тлі введення вказаних біологічних препаратів.

#### Література:

1. Akiyama S., Imai E., Maruyama S. Immunology of membranous nephropathy. *F1000Res*. 2019. № 8. Rev-734. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.17589.1>
2. Anders H. J., Kitching A. R., Leung N., Romagnani P. Glomerulonephritis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2023. № 23 (7). P. 453–471. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00816-y>
3. Becker G. J., Hewitson T. D. Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013. № 28 (10). P. 2432–2438. DOI: <https://doi.org/10.1093/ndt/gft071>
4. Bessalova I. G. 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/>
5. Besseling P. J., Pieters T. T., Nguyen I. T. N., de Bree P. M., Willekes N., Dijk A. H., Bovee D. M., Hoorn E. J., Rookmaaker M. B., Gerritsen K. G., Verhaar M. C., Gremmels H., Joles J. A. A plasma creatinine- and urea-based equation to estimate glomerular filtration rate in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2021. № 320 (3). P. 518–524. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00656.2020>
6. Borisov S. O., Kolosov O. M., Kostev F. I., Borisov O. V. 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). P. 80–83. DOI: <https://doi.org/10.30841/2307-5090.1.2020.205494>
7. Cremona M., Brglez V., Perez S., Decoupligny F., Zorzi K., Andreani M., Gérard A., Boyer-Suavet S., Ruetsch C., Benzaken S., Esnault V., Seitz-Polski B. Th17-immune response in patients with membranous nephropathy is associated with thrombosis and relapses. *Frontiers in Immunology*. 2020. № 11. 574997. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574997>
8. Cybulsky A. V., Quigg R. J., Salant D. J. Experimental membranous nephropathy redux. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005. № 289 (4). P. 660–671. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00437.2004>
9. Dantas M., Silva L. B. B., Pontes B. T. M., Dos Reis M. A., de Lima P. S. N., Moysés Neto M. Membranous nephropathy. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2023. № 45 (2). P. 229–243. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2023-0046en>
10. Deepthi R., Suhasin G. A review on animal models of chronic kidney disease – an update. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2023. № 16 (3). P. 1319–1327. DOI: <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2711>
11. Francis J. M., Beck L. H. Jr., Salant D. J. Membranous nephropathy: a journey from bench to bedside. *American Journal of Kidney Diseases*. 2016. № 68 (1). P. 138–147. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.01.030>
12. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. 1947. № 1. P. 291–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
13. Globa V. Yu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. *Dissertation*. Kharkiv, 2021. 156 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>
14. Golubinskaya P. A., Sarycheva M. V., Dolzhikov A. A., Bondarev V. P., Stefanova M. S., Soldatov V. O., Nadezhdin S. V., Korokin M. V., 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). P. 416–425. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
15. Guo Q., Wu S., Xu C., Wang J., Chen J. Global Disease Burden from acute glomerulonephritis 1990–2019. *Kidney International Reports*. 2021. № 6 (8) P. 2212–2217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.04.038>
16. Heymann W., Kmetec E. P., Wilson S. G., Hunter J. L., Hackel D. B., Okuda R., Cuppage F. Experimental autoimmune renal disease in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965. № 124 (1). P. 310–322. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb18966.x>
17. Hladkykh F. V. Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium on background of its combined use with cryopreserved placenta extract in experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021. № 31 (4). P. 364–367. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>

18. Hladkykh F. V. 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)). P. 124–137. DOI: <https://doi.org/10.26565/2312-5675-2024-24-02>
19. Hladkykh F. V. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization. *Vynnytsia*, 2022. 216 p. DOI: <https://doi.org/10.46879/2022.1>
20. Hladkykh F. V., Chyzh M. O., Manchenko A. O., Belochkina I. V., Mikhailova I. P. Effect of cryopreserved placenta extract on some biochemical indices of therapeutic efficiency and toxicity of diclofenac sodium in adjuvant-induced experimental arthritis. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021. № 9 (4). P. 278–93. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-278-293>
21. 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. P. 391–400.
22. Jefferson J. A., Pippin J. W., Shankland S. J. Experimental models of membranous nephropathy. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2010. № 7 (1–2). P. 27–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2010.11.001>
23. Kamyshnikov V. S. Handbook of clinical and biochemical research and laboratory diagnostics. MEDpress-inform; 2009. 896 p.
24. Kovalcikova A., Jansakova K., Gyuraszova M., Podracka L., Sebekova K., Celec P, Tothova L. Salivary creatinine and urea are higher in an experimental model of acute but not chronic renal disease. *PLoS One*. 2018. № 13 (7). e0200391. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200391>
25. Kuroki A., Iyoda M., Shibata T., Sugisaki T. Th2 cytokines increase and stimulate B cells to produce IgG4 in idiopathic membranous nephropathy. *Kidney International*. 2005. № 68 (1). P. 302–310. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00415.x>
26. Li H., Wu H., Guo Q., Yu H., Xu Y., Yu J., Wang Z., Yi H. Myeloid-derived suppressor cells promote the progression of primary membranous nephropathy by enhancing Th17 response. *Frontiers in Immunology*. 2020. № 11. 1777. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01777>
27. Lv X., Wang J., Zhang L., Shao X., Lin Y., Liu H., Ma G., Li J., Zhou S., Yu P. Canagliflozin reverses Th1/Th2 imbalance and promotes podocyte autophagy in rats with membranous nephropathy. *Frontiers in Immunology*. 2022. № 13. 993869. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.993869>
28. Masutani K., Taniguchi M., Nakashima H., Yotsueda H., Kudoh Y., Tsuruya K., Tokumoto M., Fukuda K., Kanai H., Hirakata H., Iida M. Up-regulated interleukin-4 production by peripheral T-helper cells in idiopathic membranous nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004. № 19 (3). P. 580–586. DOI: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg572>
29. Monatko K. V. Experimental study of the nephroprotective effect of freeze-dried watermelon powder. *Dissertation*. Kharkiv, 2014. 217 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0414U004729/>
30. Motavalli R., Etemadi J., Soltani-Zangbar M. S., Ardalan M. R., Kahroba H., Roshangar L., Nouri M., Aghebati-Maleki L., Khiavi F. M., Abediazar S., Mehdizadeh A., Hojjat-Farsangi M., Mahmoodpoor A., Kafil H. S., Zolfaghari M., Ahmadian Heris J., Yousefi M. Altered Th17/Treg ratio as a possible mechanism in pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy. *Cytokine*. 2021. № 141. 155452. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155452>
31. Podpletnia O. A., Khomyak N. V., Sokolova K. V., Kaidash S. P., Khomyak O. V. Phytotherapeutic drugs with nephroprotective activity (review). *Medical perspectives*. 2017. № 22 (17). P. 10–7. DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2017.1.100866>
32. Prokopyuk O. S. 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. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0514U000218/>
33. Qi Y. Y., Zhou X. J., Cheng F. J., Hou P., Ren Y. L., Wang S. X., Zhao M. H., Yang L., Martinez J., Zhang H. Increased autophagy is cytoprotective against podocyte injury induced by antibody and interferon- $\alpha$  in lupus nephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018. № 77 (12). P. 1799–1809. DOI: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213028>
34. Repin M. V., Chyzh Yu. O., Marchenko L. M., Govorukha T. P., Brusentsov O. F. Effect of placenta cryoextract and blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system on the development of renal failure in rats. *Problems of cryobiology and cryomedicine*. 2021. № 31 (3). P. 223–235. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.22>
35. Ronco P., Beck L., Debiec H., Fervenza F.C., Hou F.F., Jha V., Sethi S., Tong A., Vivarelli M., Wetzels J. Membranous nephropathy. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021. № 7 (1). P. 69. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00303-z>
36. Rosenzweig M., Languille E., Debiec H., Hygino J., Dahan K., Simon T., Klatzmann D., Ronco P. B- and T-cell subpopulations in patients with severe idiopathic membranous nephropathy may predict an early response to rituximab. *Kidney International*. 2017. № 92 (1). P. 227–237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.01.012>
37. Rybolovlev Yu. R., Rybolovlev R. S. Dosage of substances for mammals according to biological activity constants. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1979. № 247 (6). P. 1513–1516.
38. Salant D. J. Unmet challenges in membranous nephropathy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2019. № 28 (1). P. 70–76. DOI: <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000459>
39. Shebeko S. K. Experimental substantiation of the combined use of amino sugar derivatives and flavonoids in the therapy of chronic kidney disease. *Dissertation*. Kharkiv, 2017. 516 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0521U100125/>
40. Shebeko S. K., Chernykh V. V., Zupanets, K. O. Nephroprotective effect of the herbal composition BNO 2103 in rats with renal failure. *Health of Man*. 2021. № 4. P. 48–56. DOI: <https://doi.org/10.30841/2307-5090.4.2021.252396>
41. Shepitko V. I. Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs: dissertation. *Dissertation*. Kharkiv, 2004. 326 p. Access: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>
42. Shtryhol S. Yu., Lisovyi V. M., Zupanets I. A., Shebeko S. K., Maslova N. F., Hozhenko A. I., Kharchenko D. S. Methods of experimental modeling of kidney damage for pharmacological research: methodical recommendations. Kharkiv, 2009. 48 p.

43. Sinico R. A., Mezzina N., Trezzi B., Ghiggeri G.M., Radice A. Immunology of membranous nephropathy: from animal models to humans. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016. № 183 (2). P. 157–165. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.12729>
44. Stefanov O. V., ed. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
45. Talke H, Schubert G. E. Enzymatic urea determination in the blood and serum in the Warburg optical test. *Klinische Wochenschrift*. 1965. № 41. P. 174–175.
46. Wang Y. M., Lee V.W.S., Wu H., Harris D.C.H., Alexander S. I. Heymann nephritis in Lewis rats. *Current Protocols in Immunology*. 2015. № 109. P. 1–6. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1529s109>
47. Zahraa Mohammed-Ali, Rachel E. Carlisle, Samera Nademi, Jeffrey G. Dickhout, Chapter 16 – Animal Models of Kidney Disease. 2017. P. 379–417. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00016-4>
48. Zar J.H. Biostatistical analysis (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014; 960 p.
49. Zhao Q, Dai H., Liu X., Jiang H., Liu W., Feng Z., Zhang N., Gao Y, Dong Z., Zhou X., Du J., Zhang N., Rui H., Yuan L., Liu B. Helper T Cells in Idiopathic membranous nephropathy. *Frontiers in Immunology*. 2021. № 12. 665629. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.665629>
50. Zhou X. J., Klionsky D. J., Zhang H. Podocytes and autophagy: a potential therapeutic target in lupus nephritis. *Autophagy*. 2019. № 15 (5). P. 908–912. DOI: <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1580512>