

ХАРАКТЕРИСТИКА ПІГМЕНТНОГО ОБМІНУ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА МОДЕЛІ АУТОІМУННОГО ГЕПАТИТУ

Ф. В. ГЛАДКИХ

*Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»,
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України
61022, Майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com*

Аутоімунний гепатит (АІГ) – це імуноопосередковане запальне захворювання печінки, спричинене втратою толерантності до власних антигенів гепатоцитів, що призводить до аутоімунного ураження печінки. Мета дослідження – охарактеризувати вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), кріоекстракту плаценти (КЕП) та кріоекстракту селезінки (КЕС)) на стан пігментного обміну на моделі АІГ у щурів. Оцінка стану пігментного обміну показала, що на тлі розвитку АІГ у щурів відмічалось статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання рівня загального білірубину у крові на 148,9% відносно показників інтактних щурів, що становило 33,4 ммоль/л. Зростання загального білірубину у тварин групи контролю відбувалось переважно за рахунок пулу прямого білірубину – його концентрація статистично вірогідно ($p < 0,001$) зросла на 240,0% та становила 17,0 ммоль/л, в той час як вміст непрямого білірубину зріс ($p < 0,001$) лише на 98,3% відносно показників інтактних щурів. За здатністю нормалізувати пігментний обмін на тлі АІГ досліджувані біологічні засоби можна розташувати у наступній послідовності (за % зниження загального білірубину відносно показників тварин групи контролю): КС-МСК (52,6%; $p < 0,001$) > КЕП (49,6%; $p < 0,001$) > КЕС (40,2%; $p < 0,001$).

Ключові слова: аутоімунний гепатит, ад'ювант Фрейнда, білірубин, пігментний обмін, аутоімунні захворювання, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин, кріоекстракт плаценти, кріоекстракт селезінки

Вступ. Аутоімунний гепатит (АІГ) – це імуноопосередковане запальне захворювання печінки, спричинене втратою толерантності до власних антигенів гепатоцитів, що призводить до аутоімунного ураження печінки. АІГ характеризується гіпергаммаглобулінемією, наявністю циркулюючих аутоантитіл, ознаками гепатиту при гістологічному дослідженні печінки та демонструє ефективність імуносупресивної терапії. Передбачувані механізми розвитку АІГ вважаються взаємодією між генетичною схильністю, пусковими факторами навколишнього середовища та недостатністю нативної імунної системи (Komori A., 2021; Poddighe D. et al., 2023; Mieli-Vergani G. et al., 2018; Hladkykh F., 2024).

Захворюваність на АІГ зростає у усьому світі (Mroskowiak A. et al., 2022). Показники захворюваності та поширеності АІГ у світі становлять 1,37 (95% довірчий інтервал (ДІ): 0,95–1,80) та 17,4 (95% ДІ: 12,0–22,9) на 100 тис.

осіб відповідно. Сукупна річна захворюваність на АІГ для населення Азії, Європи та Америки становить 1,3 (95% ДІ: 0,4–2,2), 1,4 (95% ДІ: 1,1–1,6) та 1,0 (95% ДІ: 0,4–1,6) на 100 тис. осіб відповідно. Сукупна поширеність для азіатського, європейського та американського населення становить 13,0 (95% ДІ: 2,1–23,9), 19,4 (95% ДІ: 15,6–23,2) та 22,8 (95% ДІ: 13,5–59,1) на 100 тис. осіб відповідно. Вищі показники захворюваності та поширеності спостерігалися у жінок, ніж у чоловіків, і вищий рівень поширеності спостерігався у літніх людей, ніж у молодих людей (Lv T. et al., 2019).

Аутоантигенний пептид (Ag) презентується Т-клітинному рецептору (TCR) некоммітованих Т-хелперних (Th0) лімфоцитів у межах молекули HLA класу II (HLA II) антигенпрезентуючої клітини (APC) або в регіонарних лімфатичних вузлах, або в самій печінці (рис. 1) (Terziroli B-P. B. et al., 2022; Fasano R. et al., 2022; Liberal, R. et al., 2016; Hladkykh F. et al., 2024).

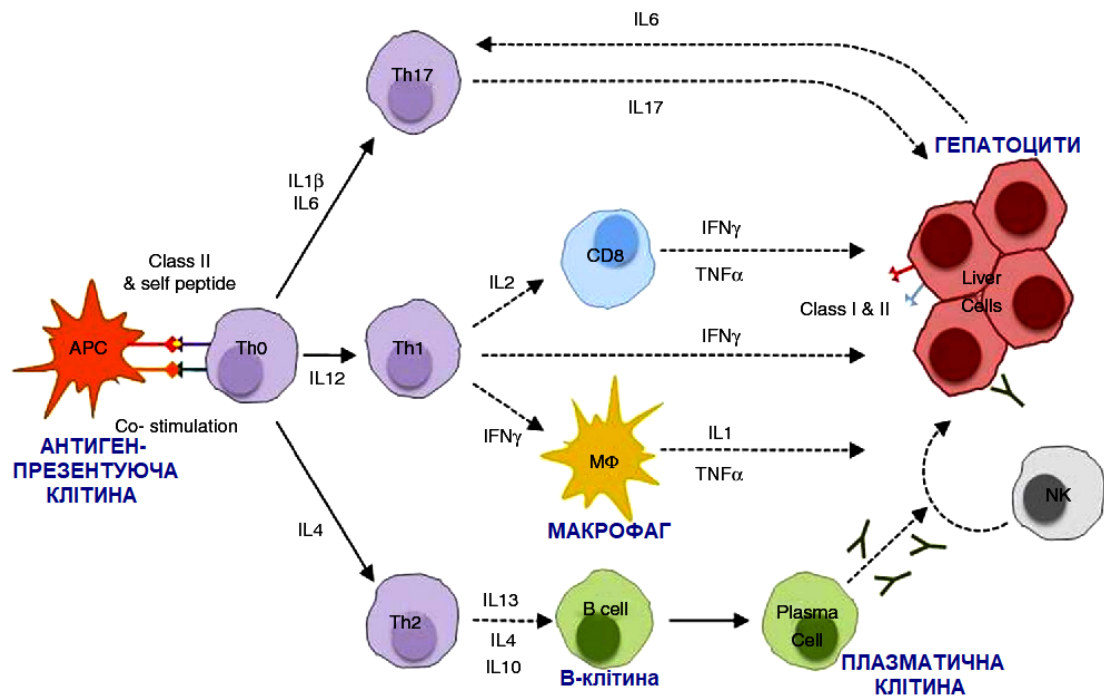


Рис. 1 *Схема патогенезу АІГ (адаптовано за Liberal, R. et al., 2016)*
Fig. 1. *Scheme of the Pathogenesis of Autoimmune Hepatitis (adapted from Liberal, R. et al., 2016)*

Активовані клітини Th0 диференціюються в клітини Th1 або Th2 у присутності інтерлейкіну (IL)-12 або IL-4 відповідно до природи антигену. Це запускає каскад імунних реакцій, що визначаються цитокинами, які вони виробляють. Клітини Th1 секретують IL-2 та інтерферон (IFN)- γ , цитокини, які стимулюють цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL), посилюють експресію молекул HLA класу I (HLA I), індують експресію молекул HLA класу II на клітинах печінки та активують макрофаги (МФ). МФ вивільняє IL-1 і фактор некрозу пухлини (TNF). Клітини Th2 секретують переважно IL-4, IL-13 та IL-21 і стимулюють вироблення аутоантитіл В-лімфоцитами, які дозрівають у плазматичні клітини. Регуляторні Т-клітини (T-reg) походять від Th0 у присутності трансформуючого фактора росту (TGF)- β . Якщо T-reg є дефектними за кількістю та/або функціями, руйнування гепатоцитів є результатом залучення пошкоджуючих ефektorних механізмів, включаючи CTL, цитокини, що вивільняються Th1 та активованим МФ, активація комплексу або адгезія природних клітин-кілерів (NK) до вкритих аутоантитілами гепатоцитів через їх Fc-рецептори. Клітини Th17 продукують запальні цитокини IL-17, IL-22 і TNF і походять від клітин Th0 у присутності TGF- β та IL-6. Гепатоцит вивільняє IL-6, який додатково стимулює Th17. Позитивний сигнал: негативний сигнал (Terziroli B-P. V. et al., 2022; Fasano R. et al., 2022; Liberal, R. et al., 2016; Hladkykh F. et al., 2024).

Мета дослідження – охарактеризувати вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), кріоекстракту плаценти (КЕП) та кріоекстракту селезінки (КЕС)) на стан пігментного обміну на моделі АІГ у щурів.

Матеріали та методи досліджень. Експериментальні дослідження проведені на лабораторних щурах у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р. АІГ у щурів моделювали шляхом введення гепатотропної антигенної суміші, яка складалась з повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) (Thermo Fisher Scientific, США) та розчину антигену, отриманого з гомогенату алогенної печінки (Kohda H. et al., 1990; Hladkykh F., 2024). Гепатотропну антигенну суміш вводили щурам внутрішньом'язово по 2,0 мл 1 раз на тиждень впродовж 6 тижнів (на 1, 7, 14, 21, 28 та 35 дні експерименту) (Kohda H. et al., 1990). Досліджувані препарати починали вводити через 7 днів після останньої ін'єкції гепатотропної антигенної суміші (Kohda H. et al., 1990). Безклітинні засоби вводили з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту. В якості референс-препарату обрано гепатопротектор силібор. На 52 день експерименту тварин виводили з експерименту. Концентрацію білірубину (загального, прямого та зв'язаного) визначали спектрофотометрично за реакцією

діазофенілсульфонової кислоти з прямим білірубінном. При внесенні кофеїнового реактиву непрямий білірубін переходить в розчинний стан та з сумішшю діазореактивів дає рожево-фіолетове забарвлення. За інтенсивністю забарвлення визначали концентрацію прямого і загального білірубину. Інтенсивність забарвлення визначали за світлопоглинанням при довжині хвилі $\lambda = 500\text{--}560$ нм. За різницею між загальним і прямим білірубінном розраховували концентрацію непрямого білірубину (Vink K. et al., 1993; Vink K. et al., 1986).

Результати та їх обговорення. Оцінка стану пігментного обміну показала, що на тлі розвитку АІГ у щурів відмічалось статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання рівня загального білірубину у крові на 148,9% відносно показників інтактних щурів, що становило 33,4 ммоль/л. Зростання загального білірубину у тварин групи контролю відбувалось переважно за рахунок пулу прямого білірубину – його концентрація статистично вірогідно ($p < 0,001$) зросла на 240,0% та становила 17,0 ммоль/л, в той час як вміст непрямого білірубину зріс ($p < 0,001$) лише на 98,3% відносно показників інтактних щурів. КЕП та КС-МСК перевищували за здатністю нормалізувати пігментний обмін у щурів з АІГ як КЕС, так і референс-препарат силібор. Так, на лі введення КЕП рівень загального білірубину у щурів з АІГ статистично вірогідно знизився ($p < 0,001$) на 49,6%, а на тлі введення КС-МСК – статистично вірогідно знизився ($p < 0,001$) на 52,6% відносно показників щурів контрольної групи та становив відповідно 16,9 ммоль/л та 15,9 ммоль/л. На тлі застосування КС-МСК відмічена тенденцію до відновлення пропорційного співвідношення прямого та непрямого білірубину. Так, на тлі введення КС-МСК співвідношення прямий:нпрямий білірубін становило 1:1,3; на тлі введення силібору – 1:1,2; в той час як на тлі введення досліджуваних кріоекстрактів аналогічні співвідношення залишались незмінними та становили 1:1, як і у тварин контрольної групи (1:1), в той час як у інтактних тварин аналогічне співвідношення дорівнювалось 1:1,7.

Висновки. За здатністю нормалізувати пігментний обмін на тлі АІГ досліджувані біологічні засоби можна розташувати у наступній послідовності (за % зниження загального білірубину відносно показників тварин групи контролю): КС-МСК (52,6%; $p < 0,001$) > КЕП (49,6%; $p < 0,001$) > КЕС (40,2%; $p < 0,001$).

Конфлікт інтересів. Автор заявляє, що дослідження проводилося за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які

можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.

Список використаної літератури / References:

1. Fasano, R., Malerba, E., Prete, M., Solimando, A. G., Buonavoglia, A., Silvestris, N., Leone, P., & Racanelli, V. (2022). Impact of antigen presentation mechanisms on immune response in autoimmune hepatitis. *Frontiers in Immunology*, 12, 814155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.814155>
2. Hladkykh, F. V. (2024). 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*, 32(3(50)). <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-9>
3. Hladkykh, F. V. (2024). Immune disorders in autoimmune hepatitis: The role of autoantibodies, T-reg cells, and novel therapeutic approaches. *Bukovinian Medical Bulletin*, 28(3), 76–82. <https://doi.org/10.24061/2413-0737.28.3.111.2024.13>
4. Hladkykh, F. V., & Liadova, T. I. (2024). Characteristics of the hepatotropic activity of cell-free cryopreserved biological agents in the model of autoimmune hepatitis. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine*, 32(3(50)). <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-01>
5. Kohda, H., Sekiya, C., Kanai, M., Yoshida, Y., Uede, T., Kikuchi, K., & Namiki, M. (1990). Flow cytometric and functional analysis of mononuclear cells infiltrating the liver in experimental autoimmune hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 82(3), 473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05474.x>
6. Komori, A. (2021). Recent updates on the management of autoimmune hepatitis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 27(1), 58–69. <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0189>
7. Liberal, R., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2016). Autoimmune hepatitis: From mechanisms to therapy. *Revista Clinica Espanola*, 216(7), 372–383.
8. Lv, T., Li, M., Zeng, N., Zhang, J., Li, S., Chen, S., Zhang, C., Shan, S., Duan, W., Wang, Q., Wu, S., You, H., Ou, X., Ma, H., Zhang, D., Kong, Y., & Jia, J. (2019). Systematic review and meta-analysis on the incidence and prevalence of autoimmune hepatitis in Asian, European, and American populations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 34(10), 1676–1684. <https://doi.org/10.1111/jgh.14746>
9. Mieli-Vergani, G., Vergani, D., Czaja, A. J., Manns, M. P., Krawitt, E. L., Vierling, J. M., Lohse, A. W., & Montano-Loza, A. J. (2018). Autoimmune hepatitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.17>
10. Mroskowiak, A., Suleja, A., Stec, M., Kuczmik, W., Migacz, M., & Holecki, M. (2022). Autoimmune hepatitis—Challenging diagnosis. *Medicina (Kaunas)*, 58(7), 896. <https://doi.org/10.3390/medicina58070896>
11. Poddighe, D., Maulenkul, T., Zhubanova, G., Akhmaltdinova, L., & Dossybayeva, K. (2023). Natural Killer T (NKT) cells in autoimmune hepatitis:

- Current evidence from basic and clinical research. *Cells*, 12(24), 2854. <https://doi.org/10.3390/cells12242854>
12. Terziroli Beretta-Piccoli, B., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2022). Autoimmune hepatitis. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(2), 158–176. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00768-8>
13. Tokuda, K., & Tanimoto, K. (1993). New method of measuring serum bilirubin using vanadic acid. *Japanese Journal of Clinical Chemistry*, 22(2), 116–122.
14. Vink, K. L., Schuurman, W., & van Gansewinkel, R. (1986). Use of the caffeine reagent in direct spectrophotometry of bilirubin. *Clinical Chemistry*, 32(7), 1389–1393.

CHARACTERISTICS OF PIGMENT METABOLISM FOLLOWING THE ADMINISTRATION OF ACELLULAR CRYOPRESERVED BIOLOGICAL AGENTS IN A MODEL OF AUTOIMMUNE HEPATITIS

F.V. Hladkykh

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

V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine,
4 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Autoimmune hepatitis (AIH) is an immune-mediated inflammatory disease of the liver caused by a loss of tolerance to the liver's own hepatocyte antigens, leading to autoimmune liver damage. The aim of this study was to characterize the effects of acellular cryopreserved biological agents – conditioned medium from mesenchymal stem cells (MSC-CM), cryoextract of placenta (CEP), and cryoextract of spleen (CES) on the state of pigment metabolism in a rat model of AIH. Assessment of pigment metabolism showed that, in the context of developing AIH, there was a statistically significant ($p < 0.001$) increase in total bilirubin levels in the blood of rats by 148.9% compared to the values of intact rats, which were 33.4 $\mu\text{mol/L}$. The increase in total bilirubin in the control group animals was mainly due to an increase in direct bilirubin – its concentration rose significantly ($p < 0.001$) by 240.0%, reaching 17.0 $\mu\text{mol/L}$, while the level of indirect bilirubin increased ($p < 0.001$) by only 98.3% compared to the values of intact rats. In terms of the ability to normalize pigment metabolism in the context of AIH, the studied biological agents can be ranked in the following order (by % decrease in total bilirubin compared to control group values): MSC-CM (52.6%; $p < 0.001$) > CEP (49.6%; $p < 0.001$) > CES (40.2%; $p < 0.001$).

Keywords: autoimmune hepatitis, Freund's adjuvant, bilirubin, pigment metabolism, autoimmune diseases, conditioned medium from mesenchymal stem cells, cryoextract of placenta, cryoextract of spleen.

Отримано редколегією 22.10.2024

ORCID ID

Федір Гладких: <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>