

УДК 615.361:615.451:618.46]:57.086.13+616-031:616.61-008.6-007.1

М.В. Репін\*, Ю.О. Чиж, Л.М. Марченко, Т.П. Говоруха, О.Ф. Брусенцов

## Вплив кріоекстракту плаценти та блокади ренін-ангіотензин-альдостеронової системи на розвиток ниркової недостатності у щурів

UDC 615.361:615.451:618.46]:57.086.13+616-031:616.61-008.6-007.1

M.V. Repin\*, Yu.O. Chyzh, L.M. Marchenko, T.P. Govorukha, O.F. Brusentsov

## Placental Cryoextract and Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockade Mitigate Renal Failure in Rats

**Реферат:** У роботі вивчали вплив введення кріоекстракту плаценти щура (КЕП), медикаментозної блокади ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) еналаприлом і спіронолактоном та їх комбінованої дії на структуру тканини і видільну функцію нирок щурів у різні терміни розвитку хронічної ниркової недостатності (ХНН) на тлі гліцеролової моделі. Через 3 тижні після введення гліцеролу у тварин всіх груп виявлялося низьке значення швидкості клубочкової фільтрації, порушення кровотоку в корі нирок, дистрофія канальцевого епітелію, запалення та набряк інтерстиції, що свідчить про початок розвитку ХНН. Через 16 тижнів у нелікованих щурів переважали явища тубулоінтерстиціального нефриту та нефросклерозу. Застосування медикаментозної блокади РААС, а також комплексне лікування блокаторами РААС та кріоекстрактом плаценти викликало зупинку запальних процесів у тканині нирки, відновлення кровообігу та нормалізацію видільної функції, які зберігалися до 16 тижнів спостереження.

**Ключові слова:** хронічна ниркова недостатність, кріоекстракт плаценти, медикаментозна блокада ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, морфологічна структура, креатинін.

**Abstract:** Here, we have studied the impact of administration of rat placental cryoextract (PCE), drug blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) with enalapril and spironolactone and their combination on the rat kidney tissue structure and excretory function at different stages of chronic renal failure (CRF) development using the glycerol model. In 3 weeks after glycerol introduction, the animals from all the groups showed low values of glomerular filtration rate, impaired blood flow in renal cortex, tubular epithelial dystrophy, inflammation and edema of interstitium, indicating the onset of CRF development. Tubulo-interstitial nephritis and nephrosclerosis were dominated in untreated rats 16 weeks later. The use of RAAS drug blockade, as well as a comprehensive therapy with RAAS blockers and placental cryoextract stopped the inflammatory processes in renal tissue, restored blood circulation and normalized excretory function, which persisted for up to 16 weeks of observation.

**Key words:** chronic renal failure, placental cryoextract, drug blockade of renin-angiotensin-aldosterone system, morphology, creatinine.

На сьогоднішній день хронічна ниркова недостатність (ХНН) належить до невиліковних патологій, патогенез яких характеризується поступовим, але неухильним руйнуванням ниркових структур [11]. Сучасний підхід до лікування ХНН передбачає використання нефропротективної терапії на ранніх етапах захворювання. Експериментальні дані свідчать, що застосування тканин і клітин фетоплацентарного комплексу здатне коригувати цілий ряд патологічних станів і може бути одним з нових напрямків лікування та профілактики ХНН [1, 4, 17, 19, 27].

Відомо, що до механізмів патогенезу ХНН, а також різних форм тубулоінтерстиціального нефриту обов'язково залучається ренін-ангіотензин-альдостеронова система (РААС) [7, 22]. При цьому неминуче збільшується синтез і підвищується

Nowadays, a chronic renal failure (CRF) belongs to incurable pathologies, the pathogenesis of which is characterized by gradual, but steady destruction of renal structures [20]. Current approach to CRF treatment includes the use of nephroprotective therapy at the early stages of the disease. Experimental data suggest using the tissues and cells of fetoplacental complex to be capable of correcting a large number of pathological states and may be one of the new directions for CRF therapy and prevention [4, 5, 8, 9, 25].

It is known, that the mechanisms of CRF pathogenesis, as well as various forms of tubulo-interstitial nephritis mandatory involve the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) [13, 16]. This inevitably entails an increased synthesis and activity of different vasopressors, including the angio-

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: 1nvrepin@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: 1nvrepin@gmail.com

Надійшла 20.11.2020

Прийнята до друку 31.08.2021

Received November, 20, 2020

Accepted August, 31, 2021

© 2021 M.V. Repin, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

активність різних вазопресорних субстанцій, зокрема нейрогормону ангіотензину II (АТ-II) [24], що посилює ішемію первинної мікрокапілярної мережі нирок, ініціює синтез та секрецію альдостерону, а також активізує процеси гломеруло- та нефросклерозу, сприяючи хронізації патологічних процесів у нирках.

До лікарських препаратів, здатних значно впливати на активність АТ II, а отже, й на рівень внутрішньоклубочкової гіпертензії, протеїнурії та швидкість розвитку гломерулосклерозу, можуть бути віднесені інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (іАПФ), блокатори рецепторів АТ-II і прямі інгібітори реніну. Калійзберігаючий діуретик – спіронолактон – здатний блокувати рецепторні взаємодії альдостерону [5].

До недоліків терапії іАПФ відноситься виражене прогресуюче збільшення їх нефротоксичності в умовах розвитку ХНН [8]. Крім того доведено, що після терапії іАПФ досить швидко підвищується рівень альдостерону, який також має виражені антидіуретичні властивості, оскільки його секрецію на тлі використання препаратів цієї групи в організмі починають активно стимулювати інші, не пов'язані з РААС, чинники [18, 25]. Кріоекстракт плаценти (КЕП), який має протизапальні та імуномодулюючі властивості [1], може компенсувати недоліки терапії іАПФ і спіронолактоном. У наших попередніх дослідженнях показано, що введення алогенного КЕП щурам з гострою нирковою недостатністю покращувало морфофункціональний стан нирок та затримувало розвиток інтерстиціального нефриту [15], а також зменшувало ознаки ендотеліальної дисфункції [10]. На нашу думку, комбінування КЕП з традиційними медикаментозними методами лікування може забезпечити стійку ремісію захворювання у віддалені терміни розвитку ХНН.

Мета роботи – дослідження впливу алогенного кріоекстракту плаценти та медикаментозної блокади ренін-ангіотензин-альдостеронової системи на структуру тканини нирки та її видільну функцію в процесі розвитку хронічної ниркової недостатності у щурів.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

tensin II (AT-II) neurohormone [22]. This enhances the ischemia of primary microcapillary network of the kidney, initiates synthesis and secretion of aldosterone, as well as activates glomerulo- and nephrosclerosis, thereby contributing to pathology chronicity in kidneys.

Inhibitors of angiotensin-converting enzyme (iACE), AT-II receptor blockers and direct renin inhibitors may be referred to the drugs able to significantly affect the AT II activity, and hence the level of intraglomerular hypertension, proteinuria and glomerulosclerosis development rate. Potassium-sparing diuretic: spironolactone is capable of blocking the receptor interactions of aldosterone [10].

The limitations of iACE therapy include a pronounced progressive increase in their nephrotoxicity under CRF development [17]. Furthermore, quite a rapid increase in aldosterone level after iATE therapy, which also possesses the pronounced anti-diuretic properties, has been proven. This is due to the fact, that against the background of use of this group drugs, the other non-RAAS factors begin an active stimulation of aldosterone secretion in a body [7, 23]. The placental cryoextract (PCE) which has anti-inflammatory and immune-modulating properties [4] may compensate the limitations of therapy with iATE and spironolactone. Our previous studies showed the administration of allogeneic PCE to rats with acute renal failure to improve the morphofunctional state of kidneys and delay the development of interstitial nephritis [27], as well as to reduce signs of endothelial dysfunction [19]. We believe that the combination of PCE with the standard drug therapies may ensure a sustainable remission of the disease in long term of CRF development.

The objective herein was to investigate the impact of allogeneic placental cryoextract and drug blockade of renin-angiotensin-aldosterone system on the structure of kidney tissue and its excretory function during chronic renal failure development in rats.

### Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, agreed with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).



Матеріалом дослідження були 65 білих 4-місячних безпородних шурів масою 180–200 г. Для моделювання токсичної ниркової недостатності тварин витримували 24 години без їжі, після чого однократно внутрішньом'язово вводили 50%-й водний розчин гліцеролу в дозі 10 мл на 1 кг маси тіла [14, 16, 20].

Тварини були розподілені на групи: 1 (контроль) – інтактна ( $n = 5$ ); 2 (ХНН) – модель ХНН ( $n = 15$ ); 3 (КЕП) – модель ХНН із внутрішньом'язовим введенням КЕП по 0,5 мл тричі протягом тижня на другому тижні розвитку патології ( $n = 15$ ); 4 (МБ) – модель ХНН із застосуванням медикаментозної блокади РААС (МБ) еналаприлом (таблетована форма «Енап» («KRKA», Словенія)) по 2,5 мг та спіронолактоном (таблетована форма «Верошпірону» («Геден Ріхтер», Угорщина) по 25 мг, які вводили *per os* у дозі 0,5 мл суспензії (10 мг «Енапу» + 200 мг «Верошпірону» в 30 мл фізіологічного розчину) щоденно на 2–3-му тижні розвитку патології ( $n = 15$ ); 5 (МБ + КЕП) – модель ХНН із застосуванням МБ РААС, як й у групі 4, та одночасним введенням КЕП на 2-му тижні розвитку патології за вищевказаними дозами ( $n = 15$ ).

Для виготовлення КЕП тканину щура відмивали фізіологічним розчином, гомогенізували, заморожували до  $-18^{\circ}\text{C}$  протягом 24 годин. Для більш інтенсивного руйнування клітин і виходу з них біологічно активних речовин гомогенат піддавали двократному заморожуванню у рідкому азоті та відігріву, після чого змішували з фізіологічним розчином (1 : 2), центрифугували при 4500g. Для подальшого застосування отриманий супернатант (кріоекстракт) зберігали в рідкому азоті.

Дози медикаментів для блокади РААС розраховували за формулою Риболовлева [12]. Дозування КЕП проводили відповідно до даних В.І Грищенка та співавт. [1] і Т.М. Юрченко та співавт. [15]. Тварин кожної з груп (по  $n = 5$ ) виводили з експерименту через 3, 8 та 16 тижнів після введення гліцеролу шляхом евтаназії за Директивою 86/609 ЄС та угодою Ради Європи ETS 123. Гістологічні препарати виготовляли згідно з класичними методиками, забарвлювали гематоксиліном і еозином, аналізували в оптичному мікроскопі R-40 («Granum», Китай). Фотореєстрацію проводили за допомогою CD-камери «UCMOS 03100 KPA» («Touptek photonics», Китай). Площу ниркових клубочків вимірювали за допомогою програм «ToupView 3.7» («Touptek», Китай) та «Biovision 4.0» («West Medica», Австрія). Для електронно-мікроскопічного дослідження фрагменти тканини нирки фіксували в 3%-му

Experiments were performed in 65 white 4-month-old outbred rats weighing 180–200g. To simulate a toxic acute renal failure the animals were deprived of food for 24 hrs, then they were injected with a 50% aqueous solution of glycerol at a dose of 10 ml per 1 kg of body weight once intramuscularly [1, 3, 11].

Animals were divided into the following groups: the group 1 (control) was the intact animals ( $n = 5$ ); the group 2 (CRF) consisted of the rats with CRF model ( $n = 15$ ); the group 3 (PCE) comprised the animals with CRF model, injected intramuscularly with PCE by 0.5 ml thrice within a week at the second week of pathology development ( $n = 15$ ); the group 4 (DB) was the CRF model with RAAS drug blockade (DB) by enalapril (Enap tablets 2.5mg (KRKA, Slovenia)) and spironolactone (Verospiron tablets 25 mg (Gedeon Richter, Hungary)), administered *per os* at a dose of 0.5 ml of suspension (10 mg Enap + 200 mg Verospiron in 30 ml saline) daily during weeks 2–3 of pathology development ( $n = 15$ ); the group 5 (DB + PCE) included the animals with CRF model received RAAS DB, as in the group 4, and a simultaneous administration of PCE during week 2 of pathology development at the above doses ( $n = 15$ ).

For PCE preparation, the rat tissue was washed with saline, homogenized and then frozen down to  $-18^{\circ}\text{C}$  for 24 hrs. Homogenate was twice frozen in liquid nitrogen and thawed, then mixed with saline (1:2), centrifuged at 4,500g for more intensive cell destruction and release of biologically active substances. The obtained supernatant (cryoextract) was stored in liquid nitrogen for further use.

The drug doses for RAAS blockade were calculated by Rybolovlev's formula [21]. The PCE was dosed according to the data reported by V.I. Gryshchenko *et al.* [4] and T.M. Yurchenko *et al.* [27]. Animals from each group ( $n = 5$ ) were sacrificed via euthanasia in 3, 8 and 16 weeks after glycerol administration according to Directive 86/609 EEC and Council of Europe Convention ETS 123. Histological specimens were prepared according to the standard techniques, stained with hematoxylin and eosin, analyzed with Granum R40 optical microscope (China). Micrographs were taken with 'UCMOS 03100 KPA' camera (Touptek Photonics, China). The glomerular area was measured using 'ToupView 3.7' (Touptek, China) and 'Biovision 4.0' (West Medica, Austria) software. For electron microscopy, the fragments of kidney tissue were fixed in 3% glutaraldehyde solution with phosphate buffer and osmium tetroxide and placed in epon-araldite. Semi-thin sections (0.5  $\mu\text{m}$ ) were stained with methylene blue and fuchsin (basic), analyzed with





розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері та чотирьохоксику осмію та поміщали в епон-аралдит. Напівтонкі зрізи (0,5 мкм) забарвлювали метиленовим синім та лужним фуксином, аналізували в оптичному мікроскопі R-40. Ультратонкі зрізи після контрастування уранілацетатом і цитратом свинцю досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К («Selmi», Україна) при прискорювальній напрузі 75 кВ, забезпеченого системою знімання і аналізу зображення SAZ-01A («Selmi») з використанням CCD-камери DX-2 і програми для обробки зображення («KAPPA», Німеччина).

Тварин усіх груп поміщали в обмінні камери і збирали сечу в умовах спонтанного діурезу протягом доби до забою. В пробах сечі та крові визначали рівень креатиніну на біохімічному аналізаторі BTS-350 («Biosistemas S.A.», Іспанія) з використанням діагностичного набору (для фотометричного колориметричного визначення креатиніну кінетичним методом без депротейнізації) («Cormay», Польща). Розраховували швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) за Ребергом-Таревим [2].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програм «Excel 2007» («Microsoft», США) та «Statgraphics 2.1» («Statpoint Technologies Inc.», США). Міжгрупову різницю оцінювали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні. Дані в таблиці наводили як середнє арифметичне  $\pm$  стандартне відхилення.

### Результати та обговорення

Найбільш показовий критерій розвитку тубулярного нефрозу при гліцероловій моделі ниркової недостатності – підвищений вміст у сироватці крові креатиніну, який є кінцевим продуктом білкового обміну, що рівномірно розподіляється в рідких середовищах організму. Найчастіше ХНН супроводжується зниженням ШКФ і наявністю мікроальбумінурії. Зв'язок між концентрацією креатиніну і ШКФ нелінійний, тому на ранніх стадіях ХНН при дуже близьких рівнях сироваткового креатиніну ШКФ може відрізнятись майже в два рази. У зв'язку з цим ШКФ можна вважати найбільш чутливим показником функціонального стану нирок [26].

Через 3 тижні після введення гліцеролу у тварин групи 2 спостерігалось помірне порушення видільної функції нирок, про яке свідчили олігоурія, помірна гіперкреатинінемія (концентрація креатиніну незначно перевищувала показник інтактних тварин), зменшення концентрації креатиніну в сечі та суттєве зниження ШКФ

Granum R40 optical microscope. After contrast staining with uranyl acetate and lead citrate, the ultrathin sections were examined using an electron microscope PEM-125K (Selmi, Ukraine) at an accelerating voltage of 75 kV, equipped with a system of image capture and analysis SAZ-01A (Selmi) using a DX-2CCD camera and image processing software (KAPPA, Germany).

Animals of all groups were placed in exchange chambers and the urine was collected under spontaneous daily urine output before euthanasia. The creatinine level was determined in urine and blood samples using a BTS-350 biochemical analyzer (Biosistemas S.A., Spain) with creatinine assay kit (for photometric colorimetric determination of creatinine by kinetic method without deproteinization) (Cormay, Poland). The glomerular filtration rate (GFR) was assessed according to Reberg-Tareev test [2].

The results obtained were statistically processed using the 'Excel 2007' (Microsoft, USA) and 'Statgraphics 2.1' (StatPoint Technologies Inc., USA) software. The difference between groups was evaluated by the nonparametric Mann-Whitney U-test. The data in the Table were presented as the arithmetic mean  $\pm$  standard deviation.

### Results and discussion

The most indicative criterion for tubular nephrosis development in glycerol model of renal failure is an increased content of serum creatinine, being the end product of protein metabolism, evenly distributed in body fluids. Most often, CRF is accompanied by a decreased GFR and microalbuminuria presence. The relationship between the creatinine concentration and GFR is nonlinear, therefore the GFR may differ almost twice at the early stages of CRF at very close levels of serum creatinine. Hence, the GFR may be considered as the most sensitive index of renal functional state [24].

Three weeks after glycerol administration, the group 2 animals had moderate renal excretory dysfunction, as evidenced by oliguria, moderate hypercreatininemia (creatinine concentration was slightly higher vs. the intact animals), decreased urinary creatinine, and a significant reduction of GFR down to  $(0.19 \pm 0.06)$  ml / min (Table). After 8 weeks, the renal excretory dysfunction was more pronounced together with a considerably increased creatinine concentration in blood, its twofold decrease in urine and a further reduction of GFR due to a decreased daily urine output (Table). To the week 16 of observation, serum creatinine levels decreased as compared to previous follow-up period, but remained above normal. The concentration of urinary creati-



Функціональні показники нирок щурів з ХНН після введення КЕП, медикаментозної блокади РААС та їх комбінованої дії на тлі ХНН

Functional parameters of kidneys in CRF rats after administering PCE, RAAS drug blockade and their combined effect against the background of CRF

Група Group	Строк спостереження, тижні Observation term, week	Креатинін крові, мкмоль/л Serum creatinine, $\mu\text{M/l}$	Креатинін сечі, ммоль/л Urine creatinine, mM/l	Добовий діурез, мл Daily urine output, ml	ШКФ, мл/хв Glomerular filtration rate, ml/min
Контроль Control	–	46 ± 4,24	3,8 ± 0,4	10 ± 2,1	0,57 ± 0,04
ХНН CRF	3	48,2 ± 8,7	2,2 ± 0,06 <sup>1,4,5</sup>	6,2 ± 2,1	0,19 ± 0,06 <sup>1</sup>
	8	80,3 ± 3,2 <sup>1,4,5</sup>	1,54 ± 0,46 <sup>1</sup>	5,3 ± 3,0	0,07 ± 0,06 <sup>1,4</sup>
	16	61,7 ± 2,5 <sup>1</sup>	1,44 ± 0,3 <sup>1,3,4,5</sup>	11,2 ± 2,2	0,18 ± 0,06 <sup>1,3,4,5</sup>
КЕП PCE	3	57,2 ± 3,6	3,84 ± 0,9 <sup>4,5</sup>	6,3 ± 2,3	0,29 ± 0,02 <sup>1,2</sup>
	8	70,3 ± 4,0 <sup>1,4,5</sup>	1,59 ± 0,4 <sup>1</sup>	12,0 ± 7,2	0,19 ± 0,08 <sup>1</sup>
	16	58,5 ± 0,31	2,46 ± 0,5 <sup>1,2</sup>	9,5 ± 1,1	0,28 ± 0,01 <sup>1,2,5</sup>
МБ DB	3	49,2 ± 7,6	1,7 ± 0,1 <sup>1,2,3</sup>	7,5 ± 2,3	0,18 ± 0,09 <sup>1,3</sup>
	8	60,0 ± 2,6 <sup>1,2,3</sup>	2,32 ± 0,50 <sup>1</sup>	10,0 ± 3,4	0,27 ± 0,1 <sup>1,2</sup>
	16	60,1 ± 0,81	2,7 ± 0,5 <sup>1,2</sup>	10,0 ± 1,8	0,31 ± 0,04 <sup>1,2,5</sup>
МБ + КЕП DB + PCE	3	46,6 ± 8,5	1,97 ± 0,09 <sup>1,2,3</sup>	8,4 ± 2,2	0,24 ± 0,03 <sup>1</sup>
	8	56,6 ± 3,4 <sup>1,2,3</sup>	2,30 ± 1,1 <sup>3</sup>	9,3 ± 1,0	0,26 ± 0,07 <sup>1,2</sup>
	16	50,3 ± 0,5	3,2 ± 0,6	9,5 ± 2,1	0,41 ± 0,05 <sup>1,2,3,4</sup>

**Примітки:** <sup>1</sup> – значуще порівняно з групою контролю; <sup>2</sup> – значуще порівняно з групою ХНН у той самий термін спостереження; <sup>3</sup> – значуще порівняно з групою КЕП у той самий термін спостереження; <sup>4</sup> – значуще порівняно з групою МБ у той самий термін спостереження; <sup>5</sup> – значуще порівняно з групою МБ + КЕП у той самий термін спостереження;  $p < 0,05$ .

**Notes:** <sup>1</sup> – significant if compared with control group; <sup>2</sup> – significant if compared with CRF group within the same observation period; <sup>3</sup> – significant in comparison with PCE group within the same observation period; <sup>4</sup> – significant compared to the DB group at the same observation period; <sup>5</sup> – significant in comparison with DB + PCE group within the same observation period;  $p < 0.05$ .

до (0,19 ± 0,06) мл/хв (таблиця). Через 8 тижнів порушення видільної функції нирок було більш вираженим на тлі значного підвищення концентрації креатиніну в крові, двократного її зниження в сечі та подальшого зниження ШКФ за рахунок зменшення добового діурезу (таблиця). На 16-й тиждень спостереження концентрація креатиніну в крові зменшилася порівняно з попереднім терміном спостереження, але залишалася вище норми. Концентрація креатиніну в сечі не відрізнялася від попередніх значень, добовий діурез нормалізувався, а ШКФ залишалася низькою. Отже, видільна функція нирок у нелікованих тварин із ХНН до 16-го тижня розвитку патології не відновилася.

У тварин групи 3 (введення КЕП) через 3 тижні розвитку ХНН концентрація креатиніну в крові значуще підвищилася, а ШКФ зменшилася порівняно з контролем. Концентрація креатиніну в сечі тварин цієї групи дорівнювала контроль-

nine did not differ from the previous values, daily urine output was normalized, and GFR remained low. Thus, the renal excretory function in untreated animals with CRF remained unrestored to week 16 of pathology development.

The concentration of blood creatinine was significantly increased in group 3 animals (PCE administration) after 3 weeks of CRF development, but GFR decreased as compared with the control. The concentration of urinary creatinine in this group animals was equal to the control value, which together with low daily urine output indicated a slight increase in concentration capacity of tubular apparatus. After 8 weeks, the concentration of serum creatinine considerably exceeded the control, but GFR was significantly decreased. The concentration of urinary creatinine was low and did not differ from that in untreated rats, but daily urine output was normal. After 16 weeks, the indices of renal excretory function in animals from this group showed their

ним значенням, що у сукупності з низьким добовим діурезом свідчило про деяке підвищення концентраційної здатності каналцевого апарату. Через 8 тижнів концентрація креатиніну в крові значно перевищувала контроль, а ШКФ значуще зменшилася. Концентрація креатиніну в сечі була низькою і не відрізнялася від такої у нелікованих щурів, але добовий діурез наближався до норми. Через 16 тижнів показники видільної функції нирок тварин цієї групи свідчили про її поліпшення порівняно з попереднім терміном спостереження та групою нелікованих тварин (група 2), але вони не досягали норми.

У крові тварин групи 4 (медикаментозна блокада РААС) через 3 тижні розвитку ХНН концентрація креатиніну в крові незначно підвищилася порівняно з контролем, а креатиніну в сечі та ШКФ суттєво зменшилися і були найнижчими серед усіх досліджуваних груп. Через 8 тижнів концентрація креатиніну в крові була вищою порівняно з контролем, але значуще нижчою, ніж у тварин групи 2. Показники креатиніну сечі та ШКФ суттєво збільшувалися порівняно з тваринами груп 2 та 3, а добовий діурез відповідав нормі. Дані показники свідчать про стабілізацію видільної функції нирок тварин після медикаментозної блокади РААС [21]. Стабілізація зберігалася до 16 тижнів спостереження.

У щурів з комбінованим лікуванням (група 5) через 3 тижні розвитку ХНН концентрація креатиніну в крові не відрізнялася від контрольної, а в сечі була нижче, ніж у групах 2 та 3. При цьому ШКФ хоч і була нижче норми, але значуще вище, ніж у групах 2 та 4. Через 8 тижнів концентрація креатиніну в крові щурів групи 5 незначно перевищувала таку в контролі, але була найнижчою серед усіх груп лікованих тварин і значуще нижчою порівняно з групою 2 (таблиця). Значення креатиніну в сечі відповідало групі 4 і значуще не відрізнялося від контрольного, а ШКФ була значуще нижче норми, але вище порівняно з групою 2 (таблиця). Через 16 тижнів у тварин цієї групи показники видільної функції нирок були найкращими серед усіх інших груп та наближались до контрольних.

Морфологічне дослідження нирок тварин через 3 тижні після введення гліцеролу визначило типові зміни в усіх досліджуваних групах. Спостерігалися ознаки порушення гемодинаміки у вигляді розширення міжканалцевих кровоносних капілярів, складжу еритроцитів у клубочкових і каналцевих мікросудинах, а також перикапілярний та інтерстиціальний набряки. Канальцевий епітелій характеризувався явищами дистрофії та регенерації, враховуючи початкову стадію

improvement as compared with the previous observation period and the group of untreated animals (group 2), but did not reach the normal values.

In blood of animals from group 4 (RAAS drug blockade) 3 weeks later CRF development, the concentration of creatinine slightly augmented vs. the control, but the urinary creatinine and GFR decreased significantly and were the lowest among the whole studied groups. After 8 weeks, the concentration of serum creatinine was higher than in the control, but significantly lower than in group 2 animals. The urinary creatinine and GFR increased significantly as compared with animals of groups 2 and 3, and daily urine output was normal. These indices testify to the stabilization of excretory function of animal kidneys after RAAS drug blockade [12], which persisted for up to 16 weeks of observation.

In the rats received the combined therapy (group 5) after 3 weeks of CRF development, the concentration of serum creatinine did not differ from the control, but the urinary one was lower than in groups 2 and 3. Herewith, the GFR, although below normal, was significantly higher than in groups 2 and 4. After 8 weeks, the concentration of serum creatinine in group 5 rats was slightly higher than in the control, but the lowest among the whole groups of treated animals and significantly lower vs. the group 2 (Table). The urinary creatinine value corresponded to group 4 and did not differ significantly from the control, and GFR was significantly below normal, but best as compared with the group 2 (Table). After 16 weeks, the animals from this group had the highest indices of renal excretory function among all other groups and approached the control values.

Morphological examination of animal kidneys in 3 weeks after glycerol administration revealed the typical changes in all the studied groups. There were observed the signs of hemodynamic disorders such as the dilatation of intertubular blood capillaries, erythrocyte sludge in glomerular and tubular microvessels, as well as pericapillary and interstitial edema. The tubular epithelium was characterized by phenomena of dystrophy and regeneration, taking into account the initial stage of CRF development (restoration of urine output and transition to chronic phase) (Fig. 1A).

Electron microscopy revealed the dystrophic changes of nephrocytes as the formation of vacuoles, lipid and protein droplets in cell cytoplasm. The focal necrosis of tubular epithelium and their dilated lumens with accumulated in it cell detritus, being the basis for cylinder formation, were observed. Infiltration of interstitium by leukocytes and lymphocytes was pronounced in the untreated rats from group 2 only. Importantly, that followed RAAS bloc-





розвитку ХНН (відновлення діурезу і перехід у хронічну фазу) (рис. 1, А).

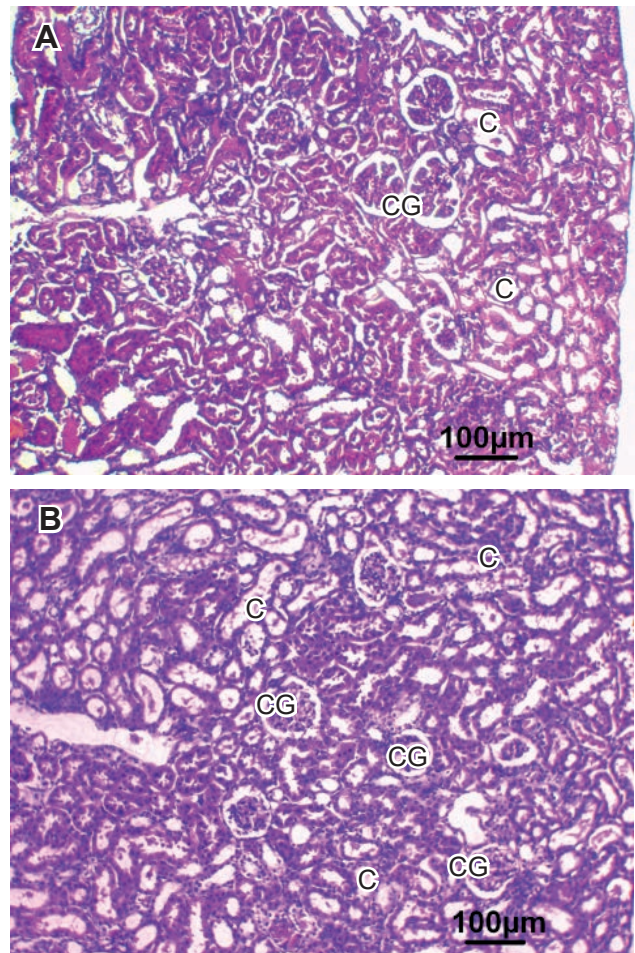
За даними електронної мікроскопії дистрофічні зміни нефроцитів виявлялися як утворення вакуолей, ліпідних і білкових крапель у цитоплазмі клітин. Спостерігалися фокальний некроз епітелію канальців і розширення їх просвітів зі скупченням в них клітинного детриту – основи формування циліндрів. Інфільтрація інтерстиції лейкоцитами і лімфоцитами була виражена тільки у нелікованих шурів групи 2. Важливо, що після блокади РААС, введення КЕП та їх поєднаного застосування зони некрозу епітеліоцитів у корі нирок на цьому терміні спостереження не виявлялися (рис. 1, В). Слід відзначити, що використання блокаторів РААС, особливо іАПФ, може уповільнити розвиток гломерулосклерозу [6].

Електронно-мікроскопічні дослідження тканини нирок шурів усіх груп підтверджують наявність тубулярної нефропатії, яка призводила до розвитку реабсорбційної недостатності канальців та подальшого пошкодження клубочків.

Найбільш суттєвими виявилися зміни ультраструктури подоцитів та мезангіоцитів клубочків. Подоцити характеризувалися збільшенням електронної щільності цитоплазми, посиленням її фібрилярного рисунка, добре розвиненим ендоплазматичним ретикуломом (ЕПР), великою кількістю рибосом, дрібних везикул (рис. 2, А), що свідчить про їх підвищену функціональну активність, характерну для протеїнурії [13, 23].

Пошкодження гломерулярного фільтра супроводжувалося адаптивною гіперплазією та проліферацією мезангіоцитів, що приводило до збільшення мезангіального матриксу і потовщення базальних мембран клубочкових капілярів (рис. 2, В, С). Слід відзначити, що такі перебудови ниркових клубочків не були тотальними.

Через 8 тижнів після введення гліцеролу в корі нирки нелікованих тварин (група 2) залишалися ознаки порушення гемо- і лімфодинаміки. Канальцевий епітелій характеризувався явищами осередкової дистрофії та регенерації. Крім того, спостерігалися фокальний некроз епітелію канальців, лімфоцитарно-плазмодитарна інфільтрація інтерстиції, а також дифузний нефросклероз, які свідчать про розвиток тубулоінтерстиціального нефриту. У шурів, яким застосовували МБ РААС, введення КЕП та їх комбінацію, запалення інтерстиції не спостерігалося, але виявлялися осередкові дистрофічні зміни канальцевого епітелію та нефросклероз. Ультраструктура епітелію проксимальних та дистальних канальців поза зонами дистрофії вказувала на напруженість функціонування цих клітин, особливо міто-



**Рис. 1.** Морфологічний стан кори нирок шурів через 3 тижні після введення гліцеролу: **А** – група 2; **В** – група 5; **С** – канальці; \* – некроз епітелію; **CG** – коркові клубочки.

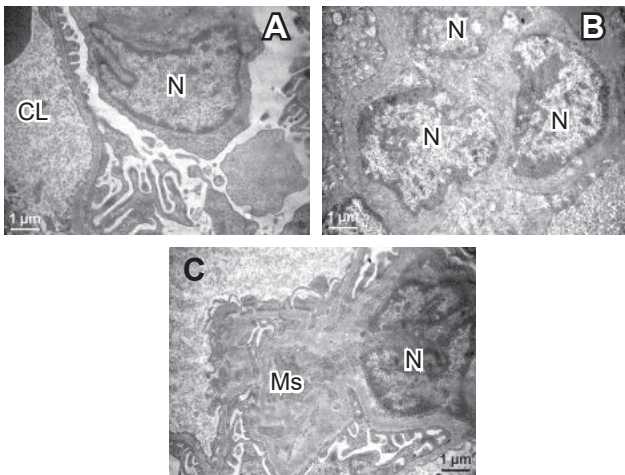
**Fig. 1.** Morphological state of renal cortex of rats 3 weeks after glycerol administration: **A** – group 2; **B** – group 5; **C** – tubules; \* – epithelial necrosis; **CG** – cortical glomeruli.

kade, PCE introduction and their combined use, no necrotic areas of epitheliocytes in renal cortex were seen within this observation term (Fig 1B). It is noteworthy, that the use of RAAS blockers, especially iACE, may slow down glomerulosclerosis development [14].

Electron microscopy of renal tissue of rats from all the groups confirmed the presence of tubular nephropathy, resulting in development of tubular reabsorption insufficiency and subsequent damage to the glomeruli.

Changes in ultrastructure of glomerular podocytes and mesangiocytes occurred to be most significant. Podocytes were characterized by an increased electron density of the cytoplasm, its enhanced fibrillar pattern, well-developed endoplasmic reticulum (EPR), a large number of ribosomes, small vesicles (Fig. 2A), indicating thereby their enhanced functional activity, specific to proteinuria [15, 26].





**Рис. 2.** Ультраструктура фрагментів ниркових клубочків у щурів з ХНН: **A** – насиченість органелами цитоплазми подоцита; **B** – проліферація мезангіоцитів; **C** – інтерпозиція відростків мезангіоцитів і збільшення мезангіального матриксу. N – ядра подоцита, мезангіоцитів; Ms – відростки мезангіоцитів; CL – просвіт капіляра.

**Fig. 2.** Ultrastructure of renal glomerular fragments in CRF rats: **A** is saturation of podocyte cytoplasm with organelles; **B** is proliferation of mesangial cells; **C** is interposition of mesangial cell processes and mesangial matrix expansion. N – nuclei of podocytes, mesangial cells; Ms – mesangial cell processes; CL – capillary lumen.

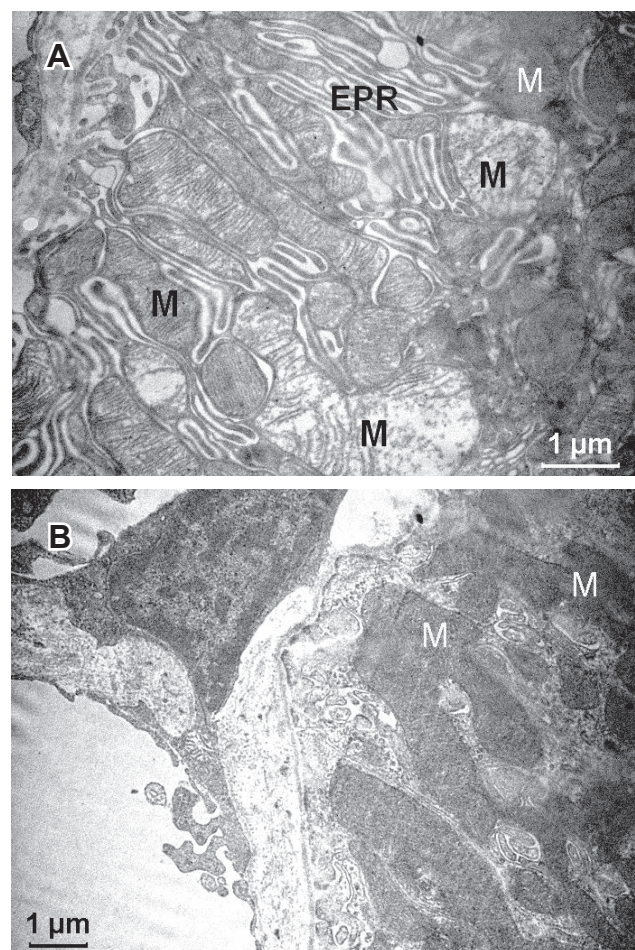
хондрій і цистерн ЕПР. Мітохондрії частини клітин відрізнялися поліморфізмом (рис. 3, А), а також гіпертрофією (рис. 3, В), що є компенсаторно-адаптивною реакцією в умовах реабсорбційної недостатності.

У віддалені терміни розвитку патології, через 16 тижнів після введення гліцеролу, незалежно від проведеного лікування, в корі нирки спостерігалася осередкове розширення міжканальцевих кровоносних і лімфатичних капілярів, що може бути ознакою незначного порушення гемо- і лімфодинаміки.

У нашій моделі ХНН провідну роль відігравав тубулоінтерстиціальний нефрит, результатом якого став стабільний або частково зворотний замінний нефросклероз. При цьому в інтерстиції процеси периваскулярного та передуктального склерозування переважали над макрофагально-гістіоцитарною інфільтрацією. У корі нирки нелікованих тварин з ХНН (група 2) часто спостерігалися осередки інфільтрації інтерстиції та розростання сполучної тканини в місцях некрозу клубочків та каналців, а в епітелії каналців – поширені дистрофічні та атрофічні явища (рис. 4, А). Також виявлялися поодинокі випадки гіалінозу клубочків (частіше коркового шару) та їх атрофії як наслідок прогресування хронічної стадії патології.

Damage to glomerular filter was accompanied by adaptive hyperplasia and proliferation of mesangial cells, entailing an increase in mesangial matrix and thickening of basal membranes of glomerular capillaries (Fig. 2B, C). Notably, that these rearrangements in renal glomeruli were not entire.

In 8 weeks after glycerol administration, the signs of disordered hemo- and lymphodynamics were kept in renal cortex of untreated animals (Group 2). The tubular epithelium was characterized by the phenomena of focal dystrophy and regeneration. In addition, there were seen a focal necrosis of tubular epithelium, lymphocytic-plasmacytic infiltration of interstitium, as well as diffuse nephrosclerosis, indicating the development of tubulointerstitial nephritis. The rats, administered with RAAS DB,

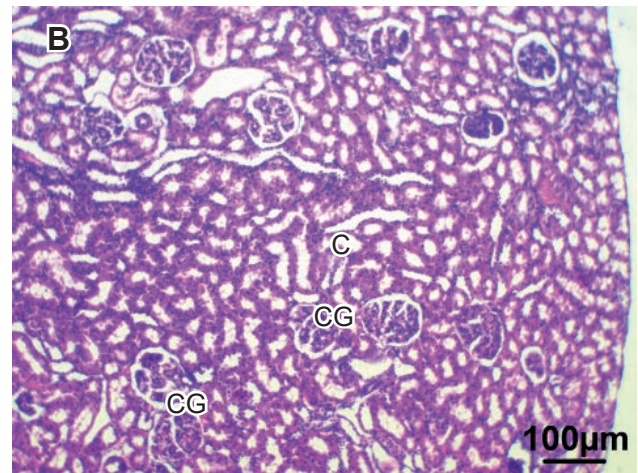
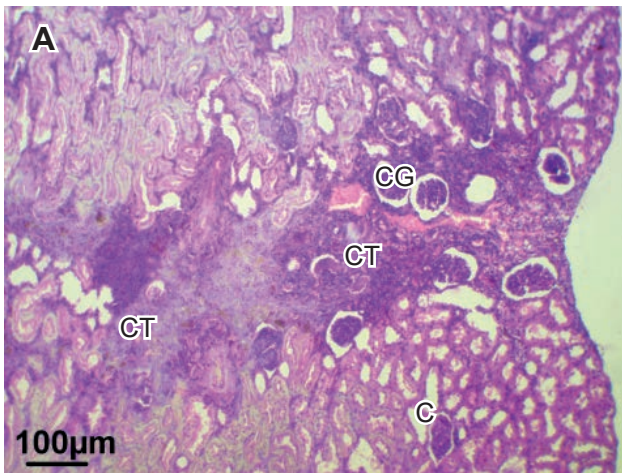


**Рис. 3.** Адаптаційно-компенсаторні ознаки в ультраструктурі мітохондрій і ЕПР нефроцитів дистальних каналців нирок щурів з ХНН після введення КЕП і блокади РААС: **A** – поліморфізм мітохондрій; **B** – гіпертрофія мітохондрій. M – мітохондрії; EPR – ендоплазматичний ретикулум.

**Fig. 3.** Adaptive-compensatory signs in ultrastructure of mitochondria and EPR of renal distal tubular nephrocytes in CRF rats after administering PCE and RAAS blockade: **A** – mitochondrial polymorphism; **B** – hypertrophy of mitochondria. M – mitochondria; EPR – endoplasmic reticulum.







**Рис. 4.** Морфологічний стан кори нирок щурів через 16 тижнів після введення гліцеролу: **А** – група 2; **В** – група 5; **С** – каналці; **СТ** – сполучна тканина; **СГ** – коркові клубочки.

**Fig. 4.** Morphology of renal cortex of rats in 16 weeks after glycerol administration: **A** – group 2; **B** – group 5; **C** – tubules; **CT** – connective tissue; **CG** – cortical glomeruli.

Слід відзначити, що у лікованих щурів дистрофічні зміни нефроцитів мали осередковий характер і поєднувалися з процесами регенерації, які проявлялися в гіпертрофії клітин та їх органел, а іноді – в багаторядності епітеліального вистилання каналців. Ознаки регенерації каналцевих структур найчастіше визначалися в паренхімі нирок щурів після комплексного лікування (введення КЕП на тлі медикаментозної блокади РААС). Структура тканини наближалася до стану норми (рис. 4, В).

Відомо, що в нирці існує два кола кровообігу: корковий та юкстамедулярний [13]. У ссавців активну участь у сечоутворенні беруть саме інтракортикальні нефрони. Юкстамедулярний кровообіг грає роль шунта за рахунок коротшого шляху, яким проходить частина крові через нирки в умовах підвищеного тиску, і який стає активним в патологічних умовах для термінового відновлення показників артеріального тиску [3].

Для оцінки стану кровообігу в тканині нирки використовується морфометричний аналіз площ поперечного перерізу клубочків, а зміна цього показника на 10% може свідчити про розвиток ішемізації та порушення кровотоку в корковому шарі [3]. В наших дослідженнях виявлено, що середня площа коркових та юкстамедулярних клубочків у групі контролю значуще не відрізнялася, що може свідчити про однакову активність двох кіл кровообігу в нирці інтактних тварин (рис. 5).

У тварин усіх досліджуваних груп під час розвитку ХНН площа перетину юкстамедулярних клубочків значуще перевищувала площу коркових незалежно від виду лікування, що є ознакою порушення балансу між двома колами нирко-

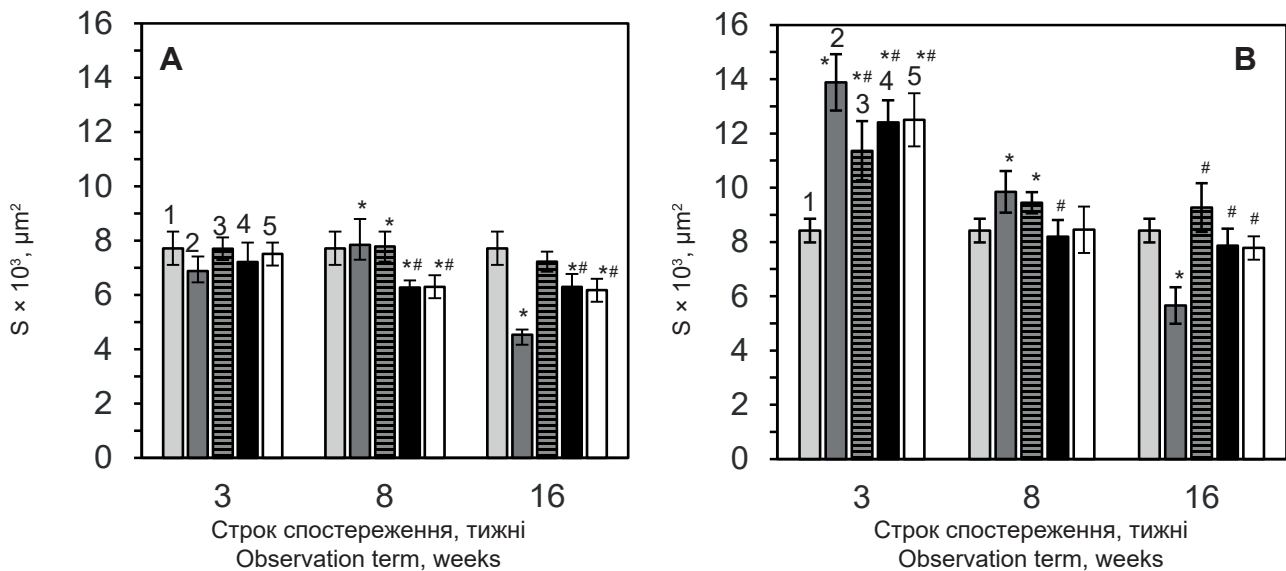
PCE and their combination, displayed no interstitial inflammation of interstitium, but revealed focal dystrophic changes of tubular epithelium and nephrosclerosis. The ultrastructure of epithelium of proximal and distal tubules outside the dystrophy areas indicated the intensive of functioning of these cells, especially mitochondria and EPR cisternae. Mitochondria of some cells differed by polymorphism (Fig. 3A) and hypertrophy (Fig. 3B), being a compensatory-adaptive response under reabsorption insufficiency.

In long-term of pathology development, namely in 16 weeks after glycerol administration, regardless of therapy performed the renal cortex showed a focal dilatation of intratubular blood and lymphatic capillaries, being likely a sign of slight disorder of hemo- and lymphodynamics.

In our model of CRF, the leading role was played by tubulointerstitial nephritis, resulted in stable or partially reversible substitutive nephrosclerosis. Herewith, in the interstitium, the perivascular and preductal sclerosis prevailed over macrophage-histiocytic infiltration. The renal cortex of untreated animals with CRF (group 2) displayed often the foci of interstitial infiltration and growth of connective tissue in sites of glomerular and tubular necrosis, and the extensive dystrophic and atrophic phenomena in tubular epithelium (Fig. 4A). Single cases of glomerular hyalinosis (more often of cortical layer) and their atrophy as a result of CRF development were also revealed.

It should be noted that dystrophic changes of nephrocytes in treated rats were of focal nature, combined with regenerative processes, manifested in hypertrophy of cells and their organelles, and multilayered epithelial lining of tubules somewhere. Signs of regeneration of tubular structures were





**Рис. 5.** Гістограма розподілу площ (S) коркових (A) та юкстамедулярних (B) клубочків у тканині нирок щурів різних груп: 1 – контроль, 2 – ХНН, 3 – КЕП, 4 – МБ, 5 – МБ + КЕП. на різних термінах дослідження. \* – значуще порівняно з групою контролю; # – значуще порівняно з групою ХНН у той самий термін спостереження;  $p < 0,05$ .

**Fig. 5.** Histogram of areas (S) distribution of cortical (A) and juxtamedullary (B) glomeruli in renal tissue of rats from different groups: 1 – control, 2 – CRF, 3 – PCE, 4 – DB, 5 – DB + PCE at different observation terms. \* – significant in comparison with control group; # – significant in comparison with CRF group at the same observation period;  $p < 0.05$ .

вого кровотоку. Ця різниця була найбільш значуща на ранніх термінах розвитку захворювання (3 тижні), коли в результаті ішемії кори нирки компенсаторно підвищується активність юкстамедулярного кола кровообігу. Така тенденція зберігалася до 16 тижнів спостереження. Крім того, у нелікованих тварин площа коркових та юкстамедулярних клубочків на цьому терміні була значуще менше порівняно з контролем та усіма групами лікування.

Протягом 16 тижнів експерименту в групі тварин з введенням КЕП метричні показники коркових клубочків були найбільш наближені до контрольних значень. Слід зазначити, що площа юкстамедулярних клубочків нормалізувалася у тварин, яким застосовували медикаментозну блокаду РААС, а також поєднували її з введенням КЕП.

Таким чином, одержані дані свідчать, що введення КЕП у комплексі з МБ РААС сприяє відновленню кровообігу в корковому шарі нирки, що зменшує ішемізацію та зупиняє подальший розвиток запальних процесів і може бути пов'язано з нормалізацією активності РААС. Відомо, що у ланцюзі подій, що ініціюють і підтримують процеси нефросклерозу, велике значення приділяють РААС, а її гальмування є загальноновизнаним стандартом терапії, спрямованої на зниження прогресування хронічної патології [5, 6]. На це також вказують морфологічні дані щодо ультраструктури та метричних характеристик наднирників щурів, а саме: зменшення ознак посилення

most pronounced in renal parenchyma of rats after combined treatment (PCE administration together with RAAS drug blockade). The tissue structure was close to normal state (Fig. 4B).

It is known that there are two pathways of renal circulation: cortical and juxtamedullary [26]. In mammals, namely intracortical nephrons are actively involved in urination. Juxtamedullary pathway plays the role of a shunt due to a shorter path across which a part of blood passes through kidneys under high pressure, and which becomes active under pathology conditions for urgent blood pressure recovery [6].

Morphometric analysis of glomerular cross-sectional areas is used to assess the state of blood circulation in renal tissue. Change of this index by 10% may indicate the development of ischemia and impaired blood flow in cortical layer [6]. Here, we have revealed the average area of cortical and juxtamedullary glomeruli not to significantly differ in the control group, indicating thereby the same activity of two circulatory pathways in kidneys of intact animals (Fig. 5).

In animals of the whole groups during CRF development, the area of intersection of juxtamedullary glomeruli significantly exceeded the area of cortical ones, regardless of treatment type, being a sign of imbalance between two pathways of renal blood flow. This difference was most significant at the early stages of the disease development (3 weeks), when as a result of renal cortex ischemia the activity of juxtamedullary circulation increased in a compensatory way. This tendency persisted up to 16 weeks



стероїдогенезу в корі та збільшення товщини клубочкової зони наднирників, одержаних нами в умовах цього експерименту [9].

Отримані дані можуть бути використані для впровадження в клінічну практику як доповнення до базової терапії, а також для більш глибокого вивчення механізмів впливу аlogenного КЕП на різні патогенетичні ланки ниркової недостатності порівняно з традиційною медикаментозною терапією.

### Висновки

1. Через 3 тижні після введення гліцеролу у тварин усіх груп встановлено ознаки розвитку ХНН: низьке значення швидкості клубочкової фільтрації, порушення кровотоку в корі нирок, дистрофія канальцевого епітелію, запалення та набряк інтерстиції.

2. Застосування МБ РААС, а також комплексне лікування зупинило прогресування захворювання і покращило видільну функцію нирок на 8-му тижні ХНН, а також привело до нормалізації видільної функції та ремісії захворювання до 16-го тижня спостереження.

3. За даними морфологічних досліджень та морфометричного аналізу введення КЕП викликало ефект, подібний до МБ РААС, який проявлявся у відновленні кровотоку в корі нирки та призупиненні запальних процесів в нирковій інтерстиції вже на початкових етапах розвитку ХНН. В результаті комплексного лікування структура ниркової тканини нормалізувалася на 16-му тижні спостереження.

### Література

1. Грищенко ВИ, Юрченко ТН, редактор. Пластина: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харьков; 2011. 292 с.
2. Данилова ЛА. Анализы крови, мочи и других биологических жидкостей человека в различные возрастные периоды. 3-е изд. Санкт Петербург: СпецЛит; 2019. 119 с.
3. Каплунова ОА. Юкстамедуллярный путь кровотока в почке (сравнительно-анатомический и возрастной аспекты). Морфология. 2015; 147(1): 53–8.
4. Кирлатовский ВИ, Казаченко АВ, Плотников ЕЮ, и др. Экспериментальная оценка новых технологий профилактики и лечения почечной недостаточности. Экспериментальная и клиническая урология. 2010; (1): 30–6.
5. Кутырина ИМ, Лившиц НЛ, Рогов ВА, и др. Применение ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента при хронической почечной недостаточности. Терапевтический архив. 2002; 74(6): 34–9.

of observation. In addition, at this observation term the area of cortical and juxtamedullary glomeruli in untreated animals was significantly lower as compared to the control and all treated groups.

During 16 weeks of experiment the metric values of cortical glomeruli were closest to the control values in PCE animals. Notably, that the areas of juxtamedullary glomeruli were normalized in the animals treated with RAAS drug blockade and its combination with PCE administration.

Thus, our findings testify to the administration of PCE together with RAAS DB to ensure the restoration of blood circulation in renal cortical layer, thus reducing the ischemia and stopping further development of inflammatory processes, that may be due to the normalization of RAAS activity. It is well-known that in the chain of events, initiating and supporting nephrosclerosis, a great importance is paid to RAAS, and its inhibition is a generally accepted standard of the therapy aimed at reducing the chronic pathology progression [10, 14]. This is also suggested by morphological data we obtained here on ultrastructure and metric characteristics of rat adrenal glands, namely the decreased signs of enhanced cortical steroidogenesis and increased thickness of glomerular zone of adrenal glands [18].

Our findings may be used for enrolling into clinical practice as a supplement to basic therapy, as well as for a deeper study of mechanisms of allogeneic PCE impact on various pathogenetic links of renal failure if compared with the standard drug therapy.

### Conclusions

1. In 3 weeks after glycerol introduction, the animals of all the groups showed the signs of CRF development, namely low glomerular filtration rate, impaired blood flow in renal cortex, tubular epithelial dystrophy, interstitial inflammation and edema.

2. The use of RAAS DB, as well as a comprehensive therapy stopped the disease progress and improved the renal excretory function on the week 8 of CRF, and resulted in normalization of excretory function and disease remission to the week 16 of observation.

3. Morphological studies and morphometric analysis revealed the PCE administration to cause an effect similar to RAAS DB, manifested in blood flow restoration in renal cortex and cessation of inflammatory processes in renal interstitium even at the early stages of CRF. A combined therapy resulted in normalization of renal tissue structure to the week 16 of observation.





6. Моисеев СВ, Арутюнов ГП, Фомин ВВ. Ингибиторы АПФ и нефропротекция при хронических заболеваниях почек с протеинурией. Клиническая нефрология. 2009; (2): 31–6.
7. Николаев АЮ, Николаева АА, Попова ЛВ. Патогенез хронической почечной недостаточности у пациентов с гипертензией (обзор литературы). Казанский медицинский журнал. 2015; 96 (4): 659–65.
8. Осиков МВ, Гизингер ОА, Черепанов ДА. Патогенез изменений иммунного статуса и роль амлодипина в их коррекции при экспериментальной хронической почечной недостаточности. Медицинская иммунология. 2016; 18(3): 231–8.
9. Репін МВ, Марченко ЛМ, Говоруха ТП та ін. Ультраструктура наднирників щурів з хронічною нирковою недостатністю після терапії криоекстрактом плаценти на тлі медикаментозної блокади РААС. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4(6): 349–55.
10. Репін НВ, Чиж ЮА, Марченко ЛН, Говоруха ТП. Морфологическая характеристика эндотелия аорты крыс с почечной недостаточностью после коррекции аллогенным криоекстрактом плаценты. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020; 5(4): 379–85.
11. Романенко АМ, Непомнящий ВМ. Морфологічна діагностика нефрологічних хвороб. В: Нефрологія. Київ: Здоров'я; 2004. с. 38–97.
12. Рыболовлев ЮР, Рыболовлев РС. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. Доклады АН СССР. 1979; 247(6): 1513–6.
13. Тареева ИЕ. Нефрология: Руководство для врачей. Москва: Медицина; 2000. 687с.
14. Фира ЛС, Николаев ВГ, Клишч ИН, и др. Изучение эффективности препарата Энтеросгель при экспериментальной почечной недостаточности. Медицина неотложных состояний. 2011;(1-2):91–4.
15. Юрченко ТН, Кондаков ИИ, Страна ВИ. Ренальные эффекты при введении криоекстракта плаценты на фоне экспериментальной почечной недостаточности. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014; 24(1): 75–8.
16. Dai C, Kiss LP, Liu Y. Animal models of kidney diseases. In: Conn PM, editor Sourcebook of models for biomedical research. Totowa: Humana Press; 2008. p. 657–64.
17. Iwatani H, Imai E. Kidney repair using stem cells: myth or reality as a therapeutic option. Nephrol. 2010; 23(2): 143–6.
18. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. Circulation. 2004; 109(18): 2213–20.
19. Kirpatovskiy VI, Kazachenko AV, Kon'kova TA, et al. Functional aftereffects of intraparenchymatous injection of human fetal stem and progenitor cells to rats with chronic and acute renal failure. Bull Exp Biol Med. 2006; 141(4): 500–6.
20. Li K, Chen Yu, Zhang J, et al. Microenvironment derived from metanephros transplantation inhibits the progression of acute kidney injury in glycerol-induced rat models. Renal Failure. 2020; 42(1): 89–97.
21. Luno J, Barrio V, Goicoechea MA, et al. Effect of dual blockade of the renin-angiotensin system in primary proteinuric nephropathies. Kidney Int. 2002; 62(Suppl.82): S47–S52.
22. Marisa KA, Clarke EA, Bertram P. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. J Vet Intern Med. 2019;33(2):363–82.
23. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, et al. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. Hypertension. 2006; (47): 1084–93.
24. Sharfuddin AA, Molitoris BA: Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. Nat Rev Nephrol. 2011; (7): 189–200.

## References

1. Dai C, Kiss LP, Liu Y. Animal models of kidney diseases. In: Conn PM, editor. Sourcebook of models for biomedical research. Totowa: Humana Press; 2008. p. 657–64.
2. Danilova LA. [Analyzes of human blood, urine and other biological fluids at different age periods.] 3rd ed. St. Petersburg: SpetsLit; 2019. 119 p. ISBN 978-5-299-01019-0 Russian.
3. Fira LS, Nikolayev VG, Klisch IN, et al. [Study of efficiency of enterosgel at experimental renal failure]. Emergency Medicine. 2011;(1-2):91-4. Russian.
4. Gryschenko VI, Yurchenko TN. [Placenta: cryopreservation, structure, properties, perspectives of clinical use]. Kharkiv: Brovin AV, 2011. 292 p. Russian.
5. Iwatani H, Imai E. Kidney repair using stem cells: myth or reality as a therapeutic option? Nephrol. 2010; 23(2): 143–6.
6. Kaplunova O.A. [Juxtaglomerular blood flow pathway in the kidney (comparative-anatomical and age-related aspects)]. Morphologiya. 2015;147(1): 53–8. Russian.
7. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. Circulation. 2004; 109(18): 2213–20.
8. Kirpatovskiy VI, Kazachenko AV, Kon'kova TA, et al. Functional aftereffects of intraparenchymatous injection of human fetal stem and progenitor cells to rats with chronic and acute renal failure. Bull Exp Biol Med. 2006; 141(4): 500–6.
9. Kirpatovskiy VI, Kazachenko AV, Plotnikov EYu, et al. [Experimental evaluation of novel technologies for acute renal failure preventing and treatment]. Experimental & Clinical Urology. 2010; (1): 30-6. Russian.
10. Kutyryna, IM, Lifshits, NL, Rogov VA, et al. [Administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor synchronic renal failure]. Terapevticheskii Arkhiv. 2002; 74 (6): 34–9. Russian.
11. Li K, Chen Yu, Zhang J, et al. Microenvironment derived from metanephros transplantation inhibits the progression of acute kidney injury in glycerol-induced rat models. Renal Failure. 2020; 42(1): 89–97.
12. Luno J, Barrio V, Goicoechea MA et al. Effect of dual blockade of the renin-angiotensin system in primary proteinuric nephropathies. Kidney Int. 2002; 62(Suppl.82): S47–S52.
13. Marisa KA, Clarke EA, Bertram P. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. J Vet Intern Med. 2019;33(2):363–82.
14. Moiseev SV, Arutyunov GP, Fomin VV. [ACE inhibitors and nephroprotection in chronic proteinuric nephropathies]. Clinical Nephrology. 2009; 2: 31–6. Russian.
15. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, et al. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. Hypertension. 2006; (47): 1084–93.
16. Nikolaev KYu, Nikolaeva AA, Popova LV, et al. [Pathogenesis of chronic renal failure in patients with hypertension (review)]. Kazan Medical Journal. 2015; 96 (4): 659-65. Russian.
17. Osikov MV, Gizinger OA, Cherepanov DA. [Pathogenesis of immune alterations and corrective role of amlodipine in experimental chronic renal failure]. Meditsinskaya Immunologiya. 2016; 18(3): 231–2. Russian.
18. Repin NV, Marchenko LN, Govorukha TP, et al. [Ultrastructure of rat adrenal glands with chronic renal insufficiency following placental cryoextract therapy in the course of RAAS mediated blocking]. Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sport. 2019;4(6): 349–55. Ukrainian.
19. Repin NV, Chizh YuA, Marchenko LN, Govorukha TP. [Morphological characteristics of aortal endothelium in rats with renal insufficiency following correction by allogenic placental cryoextract]. Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sport. 2020; 5(4): 379–85. Russian.



25. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, et al. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*. 2007; (49): 355–64.
26. Snyder S, Pendergraph B. Detection and evaluation of chronic kidney disease. *Am Fam Physician*. 2005; 72(9): 1723–32.
27. Sunil KG, Mehran A, Tae-Hyoung K, et al. Effect of human amniotic fluid stem cells on kidney function in a model of chronic kidney disease. *Tissue Eng Part A*. 2019; 25(21-22): 1493–503.
20. Romanenko AM, Nepomnyashchyi VM [Morphological diagnosis of nephrological diseases]. In: [Nephrology]. Kyiv: Zdorov'ya; 2004. p. 38–97. Russian.
21. Rybolovlev YuR, Rybolovlev RC. [Dosing of substances for mammals by biological activity constants]. *Reports of Academy of Sciences of the USSR*. 1979; 247(6): 1513–6. Russian.
22. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011; (7): 189–200.
23. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, et al. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*. 2007; (49): 355–64.
24. Snyder S, Pendergraph B. Detection and evaluation of chronic kidney disease. *Am Fam Physician*. 2005; 72(9): 1723–32.
25. Sunil KG, Mehran A, Tae-Hyoung K, et al. Effect of human amniotic fluid stem cells on kidney function in a model of chronic kidney disease. *Tissue Eng Part A*. 2019; 25(21-22): 1493–503.
26. Tareyeva IE. [Nephrology: a guide for physicians]. Moscow: Meditsina; 2000. 687 p. Russian.
27. Yurchenko TN, Kondakov II, Strona VI. Renal effects following introduction of cryopreserved placental extract on the background of experimental renal failure. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2014; 24(1): 75–8.

