

УДК 616.36-002+632.938+611.013+615.832.98
DOI <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-6-8>

Ф. В. Гладких^{1,2} <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

ОЦІНКА ВПЛИВУ КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА КРІОЕКСТРАКТІВ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН НА ПРОЯВИ ЦИТОЛІТИЧНОГО СИНДРОМУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АУТОІМУННОМУ ГЕПАТИТІ

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна
²Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

УДК 616.36-002+632.938+611.013+615.832.98

Ф. В. Гладких^{1,2}

ОЦІНКА ВПЛИВУ КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА КРІОЕКСТРАКТІВ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН НА ПРОЯВИ ЦИТОЛІТИЧНОГО СИНДРОМУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АУТОІМУННОМУ ГЕПАТИТІ

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

²Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

На тлі розвитку аутоімунного гепатиту (АІГ) у щурів відзначено формування цитолітичного синдрому, на що вказувало зростання активності АлАт на 66,7% ($p=0,015$) та зростання активності АсАт на 85,0% ($p<0,001$) стосовно показників інтактних тварин, що супроводжувався зростанням на 52,3% ($p=0,002$) активності γ -ГТП та зростанням ($p=0,01$) на 36,5% активності ЛФ. Застосування досліджуваних біологічних засобів призвело до виразного ослаблення ознак цитолітичного синдрому у щурів з АІГ. Найвиразніше рівень АлАт знизився на тлі застосування кріоекстракту плаценти (КЕП) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), а активність АсАт найвиразніше знизилась на тлі застосування КС-МСК. Найвиразніше зниження активності γ -ГТП відзначено на тлі введення КЕП та КС-МСК. Найвиразніше зниження активності ЛФ у щурів з АІГ відзначено на тлі введення КС-МСК.

Ключові слова: безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби, гепатит, цитоліз, імунітет, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин.

UDC 616.36-002+632.938+611.013+615.832.98

F. V. Hladkykh^{1,2}

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF CONDITIONED MEDIUM FROM MESENCHYMAL STEM CELLS AND CRYOEXTRACTS OF BIOLOGICAL TISSUES ON THE MANIFESTATIONS OF CYTOLYTIC SYNDROME IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE HEPATITIS

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

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

Background. Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic immune-mediated liver disease characterized by relapsing and remitting courses, which progresses to cirrhosis if left untreated. Our attention as an innovative approach to treating AIH patients was drawn to the use of domestic acellular cryopreserved biological agents (CBA) – cryoextracts of placenta (CEP), cryoextracts of spleen (CES), and conditioned medium of mesenchymal stem cells (MSC-CM).

Objective – to assess the impact of conditioned medium from mesenchymal stem cells and cryoextracts of biological tissues on the manifestations of cytolytic syndrome in experimental AIH in rats.

Methods. Experimental studies were conducted on 42 male rats weighing 200–220 g in compliance with the main bioethical principles of European Union Directive 2010/10/63 EU. AIH in rats was modeled by administering a hepatotropic antigenic mixture consisting of Freund's complete adjuvant and an antigen solution. On the 52nd day of the experiment, the animals were euthanized. The activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and gamma-glutamyltransferase (γ -GGT) was determined spectrophotometrically.

Results. The study showed that the development of AIH in rats was accompanied by the formation of a cytolytic syndrome, as evidenced by a statistically significant increase in ALT activity by 66.7% ($p=0.015$) and AST activity by 85.0% ($p<0.001$) in the peripheral blood serum compared to similar indicators in intact animals. It was also found that the development of AIH in rats was accompanied by a statistically significant ($p=0.002$) increase in γ -GGT activity by 52.3% and an increase ($p=0.01$) in ALP activity by 36.5%.

Conclusions. The use of the studied CBAs led to a significant reduction in the signs of cytolytic syndrome in rats with AIH. The most pronounced reduction in ALT levels was observed with the application of CEP and MSC-CM. AST activity was most significantly and statistically reliably ($p<0.001$) reduced with the application of MSC-CM. The most pronounced decrease in γ -GGT activity was noted with the administration of CEP and MSC-CM.

Key words: cell-free cryopreserved biologicals, hepatitis, cytolysis, immunity, mesenchymal stem cell conditioned medium.

© Ф. В. Гладких, 2024

Стаття поширюється на умовах ліцензії



Вступ. Аутоімунний гепатит (АІГ) – це хронічне імуноопосередковане захворювання печінки, що рецидивує та ремітує, яке прогресує до цирозу, якщо його не лікувати. У значної кількості пацієнтів може бути гострий гепатит або гостра печінкова недостатність, які часто помилково діагностуються як токсичне ураження печінки [1].

Глобальна щорічна захворюваність на АІГ становить 1,37 на 100 тис., а поширеність – 17,44 на 100 тис. [1]. АІГ трапляється в усіх вікових та етнічних групах, а його клінічні прояви різняться залежно від раси та етнічної приналежності. АІГ більш переважає серед дорослих жінок (71–95%) та дівчат (60–76%). Вікові піки зазвичай описані в 10–30 та 40–60 років, проте останніми роками майже повсюдно повідомлялося про пізніший пік маніфестації АІГ, в основному в Західній Європі та Північній Америці, у осіб старше 60 років [2].

Діагноз АІГ можна встановити за наявності характерних гістологічних змін, клінічних і лабораторних даних (підвищення активності аланінамінотрансферази (АлАт) та аспартатамінотрансферази (АсАт) та сироваткових ІgG), а також одного або кількох циркулюючих антитіл. Підвищення активності гамма-глутамілтрансферази (γ -ГТП) також можна спостерігати у разі АІГ. Високі рівні ІgG дуже характерні для АІГ, тоді як підвищені рівні ІgА та ІgМ вказують на інший діагноз. Повна біохімічна ремісія полягає в нормалізації активності трансаміназ і ІgG [2; 3].

Через складність патогенезу АІГ лікування спрямоване на кілька шляхів запалення. Однак, на відміну від інших аутоімунних захворювань, для яких було схвалено таргетне лікування, у розвитку парадигми лікування АІГ досягнуто незначного прогресу. Для покращення прогнозу АІГ та мінімізації несприятливих ефектів, пов'язаних із прийомом стероїдів, необхідно зосередитися на індивідуальних підходах до лікування без стероїдів [4].

В останнє десятиліття все більша увага дослідників прикута до розробки персоналізованих стратегій лікування хворих з використанням біотехнологічних препаратів. Особливого розвитку біотехнологічні препарати здобули у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. Тому нашу увагу у якості інноваційного підходу до лікування хворих на АІГ привернуло застосування вітчизняних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ) – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних клітин (КС-МСК) [5; 6; 7].

Мета – оцінити вплив кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин та кріоекстрактів біологічних тканин на прояви цитолітичного синдрому при експериментальному АІГ у щурів.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у відповідності до основних біоетичних принципів Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах та інших чинних вітчизняних та міжнародних нормативних актів. Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комісією з питань етики та біоетики медичного факультету Харківського національного університету

імені В.Н. Каразіна МОН України (протокол № 4/3 від 11.12.2024 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 [6]. Гепатотропну антигенну суміш вводили щурам внутрішньом'язово (в/м) по 2,0 мл 1 раз на тиждень впродовж 6 тижнів (на 1, 7, 14, 21, 28 та 35 дні експерименту) [6].

Досліджувані препарати починали вводити через 7 днів після останньої ін'єкції гепатотропної антигенної суміші [6]. БКБЗ вводили в/м з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій) відповідно на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту. В якості референс-препарату вибрано гепатопротектор силібор (*ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»», Україна*) – рослинний екстракт з насіння розторопші плямистої (*Silybum marianum*) [8]. Силібор вводили внутрішньошлунково (в/шл) на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в дозі 50 мг/кг [9].

Дослідження ефективності БКБЗ у разі АІГ проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г, рандомізованих на 6 груп:

I (негативний контроль) – інтактні щури (n=7), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl у дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

II – щури зі змодельованим АІГ (n=7) без лікування (контрольна група), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl у дозі 1,0 мл/кг;

III – щури зі змодельованим АІГ (n=7), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту внутрішньошлунково (в/шл) вводили референс-препарат силібор у дозі 50 мг/кг [9];

IV – щури зі змодельованим АІГ (n=7), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [10];

V – щури зі змодельованим АІГ (n=7), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [5; 10];

VI – щури зі змодельованим АІГ (n=7), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [10].

На 52-й день експерименту тварин виводили з експерименту. Зразки змішаної крові після декапітації тварин відбирали у центрифужні пробірки.

Активність аланінамінотрансферази (АлАт) визначали спектрофотометрично за методом S. Reitman та S. Frankel, який ґрунтується на тому, що внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією АлАТ, утворюються L-глутамінова та пірвіноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідрозонів 2-оксоглутарової та пірвіноградної кислот у лужному середовищі за довжини хвилі $\lambda = 530$ (500–560) нм [11].

Активність аспартатамінотрансферази (АсАт) визначали спектрофотометрично за методом S. Reitman та S. Frankel, який ґрунтується на тому, що внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аспарагіновою кислотою, яке відбувається під дією АсАТ, утворюються L-глутамінова та щавелевооцтова кислоти, що

декарбоксілюються до пірвіноградної кислоти. Розраховували коефіцієнт де Рітиса = АсАт / АлАт [11].

Активність γ-ГТП визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на тому, що під дією γ-ГТП глутаміновий залишок з гамма-L-(+)-глутаміл-4-нітроаналіда переходить на дипептидний акцептор – гліцилгліцин. При цьому вилучається хромоген-п-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину вимірюють за довжини хвилі $\lambda = 405$ (400–430) нм після гальмування ензиматичної реакції ацетатною кислотою [12].

Активність лужної фосфатази (ЛФ) визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на властивості ЛФ гідролізувати ефірний зв'язок у β-гліцерофосфаті з відщепленням фосфатної кислоти. Вміст фосфору, що утворився, визначають за реакцією з молібденовим реактивом у присутності аскорбінової кислоти. Інтенсивність забарвлення молібденового синього пропорційна кількості фосфору [13].

Статистична обробка даних. Статистичну обробку результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel». Оцінку характеру розподілу величин у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням критерію Шапіро-Вілка. У разі нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. У разі ненормального розподілу принаймні однієї з груп незалежних величин відмінності між

ними визначали попарно за непараметричним ранговим U-критерієм Манна-Уїтні (Mann-Whitney) [14].

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження показало, що розвиток АІГ у щурів супроводжувався формуванням цитолітичного синдрому, на що вказувало статистично вірогідне зростання рівня АлАт на 66,7% ($p=0,015$) та зростання рівня АсАт на 85,0% ($p<0,001$) у сироватці периферичної крові стосовно аналогічних показників інтактних тварин (табл. 1). Вказане диспропорційне зростання рівня амінотрансфераз у щурів з АІГ призвело до зниження значення коефіцієнта де Рітиса на 20,0% стосовно значень у здорових щурів (рис. 1).

Також встановлено, що розвиток АІГ у щурів супроводжувався статистично вірогідним ($p=0,002$) зростанням на 52,3% активності γ-ГТП (рис. 2) та зростанням ($p=0,01$) на 36,5% активності ЛФ (рис. 3). Як відомо, γ-ГТП є ферментом, зв'язаним із плазматичною мембраною, який бере участь у γ-глутаміновому циклі, подібно до метаболізму глутатіону (GSH). Цей фермент відіграє важливу роль у захисті клітин від окислювального стресу, тому його перевіряють як ключовий біомаркер для кількох захворювань, зокрема у разі пошкодження печінки [15]. Вказані зміни з боку амінотрансфераз, γ-ГТП та ЛФ вірогідно вказують на формування виразного цитолітичного синдрому у щурів на тлі розвитку АІГ.

Застосування референс-препарату силібору призвело до нівелювання ознак цитолітичного синдрому,

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на активність амінотрансфераз у сироватці крові щурів з АІГ на 52-й день експерименту, мкмоль / (мл × год), n=42

№ групи	Умови експерименту	n	Досліджуваний показник, статистичне представлення	
			АлАт, М ± m (95 % ДІ)	АсАт, Ме [LQ; UQ]
I	Інтактні щури	7	1,2 [0,8; 1,8]	1,6±0,13 (95 % ДІ: 1,4–1,9)
II	Контроль (АІГ без лікування)	7	2,0 [1,7; 2,2] $p_1=0,015$ [66,7%]	3,0±0,21 (95 % ДІ: 2,6–3,4) $p_1<0,001$ [85,0%]
III	АІГ + силібор	7	1,4 [1,2; 1,5] $p_2=0,002$ [30,0%]	2,0±0,18 (95 % ДІ: 1,6–2,3) $p_2=0,003$ [34,0%]
IV	АІГ + КЕП	7	1,3 [0,8; 1,8] $p_2=0,015$ [35,0%] $p_3=0,5$ [7,1%]	2,1±0,09 (95 % ДІ: 1,9–2,2) $p_2=0,002$ [31,3%] $p_3=0,7$ [4,3%]
V	АІГ + КЕС	7	1,5 [1,3; 1,7] $p_2=0,015$ [25,0%] $p_3=0,3$ [7,1%]	2,0±0,23 (95 % ДІ: 1,6–2,5) $p_2=0,01$ [31,6%] $p_3=0,8$ [3,6%]
VI	АІГ + КС-МСК	7	1,3 [1,2; 1,5] $p_2=0,003$ [35,0%] $p_3=0,4$ [7,1%]	1,5±0,13 (95 % ДІ: 1,3–1,8) $p_2<0,001$ [49,3%] $p_3=0,6$ [23,2%]

Примітки.

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

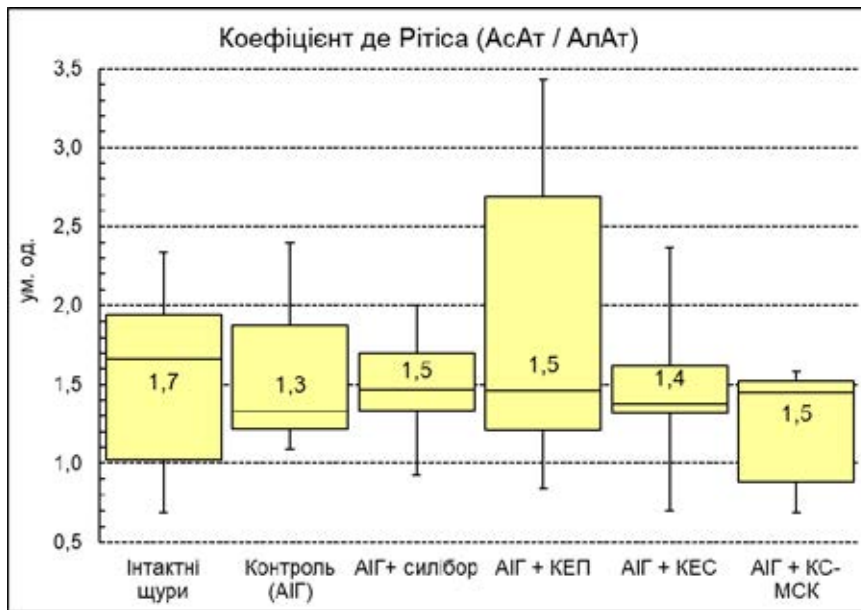


Рис. 1. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на значення коефіцієнта де Рітиса (АсАт / АлАт) у сироватці крові щурів з АІГ

Примітки.

1. Розподіл величин ненормальний.
2. Бокси включають результати від 25-го до 75-го перцентилю, вертикальні лінії за межами боксів – мінімальне та максимальне значення.
3. Горизонтальна лінія всередині боксу – медіана.

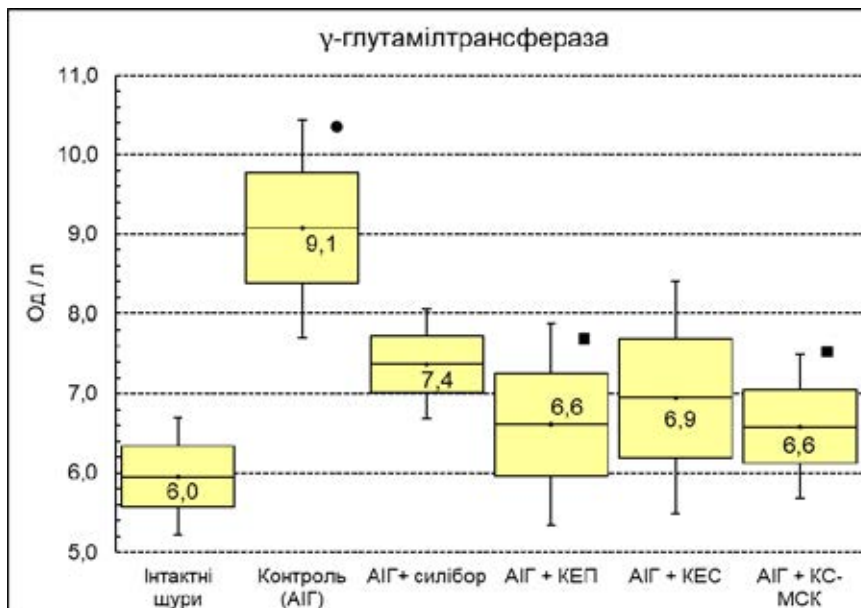


Рис. 2. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на активність γ-ГТП у сироватці крові щурів з АІГ

Примітки.

1. Розподіл величин кожної групи вибіркової сукупності нормальний.
2. Бокси включають значення стандартної похибки середнього арифметичного, вертикальні лінії за межами боксів – 95% довірчий інтервал.
3. Горизонтальна лінія всередині боксу – середнє арифметичне значення.
4. ● – $p < 0,05$ стосовно показників інтактних щурів;
5. ■ – $p < 0,05$ стосовно показників щурів з АІГ.

на що вказувало статистично вірогідне зниження рівня амінотранфераз (табл. 1) – рівень АлАт статистично вірогідно ($p=0,002$) знизився на 30,0% стосовно показників у щурів контрольної групи та становив 1,4 [1,2; 1,5] мкмоль / (мл × год), а рівень АсАт – статистично вірогідно ($p=0,003$) знизився на 34,0% стосовно показників у нелікованих щурів з АІГ та становив відповідно $2,0 \pm 0,18$ (92% ДІ: 1,6–2,3) мкмоль / (мл × год).

Встановлене зниження активності амінотранфераз на тлі застосування силібору у щурів з АІГ призвело до зростання значення коефіцієнта де Рітіса на 10,0% (рис. 1). Також встановлене статистично вірогідне ($p=0,02$) зниження активності ЛФ на 22,1% стосовно показників щурів контрольної групи на тлі застосування силібору у щурів з АІГ (рис. 3). Як відомо, тканинно-неспецифічна ЛФ є ключовим ферментом, що бере участь у дефосфорилуванні різних фізіологічних субстратів і виконує життєво важливі фізіологічні функції, включаючи позаскелетні функції, такі як розвиток нейронів, детоксикація ліпополісахариду, протизапальна роль, регуляція рН жовчі та підтримка гематоенцефалічного бар'єру [16; 17].

Застосування досліджуваних БКБЗ призвело до виразного ослаблення ознак цитолітичного синдрому у щурів з АІГ. Встановлено, що найвиразніше рівень АлАт знизився на тлі застосування КЕП та КС-МСК – активність вказаного ензиму знизилась відповідно на 35,0% ($p<0,05$) в обох випадках (табл. 1) стосовно показників щурів з АІГ без лікування.

Тоді як активність АсАт найвиразніше статистично вірогідно ($p<0,001$) знизилась на тлі застосування КС-МСК та становила відповідно $1,5 \pm 0,13$ (95% ДІ: 1,3–1,8) мкмоль/(мл × год), що на 23,2% ($p=0,6$) перевищувало здатність референс-препарату силібору знижувати аналогічний показник у щурів з АІГ.

Оцінка значення коефіцієнта де Рітіса показала, що найвиразнішу тенденцію до зростання цього показника відзначено на тлі застосування КЕП та КС-МСК (рис. 1).

Оцінка рівня γ -ГТП та ЛФ показала, що на тлі застосування БКБЗ у щурів з АІГ найвиразніше статистично вірогідне зниження активності γ -ГТП відзначено на тлі введення КЕП та КС-МСК – активність γ -ГТП знизилась відповідно на 27,1% ($p=0,024$) та на 27,4% ($p=0,012$) стосовно показників щурів контрольної групи (рис. 3). Найвиразніше зниження активності ЛФ у щурів з АІГ відзначено на тлі введення КС-МСК – вказаний показник статистично вірогідно ($p=0,009$) знизився на 27,9% стосовно показників нелікованих щурів з АІГ та становив $2,7 \pm 0,20$ (95% ДІ: 2,3–3,1) мкмоль/л (рис. 3).

Висновки. На тлі розвитку АІГ у щурів відзначено формування цитолітичного синдрому, на що вказувало статистично вірогідне зростання рівня АлАт на 66,7% ($p=0,015$) та зростання рівня АсАт на 85,0% ($p<0,001$) стосовно аналогічних показників інтактних тварин, що супроводжувався статистично вірогідним ($p=0,002$) зростанням на 52,3% активності γ -ГТП та зростанням ($p=0,01$) на 36,5% активності ЛФ.

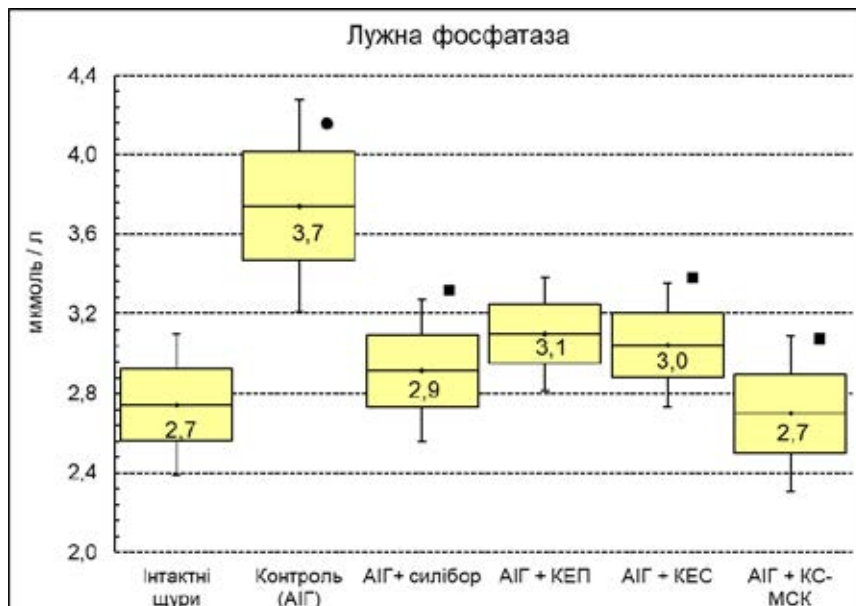


Рис. 3. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на активність ЛФ у сироватці крові щурів з АІГ

Примітки.

1. Розподіл величин кожної групи вибіркової сукупності нормальний.
2. Бокси включають значення стандартної похибки середнього арифметичного, вертикальні лінії за межами боксів – 95% довірчий інтервал.
3. Горизонтальна лінія всередині боксу – середнє арифметичне значення.
4. ● – $p < 0,05$ стосовно показників інтактних щурів;
5. ■ – $p < 0,05$ стосовно показників щурів з АІГ (контрольна група).

Застосування досліджуваних БКБЗ призвело до виразного ослаблення ознак цитолітичного синдрому у щурів з АІГ. Найвиразніше рівень АлАт знизився на тлі застосування КЕП та КС-МСК – активність вказаного ензиму знизилась відповідно на 35,0% ($p < 0,05$) в обох випадках, активність АсАт найвиразніше статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизилась на тлі застосування

КС-МСК. Найвиразніше зниження активності γ -ГТП відзначено на тлі введення КЕП та КС-МСК – активність знизилась відповідно на 27,1% ($p = 0,024$) та на 27,4% ($p = 0,012$) стосовно показників щурів контрольної групи. Найвиразніше зниження активності ЛФ у щурів з АІГ відзначено на тлі введення КС-МСК – на 27,9% ($p = 0,009$) стосовно показників у неліктованих щурів з АІГ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Sakhuja P, Goyal S. Autoimmune Hepatitis: From Evolution to Current Status-A Pathologist's Perspective. *Diagnostics (Basel)*. 2024; 14 (2): 210. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14020210>.
2. Mercado LA, Gil-Lopez F, Chirila RM, Harnois DM. Autoimmune Hepatitis: A Diagnostic and Therapeutic Overview. *Diagnostics (Basel)*. 2024; 14 (4): 382. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14040382>.
3. Hladkykh FV. Immune disorders in autoimmune hepatitis: the role of autoantibodies, T-reg cells, and novel therapeutic approaches. *Bukovinian Medical Bulletin*. 2024; 28 (3): 76–82. (In Ukrainian). <https://doi.org/10.24061/2413-0737.28.3.111.2024.13>.
4. Reau NS, Lammert CS, Weinberg EM. Autoimmune hepatitis: Current and future therapies. *Hepatol Commun*. 2024; 8 (6): e0458. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000458>.
5. Hladkykh FV, Chyzh MO. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a modern understanding of the mechanisms of damage to the digestive tract, the shortcomings of pathogenetic drugs and prospects for biological therapy of NSAID-induced esophago-gastroenterocolonopathy. *Gastroenterology (Ukraine)*. 2020; 54 (4): 253–266. <https://doi.org/10.22141/2308-2097.54.4.2020.216714>.
6. Kohda H, Sekiya C, Kanai M, Yoshida Y, Uede T, Kikuchi K, Namiki M. Flow cytometric and functional analysis of mononuclear cells infiltrating the liver in experimental autoimmune hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 1990; 82 (3): 473–478. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05474.x>.
7. Hladkykh FV, Koshurba MO, Chyzh MO. Characteristics of the antiulcerogenic activity of cryopreserved placenta extract in acute and chronic lesions of the stomach. *Modern Medical Technology*. 2023; 56 (1): 62–68. [https://doi.org/10.34287/MMT.1\(56\).2023.10](https://doi.org/10.34287/MMT.1(56).2023.10).
8. Avelar CR, Pereira EM, Farias Costa PR, Jesus RP, Oliveira LPM. Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*. 2017; 23 (27): 5004–5017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.5004>.
9. Shanayda MI, Oleshchuk OM, Lykhatskyi PG, Kernychna IZ. Study of the hepatoprotective activity of the liquid extract of garden thyme herb in carbon tetrachloride-induced hepatitis. *Pharmaceutical Journal*. 2017; 2: 91–97. (In Ukrainian). <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2017.2.7899>.
10. Hladkykh FV, Liadova TI. Analgesic potential of cryoextracts of biological tissues and conditioned medium from mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune arthritis. *Odesa Medical Journal*. 2024; 186 (1): 35–41. (In Ukrainian). <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-1-6>.
11. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. 1957; 28 (1): 56–63.
12. Szasz G. New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie*. 1974; 12 (5): 228–33.
13. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphate with five cubic millimeters of serum. *The Journal of Biological Chemistry*. 1946; 164: 321–329.
14. Zar JH. Biostatistical analysis. 5 ed. Prentice-Hall, Englewood. 2014. 960 p.
15. Zhang Y, Zhang Z, Wu M, Zhang R. Advances and Perspectives of Responsive Probes for Measuring γ -Glutamyl Transpeptidase. *ACS Meas Sci Au*. 2023; 4 (1): 54–75. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.3c00045>.
16. Hladkykh FV, Chyzh MO, Manchenko AO, Belochkina IV, Mikhailova IP. 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): 278–293. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-278-293>.
17. Sekaran S, Vimalraj S, Thangavelu L. The Physiological and Pathological Role of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase beyond Mineralization. *Biomolecules*. 2021; 11 (11): 1564. <https://doi.org/10.1021/10.3390/biom11111564>.

Надійшла до редакції 01.12.2024 р.

Прийнята до друку 30.01.2025 р.

Електронна адреса для листування fedir.hladkykh@gmail.com