

УДК 616.36-002+615.451.16+615.832.98+615.324
DOI <https://doi.org/10.32782/2306-2436.13.1.2024.318>

БІЛКОВОСИНТЕЗУЮЧА ФУНКЦІЯ ПЕЧІНКИ ЗА АУТОІМУННОГО ГЕПАТИТУ: ОЦІНКА ВПЛИВУ БЕЗКЛІТИННИХ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

ГЛАДКИХ Ф. В.^{1,2}

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

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

Для кореспонденції: Гладких Федір Володимирович, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com ; тел.: +38 (099) 782-78-72

THE PROTEIN-SYNTHESIZING FUNCTION OF THE LIVER IN AUTOIMMUNE HEPATITIS IS ASSESSED THROUGH THE IMPACT OF ACELLULAR CRYOPRESERVED BIOLOGICAL AGENTS IN EXPERIMENTAL STUDIES

For correspondence: Hladkykh Fedir Volodymyrovych, V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, 4 Svobody Square, Kharkiv, Ukraine, 61022; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com ; tel.: +38 (099) 782-78-72

Резюме. Актуальність теми дослідження. Синтез білків плазми крові є однією з найважливіших функцій печінки. До захворювань печінки, які викликають розлади її білковосинтезуючої функції, належить аутоімунний гепатит (АІГ). Нашу увагу як інноваційного біотехнологічного підходу до лікування хворих на АІГ привернуло застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ).

Мета роботи – охарактеризувати вплив кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), кріоекстракту плаценти (КЕП) та кріоекстракту селезінки (КЕС) на білковосинтезуючу функцію печінки при експериментальному АІГ у щурів.

Матеріали та методи дослідження. АІГ у щурів моделювали шляхом введення гепатотропної антигенної суміші, яка складалась з повного ад'юванта Фрейнда та розчину антигену, отриманого з гомогенату алогенної печінки. Дослідження ефективності БКБЗ за АІГ проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г, рандомізованих на 6 груп. На 52 день експерименту тварин виводили з експерименту. Вміст загального білка (ЗБ) та його фракцій (альбуміну та глобулінів) визначали спектрофотометричним методом за біуретовою реакцією.

Результати та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що на 52 день експерименту у щурів з АІГ відзначено порушення синтезу білка печінкою, на що вказувало статистично вірогідне ($p=0,03$) зниження рівня ЗБ в сироватці периферичної крові на 10,4% відносно показників інтактних тварин, що становило $60,0 \pm 1,7$ г/л відповідно. Дослідження показало, що рівень ЗБ у щурів з АІГ, яким вводили силімарин, зріс на 5,2% ($p=0,3$) відносно показників нелікованих тварин, що відбулось переважно за рахунок альбумінової фракції. Рівень альбумінів у щурів зазначеної групи статистично вірогідно ($p=0,015$) зріс на 27,8% відносно рівня ЗБ щурів контрольної групи. Дослідження впливу БКБЗ на стан білковосинтезуючої функції печінки тварин з експериментальним АІГ за їх введення на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту показало, що найвиразніше зростання рівня ЗБ в сироватці крові відзначено на тлі застосування КС-МСК: рівень ЗБ становив $72,1 \pm 1,6$ г/л. Найвиразніше зростання фракції глобулінів у пулі ЗБ на моделі АІГ у щурів відзначено на тлі застосування КЕС: рівень глобулінів зріс ($p=0,2$) на 19,6% відносно показників щурів контрольної групи, становлячи $27,6 \pm 4,4$ г/л відповідно.

Висновки. На тлі застосування КС-МСК рівень ЗБ статистично вірогідно ($p<0,001$) зріс на 20,2% відносно показників тварин групи контролю та становив $72,1 \pm 1,6$ г/л, що на 14,3% статистично вірогідно перевищувало ($p=0,01$) аналогічний показник тварин, яким вводили референс-препарат силібор. За здатністю відновлювати альбумін-глобулінове співвідношення у щурів з АІГ досліджувані БКБЗ можна розташувати у такій послідовності: КЕС (72,9%; $p=0,003$) > КС-МСК (51,7%; $p=0,005$) > КЕП (36,2%; $p=0,009$).

Ключові слова: аутоімунний гепатит, загальний білок, мезенхімальні стовбурові клітини, біологічна терапія, кріоконсервування.

Abstract. Introduction. Among the liver functions, protein synthesis is of utmost importance. Among the liver diseases that can disrupt its protein-synthesizing function, autoimmune hepatitis (AIH) has garnered our attention. As an innovative biotechnological approach to the treatment of AIH, we focused on the use of acellular cryopreserved biological agents (CBAs).

The aim of the study is to characterize the impact of conditioned medium from mesenchymal stem cells (MSC-CM), cryoextracts of placenta (CEP), and cryoextracts of spleen (CES) on the protein-synthesizing function of the liver in experimental AIH in rats.

Materials and methods. AIH in rats was modeled by administering a hepatotropic antigenic mixture consisting of Freund's complete adjuvant and an antigen solution obtained from a homogenate of allogeneic liver. The effectiveness of CBAs in AIH was studied on 42 male rats weighing 200–220 g, randomized into 6 groups. On day 52 of the experiment, the animals were euthanized. The total protein (TP) content and its fractions (albumins and globulins) were determined by the spectrophotometric biuret reaction.

Research results and their discussion. The study showed that on day 52 of the experiment, rats with AIH had impaired liver protein synthesis, evidenced by a statistically significant ($p=0.03$) decrease in TP levels in the peripheral blood serum by 10.4% compared to intact animals, which was 60.0 ± 1.7 g/L. The study showed that TP levels in AIH rats treated with silymarin increased by 5.2% ($p=0.3$) compared to untreated animals, mostly due to the albumin fraction. The albumin level in this group of rats increased statistically significantly ($p=0.015$) by 27.8% compared to the control group. The effects of CBAs on the liver's protein-synthesizing function in rats with experimental AIH, following their intramuscular injection on days 42, 44, 46, 48, and 50, showed that the most noticeable increase in TP levels in blood serum occurred with the use of MSC-CM – the TP level was 72.1 ± 1.6 g/L. The most significant increase in the globulin fraction in the total TP pool in AIH rats was observed with the use of CES, with a 19.6% increase ($p=0.2$) compared to the control group, reaching 27.6 ± 4.4 g/L.

Conclusions. The use of MSC-CM resulted in a statistically significant ($p<0.001$) increase in TP levels by 20.2% compared to the control group, reaching 72.1 ± 1.6 g/L, which was 14.3% significantly higher ($p=0.01$) than in the silymarin-treated group. By the ability to restore the albumin-globulin ratio in rats with AIH can be ranked in the following order for the studied CBAs: CES (72.9%; $p=0.003$) > MSC-CM (51.7%; $p=0.005$) > CEP (36.2%; $p=0.009$).

Key words: autoimmune hepatitis, total protein, mesenchymal stem cells, biological therapy, cryopreservation.

Вступ

Печінка є одним з найбільших органів тіла та виконує численні важливі функції, пов'язані з травленням, метаболізмом, синтезом білка та детоксикацією ксенобіотиків [1]. Синтез білків плазми крові – альбумінів, глобулінів та фібриногену, є однією з найважливіших функцій печінки [2].

Відомо, що **альбумін** синтезується виключно гепатоцитами зі швидкістю приблизно 150 мг/кг/день, тобто в організмі людини вагою 70 кг щодоби синтезується приблизно 10,5 г [3]. Після синтезу в печінці альбумін вивільняється в позаклітинний простір шляхом екзоцитозу. Близько 40% альбумінів є внутрішньосудинним, а 60% розподіляються в інтерстиціальних просторах органів, переважно в м'язах, жировій і сполучній тканині та шкірі [4]. Швидкість синтезу залежить від потреб організму та змін колоїдно-осмотичного тиску, а також від осмолярності екстраваскулярного простору печінки. Низька концентрація альбуміну в плазмі має прогностичне значення за печінкової недостатності [5].

Сироватковий альбумін є найпоширенішим білком плазми крові та відіграє ключову роль у зв'язуванні ліків з білками крові [5]. Роль альбуміну у підтримці онкотичного тиску плазми та регуляції розподілу рідини між судинними компартментами історично затьмарювала його інші важливі функції. Вони включають зв'язування та транспортування різноманітного масиву ендогенних молекул та екзогенних ліків у поєднанні з його антиоксидантними та протизапальними властивостями [6]. Останнім часом дослідження альбуміну актуалізувались у зв'язку з характеристикою його плейотропних ефектів та концепцією «ефективної концентрації альбуміну». У пацієнтів з цирозом печінки спостерігаються посттрансляційні модифікації альбуміну, що порушує його функцію. Доведено, що ці модифіковані форми альбуміну мають прогностичну цінність, і їх оцінка може змінити парадигму лікування альбуміном [3].

Глобуліни, як відомо, є комбінацією білків, до складу яких входять імуноглобуліни як основний компонент [7; 8]. Висока концентрація глобулінів може відображати збільшення їх вироблення та/або посилення активності гуморального імунітету, що спостерігається у випадках лейкемії, множинної мієломи, аутоімунних захворювань печінки, а також системних аутоімунних та хронічних запальних захворювань [9].

Фракція глобулінів складається з фракцій альфа-1, альфа-2, бета-1, бета-2 та гамма-глобулінів (рис. 1) і, як білки всередині альфа- і бета-фракцій, може виступати як білок гострої фази. Високий рівень цих речовин потенційно здатний маскувати низький рівень гамма-глобуліну (антитіл) [9]. Збільшення фракції глобулінів як компонента загального білка сироватки крові пов'язане з хронічними запальними станами, і це найкраще продемонстровано в сироватці крові пацієнтів з аутоімунним гепатитом [7].

Фібриноген синтезується в печінці зі швидкістю близько 2 г на добу у здорових людей [2]. Зазначений білок є важливим для коагуляції, де він ферментативно перетворюється на фібрин у відповідь на пошкодження тканин або судин. Концентрація фібриногену в сироватці крові часто знижується за печінкової недостатності, але портальна гіпертензія, ймовірно, краще відображає ризик кровотечі, ніж концентрація фібриногену в сироватці [8].

За даними *J.R. Carvalho та співавторів (2022 р.)* [3], альбумін, як терапевтичний засіб, зменшує ризик постпарacenteзної серцево-судинної дисфункції та смертності, пов'язаної зі спонтанною бактеріальною інфекцією, а також потроєє відповідь на терліпресин (найбільш помітним ефектом якого є зниження кровообігу в паренхімі внутрішніх органів, внаслідок чого знижуються печінковий кровотік і тиск у системі ворітної вени) у пацієнтів з гепаторенальним синдромом.

M. Amouzandeh та співавтори (2023 р.) [2] встановили, що аутоімунна запальна етіологія хронічних

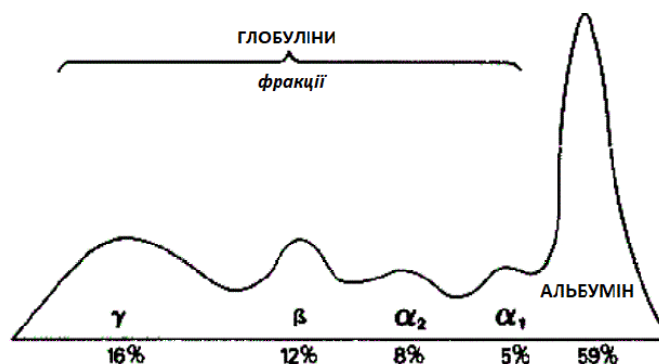


Рис. 1. Фракції білків плазми крові (адаптовано за [10])

захворювань печінки пов'язана з вищим синтезом фібриногену. Швидкість синтезу альбуміну та фібриногену *de novo* за прогресуючої хронічної печінкової недостатності негативно корелювала з прогностичними показниками захворювання печінки. Швидкість синтезу альбуміну була низькою і пов'язана як з печінковою недостатністю, так і з аутоімунним запаленням, тоді як синтез фібриногену часто був нормальним і позитивно корелював з хронічним запаленням. Це відрізняється від гострих запальних станів, за яких інтенсивність синтезу альбуміну та фібриногену є підвищеною.

Серед захворювань печінки, які викликають розлади її білковосинтезуючої функції, нашу увагу привернув аутоімунний гепатит (АІГ) [11]. Останньою розробкою в лікуванні хворих на АІГ було включення в терапевтичну парадигму кортикостероїду будесоніду, що пов'язано з меншою кількістю специфічних для стероїдів побічних ефектів, ніж інші кортикостероїди, що пояснюється його 90% ефектом першого проходження через печінку [12; 13].

Нашу увагу як інноваційного біотехнологічного підходу до лікування хворих на АІГ привернуло застосування безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (БКБЗ) [14] – кріоекстракту плаценти (КЕП), кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), які за результатами попередніх досліджень володіють імуномодельними властивостями за аутоімунних захворювань печінки в експерименті [11; 15; 16].

Мета – охарактеризувати вплив безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів (кондиціонованого середовища МСК, кріоекстракту плаценти та кріоекстракту селезінки) на білковосинтезуючу функцію печінки за експериментального аутоімунного гепатиту у щурів.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження проведені відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986 р.), Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту і Ради Європейського Союзу «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою» (м. Брюссель, 2010 р.),

Наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» від 1 березня 2012 р. № 249, Наказу Міністерства охорони здоров'я України «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» від 14 грудня 2009 р. № 944, Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (м. Київ, 2001 р.) [17; 18].

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 [19; 20].

Гомогенат тканини печінки готували з дотриманням правил асептики за стандартною методикою підготовки тканинних антигенів [21]. Фрагменти печінки подрібнювали ножицями та відмивали від крові у холодному 0,9% розчині NaCl, після чого розтирали у ступці з кварцевим піском. Гомогенну масу переносили у колбу, розчиняли ізотонічним розчином у співвідношенні 1:2, перемішували пропусканням триразово через шприц та відстоювали за -4°C близько 20 годин. Надосадну рідину центрифугували протягом 30 хвилин за 3000 об./хв за -4°C. В надосадній рідині визначали вміст білка та доводили його концентрацію до 80 мг на 1 мл гомогенату. Стандартизований за вмістом білка гомогенат печінки змішували з ПАФ у співвідношенні 1:1 та «переганяли» з шприца в шприц через перехідник до загуснення, щоб крапля отриманої емульсії не руйнувалась у воді протягом 30 хвилин [22].

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) [19].

Досліджувані препарати починали вводити через 7 днів після останньої ін'єкції гепатотропної антигенної суміші [19]. БКБЗ вводили в/м з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту відповідно. Як референс-препарат вибрано гепатопротектор силібор – рослинний екстракт з насіння розторопші плямистої (*Silybum marianum*) [23; 24]. Силібор вводили внутрішньошлунково (в/шл) на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в дозі 50 мг/кг [25; 26].

Дослідження ефективності БКБЗ за АІГ проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г, рандомізованих на 6 груп.

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

2. 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 в дозі 1,0 мл/кг.

3. III – щури зі змодельованим АІГ (n=7), яким на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту внутрішньошлунково (в/шл) вводили референс-препарат силібор в дозі 50 мг/кг [26].

4. 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 [27].

5. 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 [28].

6. 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 [29, 30].

На 52 день експерименту тварин виводили з експерименту. Матеріалом дослідження виступала кров [31]. Зразки змішаної крові після декапітації тварин відбирали у центрифужні пробірки. Сироватку відділяли центрифугуванням впродовж 15 хв за 3000 об/хв.

Вміст загального білка (ЗБ) та його фракцій (альбуміну та глобулінів) визначали спектрофотометричним методом за біуретовою реакцією, яка полягає в тому, що в лужному середовищі йони двохвалентного купруму (CuSO_4) взаємодіють з білками з утворенням комплексу фіолетового кольору та відновленням фосфомолібденової кислоти тирозином та триптофаном (реакція Лоурі). Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за світлопоглинанням за довжини хвилі $\lambda = 546$ нм. Кількісне співвідношення білкових фракцій плазми

крові визначали нефелометричним методом з використанням фосфатних буферів, який ґрунтується на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують альбуміни і глобуліни з утворенням суспензії, ступінь каламутності якої визначали за світлопоглинанням за довжини хвилі $\lambda = 625$ (590–700) нм [32; 33].

Статистичну обробку одержаних 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 W-критерію Шапіро-Вілکا. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. За нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді “ $M \pm m$ ” ($M \pm SE$), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ:), де 95% ДІ: – 95 % довірчий інтервал. Для графічного представлення даних вибрано діаграми розмаху (box-and-whiskers diagram – «шухлядові» діаграми з «вусами») [34].

Результати та обговорення

Проведене дослідження показало, що на 52 день експерименту у щурів з АІГ відзначено порушення синтезу білка печінкою, на що вказувало статистично вірогідне ($p=0,03$) зниження рівня ЗБ в сироватці периферичної крові на 10,4% відносно показників інтактних тварин, що становило $60,0 \pm 1,7$ г/л відповідно (табл. 1). Зниження рівня ЗБ відбулося здебільшого за рахунок фракції альбуміну: його вміст статистично вірогідно ($p<0,001$) знизився на 30,0% відносно показників інтактних щурів. Рівень альбуміну у щурів з АІГ становив $25,7 \pm 1,6$ г/л відповідно (табл. 1).

Водночас рівень глобулінів знизився ($p=0,1$) лише на 13,2% відносно аналогічного показника у інтактних тварин та становив $34,3 \pm 1,5$ г/л. Встановлене непро-

Таблиця 1. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на показники білкового гомеостазу в сироватці крові щурів з АІГ на 52 день експерименту, г/л ($M \pm m$ (95% ДІ), n=42)

Досліджуваний показник, одиниці вимірювання	Умови експерименту					
	I (1) група	II (2) група	III (3) група	IV (4) група	V (5) група	VI (6) група
	Інтактні щури	Контроль (АІГ без лікування)	АІГ + силібор	АІГ + КЕП	АІГ + КЕС	АІГ + КС-МСК
n	7	7	7	7	7	7
Загальний білок, г/л	$67,0 \pm 2,2$ (95% ДІ: 62,7–71,3)	$60,0 \pm 1,7$ (95% ДІ: 56,7–63,6), $p_1=0,03$ [10,4%]	$63,1 \pm 2,7$ (95% ДІ: 56,7–68,4), $p_2=0,3$ [5,2%]	$65,1 \pm 2,6$ (95% ДІ: 60,1–70,2), $p_2=0,1$ [8,6%], $p_3=0,6$ [3,2%]	$61,0 \pm 5,5$ (95% ДІ: 50,1–71,9), $p_2=0,9$ [1,7%], $p_3=0,7$ [13,4%]	$72,1 \pm 1,6$ (95% ДІ: 68,9–75,4), $p_2<0,001$ [20,2%], $p_3=0,01$ [14,3%]
Альбуміни, г/л	$36,7 \pm 1,7$ (95% ДІ: 33,4–40,1)	$25,7 \pm 1,6$ (95% ДІ: 22,6–28,8), $p_1<0,001$ [30,0%]	$32,9 \pm 2,0$ (95% ДІ: 29,0–36,7), $p_2=0,015$ [27,8%]	$33,1 \pm 1,8$ (95% ДІ: 29,7–36,6), $p_2=0,009$ [28,9%], $p_3=0,9$ [0,9%]	$33,4 \pm 1,7$ (95% ДІ: 30,1–36,7), $p_2=0,006$ [30,0%], $p_3=0,8$ [1,7%]	$38,3 \pm 1,2$ (95% ДІ: 35,7–40,7), $p_2<0,001$ [48,9%], $p_3=0,037$ [16,5%]
Глобуліни, г/л	$30,3 \pm 1,8$ (95% ДІ: 26,8–33,8)	$34,3 \pm 1,5$ (95% ДІ: 31,4–37,2), $p_1=0,1$ [13,2%]	$30,3 \pm 1,0$ (95% ДІ: 28,3–32,2), $p_2=0,045$ [11,7%]	$32,0 \pm 1,3$ (95% ДІ: 29,5–34,5), $p_2=0,1$ [6,7%], $p_3=0,3$ [5,7%]	$27,6 \pm 4,4$ (95% ДІ: 19,0–36,1), $p_2=0,2$ [19,6%], $p_3=0,5$ [9,0%]	$33,9 \pm 1,8$ (95% ДІ: 30,3–37,4), $p_2=0,9$ [1,3%], $p_3=0,1$ [11,8%]

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

порційне зниження за окремими фракціями ЗБ призвело до статистично вірогідного ($p=0,003$) зниження альбумін-глобулінового (А/Г) співвідношення на 38,5% відносно показників інтактних щурів, що становило $0,8 \pm 0,07$ ум. од. (рис. 2).

Внутрішньошлункове введення щурам з АІГ на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту референс-препарату силібору в дозі 50 мг/кг привело до відновлення рівня ЗБ в сироватці периферичної крові, що вказувало на нівелювання порушень білковосинтезуючої функції печінки за її експериментального аутоімунного ураження. Дослідження показало, що рівень ЗБ у щурів з АІГ, яким вводили силімарин, зріс на 5,2% ($p=0,3$) відносно показників нелікованих тварин, що відбулось переважно за рахунок альбумінової фракції. Рівень альбумінів у щурів зазначеної групи статистично вірогідно ($p=0,015$) зріс на 27,8% відносно рівня у щурів контрольної групи (табл. 1). Рівень глобулінів у щурів з АІГ на тлі введення силімарину статистично вірогідно ($p=0,045$) зріс на 11,7% відносно показників щурів контрольної групи, що становило $30,3 \pm 1,5$ г/л відповідно.

Оцінка зміни А/Г-співвідношення показало, що введення референс-препарату силімарину щурам з АІГ привело до статистично вірогідного зростання ($p=0,003$) зазначеного показника на 41,9% відносно значення аналогічного показника у щурів контрольної групи (рис. 2).

Здатність силібору відновлювати білковосинтезуючу функцію печінки на тлі АІГ у щурів узгоджується з літературними даними [35; 36] щодо гепатопротекторних властивостей зазначеного препарату.

Дослідження впливу БКБЗ на стан білковосинтезуючої функції печінки тварин з експериментальним АІГ за їх введення на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту

показала, що найвиразніше зростання рівня ЗБ в сироватці крові відзначено на тлі застосування КС-МСК: рівень ЗБ статистично вірогідно ($p<0,001$) зріс на 20,2% відносно показників тварин групи контролю та становив $72,1 \pm 1,6$ г/л, що на 14,3% статистично вірогідно перевищувало ($p=0,01$) аналогічний показник тварин, яким вводили референс-препарат силібор (табл. 1). На тлі введення досліджуваних кріоекстрактів рівень ЗБ у щурів з АІГ показав менш виразне зростання. Так, на тлі введення КЕП рівень ЗБ зріс ($p=0,1$) на 8,6%, а на тлі введення КЕС зріс ($p=0,9$) на 1,7% відносно показників щурів групи контролю та становив $65,1 \pm 2,6$ г/л та $61,0 \pm 5,5$ г/л відповідно (табл. 1).

Оцінка зміни рівня ЗБ за його фракціями показала, що на тлі введення КС-МСК рівень зазначеного показника на 48,9% ($p<0,001$) зріс за рахунок альбумінової фракції, тоді як рівень глобулінів на тлі введення зазначеного БКБЗ мав найменшу тенденцію до зростання: рівень глобулінів на тлі введення КС-МСК зріс ($p=0,9$) лише на 1,3% (табл. 1).

Найвиразніше зростання фракції глобулінів у сумарному пулі ЗБ на моделі АІГ у щурів відзначено на тлі застосування КЕС: рівень глобулінів зріс ($p=0,2$) на 19,6% відносно показників щурів контрольної групи та становив $27,6 \pm 4,4$ г/л відповідно.

Диспропорційне зростання рівня фракцій ЗБ на тлі введення досліджуваних БКБЗ у щурів з АІГ привело до статистично вірогідного зростання значення А/Г-співвідношення. Найвиразніше А/Г-співвідношення зросло ($p=0,003$) на тлі введення КЕС та становило $1,3 \pm 0,13$ ум. од. (рис. 2).

Отримані результати оцінки зміни А/Г-співвідношення на тлі застосування БКБЗ можна

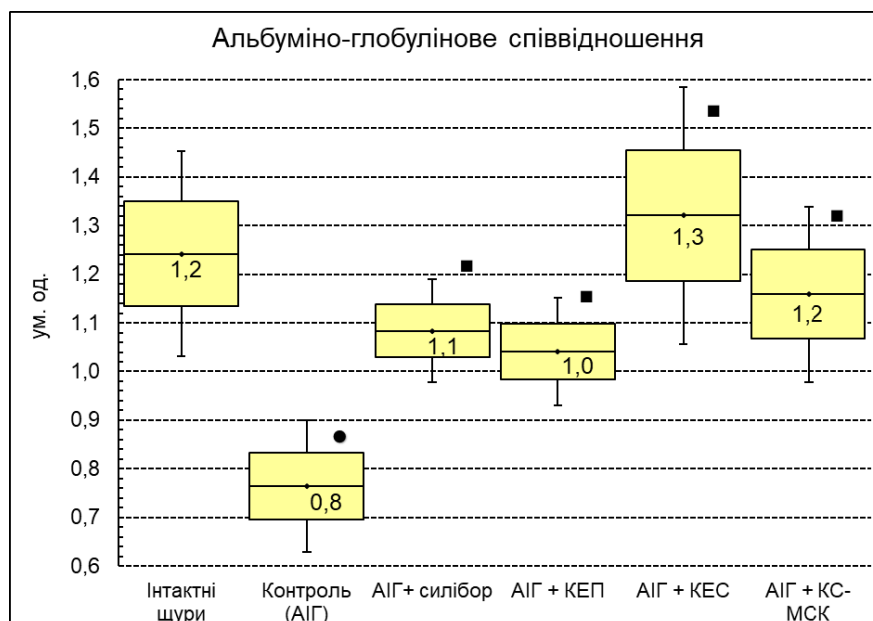


Рис. 2. Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на значення альбумін-глобулінового співвідношення у крові щурів з АІГ

Примітки: розподіл величин кожної групи вибіркової сукупності нормальний; бокси включають значення стандартної похибки середнього арифметичного, вертикальні лінії за межами боксів – 95% довірчий інтервал; горизонтальна лінія всередині боксу – середнє арифметичне значення; ● – $p<0,05$ відносно показників інтактних щурів; ■ – $p<0,05$ відносно показників щурів з АІГ (контрольна група).

розцінювати як показник ефективності відновлення білковосинтезуючої функції печінки у щурів з АІГ, що узгоджується з даними літератури, що А/Г-співвідношення, яке враховує як альбумін, так і глобулін, є зручним серологічним індикатором для ідентифікації цілої низки аномалій сироваткового білка [37; 38].

Висновки

Проведене дослідження дає змогу дійти таких висновків.

1. У щурів з АІГ відзначено порушення синтезу білка печінкою, на що вказувало статистично вірогідне ($p=0,03$) зниження рівня ЗБ в сироватці крові на 10,4%, зниження рівня альбуміну ($p<0,001$) на 30,0% та зниження ($p=0,1$) рівня глобулінів на 13,2% відносно показників у інтактних тварин. Встановлене непропорційне зниження за окремими фракціями ЗБ привело до статистично вірогідного ($p=0,003$) зниження А/Г-співвідношення на 38,5% відносно показників інтактних щурів.

2. На тлі застосування КС-МСК рівень ЗБ статистично вірогідно ($p<0,001$) зріс на 20,2% відносно показників тварин групи контролю та становив $72,1\pm 1,6$ г/л, що на 14,3% статистично вірогідно перевищувало ($p=0,01$) аналогічний показник тварин, яким вводили референс-препарат силібор.

3. За здатністю відновлювати рівень А/Г-співвідношення у щурів з АІГ досліджувані БКБЗ можна розташувати у такій послідовності: КЕС (72,9%; $p=0,003$) > КС-МСК (51,7%; $p=0,005$) > КЕП (36,2%; $p=0,009$).

Конфлікт інтересів. Автор рукопису свідомо засвідчує відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чий продукт, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Інформація про фінансування. Робота не отримувала фінансування видатками Державного бюджету України. Автор гарантує, що він не отримував жодних винагород у будь-якій формі, здатних вплинути на результати роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликаний бактеріями, вірусами, вірусно-бактеріальними асоціаціями за гострого, затяжного та хронічного перебігу хвороби та удосконалення тактики лікування» (номер державної реєстрації 0123U105022, термін виконання: 2023–2028 рр., керівник – завідувача кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, к мед. н., доцент Волобуєва О.В.).

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів. Додаткового фінансування не було.

Список літератури

1. Trefis E., Gannon M., Wasserman D. H. *The liver. Current Biology*. 2017. Vol. 27. № 21. P. R1147–R1151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.
2. Amouzandeh M., Sundström A., Wahlin S., Wernerman J., Rooyackers O., Norberg Å. *Albumin and fibrinogen synthesis rates in advanced chronic liver disease. American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2023. Vol. 325. № 5. P. G391–G397. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00072.2023>.
3. Carvalho J.R., Verdelho Machado M. *New Insights About Albumin and Liver Disease. Annals of Hepatology*. 2018. Vol. 17. № 4. P. 547–560. DOI: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.0916>.
4. Levitt D.G., Levitt M.D. *Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. International Journal of General Medicine*. 2016. Vol. 9. P. 229–255. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJGM.S102819>.
5. Rutherford S.H., Hutchison C.D.M., Greetham G.M., Parker A.W., Nordon A., Baker M.J., Hunt N.T. *Optical Screening and Classification of Drug Binding to Proteins in Human Blood Serum. Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 95, № 46. P. 17037–17045. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03713>.
6. Ward E.S., Gelinas D., Dreesen E., Van Santbergen J., Andersen J.T., Silvestri N.J., Kiss J.E., Sleep D., Rader D.J., Kastelein J.J.P., Louagie E., Vidarsson G., Spriet I. *Clinical Significance of Serum Albumin and Implications of FcRn Inhibitor Treatment in IgG-Mediated Autoimmune Disorders. Frontiers in Immunology*. 2022. Vol. 13. Article 892534. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.892534>.
7. Hashash J.G., Koutroumpakis F., Anderson A. M., Rivers C.R., Hosni M., Koutroubakis I.E., Ahsan M., Gkiaouraki E., Dunn M. A., Schwartz M., Barrie A., Babichenko D., Tang G., Binion D.G. *Elevated serum globulin fraction as a biomarker of multiyear disease severity in inflammatory bowel disease. Annals of Gastroenterology*. 2022. Vol. 35, № 6. P. 609–617. DOI: <https://doi.org/10.20524/aog.2022.0748>.
8. Lisman T., Porte R.J. *Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. Blood*. 2010. Vol. 116, № 6. P. 878–885. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-261891>.
9. Jolles S., Borrell R., Zouwail S., Heaps A., Sharp H., Moody M., Selwood C., Williams P., Phillips C., Hood K., Holding S., El Shanawany T. *Calculated globulin (CG) as a screening test for antibody deficiency. Clinical and Experimental Immunology*. 2014. Vol. 177. № 3. P. 671–678. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.12369>.
10. Potter B.J. *Liver-Plasma Protein Synthesis. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. New York*, 2014.
11. Гладких Ф.В. Імунні порушення при аутоімунному гепатиті: роль аутоантитіл, T-reg клітин та новітні терапевтичні підходи. *Буковинський медичний вісник*. 2024. Т. 28. № 3. С. 76–82. DOI: <https://doi.org/10.24061/2413-0737.28.3.111.2024.13>.
12. Reau N.S., Lammert C.S., Weinberg E.M. *Autoimmune hepatitis: Current and future therapies. Hepatology Communications*. 2024. Vol. 8. № 6. Article e0458. DOI: <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000458>.
13. European Association for the Study of the Liver. *EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. Journal of Hepatology*. 2015. Vol. 63. № 4. P. 971–1004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.030>.

14. Чиж М.О., Гальченко С.Є., Гладких Ф.В., Бизов В.В., Рогоза Л.А., Белочкіна І.В., Слета І.В. Безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби: технологія отримання та визначення складу: монографія. Вінниця: Твори; 2024. 264 с. DOI: <https://doi.org/10.46879/2024.1>.

15. Гладких Ф.В., Лядова Т.І. Характеристика гепатотропної активності безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів на моделі аутоімунного гепатиту. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: Медицина. 2024. Т. 32. № 3. С. 275–289. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-01>.

16. Гладких Ф.В. Стан енергетичного обміну гепатотропів при експериментальному аутоімунному гепатиті на тлі застосування кріоекстрактів плаценти та селезінки, а також кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин. Health & Education. 2024. Т. 3. С. 12–21. DOI: <https://doi.org/10.32782/health-2024.3.2>.

17. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV. Відомості Верховної Ради України. 2006. № 27. С. 230 (зі змінами). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>.

18. Резніков О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах в Першому національному конгресі з біоетики. Ендокринологія. 2008. Т. 8. № 1. С. 142–145.

19. 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. Vol. 82. № 3. P. 473–478. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05474.x>.

20. Гладких Ф.В. Ад'ювант Фрейнда – класика вакцинальних ад'ювантів та основа експериментальної імунології. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Медицина. 2024. Т. 32. № 3 (50). С. 414–439. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-10>.

21. Stils H.F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. Institute for Laboratory Animal Research Journal. 2005. Vol. 46. № 3. P. 280–293. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>.

22. Ганчо О.В. Вплив комплексів пептидів тваринного походження на імунітет за умов норми та різних функціональних станів організму: дис. ... к. біол. н.: спец. 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. Полтава, 2002. 170 с. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0403U003416>.

23. Чекман І.С., Поготова Г.А., Небесна Т.Ю. та ін. Квантово-фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей силімарину. Український біофармацевтичний журнал. 2014. № 2. С. 24–28.

24. Avelar C.R., Pereira E.M., Farias Costa P.R., Jesus R.P., Oliveira L.P.M. Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. World Journal of Gastroenterology. 2017. Vol. 23. № 27. P. 5004–5017. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.5004>.

25. Шанайда М.І., Олещук О.М., Лихацький П.Г., Кернична І.З. Дослідження гепатопротекторної активності рідкого екстракту трави Чаберу садового при тетрахлорметановому гепатиті. Фармацевтичний часопис. 2017. № 2. С. 91–97. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2017.2.7899>.

26. Кошурба І.В. Дослідження впливу кріоекстракту плаценти на процеси цитолізу та перекисного окислення ліпідів за CCl₄-індукованого ураження печінки. Сучасні

медичні технології. 2022. Т. 54. № 3. С. 46–54. DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.3\(54\).2022.9](https://doi.org/10.34287/MMT.3(54).2022.9).

27. Шенітко В.І. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої печінки та вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів: дис. ... д. мед. н.: спец. 14.01.35 – Кріомедицина. Харків, 2004. 326 с. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610>.

28. Беспалова І.Г. Пептидний склад та біологічна дія екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят: дис. ... к. біол. н.: спец. 03.00.19 – Кріобіологія. Харків, 2016. 162 с. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539>.

29. Голубінська П.А., Саричева М.В., Должиков А.А., Бондарев В.П., Стефанова М.С., Солдатов В.О., Надєждін С.В., Корокін М.В. та ін. Застосування секретому мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин при лікуванні ад'ювантного артриту та контактної алергічного дерматиту в моделях на тваринах. Pharmacy & Pharmacology. 2020. № 8 (6). С. 416–425. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>.

30. Глоба В.Ю. Використання кріоконсервованих клітинних культур та нейротрофічних факторів при експериментальному інфравезикальному обструктивному синдромі: дис. ... спец. 222 – Медицина. Харків, 2021. 156 с. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913>.

31. Стефанов О.В. (ред.) Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена, 2001. 527 с.

32. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. МЕДпресс-информ, 2009. 896 с.

33. Lowry O.H., Rosenbroun N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

34. Zar J.H. Biostatistical analysis. 5th ed. Englewood: Prentice-Hall, 2014. 960 p.

35. Manuc T., Preda C. M., Istratescu D., Gheorghe L., Cerban R., Ester C., Stroe T.G., Alecu R.I., Ciuciureanu C.M., Marin A.I., Tigui L., Tieranu C., Andrei S.L., Diclescu M., Manuc M. Silymarin. Versus Essential Phospholipids in Metabolic Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) – A Prospective Comparative Randomized Trial. Maedica (Bucur). 2024. Vol. 19, № 1. P. 9–16. DOI: <https://doi.org/10.26574/maedica.2024.19.1.9>.

36. Wadhwa K., Pahwa R., Kumar M., Kumar S., Sharma P.C., Singh G., Verma R., Mittal V., Singh I., Kaushik D., Jeandet P. Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin. Molecules. 2022. № 27 (16). P. 5327. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>.

37. Chen Z., Song C., Yao Z., Sun J., Liu W. Associations between albumin, globulin, albumin to globulin ratio and muscle mass in adults: results from the national health and nutrition examination survey 2011–2014. BMC Geriatrics. 2022. Vol. 22. № 1. P. 383. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12877-022-03094-4>.

38. Shang G., Fei Z., Xu H., Wang Y., Xiang S. Globulin and albumin to globulin ratio precisely diagnose periprosthetic joint infection and determine the timing of second-stage reimplantation. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2022. Vol. 17. № 1. P. 12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02899-0>.

References (NLM)

1. Trefts E., Gannon M., Wasserman D.H. The liver. Curr Biol. 2017 Nov 6; 27 (21): R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>. PMID: 29112863; PMCID: PMC5897118.

2. Amouzandeh M., Sundström A., Wahlin S., Wernerman J., Rooyackers O., Norberg Å. Albumin and fibrinogen synthesis rates in advanced chronic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2023 Nov 1; 325 (5): G391–G397. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00072.2023>. Epub 2023 Aug 22. PMID: 37605837.
3. Carvalho J.R., Verdelho Machado M. New Insights About Albumin and Liver Disease. *Ann Hepatol.* 2018 July–August; 17 (4): 547–560. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.0916>. PMID: 29893696.
4. Levitt D.G., Levitt M.D. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med.* 2016 Jul 15; 9: 229–255. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S102819>. PMID: 27486341; PMCID: PMC4956071.
5. Rutherford S.H., Hutchison C.D.M., Greetham G.M., Parker A.W., Nordon A., Baker M.J., Hunt N.T. Optical Screening and Classification of Drug Binding to Proteins in Human Blood Serum. *Anal Chem.* 2023 Nov 21; 95 (46): 17037–17045. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03713>.
6. Ward E.S., Gelinas D., Dreesen E., Van Santbergen J., Andersen J.T., Silvestri N.J., Kiss J.E., Sleep D., Rader D.J., Kastelein J.J.P., Louagie E., Vidarsson G., Spriet I. Clinical Significance of Serum Albumin and Implications of FcRn Inhibitor Treatment in IgG-Mediated Autoimmune Disorders. *Front Immunol.* 2022 Jun 1; 13: 892534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.892534>. PMID: 35757719; PMCID: PMC9231186.
7. Hashash J.G., Koutroumpakis F., Anderson A.M., Rivers C.R., Hosni M., Koutroubakis I.E., Ahsan M., Gkaiouraki E., Dunn M.A., Schwartz M., Barrie A., Babichenko D., Tang G., Binion D.G. Elevated serum globulin fraction as a biomarker of multiyear disease severity in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol.* 2022 Nov–Dec; 35 (6): 609–617. <https://doi.org/10.20524/aog.2022.0748>. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36406970; PMCID: PMC9648529.
8. Lisman T., Porte R.J. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood.* 2010 Aug 12; 116 (6): 878–885. doi:10.1182/blood-2010-02-261891. Epub 2010 Apr 16. PMID: 20400681.
9. Jolles S., Borrell R., Zouwail S., Heaps A., Sharp H., Moody M., Selwood C., Williams P., Phillips C., Hood K., Holding S., El Shanawany T. Calculated globulin (CG) as a screening test for antibody deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2014 Sep; 177 (3): 671–678. <https://doi.org/10.1111/cei.12369>. PMID: 24784320; PMCID: PMC4137851.
10. Potter B.J. Liver-plasma protein synthesis. In: Reference Module in Biomedical Sciences. New York: Elsevier; 2014.
11. Hladkykh F.V. Immune disorders in autoimmune hepatitis: The role of autoantibodies, T-reg cells, and new therapeutic approaches. *Bukovinian Med Bull.* 2024; 28 (3): 76–82. doi:10.24061/2413-0737.28.3.111.2024.13.
12. Reau N.S., Lammert C.S., Weinberg E.M. Autoimmune hepatitis: Current and future therapies. *Hepatol Commun.* 2024 Jun 5; 8 (6): e0458. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000458>. PMID: 38836863; PMCID: PMC11155538.
13. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2015 Oct; 63 (4): 971–1004. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.030>. Epub 2015 Sep 1. Erratum in: *J Hepatol.* 2015 Dec; 63 (6): 1543–1544. PMID: 26341719.
14. Chizh M.O., Halychenko S.E., Hladkykh F.V., Byzov V.V., Rohoza L.A., Belochkina I.V., Slyeta I.V. Cell-free cryopreserved biological agents: Technology of production and composition determination. Monograph. Vinnytsia: Twory, 2024. 264 p. <https://doi.org/10.46879/2024.1>
15. Hladkykh F.V., Liadova T.I. Characteristics of hepatotropic activity of cell-free cryopreserved biological agents in an autoimmune hepatitis model. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine.* 2024; 32 (3): 275–289. <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-01>
16. Hladkykh F.V. The state of energy metabolism of hepatocytes in experimental autoimmune hepatitis under the influence of cryoextracts of placenta and spleen, as well as conditioned medium of mesenchymal stem cells. *Health & Educ.* 2024; 3: 12–21. <https://doi.org/10.32782/health-2024.3.2>
17. Law of Ukraine No. 3447-IV “On Protection of Animals from Cruel Treatment”. *Bulletin of the Verkhovna Rada of Ukraine.* 2006; No. 27:230 (as amended). Available from: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>.
18. Reznikov O.H. General ethical principles of animal experiments. In: *The First National Congress on Bioethics. Endocrinology.* Vol. 8, No. 1, p. 142–145.
19. 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. *Clin Exp Immunol.* 1990; 82 (3): 473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05474.x>.
20. Hladkykh F.V. Freund's adjuvant – a classic of vaccine adjuvants and the foundation of experimental immunology. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine.* 2024; 32 (3): 414–439. <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-50-10>.
21. Stils H.F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Institute for Laboratory Animal Research Journal.* 2005; 46 (3): 280–293. doi:10.1093/ilar.46.3.280.
22. Hanch O.V. The effect of animal-derived peptide complexes on immunity in normal conditions and various functional states of the organism [dissertation]. Poltava: 2002. 170 p. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0403U003416>.
23. Chekman I.S., Pohotova G.A., Nebesna T.Yu., et al. Quantum-pharmacological study of the antioxidant properties of silymarin. *Ukr Biopharm J.* 2014; 2: 24–28.
24. Avelar C.R., Pereira E.M., Farias Costa P.R., et al. Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2017; 23 (27): 5004–5017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.5004>.
25. Shanyda M.I., Oleschuk O.M., Lykhatskyi P.H., et al. Study of the hepatoprotective activity of liquid extract of garden thyme herb in tetrachloromethane-induced hepatitis. *Pharm J.* 2017; 2: 91–97. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2017.2.7899>.
26. Koshurba I.V. Study of the effect of placenta cryoextract on cytolysis processes and lipid peroxidation in CCl4-induced liver damage. *Modern Med Technol.* 2022; 54 (3): 46–54. [https://doi.org/10.34287/MMT.3\(54\).2022.9](https://doi.org/10.34287/MMT.3(54).2022.9).
27. Shepitko V.I. Structural-functional indicators of cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of several internal organs: dissertation for a Doctor of Medical Sciences degree, specialty 14.01.35 – Cryomedicine. Kharkiv: 2004. 326 p. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610>.
28. Bespalova I.G. Peptide composition and biological activity of cryopreserved extracts of pig spleen fragments and piglet skin: dissertation for a Candidate of Biological Sciences degree, specialty 03.00.19 – Cryobiology. Kharkiv: 2016. 162 p. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>.

29. Holubinska P.A., Sarycheva M.V., Dolzhikov A.A., Bondariev V.P., Stefanova M.S., Soldatov V.O., Nadezhdin S.V., Korokin M.V., et al. Application of the secretome of multipotent mesenchymal stem cells in the treatment of adjuvant arthritis and contact allergic dermatitis in animal models. *Pharm Pharmacol.* 2020; 8 (6): 416–425. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
30. Globa V.Yu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstructive syndrome: dissertation for a specialty 222 – Medicine. Kharkiv: 2021. 156 p. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913>.
31. Stefano O.V., editor. Preclinical studies of drugs: Methodical recommendations. Kyiv: Avicena; 2001. 527 p.
32. Kamyshnikov V.S. Handbook of clinical biochemical studies and laboratory diagnostics. Moscow: MEDpress-inform; 2009. 896 p.
33. Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265–275.
34. Zar J.H. Biostatistical analysis. 5th ed. Englewood: Prentice-Hall; 2014. 960 p.
35. Manuc T., Preda C.M., Istratescu D., Gheorghe L., Cerban R., Ester C., Stroe T.G., Alecu R.I., Ciuciureanu C.M., Marin A.I., Tugui L., Tieranu C., Andrei S.L., Diculescu M., Manuc M. Silymarin versus essential phospholipids in metabolic associated steatotic liver disease (MASLD) – a prospective comparative randomized trial. *Maedica (Bucur).* 2024 Mar; 19 (1): 9–16. <https://doi.org/10.26574/maedica.2024.19.1.9>. PMID: 38736928; PMCID: PMC11079726.
36. Wadhwa K., Pahwa R., Kumar M., Kumar S., Sharma P.C., Singh G., Verma R., Mittal V., Singh I., Kaushik D., Jean-det P. Mechanistic insights into the pharmacological significance of silymarin. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2022; 27 (16): 5327. <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>.
37. Chen Z., Song C., Yao Z., Sun J., Liu W. Associations between albumin, globulin, albumin to globulin ratio and muscle mass in adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2011-2014. *BMC Geriatr.* 2022 May 2; 22(1): 383. <https://doi.org/10.1186/s12877-022-03094-4>. PMID: 35501822; PMCID: PMC9059414.
38. Shang G., Fei Z., Xu H., Wang Y., Xiang S. Globulin and albumin to globulin ratio precisely diagnose periprosthetic joint infection and determine the timing of second-stage reimplantation. *J Orthop Surg Res.* 2022 Jan 6; 17 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02899-0>. PMID: 34991649; PMCID: PMC8740003.

Information about the author:

Hladkykh Fedir Volodymyrovych – Doctor of Philosophy (PhD) in Health Care in specialty "Medicine", Doctoral student (Doctor of Sciences) of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Square, Kharkiv, Ukraine, 61022; Senior Research fellow Department of Radiation Pathology and Palliative Medicine, State Organization "Grigoriev Institute for medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>