

УДК 543.63:577.113.3+616.36-002.2:612.017.1+ 536.483

DOI <https://doi.org/10.32782/health-2024.3.2>

**СТАН ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ ГЕПАТОЦИТІВ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АВТОІМУННОМУ ГЕПАТИТІ
НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ КРІОЕКСТРАКТІВ ПЛАЦЕНТИ ТА СЕЛЕЗИНКИ,
А ТАКОЖ КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОББУРОВИХ КЛІТИН**

Гладких Федір Володимирович,
доктор філософії (PhD) в галузі охорона здоров'я за спеціальністю «Медицина»,
старший науковий співробітник
Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва
Національної академії медичних наук України»;
докторант кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології
медичного факультету
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України
ORCID: 0000-0001-7924-4048

Автоімунний гепатит (далі – АІГ) є складним імуноопосередкованим захворюванням печінки, що вимагає ретельної діагностики через гістологічні та біохімічні дослідження. Це захворювання характеризується підвищенням рівнів аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та імуноглобуліну G у крові, а також наявністю специфічних автоантитіл. Ризик летальності при АІГ досягає максимального рівня протягом першого року після встановлення діагнозу, перевищуючи загальну смертність у популяції майже в шість разів. Протягом десяти років після встановлення діагнозу смертність від АІГ варіює від 6,2 % до 10,2 %. У світлі цих даних застосування імуномодулювальних терапій є обґрунтованим та потенційно ефективним підходом до лікування пацієнтів з АІГ. Нашу увагу як потенційні імуномодулювальні засоби привернули безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (далі – БКБЗ) – кріоекстракти плаценти (далі – КЕП) та селезінки (далі – КЕС), а також похідне від мезенхімальних стовбурових клітин (далі – МСК), отримане під час їх культивування, – кондиціоноване середовище (далі – КС).

Мета роботи – здійснити порівняльний аналіз стану енергетичного обміну в гепатоцитах на моделі автоімунного гепатиту в щурів на тлі введення кріоекстракту плаценти, кріоекстракту селезінки та кондиціонованого середовища МСК.

Експериментальні дослідження проведено на 42 щурах-самцях. АІГ моделювали шляхом уведення щурам гепатотропної антигенної суміші, яка містила повний ад'ювант Фрейнда та розчин антигену, отриманого з гомогенату аlogenної печінки. На 52-й день експерименту тварин виводили з експерименту та екстирпували печінку для подальших досліджень. Матеріал дослідження становили гомогенати печінки. Уміст аденозинмонофосфорної кислоти (далі – АМФ), аденозиндифосфорної кислоти (далі – АДФ), аденозинтрифосфорної кислоти (далі – АТФ) досліджували в депротейнізованому гомогенаті хроматографічним методом. Розвиток автоімунного запального процесу в тканинах печінки супроводжувався статистично вірогідним зниженням рівня АТФ на 55,1 % ($p < 0,001$) та зниженням рівня АДФ на 57,1 % ($p = 0,1$). Рівень же АМФ у гепатоцитах щурів з АІГ навпаки зріс у 2,6 рази ($p < 0,01$) відносно показників інтактних щурів та становив $1,8 \pm 0,23$ мкмоль/г. Застосування референс-препарату силібору призвело до статистично вірогідного ($p < 0,05$) зростання рівня АТФ у гепатоцитах щурів з АІГ на 54,7 % та зниження ($p < 0,05$) рівня АМФ на 34,1 % відносно показників щурів контрольної групи. Найвиразніші зміни показників енергетичного обміну виявлено на тлі застосування КС-МСК. Установлено, що в тварин з АІГ, яким вводили КС-МСК, рівень АТФ зріс ($p < 0,001$) на 102,7 %; рівень АДФ ($p = 0,09$) – на 83,3 %, а рівень АМФ знизився ($p < 0,01$) на 58,1 % відносно показників нелікованих щурів з АІГ. За здатністю відновлювати енергетичний баланс у гепатоцитах щурів з АІГ досліджувані БКБЗ доцільно розташувати в такій послідовності (за % зміни рівня АЕЗ відносно показників тварин групи контролю): КС-МСК (+65,8 %; $p < 0,001$) > КЕП (+41,7 %; $p < 0,01$) > КЕС (+37,3 %; $p < 0,01$).

Ключові слова: кріоекстракт плаценти, кріоекстракт селезінки, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин, аденозинмонофосфорна кислота, аденозиндифосфорна кислота, аденозинтрифосфорна кислота.

Hladkykh Fedir. Energy metabolism status of hepatocytes in experimental autoimmune hepatitis under the influence of placenta cryoextract, spleen cryoextract and conditioned medium of mesenchymal stem cells

Autoimmune hepatitis (AIH) is a complex immune-mediated liver disease diagnosed histologically and biochemically by elevated levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and immunoglobulin G in the blood serum, as well as the presence of autoantibodies. The mortality rate for AIH is highest during the first year after diagnosis and is nearly six times higher than that of the general population. The 10-year mortality associated with AIH ranges from 6.2 % to 10.2 %. Existing immunomodulatory treatments may be justified for use in patients with AIH. We focused on acellular cryopreserved biological agents (CPBAs) as potential immunomodulatory tools, specifically cryoextracted placenta (CEP) and spleen (CES), as well as a derivative of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained during their cultivation – conditioned medium (CM).

Objective: To perform a comparative analysis of energy metabolism in hepatocytes in a rat model of autoimmune hepatitis, following the administration of cryoextracted placenta, cryoextracted spleen, and MSC-conditioned medium.

Methods: Experimental studies were conducted on 42 male rats. AIH in rats was induced by administering a hepatotropic antigenic mixture consisting of Freund's complete adjuvant and an antigen solution derived from an allogeneic liver homogenate. On the 52nd day of the experiment, the animals were euthanized, and their livers were excised for further study. Liver homogenates were used as the research material. The content of adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine triphosphate (ATP) was analyzed in deproteinized homogenates using chromatographic methods.

Results. The development of the autoimmune inflammatory process in liver tissues was accompanied by a statistically significant decrease in ATP levels by 55.1 % ($p < 0.001$) and a decrease in ADP levels by 57.1 % ($p = 0.1$). Conversely, AMP levels in hepatocytes of rats with AIH increased 2.6-fold ($p < 0.01$) compared to intact rats, reaching $1.8 \pm 0.23 \mu\text{mol/g}$. Administration of the reference drug Silybor resulted in a statistically significant ($p < 0.05$) increase in ATP levels in hepatocytes of rats with AIH by 54.7 % and a decrease ($p < 0.05$) in AMP levels by 34.1 % compared to the control group. The most pronounced changes in energy metabolism parameters were observed with MSC-CM treatment. In rats with AIH treated with MSC-CM, ATP levels increased ($p < 0.001$) by 102.7 %, ADP levels increased ($p = 0.09$) by 83.3 %, and AMP levels decreased ($p < 0.01$) by 58.1 % compared to untreated AIH rats. Based on their ability to restore the energy balance in hepatocytes of AIH rats, the studied CPBAs should be ranked in the following order (by % change in energy metabolism parameters relative to the control group): MSC-CM (+65.8 %; $p < 0.001$) > CEP (+41.7 %; $p < 0.01$) > CES (+37.3 %; $p < 0.01$).

Key words: placenta cryoextract, spleen cryoextract, conditioned medium of mesenchymal stem cells, adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate.

Вступ. Автоімунний гепатит (далі – АІГ) – це комплексне імуноопосередковане захворювання печінки, яке діагностується гістологічно за морфологічними ознаками гепатиту та високим рівнем аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та імуноглобуліну G у сироватці крові з наявністю автоантитіл [1]. Річна захворюваність на АІГ коливається від 0,67 до 2,0 випадків на 100 тис., а щорічна поширеність коливається від 4,0 до 24,5 випадків на 100 тис. осіб (залежно від географічного розташування) [2; 3]. Смертність при АІГ є найвищою протягом першого року після діагностики та майже вшестеро перевищує смертність у загальній популяції. 10-річна смертність, пов'язана з АІГ, коливається від 6,2 % до 10,2 % та відрізняється в різних етнічних підгрупах і може залежати від культурних та соціально-економічних факторів, як-от обмежений доступ до медичної допомоги [4].

Факторами ризику розвитку АІГ є генетична схильність, молекулярна мімікрія та дисбаланс між ефекторним і регуляторним імунітетом у конкретній автоімунній екосистемі. Молекули HLA (*Human Leukocyte Antigen*), а також тригери навколишнього середовища, як-от віруси,

токсини та мікробіом, вважають ключовими компонентами імунної відповіді, опосередкованої Т-клітинами. Презентація автоантигенного пептиду (рис. 1) наївним CD4⁺ Т-хелперним клітинам (Th0) антигенпрезентувальними клітинами (АПК) призводить до секреції прозапальних цитокінів (IL-12, IL-6 та TGF (*Transforming Growth Factor*)), які ініціюють диференціацію клітин Th1, Th2 та Th17 [2]. Клітини Th1 секретують IL-2 та інтерферон γ (IFN- γ), які стимулюють CD8⁺ клітини індукувати експресію молекул HLA класу I та HLA класу II на гепатоцитах. регуляторні Т-клітини (T-reg) та Th2-клітини секретують IL-4, IL-10 та IL-13, тим самим стимулюючи дозрівання В-клітин та плазматичних клітин, які виробляють автоантитіла. Клітини Th17, збільшення кількості яких корелює зі ступенем фіброзу печінки, секретують прозапальні цитокіни та пригнічують T-reg. Чисельне зниження T-reg призводить до порушення толерантності до автоантигенів, що згодом призводить до ініціації та збереження автоімунного ураження печінки. Гістологічні характеристики гепатиту містять запальний клітинний інфільтрат, що налічують лімфоцити та плазматичні клітини [2].

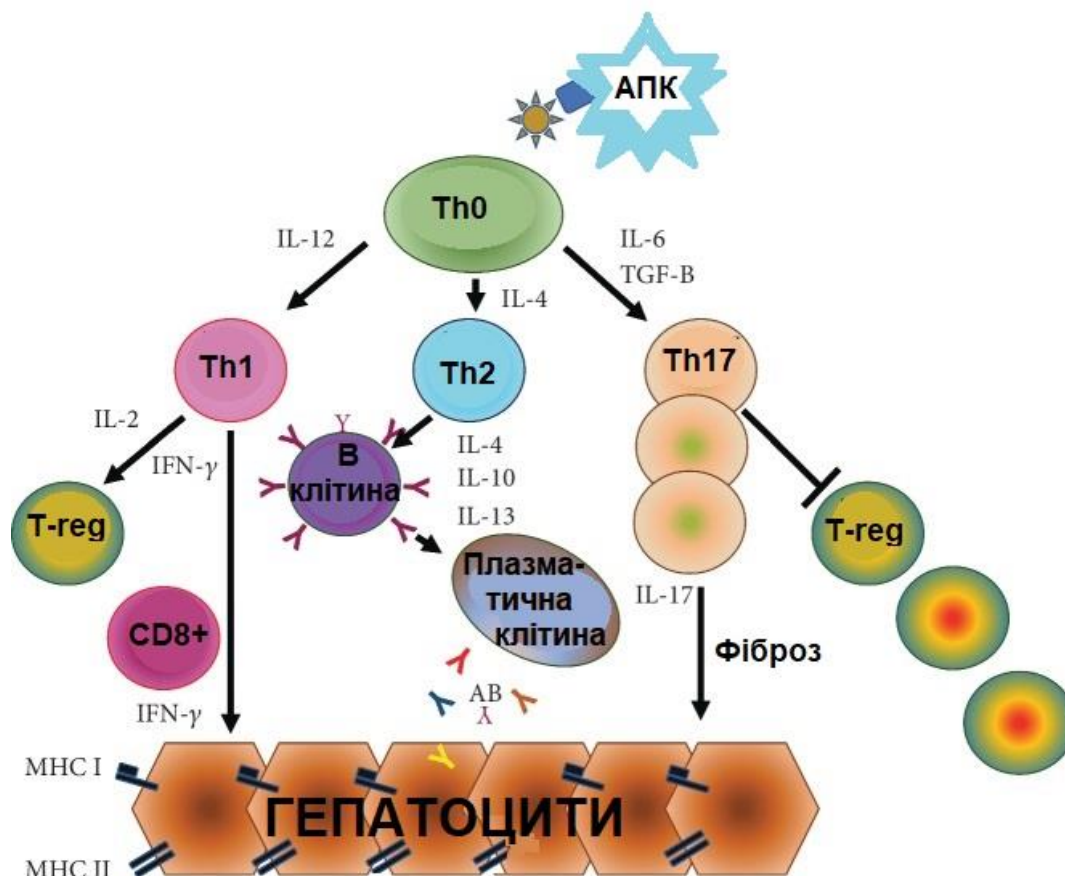


Рис. 1 Патогенез АІГ (адаптовано за [2])

Основою терапії АІГ на сьогодні є кортикостероїди окремо або в комбінації з азатиоприном, однак були запропоновані нові терапевтичні втручання, що охоплюють весь імуносупресивний арсенал, включно з біологічними препаратами, а також клітинну терапію [5].

Незважаючи на те що АІГ досліджується протягом більш тривалого періоду, ніж гепатит С, терапевтичний прогрес для АІГ був мінімальним. Останньою розробкою в лікуванні АІГ було внесення будесоніду в програму лікування. Попри те що будесонід є кортикостероїдним імуносупресивним засобом, він пов'язаний з меншою кількістю специфічних для стероїдів побічних ефектів, ніж інші кортикостероїди [6].

Останніми роками відбувся перехід від індукції широкої імуносупресії до імунотуляції для кількох аутоімунних захворювань шляхом націлювання на специфічні медіатори запалення, пов'язані з хворобою [7]. Наявні імунотулявальні методи лікування можуть бути обґрунтованими для використання в пацієнтів з АІГ. Серед цих методів лікування ритуксимаб, моноклональне антитіло, яке виснажує В-клітини,

націлюючись на CD20, асоціюється з покращенням у пацієнтів із важким для лікування АІГ. Так, у дослідженні 22 пацієнтів з АІГ ритуксимаб покращив функцію печінки та зменшив клінічні вияви захворювання й використання кортикостероїдів [8; 9].

Нашу увагу як потенційні імунотулявальні засоби привернули безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби (далі – БКБЗ) – кріоекстракти плаценти (далі – КЕП) та кріоекстракт селезінки (далі – КЕС), а також похідне мезенхімальних стовбурових клітин (далі – МСК), отримане під час їх культивування, – кондиціоноване середовище (далі – КС) МСК.

І. В. Кошурба та співав. (2022 р.) [10; 11] показали, що профілактичне введення КЕП призводить до відновлення функціональної активності пошкодженої печінки, що проявлялось у зменшенні вираженості цитолітичного та холестатичного синдрому на тлі тетрахлорметан-індукованого гепатиту. Крім того, показано, що на моделі гострого D-галактозамін-індукованого гепатиту введення КЕП нормалізувало метаболічні процеси в печінці та відновлювало її функціональний

стан завдяки антиоксидантному та мембраностабілізуючому ефектам, які ослаблювали цитолітичний синдром і відновлювали білоксинтезувальну функцію печінки та пігментний обмін [11].

Мета дослідження – здійснити порівняльний аналіз стану енергетичного обміну в гепатоцитах на моделі автоімунного гепатиту в щурів на тлі введення кріоекстракту плаценти, кріоекстракту селезінки та кондиціонованого середовища МСК.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на лабораторних щурах відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р., Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (м. Київ, 2001 р.) та інших чинних вітчизняних і міжнародних нормативних актів [12; 13].

АІГ у щурів моделювали через введення гепатотропної антигенної суміші, яка містила повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ) (*Thermo Fisher Scientific, США*) та розчин антигену, отриманого з гомогенату аlogenної печінки [14].

Гомогенат тканини печінки готували з дотриманням правил асептики за стандартною методикою підготовки тканинних антигенів [16]. Фрагменти печінки подрібнювали ножицями та відмивали від крові в холодному 0,9 % розчині NaCl, після чого розтирали в ступці з кварцевим піском. Гомогенну масу переносили в колбу, розчиняли ізотонічним розчином у співвідношенні 1:2, перемішували пропусканням триразово через шприц та відстоювали при -4°C близько 20 годин. Надосадну рідину центрифугували протягом 30 хвилин при 3000 об./хв при -4°C . У 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 хв [17].

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) [14].

Досліджувані препарати починали вводити через 7 днів після останньої ін'єкції гепатотропної антигенної суміші [14]. БКБЗ вводили в/м, з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту. Як референс-препарат обрано гепатопротектор силібор – рослинний екстракт з насіння розторопші плямис-

тої (*Silybum marianum*) [18; 19]. Силібор вводили внутрішньошлунково (в/шл) на 42, 44, 46, 48 та 50 дні експерименту в дозі 50 мг/кг [20; 21].

Дослідження ефективності БКБЗ при 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 в 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 [20];

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 [22];

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 [23];

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 [24, 25].

На 52-й день експерименту тварин виводили з експерименту та екстирпували печінку для подальших досліджень. Матеріал дослідження становили гомогенати печінки [26]. Тканини печінки промивали холодним ($+4^{\circ}\text{C}$) ізотонічним 1,15 % розчином KCl та гомогенізували при 3 000 об/хв (тефлон-скло) у середовищі буферного розчину при співвідношенні 1:10 (маса/об'єм: наважка 250 мг + 2,25 мл 1,15 % розчину KCl), отримуючи 10 % гомогенат. Постядерний супернатант отримували через центрифугування гомогенату впродовж 30 хв при 600 g з подальшим відбором аліквот у мікропробірки Eppendorf. Депротейнізований екстракт отримували додаванням до гомогенату тканини трихлортової кислоти (0,6 M) з подальшою нейтралізацією 5,0 M калію карбонатом.

Визначення вмісту аденілових нуклеотидів.

Уміст аденозинмонофосфорної кислоти (далі – АМФ), аденозиндифосфорної кислоти (далі – АДФ) та аденозинтрифосфорної кислоти (далі – АТФ) досліджували в депротейнізованому гомогенаті хроматографічним методом. Аденілатний енергетичний заряд (АЕЗ) за D. Atkinson & G. Walton (1968 р.) [27; 28] розраховували за формулою: $\text{АЕЗ} = (\text{АТФ} + 0,5 \times \text{АДФ}) / (\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ})$.

Статистична обробка даних. 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-Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. Цифрові дані в разі нормального розподілу величин наведено у вигляді $M \pm m$ ($M \pm SE$), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного, та наводили 95 % ДІ: 5 % – 95 %, де 95 % ДІ: – 95 % довірчий інтервал (Confidence interval – CI). При ненормальному розподілі отриманих величин дані представлено у вигляді Me [LQ; UQ], де Me – медіана, [LQ; UQ] – верхня межа нижнього квартиля (lower quartile – LQ) та нижня межа верхнього квартиля (upper quartile – UQ). Для графічного представлення даних обрано діаграми розмаху (box-and-whiskers diagram – «шухлядові» діаграми з «вусами») [29].

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження показало, що розвиток автоімунного запального процесу в тканинах печінки супроводжувався статистично вірогідним зниженням рівня АТФ на 55,1 % ($p < 0,001$) та зниженням рівня АДФ на 57,1 % ($p = 0,1$). Рівень же АМФ у гепатоцитах щурів з АІГ навпаки зріс у 2,6 раза ($p < 0,01$) відносно показників інтактних щурів та становив $1,8 \pm 0,23$ мкмоль/г (табл. 1).

Варто зазначити, що співвідношення АТФ, АДФ та АМФ функціонально важливіше, ніж абсолютна концентрація АТФ. Саме тому різні співвідношення часто використовували для перевірки метаболічних шляхів, які виробляють і споживають АТФ [30]

Аденілатний енергетичний заряд (АЕЗ) – це скалярний індекс, що варіюється від 0 до 1. Коли весь пул аденінових нуклеотидів міститься у формі АМФ, енергетичний заряд дорівнює нулю й система повністю розряджена (нульові концентрації АТФ та АДФ). Тільки з АДФ енер-

Таблиця 1

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та силібору на вміст аденілових нуклеотидів у тканинах печінки щурів з АІГ на 52-й день експерименту, мкмоль/г ($M \pm m$ (95 % ДІ) або Me [LQ; UQ], $n=42$)

| 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 лікув.) | АІГ + силібор | АІГ + КЕП | АІГ + КЕС | АІГ + КС-МСК |
| n | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| АТФ, мкмоль/г | $2,4 \pm 0,11$ (95 % ДІ: 2,2–2,6) | $1,1 \pm 0,10$ (95 % ДІ: 0,9–1,3) $p_1 < 0,001$ [55,1%] | $1,7 \pm 0,16$ (95 % ДІ: 1,4–2,0) $p_2 < 0,05$ [54,7%] | $2,0 \pm 0,09$ (95 % ДІ: 1,8–2,2) $p_2 < 0,001$ [89,3%] $p_3 = 0,1$ [22,4%] | $1,8 \pm 0,11$ (95 % ДІ: 1,6–2,1) $p_2 < 0,001$ [72,0%] $p_3 = 0,4$ [19,9%] | $2,2 \pm 0,12$ (95 % ДІ: 1,9–2,4) $p_2 < 0,001$ [102,7%] $p_3 < 0,05$ [31,0%] |
| АДФ, мкмоль/г | $1,4$ [0,8; 1,6] | $0,6$ [0,5; 1,0] $p_1 = 0,1$ [57,1%] | $0,8$ [0,7; 0,9] $p_2 = 0,1$ [33,3%] | $0,9$ [0,9; 1,2] $p_2 = 0,08$ [50,0%] $p_3 = 0,03$ [12,5%] | $0,7$ [0,7; 1,0] $p_2 < 0,2$ [16,7%] $p_3 = 0,4$ [12,5%] | $1,1$ [1,1; 1,2] $p_2 = 0,09$ [83,3%] $p_3 = 0,04$ [37,5%] |
| АМФ, мкмоль/г | $0,7 \pm 0,14$ (95 % ДІ: 0,4–1,0) | $1,8 \pm 0,23$ (95 % ДІ: 1,4–2,3) $p_1 < 0,01$ [163,3%] | $1,2 \pm 0,17$ (95 % ДІ: 0,9–1,6) $p_2 < 0,049$ [34,1%] | $1,4 \pm 0,14$ (95 % ДІ: 1,1–1,7) $p_2 < 0,01$ [24,8%] $p_3 = 0,5$ [14,1%] | $1,4 \pm 0,16$ (95 % ДІ: 1,1–1,7) $p_2 = 0,1$ [23,3%] $p_3 = 0,4$ [16,5%] | $0,8 \pm 0,09$ (95 % ДІ: 0,6–1,0) $p_2 < 0,01$ [58,1%] $p_3 = 0,04$ [36,5%] |

Примітки.

1. p_1 – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;

2. [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;

3. Індексами 1, 2, 3 вказано номер групи, з показниками якої проведено зрівняння. Як відомо, у живій клітині майже всі біоенергетичні процеси пов'язані один з одним за допомогою аденозинових нуклеотидів, які споживають або регенерують різні ферментативні реакції. Насправді найважливішими регуляторними елементами, які беруть участь у поєднанні катаболічних і анаболічних реакцій, є АТФ, АДФ та АМФ [30].

гетичний заряд становить 0,5. Коли весь пул аденінових нуклеотидів міститься у формі АТФ, тоді АЕЗ дорівнює 1 [30].

Виявлені нами в дослідженні зміни вмісту аденілових нуклеотидів на тлі розвитку АІГ призвели до статистично вірогідного ($p < 0,001$) зниження АЕЗ на 42,5 % відносно показників інтактних щурів, який становив $0,41 \pm 0,03$ ум. од. (рис. 2).

Застосування референс-препарату силібору призвело до статистично вірогідного ($p < 0,05$) зростання рівня АТФ у гепатоцитах щурів з АІГ на 54,7 % та зниження ($p < 0,05$) рівня АМФ на 34,1 % відносно показників щурів контрольної групи (див. табл. 1). Також відмічено зростання рівня АДФ ($p = 0,1$) на 33,1 % щодо показників нелікованих щурів з АІГ.

Вказані зміни співвідношення рівня АТФ, АДФ та АМФ у гепатоцитах щурів з АІГ на тлі введення силімарину зумовили статистично вірогідне ($p < 0,01$) зростання АЕЗ на 37,8 % відносно аналогічного показника в щурів групи контролю (див. рис. 2). Установлена здатність силібору відновлювати енергетичний баланс у гепатоцитах на тлі АІГ у щурів узгоджується із широким спектром його біологічної активності. За даними літератури силібор (син. *Silymarin*, рис. 3) має протизапальні, антиоксидантні та проапоптотичні властивості й модулює різні фактори транскрипції (NF κ B, PPAR- γ , Nrf2, β -катенін, AP-1, WT-1, kLF6, IRS-1,

SREBP-1c, CREB і GADD45 α), фактори росту, як-от BDNF, TGF- β і VEGF, рецептори (LDL, рецептор естрогену, GLP-1, Farnesyl і Chemokine 4 і 5), сигнальні шляхи (MAPK/ERK2/p53, Slit-2/Robo, Notch, CDK, Wnt/ β -катенін P13K- PKB/ Akt, mTOR, IRS-1/P13K/Akt і Jak-STAT), модулює експресію генів апоптотичних білків (Bax, Bcl-2, Bcl-XL, Vim, Caspase 3, 8, 9, FADD і Survivin) і запальних цитокінів (IL-1 β , 2, 5, 6, 8, 12, TNF α , IFN γ , MIP α та MCP-1), одночасно інгібуючи окремі ферменти (COX-2, iNOS, SGPT, SGOT, MMP, MPO, AChE, G6Pase, MAO-B, LDH, теломераза, FAS і СК-МВ) та здатен активувати ендогенні антиоксидантні ферменти, які відповідають за численні біологічні й фармакологічні ефекти, включно з гепатопротекцією, нейропротекцією, кардіопротекцією, а також протиракові, протівірусні та протидіабетичні властивості, про що свідчать численні дослідження та експериментальні дані [31].

Оцінка здатності досліджуваних БКБЗ відновлювати енергетичний обмін на тлі АІГ у щурів показала, що з досліджуваних кріоекстрактів КЕС зіставлявся за ефективністю з референс-препаратом силібором. Так, на тлі введення КЕС АЕЗ статистично вірогідно ($p < 0,01$) зріс на 37,3 % відносно показників щурів контрольної групи та становив $0,56 \pm 0,03$ ум. од. (див. рис. 2). Варто зазначити, що на відміну від силібору, введення КЕС

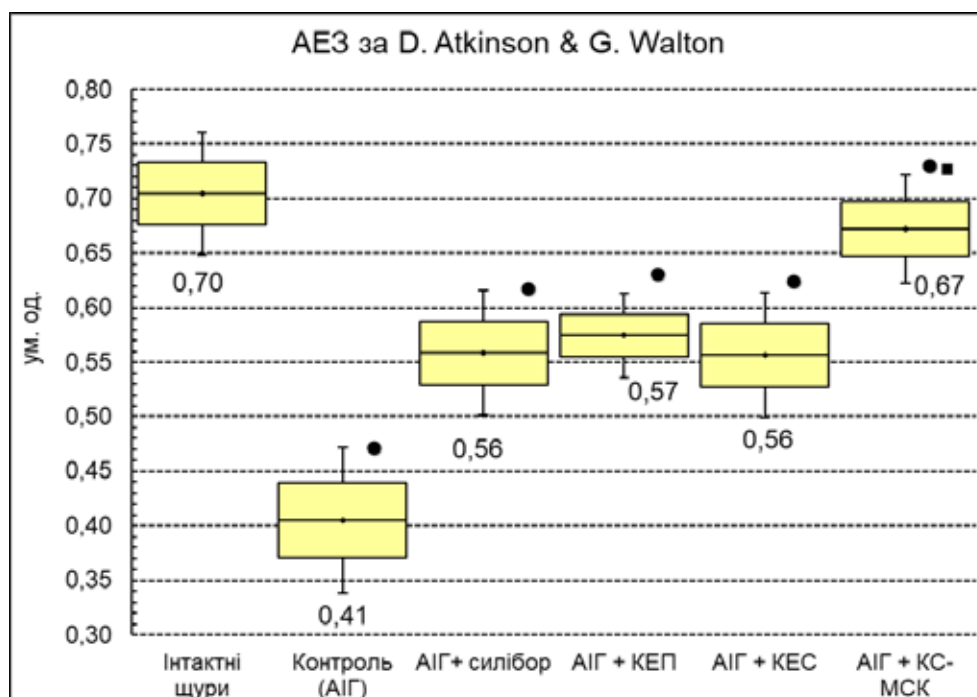


Рис. 2 Вплив КЕС, КЕС, КС-МСК та силібору на рівень аденілатного енергетичного заряду за D. Atkinson & G. Walton у гомогенатах печінки щурів з АІГ

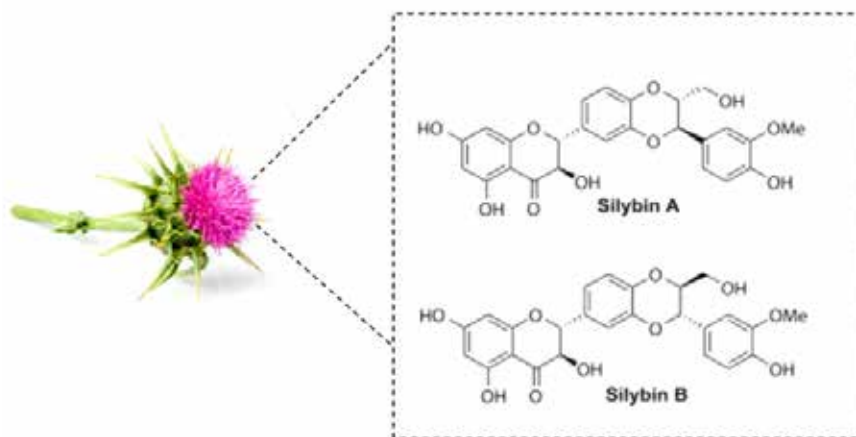


Рис. 3. Основні сполуки силімарину (силібору) з розторопші (адаптовано за [32])

супроводжувалося в 1,3 раза більшим зростанням рівня АТФ (72,0 % проти 54,7 %), проте менш виразно відновлювалися до вихідних показників рівні АМФ та АДФ (див. табл. 1).

Доведено, що застосування КЕП у щурів з АІГ показало більш виразну, ніж уведення КЕС, здатність нормалізувати енергетичний обмін у гепатоцитах. Установлено, що на тлі введення КЕП рівень АТФ зріс ($p < 0,001$) на 89,3 %, рівень АДФ ($p = 0,08$) – на 50,0 %, а рівень АМФ знизився ($p < 0,01$) на 24,8 % відносно показників щурів контрольної групи (див. табл. 1). Отримані дані узгоджувалися з результатами досліджень І. В. Кошурби, М. О. Чижа та співав. щодо модульовального впливу КЕП на енергетичний обмін у гепатоцитах [10; 11].

Найвиразніші зміни показників енергетичного обміну виявлено на тлі застосування КС-МСК. Установлено, що у тварин з АІГ, яким вводили КС-МСК, рівень АТФ зріс ($p < 0,001$) на 102,7 %; рівень АДФ ($p = 0,09$) – на 83,3 %, а рівень АМФ знизився ($p < 0,01$) на 58,1 % відносно показників нелікованих щурів з АІГ (див. табл. 1).

Варто зазначити, що на тлі введення КС-МСК відзначено найвиразніше зростання АЕЗ – ука-

заний показник статистично вірогідно ($p < 0,001$) підвищився на 65,8 % відносно показників нелікованих тварин з АІГ та становив $0,67 \pm 0,03$ ум. од. (див. рис. 2).

Висновки.

1. Розвиток АІГ у щурів супроводжувався статистично вірогідним зниженням рівня АТФ на 55,1 % ($p < 0,001$) та зниженням рівня АДФ на 57,1 % ($p = 0,1$), а також зростанням у 2,6 раза ($p < 0,01$) рівня АМФ у гепатоцитах відносно показників інтактних щурів.

2. За здатністю відновлювати енергетичний баланс у гепатоцитах щурів з АІГ досліджувані БКБЗ доцільно розташувати в такій послідовності (за % зміни рівня АЕЗ відносно показників тварин групи контролю): КС-МСК (+65,8 %; $p < 0,001$) > КЕП (+41,7 %; $p < 0,01$) > КЕС (+37,3 %; $p < 0,01$).

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дослідження стану енергетичного обміну в гепатоцитах щурів на моделі АІГ вказують на доцільність подальших досліджень патобіохімічних механізмів гепатопротекторної активності безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Floreani A., Restrepo-Jimenez P., Secchi M. F., De Martin S., Leung P. S. C., Krawitt E., Bowlus C. L., Gershwin M. E., Anaya J. M. Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *Journal of Autoimmunity*. 2018. Vol. 95. P. 133–143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.020>
2. Sucher E., Sucher R., Gradistanac T., Brandacher G., Schneeberger S., Berg T. Autoimmune hepatitis-immunologically triggered liver pathogenesis-diagnostic and therapeutic strategies. *Journal of Immunology Research*. 2019. Vol. 2019. Article 9437043. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/9437043>
3. Delgado J. S., Vodonos A., Malnick S., Kriger O., Wilkof-Segev R., Delgado B., Novack V., Rosenthal A., Menachem Y., Melzer E., Fich A. Autoimmune hepatitis in southern Israel: a 15-year multicenter study. *Journal of Digestive Diseases*. 2013. Vol. 14, №. 11. P. 611–618. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12085>
4. Grønbaek L., Vilstrup H., Jepsen P. Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study. *Journal of Hepatology*. 2014. Vol. 60, №. 3. P. 612–617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.10.020>

5. Czaja A. J. Drug choices in autoimmune hepatitis: part B. Nonsteroids. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2012. Vol. 6, № 5. P. 617–635. DOI: <https://doi.org/10.1586/egh.12.38>
6. 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>
7. Strzelec M., Detka J., Mieszczak P., Sobocińska M. K., Majka M. Immunomodulation: A general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. *Frontiers in Immunology*. 2023. Vol. 14. Article 1127704. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1127704>
8. Czaja A. J. Advancing biologic therapy for refractory autoimmune hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2022. Vol. 67, № 11. P. 4979–5005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-021-07378-4>
9. Than N. N., Hodson J., Schmidt-Martin D., Taubert R., Wawman R. E., Botter M., Gautam N., Bock K., Jones R., Appanna G. D., Godkin A., Montano-Loza A. J., Lammert F., Schramm C., Manns M. P., Swain M., Burak K. W., Adams D. H., Hirschfield G. M., Oo Y. H. Efficacy of rituximab in difficult-to-manage autoimmune hepatitis: Results from the International Autoimmune Hepatitis Group. *JHEP Reports*. 2019. Vol. 1, № 6. P. 437–445. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.10.005>
10. Кошурба І. В. Гепатопротекторна дія кріопресервованого екстракту плаценти при ураженні печінки тетрахлорометаном. *Східноукраїнський медичний журнал*. 2022. Т. 10, № 4. С. 333–341. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10\(4\):333-341](https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10(4):333-341)
11. Кошурба І. В., Чиж М. О., Гладких Ф. В., Белочкіна І. В. Вплив кріоекстракту плаценти на метаболічний та функціональний стан печінки за D-галактозамінового гепатиту. *Інноваційні біосистеми та біоінженерія*. 2022. Т. 6, № 2. С. 64–74. DOI: <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.2.264774>
12. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». *Відомості Верховної Ради України*. 2006. № 27. С. 230 (зі змінами). Доступно за посиланням: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>
13. Резніков О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. В Першому національному конгресі з біоетики. *Ендокринологія*. Т. 8, № 1, С. 142–145.
14. 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: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05474.x>
15. 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>
16. Harold F. Stils, 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>
17. Ганчо О. В. Вплив комплексів пептидів тваринного походження на імунітет за умов норми та різних функціональних станів організму (дисертація к. біол. н., спец. 03.00.13 – фізіологія людини і тварин, Полтава). 2002. 170 с. Доступно за посиланням: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0403U003416/>
18. Чекман І. С., Погорова Г. А., Небесна Т. Ю., та ін. Квантово-фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей силімарину. *Український біофармацевтичний журнал*. 2014. № 2. С. 24–28.
19. 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>
20. Шанайда М. І., Олещук О. М., Лихацький П. Г., Кернична І. З. Дослідження гепатопротекторної активності рідкого екстракту трави Чаберу садового при тетрахлорометановому гепатиті. *Фармацевтичний часопис*. 2017. № 2. С. 91–97. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2017.2.7899>
21. 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)
22. Шепітко В. І. Структурно-функціональні показники кріопресервованої печінки та вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів: дис. ... д. мед. н.: спец. 14.01.35 – Криомедицина. Харків, 2004. 326 с. Доступно за посиланням: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>
23. Беспалова І. Г. Пептидний склад та біологічна дія екстрактів кріопресервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят : дис. ... канд. біол. н.: спец. 03.00.19 – Кріобіологія. Харків, 2016. 162 с. Доступно за посиланням: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>
24. Голубінська П. А., Саричева М. В., Должиков А. А., Бондарев В. П., Стефанова М. С., Солдатов В. О., Надеждин С. В., Корокін М. В. та ін. Застосування секретому мультіпотентних 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>
25. Глоба В. Ю. Використання кріопресервованих клітинних культур та нейротрофічних факторів при експериментальному інфравезикальному обструктивному синдромі: дис. ... спец. 222 – Медицина. Харків, 2021. 156 с. Доступно за посиланням: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>
26. Стефанов О. В. (ред.) Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ : Авіцена, 2001. 527 с.
27. Atkinson D. E. Citrate and citrate cycle in regulation of energy metabolism. *The metabolic roles of citrate*. London and New York. 1968. P. 23–40.

28. Atkinson D. E., Walton G. M. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1967. № 242 (13). P. 3239–41.
29. Zar J. H. *Biostatistical analysis*. 5th ed. Englewood: Prentice-Hall, 2014. 960 p.
30. De la Fuente I. M., Cortés J. M., Valero E., Desroches, M., Rodrigues S., Malaina I., Martínez L. On the dynamics of the adenylate energy system: homeorhesis vs homeostasis. *PloS one*. 2014. № 9 (10). e108676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108676>
31. 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 (Basel, Switzerland)*. 2022. № 27 (16). 5327. <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>
32. Delmas D., Xiao J., Vejux A., Aires, V. Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2009. 25 (9). 2009. <https://doi.org/10.3390/molecules25092009>

REFERENCES

1. Floreani, A., Restrepo-Jimenez, P., Secchi, M. F., De Martin, S., Leung, P. S. C., Krawitt, E., Bowlus, C. L., Gershwin, M. E., & Anaya, J. M. (2018). Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *Journal of Autoimmunity*, 95, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.020>
2. Sucher, E., Sucher, R., Gradistanac, T., Brandacher, G., Schneeberger, S., & Berg, T. (2019). Autoimmune hepatitis-immunologically triggered liver pathogenesis-diagnostic and therapeutic strategies. *Journal of Immunology Research*, 2019, 9437043. <https://doi.org/10.1155/2019/9437043>
3. Delgado, J. S., Vodonos, A., Malnick, S., Kriger, O., Wilkof-Segev, R., Delgado, B., Novack, V., Rosenthal, A., Menachem, Y., Melzer, E., & Fich, A. (2013). Autoimmune hepatitis in southern Israel: A 15-year multicenter study. *Journal of Digestive Diseases*, 14(11), 611–618. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12085>
4. Grønbaek, L., Vilstrup, H., & Jepsen, P. (2014). Autoimmune hepatitis in Denmark: Incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study. *Journal of Hepatology*, 60(3), 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.10.020>
5. Czaja, A. J. (2012). Drug choices in autoimmune hepatitis: Part B. Nonsteroids. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 6(5), 617–635. <https://doi.org/10.1586/egh.12.38>
6. Reau, N. S., Lammert, C. S., & Weinberg, E. M. (2024). Autoimmune hepatitis: Current and future therapies. *Hepatology Communications*, 8(6), e0458. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000458>
7. Strzelec, M., Detka, J., Mieszczyk, P., Sobocińska, M. K., & Majka, M. (2023). Immunomodulation: A general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. *Frontiers in Immunology*, 14, 1127704. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1127704>
8. Czaja, A. J. (2022). Advancing biologic therapy for refractory autoimmune hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 67(11), 4979–5005. <https://doi.org/10.1007/s10620-021-07378-4>
9. Than, N. N., Hodson, J., Schmidt-Martin, D., Taubert, R., Wawman, R. E., Botter, M., Gautam, N., Bock, K., Jones, R., Appanna, G. D., Godkin, A., Montano-Loza, A. J., Lammert, F., Schramm, C., Manns, M. P., Swain, M., Burak, K. W., Adams, D. H., Hirschfield, G. M., & Oo, Y. H. (2019). Efficacy of rituximab in difficult-to-manage autoimmune hepatitis: Results from the International Autoimmune Hepatitis Group. *JHEP Reports*, 1(6), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.10.005>
10. Koshurba, I. V. (2022). Hepatoprotective effect of cryopreserved placenta extract on the tetrachloromethane liver injury. *Eastern Ukrainian Medical Journal*, 10(4), 333–341. [https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10\(4\):333-341](https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10(4):333-341) [In Ukrainian].
11. Koshurba, I. V., Chyzh, M. O., Hladkykh, F. V., & Belochkina, I. V. (2022). Effect of cryoextract of placenta on the metabolic and functional state of the liver in D-galactosamine-induced hepatitis. *The Innovative Biosystems and Bioengineering*, 6(2), 64–74. <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.2.264774> [In Ukrainian].
12. Law of Ukraine No. 3447-IV. (2006). On the protection of animals from cruelty. *Verkhovna Rada of Ukraine Bulletin*, 27, 230 (with amendments). Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> [In Ukrainian].
13. Reznikov, O. H. (2003). General ethical principles of animal experiments. In *First National Congress on Bioethics*. *Endocrinology*, 8(1), 142–145 [In Ukrainian].
14. Kohda, H., Sekiya, C., Kanai, M., Yoshida, Y., Uede, T., Kikuchi, K., & Namiki, M. (1990). Flow cytometric and functional analysis of mononuclear cells infiltrating the liver in experimental autoimmune hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 82(3), 473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05474.x>
15. Stils, H. F. (2005). Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 46(3), 280–293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
16. Harold F. (2005). Stils, adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants, *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 46(3), 280–93. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
17. Hanchó, O. V. (2002). Effect of animal-derived peptide complexes on immunity under normal conditions and various functional states of the organism (Ph.D. dissertation, Poltava). Retrieved from <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0403U003416/> [In Ukrainian].
18. Chekman, I. S., Pohotova, H. A., Nebesna, T. Yu., et al. (2014). Quantum-pharmacological study of the antioxidant properties of silymarin. *Ukrainian Biopharmaceutical Journal*, (2), 24–28. [In Ukrainian].
19. Avelar, C. R., Pereira, E. M., Farias Costa, P. R., Jesus, R. P., & Oliveira, L. P. M. (2017). Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(27), 5004–5017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.5004>

20. Shanaida, M. I., Oleschuk, O. M., Lyakhatskyi, P. H., & Kerychna, I. Z. (2017). Study of the hepatoprotective activity of liquid extract of garden thyme herb in carbon tetrachloride-induced hepatitis. *Pharmaceutical Journal*, 2, 91–97. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2017.2.7899> [In Ukrainian].
21. Koshurba, I. V. (2022). Study of the effect of placental cryoextract on cytolysis processes and lipid peroxidation in CC14-induced liver injury. *Modern Medical Technologies*, 54(3), 46-54. [https://doi.org/10.34287/MMT.3\(54\).2022.9](https://doi.org/10.34287/MMT.3(54).2022.9) [In Ukrainian].
22. Shepitko, V. I. (2004). Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs (Doctoral dissertation, Kharkiv). <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/> [In Ukrainian].
23. Bepalova, I. G. (2016). Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin (Ph.D. thesis, Kharkiv). <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/> [In Ukrainian].
24. Golubinskaya, P. A., Sarycheva, M. V., Dolzhikov, A. A., Bondarev, V. P., Stefanova, M. S., Soldatov, V. O., Nadezhdin, S. V., Korokin, M. V., et al. (2020). Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*, 8(6), 416–425. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
25. Globa, V. Yu. (2021). Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. (Ph.D. thesis, Kharkiv). <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/> [In Ukrainian].
26. Stefanov, O. V. (Ed.). (2001). Preclinical studies of medicinal products: Methodical recommendations. Kyiv: Avicenna. [In Ukrainian].
27. Atkinson, D. E. (1968). Citrate and citrate cycle in regulation of energy metabolism. In *The metabolic roles of citrate*. pp. 23–40. London & New York.
28. Atkinson, D. E., Walton, G. M. (1967) Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 242(13), 3239-41.
29. Zar, J. H. (2014). *Biostatistical analysis* (5th ed.). Prentice-Hall.
30. De la Fuente, I. M., Cortés, J. M., Valero, E., Desroches, M., Rodrigues, S., Malaina, I., & Martínez, L. (2014). On the dynamics of the adenylate energy system: homeorhesis vs homeostasis. *PloS one*, 9(10), e108676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108676>
31. Wadhwa, K., Pahwa, R., Kumar, M., Kumar, S., Sharma, P. C., Singh, G., Verma, R., Mittal, V., Singh, I., Kaushik, D., & Jeandet, P. (2022). Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(16), 5327. <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>
32. Delmas, D., Xiao, J., Vejux, A., & Aires, V. (2020). Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(9), 2009. <https://doi.org/10.3390/molecules25092009>