

Міністерство охорони здоров'я України
Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РЕДЬКО ОЛЕСЯ СЕРГІЇВНА

УДК 611.36-091.8-02:616.2-022.6]-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ
МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ПРИ ГОСТРОМУ
РЕСПІРАТОРНОМУ ДИСТРЕС-СИНДРОМІ ТА ЗА УМОВ ЙОГО
КОРЕКЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Редько О.С.

Науковий керівник: **Довгалюк Аліна Іванівна**, кандидат біологічних наук,
доцент

Тернопіль – 2024

АНОТАЦІЯ

Редько О. С. Морфо-функціональний стан печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі та за умов його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я») – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2024.

Тернопільський національний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2024.

Дисертація присвячена комплексному дослідженню структурних компонентів та функціональної активності печінки щурів при експериментальному гострому респіраторному дистрес-синдромі (ГРДС) та застосуванні людських мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пуповини. ГРДС моделювали шляхом інтраназального введення ліпополісахариду (ЛПС) попередньо розведеного ізотонічним розчином натрію хлориду (1 мг ЛПС у 4 мл NaCl). ЛПС вводили інтраназально за допомогою небулайзера у дозі 5 мг/кг маси тіла щура протягом 30 хв. Корекцію було проведено введенням людських МСК у дозі 1 млн на кг маси тіла тварини. МСК вводилися внутрішньоочередно розведені у 0,25 мл NaCl.

Експериментальне дослідження проведене на 96 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою тіла 200-220 г. Піддослідних тварин було поділено на 12 груп по 8 тварин у кожній: 1 — інтактні щури; 2 — 6 годин ЛПС; 3 — 24 години ЛПС; 4 — 3 дні ЛПС; 5 — 7 днів ЛПС; 6 — 14 днів ЛПС; 7 — 28 днів ЛПС; 8 — 24 години ЛПС + 2 дні МСК; 9 — 4 дні ЛПС + 3 дні МСК; 10 — 14 днів ЛПС + 14 днів МСК; 11 — 21 день ЛПС + 7 днів МСК; 12 — контроль-МСК (щурі без модельованої патології, яким перитонеально вводили МСК та проводили евтаназію через 3 дні).

Об'єктом дослідження була печінка щурів при змодельованому ГРДС без корекції та після застосування МСК як корегуючого чинника.

Встановлено, що інгаляційне введення ЛПС викликало значні морфофункціональні порушення всіх компонентів печінки, ступінь пошкоджень залежав від терміну експерименту.

У тканинах печінки щурів контрольної групи відхилень від норми виявлено не було.

На 6 годину після введення ЛПС спостерігалися розширені кровонаповнені судини печінки та інфільтрація триад клітинами запалення. Радіальне розташування гепатоцитів у вигляді печінкових балок залишалось збереженим.

На 24 годину після ЛПС зберігалася інфільтрація лейкоцитами периваскулярного простору та розширення міжчасточкових вен. Також були наявні світлі набряклі гепатоцити з підвищеною вакуолізацією цитоплазми та темними гетерохроматиновими ядрами.

На 3 добу у венах та синусоїдах виявлялись ознаки тромбозу. Структура печінки була порушена. У ній фіксувалися темні та світлі типи гепатоцитів. Гідропічно дегенеровані гепатоцити в основному були локалізовані в центральній частині печінкових балок, у той час як темні клітини з базофільною цитоплазмою знаходилися на периферії часточок та біля центральних вен. Зростала кількість гепатоцитів з пікнотичними ядрами.

На 7 добу венозні тромби почали лізуватися. У печінкових часточках наявні групи темних більш базофільних гепатоцитів з еухроматичними ядрами. Однак виявлялася невелика кількість гепатоцитів, що мали світлішу цитоплазму та пікнотичні ядра.

На 14 добу часточкова структура печінки залишалася порушеною. Було видно чіткі окремі групи темних базофільних та світлих гідропічно дегенерованих гепатоцитів. Зберігалася присутність гепатоцитів з пікнотичними ядрами. Залишалися ознаки гемостазу у судинах.

У пізній термін після введення ЛПС (28 доба досліду) спостерігалися великі ділянки вакуолізованих гепатоцитів зі зруйнованими ядрами. Спостерігалось лізування судинних тромбів, запальна інфільтрація периваскулярних ділянок знижувалася. Унаслідок некротичних змін порушувалася часточково-балкова будова печінки.

Застосування МСК як коригуючого чинника створювало сприятливі умови для регенеративних процесів у тканинах печінки.

У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК просвіти судин не були облітеровані. Спостерігалася лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів. На препаратах переважали темні базофільні гепатоцити, які в основному локалізувалися в центральних частинах часточок.

У групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК гепатоцити виявляли менше ознак дегенерації порівняно з групою без корекції (7 днів ЛПС). Була присутня лейкоцитарна інфільтрація портальних трактів.

У групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК часточкова структура печінки збережена навколо центральних вен, у той час як на периферії радіальне розміщення печінкових балок відсутнє. Гепатоцити однорідні, базофільні, не вакуолізовані.

У групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК відмічаються ознаки лейкоцитарної інфільтрації навколо портальних трактів. Наявні поодинокі вакуолізовані гепатоцити на відміну від групи 14 днів ЛПС+ МСК 14 днів, де такі клітини відсутні.

Порівняння структурних змін печінки щурів на різних стадіях ГРДС без корекції та з корекцією МСК виявляє регенеративний та протизапальний потенціал МСК.

Порівняння гістологічних змін печінки груп 28 днів ЛПС, 14 днів ЛПС + 14 днів МСК та 21 день ЛПС + 7 днів МСК показує, що регенеративний ефект МСК зростає зі зростанням тривалості часу після їхнього введення.

При аналізі електронномікроскопічних досліджень, проведених в групах

24 год ЛПС та 3 дні ЛПС, спостережено розвиток ранньої стадії гострого ураження печінки, яка характеризувалася кровонаповненням та стазами в кровоносних судинах, нейтрофільною інфільтрацією паренхіми, активацією макрофагів та пошкодженням ультраструктури гепатоцитів. На противагу цьому, група 24 години ЛПС + 2 дні МСК виявила значне зниження рівнів запалення та набряку. Більше того, її гепатоцити мали збережену ультраструктуру.

На пізніх стадіях ГРДС було виявлено значні ультраструктурні зміни у печінці, включаючи клітинний набряк та пошкодження мітохондрій гепатоцитів. Крім того, спостерігалися гепатоцелюлярний некроз, активація клітин Купфера та трансформація клітин Іто, яка призводила до збільшення відкладень колагену. Введення МСК суттєво зменшила ці ультраструктурні аномалії, відновила цілісність мітохондрій та зменшила клітинний і позаклітинний набряк.

Виявлено, що маркер фіброзу TGF- β 1 майже не експресувався в групі контроль та контроль-МСК та був менш присутній у групах, яким вводилися МСК, у порівнянні з групами без корекції. У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК його експресія знизилася в середньому у 1,7 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС, у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК у 1,4 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК у 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 28 днів ЛПС, у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК у 1,2 раза ($p < 0,05$) у порівнянні з групою 28 днів ЛПС. У групі, якій вводили МСК на ранішій стадії (14 день) спостерігалася значно менша площа відкладення імунопреципітату у порівнянні з групою, якій вводили МСК на пізнішій стадії (21 день) експерименту. Це свідчить про вищий антифібротичний вплив МСК, якщо вона проведена у більш ранні терміни розвитку патології.

Для того, щоб порівняти ступені мікроскопічного пошкодження печінки щурів у різні терміни експерименту без корекції та після корекції МСК нами було визначено комплексну гістологічну оцінку ураження (КГОУ) на основі порівняння даних гістологічного аналізу та імуногістохімічного виявлення експресії TGF- β 1. Підрахунок КГОУ печінки проводився з використанням

спеціально розробленої системи оцінювання, яка складалася з таких параметрів як ступені гепатоцелюлярного некрозу, пошкодження структури печінки, вакуолізації гепатоцитів, запалення, ознаки синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ-синдрому) та фіброзу. Результати свідчать, що ЛПС-індуковане ураження печінки розвивається стадійно. Найвища кількість балів КГОУ була на 28 день. У групі контролю та контролю-МСК не було виявлено ознак ураження печінки. У порівнянні з групами без корекції, групи, кореговані МСК, отримали значно менше балів КГОУ, що свідчить про потенційний терапевтичний ефект МСК.

При імуногістохімічному аналізі на ранніх етапах ГРДС спостерігалася збільшена кількість М1 макрофагів, що вказує на активацію прозапальної відповіді, тоді як на пізніших стадіях хвороби переважали М2 макрофаги з протизапальною функцією та здатністю сприяти відновленню тканин. Введення МСК спричиняло трансформацію макрофагів переважно у М2 фенотип, що сприяло створенню протизапального середовища. У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК площа, заповнена М2 макрофагами, зросла в середньому у 3,3 раза ($p < 0,001$), а площа, зайнята М1 макрофагами, зменшилася у 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС, у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК у 1,3 ($p < 0,001$) і 2,1 ($p < 0,001$) раза відповідно у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК у 1,2 ($p < 0,01$) і 1,1 раза відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС, у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК у 1,4 ($p < 0,001$) і 1,5 ($p < 0,001$) раза відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС.

При біохімічному аналізі печінкових маркерів крові виявлено, що рівні АЛТ, АСТ та ЛФ були значно підвищені у сироватці крові щурів без корекції. Це свідчить про ураження клітин печінки та порушення її функції. На противагу цьому, рівні печінкових маркерів були нижчими у щурів, яким вводилися МСК, у порівнянні з групами без корекції, що свідчить про їхню ефективність у зниженні гепатоцелюлярного та біліарного ураження. У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК рівні АСТ, АЛТ та ЛФ зменшилися на 22,1 %, 13,8 %, 21,9 % ($p < 0,05$)

7
відповідно порівнянні з групою 3 дні ЛПС, у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК на 14,7 %, 5,0 %, 23, 9% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК на 42,1 %, 8,1 %, 10,7 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС, у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК на 43,8 %, 6,8 %, 11,1 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС. При цьому, значення АСТ у групах 14 днів ЛПС + 14 днів МСК та 21 день ЛПС + 7 днів МСК, АЛТ у групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК досягнули величин групи контролю.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні проаналізовано розвиток ураження печінки при змодельованому ГРДС у щурів. Проведені гістологічні, ультрамікроскопічні, імуногістохімічні, біохімічні дослідження встановили стадійність перебігу патологічних змін у печінці в експериментальній моделі ГРДС.

Комплексно вивчено гепатопротекторний та регенеративний ефект МСК при ГРДС-індукованому ураженні печінки щурів. Встановлено відсутність імуногенної дії МСК пуповини людини на тканини печінки щурів. На основі результатів гістологічних, імуногістохімічних, електронномікроскопічних, біохімічних та статистичних аналізів доведено протизапальну, антифібротичну та імуномодулюючу активність досліджуваних МСК. Імуномодулююча дія МСК проявлялася у трансформації макрофагів у напрямку протизапального M2 фенотипу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані щодо регенеративного потенціалу МСК при пошкодженні структур печінки за умов ГРДС дають змогу знайти новітні безпечні шляхи корекції даної патології методами МСК. Це сприятиме оптимізації способів лікування хворих із ГРДС та поліпшенню якості життя даної категорії хворих за скоректованими протоколами лікування. Результати роботи впроваджені в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри гістології, цитології та ембріології та кафедри патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

Ключові слова: печінка, ураження печінки, гострий респіраторний дистрес-синдром, ліпополісахарид, мезенхімальні стовбурові клітини.

ANNOTATION

Redko O. S. Morphofunctional state of the liver during acute respiratory distress syndrome and its treatment by mesenchymal stem cells. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 "Medicine" (22 "Health Care") – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2024.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2024.

The dissertation is dedicated to the comprehensive study of the structural components and functional activity of the liver in rats with experimental acute respiratory distress syndrome (ARDS) and during the use of human umbilical cord mesenchymal stem cells (MSC).

ARDS was modeled through intranasal administration of lipopolysaccharide (LPS) previously diluted in isotonic sodium chloride solution (1 mg LPS per 4 ml NaCl). LPS was administered intranasally using a nebulizer at a dose of 5 mg/kg rat body weight for the duration of 30 minutes. Treatment was performed by the administration of human MSCs at a dose of 1 million per kg body weight. MSCs were administered intraperitoneally diluted in 0.25 ml NaCl.

The experimental study was conducted on 96 sexually mature male Wistar rats weighing 200-220 g. The experimental animals were divided into 12 groups of 8 animals each: 1 – intact rats; 2 – 6 hours of LPS; 3 – 24 hours of LPS; 4 – 3 days of LPS; 5 – 7 days of LPS; 6 – 14 days of LPS; 7 – 28 days of LPS; 8 – 24 hours of LPS + 2 days of MSC; 9 – 4 days of LPS + 3 days of MSC; 10 – 14 days of LPS + 14 days of MSC; 11 – 21 days of LPS + 7 days of MSC; 12 – MSC control (rats without

modeled pathology, which received intraperitoneal MSCs injections and were euthanized 3 days afterwards).

The object of the study was the liver of rats with a modeled ARDS without treatment and after the use of MSCs as a treatment.

It was confirmed that inhalation of LPS caused significant morphofunctional damage in all components of the liver, and the degree of damage depended on the duration of the experiment.

No deviations from the norm were found in the liver tissues of the control group rats.

At 6 hours after LPS administration, dilated blood vessels in the liver and infiltration of inflammatory cells in the triads were observed. The radial arrangement of hepatocytes in the form of liver plates remained preserved.

At 24 hours after LPS administration, leukocyte infiltration of the perivascular space and enlargement of the interlobular veins persisted. Additionally, there were pale swollen hepatocytes with increased cytoplasmic vacuolization and dark heterochromatic nuclei.

At 3 days, signs of thrombosis were detected in the veins and sinusoids. The liver structure was impaired, with dark and light types of hepatocytes observed. Hydropic degenerated hepatocytes were mainly localized in the central part of the liver lobules, while dark cells with basophilic cytoplasm were found at the periphery of the lobules and near the central veins. The number of hepatocytes with pyknotic nuclei increased.

By day 7, venous thrombi began to lyse. Liver lobules contained groups of dark, more basophilic hepatocytes with euchromatic nuclei. However, there was a small number of hepatocytes with lighter cytoplasm and pyknotic nuclei.

At 14 days, the lobular structure of the liver remained damaged. Clear distinct groups of dark basophilic and light hydropic degenerated hepatocytes were visible. Hepatocytes with pyknotic nuclei were still present, and signs of hemostasis in vessels persisted.

At the late term after LPS administration (28 days of the experiment), large areas of vacuolated hepatocytes with disrupted nuclei were observed. Lysis of vascular thrombi occurred, and inflammatory infiltration of perivascular areas decreased. The lobular architecture of the liver was impaired due to necrotic changes.

The use of MSC as a treatment factor created favorable conditions for regenerative processes in liver tissues.

In 24 hours of LPS + 2 days of MSC group, the vessel lumens were not obliterated. Lymphohistiocytic infiltration of the portal tracts was observed. Dark basophilic hepatocytes predominated, mainly localized in the central parts of the lobules.

In 4 days of LPS + 3 days of MSC group, hepatocytes contained fewer signs of degeneration compared to the untreated group (7 days of LPS). Leukocytic infiltration of the portal tracts was present.

In 14 days LPS + 14 days MSC group, the lobular structure of the liver was preserved around the central veins, while radial arrangement of hepatic cords was absent in the periphery. Hepatocytes were homogeneous, basophilic, and non-vacuolated.

In 21 days LPS + 7 days MSC group, signs of leukocyte infiltration around portal tracts were noted. Isolated vacuolated hepatocytes were present, unlike in the group 14 days LPS + 14 days MSC, where such cells were absent.

Comparison of structural changes in the liver of rats at different stages of ARDS without and with MSC treatment reveals the regenerative and anti-inflammatory potential of MSC.

Comparison of histological changes in the liver of 28 days LPS, 14 days LPS + 14 days MSC, and 21 days LPS + 7 days MSC groups shows that the regenerative effect of MSC increases with the duration of time after their administration.

Analysis of electron microscopy images of 24 hours LPS and 3 days LPS groups revealed the development of early stages of acute liver injury, characterized by congestion and stasis in blood vessels, neutrophil infiltration of parenchyma,

macrophage activation, and hepatocyte ultrastructural damage. In contrast, 24 hours LPS + 2 days MSC group showed a significant reduction in inflammation levels and edema. Furthermore, its hepatocytes exhibited preserved ultrastructure.

At the late stages of ARDS, significant ultrastructural changes in the liver were observed, including cellular swelling and mitochondrial damage in hepatocytes. Additionally, hepatocellular necrosis, Kupffer cell activation, and transformation of Ito cells leading to increased fibrin deposits were observed.

MSC therapy significantly reduced these ultrastructural anomalies, restored mitochondrial integrity, and reduced cellular and extracellular edema.

It was found that the fibrosis marker TGF- β 1 was barely expressed in the control and MSC control groups and was less present in the MSC-treated groups compared to untreated ones. In 24 hours of LPS + 2 days of MSC group, its expression decreased by an average of 1.7 times ($p < 0.001$) compared to 3 days of LPS group. In 4 days of LPS + 3 days of MSC group, it decreased by 1.4 times ($p < 0.001$) compared to 7 days of LPS group. In 14 days of LPS + 14 days of MSC group, it decreased by 1.8 times ($p < 0.001$) compared to 28 days of LPS group. In 21 days of LPS + 7 days of MSC group, it decreased by 1.2 times ($p < 0.05$) compared to 28 days of LPS group. In the group treated at an earlier stage (14 days), a significantly smaller area of immunoprecipitate deposition was observed compared to the group treated at a later stage (21 days) of the experiment. This indicates a higher anti-fibrotic effect of MSC therapy when administered at earlier stages of pathology.

To compare the degrees of microscopic liver damage in rats at different stages of the experiment without treatment and after MSC treatment, we conducted the comprehensive histological assessment of damage (CHAD) based on comparing histological analysis data and immunohistochemical detection of TGF- β 1 expression. Liver CHAD assessment was performed using a specially developed assessment system, which included parameters such as the degree of hepatocellular necrosis, liver structure damage, hepatocyte vacuolization, inflammation, signs of disseminated intravascular coagulation (DIC) syndrome, and fibrosis. The results indicate that LPS-

induced liver damage develops in stages, with the highest score observed at 28 days. No signs of liver damage were found in the control and MSC control groups. Compared to untreated groups, the MSC-treated groups had significantly lower CHAD scores, indicating a potential therapeutic effect of MSC.

Immunohistochemical analysis of the early stages of ARDS showed an increased number of M1 macrophages, indicating activation of the pro-inflammatory response, while at later stages of the disease, M2 macrophages with anti-inflammatory function and tissue repair ability predominated. MSC administration induced the transformation of macrophages predominantly into the M2 phenotype, contributing to the creation of an anti-inflammatory environment. In 24 hours of LPS + 2 days of MSC group, the area occupied by M2 macrophages increased by an average of 3.3 times ($p < 0.001$), while the area occupied by M1 macrophages decreased by 1.8 times ($p < 0.001$) compared to 3 days of LPS group. In 4 days of LPS + 3 days of MSC group, the respective changes were 1.3 ($p < 0.001$) and 2.1 ($p < 0.001$) times compared to 7 days of LPS group. In 14 days of LPS + 14 days of MSCs group, the changes were 1.2 ($p < 0.01$) and 1.1 times, respectively, compared to 28 days of LPS group. In 21 days of LPS + 7 days of MSC group, the changes were 1.4 ($p < 0.001$) and 1.5 ($p < 0.001$) times, respectively, compared to 28 days of LPS group.

Biochemical analysis of liver markers in the blood serum revealed significantly elevated levels of ALT, AST, and ALP in untreated rats, indicating liver cell damage and impairment of its function. In contrast, liver marker levels were lower in rats treated with MSC compared to untreated groups, indicating their effectiveness in reducing hepatocellular and biliary damage. In 24 hours of LPS + 2 days of MSC group, the levels of AST, ALT, and ALP decreased by 22.1 %, 13.8 %, and 21.9 % ($p < 0.05$), respectively, compared to 3 days of LPS group. In 4 days of LPS + 3 days of MSCs group, the respective decreases were 14.7 %, 5.0 %, and 23.9 % ($p < 0.05$) compared to 7 days of LPS group. In 14 days of LPS + 14 days of MSC group, the decreases were 42.1 %, 8.1 %, and 10.7 % ($p < 0.05$) compared 28 days of LPS group. In 21 days of LPS + 7 days of MSC group, the decreases were 43.8 %, 6.8 %, and 11.1

% ($p < 0.05$) compared to 28 days of LPS group. Moreover, the AST levels in 14 days of LPS + 14 days of MSC and 21 days of LPS + 7 days of MSC groups, as well as ALT levels in 24 hours of LPS + 2 days of MSCs group, reached the levels of the control group.

Scientific novelty of the obtained results: For the first time in Ukraine, the development of liver injury during simulated ARDS in rats has been analyzed. Histological, ultramicroscopic, immunohistochemical, biochemical studies established the stages of pathological changes in the liver in the experimental ARDS model.

The hepatoprotective and regenerative effects of MSC in ARDS-induced liver injury in rats have been comprehensively studied. It has been established that human umbilical cord MSCs do not exhibit immunogenic effects on the liver tissues of rats. Based on the results of histological, immunohistochemical, electron microscopic, biochemical, and statistical analyses, the anti-inflammatory, antifibrotic, and immunomodulatory activities of the investigated MSC were demonstrated. The immunomodulatory effect of MSC was manifested in the transformation of macrophages towards the anti-inflammatory M2 phenotype.

Practical significance of the obtained results: The data on the regenerative potential of MSC for the liver structure damage during ARDS conditions provide an opportunity to find innovative and safe ways to treat this pathology using cell therapy methods. This will contribute to optimizing the treatment of patients with ARDS and improving the quality of life of this category of patients using improved treatment protocols. The results of the work are implemented in the educational process and scientific research of the Department of Histology, Cytology, and Embryology and the Department of Pathological Physiology of Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University.

Keywords: liver, liver injury, acute respiratory distress syndrome, lipopolysaccharide, mesenchymal stem cells.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Redko O, Dovhalyuk A, Dovbush A, Nebesna Z, Yakubyshyna L, Krynytska I. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stem cells therapy for liver failure. *Cell Organ Transpl.* 2021;9(2):136-142. DOI: 10.22494/cot.v9i2.130

2. Редько ОС, Довгалюк АІ. Морфологічні зміни печінки щура при гострому респіраторному дистрес-синдромі у різні терміни експерименту. *Вісник медичних і біологічних досліджень.* 2022;(4):52–57. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2022.4.13317

3. Redko O, Dovgalyuk A, Nebesna Z, Kramar S, Sverstyuk A, Korda M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells mitigate lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(1):34-45. Q4. DOI: 10.22494/cot.v11i1.148

4. Редько О, Довгалюк А. Ультраструктурні зміни печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом та після корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами у ранні терміни експерименту. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* 2023;22(3):84–90. DOI: 10.24061/1727-0847.22.3.2023.34

5. Redko O, Dovgalyuk A, Kramar S, Ohinska N, Nebesna Z, Korda M. Mesenchymal stem cell therapy modulates macrophage dynamics in ARDS-associated liver injury in rats. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(2):114-121. Q4. DOI: 10.22494/cot.v11i2.157

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Палій І, Загричук Ю, Редько О. Аналіз ростових властивостей та каріотипу стовбурових клітин пуповини щурів. В: *Матеріали XXV міжнародного медичного конгрес студентів та молодих вчених; 2021 Квіт. 12-14; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с. 285-286.*

7. Редько ОС, Довгалюк АІ, Палій ІР. Підбір моделі ГРДС для вивчення ефективності методів корекції важких станів при COVID-19. В: Матеріали XXI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 35-ій річниці Чорнобильської катастрофи Довкілля і здоров'я; 2021 Квіт. 22-24; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с. 51-53.

8. Редько ОС, Довгалюк АІ, Крамар СБ. Гістологічні зміни печінки щура при експериментальному гострому респіраторному дистрес-синдромі. В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю від дня народження професорки Вікторії Антонівни Малішевської Прикладні питання сучасної морфології; 2022 Берез. 23-24; Чернівці. Чернівці; 2022, с. 97-100.

9. Dovgalyuk A, Redko O, Dovbush A, Kramar S, Sverstyuk A. The effect of MMSCs on the cytokine profile in the lungs of rats with simulated ARDS. 4Th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences; 2022 Apr 7-8; Prague, Czech Republic. Prague; 2022, p. 115.

10. Редько О, Тесля В, Поліщук Н. Мікроскопічний стан печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом у пізні терміни експерименту. В: Матеріали XXVI міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2022, с. 220.

11. Редько О, Довгалюк Б, Саковець А. Імуногістохімічне виявлення TGF- β у тканинах печінки щурів при змодельованому гострому респіраторному дистрес-синдромі та його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. В: Матеріали XXVII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2023 Квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с. 282.

12. Redko O, Dovhaliuk B, Sakovets A. Histological analysis of mesenchymal stem cell therapy efficacy for liver injury in rat model of acute respiratory distress syndrome. 5th RECOOP International Student and 18th RECOOP

Bridges in Life Sciences Conferences; 2023 Apr 20-21; Budapest, Hungary. Budapest; 2023, p. 52.

13. Редько ОС, Крамар СБ, Андріішин ОП. Імуногістохімічне виявлення CD68 у тканинах печінки щурів при змодельованому гострому респіраторному дистрес-синдромі та його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. В: Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої пам'яті члена- кореспондента НАМН України д. мед. н. професора Ю. Б. Чайковського Тканинні реакції в нормі експерименті та клініці; 2023 Черв. 8-9; Київ. Київ; 2023, с. 137.

14. Редько ОС, Довгальок АІ, Крамар СБ, Довбуш АВ. Застосування мезенхімальних стовбурових клітин для корекції ураження печінки у щурів, викликаного гострим респіраторним дистрес-синдромом. В: Матеріали підсумкової LXVI науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2023 Черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с. 136-137.

15. Redko O., Dovgalyuk A., Kramar S., Korda M. M1-M2 macrophage shift in the liver of rats with simulated ARDS: impact of MSC therapy. В: Матеріали XI наукового симпозіуму з міжнародною участю Імунопатологія при захворюваннях органів дихання і травлення; 2023 Жовт. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с.40-43.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1 Морфофункціональна характеристика структурних компонентів печінки щурів	26
1.2 Ультрамікроскопічні зміни печінки при її експериментальному ураженні	30
1.3 Гострий респіраторний дистрес-синдром	32
1.4 Взаємозв'язок між печінкою та легеньми за умов розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому	33
1.5 Ураження печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі, викликаному COVID-19	36
1.6 Вплив стовбурових клітин на морфофункціональний стан печінки	38
1.7 Клінічні дослідження ефективності клітинної терапії уражень печінки	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1 Постановка дослідження та об'єкт досліджень	44
2.2 Методи дослідження та їхнє обґрунтування	46
РОЗДІЛ 3 МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ІНТАКТНОЇ ГРУПИ ТА ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРОГО РЕСПІРАТОРНОГО ДИСТРЕС-СИНДРОМУ	51
3.1 Гістологічна, електронномікроскопічна та імуногістохімічна характеристика структурних компонентів печінки тварин інтактної групи	51
3.2 Гістологічні, електронномікроскопічні та імуногістохімічні зміни в тканинах печінки після моделювання гострого респіраторного дистрес-синдрому	56
РОЗДІЛ 4 МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ РЕСПІРАТОРНОМУ ДИСТРЕС-	

СИНДРОМІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ	18
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН	87
4.1 Гістологічна, електронномікроскопічна та імуногістохімічна характеристика структурних компонентів печінки тварин групи контроль-МСК	87
4.2 Гістологічні, електронномікроскопічні та імуногістохімічні зміни печінки після моделювання гострого респіраторного дистрес-синдрому за умов застосування мезенхімальних стовбурових клітин	91
РОЗДІЛ 5 БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ РІВНІВ ПЕЧІНКОВИХ МАРКЕРІВ У КРОВІ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН	112
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	124
ВИСНОВКИ	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	140
ДОДАТКИ	165

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ГРДС – гострий респіраторний дистрес-синдром;
МСК – мезенхімальні стовбурові клітини;
ЕВ – екстрацелюлярні везикули;
ІЛ – інтерлейкіни;
БГФ — білки гострої фази;
ПАМП — патоген-асоційовані молекулярні патерни;
ДАУ — дифузне альвеолярне ураження;
СД – кластери (маркери) диференціації клітин;
ГКГ — головний комплекс гістосумісності;
ЛПС — ліпополісахарид;
ЕС — ендоплазматична сітка;
ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка;
АЕС – агранулярна ендоплазматична сітка;
ДВЗ – дисеміноване внутрішньосудинне згортання;
TGF- β 1 – трансформуючий фактор росту β 1;
АСТ — аспаратамінотрансфераза;
АЛТ — аланінамінотрансфераза;
ЛФ — лужна фосфатаза;
ГГТ — гама-глутамілтрансфераза;
КГОУ — комплексна гістологічна оцінка ураження.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС) – це гостра дихальна недостатність, що виникає в критично хворих пацієнтів. ГРДС часто асоційований з множинною органною недостатністю. Причинами ГРДС може бути пневмонія, сепсис, аспірація шлункового вмісту, політравма. Також ГРДС характерний для важких випадків COVID-19 — 15 % [93; 216].

Встановлено, що відмінною ознакою гострого перебігу COVID-19 є так званий цитокиновий шторм в легенях, під час якого спостерігають ініційоване вірусом різке вивільнення прозапальних цитокинів, таких як ІЛ-6, що викликає набряк легень, ГРДС і гостру серцеву недостатність. [89; 170; 172; 206].

ГРДС характеризується вираженою гіпоксемією, некардіальним набряком легень та дифузним альвеолярним пошкодженням [26; 82; 173; 174]. Основним патогенетичним механізмом ураження органів та систем при ГРДС є гіпоксія.

При ГРДС відбуваються значні структурно-клітинні зміни органів та систем. Зокрема, у печінці спостерігається збільшення діаметру гепатоцитів та їхніх ядер, порушення ядерно-плазматичного співвідношення, зростання відносного об'єму стромы, стромально-паренхіматозного співвідношення та відносного об'єму ушкоджених гепатоцитів, зумовлене ішемічними розладами в печінці [1].

Незважаючи на досягнення в розумінні патогенезу ГРДС та розвитку підтримуючих підходів до догляду хворих, ГРДС залишається небезпечним, загрозливим для життя станом, з високим показником смертності (коливається від 35 до 60 %) [123; 140]. Хворі всіх профілів з ГРДС потребують лікування у відділенні інтенсивної терапії. Крім того, пацієнти, які виживають, зазвичай стикаються з тривалою захворюваністю та мають довгий відновлювальний період, що суттєво погіршує якість їхнього життя [22; 38; 65; 143; 144; 174; 182].

Важкі наслідки пандемії COVID-19 зумовлюють нагальну потребу пошуку нових методів терапії ГРДС. Одним із перспективних напрямків біомедицини є застосування мезенхімальних стовбурових клітин.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) – це негематопоеичні стовбурові клітини з низькою імуногенністю, що секретують такі паракринні фактори як фактори росту ендотелію, фібробластів, кератиноцитів та гепатоцитів, протизапальні цитокіни та протимікробні пептиди. МСК володіють високими протизапальними, імуномодулюючими та імуносупресивними властивостями [68].

МСК є цінним джерелом біологічно активних речовин, що володіють ангіогенними, антиапоптотичними, антиоксидантними і мітогенними ефектами, тому здатні ефективно стимулювати відновлення відсутніх, дисфункціональних чи пошкоджених клітин, тканин і органів для відтворення їхньої нормальної функції [68].

У багатьох дослідженнях *in vitro* МСК були диференційовані у функціонуючі гепатоцитоподібні клітини, що згодом були успішно застосовані для регенерації уражень печінки [90; 133; 207].

Численними доклінічними дослідженнями й клінічними випробуваннями [59; 93; 120] доведено, що клітинна терапія є безпечною і має потужну імуномодулюючу дію, що свідчить про перспективність МСК терапії ГРДС.

Однак переважна більшість цих досліджень виконана на МСК кісткового мозку, гарвестування яких є болючою високоінвазивною процедурою [164].

Пуповина є альтернативним більш доступним джерелом МСК, для гарвестування яких застосовуються неінвазивні методи [108]. МСК, виділені з пуповини, вважають проміжним типом між ембріональними стовбуровими клітинами та стовбуровими клітинами дорослого організму. Важливими перевагами перинатальних стовбурових клітин є доступність, економічність, біоетичність, неімуногенність і низький ризик передачі інфекцій [108].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є фрагментом держбюджетної комплексної міжкафедральної науково-дослідної роботи Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Дослідження регенеративного потенціалу засобів клітинної терапії при гострому респіраторному дистрес-синдромі» (номер державної реєстрації 0121U100159) та ініціативної комплексної міжкафедральної науково-дослідної роботи Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Дослідження регенеративного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при пошкодженні тканин в експерименті та перспективи їхнього терапевтичного застосування» (номер державної реєстрації 0120U104146). Здобувачка була співвиконавицею даних науково-дослідних робіт.

Мета дослідження: вивчити терапевтичний потенціал МСК пуповини у печінці лабораторних щурів за умов експериментального ГРДС.

Завдання дослідження:

1. Провести гістологічний, імуногістохімічний та субмікроскопічний аналіз структурних компонентів печінки та біохімічних показників крові інтактних щурів.
2. Оцінити вплив інтраперитонеальних ін'єкцій ксеногенних МСК пуповини людини на морфофункціональний стан печінки щурів без змодельованої патології.
3. Вивчити морфо-функціональні зміни печінки щурів на ранніх стадіях розвитку ГРДС.
4. Дослідити мікроскопічний, субмікроскопічний стан зразків печінки, кількісний розподіл субпопуляцій макрофагів в них та рівні печінкових маркерів у сироватці крові на середніх стадіях розвитку ГРДС.
5. Дослідити характер мікроскопічних, ультрамікроскопічних,

імуногістохімічних змін зразків печінки та біохімічних параметрів крові на пізніх стадіях розвитку ГРДС.

6. Оцінити зміни печінки щурів зі змодельованим ГРДС після корекції МСК у ранні терміни експерименту та порівняти їх з відповідними групами без корекції.
7. З'ясувати особливості регенеративних процесів у печінці щурів зі змодельованим ГРДС після корекції МСК у середні терміни експерименту та порівняти їх з відповідними групами без корекції.
8. Порівняти терапевтичну ефективність МСК на пізніх термінах експерименту залежно від тривалості часу після їхнього введення.

Об'єкт дослідження: печінка щурів при змодельованому ГРДС без корекції та після застосування МСК як корегуючого чинника.

Предмет дослідження: морфо-функціональні характеристики печінки при змодельованій патології ГРДС та за умов використання МСК для її корекції.

Методи дослідження: гістологічні (світлооптичні та електронномікроскопічні) для встановлення якісних змін структурних компонентів печінки; імуногістохімічні для оцінки субпопуляцій макрофагів та рівнів експресії маркера фіброзу TGF- β 1 у тканинах печінки, біохімічні для визначення рівнів маркерів ураження печінки аспартатамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ) та лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові, статистичні для обробки та визначення достовірності даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні проаналізовано розвиток ураження печінки при змодельованому ГРДС у щурів. Проведені гістологічні, ультрамікроскопічні, імуногістохімічні, біохімічні дослідження встановили стадійність перебігу патологічних змін у печінці в експериментальній моделі ГРДС.

Комплексно вивчено гепатопротекторний та регенеративний ефект МСК при ГРДС-індукованому ураженні печінки щурів. Встановлено відсутність

імуногенної дії МСК пуповини людини на тканини печінки щурів. На основі результатів гістологічних, імуногістохімічних, електронномікроскопічних, біохімічних та статистичних аналізів доведено протизапальну, антифібротичну та імуномодулюючу активність досліджуваних МСК. Імуномодулююча дія МСК проявлялася у трансформації макрофагів у напрямку протизапального M2 фенотипу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані щодо регенеративного потенціалу МСК при пошкодженні структур печінки за умов ГРДС дають змогу знайти новітні безпечні шляхи корекції даної патології методами клітинної терапії. Це сприятиме оптимізації способів лікування хворих із ГРДС та поліпшенню якості життя даної категорії хворих за скоректованими протоколами лікування.

Результати роботи впроваджені в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри гістології, цитології та ембріології та кафедри патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Особистий внесок здобувача. Авторка самостійно провела інформаційний пошук та аналіз джерел наукової літератури. Провела морфологічні дослідження, проаналізувала гістологічні, імуногістохімічні та електронномікроскопічні препарати, виконала статистичну обробку даних. Визначення мети і завдань, планування досліджень, інтерпретацію отриманих даних нових наукових результатів і висновків проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднені на XXI всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 35-ій річниці Чорнобильської катастрофи (Тернопіль, 2021); XXV, XXVI, XXVII міжнародних медичних конгресах студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2021, 2022, 2023); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100- річчю від дня

народження професорки Вікторії Антонівни Малішевської (Чернівці, 2022); 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (Prague, Czech Republic, 2022); 5th RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (Budapest, Hungary, 2023); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам'яті члена-кореспондента НАМН України д. мед. н. професора Ю. Б. Чайковського (Київ, 2023); підсумковій LXVI науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2023); XI науковому симпозиумі з міжнародною участю "Імунопатологія при захворюваннях органів дихання і травлення" (Тернопіль, 2023).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, із них 5 статей у фахових наукових виданнях України (3 – у виданні, що індексується у Scopus), 10 – у матеріалах наукових конференцій та конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 171 сторінці комп'ютерного тексту і складається з анотації, вступу, шести розділів, висновків, списку використаних джерел (у кількості 217 бібліографічних описів) та додатків. Робота ілюстрована 67 рисунками і містить 17 таблиць. Список використаних джерел і додатки викладено на 32 сторінках комп'ютерного тексту.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Морфофункціональна характеристика структурних компонентів печінки щурів

Головною функцією печінки є детоксикація шкідливих речовин, які потрапляють у кров. Також печінка бере участь у виробленні жовчі, білків крові, холестеролу, імунних факторів, зберіганні та вивільненні глюкози, перетворенні аміаку на сечовину. Фетальна печінка є місцем початкового гематопоезу у ссавців [130].

Печінка щурів знаходиться у правій частині черевної порожнини. Має дві поверхні — опуклу діафрагмальну (*facies diaphragmatica*) та увігнуту вісцеральну (*facies visceralis*). Діафрагмальна поверхня печінки прилягає до діафрагми та правої черевної стінки, є майже повністю вкрита очеревиною та є місцем прикріплення серпоподібної зв'язки (*ligamentum falciforme hepatis*). Частина діафрагмальної поверхні, не вкрита очеревиною, має назву голе поле (*area nuda*). До неї входять ліва латеральна та медіальна частки печінки. Вісцеральна поверхня прилягає до органів черевної порожнини (шлунку, дванадцятипалої кишки, ободової кишки та правої нирки) [168]. У місці прилягання цих органів знаходяться відповідні втиснення — шлункове (*impressio gastrica*), дванадцятипалокишкове (*impressio duodenalis*), ободовокишкове (*impressio colica*), ниркове (*impressio renalis*). Вісцеральна поверхня повністю вкрита очеревиною. На ній знаходяться ворота печінки (*porta hepatis*). Вони є місцем впадання портальної вени, печінкової артерії, нервів, лімфатичних судин та виходу загальної жовчної протоки [180].

Діафрагмальна та вісцеральна поверхні відділені між собою краями печінки — правим, лівим, вентральним і дорзальним. На дорзальному краю

міститься стравохідне втиснення (*impressio esophagea*) і каудальна порожниста вена (*v. cava caudalis*) [180].

Печінка щурів має 4 частки— ліву, або ліву латеральну (*lobus hepatis sinister lateralis*), праву, або праву латеральну (*lobus hepatis dexter lateralis*), медіальну (*lobus medialis*) і хвостату (*lobus caudatus*) [96; 168; 177].

Хвостата частка, або частка Шпігеля, розташовується між каудальною порожнистою веною і лівою гілкою порталльної вени. Вона має 2 відростки — папілярний (*processus papillaris*) і хвостатий (*processus caudatus*). Папілярний відросток менший за розміром, розташований зліва від воріт, поділяється на 2 частини — превентрикулярну (*pars prehepaticularis*) та ретровентрикулярну (*pars retrohepaticularis*). Хвостатий відросток більший, розташований справа [180].

Щури, на відміну від людей, не мають жовчного міхура і загальної жовчної протоки (*ductus choledocus*) [127]. У них є лише загальна печінкова протока (*ductus hepaticus communis*), утворена правою і лівою печінковими протоками (*ductus hepaticus dexter et sinister*). У кожній із часток печінки є власні внутрішньопечінкові жовчні протоки. Загальна печінкова протока розташована вентрально справа від порталльної вени і впадає у дванадцятипалу кишку [180].

Печінкова артерія (*a. hepatica*) приносить до печінки кров, багату киснем. Вона відходить від черевної артерії (*a. coeliaca*), йде між порталною веною і правим боком папілярного відростка до воріт печінки (*porta hepatis*). Перед впадінням у ворота вона ділиться на праву та ліву гілки (*r. dexter et sinister*). Права гілка у свою чергу поділяється на праву латеральну (*r. dexter lateralis*) та праву медіальну гілки (*r. dexter medialis*) [180].

Портальна вена (*v. portae*) переносить частково дезоксигеновану, багату на нутрієнти кров від капілярів непарних органів черевної порожнини до печінки. Позапечінкова частина порталльної вени знаходиться ззаду та латерально від печінкової артерії та загальної жовчної протоки. У воротах

печінки стовбур порталльної вени ділиться на праву та ліву гілки (r. dexter et sinister) [180].

Мікроскопічна архітектура печінки складається із класичних печінкових часточок — полігональних структур із порталними трактами на периферії та центральною веною в центрі [96; 127]. Гепатоцити утворюють печінкові балки, що підтримуються ретикуліном — тонкою сіткою ретикулярних волокон — і йдуть від порталних трактів до центральних вен. Між балками розташовані печінкові синусоїди — капіляри печінки — товщиною в одну клітину. Стінки синусоїдів утворені фенестрованим ендотелієм з великими порами, через які вільно виходить плазма. Між ендотелієм і гепатоцитами знаходиться перикапілярний (перисинусоїдний) простір Діссе, у якому плазма крові напряму контактує з гепатоцитами і де відбувається обмін макромолекулами [177]. Багата білками плазма із синусоїдів через простір Діссе йде на периферію часточок і там потрапляє до перипортального простору Mall, що розташований між стромою порталного тракту і зовнішніми гепатоцитами печінкових часточок, звідки бере початок лімфатична система печінки. З простору Mall лімфа потрапляє у лімфатичні капіляри, які у свою чергу зливаються у малі лімфатичні судини, що виводять лімфу через ворота печінки у велику грудну протоку [127].

Кров і жовч у печінці переносяться у протилежних напрямках — кров прямує від периферії часточки до центральної вени по синусоїдах, а жовч секретується в каналці між гепатоцитами і спрямовується за допомогою гепатоцелюлярних мікроворсинок на периферію, де потрапляє у жовчні протоки порталних трактів [96; 127; 177].

До порталних трактів входять артеріоли (термінальні гілки печінкової артерії), венули (термінальні гілки порталльної вени), жовчні протоки, вистелені кубоїдним епітелієм, та лімфатичні судини [96; 177].

Хоча більшість гепатоцитів у щурів у нормі має одне ядро, іноді трапляються дво- або багатоядерні гепатоцити.

У синусоїдному просторі знаходяться резидентні макрофаги (клітини Купфера), які беруть участь у фільтрації чужорідних речовин, що надходять у печінку через порталну вену [177].

Особливостями будови печінки щурів, у порівнянні з печінкою людини, є наступні морфологічні характеристики:

1. У щурів синусоїди впадають не лише у центральні вени, а також у більші за розміром підчасточкові вени і збірні вени.
2. У щурів до синусоїдів надходить кров не лише із термінальних гілок порталних вен, а ще із інших гілок порталних вен, у тому числі великих.
3. У щурів відсутні септальні гілки порталних вен, які відгалужуються по краях класичних часточок і формують осі ацинусів Раппапорта.
4. У щурів часто трапляються анастомози між печінковими і порталними венами.
5. У щурів і малі, і більші гілки порталних вен оточені сплетінням жовчних проток, тоді як у людей вони знаходяться переважно біля великих вен [127].

Овальні клітини печінки — це малодиференційовані клітини печінки гризунів. Вони активуються при важкому ушкодженні печінки, коли проліферація гепатоцитів неможлива. У здоровій печінці їхня кількість становить 1-3 %. Овальні клітини беруть початок в кінцевих гілках внутрішньопечінкової біліарної системи та каналцях Герінга (юксталобулярних холангіолах) [54].

Вони отримали таку назву через своє овальне ядро. Овальні клітини — біпотентні клітини-прекурсори, які здатні диференціюватися у клітини жовчних проток, (активовані холангіоцити, розташовані перипортально) та гепатоцити (печінкові прогеніторні клітини, розташовані інтрапаренхімно, у вогнищах фіброзу та на периферії вузликів регенерації). Ультраструктурно

ідентифікуються 4 типи овальних клітин — тип 0 (примітивні), тип 1 (недиференційовані, базальні), тип 2 (біліарно диференційовані) і тип 3 (гепатоцитарно диференційовані) [13; 121].

1.2 Ультрамікроскопічні зміни печінки при її експериментальному ураженні

Nafady et al. описували електронномікроскопічні дослідження клітин стінок синусоїдних капілярів печінки щурів з гепатотоксичністю, спричиненою введенням ацетамінофену та ендотоксину *Escherichia coli* [136]. У щурів, яким вводили ацетамінофен, у гострій стадії спостерігалася гідропічна та жирова дегенерація паренхіми печінки. Клітини синусоїдного ендотелію були набряклі, пори звужені. Клітини Купфера активовані, набряклі, проліферуючі, містили велику кількість везикул [136].

Клітини Іто у хронічній стадії гепатотоксичності, викликаній ацетамінофеном, інтенсивно продукували волокна колагену у простір Діссе та поміж гепатоцитів. У цитоплазмі гепатоцитів спостерігалася жирова дегенерація. У синусоїдному ендотелії реєструвалися великі проміжки унаслідок деструкції мембран [136].

У гострій стадії гепатотоксичності, викликаній ендотоксином, спостерігалася значна активація клітин Купфера, а саме зростання їхнього розміру та кількості, числа фагосом, що містили еритроцити. Гіпертрофовані клітини Купфера закупорювали синусоїдний простір. Також спостерігався набряк ендотелію, гідропічна та жирова дегенерація гепатоцитів [136].

Xu et al. вивчали ураження печінки при ліпополісахарид (ЛПС)-зумовленому сепсисі на свинячій моделі. При цьому спостерігалася набрякання мітохондрій, розширення ендоплазматичної сітки, деформація ядер, порушення цілісності ядерної мембрани з витоком хроматину [199].

Xie et al. описали щурячу модель розвитку гострої печінкової недостатності на фоні хронічної. При цьому ядерний хроматин гепатоцитів піддослідних тварин був фрагментований, а гранулярна ендоплазматична сітка (ГЕС) не спостерігалася. У мітохондріях зникли кристи, проте формувалися численні вакуолі [195].

Zhang et al. моделювали ураження печінки у свиней за допомогою ЛПС. Вони відмітили зростання кількості мітохондрій у гепатоцитах та їхній подальший розпад, появу аутофагосом, розширення ендоплазматичної сітки, деформацію ядра, порушення цілісності ядерної мембрани та витік хроматину [212].

Yang et al. у своєму описі щурячої моделі розвитку гострої печінкової недостатності на фоні хронічної спостерігали на ранній стадії деформацію ядер, конденсацію хроматину, спорожніння цитоплазми та набряклі вакуолізовані мітохондрії гантелеподібної форми. У подальшому відбувалася фрагментація ядер гепатоцитів та фагоцитування клітинами Купфера некротичних клітин та апоптотичних тілець [204].

Huang et al. описали мишачу модель гострого ураження печінки, звернувши увагу на зменшений вміст глікогену в печінці піддослідних мишей, а також на зменшення розмірів мітохондрій та підвищення щільності мембран, що є головною ознакою фероптозу [80].

Фероптоз — одна з форм програмованої клітинної смерті, що характеризується залізо залежним накопиченням продуктів перекисного окиснення ліпідів. Фероптоз відіграє важливу роль при патологіях печінки, у тому числі гострому ураженні та фіброзі печінки [29].

Yu et al. моделювали ураження печінки *in vitro* за допомогою ізольованих гепатоцитів курей. При цьому у клітинах спостерігалися набряклі, вакуолізовані мітохондрії з дизінтегрованими кристами [209].

1.3 Гострий респіраторний дистрес-синдром

ГРДС — це симптомокомплекс гострої дихальної недостатності, що характеризується значною гіпоксемією (індекс оксигенації менше 300), некардіогенним набряком легень, дифузним альвеолярним пошкодженням та наявністю легеневих клітинних інфільтратів [125; 148].

ГРДС був уперше описаний у 1967 р. під час В'єтнамської війни, під назвою «шокова легеня» або легеня «Дананг» [19].

Патогенез ГРДС включає в себе дифузне альвеолярне ураження (ДАУ), а саме: значне пошкодження альвеолярного епітелію, нейтрофільну інфільтрацію, активацію альвеолярних макрофагів, вироблення цитокінів та хемокінів, вихід плазми за межі судин, прокоагулянтну активність, що супроводжується відкладенням колагену, формування гіалінових мембран, проліферацію міофібробластів та фіброз міжальвеолярних просторів [70].

ГРДС має три стадії: ексудативну (гостру), фіброплазії (проліферації або реабілітації) та фіброзу або розршення [57; 97]. У першій гострій фазі ГРДС відбувається дифузне ураження легень. Далі воно або поступово розршується, або прогресує до інтерстиційного фіброзу [26].

За індексом оксигенації PaO_2/FiO_2 ГРДС поділяється на легкий ($PaO_2/FiO_2 = 200 - 300$ mmHg), помірний ($100 - 199$ mmHg) та важкий (< 100 mmHg) [26; 65].

ГРДС часто призводить до розвитку множинної органної дисфункції. Важкість нелегеневої поліорганної недостатності при ГРДС збільшується зі зростанням гіпоксемії [91].

ГРДС відіграє значну роль у рівні захворюваності та смертності критично хворих [21]. Більше ніж 10 % пацієнтів у реанімації та майже 25 % пацієнтів, які потребують механічної вентиляції, підпадають під критерії ГРДС. Смертність при ГРДС становить від 35 % до 46 % [21] та зазвичай настає від прогресуючої множинної органної недостатності, а не від рефрактерної

гіпоксемії. У тих, хто вижив, спостерігаються значні довгострокові патології, такі як легеневий фіброз, що призводить до постійної дисфункції легень [21; 38; 65; 143; 144 174; 182].

На даний момент єдиним лікуванням ГРДС є підтримуюча терапія за допомогою механічної вентиляції легень, антибіотикотерапії, седації, обмеження введення рідин, нейро-м'язової блокади, лежання на животі та екстракорпоральної мембранної оксигенації. Ефективна фармакотерапія ГРДС досі відсутня [16; 24; 35; 62; 64; 156; 176].

Основні причини ГРДС можна розділити на дві патофізіологічні категорії – прямий легеневий патогенез (бактеріальна та вірусна пневмонія, інгаляційна травма, аспіраційний пневмоніт або торакальна травма, що включає в себе травму легеневої паренхіми); та непрямий екстрапульмонарний патогенез (екстраторакальний сепсис, травма, шок, опікове ураження, трансфузія крові, панкреатит, мультиорганна трансплантація) [16; 129; 140; 175].

Одним із основних чинників, що зумовлюють значне порушення оксигенації крові та тканин при ДАУ є формування багатого білком набряку дихальних просторів унаслідок порушення цілісності альвеолярно-капілярної мембрани. ДАУ не тільки виникає у відповідь на пряме ураження легень (напр. пневмонія), а ще може бути пульмонарною маніфестацією низки системних імунорегуляторних розладів, таких як сепсис. Таким чином, патогенез ГРДС пов'язаний зі змінами у місцевому і системному імунітеті та імунних відповідях [70].

1.4 Взаємозв'язок між печінкою та легеньми за умов розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому

При ГРДС легені не здатні забезпечити організм достатньою кількістю кисню. Це призводить до тканинної гіпоксії, яка впливає на клітини печінки. Гіпоксія печінки призводить до продукції вільних радикалів та оксидативного

стресу, що пошкоджує гепатоцити [39; 69].

Також ураження печінки при ГРДС може виникати унаслідок синдрому системної запальної відповіді та цитокінового шторму (неконтрольованого і надлишкового виділення прозапальних цитокінів [66]. У важких випадках настає печінкова недостатність, яка характеризується жовтяницею, асцитом та печінковою енцефалопатією [70; 203].

При ГРДС часто виникає коагулопатія, яка призводить до тромбозів та крововиливів у печінці, що також погіршує функціональну здатність печінки [30; 59; 119].

Коли у пацієнтів з ГРДС виникає місцеве запалення в альвеолярному просторі, це викликає гострофазову відповідь у печінці, що не залежить від бактеріальної дисемінації, а виникає унаслідок дії прозапальних сигнальних молекул (IL-1, IL-6 і TNF- α), утворених легеневиими імуніцитами. Такі цитокіни надходять із легень у системну циркуляцію і впливають на експресію печінкою таких гострофазових молекул як С-реактивний білок, α -1 антитрипсин, білок сироваткового амیلлоїду А тощо, які, у свою чергу, здатні зворотно повертатися у легені та спричинити там запалення внаслідок активації альвеолярних макрофагів [66].

У разі потрапляння бактерій у печінку, вони впливають на клітини імунної системи двома способами: прямим чином шляхом активації Toll-подібних рецепторів та непрямим за допомогою своїх метаболітів та сигнальних молекул, таких як патоген-асоційовані молекулярні патерни (ПАМП). Активовані клітини Купфера виділяють прозапальні цитокіни, що сприяють початку та прогресуванню ураження печінки та активації системного запального процесу [14; 51; 208].

Дисфункція печінки проявляється зростанням рівнів ферментів аспаратамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ), лужної фосфатази (ЛФ), гама-глутамілтрансферази (ГГТ) і білірубину у плазмі крові, зменшенням плазмових рівнів альбуміну і факторів коагуляції та зростанням

протромбінового часу [75].

Унаслідок печінкової дисфункції зменшується здатність печінки видаляти з кровотоку бактерії та їхні продукти, а також медіатори запалення такі як ПАМП та цитокіни, внаслідок чого рівень цих молекул у крові зростає. Такі прозапальні речовини здатні також реципрокно спричинити чи посилити ураження легень шляхом TLR-4-медійованої активації інтраваскулярних та альвеолярних макрофагів [40; 44; 45; 124; 135].

У свою чергу, гіпербілірубінемія негативно впливає на легені, викликаючи зниження поверхнево-активних властивостей альвеолярного сурфактанту. Також високі рівні білірубіну призводять до оксидативного стресу, апоптозу та запальної відповіді, що посилює розвиток ГРДС. Гіпербілірубінемія використовується як біомаркер ГРДС і є фактором смертності у пацієнтів з цим синдромом [46].

Печінка виробляє низку гормонів, зокрема інсуліноподібний фактор росту, ангіотензиноген і тромбопоетин, що зворотно впливають на розвиток ГРДС [37; 190].

Печінка відіграє важливу роль у регуляції метаболічного гомеостазу. Вона бере участь у синтезі та переробці ліпідів, вуглеводів, білків та жовчних кислот. Тому порушення її роботи впливає на функціонування інших органів через порушення забезпечення їх енергією [160].

Печінка відіграє ключову роль у метаболізмі токсинів та ліків, у регуляції системної запальної відповіді та імунному захисті. Даний орган знищує ендотоксини, циркулюючі бактерії, продукти інтраваскулярної коагуляції та біоактивні молекули. До його функцій належить синтез білків гострої фази (БГФ) запалення, компонентів комплементу, прозапальних цитокінів та хемокінів, ейкозаноїдів. Печінка містить велику кількість резидентних імунних клітин. Нормальне функціонування цього органу важливе для захисту легень та їхнього відновлення після ураження [70].

Взаємозв'язок між печінкою та легеньми, медійований БГФ, є важливим

для інтеграції системної та легеневої відповіді, регуляції імунної відповіді для нормалізації гомеостазу та відновлення організму після ураження органів. Дисбаланс у цьому взаємозв'язку є важливим фактором ініціації та прогресування ГРДС і виникнення поліорганної недостатності [74; 208].

Гепатобіліарна система має здатність інактивувувати і детоксикувати прозапальні цитокіни, вазоактивні медіатори та ейкозаноїди, що перебувають у системній циркуляції, захищаючи таким чином легені та інші органи від пошкодження. Підвищені рівні таких цитокінів як IL-8, IL-1 β , ENA-78, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α та ейкозаноїдів, таких як тромбоксан та лейкотрієни, мають прямий цитотоксичний ефект на клітини альвеолярного епітелію та ендотелію, здатні активувати місцеву вроджену імунну відповідь та підсилювати агрегацію тромбоцитів у легенях. Усе це сприяє розвитку ДАУ [66; 95].

БГФ, утворені в печінці, володіють антимікробною та фагоцитарною властивостями, антиоксидантним ефектом, мають антипротеолітичну дію та здатні контролювати гемостаз. Але, у той же час, вони разом із печінковими прозапальними медіаторами здатні спричинити набряк легень, ураження альвеолярного епітелію та ендотелію, оксидативний стрес, надходження нейтрофілів у легені, підвищення рівня легневих прозапальних медіаторів, активацію альвеолярних макрофагів та стимулювання коагуляції [70].

1.5 Ураження печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі, викликаному COVID-19

ГРДС є головною причиною смертності при COVID-19 [137].

Дослідження, проведене у Jinyintan Hospital (Ухань, КНР), виявило, що у 67–85 % критично хворих пацієнтів з інфекцією SARS-CoV-2 розвинувся ГРДС. Смертність у хворих з ГРДС становила 61.5 % загалом [79]. Дослідження, проведені у Wuhan Central Hospital, виявили, що смертність у пацієнтів з COVID-19 становила 70 % при середньому і важкому ГРДС [116].

У пацієнтів з COVID-19 часто уражається печінка. Вона є другим за частотою ураження органом після легень [106; 154; 217].

Гепатоцити можуть уражатися як внаслідок прямої цитотоксичності при реплікації вірусу SARS-CoV-2 у печінці, так і в результаті синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ), цитокинового шторму, що виникає при важких формах COVID-19, чи внаслідок гіпоксичних змін, зумовлених дихальними розладами [98; 115; 157; 191; 192; 211].

Ураження печінки при COVID-19 характеризується помірним мікроемулярним стеатозом, активацією клітин Купфера, лобулярним і портальним запаленням, апоптичними та некротичними вогнищами та підвищенням рівнів АЛТ і АСТ у плазмі крові [88; 103; 167; 191; 192].

У багатьох клінічних випадках спостерігалися дві окремі фази ураження печінки: спочатку зростала концентрація трансаміназ (АЛТ і АСТ) і лише після цього піднімалися рівні холестатичних печінкових ферментів (ЛФ і ГГТ) [25]. За даними Chen et al. при обстеженні 99 пацієнтів з Уханя у 43,4 % було виявлено підвищені рівні АЛТ, АСТ і лактатдегідрогенази (ЛДГ) [33]. За даними Guan et al. при огляді 1099 китайських пацієнтів з COVID-19 АСТ і АЛТ були підвищені відповідно у 18,2 % та 19,8 % пацієнтів із легким та у 39,4 % та 28,1 % пацієнтів з важким перебігом хвороби [63]. Wang et al. виявили, що рівні АЛТ і АСТ у пацієнтів, що перебували у відділенні інтенсивної терапії були значно вищими, ніж у інших пацієнтів з COVID-19 [185]. Це доводить, що ураження печінки частіше виникає при важкому перебігу коронавірусної хвороби, ніж при легкому. Xie et al. досліджували ураження печінки у пацієнтів з COVID-19, що не мали супутніх захворювань печінки. Ними було виявлено, що 31,6 %, 35,4 % та 5,1 % пацієнтів мали підвищені рівні АЛТ, АСТ та білірубину відповідно [196].

При дослідженні даних 5700 пацієнтів з Нью-Йорка було виявлено, що 58,4 % з них мали АСТ >40 Од/л, 39 % мали АЛТ >60 Од/л, а у 2,1 % було діагностовано гостре ураження печінки на основі підвищення рівнів АСТ чи

АЛТ у 15 та більше разів вище норми [155].

Wang et al. опрацювавши клінічні дані про 228 пацієнтів з COVID-19, у яких не було супутніх хронічних хвороб печінки, виявили, що у 29,4 % із цих пацієнтів при надходженні до клініки були підвищені рівні АЛТ, АСТ, ГГТ, загального білірубину та ЛФ, а під час госпіталізації порушення функцій печінки спостерігалися уже у 56,3 % пацієнтів [187].

За даними низки систематичних оглядів та мета-аналізів випадки зростання рівнів АЛТ і АСТ у пацієнтів з COVID-19 сягають 14,8–53 %. У 35 % випадків виявлений підвищений рівень загального білірубину. У 6,1 % виявлено підвищений рівень ЛФ, а у 21,1 % підвищений рівень ГГТ [99; 100; 139; 141; 201; 214].

COVID-19-асоційований ГРДС здатний викликати гіпоксичний гепатит. Більше ніж 90 % випадків гіпоксичного гепатиту зумовлені серцевою, дихальною недостатністю та сепсисом. Унаслідок гострої респіраторної недостатності, ішемії, гіповолемії та шоку настає гіпоксія тканин печінки, гепатоцити відмирають і виникає централобулярний некроз [193]. Ішемічно-гіпоксичне ураження печінки асоційоване з метаболічним ацидозом, надлишком кальцію, зміною проникності мітохондріальної мембрани та дуже високою концентрацією амінотрансфераз у сироватці [107]. Як результат гіпоксемії та гіперкапнії при ГРДС виникає дисфункція правого шлуночка серця, викликана високим опором легневих судин. Унаслідок цього піднімається центральний венозний тиск, який у свою чергу викликає застій крові у печінці та наступну застійну (конгестивну) гепатопатію [75; 181; 193].

1.6 Вплив стовбурових клітин на морфофункціональний стан печінки

Терапія з використанням стовбурових клітин є новітнім методом лікування захворювань печінки. Для цього використовуються гематопоетичні, індуковані плюрипотентні та мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). Усі ці

клітини мають здатність до диференціювання у гепатоцитоподібні клітини [67; 90; 92; 207].

Серед різних типів стовбурових клітин перинатальні МСК володіють низкою переваг для клінічного застосування. Важливими перевагами МСК, отриманих із післяродового матеріалу, порівняно зі стовбуровими клітинами з інших джерел дорослого організму чи ембріона, є доступність, економічність, мультипотентність, вищий регенеративний потенціал і низький ризик передачі інфекцій [186].

На відміну від ембріональних та індукованих плюрипотентних клітин МСК позазародкових органів мають репресовані онкогени, тому не володіють пухлинногенністю [142]. На відміну від стовбурових клітин дорослого організму МСК перинатального матеріалу є менш імуногенними, оскільки характеризуються низькою експресією антигенів головного комплексу гістосумісності (ГКГ) I класу, а також низькою чи нульовою експресією антигенів ГКГ II класу. Це захищає їх при алогенному та ксеногенному введенні від атаки природних кілерів та Т-лімфоцитів реципієнта [146].

МСК пуповини та амніону продукують різні цитокіни, серед яких інтерлейкіни, фактори росту, простагландин E2, фактор-інгібітор лейкемії тощо. Очевидно саме завдяки біологічно активним речовинам секретому, що володіють ангіогенним, антиапоптозним, антиоксидантними і мітогенними ефектами, МСК стимулюють регенерацію пошкоджених тканин та органів [101].

МСК можуть бути ізольовані з низки органів та тканин людини, зокрема із кісткового мозку, кордової крові, пуповинного канатика та жирової тканини тощо [210]. Вони здатні до диференціювання у клітини різних ліній, не тільки мезенхімального, але й екто- та ендодермального походження [94; 164].

Виявлено, що МСК можуть бути диференційовані у гепатоцити з подальшим використанням їх для регенерації печінки [36; 165; 189]. Для цього МСК індукують фактором росту гепатоцитів (HGF), епідермальним фактором росту, онкостатином M, лейкемієінгібуючим фактором, дексаметазоном,

інсулін-трансферин-селеном чи нікотинамідом. Також диференціювання МСК в гепатогенному напрямку може бути стимульоване екстрацелюлярним матриксом печінки. Співкультивування МСК з клітинами печінки теж здатне індукувати їхню диференціацію в гепатоцитоподібні клітини [90; 207].

Також є дані про те, що трансплантовані алогенні та навіть ксеногенні стовбурові клітини здатні відновлювати уражену печінку шляхом злиття з гепатоцитами [205].

МСК секретують трофічні молекули, такі як фактор росту гепатоцитів (HGF) та фактор росту ендотелію судин (VEGF), що активують процес відновлення уражених тканин паракринним шляхом, стимулюючи проліферацію і репарацію [55; 197; 213].

МСК знижують рівні прозапальних цитокінів IL-6 і TNF-а та підвищують рівні протизапальних цитокінів, таких як IL-10 [73].

Одним із головних медіаторів розвитку фіброзу при ураженні печінки є цитокін TGF- β , який стимулює перетворення зірчастих клітин у міофібробласти. Низка досліджень описала здатність МСК знижувати рівні TGF- β 1 і таким чином зменшувати фіброз печінки. Завдяки своєму паракринному впливу вони здатні пригнічувати активацію зірчастих клітин печінки та викликати їхній апоптоз [52; 87; 117; 118; 116; 202].

МСК мають здатність продукувати екзосоми та виділяти секрети, що мають антифібротичний ефект [17; 29; 76; 86; 138; 158; 200]. Екзосоми — пухирці нанорозміру — містять біоактивні молекули і є важливим засобом міжклітинного спілкування. Вони переносять багатий вантаж мікроРНК, білків і ліпідів, які можуть значно впливати на поляризацію макрофагів [113; 179].

Виявлено, що екзосоми МСК містять фактор росту гепатоцитів (HGF), який сприяє проліферації гепатоцитів [55; 213]. Фактор росту ендотелію судин (VEGF), секретований МСК, також здатний відновлювати пошкоджену систему мікроциркуляторного русла печінки [32; 53].

МСК впливають на поляризацію макрофагів шляхом виділення розчинних факторів. Ці фактори, включаючи цитокіни та хемокіни, створюють паракринну сигналізацію, яка модулює поведінку макрофагів [15; 58; 113].

Kwon et al. відкрили, що МСК пуповини регулюють протизапальну відповідь шляхом виділення декорину, ключової регуляторної молекули. Декорин відіграє важливу роль у перетворенні запальних макрофагів у протизапальні [102].

Ще одним способом регулювання макрофагів за допомогою МСК є метаболічне репрограмування. М1 макрофаги використовують процес гліколізу для виробництва енергії, створюючи прозапальне середовище, тоді як протизапальні М2 макрофаги віддають перевагу оксидативній фосфорилляції. МСК можуть спричинити зсув в метаболізмі макрофагів на користь оксидативної фосфорилляції, тим самим сприяючи утворенню протизапального фенотипу [41; 113; 122; 134].

МСК також здатні регулювати поляризацію макрофагів за допомогою мітохондріального трансферу, який відбувається через тимчасово утворені нанотрубочки або через екстрацелюлярні везикули [83]. Цей процес включає обмін функціонуючими мітохондріями між МСК і макрофагами, що впливає на метаболічний та функціональний статус останніх [147]. МСК завдяки своїй надзвичайній пластичності та імуномодуючим властивостям здатні брати участь в унікальній формі комунікації шляхом передачі своїх здорових мітохондрій макрофагам. Ця передача мітохондрій може значно впливати на поляризацію макрофагів. МСК через передачу мітохондрій можуть індукувати зміни метаболізму макрофагів на користь окисної фосфорилляції, сприяючи переходу до протизапального фенотипу [50; 113; 132].

У дослідженні моделі ураження печінки мишей, викликаного конканаваліном А, застосування МСК мало гепатопротекторний ефект, що проявився зменшенням рівнів трансаміназ у сироватці, зменшенням некрозу гепатоцитів та зниженням продукції прозапальних та проапоптотичних

цитокінів TNF- α і IFN- γ імуніцитами печінки [72].

МСК володіють здатністю до мобілізації, що дозволяє їм надходити у місця запалення чи ураження. У цьому бере участь низка сигнальних шляхів та факторів росту. При ураженні печінки унаслідок стресу відбувається викид хемокінів та цитокінів, які підвищують здатність стовбурових клітин зв'язуватися з поверхневими рецепторами клітин. [183].

1.7 Клінічні дослідження ефективності клітинної терапії уражень печінки

У низці клінічних досліджень, проведених на пацієнтах з гострим та хронічним ураженням печінки, було виявлено ефективність та безпечність МСК [85; 109; 111; 161; 169; 188; 198].

Xu et al. використовували введення аутологічних МСК кісткового мозку у печінкову артерію для терапії цирозу печінки, асоційованого з хронічним гепатитом В. У ході дослідження встановлено зменшення рівнів ІЛ-6, ІЛ-17 і TNF- α [198].

Li et al. вводили алогенні МСК пуповинного канатика у печінкову артерію для лікування пацієнтів з недостатністю печінки, спричиненою гепатитом В, у результаті чого у лікованих пацієнтів виявлено значне покращення показників сироваткового альбуміну, АЛТ, АСТ, загального та прямого білірубіну та протромбінового часу [109].

Lin et al. у рандомізованому контрольованому дослідженні вводили алогенні МСК кісткового мозку пацієнтам з недостатністю печінки, зумовленою гепатитом В, що призводило до зниження рівня білірубіну у сироватці крові [111].

Salama et al. встановили позитивний вплив аутологічних МСК кісткового мозку, введених внутрішньовенно, на перебіг хронічного цирозу печінки, асоційованого з гепатитом С [161].

Jang et al. здійснювали введення аутологічних МСК кісткового мозку у печінкову артерію для лікування алкогольного цирозу печінки. При цьому спостерігалось значне зниження маркерів фіброзу, таких як TGF- β 1, колаген 1 та α -SMA, а також позитивні гістологічні зміни печінки [84]. Здатність МСК кісткового мозку знижувати формування фіброзу печінки було також виявлено у другій фазі рандомізованого дослідження, проведеного Suk et al. [169].

Таким чином, проведений аналіз літературних даних показав актуальність доклінічних досліджень ураження печінки при ГРДС та перспективність використання МСК для корекції цього патологічного стану.

Результати даного розділу висвітлені у наукових публікаціях [3; 49; 149].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Постановка досліду та об'єкт досліджень

До цього дослідження залучено 96 статевозрілих щурів-самців лінії Wistar масою тіла 200-220 г. Піддослідних тварин було поділено на 12 груп по 8 особин у кожній (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Розподіл тварин за експериментальними групами

Група спостережень	Кількість тварин
Група № 1 – контроль (група інтактних тварин, яку утримували у стандартних умовах і не піддавали жодному впливу)	8
Групи моделювання ГРДС	
Група № 2 – 6 годин ЛПС (6 годин після моделювання ГРДС);	8
Група № 3 – 24 год ЛПС (24 години після моделювання ГРДС);	8
Група № 4 – 3 дні ЛПС (3 дні після моделювання ГРДС);	8
Група № 5 – 7 днів ЛПС (7 днів після моделювання ГРДС);	8
Група № 6 – 14 днів ЛПС (14 днів після моделювання ГРДС);	8
Група № 7 – 28 днів ЛПС (28 днів після моделювання ГРДС).	8
Групи корекції	
Група № 8 – 24 год ЛПС + 2 дні МСК (для порівняння з групою 3 дні ЛПС);	8
Група № 9 – 4 дні ЛПС + 3 дні МСК (для порівняння з групою 7 днів ЛПС);	8
Група № 10 – 14 днів ЛПС + 14 днів МСК (для порівняння з групою 28 днів ЛПС);	8
Група № 11 – 21 день ЛПС + 7 днів МСК (для порівняння з групами № 7 і № 10).	8
Група № 12 – контроль-МСК (щурі без модельованої патології, яким перитонеально вводили МСК у стандартній терапевтичній дозі 1 млн клітин /кг маси тварини та проводили евтаназію через 3 дні після введення МСК)	8

Тварин утримували у стандартних умовах віварію (12-годинний цикл дня/ночі; $t = 20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$; вологість 40-45 %) при вільному доступі до води та їжі, досліди були проведені у літній період.

Під час дослідження дотримувалися етичних стандартів і нормативів, щоб забезпечити гуманне поводження з лабораторними тваринами. Всі експерименти проводилися відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних цілей (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), а також Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006). Комісією з питань біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол №76 від 15 січня 2024 р.).

Гострий респіраторний дистрес-синдром моделювали шляхом інтраназального введення ЛПС фірми SIGMA-ALDRICH, попередньо розведеного ізотонічним розчином натрію хлориду (1 мг ЛПС у 4 мл NaCl). ЛПС вводили інтраназально за допомогою небулайзера у дозі 5 мг/кг маси тіла щура протягом 30 хв. Аерозоль ЛПС надходив через спеціально розроблену маску. Цю модель було обрано через її можливість найкраще імітувати запальні аспекти ГРДС [21; 42; 47; 60; 114; 159].

ЛПС є частиною зовнішньої мембрани грам-негативних бактерій. Його можна вводити або у дихальні шляхи (пряме легеневе ураження) або системно (непряме екстрапульмонарне ураження). Пряме легеневе ураження у щурів моделюється введенням ЛПС у легені або шляхом трахеальної інстиляції або шляхом інгаляції. У цьому разі перш за все відбудеться ушкодження альвеолярного епітелію [47].

Місцеве введення ЛПС спричиняє гостру та швидку міграцію клітин запалення у легеневу тканину, після чого настає розривлення або виникає

вторинний фіброз [47].

ЛПС активує макрофаги, стимулює виділення великої кількості прозапальних факторів і активує поліморфоядерні лейкоцити, спричиняючи таким чином стан системної запальної відповіді, що ушкоджує легеневі тканини шляхом каскадної запальної реакції, спричиняючи ГРДС [47].

Під час введення ЛПС тварини були знечулені кетаміном (50 мг/кг), введеним інтраперитонеально.

В якості коригуючого препарату використовували МСК, отримані з пуповини людини, введені інтраперитонеально в дозі 10^6 клітин/кг маси тіла. Для приготування суспензії МСК використовували фізіологічний розчин натрію хлориду. МСК вводили якнайшвидше після зняття клітин із культуральних флаконів і приготування суспензії. Цей спосіб введення обрано через його ефективність у досягненні системного терапевтичного ефекту.

Термінальна анестезія була проведена шляхом інтраперитонеального введення летальної дози тіопенталу натрію (150 мг/кг маси щура).

З кожної тварини проведено забір крові для подальшого біохімічного аналізу, тканин лівої частки печінки для проведення гістологічних, імуногістохімічних та електронномікроскопічних досліджень.

2.2 Методи дослідження та їхнє обґрунтування

Для виконання поставлених завдань використовували наступні методи: гістологічні, електронномікроскопічні, імуногістохімічні, статистичні та біохімічні.

Забір матеріалу для гістологічних досліджень проводили згідно загальноприйнятої методики [2]. Зразки тканини печінки фіксували у 10 % нейтральному забуференому формаліні та обробляли з використанням тканинного процесора LOGOS One (Milestone Medical, США). Виготовлення парафінових блоків проводили з використанням заливочної станції TEC2800

(Amos Scientific, Австралія). За допомогою роторного мікротома AMR 400 (Amos Scientific, Австралія) отримували зрізи завтовшки 5 мкм. Забарвлення препаратів здійснювали гематоксилином та еозином за загальноприйнятою методикою [2].

Гістологічні препарати досліджувалися під світловим мікроскопом Eclipse Ci-E (Nikon, Японія) і документувалися за допомогою камери M3CMOS 14000 (Sigeta, Україна) та програми Tour View (TourTek Photonics, Китай).

Для електронномікроскопічного дослідження шматочки печінки 1 мм³ фіксували у 2,5 % розчині глутаральдегіду (Spi Supplies, США), що готували на основі фосфатного буферу Міллоніга з рН середовища 7,2-7,4. Після фіксації зразки промивали фосфатним буферним розчином протягом 30 хвилин. Постфіксацію здійснювали 1 % розчином тетраоксиду осмію (Spi Supplies, США), після чого проводили дегідратацію зразків в етилових спиртах зростаючої концентрації та пропіленоксиді (Spi Supplies, США). Матеріал ущільнювали у суміші пропіленоксиду та епоксидних смол у співвідношенні 1:1. Для виготовлення блоків ущільнені шматочки печінки поміщали у пластикові капсули та заливали сумішшю епоксидних смол з аралдитом (Spi Supplies, США) та залишали на 24 год за кімнатної температури з подальшою інкубацією в термостаті за температури 37 °C (24 год), 45 °C (24 год) і 56 °C (24 год). Ультратонкі зрізи товщиною 400-800 нм отримували за допомогою ультрамікротома LKB-4801 A (Bromma, Швеція), контрастували матеріал уранілом ацетатом та цитратом свинцю згідно з методом Рейнольдса та досліджували в електронному мікроскопі ПЕМ-125К (Суми, Україна).

Оцінку субпопуляцій макрофагів у тканинах печінки здійснювали за допомогою імуногістохімічного методу. З цією метою використовували наступні маркери: CD68 – загальний маркер макрофагів; CD86 – ідентифікатор M1 клітин і CD163 – ідентифікатор M2 клітин.

Відновлення антигенів проводили з використанням буферу EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (pH 9) у гістопроесорі KOS (Milestone,

Італія) 20 хв за температури 98 °С. Активність ендогенної пероксидази блокували за допомогою 3 % перекису водню. Далі зрізи інкубували протягом 60 хв з первинними антитілами. Для визначення CD68+ клітин використовували кролячі поліклональні антитіла Anti-CD68 (Cat. No. ab125212, Abcam, США); для детекції M1 макрофагів – мишачі моноклональні антитіла Anti-CD86, клон C86/1146 (Cat. No. NBP2-44514, Novus Biologicals, США), для ідентифікації M2 клітин – мишачі моноклональні антитіла, клон EDHu-1 до CD163 (Cat. No. NB110-40686, Novus Biologicals, США). Для візуалізації імунних комплексів було використано систему детекції Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США). Зрізи дозбарвлювали гематоксиліном Майєра.

Для кількісного вираження результатів імуногістохімічного дослідження було проаналізовано 540 полів зору за збільшення $\times 100$ (об. 10, ок.10) за допомогою світлового мікроскопа Eclipse Ci-E (Nikon, Японія) і камери МЗСМОS 14000 (Sigeta, Україна). Отримані знімки обробляли за допомогою програми ImageJ (США) та за допомогою команди “Analyze particles” обраховували відсоток площі мікрофотографії, який займали клітини макрофагічного ряду. Для отриманих даних в межах однієї групи визначали значення середнього арифметичного (M), похибки середнього арифметичного (m) і стандартне відхилення (σ). Достовірність різниці між даними визначалася при нормальному розподілі за t -критерієм Стюдента. Різниці вважалися достовірними при значенні $p < 0,05$.

TGF- β 1 – це цитокін, який бере участь у розвитку фіброзу печінки, патологічного процесу, що призводить до цирозу та печінкової недостатності. TGF- β 1 експресується непаренхімними клітинами, такими як клітини Купфера, клітини Іто, клітини епітелію синусоїдних капілярів печінки, дендритні клітини, а також природні кілери, Т-лімфоцити та інші печінкові лімфоцити. Ці клітини беруть участь в імунній відповіді та процесах регенерації печінки.

Надлишкова та дисрегульована продукція ними TGF- β 1 у відповідь на ушкодження сприяє фіброзу печінки [48; 73; 145].

Для імуногістохімічної оцінки експресії TGF- β 1 відновлення антигенів також проводили з використанням буферу EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (pH 9) у гістопроесорі KOS (Milestone, Італія) 20 хв за температури 98 °С. Активність ендогенної пероксидази було блоковано 3 % гідроген пероксидом. Використовувалися рекомбінантні кролячі моноклональні первинні антитіла (Cat. No. ab215715, Abcam, США) та система детекції Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США). Зрізи були контрзбарвлені гематоксилином Майєра.

Для кількісного вираження результатів імуногістохімічного дослідження було проаналізовано 540 полів зору за збільшення $\times 100$ (об. 10, ок.10) за допомогою світлового мікроскопа Eclipse Ci-E (Nikon, Японія) і камери МЗСМОС 14000 (Sigeta, Україна). Отримані знімки обробляли за допомогою програми ImageJ (США) та за допомогою команди “Analyze particles” обраховували відсоток площі мікрофотографії, який займав преципітат TGF- β 1. Для отриманих даних в межах однієї групи визначали значення середнього арифметичного (M), похибки середнього арифметичного (m) і стандартне відхилення (σ). Достовірність різниці між даними визначалася при нормальному розподілі за t-критерієм Стьюдента. Різниці вважалися достовірними при значенні $p < 0,05$.

Для того, щоб порівняти ступені мікроскопічного пошкодження печінки щурів у різні терміни експерименту без корекції та після корекції МСК нами було визначено комплексну гістологічну оцінку ураження (КГОУ) на основі порівняння даних гістологічного аналізу та імуногістохімічного виявлення експресії TGF- β 1. Підрахунок КГОУ печінки проводився з використанням спеціально розробленої системи оцінювання, яка складалася з таких параметрів як ступені гепатоцелюлярного некрозу, пошкодження структури печінки, вакуолізації гепатоцитів, запалення, ознаки ДВЗ-синдрому та фіброзу.

Гепатоцелюлярний некроз визначався як присутність ділянок мертвих гепатоцитів з пікнотичними ядрами. Ступінь запалення визначався за присутністю інфільтруючих клітин запалення у печінці, включаючи лімфоцити і нейтрофіли. Фіброз оцінювався за рівнем експресії TGF- β 1. Кожен гістологічний параметр оцінювався за шкалою від 0 до 3, де 0 відповідає відсутності ураження, а 3 відповідає значному ураженню. Виводилася середня оцінка кожного параметру по кожній експериментальній групі тварин. Бали за всіма параметрами додавалися з виведенням загальної КГОУ для кожної групи від 0 до 18, вища оцінка відповідала вищому рівню ураження печінки (див. табл. 4.1).

Забір крові щурів проводився шляхом пункції серця. Сироватка виділялася шляхом центрифугування крові. Далі сироватку зберігали при температурі $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до моменту аналізу. Рівні сироваткової АСТ, АЛТ, ЛФ були визначені кінетичним методом відповідно до інструкцій виробника за допомогою напіваавтоматичного біохімічного аналізатора Master T (Hospitex, Італія) та наборів, виготовлених Spinreact (Іспанія). Аналізи проведено на базі міжкафедральної навчально-дослідної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

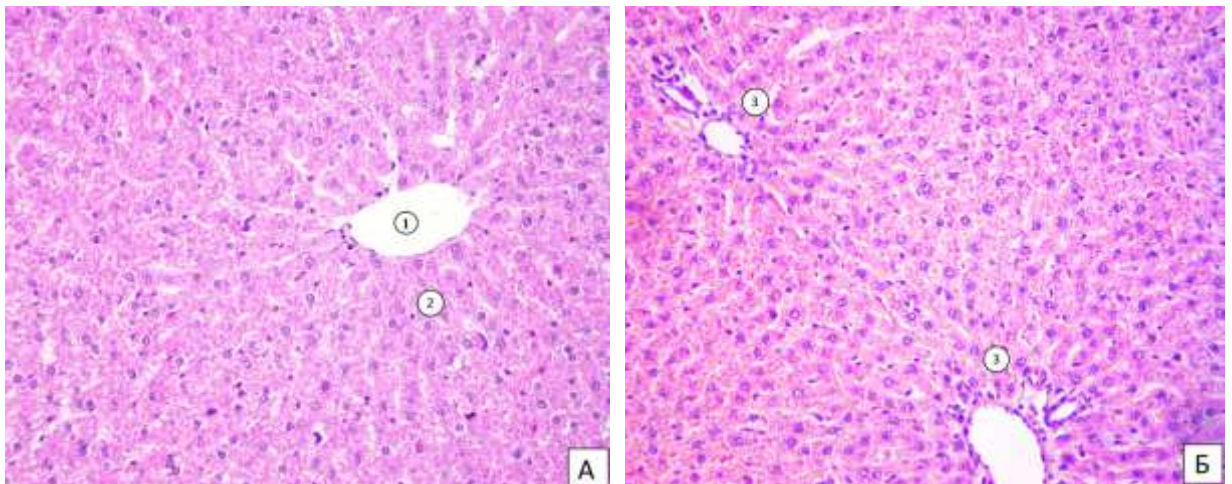
Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програм LibreOffice Calc. та Statistica 10.0 (Statsoft Inc., USA). Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення. Для оцінки відмінностей між отриманими даними використовували критерій Краскела-Уолліса. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ІНТАКТНОЇ ГРУПИ ТА ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРОГО РЕСПІРАТОРНОГО ДИСТРЕС-СИНДРОМУ

3.1 Гістологічна, електронномікроскопічна та імуногістохімічна характеристика структурних компонентів печінки тварин інтактноЇ групи

При мікроскопічному дослідженні печінки інтактних щурів не виявлено значних видових особливостей будови. Спостерігалися печінкові часточки шестигранної форми. Центральні вени великі, тонкостінні, безм'язового типу (рис. 3.1 А). В них відкривалися печінкові синусоїдні гемокапіляри, розташовані між радіальними балками гепатоцитів. У кутах часточок розташовувалися портальні тракти, до складу яких входили великі тонкостінні гілки портальної вени, оточені меншими за діаметром жовчними протоками, а також кінцеві розгалуження печінкової артерії.



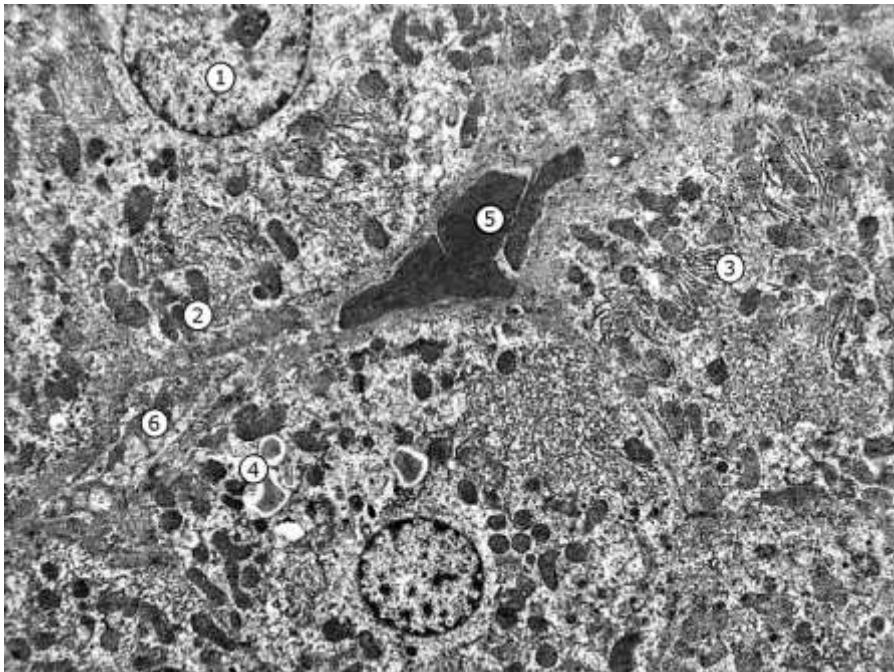
Умовні позначки: 1 – центральна вена, 2 – часточково-балкове розташування гепатоцитів, 3 – портальні тракти

Рисунок 3.1 – Гістологічна будова печінки інтактних щурів. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення: x 200

Міжчасточкові жовчні протоки портального тракту вистелені кубічним

епітелієм, під яким лежала базальна мембрана і сполучна тканина. Міжчасточкові артерії містили один шар гладких міоцитів з подовгастими ядрами. Міжчасточкова вена, жовчна протока і міжчасточкова артерія разом формували печінкову тріаду. Кожен порталний тракт оточений гепатоцитами балок трьох прилеглих класичних часточок (рис. 3.1 Б).

Електронномікроскопічні дослідження печінки інтактних щурів розкрили низку характерних особливостей її структури та організації на рівні клітин, їхніх ядер та цитоплазматичних органел. Гепатоцити великі, полігональні, щільно розташовані клітини, утворювали печінкові балки, відділені синусоїдними капілярами. Ядра великі, кругло-овальної форми, еухроматинові (рис. 3.2).

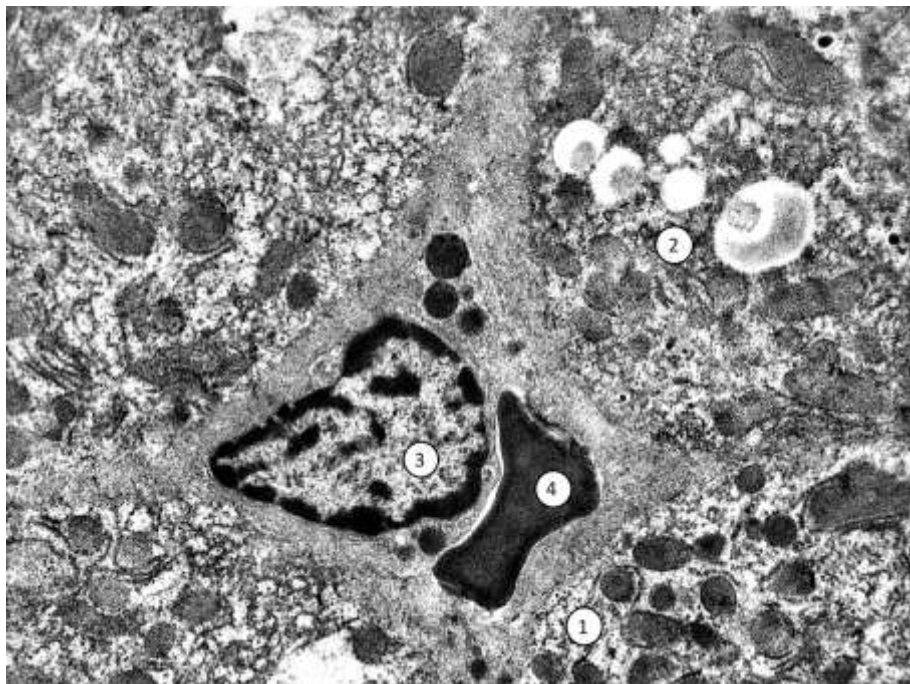


Умовні позначки: 1 – ядро гепатоцита, 2 – мітохондрії, 3 – гранулярна ендоплазматична сітка, 4 – ліпідні включення, 5 – еритроцити в просвіті синусоїдного капіляра, 6 – фрагмент клітини Купфера у просвіті гемокапіляра.

Рисунок 3.2 – Ультраструктура печінки інтактного щура.

Електронограма. Збільшення: x 6000

Більшість клітин одноядерна, але була невелика кількість двоядерних гепатоцитів. Як правило, ядра містили одне-два ядерця, але в деяких клітинах їх могло бути більше. У гепатоцитах були чітко виражені такі органели як мітохондрії, гранулярна (ГЕС) та агранулярна ендоплазматична сітка (АЕС), комплекс Гольджі, лізосоми, пероксисоми а також помітні включення глікогену. Іноді у цитоплазмі гепатоцитів було добре видно краплі жиру у вигляді білих мутних плям. Клітини Купфера (спеціалізовані макрофаги печінки) неправильної видовженої форми, знаходилися переважно у просвітах синусоїдних капілярів, прикріплені до їхнього ендотелію. У цитоплазмі було видно численні електроннощільні, неоднорідні за вмістом лізосоми та фагосоми. Плазмолема формувала численні мікрворсинки та псевдоподії. Ядро подовгасте, містило ділянки гетерохроматину на периферії (рис. 3.3).



Умовні позначки: 1 – мітохондрії в цитоплазмі гепатоцитів, 2 – краплі жиру, 3 – ядро клітини Купфера, 4 – еритроцит в просвіті синусоїда.

Рисунок 3.3 – Ультраструктура печінки інтактного щура.

Електронограма. Збільшення: x 10000

Жовчні капіляри візуалізувалися як дрібні світлі каналці з хвилястими стінками, утвореними плазмолемою прилеглих гепатоцитів. Просвіт жовчних капілярів герметизований за допомогою десмосомних контактів гепатоцитів. Клітини синусоїдного ендотелію плоскі, неправильної форми, пористі. Органел мало, ядра овально-видовжені, еухроматинові. Базальна мембрана відсутня.

Простір Діссе (перисинусоїдний простір) відділяв гепатоцити від ендотеліальних клітин синусоїдних капілярів. У ньому містилися компоненти екстрацелюлярного матриксу, представленого в основному тонкими ретикулярними волокнами, утвореними колагеном III типу.

Клітини Іто (зірчасті клітини печінки) розташовані в просторі Діссе. Мали довгі цитоплазматичні відростки, що простягалися вздовж гемокапілярів та контактували з гепатоцитами і синусоїдним ендотелієм. Містили численні краплі жиру в цитоплазмі, а також ГЕС, АЕС, проміжні філаменти та скоротливі білки.

Результати імуногістохімічного аналізу TGF- β 1 у печінці інтактних щурів виявили слабкий рівень його експресії ($1,98 \pm 0,09$ % від загальної площі проаналізованих препаратів), що вказує на відсутність ознак фіброзу (рис. 3.4).

При імуногістохімічному аналізі CD68⁺ макрофагів у печінці інтактних щурів спостерігалася наявність клітин Купфера, розташованих між печінковими балками в просвіті капілярів синусоїдів ($8,68 \pm 0,32$ % площі) (рис. 3.5 А).

Забарвлення зразків печінки антитілами до CD86⁺ показало слабе утворення імунопреципітату (коричневий осад на препараті), що свідчить про малу кількість прозапальних M1 макрофагів у печінці інтактних тварин ($2,01 \pm 0,09$ %) (рис. 3.5 Б). Одночасно з цим, антитіла до CD163⁺ виявили більше клітин протизапального M2 фенотипу макрофагів ($7,06 \pm 0,19$ %) (рис. 3.5 В). Таким чином, у печінці здорових щурів клітини Купфера переважно представлені макрофагами M2 фенотипу.

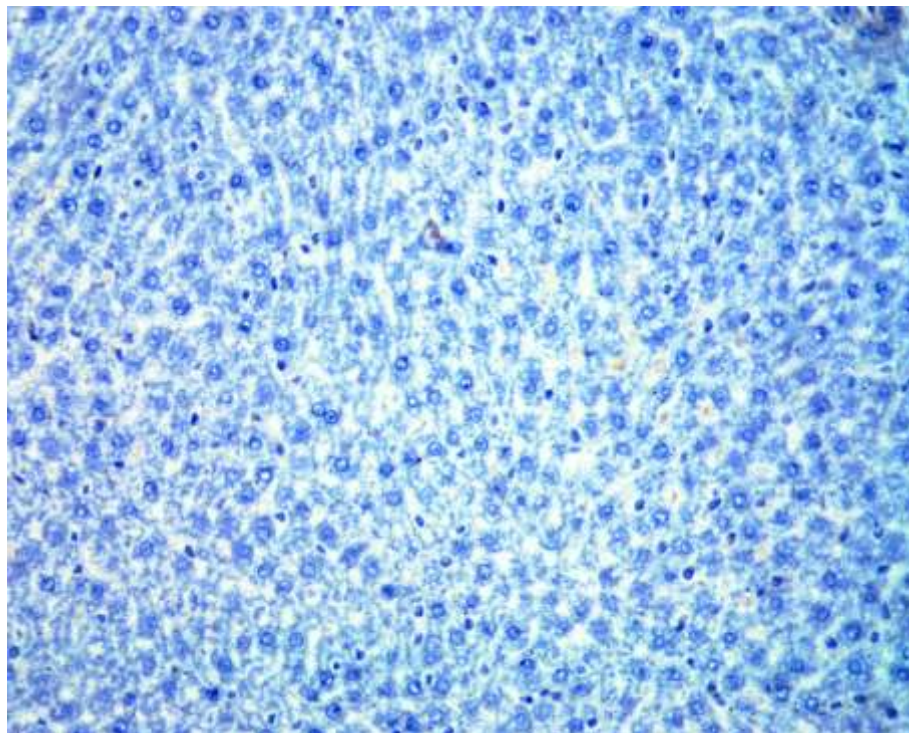


Рисунок 3.4 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи контролю, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.
Збільшення: x 200

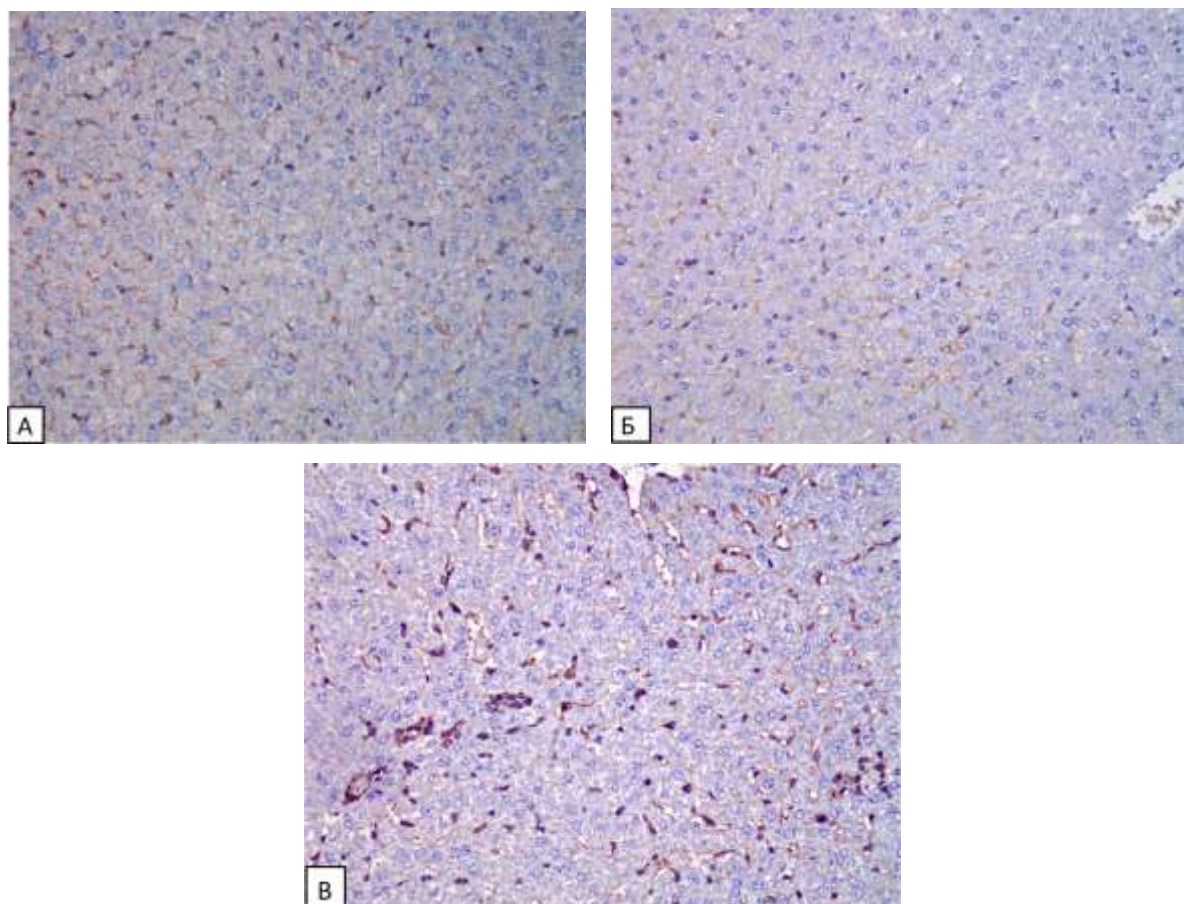
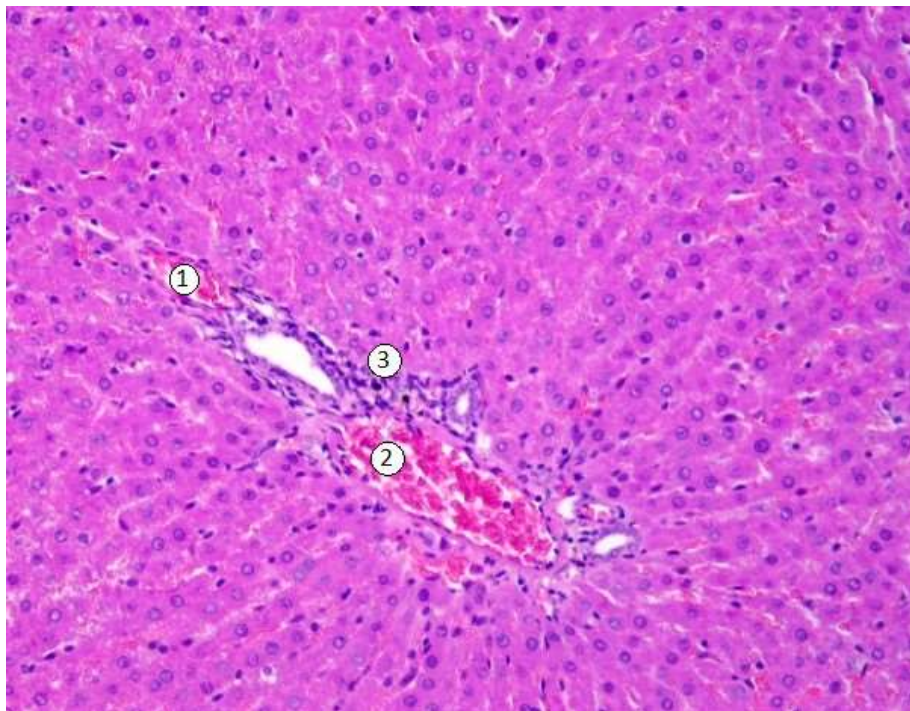


Рисунок 3.5 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів контрольної групи, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 візуалізуються як коричневий осад на зрізах.
Збільшення: x 200

3.2 Гістологічні, електронномікроскопічні та імуногістохімічні зміни в тканинах печінки після моделювання гострого респіраторного дистрес-синдрому

На 6 годину після введення ЛПС на препаратах печінки почали з'являтися ознаки судинних порушень, особливо виражені у мікроциркуляторному руслі. Просвіти міжчасточкових і підчасточкових вен стали розширеними та кровонаповненими. Також були наявні розширені гемокапіляри, поодинокі тромби в синусоїдах та лейкоцитарна інфільтрація триад. Радіальне розташування гепатоцитів у вигляді печінкових балок залишалось збереженим (рис. 3.6).

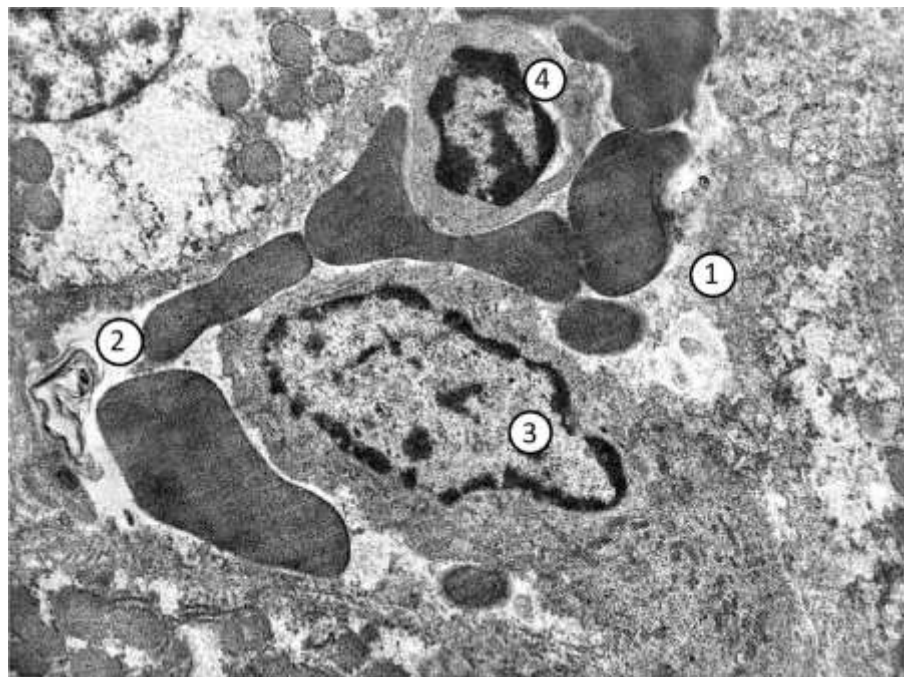


Умовні позначки: 1 – синусоїдні тромби, 2 – розширені кровонаповнені судини, 3 – лейкоцитарна інфільтрація триад.

Рисунок 3.6 – Гістологічні зміни в печінці щурів на 6 годину після змодельованого ГРДС. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення:

x 200

При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки на 6 год експерименту виявлено просвітлення цитоплазми гепатоцитів за рахунок руйнування компонентів ЕС, виснаження включень глікогену. Кількість мітохондрій у клітинах печінки знизилася, але при цьому вони були збільшені в об'ємі і мали неупорядковано розташовані поодинокі кристи (рис. 3.7). Такі ознаки клітинної деструкції свідчили про розвиток гепатоцелюлярного стресу.



Умовні позначки: 1 – набряк перисинусоїдного простору Діссе, 2 – просвіт гемокапіляра, 3 – клітина Купфера, 4 – лімфоцит.

Рисунок 3.7 – Фрагмент гемокапіляра печінки тварин на 6 годину досліду.

Електронограма. Збільшення: x 10000

Клітини Купфера проявляли ознаки активації та залучення у імунну відповідь. При цьому їхня цитоплазма стала більш гранульованою, наповненою лізосомами та фагоцитозними пухирцями, що вказувало на активну роль цих клітин у кліренсі дебрисів. У просвіті синусоїдних капілярів та просторі Діссе виявлялася збільшена кількість гранулярних та агранулярних лейкоцитів.

При імуногістохімічному аналізі експресії TGF- β 1 на 6 год дослідю не виявлено зростання кількості імунопреципітату в порівнянні з контрольною групою ($2,25 \pm 0,12$) %, що свідчить про відсутність розвитку фіброзу (рис. 3.8).

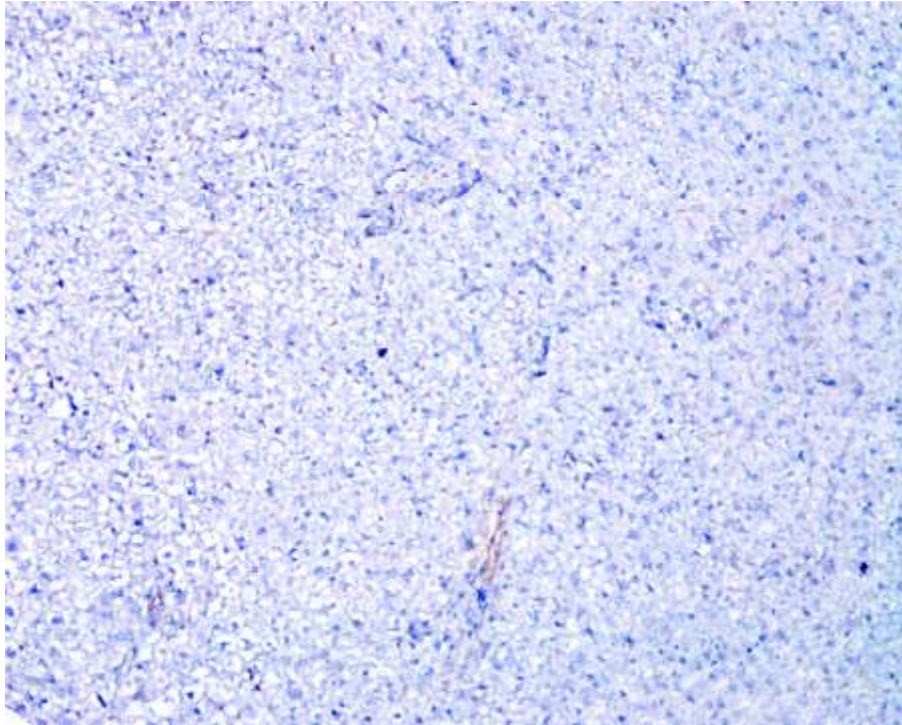


Рисунок 3.8 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи 6 год ЛПС, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x 100

На 6 годину експерименту дані імуногістохімічного дослідження свідчили про те, що загальна кількість макрофагів CD68+ у тканинах печінки піддослідних щурів суттєво не змінилася у порівнянні з контролем ($8,03 \pm 0,3$) % (рис. 3.9 А). Однак при дослідженні субпопуляцій макрофагів печінки виявлено, що переважна кількість макрофагів представлена прозапальним M1 (CD86+) фенотипом ($6,98 \pm 0,31$) % (рис. 3.9 Б), у той час як протизапальні M2 (CD163+) клітини майже не спостерігаються ($1,15 \pm 0,05$) % (рис. 3.9 В). Рівень M1 макрофагів зріс у 3,5 раза ($p < 0,001$), а рівень M2 макрофагів знизився у 3,3 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. Це свідчить про початок розвитку запального процесу в печінці щурів (табл. 3.3).

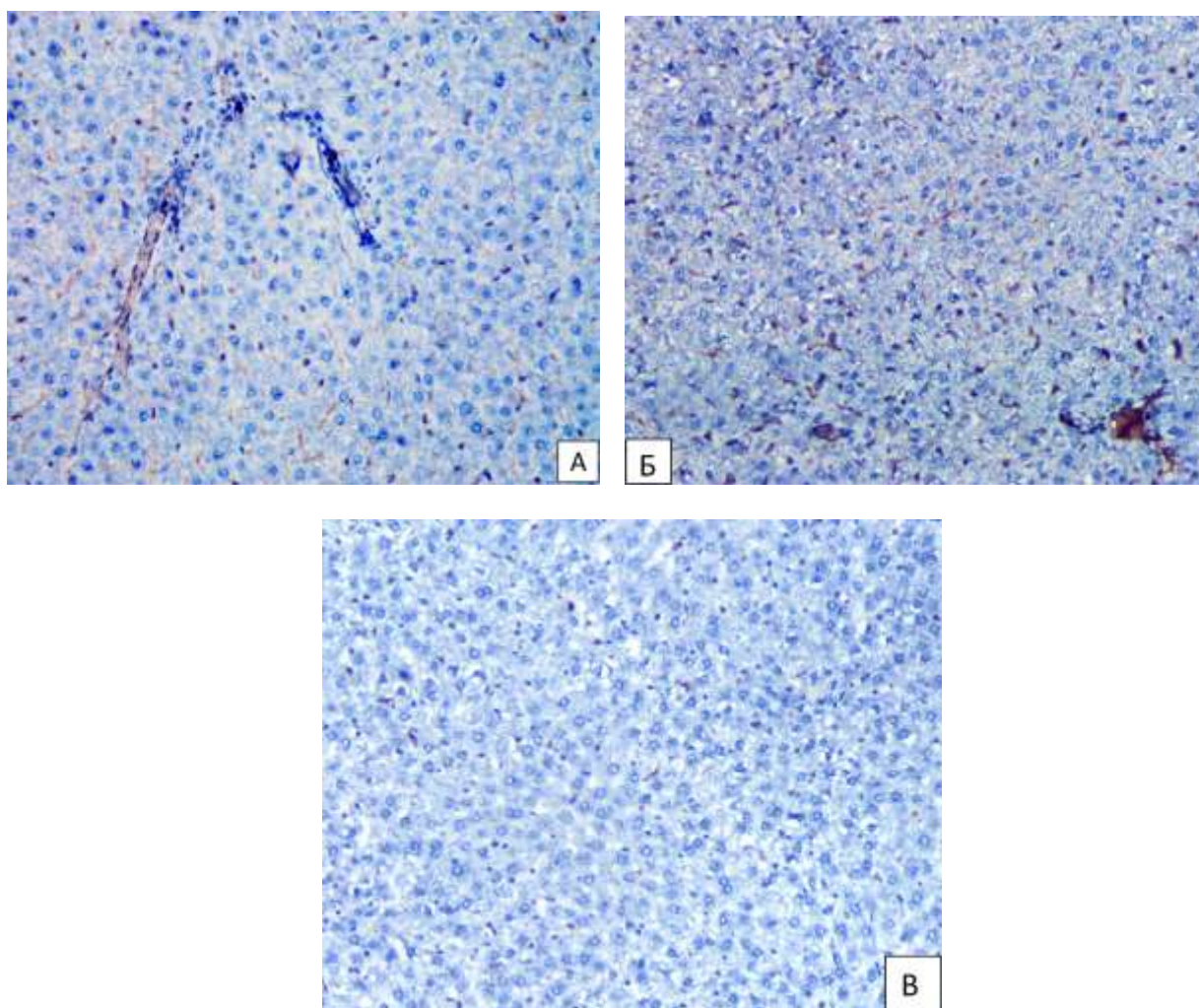
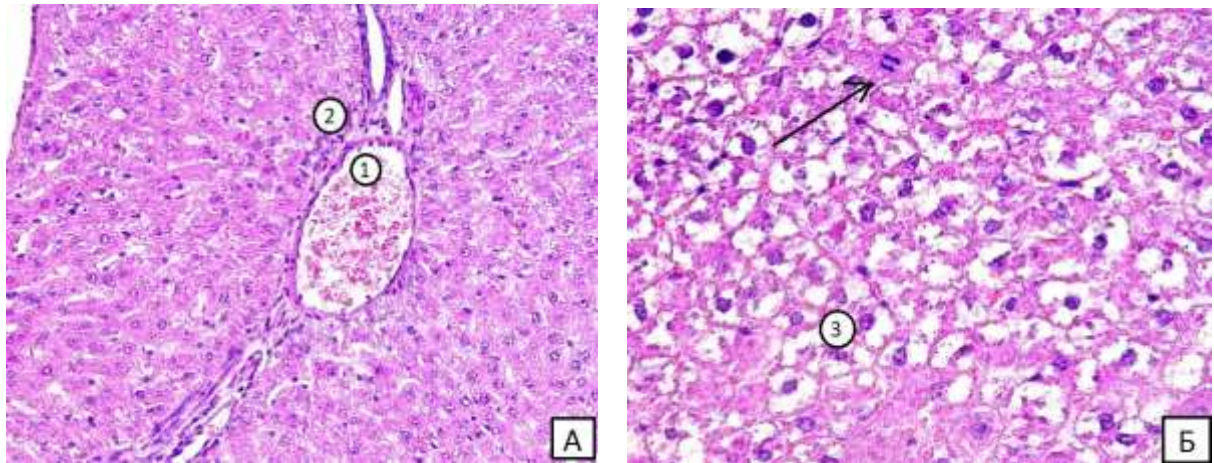


Рисунок 3.9 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 6 год ЛПС, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 візуалізуються як коричневий колір.

Збільшення: x 200

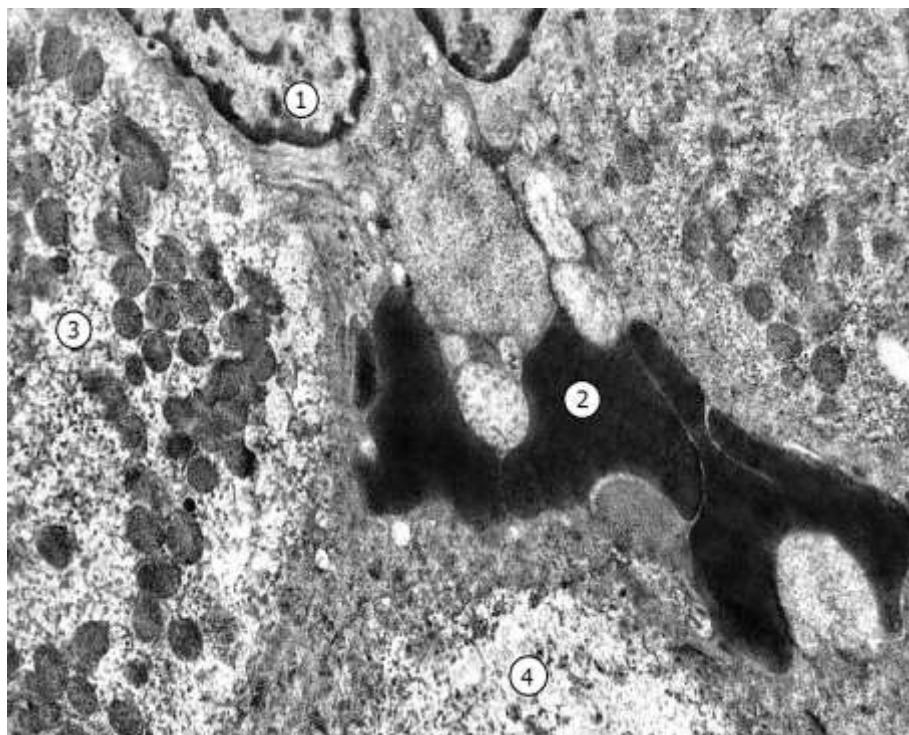
На 24 годину після введення ЛПС збереглася лейкоцитарна інфільтрація триад. Міжчасточкові вени були значно розширені та кровонаповнені (рис. 3.10 А). Спостерігалися світлі набряклі гепатоцити з підвищеною вакуолізацією цитоплазми та темними гетерохроматиновими ядрами. Частина клітин з ознаками гідропічної дегенерації. Проте поміж ними подекуди виявлялися темні гепатоцити з базофільною цитоплазмою і фігурами мітозу (рис. 3.10 Б). Очевидно, такі клітини відповідають за регенерацію печінкових балок.



Умовні позначки: 1 – розширений кровонаповнений простір вени, 2 – лейкоцитарна інфільтрація периваскулярного простору, 3 – світлі гепатоцити з підвищеною вакуолізацією цитоплазми.

Рисунок 3.10 – Гістологічні зміни у печінці щурів на 24-ту год після змодельованого гострого респіраторного дистрес-синдрому. Стрілкою вказаний темний гепатоцит на стадії анафази. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 200 (А), x 400 (Б)

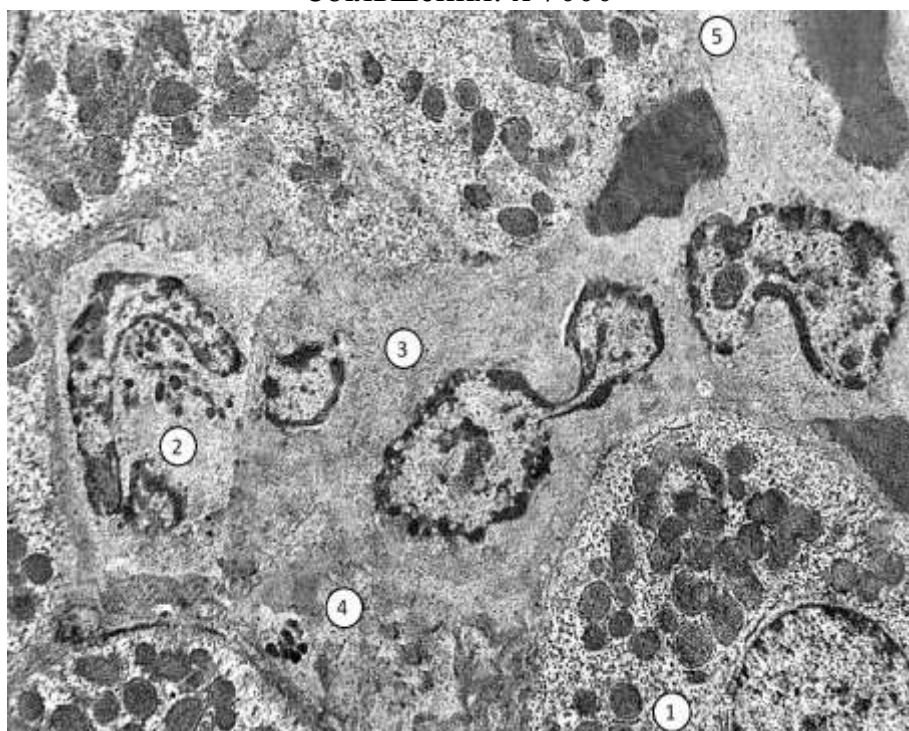
При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки щурів на 24 годину експерименту виявлено розширені кровонаповнені синусоїдні капіляри. Також спостерігалися стази. Еритроцити були гемолізовані (рис. 3.11). Окремі гепатоцити були пошкоджені, що було свідченням розвитку гепатоцелюлярного некрозу. Біля центральної вени паренхіма мала ознаки гіпоксії. Цитоплазма гепатоцитів була набрякла, що є ознакою клітинного стресу. Ендоплазматична сітка була розширена. Зросла кількість мітохондрій, більшість із них були набряклі, деякі мали фрагментовані кристи. Ядра були відносно інтактними, але з'явилися ознаки конденсації хроматину. У клітинах Іто деструктивні зміни не спостерігалися. Клітини Купфера були активованими, що свідчило про їхню участь у розвитку запальної реакції у печінці. Простір Діссе був інфільтрований імунними клітинами, зокрема нейтрофілами, що є ознакою ранньої запальної відповіді (рис. 3.12).



Умовні позначки: 1 – ядро клітини Іто в просторі Діссе, 2 – еритроцити в просвіті капіляра, 3 – збільшена кількість мітохондрій у цитоплазмі гепатоцита, 4 – гепатоцелюлярний некроз.

Рисунок 3.11 – Печінка щура на 24 год після введення ЛПС. Електронограма.

Збільшення: x 7000



Умовні позначки: 1 – гепатоцит з підвищеною кількістю мітохондрій, 2 – нейтрофіл, 3 – активований макрофаг, 4 – фагоцитовані рештки відмерлого гепатоцита, 5 – порушення ендотеліального бар'єру, набряк простору Діссе.

Рисунок 3.12 – Печінка щура на 24 год після введення ЛПС. Електронограма.

Збільшення: x 6000

Наявність імунної реакції у просторі Діссе вказує на спробу організму впоратися з патологічним станом та запобігти його подальшому розвитку. Крім того, спостерігалася екстравазація еритроцитів, що є ознакою пошкодження судинної стінки та порушення цілісності кровоносних судин.

При імуногістохімічному аналізі експресії TGF- β 1 у тканинах печінки на 24 год експерименту виявлено зростання кількості імунопреципітату на препаратах печінки ($3,88 \pm 0,15$) %. Це вказує на наявність активного процесу фіброгенезу у печінці (рис. 3.13). У порівнянні з контрольною групою експресія TGF- β 1 достовірно зросла у 2,0 раза, що свідчить про збільшення активності цього біомаркера в умовах експерименту. Ці результати говорять про активування шляхів, що сприяють розвитку фіброзу та погіршенню стану печінки.

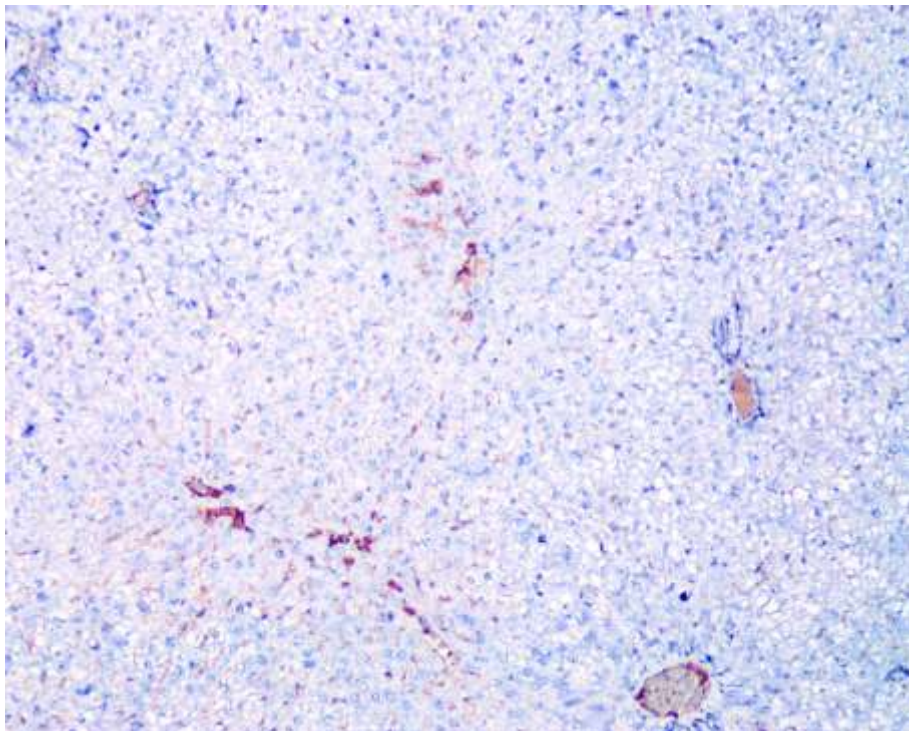


Рисунок 3.13 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи 24 год ЛПС, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x 100

При імуногістохімічному аналізі тканини печінки на 24 годину експерименту на наявність різних субпопуляцій макрофагів було виявлено цікаві результати. Зокрема, площа тканини печінки, заповнена прозапальними CD86+ макрофагами статистично достовірно зросла у порівнянні з контролем і становила ($6,77 \pm 0,29$) % (рис. 3.14 Б).

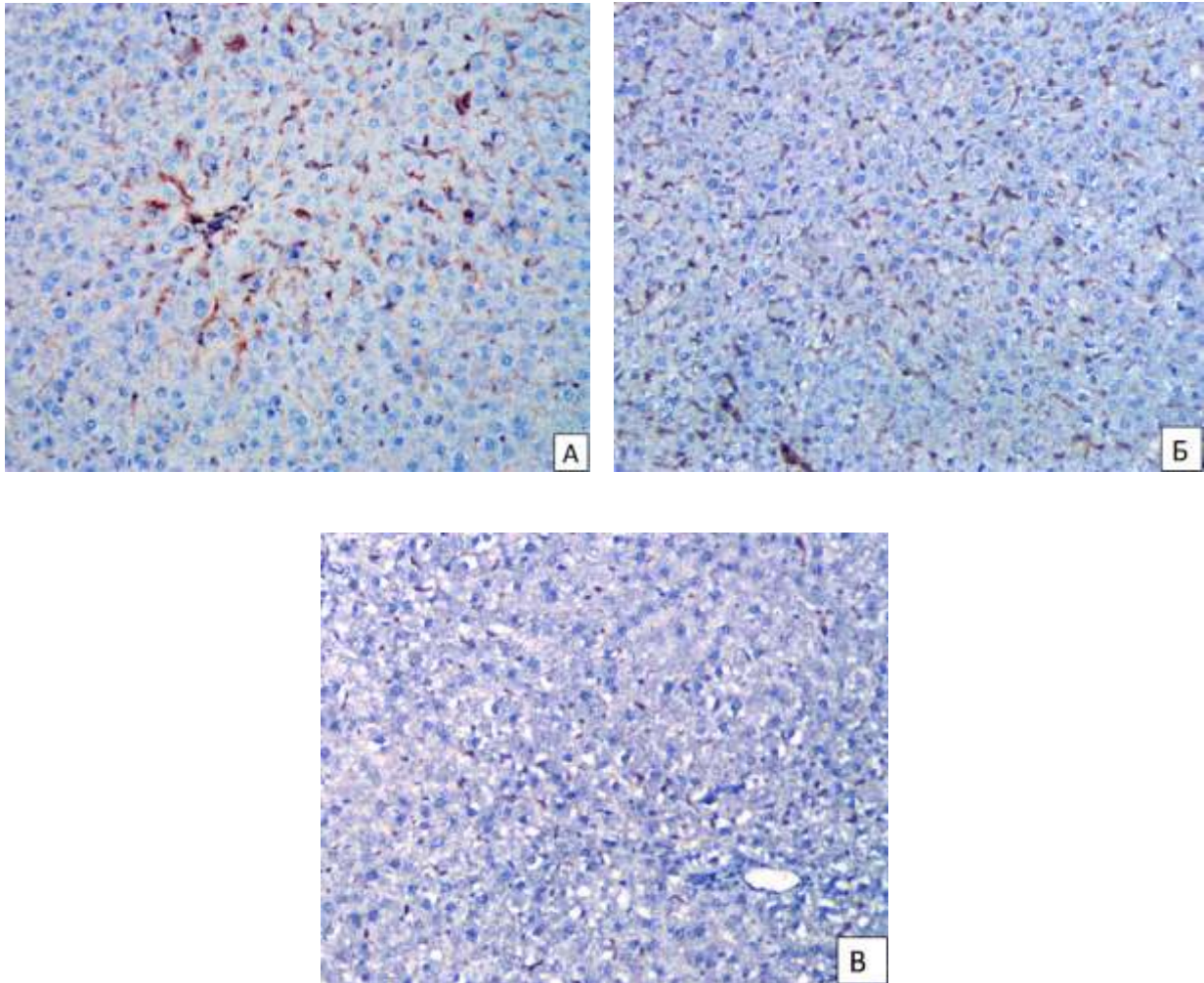


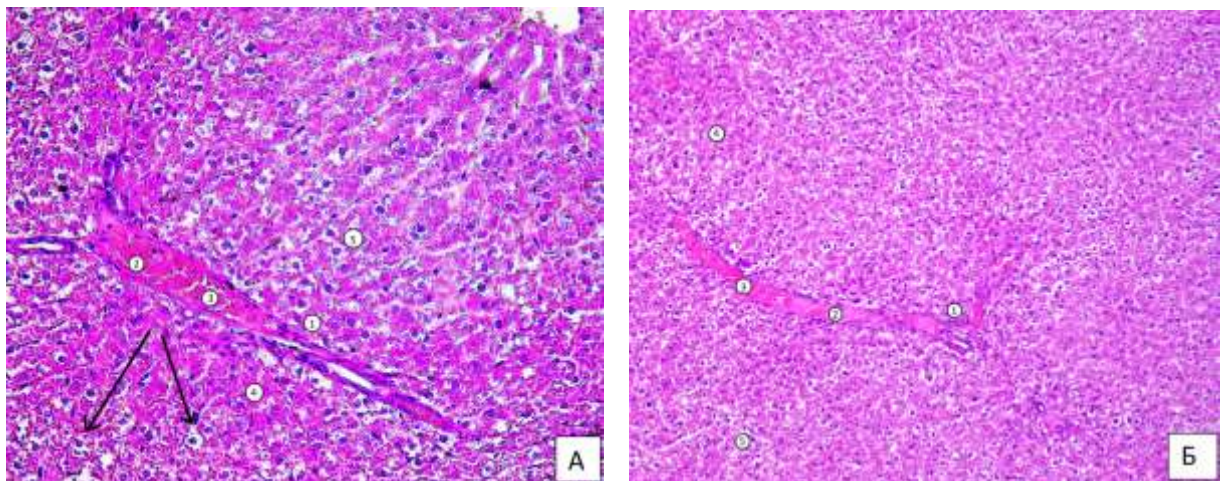
Рисунок 3.14 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 24 год ЛПС, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 візуалізуються як коричневий колір.

Збільшення: x 200

Це свідчить про активну присутність прозапальних клітин у печінці на 24 год експерименту. У той же час площа протизапальних CD163+ клітин була дуже малою і складала лише ($2,12 \pm 0,09$) % (рис. 3.14 В). Важливо відзначити,

що кількість М1 макрофагів була підвищена в 3,4 раза ($p < 0,001$), що вказує на розвиток прозапальної реакції в організмі. У той же час кількість М2 макрофагів була знижена в 3,3 раза ($p < 0,001$) порівняно з контролем.

На 3 добу після введення ЛПС продовжували спостерігатися розширені та кровонаповнені судини зі стазами, наявна периваскулярна лейкоцитарна інфільтрація. Були наявні набряклі вакуолізовані гепатоцити з більш компактизованим хроматином, порівняно з контролем і ГРДС 24 год. Багато гепатоцитів мали пікнотичні ядра (рис. 3.15 А). Поміж дегенерованих гепатоцитів значно частіше траплялися темні клітини з базофільною цитоплазмою, що свідчить про активацію репаративних процесів у паренхімі печінки (рис. 3.15 А).



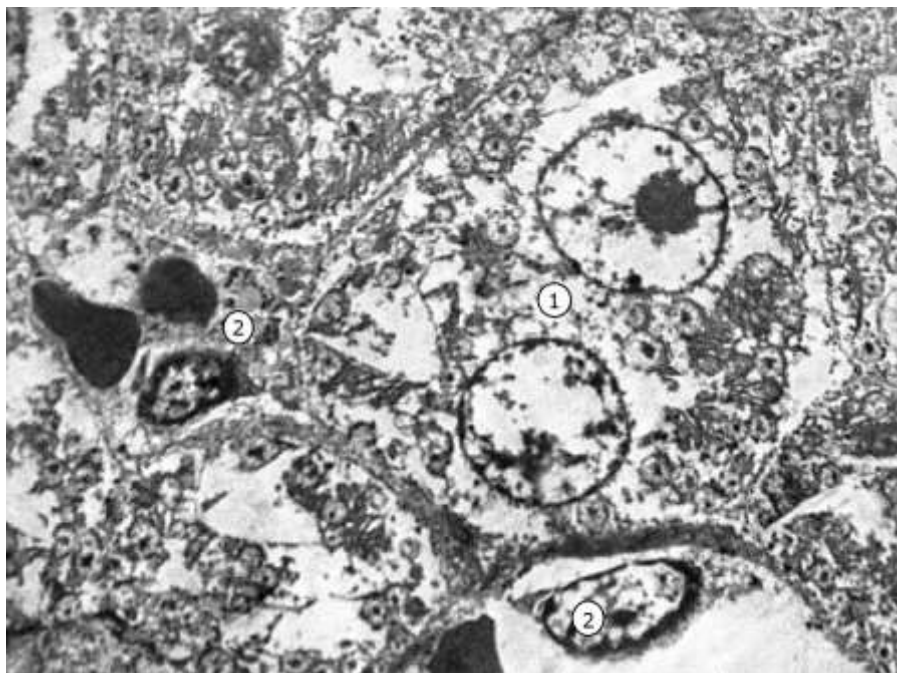
Умовні позначки: 1 – периваскулярна лейкоцитарна інфільтрація, 2 – венозні тромби, 3 – розширені й кровонаповнені судини, 4 – темні гепатоцити, 5 – світлі гепатоцити.

Рисунок 3.15 – Гістологічні зміни у печінці шурів на 3 добу після змодельованого ГРДС. Стрілки вказують на уражені гепатоцити з пікнотичними ядрами. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 200 (А), x 100 (Б)

Гідропічно дегенеровані гепатоцити в основному були локалізовані в центральній частині печінкових балок, у той час як темні клітини з

базофільною цитоплазмою знаходилися на периферії часточок та біля центральних вен (рис. 3.15 А, Б). Трабекулярна будова печінки подекуди порушена (рис. 3.15 Б).

При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки на 3 добу експерименту виявлялися альтеративні зміни гепатоцитів. У деяких клітин цитоплазма була більш гранулярною та електроннощільною у порівнянні з контролем, що свідчить про підвищену метаболічну активність гепатоцитів у відповідь на запалення. Очевидно, ці клітини відповідають темним гепатоцитам, виявленим на гістологічних препаратах. Кількість мітохондрій у них зросла для забезпечення збільшеної потреби клітин енергією. Краще видимі ядрця свідчать про підвищений синтез білків. Частина гепатоцитів мала світлу більш електроннопрозору цитоплазму, що містила залишки зруйнованих органел (рис. 3.16).

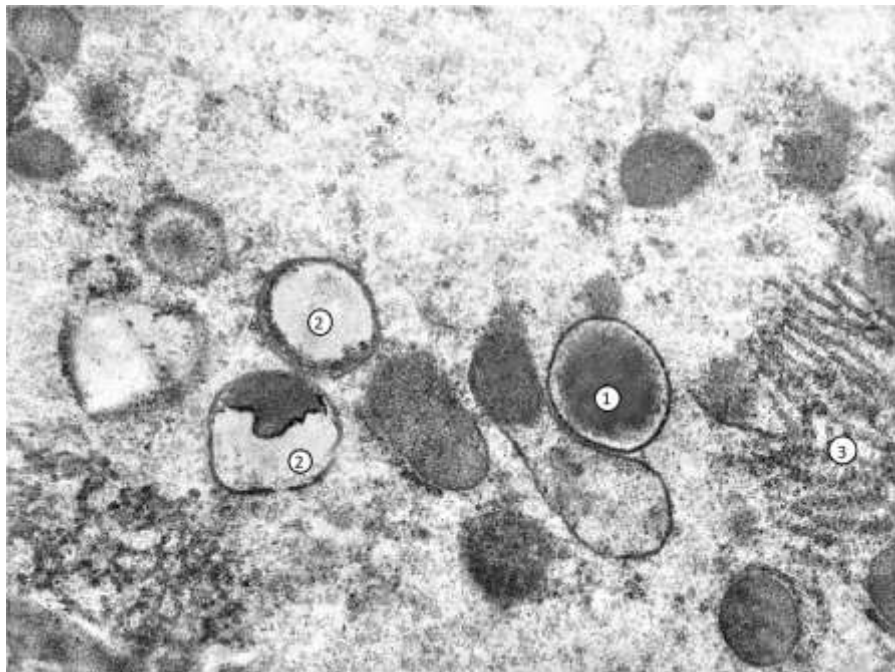


Умовні позначки: 1 – двоядерний гепатоцит з ознаками гідропічної дегенерації та деструкцією мітохондрій, гранулярної ендоплазматичної сітки, відсутністю гранул глікогену, 2 – клітини Купфера у просвіті синусоїдних капілярів.

Рисунок 3.16 – Печінка тварин на 3 добу після введення ЛПС. Електроннограма.

Збільшення: x 6000

Спостережуваний внутрішньоклітинний набряк є наслідком клітинного стресу у результаті системного запалення. Клітинна архітектура порушена, були ознаки вакуолізації цитоплазми та пошкодження структури клітинної мембрани. Мітохондрії набрякли, частина крист зруйнована, що свідчить про розвиток оксидативного стресу та порушення продукції енергії. Подекуди спостерігалось збільшення кількості лізосом та аутофагосом, що свідчить про спроби клітини елімінувати пошкоджені органели (рис. 3.17).



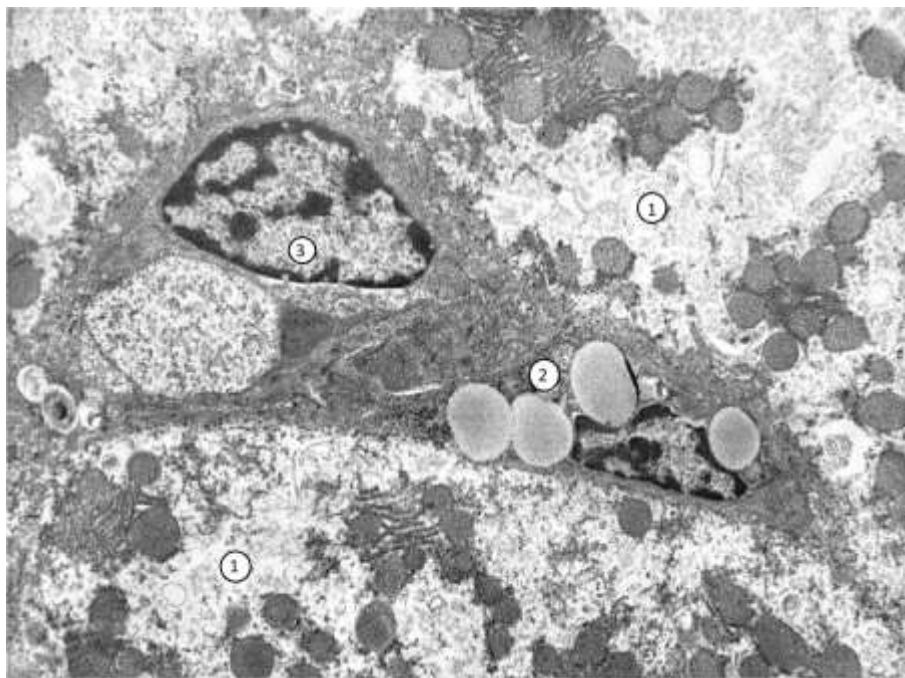
Умовні позначки: 1 – лізосоми, 2 – аутофагосоми, 3 – залишки ГЕС.

Рисунок 3.17 – Печінка тварин на 3 добу після введення ЛПС. Фрагмент світлого гепатоцита. Електронограма. Збільшення: $\times 36000$

ГЕС розширена, спостерігалися відкріплені рибосоми. У синусоїдних просторах було видно значну кількість клітин Купфера. Їхня цитоплазма багата на лізосоми та фагосоми (рис. 3.18). Клітини ендотелію проявляли ознаки активації, а саме підвищений вміст піноцитозних везикул та вакуоль у відповідь на системний запальний процес. В ендотелії зросла кількість проміжків, що веде до підвищення проникності капілярної стінки. Це сприяє надходженню імунних клітин та білків плазми у периваскулярний простір. Простір Діссе був більш розширеним унаслідок підвищення вмісту рідини та надходження

білків із синусоїдних капілярів як наслідок запалення. Це свідчить про формування набряку строми печінки. Частина клітин Іто в перисинусоїдному просторі почала активуватися, що проявляється зменшенням кількості і розміру жирових включень у їхній цитоплазмі. При цьому зріс вміст ГЕС, що свідчить про зсув їхнього фенотипу у міофібробластний бік та початок продукції ними волокон екстрацелюлярного матриксу. Цей процес асоційований з фіброгенезом.

При імуногістохімічному аналізі експресії TGF- β 1 через 3 доби після моделювання ГРДС виявлялося зростання його кількості ($8,54 \pm 0,39$ %), що є ознакою фіброзу (рис. 3.19, табл. 3.2). Площа, заповнена преципітатом, зросла у 4,3 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. Ці результати узгоджуються з активацією клітин Іто, які здатні секретувати компоненти позаклітинного матриксу — ретикулярні волокна [28; 73; 194]. Було також виявлено підвищення кількості M1 клітин ($6,89 \pm 0,27$ %), тоді як чисельність M2 макрофагів залишалася низькою ($2,13 \pm 0,15$ %) (рис. 3.20).



Умовні позначки: 1 – просвітлена цитоплазма гепатоцита зі зменшеною кількістю гранул глікогену, 2 – клітина Іто в просторі Діссе, 3 – клітина Купфера в просвіті синусоїдного капіляра.

Рисунок 3.18 — Печінка тварин на 3 добу після введення ЛПС. Фрагменти світлих гепатоцитів з ознаками гідропічної дегенерації. Електроннограма.

Збільшення $\times 8000$

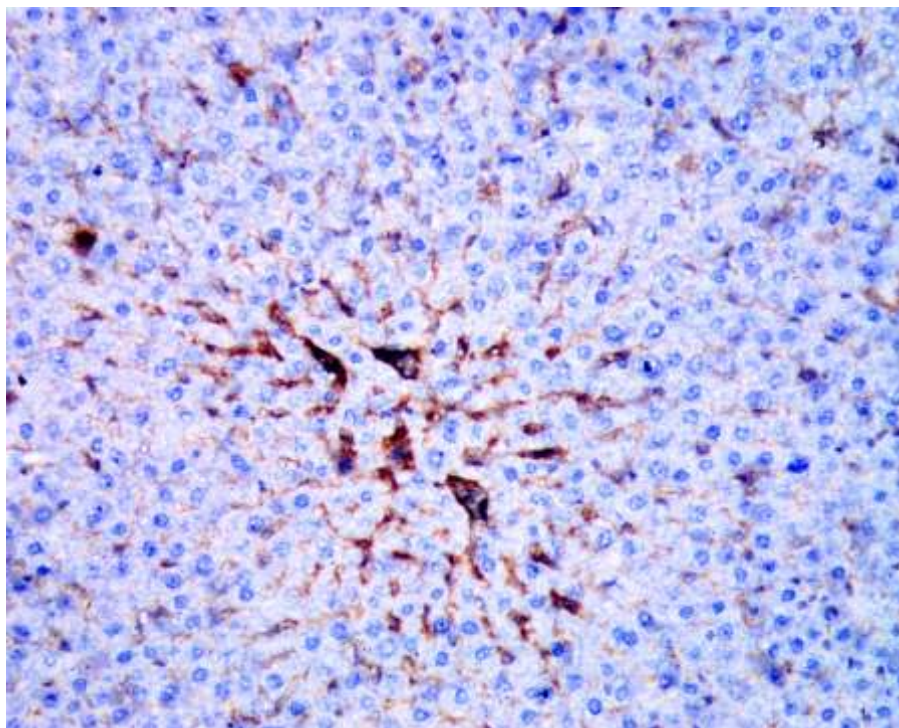


Рисунок 3.19 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи 3 дні ЛПС, забарвленого для визначення TGF-β1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x 200

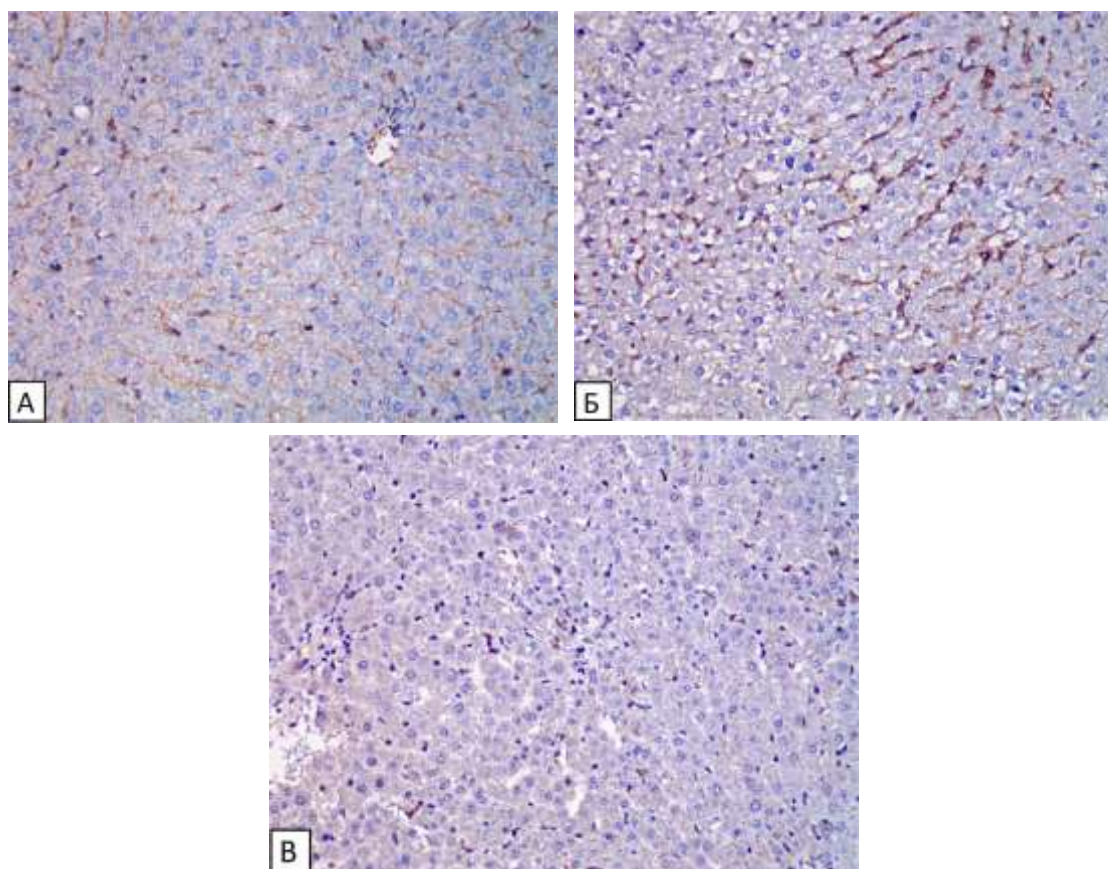
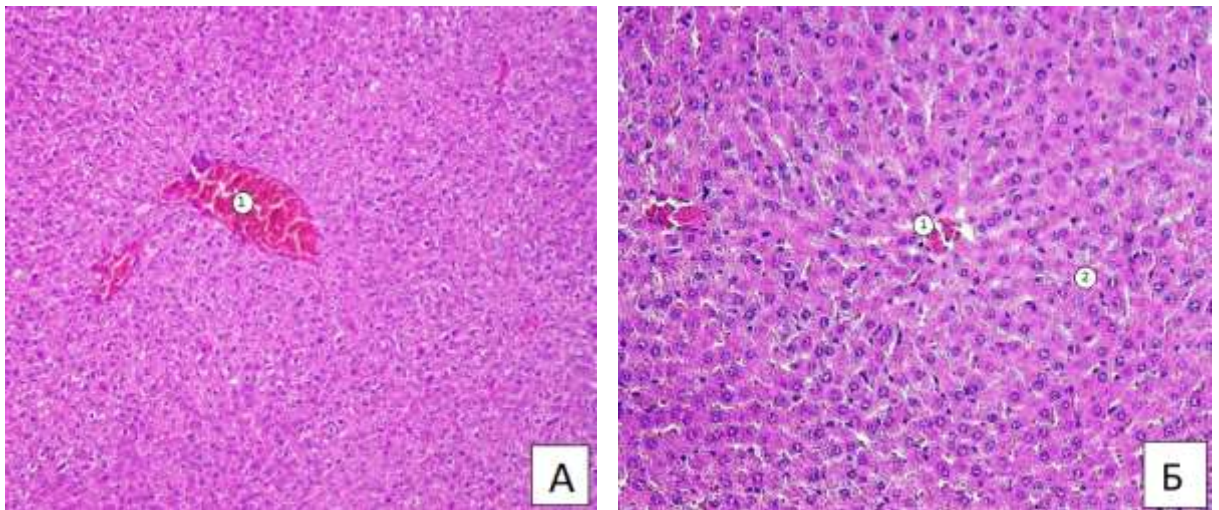


Рисунок 3.20 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 3 дні ЛПС, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 відображаються як коричневий колір.

Збільшення x 200

На 7 добу експерименту міжчасточкові вени та капіляри печінки залишалися кровонаповненими та тромбованими. У печінкових часточках наявні групи темних більш базофільних гепатоцитів з еухроматичними ядрами. Однак виявлялася невелика кількість гепатоцитів, що мали світлішу цитоплазму та пікнотичні ядра (рис. 3.21 А, Б).



Умовні позначки: 1 – лізовані венозні тромби, 2 – пікноз.

Рисунок 3.21 – Гістологічні зміни у печінці щурів на 7 добу після змодельованого ГРДС. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 100 (А), x 200 (Б)

При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки на 7 добу експерименту відмічалися ознаки відновлення, зменшення запалення та покращення клітинного гомеостазу у часточках печінки. Гепатоцити зберігали свою полігональну форму і мали відносно однаковий розмір. Це свідчить про те, що незважаючи на системне запалення гепатоцити почали репарувувати внутрішньоклітинні пошкодження та підтримувати свою структурну цілісність. Ядра гепатоцитів мали відносно нормальну округлу форму з чітко видимими ядерцями. Хроматин був менш ущільненим порівняно з групою 3 дні ЛПС, що свідчить про відновлення функціональної активності гепатоцитів.

У порівнянні з групою 3 дні ЛПС у клітинах паренхіми печінки спостерігалось зменшення кількості дегенерованих мітохондрій, компонентів

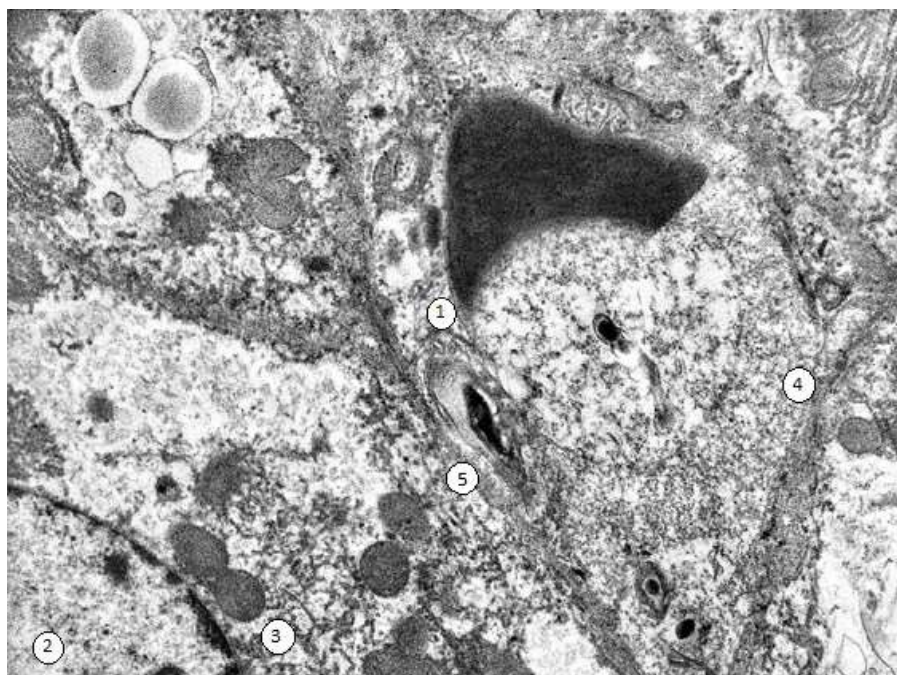
ГЕС, лізосом та аутофагосом.

Незважаючи на це, цілісність ядерних мембран деяких гепатоцитів була порушена. Подекуди у цитоплазмі спостерігалися ознаки набряку та вакуолізації. Окремі мітохондрії були набряклі та з порушеною структурою крист. Ендоплазматична сітка містила розширені цистерни. Клітини Купфера у синусоїдних капілярах продовжували проявляти ознаки фагоцитарної активності, містячи гетерофагосоми з клітинними дебрисами, апоптотичними тільцями та іншими ушкодженими структурами, що свідчить про поступове розршення запалення та відновлення тканин.

Клітини ендотелію синусоїдних капілярів печінки були набряклими, але зберігали свою пористу структуру. Ендотеліоцити формують динамічний бар'єр, що контролює потік рідин крізь свої пори. Ці клітини є високочутливими до оксидативного стресу.

Виявлений нами їхній набряк сприяє звуженню пор у стінці капілярів, що на думку Nafady з співавторами є захисним механізмом зменшення надходження токсинів у простір Діссе, а отже до гепатоцитів [136]. В окремих ендотеліоцитах відмічалась поява мієліноподібних мультиламелярних тілець (рис. 3.22). Ці тільця є ознакою аутофагії пошкоджених мембранних компонентів клітини [178].

Клітини Іто були активовані, збільшилися в розмірі та набули більш зірчастої форми, втратили характерні для них краплі жиру. Їхня активація є відповіддю на ураження та запальний процес у печінці. Синтетична активність клітин Іто підвищилася, що проявлялося збільшенням кількості компонентів ГЕС. Вони беруть участь у синтезі колагену для екстрацелюлярного матриксу, що є частиною процесу відновлення тканин після ураження печінки (рис. 3.23). У їхній цитоплазмі зросла кількість мікротрубочок та мікрофіламентів. Простір Діссе залишався розширеним як наслідок клітинної інфільтрації та набряку.



Умовні позначки: 1 – просвіт синусоїдного капіляра, 2 – ядро гепатоцита, 3 – мітохондрії, 4 — ендотеліоцити, 5 – мультамелярне тільце.

Рисунок 3.22 – Печінка тварин на 7 добу після введення ЛПС. Фрагмент гепатоцитів і гемокапіляра. Електронограма. Збільшення: x 10000



Умовні позначки: 1 – ядро клітини Іто, 2 – мітохондрії, 3 – жирові включення в гепатоцитах, 4 – відкладені колагенові волокна.

Рисунок 3.23 – Печінка тварин на 7 добу після введення ЛПС. Фрагмент синусоїдного капіляра і перисинусоїдного простору Діссе. Електронограма. Збільшення: x 8000

При імуногістохімічному аналізі TGF- β 1 у тканинах печінки на 7 добу експерименту відмічалось ще більше зростання його експресії ($10,67 \pm 0,47$) %, що свідчить про подальший розвиток фіброзу (рис. 3.24). Площа, заповнена імунопреципітатом, зросла у 5,4 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем.

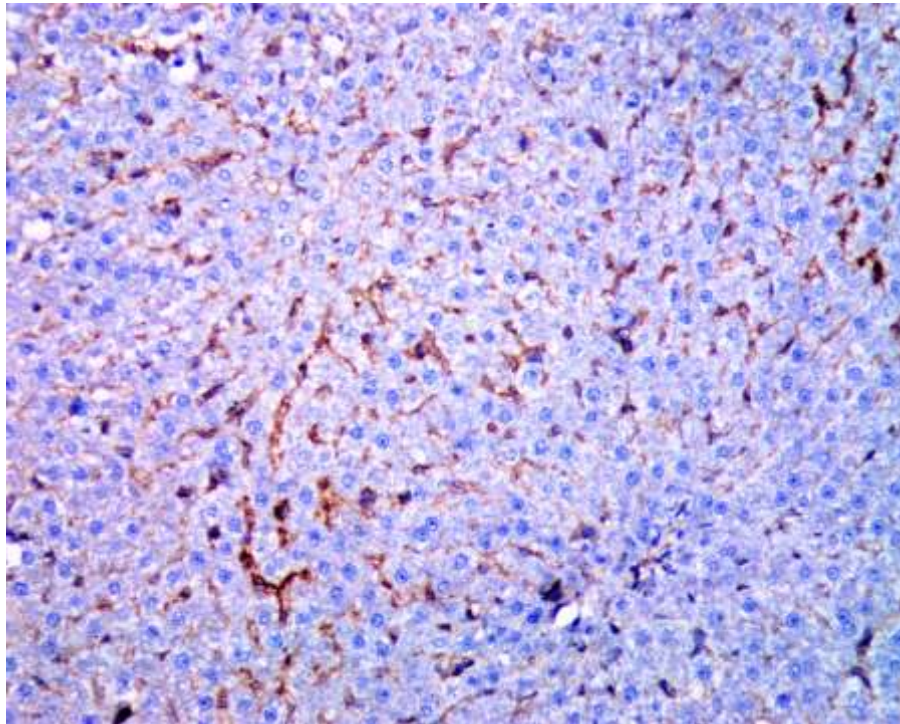


Рисунок 3.24 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи 7 днів ЛПС, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: $\times 200$

З розвитком ГРДС на сьомий день загальна кількість макрофагів в печінці суттєво не змінилася ($8,50 \pm 0,26$) % (рис. 3.25 А). Однак відбувся помітний зсув поляризації макрофагічних клітин. Відносна частка M2 протизапальних клітин (CD163+) значно збільшилася ($6,29 \pm 0,23$) % (рис. 3.25 В), тоді як M1 макрофаги стали менш чисельними ($3,54 \pm 0,10$) % (рис. 3.25 Б). У порівнянні з контролем M1 макрофаги були підвищені у 1,8 раза ($p < 0,001$), у той час як M2 макрофаги були знижені у 1,1 раза ($p < 0,05$).

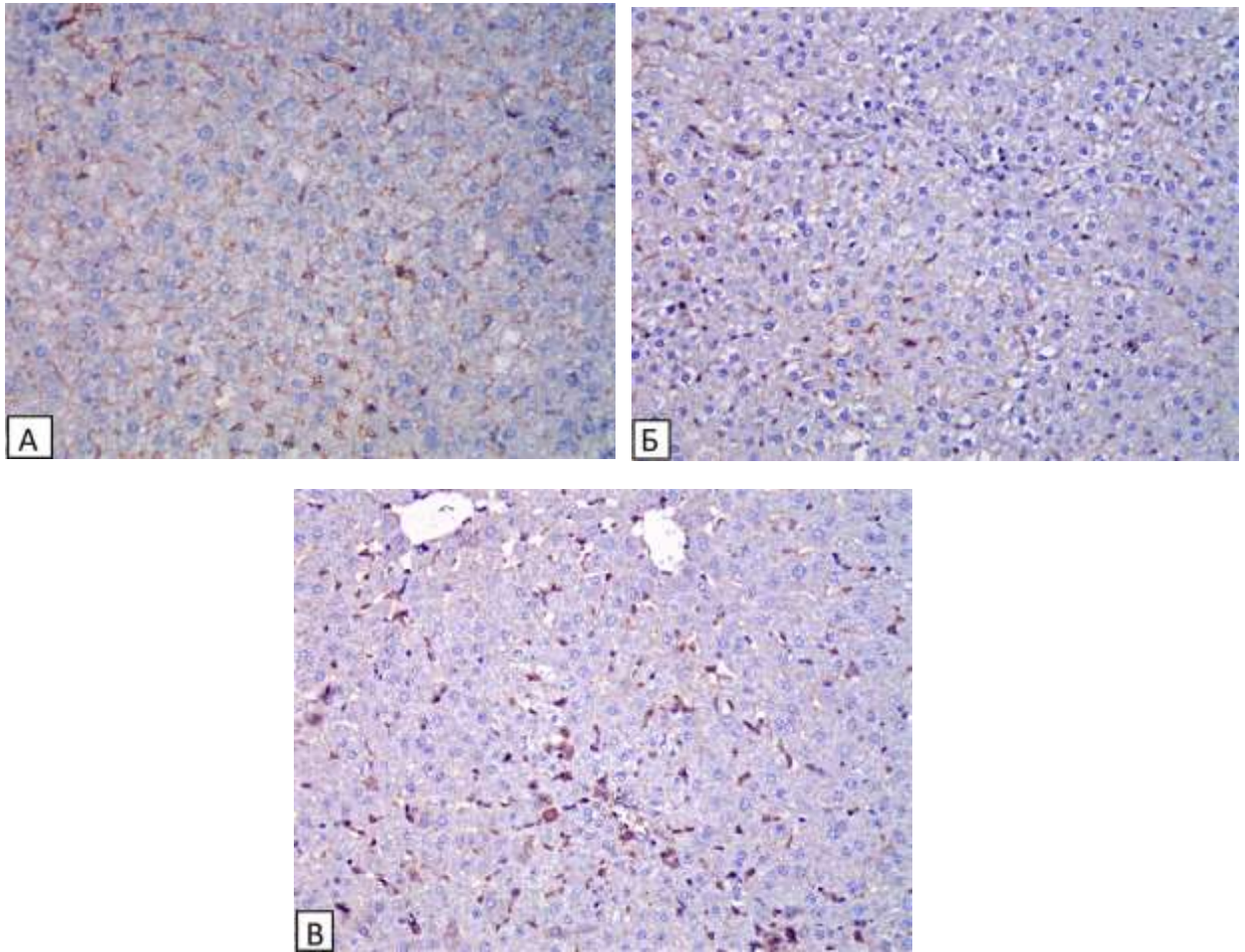
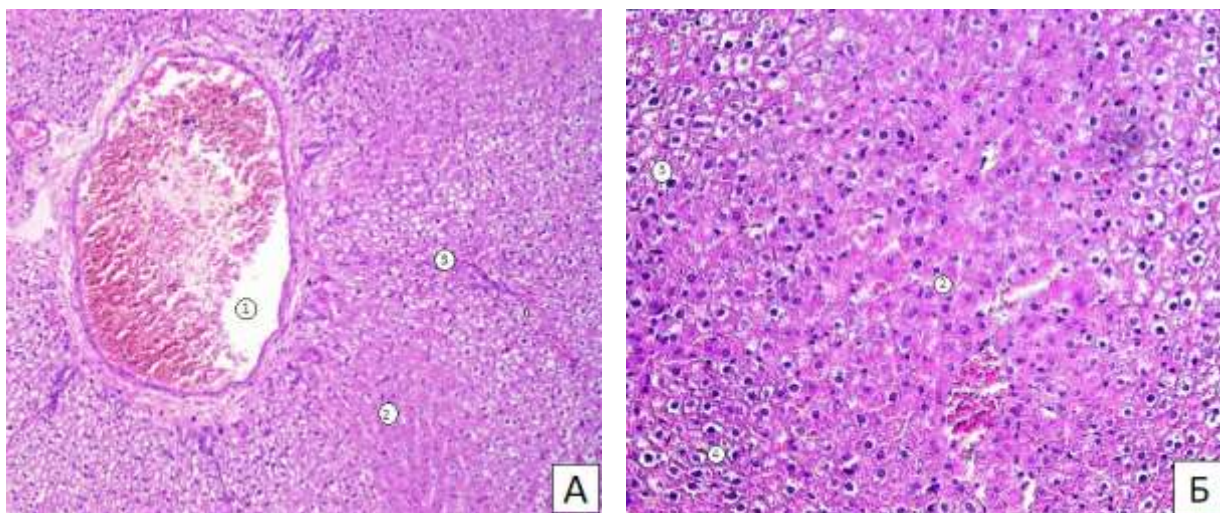


Рисунок 3.25 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 7 днів ЛПС, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 візуалізуються як коричневий колір.

Збільшення: x 200

На 14 добу у судинах печінки ще зберігалися ознаки гемостазу. Паренхіма складалася із чітко відокремлених груп світлих та темних гепатоцитів. Багато гепатоцитів з пікнотичними ядрами. Структура печінкових балок та часточок залишалася порушеною (рис. 3.26 А, Б).

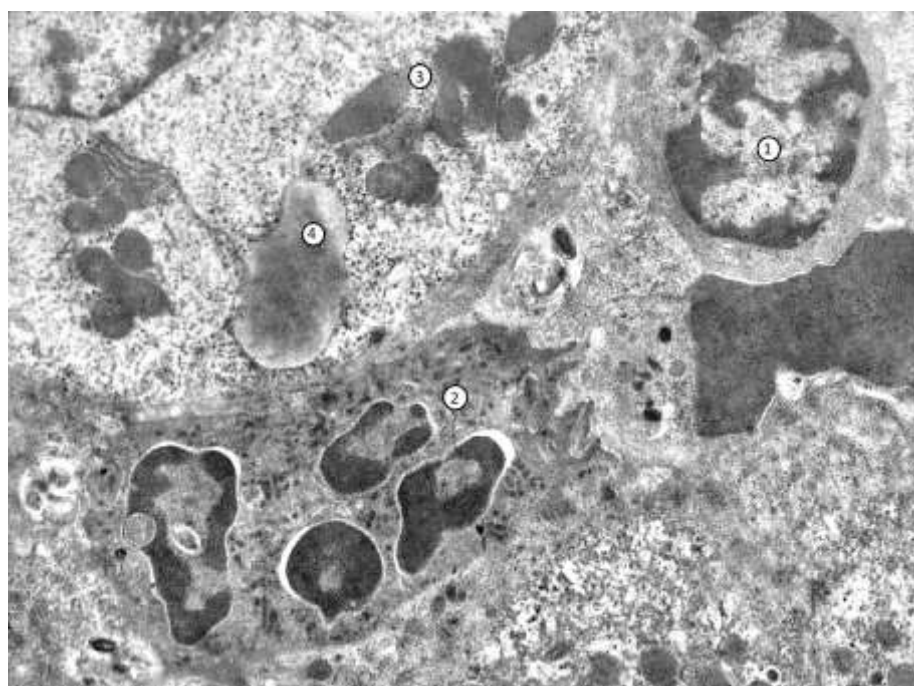
При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки на 14 добу експерименту відмічалися значні ультраструктурні зміни гепатоцитів унаслідок перенесеного клітинного стресу. Цитоплазма була значно вакуолізована, нетипово компартменталізована, що свідчило про порушення метаболізму (рис. 3.27).



Умовні позначки: 1 – лізований венозний тромб, 2 – темні гепатоцити, 3 – світлі гепатоцити, 4 — пікноз.

Рисунок 3.26 – Гістологічні зміни у печінці щурів на 14 добу після змодельованого ГРДС. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення:

х 100 (А), х 200 (Б)

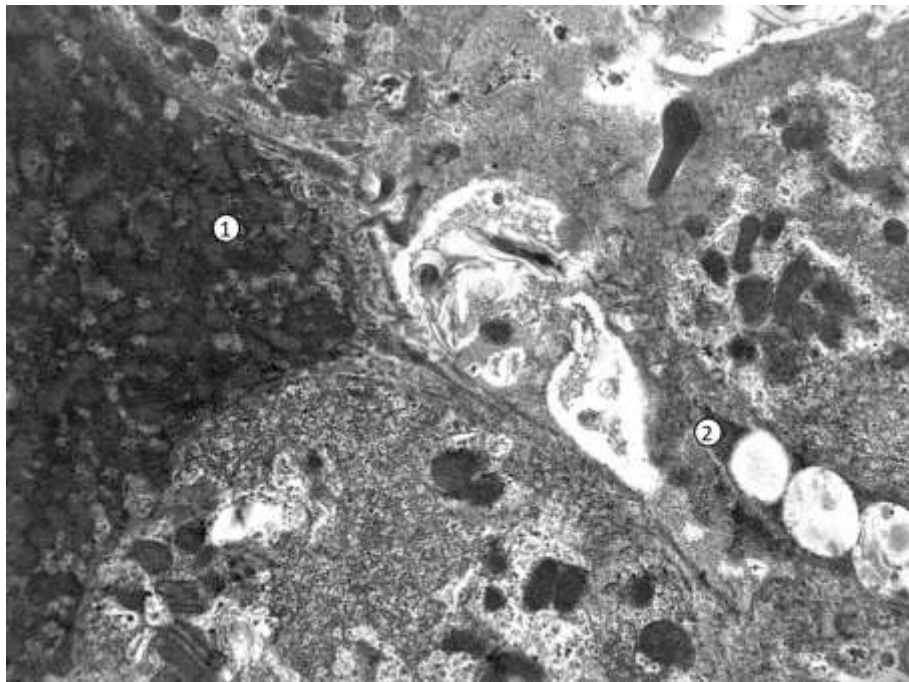


Умовні позначки: 1 – лімфоцит, 2 – нейтрофіл у просвіті синусоїдного капіляра, 3 – набряклі мітохондрії, 4 – крапля жиру в гепатоциті.

Рисунок 3.27 – Фрагмент гепатоцита печінки щура групи 14 днів ЛПС.

Електроннограма. Збільшення: х 8000

У цитоплазмі спостерігалось накопичення ліпідних включень, що є ознакою стеатозу (рис. 3.27, 3.28). Мітохондрії були набряклими, а їхні кристи пошкодженими. Ендоплазматична сітка була зруйнована. Ядра містили конденсований та маргіналізований хроматин. Клітини Іто були активовані та трансформовані у міофібробластоподібні клітини, що свідчило про активний фіброгенез у паренхімі печінки.



Умовні позначки: 1 – клітинний дебрис, 2 – краплі жиру.

Рисунок 3.28 – Фрагменти гепатоцитів печінки щура групи 14 днів ЛПС.

Електронограма. Збільшення: x 12000

Клітини Купфера були також активовані, ознакою чого була підвищена грануляція їхньої цитоплазми та наявність у ній фагоцитозних міхурців. Вони беруть участь у імунній відповіді та кліренсі клітинних дебрисів у синусоїдах печінки. Розширені та кровонаповнені синусоїдні гемокапіляри містили багато гранулярних та агранулярних лейкоцитів (рис. 3.27). Ендотелій був набряклим, а простір Діссе звуженим.

При імуногістохімічному аналізі препаратів печінки щурів на 14 добу експерименту відмічалось подальше зростання експресії TGF- β 1 ($12,55 \pm 0,59$) %, що є маркером фіброзу печінки (рис. 3.29). У порівнянні з контрольною групою площа, зайнята імунопреципітатом, зросла у 6,3 раза ($p < 0,001$).

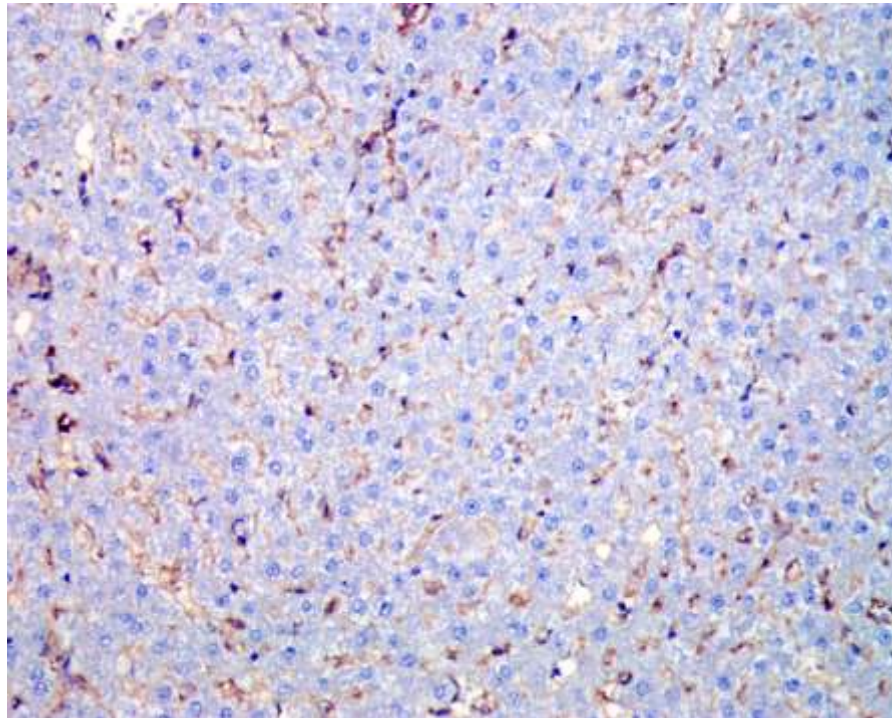


Рисунок 3.29 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи 14 днів ЛПС, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x 200

На 14 день експерименту при аналізі CD86+ і CD163+ цікавим виявився розподіл макрофагів. Показано суттєве переважання частки протизапальних M2 макрофагів ($4,76 \pm 0,22$) % порівняно із прозапальними M1 клітинами ($3,42 \pm 0,15$) % (рис. 3.30 Б, В, табл. 3.3). Порівняно з контрольною групою рівень M1 макрофагів був вищим у 1,7 раза ($p < 0,001$), а рівень M2 макрофагів був нижчим у 1,5 раза ($p < 0,001$).

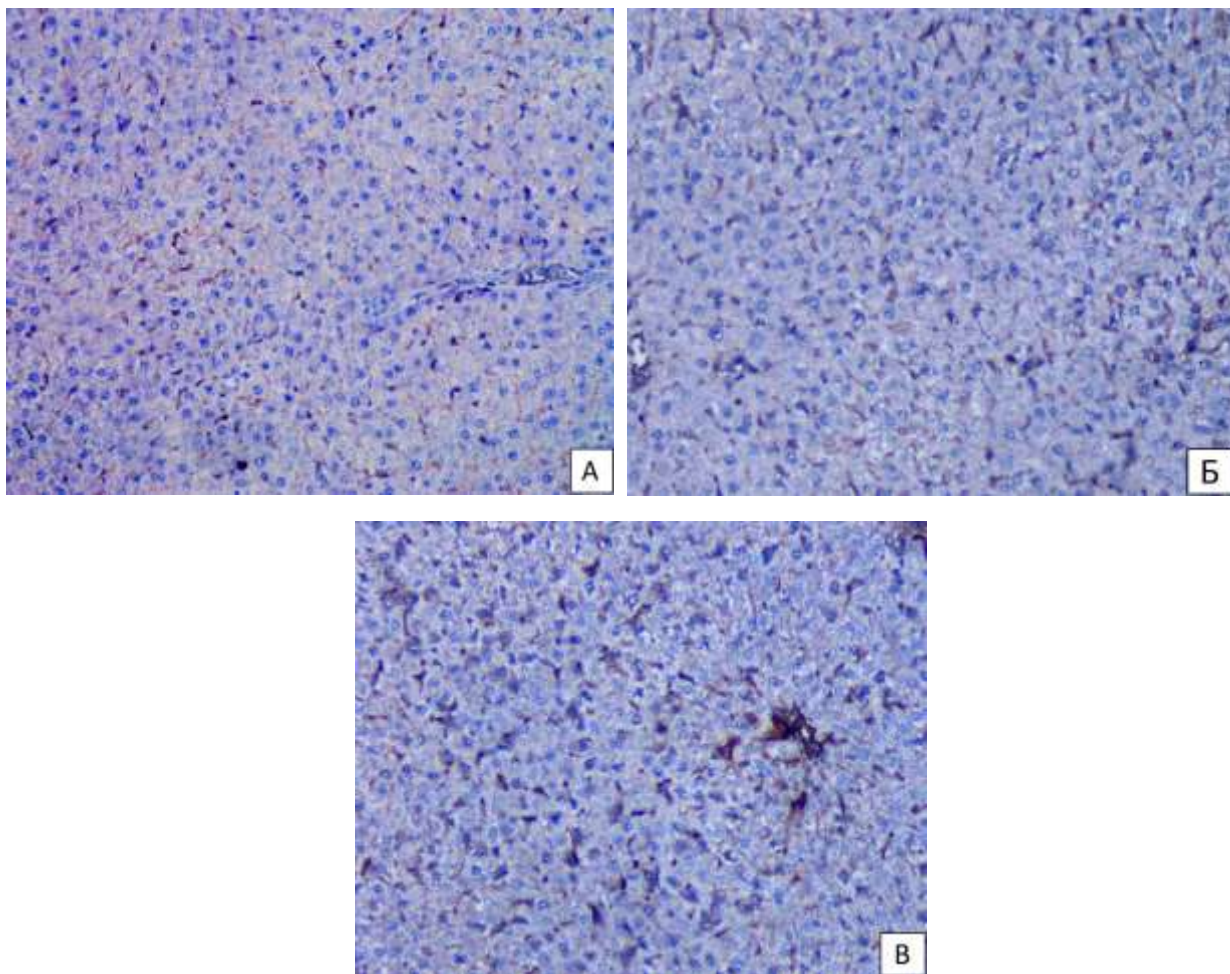
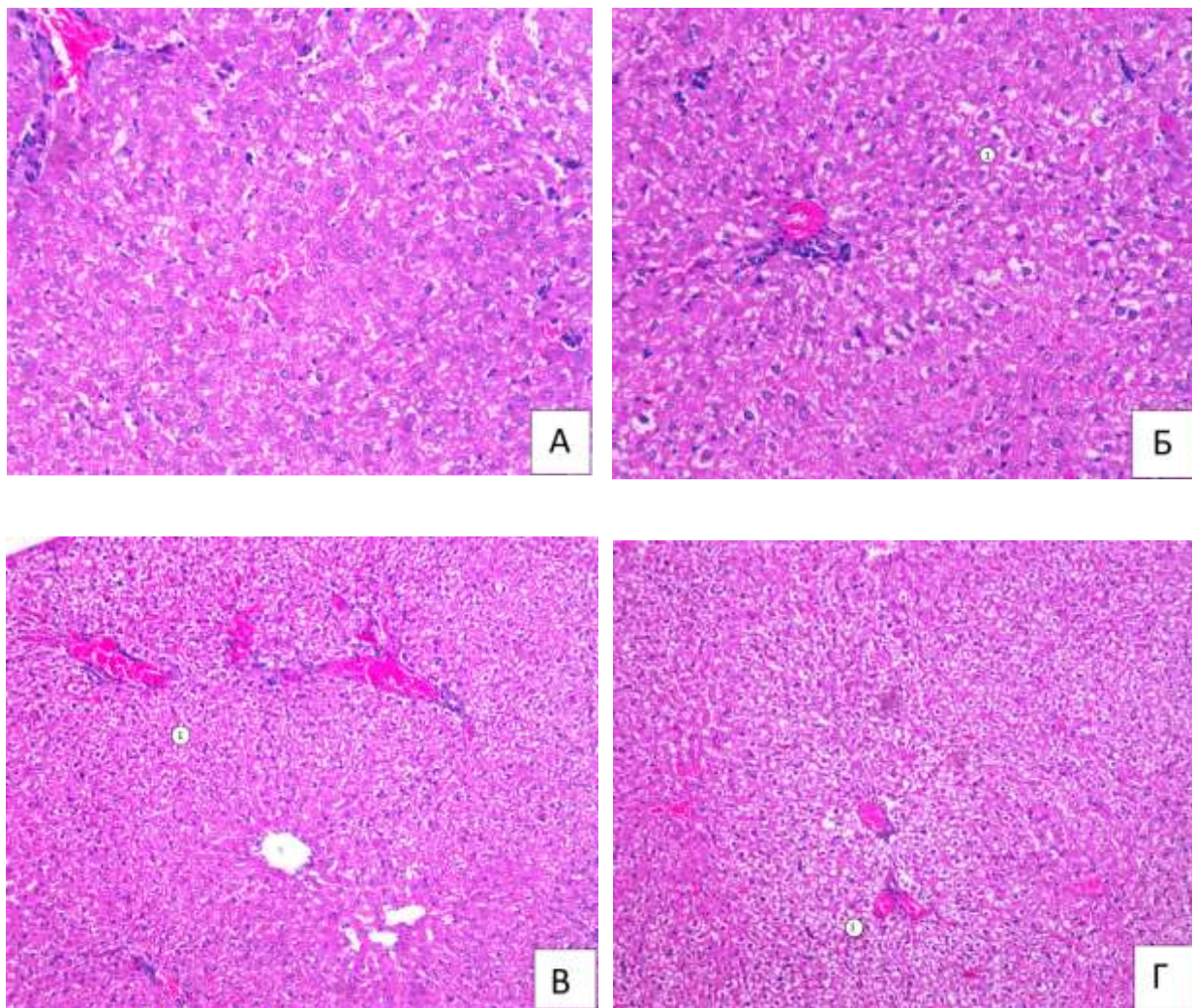


Рисунок 3.30 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 14 днів ЛПС, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 візуалізуються як коричневий колір.

Збільшення: x 200

На 28 добу ГРДС структура печінки щурів залишалася порушеною. Були присутні дуже вакуолізовані гепатоцити із зруйнованими ядрами. Ознаки некрозу також спостерігалися у темних типах гепатоцитів (рис. 3.31 А, Б, В, Г).

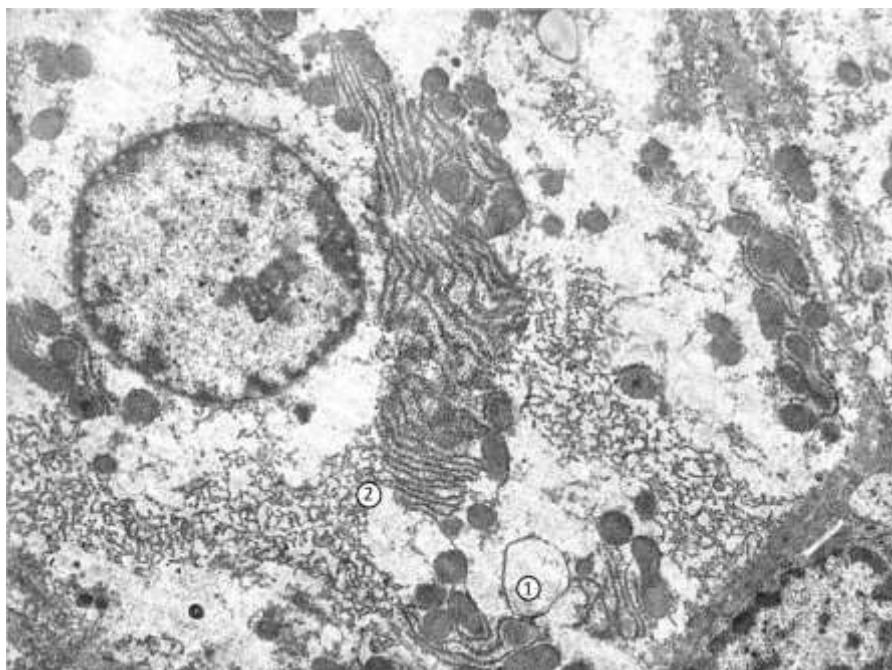
При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки на 28 добу експерименту спостерігалися фібротичні зміни. Клітини містили ознаки гідропічної дегенерації (рис. 3.32, 3.33). Ядра деяких гепатоцитів пікнотичні (містять конденсований хроматин), неправильної форми, що свідчить про клітинний стрес. Мітохондрії набрякли.



Умовні позначки: 1 – вакуолізовані гепатоцити.

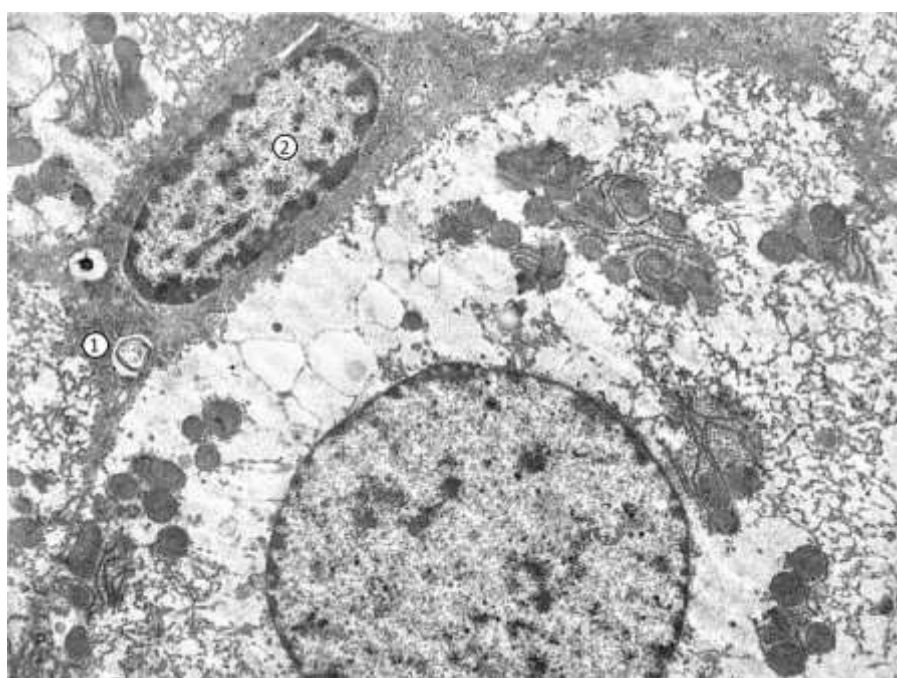
Рисунок 3.31 – Гістологічні зміни у печінці щурів на 28 добу після змодельованого гострого респіраторного дистрес-синдрому. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 100 (А, Б), x 200 (В, Г)

Підвищений вміст крапель жиру в цитоплазмі як результат запалення і фіброзу печінки (рис. 3.34). Активовані клітини Іто у просторі Діссе трансформувалися у міофібробластоподібні клітини з чітко вираженою ГЕС, що є ознакою підвищення синтезу білків. Краплі жиру, характерні для неактивних клітин Іто, зменшені у розмірі, або відсутні. У цитоплазмі було видно синтезовані волокна колагену. Клітини Іто беруть участь у фіброгенезі, відповідають за прогресування фіброзу.



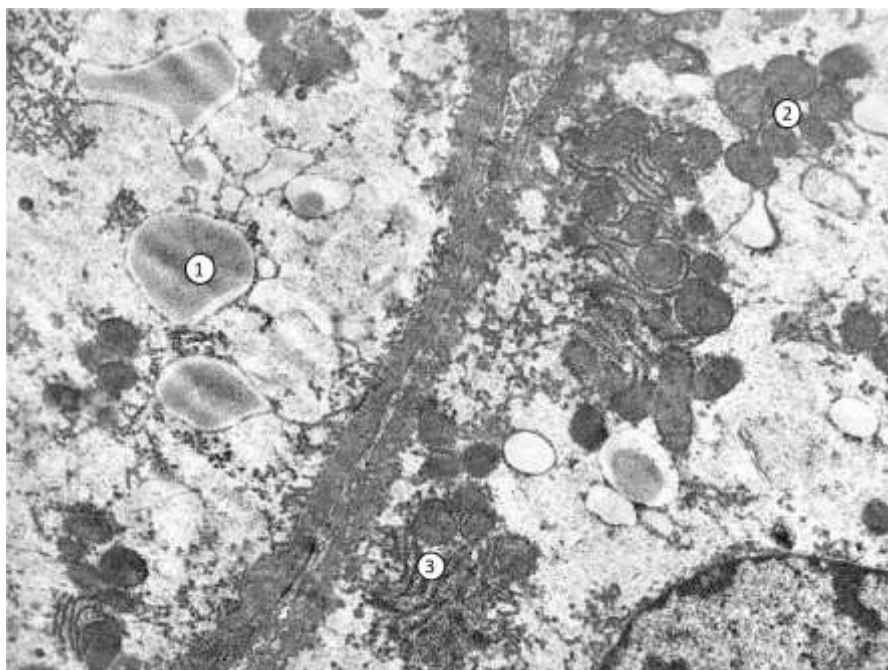
Умовні позначки: 1 – вакуоля, 2 – зруйнована ГЕС.

Рисунок 3.32 – Фрагмент гепатоцита на 28 добу досліду. Ознаки гідропічної дегенерації гепатоцитів. Електронограма. Збільшення: x 9000



Умовні позначки: 1 – мультамелярне тільце, 2 – ядро клітини Купфера.

Рисунок 3.33 – Фрагмент гепатоцита на 28 добу досліду. Ознаки вакуольної дегенерації ендоплазматичної сітки. Електронограма. Збільшення: x 10000



Умовні позначки: 1 – ліпідні краплі в цитоплазмі, 2 – набряклі мітохондрії, 3 – розширена ендоплазматична сітка.

Рисунок 3.34 – Фрагмент гепатоцита на 28 добу досліді. Електронограма.

Збільшення: $\times 10000$

Підвищений вміст волокон колагену в екстрацелюлярному матриксі. Унаслідок фібротичних змін спостерігалось порушення організації печінкових балок. Простір Діссе звужений у результаті відкладення колагену. Клітини Купфера виявлялися в меншій кількості, містили лізосоми та фагоцитозні пухирці, як результат ураження тканини при фіброзі печінки.

Ендотеліальні клітини печінки мали ознаки стресу, такі як набрякла цитоплазма та підвищена кількість везикул. Пори зменшені у розмірі та кількості через фібротичні зміни у просторі Діссе.

При імуногістохімічному аналізі TGF- β 1 у тканинах печінки на 28 добу експерименту виявлено значний ступінь його експресії ($15,01 \pm 0,72$) % , що є ознакою вираженого фіброзу печінки (рис. 3.35). У порівнянні з контрольною групою площа, зайнята імунопреципітатом, зросла у 7,6 раза ($p < 0,001$).

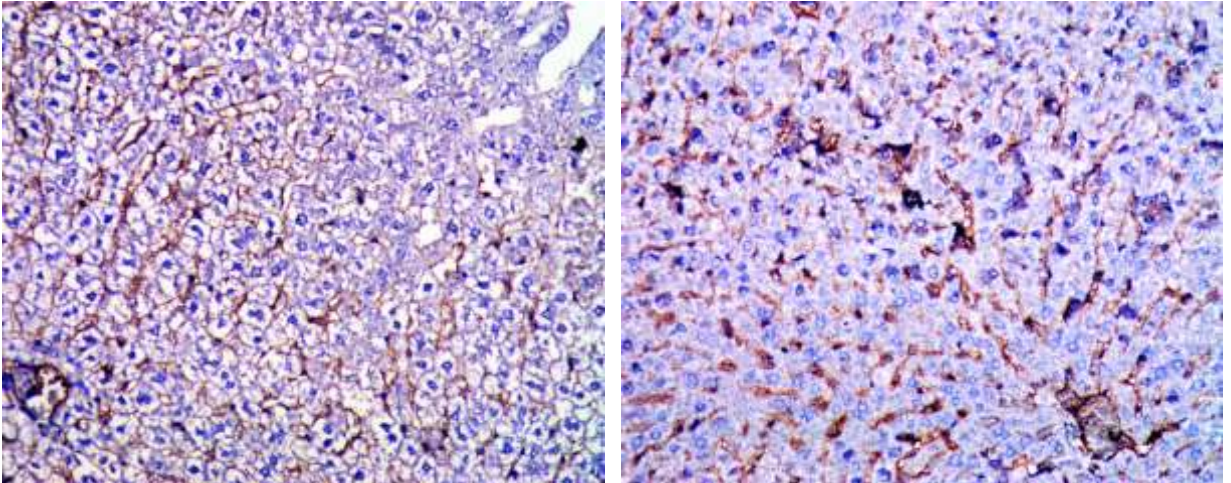


Рисунок 3.35 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 28 днів ЛПС, забарвлених для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x 200

На 28 день експерименту в препаратах печінки виявлено приблизно однакову кількість M1- та M2-макрофагів ($4,78 \pm 0,15$ % та $4,17 \pm 0,18$ % відповідно) (рис. 3.36 Б, В). У порівнянні з контрольною групою прозапальні M1 макрофаги були підвищені у 2,4 раза ($p < 0,001$), у той час як протизапальні M2 макрофаги були знижені у 1,7 раза ($p < 0,001$).

Експериментально змодельований ГРДС викликає значні зміни компонентів тканин печінки. Характер і ступінь морфологічних пошкоджень органу неоднаковий у різні періоди експерименту.

На початкових стадіях (6- 24 год) спостерігалися розширення просвітів мікроциркуляторного русла печінки та збільшення його кровонаповнення, у той час як структура печінки ще залишається збереженою. У пізніх стадіях ГРДС переважали тромби судин, які у подальшому лізувалися. Гепатоцити зазнавали некротичних змін, унаслідок чого порушувалася часточково-балкова будова печінки.

Ступінь вираження патологічних змін, зареєстрованих під час гістологічного дослідження печінки щурів зі змодельованим ГРДС у різні часові терміни експерименту, наведений в таблиці 3.1. Загальний ступінь

гістологічного ураження печінки оцінювали за КГОУ. Було відмічено 2 піки ГРДС — на 3 добу (14 балів КГОУ) та на 28 добу (15 балів КГОУ).

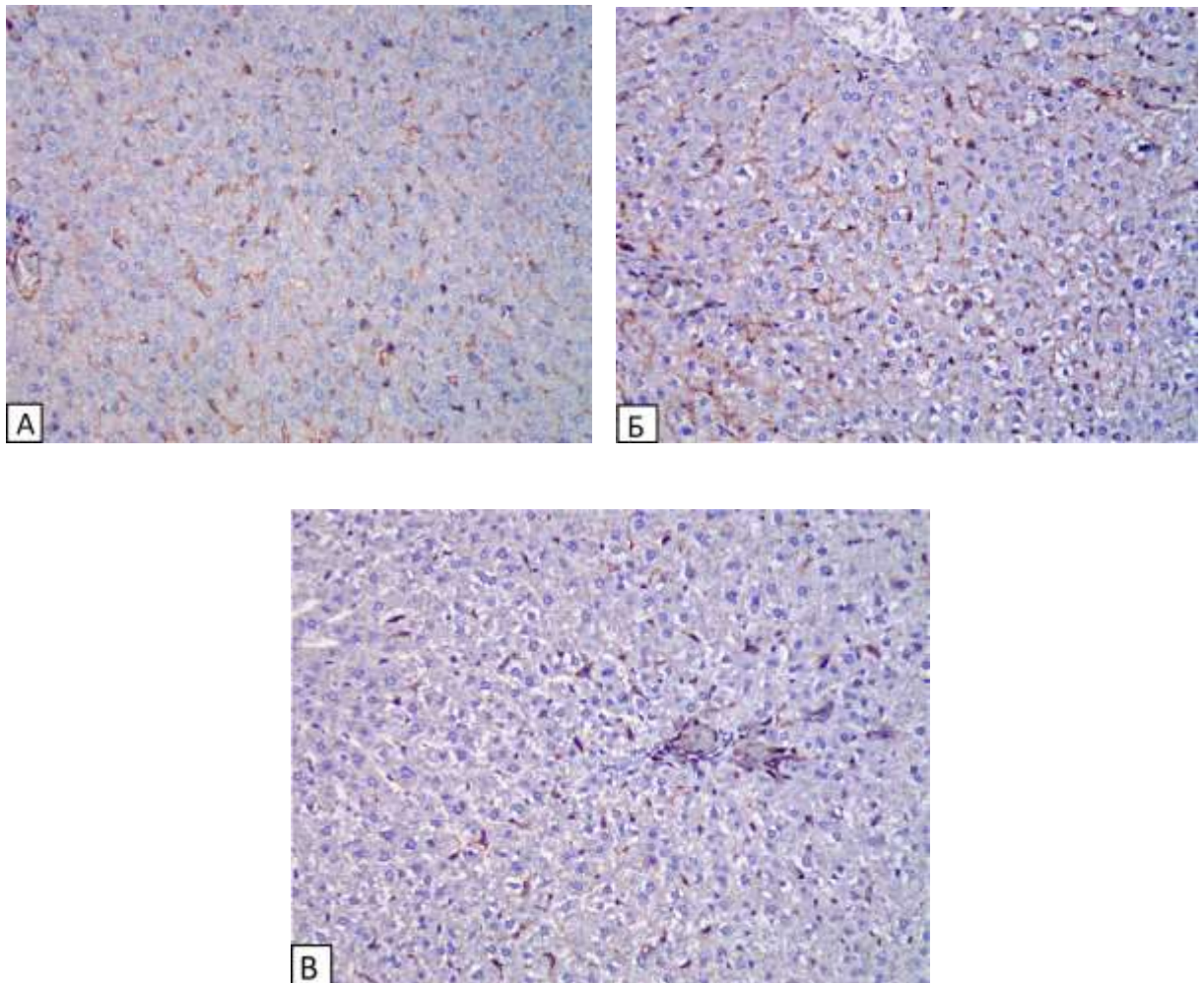


Рисунок 3.36 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 28 днів ЛПС, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 відображаються коричневим кольором.

Збільшення: x200

На основі імуногістохімічного аналізу експресії TGF- β 1 було виявлено, що відсоток площі препаратів печінки з імунопреципітацією в групі контроль був дуже малий ($1,98 \pm 0,09$). На 6 годину він майже не зріс (відмінність не достовірна). На 24 годину експресія TGF- β 1 починає достовірно зростати у 2,0 раза порівняно з контролем ($p < 0,001$), на 3 добу вона зросла у 4,3 раза ($p < 0,001$), на 7 добу у 5,4 раза ($p < 0,001$), на 14 добу у 6,3 раза ($p < 0,001$), а на

28 добу у 7,6 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контрольною групою. Це свідчить про розвиток фіброзу печінки (табл. 3.2).

Таблиця 3.1 – Гістологічне оцінювання ураження печінки в експериментальних групах

Група	КГОУ	Гепатоцелюлярний некроз	Пошкодження структури	Вакуолізація	Запалення	ДВЗ-синдром	Фіброз
Контроль	0	0	0	0	0	0	0
6 год ЛПС	4	1	0	0	2	1	0
24 год ЛПС	10	2	1	2	2	2	1
3 дні ЛПС	14	3	2	2	2	3	2
7 днів ЛПС	11	2	2	1	2	3	2
14 днів ЛПС	13	2	3	2	2	2	2
28 днів ЛПС	15	3	3	3	1	2	3

Примітка. 0 відповідає відсутності ураження, а 3 відповідає значному ураженню.

Таблиця 3.2 – Частка площі препаратів печінки з експресією TGF- β 1

Група	Частка площі печінки з експресією TGF- β 1, %
Контроль	1,98 \pm 0,09
6 год ЛПС	2,25 \pm 0,12
24 год ЛПС	3,88 \pm 0,15***
3 дні ЛПС	8,54 \pm 0,39***
7 днів ЛПС	10,67 \pm 0,47***
14 днів ЛПС	12,55 \pm 0,59***
28 днів ЛПС	15,01 \pm 0,72***

Примітка. * – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання і тварин, яким моделювали ГРДС (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

Згідно з даними проведеного кількісного аналізу площі печінки, зайнятої різними субпопуляціями макрофагів, було статистично значуще підвищення частки прозапальних M1 макрофагів (CD86+) та відповідне зниження частки протизапальних M2 макрофагів (CD163+) при розвитку ГРДС, у той час як загальна кількість макрофагів (CD68+) залишалася незмінною. У групі контроль переважали M2 макрофаги (7,06 \pm 0,19), тоді як частка M1 макрофагів

була малою ($2,01 \pm 0,09$). На 6 годину експерименту переважали M1 макрофаги. Їхній рівень зріс у 3,5 раза ($p < 0,001$), а рівень M2 макрофагів знизився у 3,3 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. На 24 годину M1 макрофаги залишалися підвищеними у 3,4 раза ($p < 0,001$), а M2 макрофаги були знизеними у 3,3 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. Через 3 дні після моделювання ГРДС M1 макрофаги були підвищені у 3,4 раза ($p < 0,001$), а M2 макрофаги були знизені у 3,3 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. Через 7 днів після моделювання M1 макрофаги були підвищені меншою мірою – у 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем, у той час як M2 макрофаги були знизені у 1,1 раза ($p < 0,05$). На 14 добу ці показники становили відповідно 1,7 раза ($p < 0,001$) та 1,5 раза ($p < 0,001$), а на 28 добу 2,4 раза ($p < 0,001$) та 1,7 раза ($p < 0,001$) (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Частка площі препаратів печінки, заповнена макрофагами

Група	Частка площі препаратів печінки, заповнена макрофагами, %		
	CD68+	CD86+	CD163+
Контроль	$8,68 \pm 0,32$	$2,01 \pm 0,09$	$7,06 \pm 0,19$
6 год ЛПС	$8,03 \pm 0,37$	$6,98 \pm 0,31^{***}$	$1,15 \pm 0,05^{***}$
24 год ЛПС	$8,87 \pm 0,41$	$6,77 \pm 0,29^{***}$	$2,12 \pm 0,09^{***}$
3 дні ЛПС	$9,03 \pm 0,32$	$6,89 \pm 0,27^{***}$	$2,13 \pm 0,15^{***}$
7 днів ЛПС	$8,50 \pm 0,26$	$3,54 \pm 0,10^{***}$	$6,29 \pm 0,23^*$
14 днів ЛПС	$8,12 \pm 0,37$	$3,42 \pm 0,15^{***}$	$4,76 \pm 0,22^{***}$
28 днів ЛПС	$7,88 \pm 0,27$	$4,78 \pm 0,15^{***}$	$4,17 \pm 0,18^{***}$

Примітка.* – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання і тварин, яким моделювали ГРДС (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

Таким чином, проведення мікроскопічних, субмікроскопічних, імуногістохімічних досліджень печінки та біохімічного аналізу крові інтактних щурів не виявило відхилень від видової норми. Спостерігалися печінкові часточки шестигранної форми з центральною веною, печінковими синусоїдами, розташованими між радіальними балками гепатоцитів, а також порталними трактами, розташованими в кутах часточок. Дані, отримані як результат

дослідження печінки та крові інтактних щурів були використані як контроль для порівняння з даними досліджень інших груп тварин.

Перебіг ГРДС у групах без корекції відбувався стадійно. На 6-24 годину ГРДС спостерігалися розширені кровонаповнені судини печінки та інфільтрація триад клітинами запалення. При проведенні електронномікроскопічного дослідження виявлено ознаки пошкодження ультраструктури гепатоцитів. Спостерігалася збільшена кількість M1 макрофагів, що вказує на активацію прозапальної відповіді. За результатами імуногістохімічного аналізу накопичення маркера фіброзу TGF- β 1 у тканинах печінки відмічено активацію експресії даного цитокіна стромальними клітинами. Результати біохімічного аналізу крові вказували значне зростання маркерів ураження печінки АСТ, АЛТ, ЛФ на 6 годину. На 24 годину АСТ і АЛТ почали знижуватися, а ЛФ зростала і далі. На 3 добу ГРДС у печінці почали спостерігатися темні та світлі типи гепатоцитів. Гідропічно дегенеровані світлі гепатоцити були локалізовані в центральній частині балок, а темні клітини з базофільною цитоплазмою знаходилися на периферії часточок та біля центральних вен. Були присутні гепатоцити з пікнотичними ядрами. Дані електронномікроскопічного аналізу свідчили про ознаки внутрішньоклітинного набряку гепатоцитів, руйнування мітохондрій та початок активації клітин Іто. Рівень експресії TGF- β 1 продовжував зростати. Кількість прозапальних M1 макрофагів підвищувалася. На 7-14 доби ГРДС судини печінки продовжували бути кровонаповненими та тромбованими. Часточково-балкова структура печінки була порушена. Чітко вирізнялися групи темних і світлих клітин. При проведенні електронномікроскопічного дослідження відмічено появу ознак відновлення у часточках печінки, зменшення кількості уражених органел, проте досі була присутня вакуолізація цитоплазми, розширення цистерн ендоплазматичної сітки та набряк мітохондрій. Клітини Іто були активовані, а простір Діссе розширений. Трансформація клітин Іто призвела до збільшення відкладень колагену, що проявлялось у подальшому зростанні рівнів експресії TGF- β 1.

Почала зростати кількість M2 макрофагів з протизапальною функцією та здатністю сприяти відновленню тканин. Зростали сироваткові рівні АСТ та ЛФ. У пізній термін експерименту (28 доба) спостерігалися великі ділянки вакуолізованих гепатоцитів зі зруйнованими ядрами, відмічалось порушення часточково-балкової будови печінки. При проведенні електронномікроскопічного дослідження виявлено ознаки фібротичних змін тканин печінки. У цитоплазмі гепатоцитів спостерігався підвищений вміст крапель жиру. В екстрацелюлярному матриксі спостерігалася велика кількість волокон колагену, синтезованих активованими клітинами Іто. Як наслідок, простір Діссе був звуженим. Доказом фіброзу печінки також був значний ступінь експресії TGF- β 1, визначений методом імуногістохімії. Рівні АСТ та ЛФ знизилися, але так і не досягнули контрольних.

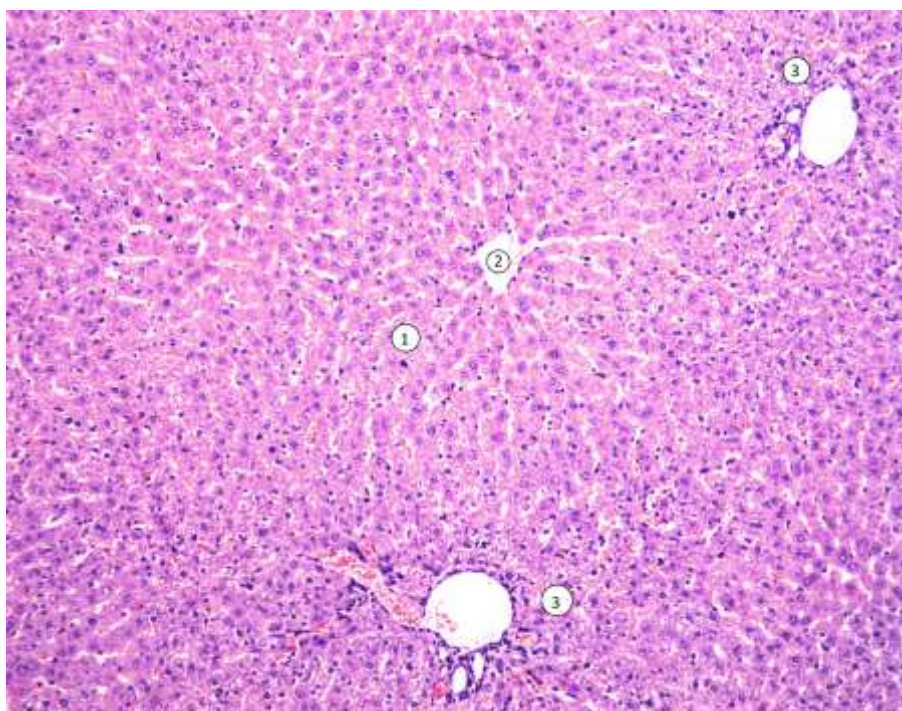
Результати даного розділу висвітлені у наукових публікаціях [5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 149; 150; 151; 152; 153].

РОЗДІЛ 4

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ РЕСПІРАТОРНОМУ ДИСТРЕС-СИНДРОМІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

4.1 Гістологічна, електронномікроскопічна та імуногістохімічна характеристика структурних компонентів печінки тварин групи контроль-МСК

На гістологічних препаратах печінки щурів групи контроль-МСК (3 доби після перитонеального введення МСК) не виявлено деструктивних змін у структурі органа. Чітко спостерігалася часточкова будова печінки. Балки гепатоцитів розташовані радіально навколо центральних вен. Судини без ознак стазів і тромбоутворення (рис. 4.1).

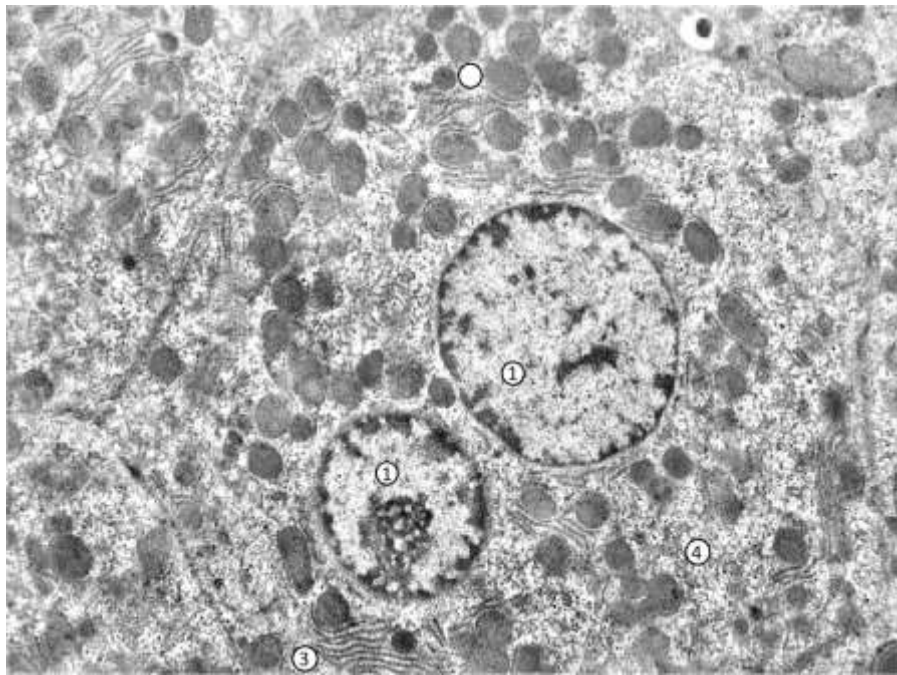


Умовні позначки: 1 – часточково-балкове розташування гепатоцитів, 2 – центральна вена, 3 – портальні тракти.

Рисунок 4.1 – Гістологічна будова печінки щурів групи контроль-МСК.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 100

Гепатоцити на електронограмах були структурно інтактні, зберегли свої морфологічні характеристики. Ознаки клітинного стресу, ураження чи структурні аберації відсутні. Кількість та розмір гранул глікогену у цитоплазмі відповідала групі інтактних тварин, що свідчить про відсутність порушень клітинного метаболізму (рис. 4.2).



Умовні позначки: 1 – ядра, 2 – мітохондрії, 3 – гранулярна ендоплазматична сітка, 4 – гранули глікогену.

Рисунок 4.2 – Гепатоцити тварини групи контроль-МСК. Електронограма.

Збільшення: x 8000

Відсутні накопичення жирових крапель чи вакуоль, що є свідченням нормального метаболізму ліпідів та відсутності печінкового стеатозу. Мітохондріальна структура збережена, кристи інтактні, ознак ураження чи дисфункції не спостерігалось, що свідчить про відсутність порушення продукції енергії (рис. 4.2).

Клітини Іто зберегли свій неактивований фенотип. Жирові краплі у їхній цитоплазмі інтактні, за кількістю та структурою не відрізнялися від контролю. Простір Діссе добре видимий, на вигляд не відрізнявся від групи інтактних

тварин. Цілісність структури тканин печінки збережена. Клітини Купфера не виявляли ознак активації, таких як збільшення розміру чи фагоцитарної активності, що свідчить про відсутність запальної відповіді.

Ендотелій печінки на вигляд не відрізнявся від інтактного. Пори відкриті та структурно не змінені, що є свідченням відсутності порушення мікроциркуляторного русла та кровотоку печінки.

При імуногістохімічному аналізі TGF- β 1 у тканинах печінки групи контроль-МСК виявлено, що він експресувався на такому ж низькому рівні, як і у групі контролю ($2,23 \pm 0,10$) %, що є ознакою відсутності розвитку фіброзу (рис. 4.3).

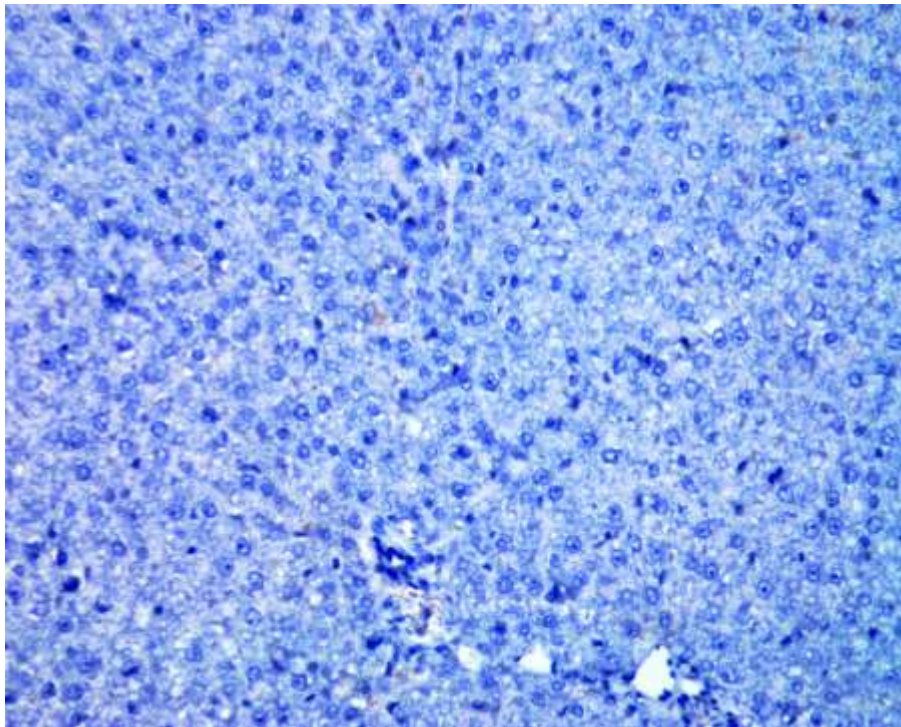


Рисунок 4.3 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів групи контроль-МСК, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x200

Розподіл субпопуляцій макрофагів у печінці щурів групи контроль-МСК був в основному схожий на той, що спостерігався в інтактних щурів (рис. 4.4). Переважна більшість печінкових макрофагів — клітин Купфера була представлена М2 протизапальним фенотипом (рис. 4.4).

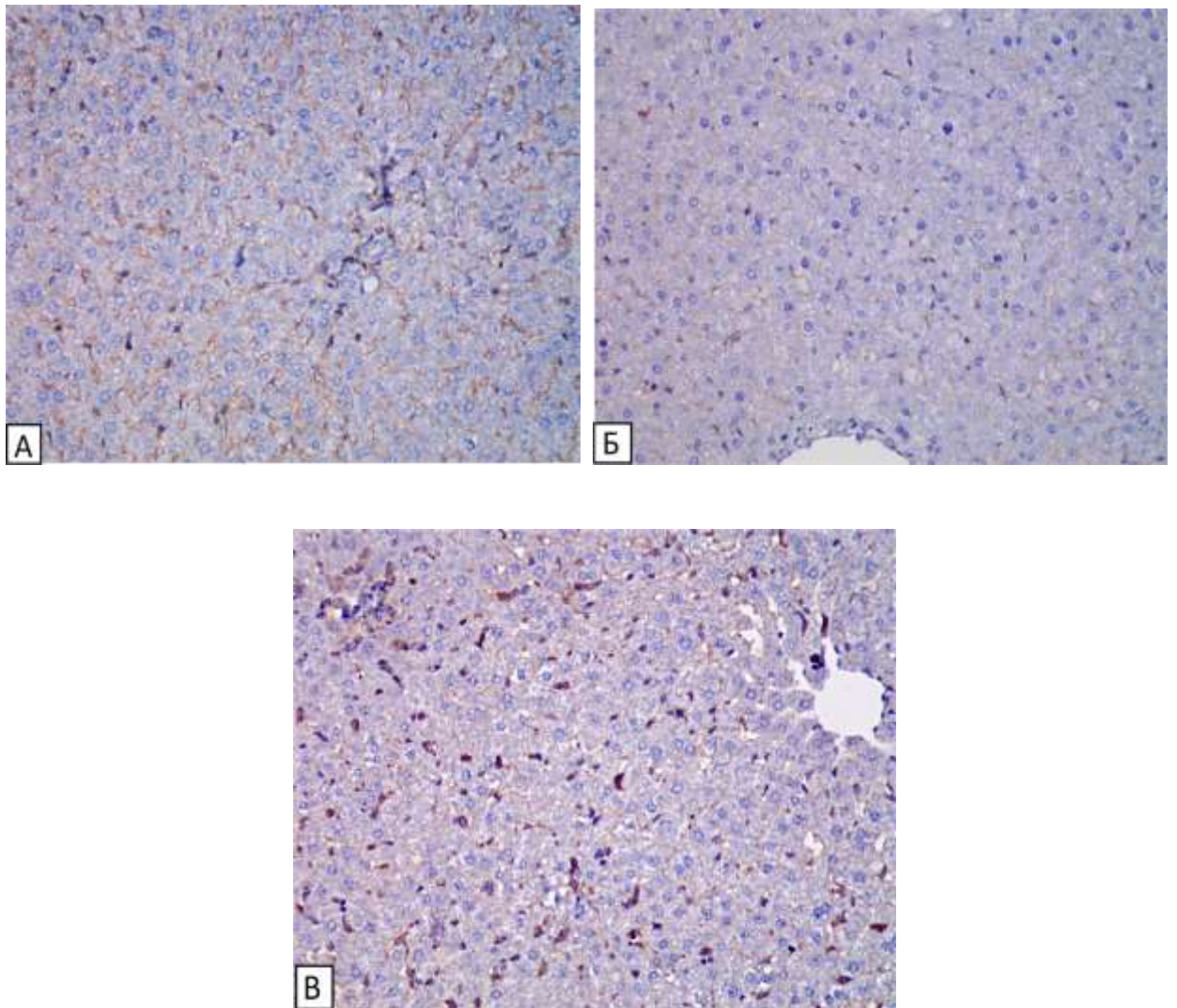
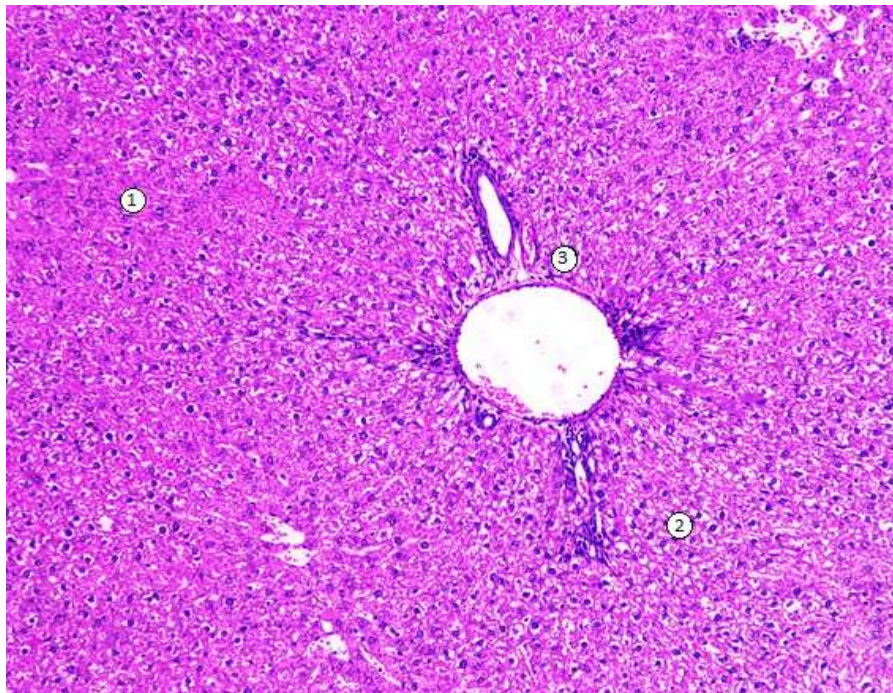


Рисунок 4.4 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи контроль-МСК, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). Клітини CD68+, CD86+ та CD163+ відображаються коричневим кольором. Збільшення: x 200

4.2 Гістологічні, електронномікроскопічні та імуногістохімічні зміни печінки після моделювання гострого респіраторного дистрес-синдрому за умов застосування мезенхімальних стовбурових клітин

У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК частина гепатоцитів довкола портальних трактів мала ознаки вакуольної дегенерації. Однак на препаратах переважали темні базофільні гепатоцити, які в основному локалізувалися в центральних частинах часточок. Просвіти судин не були облітеровані, але спостерігались пристінкові тромби. Присутня слабка лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів (рис. 4.5).

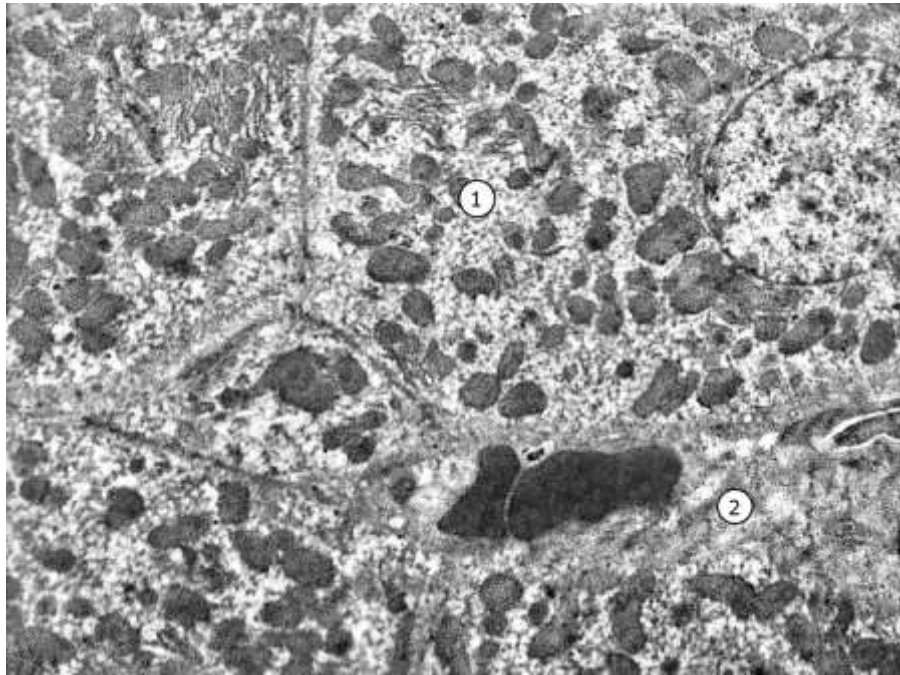


Умовні позначки: 1 – темні гепатоцити, 2 – світлі гепатоцити, 3 – портальний тракт.

Рисунок 4.5 – Гістологічні зміни в печінці щурів у групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 100

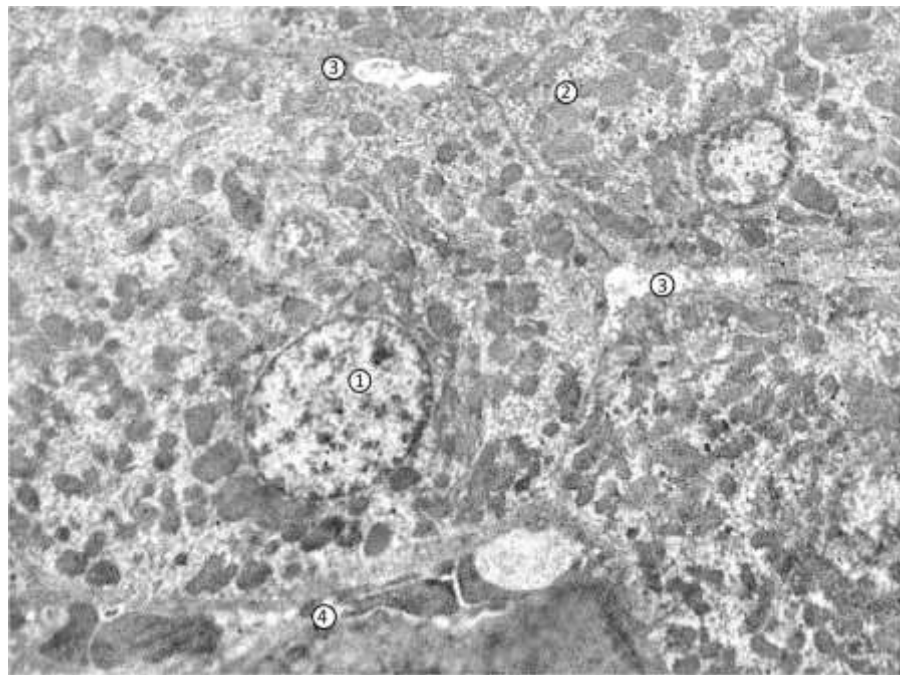
При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки виявлено, що у порівнянні з групою 3 дні ЛПС гепатоцити щурів групи 24 год ЛПС + 2 дні МСК виглядали більш збереженими. Клітинна архітектура,

цілісність клітинних мембран та органел були відносно інтактними (рис. 4.6, 4.7).



Умовні позначки: 1 – гепатоцит зі збереженою ультраструктурою, 2 – просвіт синусоїдного гемокапіляра.

Рисунок 4.6 – Фрагмент гепатоцита щура групи 24 год ЛПС + 2 дні МСК.
Електронограма. Збільшення: x 7000



Умовні позначки: 1 – ядро, 2 – мітохондрії, 3 – розширені жовчні капіляри, 4 – кровонаповнений синусоїдний капіляр.

Рисунок 4.7 – Фрагменти гепатоцитів щура групи 24 год ЛПС + 2 дні МСК.
Електронограма. Збільшення: x 7000

Мітохондрії мали менше ознак ураження, зберегли свою нормальну структуру та добре видимі кристи, що свідчить про зменшений оксидативний стрес та збереження продукції енергії (рис. 4.7).

ГЕС була менш розширена, була менша кількість відкріплених рибосом у порівнянні з групою без корекції, що свідчить про покращення синтезу та секреції білків. Клітини Іто менш активовані. Простір Діссе менш розширений, що свідчить про менший рівень набряку печінки та судинної проникності унаслідок збереження цілісності ендотеліальної вистилки синусоїдних гемокапілярів (рис. 4.6).

Клітини Купфера менш активовані, з меншою кількістю фагоцитозних пухирців, що свідчить про протизапальний вплив МСК. В ендотеліальних клітинах печінки інтактна клітинна мембрана, зменшена кількість внутрішньоклітинних везикул.

При імуногістохімічному аналізі TGF- β 1 у тканинах печінки групи 24 год ЛПС + 2 дні МСК виявлено, що частка площі, зайнята імунопреципітатом, становила $(4,95 \pm 0,21)$ %. Його експресія знизилася в середньому у 1,7 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з групою без корекції (3 дні ЛПС), що свідчить про антифібротичну дію МСК (рис. 4.8).

У тварин групи 24 год ЛПС + 2 дні МСК значно більша частина макрофагів мала CD163+ маркери, порівняно з групою 3 дні ЛПС без корекції (рис. 4.9). Площа, заповнена M2 макрофагами, зросла в середньому у 3,3 рази ($p < 0,001$), і становила $(7,04 \pm 0,41)$ %, а площа, зайнята M1 макрофагами, зменшилася у 1,8 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС і становила $(3,75 \pm 0,12)$ %. Це свідчить про зміну поляризації макрофагів на користь фенотипу M2 та активацію протизапальної імунної реакції під впливом МСК.

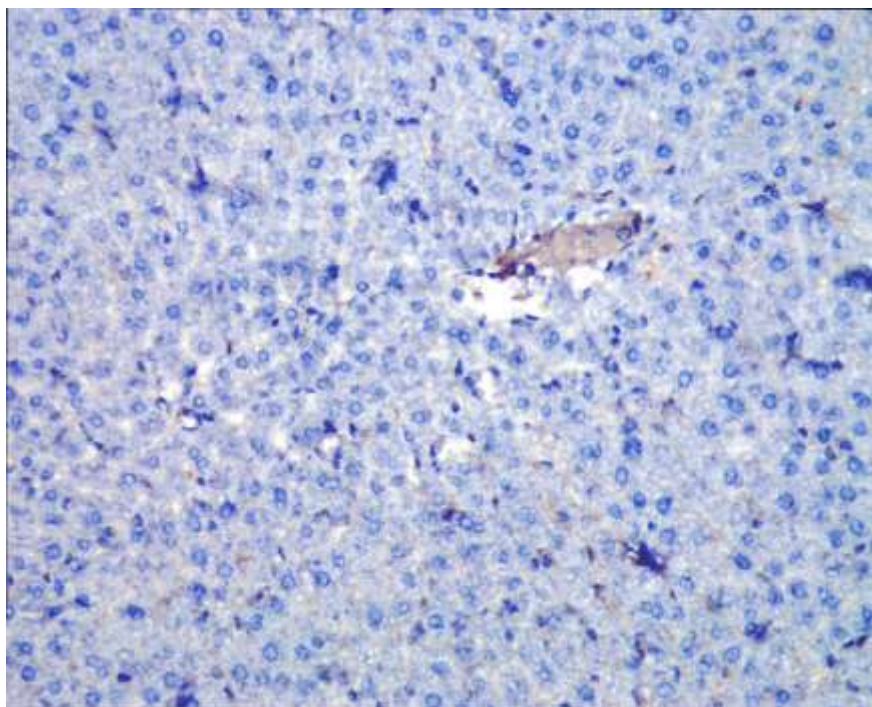


Рисунок 4.8 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів 24 год ЛПС + 2 дні МСК, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії.

Збільшення: x 200

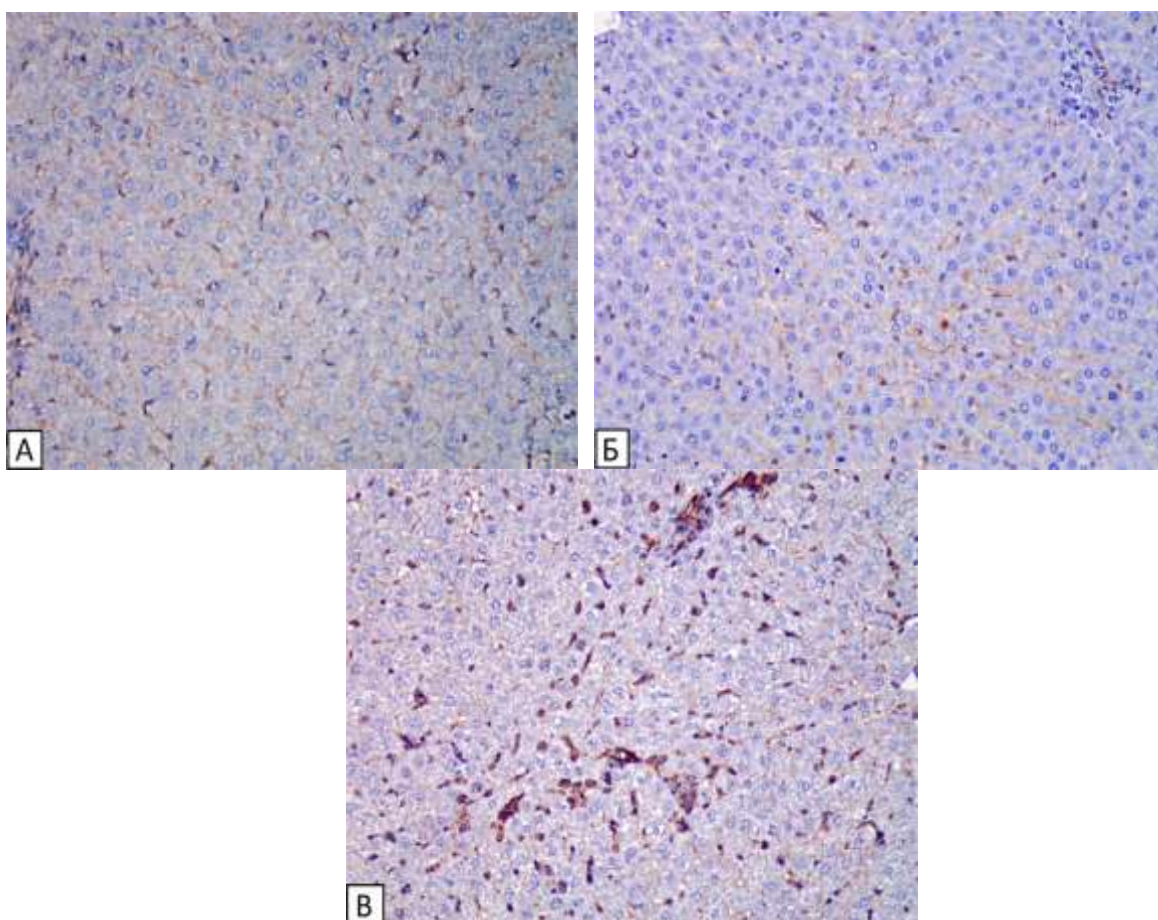
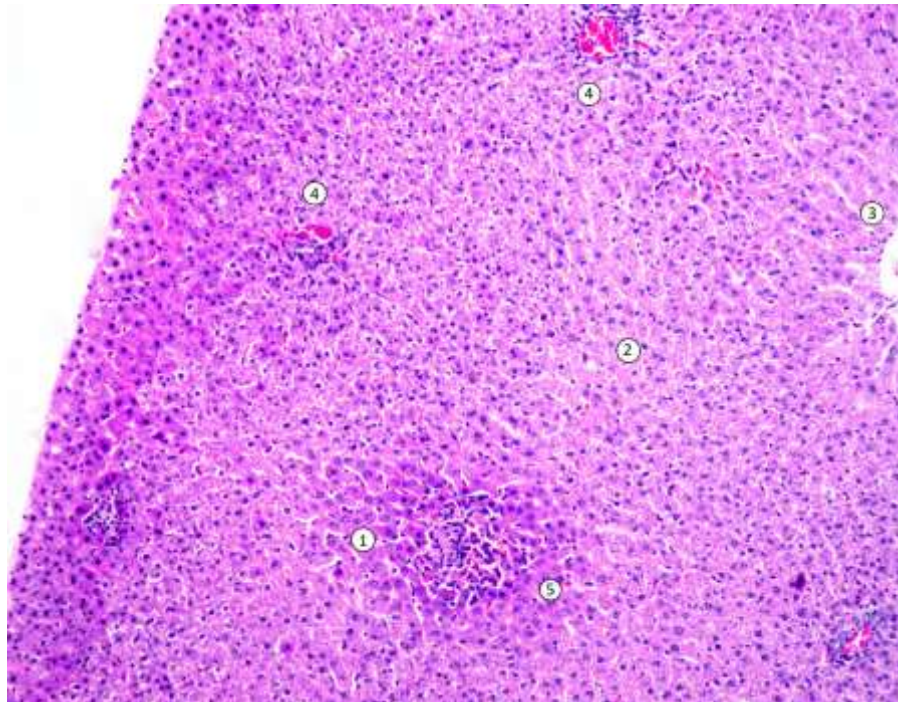


Рисунок 4.9 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 24 години ЛПС + 2 дні МСК, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 відображаються на фото як коричневий преципітат. Збільшення: x 200

У групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК гепатоцити виявляли значно менше ознак дегенерації у порівнянні з групою без корекції (3 дні ЛПС). Проте досі була присутня лейкоцитарна інфільтрація портальних трактів. Кількість темних гепатоцитів була вищою у порівнянні з групою 7 днів ЛПС без корекції (рис. 4.10).



Умовні позначки: 1 – темні гепатоцити, 2 – світлі гепатоцити, 3 – центральна вена, 4 — портальні тракти, 5 — лейкоцитарна інфільтрація.

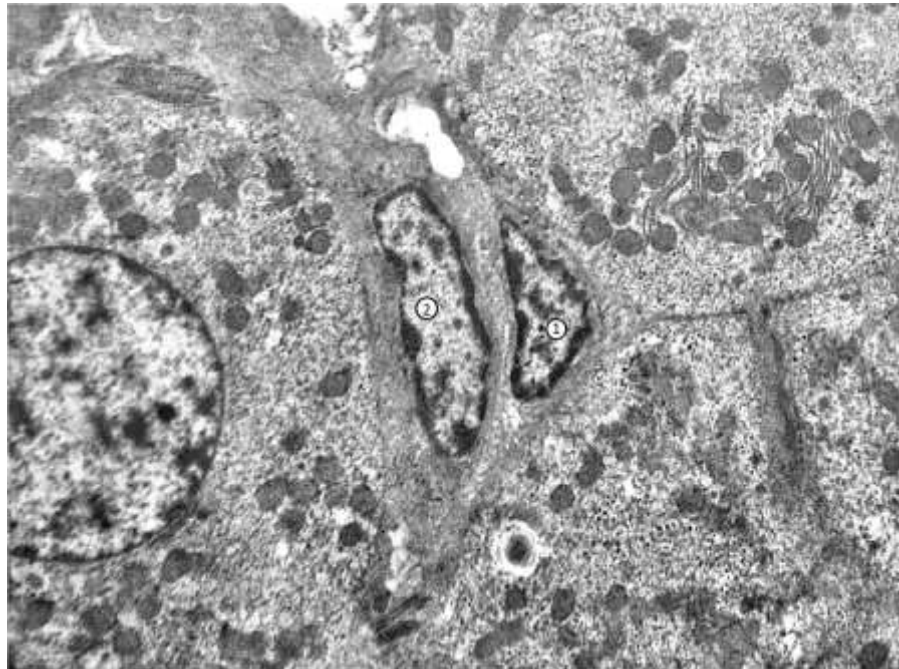
Рисунок 4.10 – Гістологічна структура печінки щурів у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 100

При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки групи 4 дні ЛПС + 3 дні МСК виявлено інтактні органели гепатоцитів включно з мітохондріями та ендоплазматичною сіткою. Мітохондрії містили добре виражені кристи та майже не мали ознак набряку. Це вказувало на збереження продукції ними енергії в належній кількості та нормального перебігу метаболізму гепатоцитів, на відміну від групи без корекції. Ендоплазматична сітка мала нормальну структуру, її цистерни і рибосоми були розподілені

рівномірно. Це було індикатором підтримання здатності до синтезу білків у гепатоцитах.

Цитоплазма мала мінімальні ознаки набряку у порівнянні з групою 7 днів ЛПС. Це свідчило про зменшення клітинного стресу та здоровий стан клітин. Ядра були округлої форми, ядерця були добре виражені, ядерна мембрана була інтактна.

Клітини Іто були менш активовані та мінімально гіпертрофовані у порівнянні в групою 7 днів ЛПС. Як результат секреція компонентів екстрацелюлярного матриксу зменшилася (рис. 4.11).



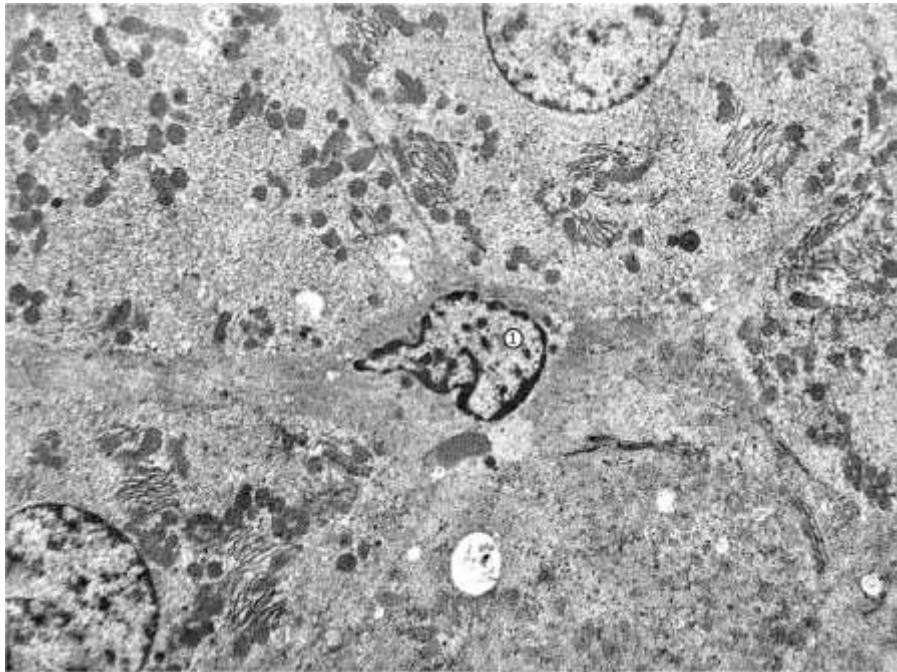
Умовні позначки: 1 – клітина Іто в просторі Діссе, 2 – клітина Купфера в просвіті синусоїдного гемокапіляра.

Рисунок 4.11 – Печінка щура 4 днів ЛПС + 3 дні МСК. Електронограма.

Збільшення: x 9000

Простір Діссе був менш розширеним у порівнянні з групою без корекції. Було менше ознак його наповнення рідиною та клітинами, що свідчило про менший ступінь запалення та набряку. Клітини Купфера мали менш виражений прозапальний фенотип. Ознаки фагоцитозу проявлялися менше (рис. 4.11, 4.12).

Це є індикатором зменшення прозапальної відповіді у порівнянні з групою без корекції МСК. Клітини ендотелію печінки були більш інтактні, менш набряклі, було менше ознак васкулярного ураження. Це свідчило про підвищення стабільності та цілісності судин у групі, підданій корекції МСК у порівнянні з групою без корекції.



Умовні позначки: 1 – клітина Купфера в просвіті синусоїдного гемокапіляра.

Рисунок 4.12 – Печінка щура групи 4 днів ЛПС + 3 дні МСК. Електронограма.

Збільшення: x 7000

У ході імуногістохімічного аналізу TGF- β 1 виявлено, що у тканинах печінки групи 4 днів ЛПС + 3 дні МСК частка площі препаратів печінки, яка була заповнена імунопреципітатом, становила $(7,85 \pm 0,33)$ %. Цікаво, що ступінь його експресії зменшився у 1,4 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою без корекції (7 днів ЛПС). Це дозволяє припустити, що застосування МСК суттєво вплинуло на експресію TGF- β 1 в тканинах печінки, що свідчить про їхню антифібротичну дію та потенційно корисні ефекти у лікуванні уражень печінки (рис. 4.13).

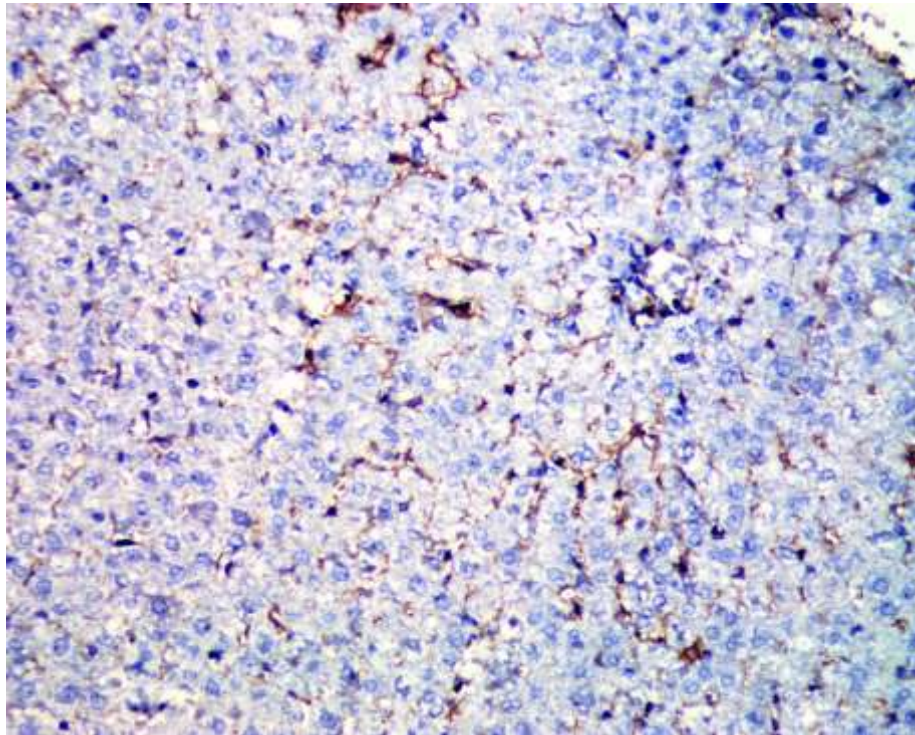


Рисунок 4.13 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів 4 днів ЛПС + 3 дні МСК, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії. Збільшення: $\times 200$

У щурів із групи 4 дні ЛПС + 3 дні МСК загальна кількість макрофагів залишилася на тому ж рівні, ніж у тварин без корекції на сьомий день експерименту (рис. 4.14). Однак після корекції МСК спостерігався перерозподіл субпопуляцій макрофагів у печінці на користь M2 клітин (рис. 4.14), при чому зростання кількості протизапальних M2 макрофагів у групі з корекцією у порівнянні з групою 7 днів ЛПС було статистично достовірним.

Площа, заповнена M2 макрофагами, зросла в середньому у 1,3 рази ($p < 0,001$), а площа, зайнята M1 макрофагами, зменшилася у 2,1 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 7 днів ЛПС. Це підтверджує імуномодулюючі властивості МСК.

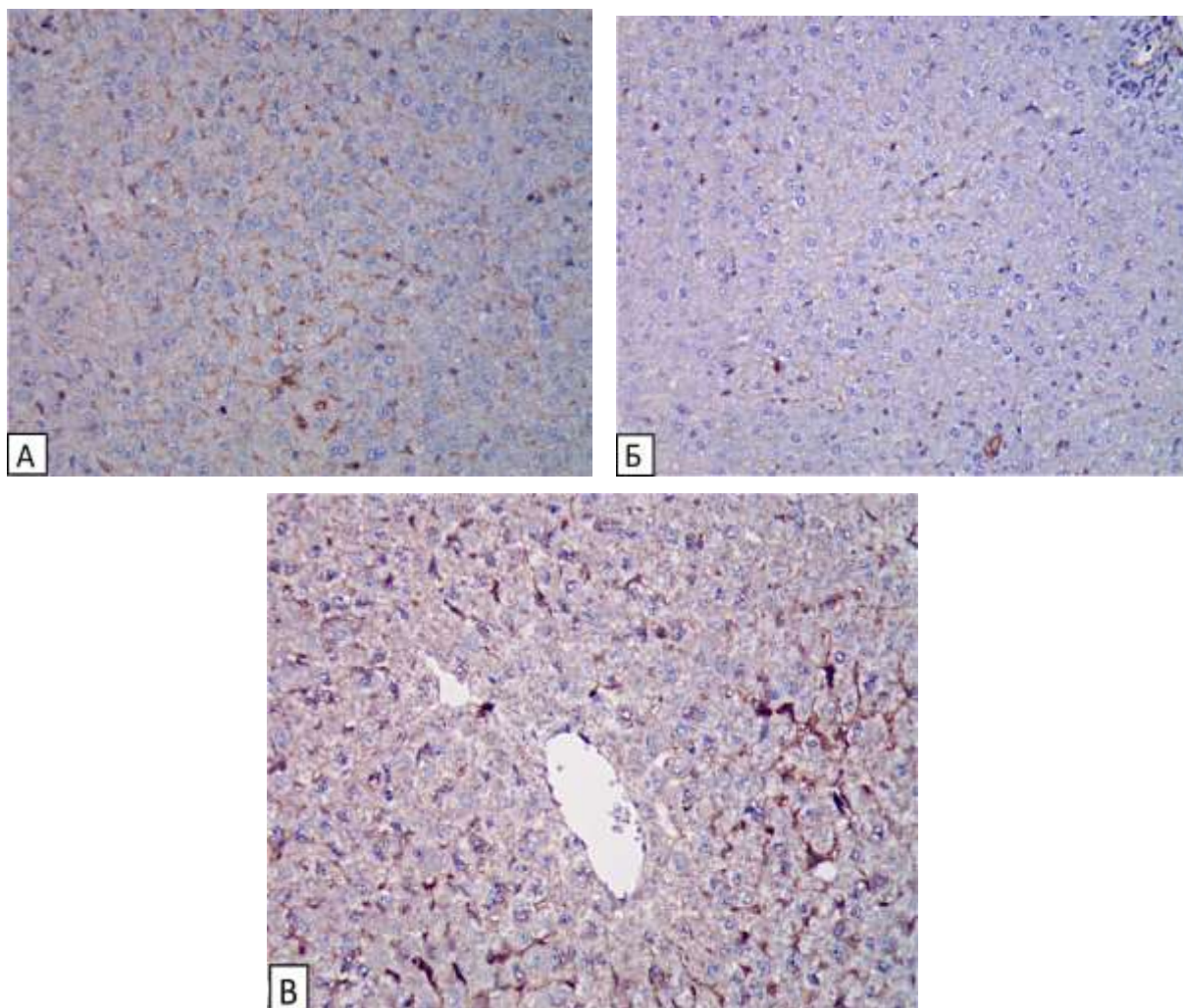
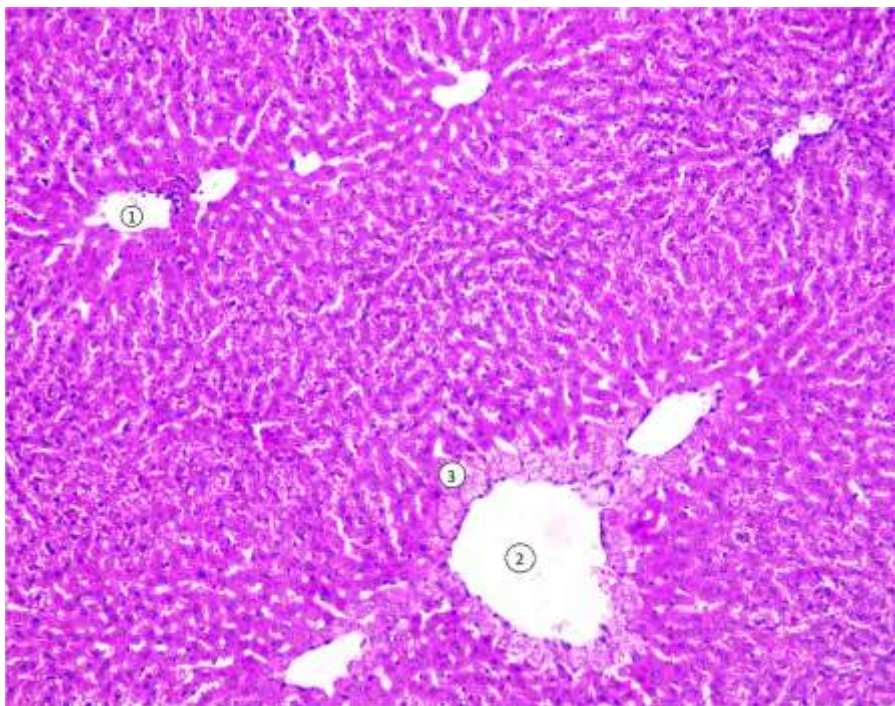


Рисунок 4.14 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 4 дні ЛПС + 3 дні МСК, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 відображаються як коричневий преципітат. Збільшення: x 200

У групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК часточкова структура печінки була збережена навколо центральних вен, у той час як на периферії радіальне розміщення печінкових балок було відсутнє. Гепатоцити були переважно однорідні, базофільні, не вакуолізовані. Лише довкола міжчасточкових вен портальних трактів спостерігалася гідропічна дистрофія клітин (рис. 4.15).



Умовні позначки: 1 – центральна вена, 2 – міжчасточкова вена портального тракту, 3 – гідропічна дистрофія гепатоцитів.

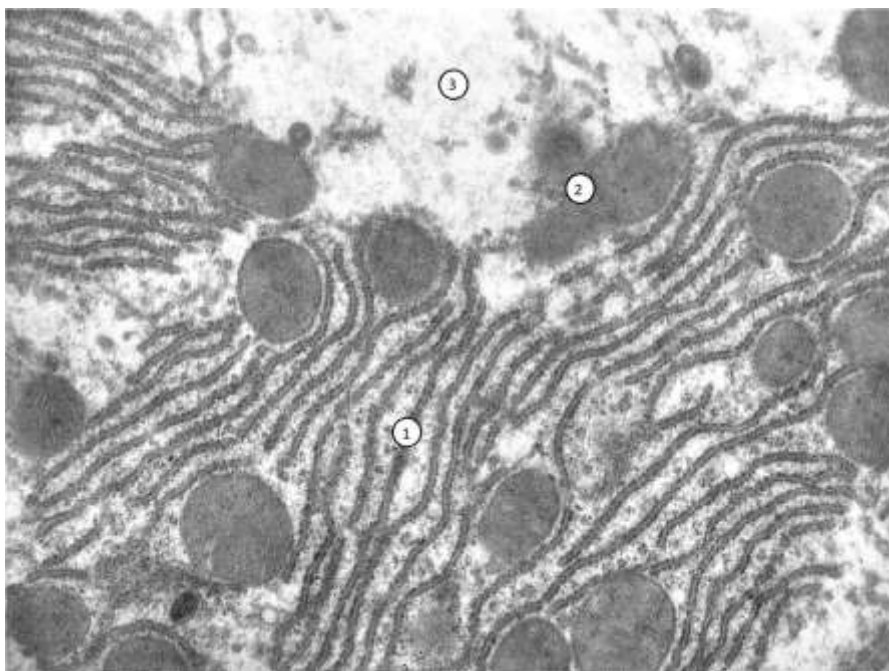
Рисунок 4.15 – Гістологічна будова печінки щурів у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення: x 100

При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки групи 14 днів ЛПС + 14 днів МСК було виявлено ознаки відновлення у гепатоцитах. Структурна цілісність клітин була в основному збережена, вакуоль було виявлено мало у порівнянні з групою без корекції (28 днів ЛПС).

Мітохондрії містили електроннощільний матрикс. Кристи мітохондрій були слабо виражені. Їхній набряк був відсутній. Це свідчило про поступове відновлення енергетичного забезпечення клітин (рис. 4.16). У ядрах переважав еухроматин, кількість гетерохроматину була значно зменшена порівняно з групою щурів без корекції. Ядерця були добре видимими (рис. 4.17).

Компоненти гранулярної ендоплазматичної сітки були добре вираженими, що є ознакою відновлення білоксинтезуючої функції гепатоцитів (рис. 4.16).

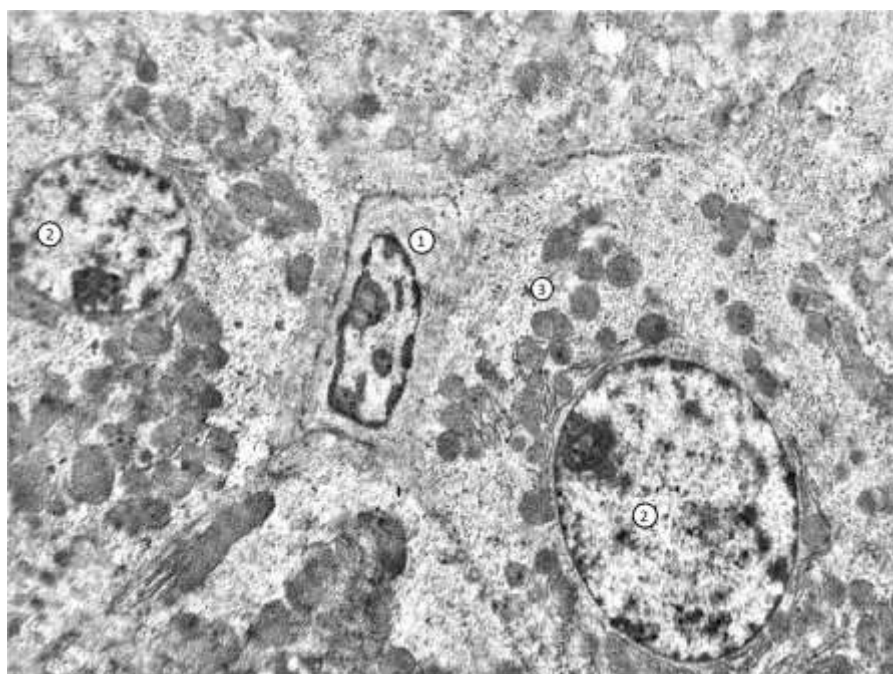
Клітини Іто мали менший розмір у порівнянні з групою без корекції. Вони були неактивовані, містили жирові краплі у своїй цитоплазмі (рис. 4.17).



Умовні позначки: 1 – гранулярна ендоплазматична сітка, 2 — мітохондрії, 3 — гіялоплазма.

Рисунок 4.16 – Печінка щура групи 14 днів ЛПС + 14 днів МСК. Електронограма.

Збільшення: $\times 34000$



Умовні позначки: 1 – неактивована клітина Іто, 2 — ядра гепатоцитів, 3 — інтактні мітохондрії.

Рисунок 4.17 – Печінка щура групи 14 днів ЛПС + 14 днів МСК.

Електронограма. Збільшення: $\times 9000$

Значних відкладень колагенових волокон у просторі Діссе не виявлено. Це свідчить про відсутність розвитку фіброзу у тканинах печінки. Ендотелій печінки був збережений. Його пори не були структурно змінені.

При імуногістохімічному аналізі TGF- β 1 у тканинах печінки групи 14 днів ЛПС + 14 днів МСК виявлено, що частка площі препаратів, зайнята імунопреципітатом, становила $(7,17 \pm 0,29)$ %. Зниження рівня експресії TGF- β 1 в цій групі було статистично значущим і становило 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою, яка не отримувала корекцію (28 днів ЛПС). Це свідчить про відсутність розвитку фіброзу у даній експериментальній групі та є доказом ефективної антифібротичної дії МСК (рис. 4.18).

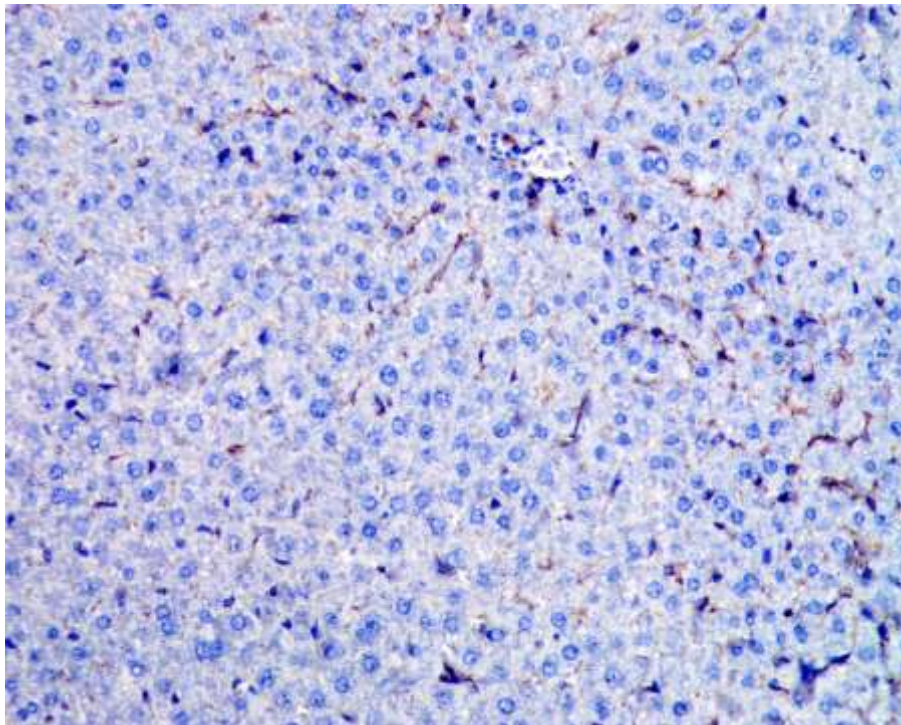


Рисунок 4.18 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів 14 днів ЛПС + 14 днів МСК, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії. Збільшення: x 200

У групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК у препаратах печінки загальна кількість макрофагів та частка прозапальних M1 макрофагів статистично достовірно не відрізнялася від групи 28 днів ЛПС без корекції (рис. 4.19 А, Б). Проте кількість

протизапальних M2 макрофагів статистично достовірно зросла у 1,2 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з групою без корекції (рис. 4.19 В).

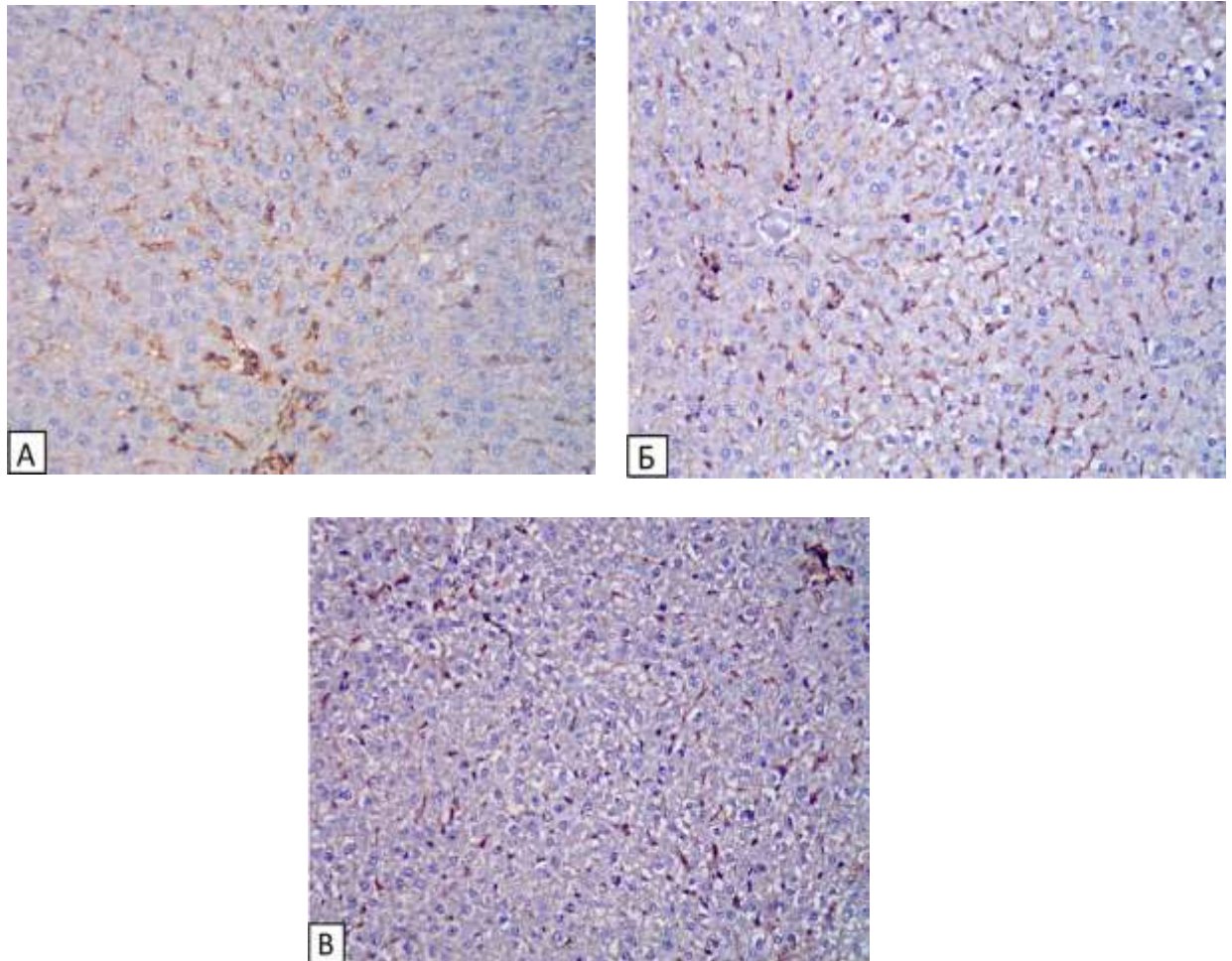
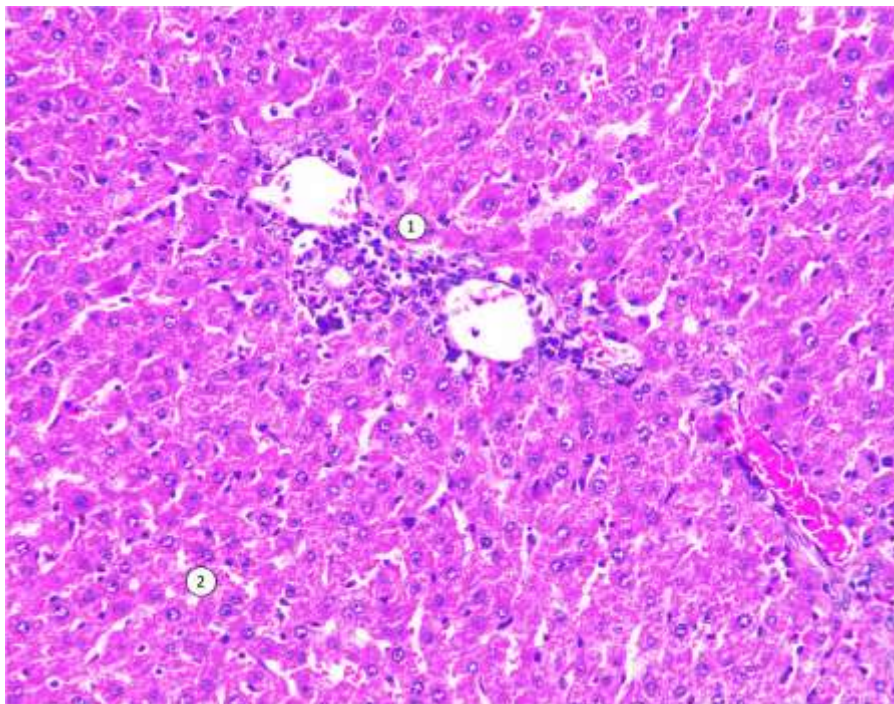


Рисунок 4.19 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 14 днів ЛПС + 14 днів МСК, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 відображаються як коричневий колір. Збільшення: $\times 200$

У групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК на препаратах печінки відмічалися ознаки лейкоцитарної інфільтрації навколо портальних трактів. Наявні поодинокі вакуолізовані гепатоцити, однак більшість клітин печінки мали однорідну базофільну цитоплазму, що свідчило про відновлення їхньої функціональної активності (рис. 4.20).

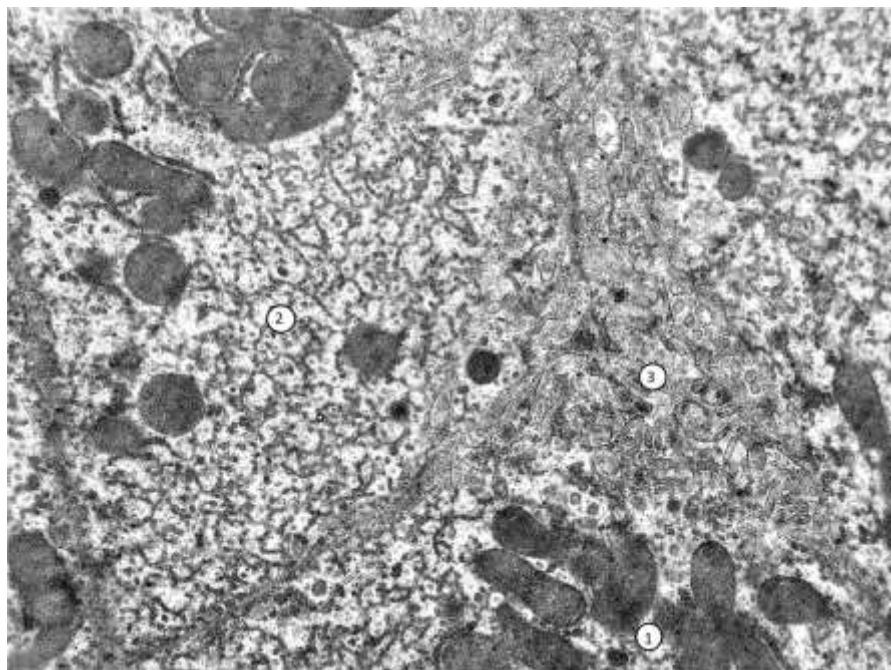


Умовні позначки: 1 – лейкоцитарна інфільтрація стромы докола портального тракту, 2 – базофільні гепатоцити.

Рисунок 4.20 – Гістологічні зміни в печінці щурів у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення: x 200

При електронномікроскопічному дослідженні препаратів печінки групи 21 день ЛПС + 7 днів МСК виявлено більшу збереженість гепатоцитів порівняно з групою 28 днів ЛПС без корекції. Проте деякі клітини мали ознаки руйнування ендоплазматичної сітки. Це свідчило про залишкове ураження. Мітохондрії були менш набряклими. Вони містили більш електроннощільний матрикс порівняно з групою без корекції (рис. 4.21).

Між клітинами печінки подекуди виявлялися розширені жовчні капіляри, просвіт яких заповнений мікрворсинками гепатоцитів. Клітини Іто менш активовані та менш гіпертрофовані у порівнянні з групою 28 днів ЛПС. Клітини Купфера мали нижчу фагоцитарну активність порівняно з групою без корекції.



Умовні позначки: 1 – мітохондрії, 2 – частково фрагментована ендоплазматична сітка, 3 – розширений просвіт жовчного капіляра.

Рисунок 4.21 – Фрагменти гепатоцитів печінки щурів групи 21 день ЛПС + 7 днів МСК. Електронограма. Збільшення: $\times 15000$

При імуногістохімічному аналізі TGF- β 1 у тканинах печінки групи 21 день ЛПС + 7 днів МСК виявлено, що його експресія зменшилася у 1,2 раза ($p < 0,05$) у порівнянні з групою без корекції (28 днів ЛПС) (рис. 4.22). Це є свідченням антифібротичного впливу МСК на уражені тканини печінки. Частка площі препаратів печінки, заповнена імунопреципітатом, становила $(12,81 \pm 0,61) \%$.

У групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК було виявлено помітний зсув макрофагів у бік M2 імунофенотипу (рис. 4.23). Частка площі препаратів печінки, заповнена прозапальними M1 макрофагами (CD86+) становила $(3,16 \pm 0,11) \%$, а частка площі протизапальних M2 макрофагів (CD163+) була $(5,93 \pm 0,19) \%$. Площа, заповнена M2 макрофагами, зросла в середньому у 1,4 раза ($p < 0,001$), тоді як площа, зайнята M1 макрофагами, зменшилася у 1,5 ($p < 0,001$) раза у порівнянні з групою 28 днів ЛПС.

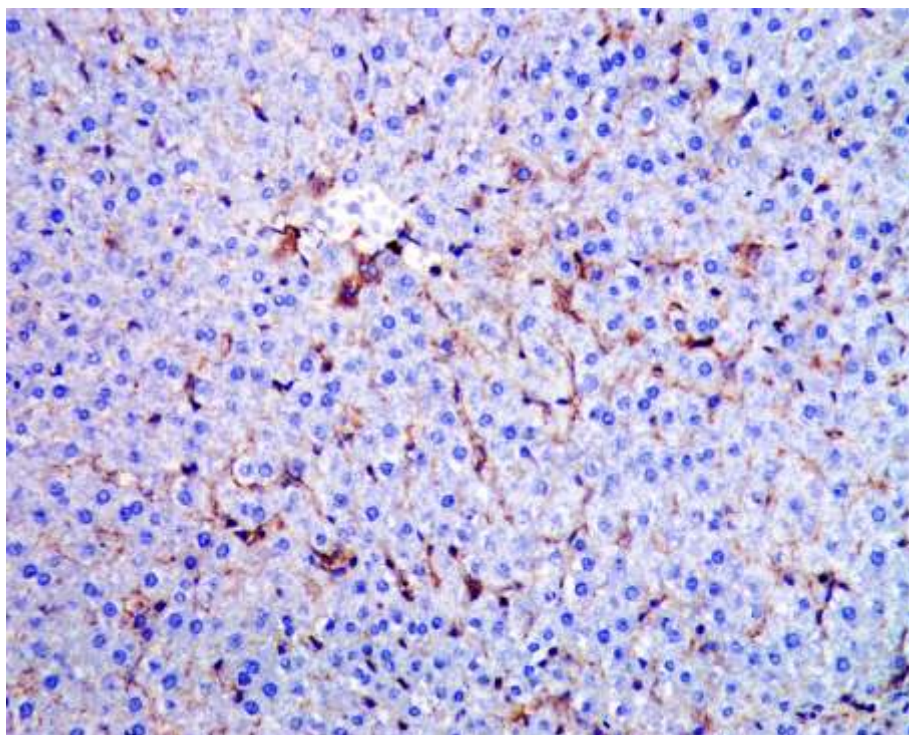


Рисунок 4.22 – Репрезентативна мікрофотографія зрізу печінки щурів 21 день ЛПС + 7 днів МСК, забарвленого для визначення TGF- β 1 методом імуногістохімії. Збільшення: x 200

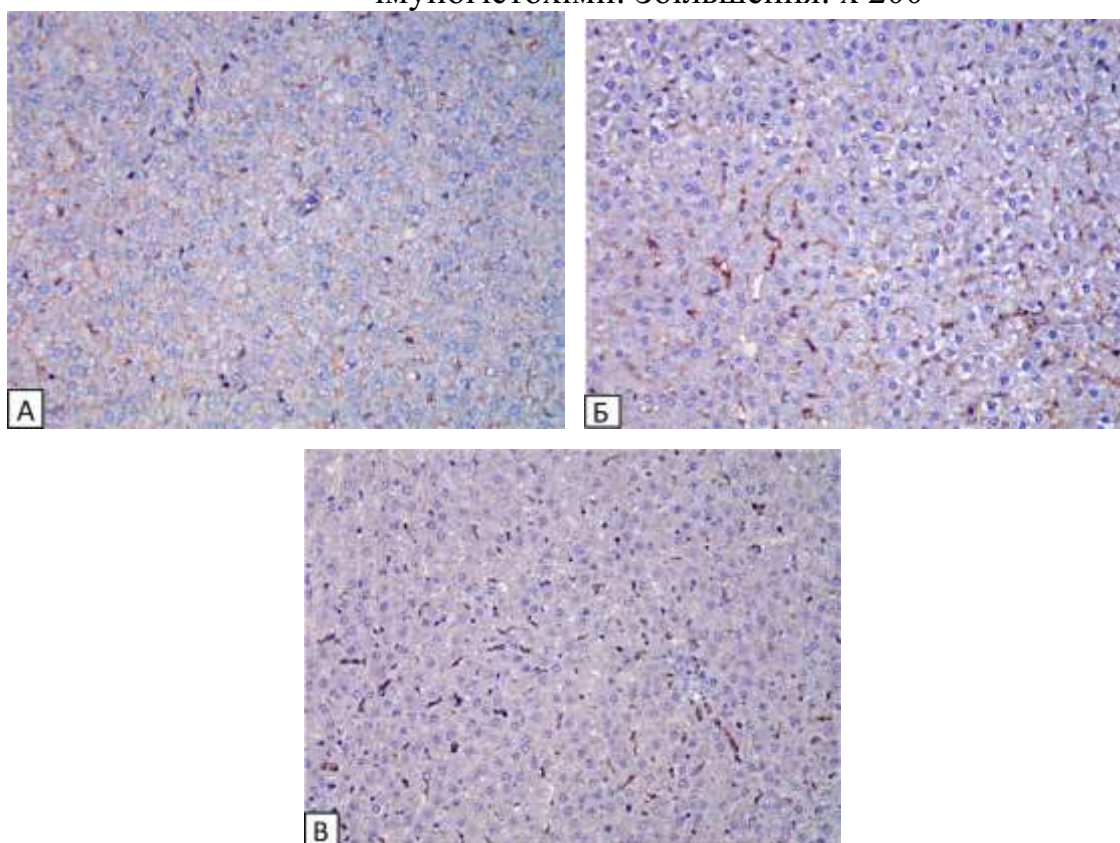


Рисунок 4.23 – Репрезентативні мікрофотографії зрізів печінки щурів групи 21 день ЛПС + 7 днів МСК, забарвлені методом імуногістохімії для виявлення CD68 (А), CD86 (Б) і CD163 (В). CD68, CD86 та CD163 відображаються як коричневий преципітат. Збільшення: x 200

Статистично підтверджене зростання частки протизапальних М2 макрофагів після введення МСК вказує на їхню імуномодулюючу дію при ураженні печінки, спричиненому ГРДС.

Порівняння структурних змін печінки щурів на різних стадіях ГРДС без корекції та з корекцією МСК виявляє регенеративний та протизапальний потенціал МСК. У порівнянні з групами без корекції, групи, кореговані МСК, отримали значно меншу КГОУ, що свідчить про потенційний терапевтичний ефект МСК. Введення МСК на більш ранній стадії (14 день) було більш ефективним у порівнянні з введенням на пізнішій стадії (21 день). У групі контролю-МСК не було виявлено ознак ураження печінки (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Гістологічне оцінювання ураження печінки в експериментальних групах

Група	КГОУ	Гепатоцелюлярний некроз	Пошкодження структури	Вакуолізація	Запалення	ДВЗ-синдром	Фіброз
Контроль	0	0	0	0	0	0	0
Контроль МСК	0	0	0	0	0	0	0
6 год ЛПС	4	1	0	0	2	1	0
24 год ЛПС	10	2	1	2	2	2	1
3 дні ЛПС	14	3	2	2	2	3	2
7 днів ЛПС	11	2	2	1	2	3	2
14 днів ЛПС	13	2	3	2	2	2	2
28 днів ЛПС	15	3	3	3	1	2	3
24 год ЛПС + 2 дні МСК	5	0	1	2	1	0	1
4 дні ЛПС+ 3 дні МСК	4	1	0	0	1	0	2
14 днів ЛПС + 14 днів МСК	4	0	1	1	0	0	2
21 день ЛПС+ 7 днів МСК	7	1	1	1	1	1	2

Примітка. 0 відповідає відсутності ураження, а 3 відповідає значному ураженню.

Виявлено, що TGF- β 1 майже не експресувався в групі контроль-МСК та був менш присутній у групах, яким вводили МСК, у порівнянні з групами без корекції. Результати морфометричного аналізу відсотків площі препарату, зайнятої імунопреципітатом, наведені у таблиці 4.2. Отримані дані свідчать про те, що МСК пуповини людини мають антифібротичний ефект, що проявляється у зменшенні експресії TGF- β 1, який спричиняє трансформацію клітин Іто у міофібробласти і стимулює продукцію білків екстрацелюлярного матриксу.

Таблиця 4.2 – Частка площі препаратів печінки з експресією TGF- β 1

Група	Частка площі печінки з експресією TGF- β 1, %
Контроль	1,98 \pm 0,09
Контроль-МСК	2,23 \pm 0,10
6 год ЛПС	2,25 \pm 0,12
24 год ЛПС	3,88 \pm 0,15***
3 дні ЛПС	8,54 \pm 0,39***
7 днів ЛПС	10,67 \pm 0,47***
14 днів ЛПС	12,55 \pm 0,59***
28 днів ЛПС	15,01 \pm 0,72***
24 год ЛПС + 2 дні МСК	4,95 \pm 0,21***###
4 дні ЛПС + 3 дні МСК	7,85 \pm 0,33***###
14 днів ЛПС + 14 днів МСК	7,17 \pm 0,29***###
21 день ЛПС + 7 днів МСК	12,81 \pm 0,61***#
Примітка.* – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання і тварин, яким моделювали ГРДС (* – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без корекції та з корекцією МСК у відповідні терміни спостереження (# – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001).	

За результатами кількісного аналізу площі печінки, зайнятої різними субпопуляціями макрофагів, виявлено, що у групах, що отримували корекцію МСК, було статистично підтверджене збільшення відсотка протизапальних макрофагів M2. Це вказує на імуномодулюючу дію МСК (табл. 4.3).

При мікроскопічному, субмікроскопічному, імуногістохімічному дослідженні печінки щурів групи контроль-МСК не виявлено статистично

достовірних відмінностей від групи контролю. Це доводить неімуногенність та безпечність застосування МСК при ураженні печінки.

Таблиця 4.3 – Частка площі препаратів печінки, заповнена макрофагами

Група	Частка площі препаратів печінки, заповнена макрофагами, %		
	CD68+	CD86+	CD163+
Контроль	8,68 ± 0,32	2,01 ± 0,09	7,06 ± 0,19
Контроль-МСК	7,79 ± 0,27#	1,84 ± 0,06	7,25 ± 0,14
6 год ЛПС	8,03 ± 0,37	6,98 ± 0,31***	1,15 ± 0,05***
24 год ЛПС	8,87 ± 0,41	6,77 ± 0,29***	2,12 ± 0,09***
3 дні ЛПС	9,03 ± 0,32	6,89 ± 0,27***	2,13 ± 0,15***
7 днів ЛПС	8,50 ± 0,26	3,54 ± 0,10***	6,29 ± 0,23*
14 днів ЛПС	8,12 ± 0,37	3,42 ± 0,15***	4,76 ± 0,22***
28 днів ЛПС	7,88 ± 0,27	4,78 ± 0,15***	4,17 ± 0,18***
24 год ЛПС + 2 дні МСК	9,06 ± 0,41	3,75 ± 0,12***###	7,04 ± 0,41###
4 дні ЛПС + 3 дні МСК	8,14 ± 0,32	1,67 ± 0,07**###	8,03 ± 0,22**###
14 днів ЛПС + 14 днів МСК	9,12 ± 0,38	4,36 ± 0,16***	5,02 ± 0,23***###
21 день ЛПС + 7 днів МСК	8,76 ± 0,21	3,16 ± 0,11***###	5,93 ± 0,19***###

Примітка.* – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання і тварин, яким моделювали ГРДС (* – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без корекції та з корекцією МСК у відповідні терміни спостереження (# – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001).

Згідно з даними проведеного гістологічного дослідження у групах з корекцією МСК спостерігалось зменшення інфільтрації тканини печінки клітинами запалення у порівнянні з групами без корекції, що є доказом протизапальної дії МСК. Також у групах щурів, яким вводилися МСК, було відмічено значно менше вакуолізованих гепатоцитів з ознаками гідропічної дегенерації та переважання темних базофільних клітин, що свідчило про активацію процесів відновлення.

Дані електронно-мікроскопічного дослідження свідчать, що у групах з корекцією гепатоцити були більш збереженими у порівнянні з відповідними групами без корекції. У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК клітинна архітектура містила менше ознак руйнування, мітохондрії зберігали нормальну структуру, ГЕС була менш розширеною. У групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК органели гепатоцитів були інтактні. Мітохондрії містили добре виражені кристи, ендоплазматична сітка мала нормальну структуру, цитоплазма виявляла мінімальні ознаки набряку. У групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК гепатоцити виявляли ознаки відновлення. Мітохондрії були заповнені електроннощільним матриксом, у ядрах переважав еухроматин, вакуоль у цитоплазмі спостерігалася мало. У групі 21 день ЛПС + 7 днів мітохондрії гепатоцитів були менш набряклі, а самі гепатоцити більш збережені. Описані ознаки відновлення структури гепатоцитів свідчать про регенеративний потенціал МСК.

Дані імуногістохімічного аналізу субпопуляцій макрофагів печінки виявили, що МСК спричиняли трансформацію макрофагів переважно у М2 фенотип, що сприяло створенню протизапального середовища в уражених органах. У усіх групах піддослідних тварин, яким була проведена корекція МСК, відмічалася зростання площі печінки, заповненої протизапальними М2 макрофагами і, відповідно, зменшення площі, заповненої М1 макрофагами. Це свідчить про імуномодулюючу роль МСК.

Також результати імуногістохімічного аналізу вказують, що корекція ГРДС за допомогою МСК знижувала рівні експресії маркера фіброзу TGF- β 1 у досліджуваних зразках печінки. В усіх групах піддослідних тварин з проведеною корекцією було відмічено статистично достовірне зниження відсотку площі печінки з експресією TGF- β 1, у порівнянні з групами без корекції. Це є доказом антифібротичного ефекту МСК.

У групі, якій вводили МСК на більш ранній стадії (14 день) спостерігалася кращі показники відновлення структури печінки, визначені за

допомогою світлових та електронномікроскопічних досліджень, менший рівень фіброзу у порівнянні з групою, якій вводили МСК на пізнішій стадії (21 день). Це свідчить про вищу ефективність МСК, якщо вона проведена у більш ранні терміни розвитку патології.

Результати даного розділу висвітлені у наукових публікаціях [6; 10; 11; 12; 150; 151; 152; 153].

РОЗДІЛ 5

БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ РІВНІВ ПЕЧІНКОВИХ МАРКЕРІВ У КРОВІ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН

Ферменти АЛТ, АСТ та ЛФ є важливими маркерами ураження печінки. Сироваткові трансамінази АЛТ і АСТ містяться в гепатоцитах, і їхні рівні в крові зростають у разі підвищеної проникності клітинних мембран чи деструкції цих клітин унаслідок запалення чи некрозу (цитолітичний синдром). АЛТ — цитозольний фермент. Його активність підвищується при нетяжких процесах. АСТ — мітохондріальний фермент. Його активність підвищується при тяжких процесах, що супроводжуються некрозом клітин [105; 128; 131].

Екскреторний фермент ЛФ знаходиться на плазматичній мембрані гепатоцитів та у епітеліоцитах жовчних проток і його рівні зростають при внутрішньопечінковому холестази унаслідок порушення секреції жовчі у жовчних капілярах та біліарній обструкції (холестатичний синдром). Це відбувається унаслідок того, що обструкція жовчі викликає так звану ферментативну індукцію – підвищений синтез ЛФ у клітинах з подальшим надходженням його у кров унаслідок підвищеної проникності мембран гепатоцитів [105; 128; 131].

У результаті проведених біохімічних аналізів сироватки крові щурів зі змодельованим ГРДС без корекції та після внутрішньоочеревинного введення МСК як корегуючого чинника були визначені рівні АСТ, АЛТ і ЛФ, медіанні значення яких наведені в таблиці 5.1.

Зміни рівнів маркерів відбувалися хвилеподібно. Рівень АСТ досягнув свого першого піку на 6 годину після моделювання ГРДС (зріс у 3,8 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$), значно знизився на 24 годину (був підвищений у 2 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$), продовжував знижуватися на 3 добу (був підвищений у 1,5 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$), дещо зріс на 7 добу (у 1,7 раза вище контролю, $p < 0,05$), досягнув другого піку на 14 добу (у

2,5 раза вище контролю, $p < 0,05$) та знову знизився на 28 добу (у 1,8 раза вище контролю, $p < 0,05$) (рис. 5.1).

Таблиця 5.1 – Медіанні значення АСТ, АЛТ і ЛФ у сироватці крові експериментальних щурів

Група	АСТ, Од/л (М, 25 %-75 %)	АЛТ Од/л (М, 25 %- 75 %)	ЛФ Од/л (М, 25 %-75 %)
Контроль	98.4 (97.8; 101.7)	38.0 (37.7; 38.5)	216.0 (212.3; 221.0)
Контроль-МСК	100.9 (99.4; 103.4)	37.7 (37.2; 38.5)	214.8 (204.6; 222.1)
6 год ЛПС	378.6 (368.9; 425.2)	70.5 (65.2; 80.5)	253.2 (250.3; 261.0)
24 год ЛПС	194.9 (188.6; 200.9)	59.9 (54.9; 65.5)	291.9 (287.5; 298.5)
3 дні ЛПС	146.2 (142.3; 148.8)	44.2 (43.7; 45.1)	293.3 (283.1; 298.4)
7 днів ЛПС	166.2 (160.3; 170.9)	46.5 (45.7; 47.5)	297.6 (285.0; 309.9)
14 днів ЛПС	247.9 (235.4; 263.1)	47.0 (43.5; 53.5)	300.9 (292.0; 302.1)
28 днів ЛПС	179.5 (174.0; 181.2)	47.1 (44.4; 48.9)	279.9 (274.4; 289.5)
24 год ЛПС + 2 дні МСК	113.9 (104.5; 124.5)	38.1 (37.9; 38.6)	229.0 (223.6; 233.5)
4 дні ЛПС + 3 дні МСК	141.7 (136.7; 144.4)	44.2 (41.8; 45.6)	226.7 (219.5; 237.2)
14 дні ЛПС + 14 днів МСК	103.9 (100.2; 104.9)	43.3 (42.3; 44.5)	250.0 (246.5; 253.6)
21 день ЛПС + 7 днів МСК	100.9 (99.9; 102.0)	43.9 (42.5; 44.7)	248.9 (235.9; 257.1)

Рівень АЛТ також досягнув свого піку на 6 годину (зріс у 1,9 раза у порівнянні з контролем), почав знижуватися на 24 годину (був підвищений у 1,6 раза у порівнянні з контролем) ще знизився на 3 добу (був підвищений у 1,2 раза у порівнянні з контролем) і далі тримався на тому ж рівні так і не досягаючи рівня контролю (рис. 5.2).

ЛФ сироватки крові зросла на 6 годину (у 1,2 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$), і в подальшому продовжила зростати, досягнувши пікових значень на 14 добу (підвищена у 1,4 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$) та врешті знизившись на 28 добу (підвищена у 1,3 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$) (рис. 5.3).

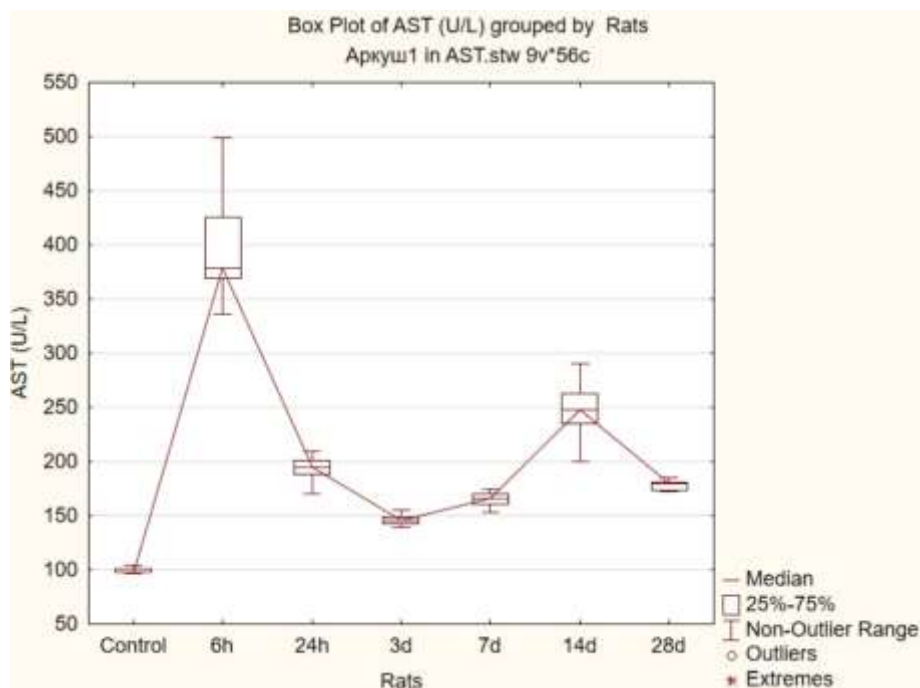


Рисунок 5.1 – Рівні АСТ у сироватці крові щурів після моделювання ГРДС на різних часових точках, МО/л

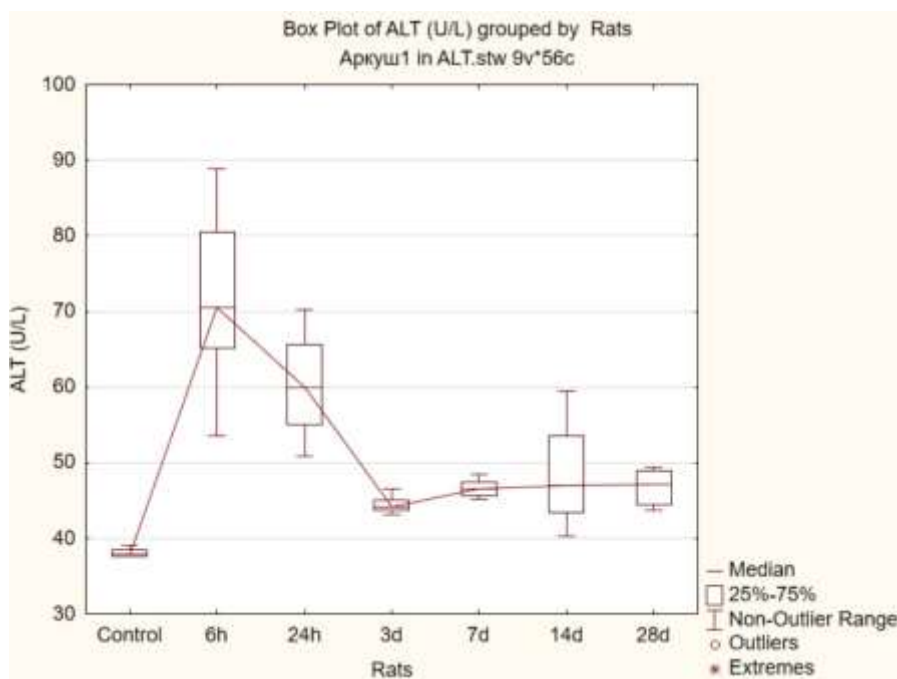


Рисунок 5.2 – Рівні АЛТ у сироватці крові щурів після моделювання ГРДС на різних часових точках, МО/л

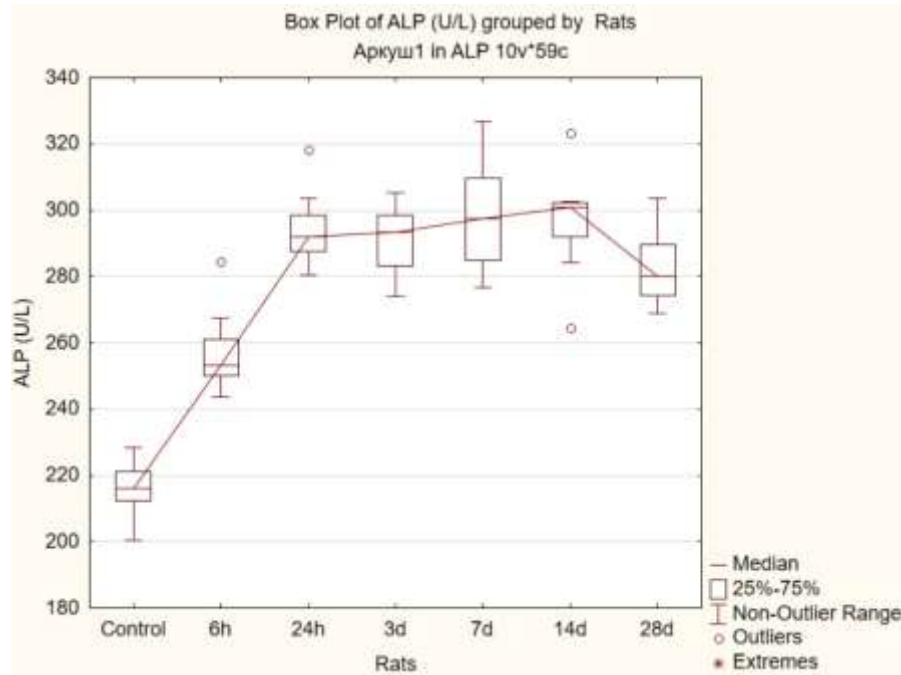


Рисунок 5.3 – Рівні ЛФ у сироватці крові щурів після моделювання ГРДС на різних часових точках, МО/л

Для того, щоб коректно оцінити ефективність введення МСК на різних часових точках, дані були поділені на три групи порівняння:

- 1) контроль; 3 дні ЛПС; 24 год ЛПС + 2 дні МСК.
- 2) контроль; 7 днів ЛПС; 4 дні ЛПС + 3 дні МСК; контроль-МСК (3 дні після введення МСК інтактним тваринам).
- 3) контроль; 28 днів ЛПС; 14 днів ЛПС + 14 днів МСК; 21 день ЛПС + 7 днів МСК.

Ці часові точки були вибрані через їхню відповідність різним стадіям ГРДС — гострій або ексудативній (до 3 днів), підгострій або фіброплазії (7 днів) та фіброзу або розрешення (28 днів) [57; 97].

Для визначення можливості застосування параметричних або непараметричних статистичних критеріїв вхідні дані перевірялися на відповідність нормальному розподілу результатів дослідження.

Виявлено, що вхідні дані не відповідають нормальному закону розподілу. Це додатково підтверджують значення коефіцієнтів асиметрії, ексцесу, мала кількість місць збору.

В даному випадку ми застосували непараметричний критерій Краскела-Уолліса, який дає змогу дати відповідь на питання, чи впливає номінальний багаторівневий фактор (різні часові відліки) на кількісний відгук (концентрація АЛТ, АСТ і ЛФ) і чи впливає кількісний фактор на номінальний багаторівневий відгук.

За базові дані взяли концентрації АСТ, АЛТ і ЛФ, виміряні у різні часові точки після моделювання ГРДС. Зміна концентрації представлена у двомірних графіках з коробковими діаграмами (рис. 5.4, 5.5, 5.6).

При зображенні на двомірних графіках коробкові діаграми асиметричні, медіани не по центру, тому розподіл концентрації АЛТ, АСТ і ЛФ після моделювання ГРДС є додатковим підтвердженням ненормального закону розподілу експериментальних даних.

Порівняння рівнів АСТ між різними групами наведені у табл. 5.2, 5.3, 5.4. При порівнянні концентрації АСТ рівень значущості є менше 0,05, що означає наявність суттєвих відмінностей між отриманими даними у таких парах часових відліків: контроль — 3 дні, контроль — 7 днів, контроль — 28 днів, контроль — 24 год + 2 дні МСК, контроль — 4 дні + 3 дні МСК, 3 дні — 24 год + 2 дні МСК, 7 днів — 4 дні + 3 дні МСК, 28 днів — 14 днів + 14 днів МСК, 28 днів — 21 день + 7 днів МСК, 7 днів — контроль МСК, 4 дні + 3 дні МСК — контроль МСК.

При порівнянні даних, взятих у часових відліках контроль — контроль МСК, контроль — 14 днів + 14 днів МСК, контроль — 21 день + 7 днів МСК, 14 днів + 14 днів МСК — 21 день + 7 днів МСК, рівень значущості є більшим 0,05. Це свідчить про відсутність суттєвих відмінностей між концентраціями АСТ у даних точках.

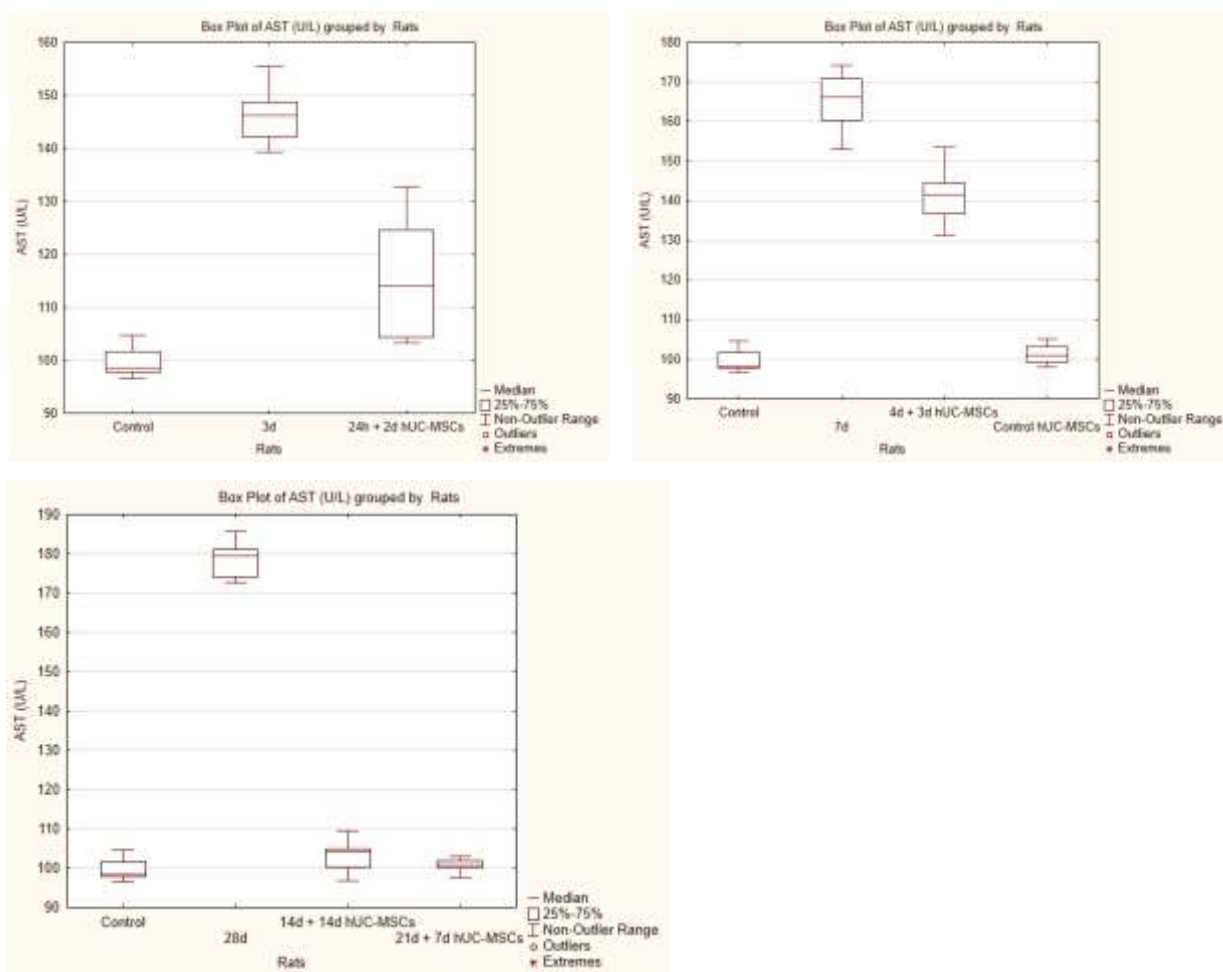


Рисунок 5.4 – Рівні АСТ у сироватці крові щурів після моделювання ГРДС та його корекції МСК на різних часових точках, МО/л. Статистично значущі відмінності між групами наведені в табл. 5.2, 5.3, 5.4

Таблиця 5.2 – Відмінності між рівнями АСТ у групі порівняння 1

АСТ	Контроль	3 дні	24 год + 2 дні МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0023)
3 дні	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0008)
24 год + 2 дні МСК	+ (p = 0.0023)	+ (p = 0.0008)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Таблиця 5.3 – Відмінності між рівнями АСТ у групі порівняння 2

АСТ	Контроль	7 днів	4 дні + 3 дні МСК	Контроль МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0023)	- p = 0.1415
7 днів	+ (p = 0.0008)	X	+ p = 0.0011	+ (p = 0.0008)
4 дні + 3 дні МСК	+ (p = 0.0023)	+ p = 0.0011	X	+ (p = 0.0008)
Контроль МСК	- p = 0.1415	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Таблиця 5.4 – Відмінності між рівнями АСТ у групі порівняння 3

АСТ	Контроль	28 днів	14 днів + 14 днів МСК	21 днів + 7 днів МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	- (p = 0.1152)	- (p = 0.2698)
28 днів	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)
14 днів + 14 днів МСК	- (p = 0.1152)	+ (p = 0.0008)	X	- (p = 0.1152)
21 днів + 7 днів МСК	- (p = 0.2698)	+ (p = 0.0008)	- (p = 0.1152)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Порівняння рівнів АЛТ між різними групами наведені у табл. 5.5, 5.6, 5.7. При порівнянні концентрації АЛТ рівень значущості є менше 0,05, що означає наявність суттєвих відмінностей між отриманими даними у таких парах часових відліків: контроль — 3 дні, контроль — 7 днів, контроль — 28 днів, контроль — 4 дні + 3 дні МСК, контроль — 14 днів + 14 днів МСК, контроль — 21 день + 7 днів МСК, 3 дні — 24 год + 2 дні МСК, 7 днів — 4 дні + 3 дні МСК, 28 днів — 14 днів + 14 днів МСК, 28 днів — 21 день + 7 днів МСК, 7 днів — контроль МСК, 4 дні + 3 дні МСК — контроль МСК.

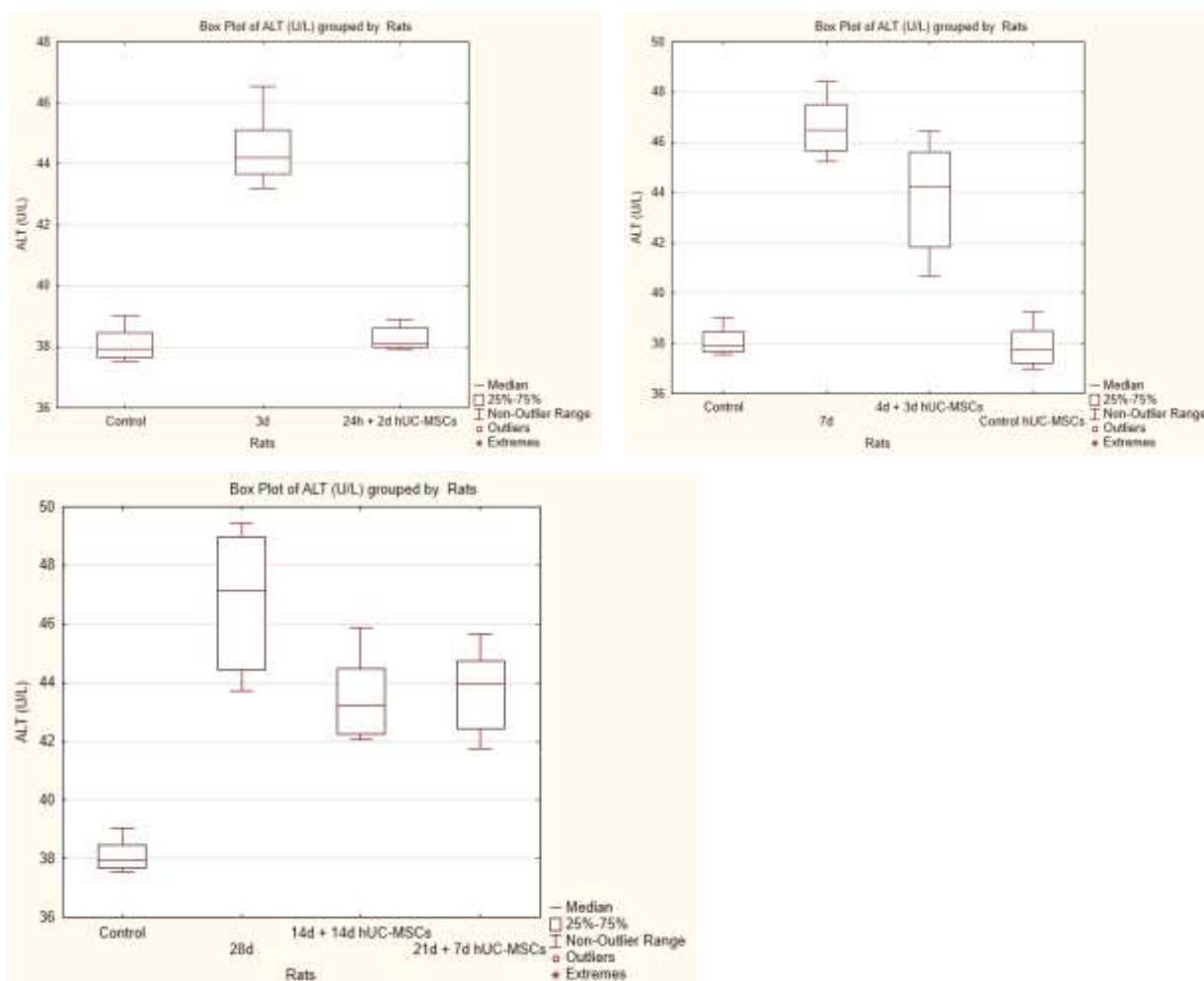


Рисунок 5.5 – Рівні АЛТ у сироватці крові щурів після моделювання ГРДС та його корекції МСК на різних часових точках, МО/л. Статистично значущі відмінності між групами наведені в табл. 5.5, 5.6, 5.7

Таблиця 5.5 – Відмінності між рівнями АЛТ у групі порівняння 1

АЛТ	Контроль	3 дні	24 год + 2 дні МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	- (p = 0.2473)
3 дні	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0008)
24 год + 2 дні МСК	- (p = 0.2473)	+ (p = 0.0008)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Таблиця 5.6 – Відмінності між рівнями АЛТ у групі порівняння 2

АЛТ	Контроль	7 днів	4 дні + 3 дні МСК	Контроль МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)	- (p = 0.4623)
7 днів	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0117)	+ (p = 0.0008)
4 дні + 3 дні МСК	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0117)	X	+ (p = 0.0008)
Контроль МСК	- (p = 0.4623)	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Таблиця 5.7 – Відмінності між рівнями АЛТ у групі порівняння 3

АЛТ	Контроль	28 днів	14 днів + 14 днів МСК	21 днів + 7 днів МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)
28 днів	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0117)	+ (p = 0.0209)
14 днів + 14 днів МСК	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0117)	X	- (p = 0.7527)
21 днів + 7 днів МСК	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0209)	- (p = 0.7527)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

При порівнянні даних, взятих у часових відліках контроль-контроль МСК, контроль — 24 год + 2 дні МСК, 14 днів + 14 днів МСК — 21 день + 7 днів МСК, рівень значущості є більшим 0,05. Це свідчить про відсутність суттєвих відмінностей між концентраціями АЛТ у даних точках.

Порівняння рівнів ЛФ між різними групами наведені у табл. 5.8, 5.9, 5.10. При порівнянні концентрації ЛФ рівень значущості є менше 0,05, що означає наявність суттєвих відмінностей між отриманими даними у таких

парах часових відліків: контроль — 3 дні, контроль — 7 днів, контроль — 28 днів, контроль — 24 год + 2 дні МСК, контроль — 4 дні + 3 дні МСК, контроль — 14 днів + 14 днів МСК, контроль — 21 день + 7 днів МСК, 3 дні— 24 год + 2 дні МСК, 7 днів — 4 дні + 3 дні МСК, 28 днів — 14 днів + 14 днів МСК, 28 днів — 21 день + 7 днів МСК, 7 днів — контроль МСК, 4 дні + 3 дні МСК — контроль МСК. При порівнянні даних, взятих у часових відліках контроль-контроль МСК, 14 днів + 14 днів МСК — 21 день + 7 днів МСК, рівень значущості є більшим 0,05. Це свідчить про відсутність суттєвих відмінностей між концентраціями ЛФ у даних точках.

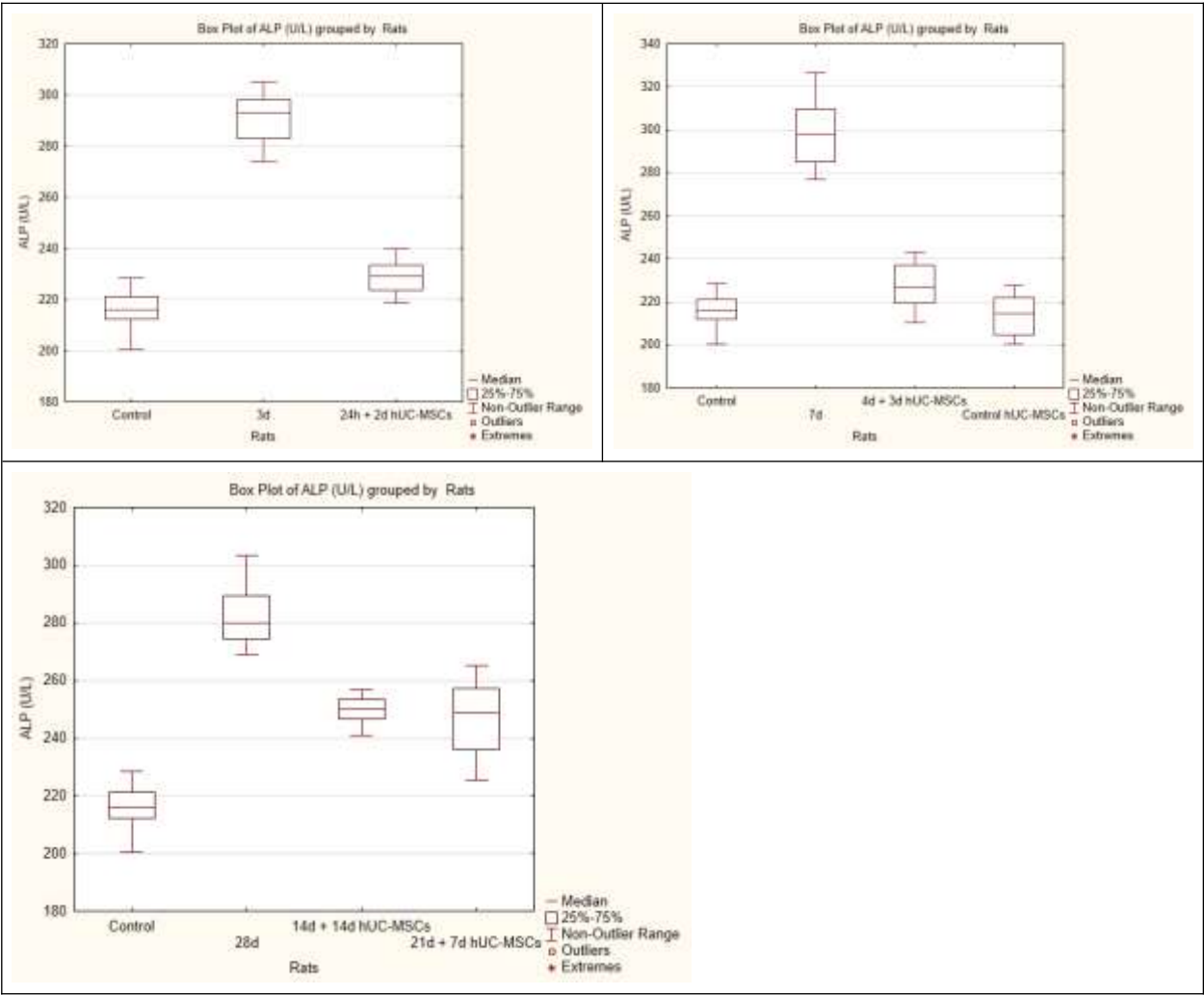


Рисунок 5.6 – Рівні ЛФ у сироватці крові щурів після моделювання ГРДС та його корекції МСК на різних часових точках, МО/л. Статистично значущі відмінності між групами наведені в табл. 5.8, 5.9, 5.10

Таблиця 5.8 – Відмінності між рівнями ЛФ у групі порівняння 1

ЛФ	Контроль	3 дні	24 год + 2 дні МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0063)
3 дні	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0008)
24 год + 2 дні МСК	+ (p = 0.0063)	+ (p = 0.0008)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Таблиця 5.9 – Відмінності між рівнями ЛФ у групі порівняння 2

ЛФ	Контроль	7 днів	4 дні + 3 дні МСК	Контроль МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0404)	- (p = 0.7130)
7 днів	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)
4 дні + 3 дні МСК	+ (p = 0.0404)	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0357)
Контроль МСК	- (p = 0.7130)	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0357)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

Таблиця 5.10 – Відмінності між рівнями ЛФ у групі порівняння 3

ЛФ	Контроль	28d	14 днів + 14 днів МСК	21 днів + 7 днів МСК
Контроль	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0011)
28 днів	+ (p = 0.0008)	X	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)
14 днів + 14 днів МСК	+ (p = 0.0008)	+ (p = 0.0008)	X	- (p = 0.8336)
21 днів + 7 днів МСК	+ (p = 0.0011)	+ (p = 0.0008)	- (p = 0.8336)	X

Примітка. «+» свідчить про наявність статистично значущої відмінності між групами, «-» свідчить про відсутність статистично важливої відмінності.

При порівнянні з даними, отриманими від інтактних тварин виявлено, що сироваткові рівні печінкових маркерів АЛТ, АСТ в моделі ГРДС статистично достовірно зросли після введення ЛПС, що свідчить про розвиток ураження печінки з деструкцією гепатоцитів або зміною проникності їхніх клітинних мембран. Зростання рівнів ЛФ у сироватці щурів з ГРДС без корекції вказує на розвиток холестазу при даному синдромі. На противагу цьому, рівні усіх аналізованих печінкових маркерів статистично достовірно знизилися у щурів, яким вводилися МСК, у порівнянні з групами без корекції, що свідчить про ефективність використаних стовбурових клітин у зниженні гепатоцелюлярного та біліарного ураження. У групі контроль-МСК рівні АСТ, АЛТ та ЛФ статистично не відрізнялися від показників інтактних тварин.

Результати даного розділу висвітлені у наукових публікаціях автора [12; 150].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

ГРДС є важким патологічним станом, що характеризується запаленням легень, різким порушенням газообміну та тканинного дихання, що в багатьох випадках призводить до розвитку множинної органної недостатності. Одним з найчастіших ускладнень ГРДС є гіпоксичне й токсичне ураження печінки. Подібна патологія становить серйозний виклик для клінічної медицини через свою складну патофізіологію і високий рівень смертності [43; 82; 91; 126].

У низці доклінічних досліджень показано терапевтичний потенціал МСК у відновленні пошкодженої структури печінки при різноманітних патологіях. Зокрема, Wang et al. виявили зменшення площі ураження печінки у мишей з гострою печінковою недостатністю під впливом людських і мишачих жирових МСК [184]. Позитивний вплив МСК на регенерацію структури печінки пояснюється тим, що МСК здатні до диференціації у гепатоцитоподібні клітини [36; 165]. Також є дані про те, що трансплантовані аlogenні та навіть ксеногенні стовбурові клітини здатні відновлювати уражену печінку шляхом злиття з гепатоцитами [205]. МСК мають здатність продукувати екзосоми та виділяти секрети, що мають антифібротичний ефект [76; 77; 158]. МСК секретують трофічні молекули, такі як фактор росту гепатоцитів та фактор росту ендотелію судин, що активують процес відновлення уражених тканин паракринним шляхом, стимулюючи проліферацію і репарацію [197; 213].

У цьому розділі описано аналіз та узагальнення даних гістологічного, електронномікроскопічного та імуногістохімічного дослідження тканин печінки та біохімічного аналізу печінкових показників крові піддослідних щурів групи контролю, груп зі змодельованим ГРДС на різних стадіях та груп, підданих лікуванню МСК.

Встановлено, що інгаляційне введення ЛПС викликало значні морфофункціональні порушення всіх компонентів печінки, ступінь

пошкоджень залежав від терміну експерименту.

У тканинах печінки щурів інтактної групи відхилень від норми виявлено не було.

На 6 годину після введення ЛПС спостерігалися розширені кровонаповнені судини печінки та інфільтрація тріад клітинами запалення. Радіальне розташування гепатоцитів у вигляді печінкових балок залишалось збереженим.

На 24 годину після ЛПС зберігалася інфільтрація лейкоцитами периваскулярного простору та розширення міжчасточкових вен. Також були наявні світлі набряклі гепатоцити з підвищеною вакуолізацією цитоплазми та темними гетерохроматиновими ядрами.

На 3 добу у венах та синусоїдах виявлялись ознаки тромбозу. Структура печінки була порушена. У ній фіксувалися темні та світлі типи гепатоцитів. Гідропічно дегенеровані гепатоцити в основному були локалізовані в центральній частині печінкових балок, у той час як темні клітини з базофільною цитоплазмою знаходилися на периферії часточок та біля центральних вен. Зростала кількість гепатоцитів з пікнотичними ядрами.

На 7 добу венозні тромби почали лізуватися. У печінкових часточках наявні групи темних більш базофільних гепатоцитів з еухроматичними ядрами. Однак виявлялася невелика кількість гепатоцитів, що мали світлішу цитоплазму та пікнотичні ядра.

На 14 добу часточкова структура печінки залишалася порушеною. Було видно чіткі окремі групи темних базофільних та світлих гідропічно дегенерованих гепатоцитів. Зберігалася присутність гепатоцитів з пікнотичними ядрами. Залишалися ознаки гемостазу у судинах.

У пізній термін після введення ЛПС (28 доба досліду) спостерігалися великі ділянки вакуолізованих гепатоцитів зі зруйнованими ядрами. Спостерігалось лізування судинних тромбів, запальна інфільтрація периваскулярних ділянок знижувалася. Унаслідок некротичних змін

порушувалася часточково-балкова будова печінки.

Застосування МСК як коригуючого чинника створювало сприятливі умови для регенеративних процесів у тканинах печінки.

У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК просвіти судин не були облітеровані. Спостерігалася лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів. На препаратах переважали темні базофільні гепатоцити, які в основному локалізувалися в центральних частинах часточок.

У групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК гепатоцити виявляли менше ознак дегенерації порівняно з групою без корекції (7 днів ЛПС). Була присутня лейкоцитарна інфільтрація портальних трактів.

У групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК часточкова структура печінки збережена навколо центральних вен, у той час як на периферії радіальне розміщення печінкових балок порушене. Гепатоцити однорідні, базофільні, не вакуолізовані.

У групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК відмічаються ознаки лейкоцитарної інфільтрації навколо портальних трактів. Наявні поодинокі вакуолізовані гепатоцити на відміну від групи ГРДС 14 днів + МСК 14 днів, де такі клітини відсутні.

При електронномікроскопічному аналізі в групах 24 год ГРДС та 3 дні ГРДС спостерігався розвиток ранньої стадії гострого ураження печінки, яка характеризувалася кровонаповненням та стазами в кровоносних судинах, нейтрофільною інфільтрацією паренхіми, активацією макрофагів та пошкодженням ультраструктури гепатоцитів. На противагу цьому, група 24 години ГРДС + 2 дні МСК виявила значне зниження рівнів запалення та набряку. Більше того, її гепатоцити мали збережену ультраструктуру.

На пізніших стадіях було виявлено значні ультраструктурні зміни, включаючи клітинний набряк та пошкодження мітохондрій гепатоцитів.

Крім того, спостерігалися гепатоцелюлярний некроз, активація клітин Купфера та трансформація клітин Іто, яка призводила до збільшення відкладень

колагену. Використання МСК суттєво зменшило ці ультраструктурні аномалії, відновило цілісність мітохондрій та зменшило клітинний і позаклітинний набряк.

Для більш повної оцінки мікроскопічних змін в печінці щурів зі змодельованим ГРДС нами була імуногістохімічно проаналізована експресія TGF- β 1 — відомого маркера фіброзу. Виявлено, що TGF- β 1 майже не експресувався в групі контроль та контроль МСК та був менш виражений у групах тварин, яким вводилися МСК, у порівнянні з щурами без корекції. У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК його експресія знизилася в середньому у 1,7 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС, у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК у 1,4 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК у 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 28 днів ЛПС, у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК у 1,2 раза ($p < 0,05$) у порівнянні з групою 28 днів ЛПС. Результати такого аналізу наведені у табл. 4.2 та на рис. 6.1.

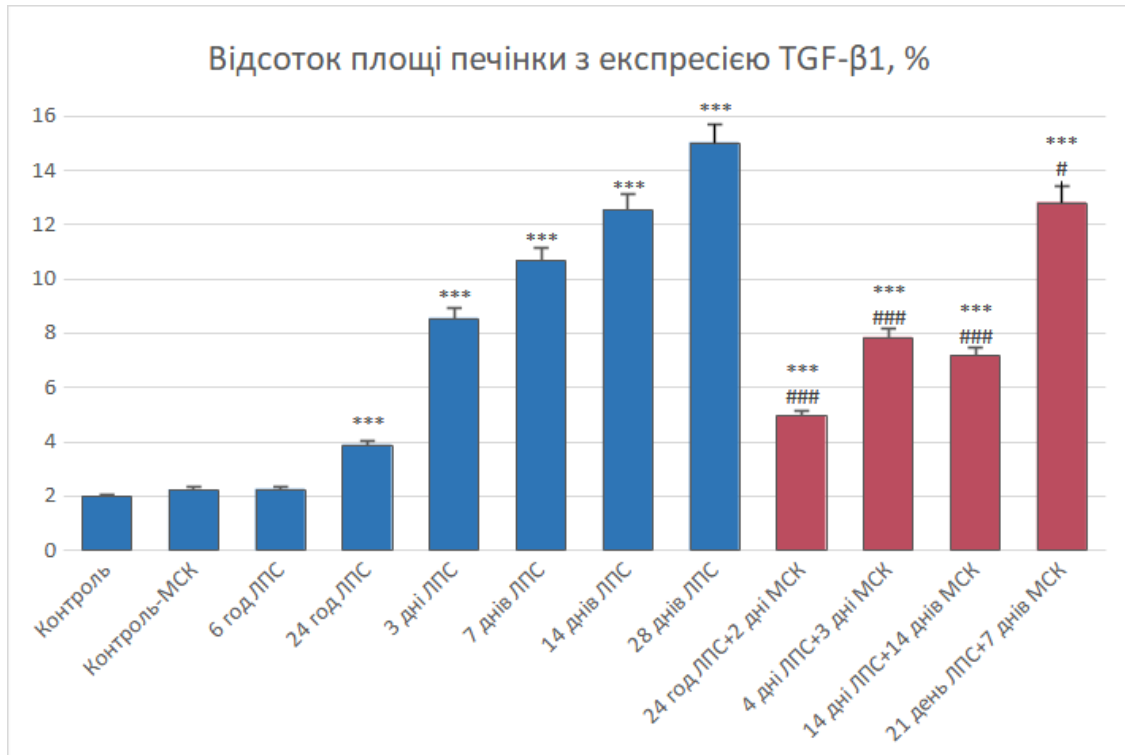


Рисунок 6.1 – Діаграмна візуалізація відсотків площі гістологічних препаратів печінки експериментальних тварин з експресією TGF- β 1

Отримані результати аналізу експресії TGF- β 1 вказують на антифібротичний ефект МСК. Особливо цікавими даними виявились результати експресії TGF- β 1 на 28 день експерименту після корекції МСК на 14 та 21 доби. Як видно з наведених результатів, у групі, де корекція проводилася на більш ранній стадії (14 день) площа відкладення імунопреципітату зменшилася набагато більше (у 1,8 раза у порівнянні з групою без корекції), у той час як у групі з корекцією на пізнішій стадії (21 день) площа відкладення імунопреципітату зменшилася меншою мірою (у 1,2 раза у порівнянні з групою без корекції) (табл. 4.2). Це свідчить про вищий антифібротичний вплив МСК, якщо вона проведена у більш ранні терміни розвитку патології.

Відомо, що TGF- β 1 спричиняє трансформацію клітин Іто у міофіброласти і стимулює продукцію білків екстрацелюлярного матриксу [73; 145]. Наші результати узгоджуються з даними попередніх досліджень з використанням інших типів МСК, таких як жирові МСК, МСК волосяних фолікулів та МСК кісткового мозку, які продемонстрували здатність стовбурових клітин моделювати сигнальні шляхи TGF- β 1 та інгібувати процес фіброгенезу у печінці [50; 87; 117; 118; 202].

Результати проведеної КГОУ, наведені в табл. 4.1, свідчать, що ЛПС-індуковане ураження печінки розвивається стадійно. Найвища кількість балів (15) була на 28 день. У групі контролю та контролю-МСК не було виявлено ознак ураження печінки. У порівнянні з групами без корекції, групи, кореговані МСК, отримали значно меншу КГОУ, що свідчить про потенційний терапевтичний ефект МСК. Введення МСК на більш ранній стадії (14 день) було більш ефективним у порівнянні з введенням на пізнішій стадії (21 день). Отримані нами результати корелюють з дослідженнями, проведеними іншими науковцями, щодо впливу МСК при патології печінки.

Світлі та темні гепатоцити, відмічені нами, були також описані Полінкевичем С. Г. при моделюванні хронічного токсичного гепатиту у щурів.

У світлих клітинах автор зазначає наявність ознак дистрофії з подальшим некрозом [4].

Поява тромбів у судинах печінки, що спостерігалася при змодельованому нами ГРДС, є ознакою розвитку ДВЗ-синдрому – частого ускладнення ГРДС, що настає унаслідок дисрегульованого запального процесу та асоційованого з ним порушення коагуляції [59]. ДВЗ-синдром здатний призводити до поліорганної недостатності, яка є головною причиною смертності при ГРДС. Дисфункція коагуляції при ГРДС виникає унаслідок активації тканинного фактору, який запускає інші ланки зсідання крові, а також втрати ендогенної антикоагулянтної функції [119]. При ДВЗ-синдромі унаслідок нерегульованої внутрішньосудинної гіперкоагуляції формуються тромби у мікро- та макроциркуляторному руслі. При цьому порушується кровообіг, настає ураження ендотелію та мікроциркуляторного русла [23].

Загибель гепатоцитів та інфільтрація печінки клітинами запалення, описані нами при змодельованому ГРДС, можна пояснити гепатоцелюлярною гіпоксією [39]. Гіпоксичне ураження печінки виникає унаслідок гіпоксемії, спричиненої порушенням оксигенації при ГРДС [69].

Запальні зміни тканин печінки, описані нами, також спостерігаються при COVID-19. Вони проявляються у появі тромбів у печінкових судинах, інфільтрації портальної тріади клітинами запалення, детеріорації гепатоцитів та некротичних змінах часточок [116; 137]. Відомо, що у розвитку ураження печінки при COVID-19 важливим фактором є гіпоксія та шок, викликані ГРДС, синдромом системної запальної відповіді та множинною недостатністю органів. Це, у свою чергу, призводить до гіпоперфузії печінки та подальшого некрозу гепатоцитів [112; 214].

Також ішемічні та гіпоксичні зміни печінки при COVID-19 виникають унаслідок ДВЗ-синдрому, що проявляється у розвитку мікроваскулярного тромбозу [71]. Дослідження біопсії печінки 48 пацієнтів, померлих від COVID-19, виявили значний тромбоз на портальному та синусоїдному рівні, а також

фіброз строми навколо порталних трактів [167].

Wang et al. вивчали вплив людських і мишачих жирових МСК на мишей зі змодельованою гострою недостатністю печінки. Введення обох видів МСК зменшувало площу ураження печінки, однак мишачі МСК виявились ефективнішими за людські жирові стовбурові клітини в даному експерименті [184].

Zhang et al., досліджуючи вплив МСК пуповинного канатика людини на ЛПС-зумовлену гостру печінкову недостатність щурів, з'ясували, що дводобова корекція МСК 5-го й 10-го пасажів зменшували кількість апоптотичних гепатоцитів та підвищували кількість проліферуючих клітин. Однак МСК 5 пасажу виявляли ефективнішу протипапоптотичну та регенеруючу дію у порівнянні з пасажем 10 [215].

Huang et al. використовували МСК кісткового мозку для корекції гострої печінкової недостатності у мишей. У печінці тварин без корекції спостерігалось відмирання гепатоцитів, вакуолізація їхньої цитоплазми, інфільтрація часточок лейкоцитами, масивні відкладення колагену та значне порушення структурної будови тканини печінки. У печінці тварин, яким вводилися МСК, інфільтрація імунними клітинами, набряк, відкладення колагену та вихід крові за межі судин значно зменшилися. Також МСК пригнічували апоптоз гепатоцитів та сприяли регенерації печінки [78].

Cai et al. використовували алогенні МСК кісткового мозку для корекції гострого ураження печінки щурів, викликаного ЛПС. Печінка групи щурів, яким вводилися МСК, зберегла свою структуру та мала лише незначну вакуолізацію цитоплазми та перипортальну інфільтрацію клітинами запалення, у порівнянні зі значною вакуолізацією цитоплазми, крововиливами та інфільтрацією запальними клітинами порталної ділянки печінки щурів без корекції. Також виявлено підвищення проліферації та зменшення апоптозу гепатоцитів, зумовлене МСК [27].

Ayatollahi et al. вивчали ефекти людських МСК кісткового мозку на

ураження печінки щурів, викликане СС14. У групі без корекції гепатоцити навколо центральної вени були значно вакуолізовані, апоптотично- некротичні, спостерігалися ознаки запалення та значний перипортальний фіброз. У групі з корекцією МСК некроз був відсутній, набряклі гепатоцити не спостерігалися, кількість відкладень колагену була зменшеною [20].

Fikry et al. використали алогенні МСК кісткового мозку для лікування експериментального ураження печінки мишей унаслідок шистосомозу. МСК зменшили рівні фіброзу печінки та сприяли збільшенню кількості овальних клітин печінки, регенерації зрілих гепатоцитів, покращенню стану резидентних гепатоцитів та проліферації жовчних каналців [54].

Дані проведеного нами кількісного аналізу площі печінки, зайнятої різними субпопуляціями макрофагів, вказують на статистично значущу активацію прозапальних макрофагів М1 при розвитку ГРДС. Однак у групах, що отримували лікування МСК, було статистично підтверджене збільшення відсотка протизапальних макрофагів М2, що свідчить про імуномодулюючий вплив МСК (рис. 6.2, див. табл. 4.3). У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК площа, заповнена М2 макрофагами, зросла в середньому у 3,3 раза ($p < 0,001$), а площа, зайнята М1 макрофагами, зменшилася у 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС, у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК у 1,3 ($p < 0,001$) і 2,1 ($p < 0,001$) раза відповідно у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК у 1,2 ($p < 0,01$) і 1,1 раза відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС, у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК у 1,4 ($p < 0,001$) і 1,5 ($p < 0,001$) раза відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС (див. табл. 4.3).

Отримані результати свідчать про динамічну взаємодію між субпопуляціями макрофагів у печінці під час прогресування ГРДС та вплив на них МСК. Початковий прозапальний сплеск за участі М1 макрофагів з часом уступає місце протизапальному середовищу, що характеризується активацією М2 макрофагів.



Рисунок 6.2 – Діаграмна візуалізація відсотків площі гістологічних препаратів печінки експериментальних тварин, зайнятих M1 (CD86+) і M2 (CD163+) макрофагами

При аналізі результатів, отриманих у групах 14 днів ЛПС + 14 днів МСК та 21 день ЛПС + 7 днів МСК, виявлено, що імуномодуляторний ефект 28 добу експерименту залежить від часу дії стовбурових клітин. Як видно із діаграми на рис. 6.2 через 14 днів після введення МСК їхній імуномодуляторний вплив був менше виражений ніж через 7 днів після корекції. Очевидно, за 2 тижні після введення МСК вплив стовбурових клітин на субпопуляції макрофагів послаблюється.

Фаза запалення, що виникає після ураження, веде до індукування фіброзу. Тому пригнічування виділення прозапальних та стимулювання протизапальних цитокінів здатне знизити рівень ураження печінки та ступінь фіброзу. Фіброз печінки відбувається унаслідок синтезу компонентів екстрацелюлярного матриксу, до складу якого входять колаген I, III і IV. У

цьому процесі беруть участь зірчасті клітини печінки. Активовані зірчасті клітини проліферують і перетворюються у міофібробласти. Міофібробласти синтезують екстрацелюлярний матрикс і виділяють велику кількість тканинного інгібітора металопротеїназ, що пригнічує активність інтерстиційної колагенази, і таким чином запобігає розщепленню екстрацелюлярного матриксу [28; 73; 194].

В активації зірчастих клітин беруть участь клітини Купфера — резидентні макрофаги печінки. Активовані клітини Купфера виділяють велику кількість оксидантів, цитокінів та протеїназ, які впливають на проліферацію, міграцію та диференціювання зірчастих клітин [163; 171].

Динамічна взаємодія між M1 та M2 фенотипами макрофагів є важливою у патофізіології ГРДС під час його різних фаз. Під час ексудативної фази домінують M1 макрофаги з їхніми прозапальними функціями, поступова активація M2 макрофагів в реабілітаційній (проліферативній) фазі є важливою для розрешення запалення та регенерації пошкоджень. У фібротичній фазі роль макрофагів стає складнішою, і досягнення правильної рівноваги між субпопуляціями M1 і M2 клітин є критичним для запобігання надмірному фіброзу та сприяння відновленню уражених органів [18; 34; 81; 104].

Спостережені зсуви поляризації макрофагів відображають складні імунорегуляторні механізми, що відбуваються під час ГРДС, і вказують на потенційну можливість використання МСК для зменшення запалення та підтримки тканинного гомеостазу.

Результати наших досліджень про вплив МСК на ураження печінки при ГРДС перекликаються з даними інших дослідників щодо впливу МСК на макрофаги печінки при інших патологіях.

Зокрема, Fiore et al. доводить, що МСК можуть викликати зсув печінкових макрофагів від профібротичного M1 до розрешального M2 фенотипу, що потенційно сприяє зменшенню фіброзу печінки [56].

Li et al. продемонстрували, що МСК здатні індукувати поляризацію

недиференційованих M0 макрофагів у M2 фенотип шляхом активації сигнального білка і активатора транскрипції STAT6, що може мати терапевтичні ефекти при гострій недостатності печінки [110].

При біохімічному аналізі печінкових маркерів крові виявив, що рівні АЛТ, АСТ та ЛФ були значно підвищені у сироватці крові щурів без корекції. Це свідчить про ураження клітин печінки та порушення її функції (див. рис. 5.1, 5.2, 5.3, табл. 5.1).

На протигагу цьому, рівні печінкових маркерів статистично достовірно знизилися у щурів, яким вводилися МСК, у порівнянні з групами без корекції, що свідчить про їхню ефективність у зниженні гепатоцелюлярного та біліарного ураження (див. рис. 5.4, 5.5, 5.6).

У групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК рівні АСТ, АЛТ та ЛФ зменшилися на 22,1 %, 13,8 %, 21,9 % ($p < 0,05$) відповідно порівнянні з групою 3 дні ЛПС, у групі 4 дні ЛПС + 3 дні МСК на 14,7 %, 5, %, 23,9 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, у групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК на 42,1 %, 8,1 %, 10,7 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС, у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК на 43,8 %, 6,8 %, 11,1 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з групою 28 днів ЛПС. При цьому, значення АСТ у групах 14 днів ЛПС + 14 днів МСК та 21 день ЛПС + 7 днів МСК, АЛТ у групі 24 год ЛПС + 2 дні МСК досягнули величин групи контролю (див. рис. 5.4, 5.5, 5.6).

Наші результати корелюють з дослідженнями інших науковців щодо впливу МСК на рівні біохімічних маркерів при ураженні печінки.

Zhang et al. досліджували вплив різних пасажів людських МСК пуповинного канатика на щурів зі гострою печінковою недостатністю, викликаною введенням ЛПС та D-галактозаміну. Було виявлено значне зниження рівнів АЛТ та АСТ на 48 та 72 години у групах, яким вводилися МСК, у порівнянні з групами без корекції. При цьому у групі, що отримала МСК більш раннього пасажу (5-го) рівні обох печінкових маркерів були значно

нижчі у порівнянні з групою, якій були введені МСК пізнішого (10-го) пасажу [215].

Cai et al. моделювали гостре ураження печінки у щурів за допомогою ЛПС та D-галактозаміну та проводили його корекцію введенням МСК кісткового мозку щурів. При цьому сироваткові рівні АЛТ і АСТ були підвищені у групах зі змодельованою патологією. У групі, якій було введено МСК, було відмічено значне зниження рівнів обох печінкових маркерів, особливо виражене на 72 год та 120 год [27].

Salomone et al. викликали ураження печінки у щурів за допомогою введення ацетамінофену та проводили його корекцію МСК жирової тканини людини. При цьому на 24 годину після моделювання патології у щурів з ураженням печінки без корекції виявлялися підвищені рівні АЛТ і АСТ, у тоді як у щурів, яким вводилися МСК, рівні АЛТ і АСТ опустилися до рівнів контрольної групи [162].

Таким чином, проведене нами дослідження свідчить про виражений протизапальний, антифібротичний, гепатопротекторний та імуномодулюючий ефект МСК. Отримані результати узгоджуються з даними інших науковців щодо корегуючого впливу стовбурових клітин на ураження печінки в експерименті. Отже, дане доклінічне дослідження доводить безпечність МСК та можливість їхнього використання для лікування уражень печінки у клініці.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично узагальнюється та наводиться вирішення важливого наукового і прикладного завдання: встановлення механізмів ураження печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі та з'ясування терапевтичного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини для відновлення її структури і функції. За результатами проведених мікроскопічних, електронномікроскопічних, імуногістохімічних досліджень печінки та біохімічного аналізу крові визначено стадійність перебігу морфофункціональних порушень даного органа. Доведено доцільність використання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини для відновлення структурної цілісності та функціонального стану ураженої печінки.

1. Проведені мікроскопічні, субмікроскопічні, імуногістохімічні дослідження печінки та біохімічний аналіз крові інтактних щурів не виявляють відхилень від видової норми. Спостерігаються печінкові часточки шестигранної форми з центральною веною, печінковими синусоїдами, розташованими між радіальними балками гепатоцитів, а також порталними трактами, розташованими в кутах часточок. Дані, отримані як результат дослідження печінки та крові інтактних щурів, використовуються як контроль для порівняння з даними досліджень інших груп тварин.

2. При мікроскопічному, субмікроскопічному, імуногістохімічному дослідженні печінки та біохімічному аналізі крові щурів групи контроль-МСК (3 доби після перитонеального введення мезенхімальних стовбурових клітин) не виявляється статистично значущих відмінностей від групи контролю. Це доводить безпечність та відсутність імуногенного впливу мезенхімальних стовбурових клітин на тканини печінки.

3. Перебіг ураження печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі у групах без корекції відбувається стадійно. На ранніх стадіях гострого респіраторного дистрес-синдрому (6, 24 год та 3 доба) спостерігаються

дисциркуляторні розлади у судинах печінки та активація прозапальної відповіді. У печінці переважають прозапальні M1 макрофаги (CD163+). У порівнянні з контролем їхній рівень зростає у 3,5 раза ($p < 0,001$), у той час як рівень протизапальних M2 макрофагів (CD86+) знижується у 3,3 раза ($p < 0,001$). На 6-24 годину відмічаються початкові деструктивні зміни гепатоцитів. Спостерігається розвиток гепатоцелюлярного стресу, що проявляється руйнуванням компонентів ендоплазматичної сітки, виснаженням включень глікогену, зниженням кількості мітохондрій у клітинах печінки, руйнуванням крист у їхньому матриксі. Розвиток цитолітичного синдрому підтверджується різким зростанням активності аспартатамінотрансферази (до 3,8 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,05$) і аланінамінотрансферази (до 1,9 раза порівняно з контролем, $p < 0,05$) сироватки крові на 6 годину. Далі досліджувані показники поступово знижуються. Величина активності лужної фосфатази зростає поступово і досягає свого піку на 3 добу експерименту, що свідчить про розвиток холестатичного синдрому. В цей термін у печінці починають відмічатися активовані клітини Іто, що вказує на початок фіброгенезу. Розвиток фіброзу печінки підтверджується зростанням рівня експресії TGF- β 1 (у 4,3 раза у порівнянні з контролем, $p < 0,001$).

4. На середніх стадіях гострого респіраторного дистрес-синдрому (7-14 доби) спостерігаються ознаки дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові. Часточково-балкова структура печінки порушується. Чітко вирізняються групи темних (базофільних, відновлених) і світлих (дегенеративно змінених) гепатоцитів. Зниження рівня гістіолейкоцитарної інфільтрації портальних трактів та статистично достовірне зростання кількості протизапальних M2 макрофагів (у 3 рази більше у порівнянні з групою щурів 3 дні ЛПС, $p < 0,001$) підтверджує зменшення інтенсивності запалення в тканинах печінки. Рівні сироваткових трансаміназ знижуються у порівнянні з ранніми термінами ураження, але залишаються підвищеними порівняно з контрольними величинами. На противагу цьому рівень лужної фосфатази залишається

підвищеним і досягає максимальних величин на 14 добу експерименту. Продовжується відкладання колагену трансформованими клітинами Іто, що підтверджується подальшим зростанням рівня експресії TGF- β 1.

5. У пізній термін експерименту (28 доба) спостерігаються великі ділянки вакуолізованих гепатоцитів зі зруйнованими ядрами, відмічається порушення часточково-балкової будови печінки. Виявляються ознаки фібротичних змін органу. Доказом фіброзу печінки також є значний ступінь експресії TGF- β 1 (зріс у 7,6 раза у порівнянні з контрольним значенням, $p < 0,001$). У цитоплазмі гепатоцитів спостерігається підвищений вміст крапель жиру, що є ознакою розвитку стеатозу. Кількість M1 макрофагів знову зростає (у 2,4 раза вище контрольного рівня, $p < 0,001$), що є свідченням хвилеподібного перебігу запального процесу в ураженій печінці.

6. Корекція уражень печінки за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин на ранніх термінах розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому (24 год ЛПС + 2 дні МСК) зменшує ознаки руйнування ультраструктури гепатоцитів у порівнянні з відповідними термінами експерименту без корекції (3 дні ЛПС). Добре видимі кристи мітохондрій свідчать про зменшений оксидативний стрес та збереження продукції енергії. Знижується лімфогістіоцитарна інфільтрація порталних трактів, зменшується набряк печінки унаслідок збереження цілісності ендотеліальної вистилки синусоїдних гемокапілярів. Експресія TGF- β 1 знижується в середньому у 1,7 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою без корекції, що свідчить про антифібротичну дію мезенхімальних стовбурових клітин. Площа, заповнена M2 макрофагами, зростає в середньому у 3,3 раза ($p < 0,001$), в той час як площа M1 макрофагів зменшується у 1,8 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС. Це свідчить про зміну поляризації макрофагів на користь фенотипу M2 та активацію протизапальної імунної реакції під впливом МСК. Рівні сироваткових трансаміназ та лужної фосфатази зменшуються на 22,1 %, 13,8 %, 21,9 % відповідно ($p < 0,05$) у порівнянні з групою 3 дні ЛПС, що є доказом

гепатопротекторної активності мезенхімальних стовбурових клітин.

7. Введення мезенхімальних стовбурових клітин на середніх термінах розвитку ураження печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі (4 дні ЛПС + 3 дні МСК) сприяє збереженню цілісності гепатоцитів та їхніх органел. Виявляється значно менше ознак васкулярного ураження порівняно з групою без корекції (7 днів ЛПС). Антифібротична дія мезенхімальних стовбурових клітин проявляється зменшенням активації клітин Іто та відкладення колагену у міжклітинному просторі, що також підтверджується зниженням експресії TGF- β 1 у 1,4 раза ($p < 0,001$) у порівнянні з групою без корекції. Площа, заповнена M2 макрофагами, зростає в середньому у 1,3 рази ($p < 0,001$), а площа, зайнята M1 макрофагами, зменшується у 2,1 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з групою 7 днів ЛПС, що є свідченням імуномодулюючих властивостей МСК. Рівні сироваткових трансаміназ та лужної фосфатази знижуються на 14,7 %, 5,0 %, 23,9 % відповідно ($p < 0,05$) у порівнянні з групою без корекції.

8. Ефективність корегуючого впливу мезенхімальних стовбурових клітин на уражену печінку щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом на пізніх термінах експерименту залежить від тривалості часу після їхнього введення. У групі 14 днів ЛПС + 14 днів МСК спостерігаються кращі показники відновлення структури печінки (збережена структурна цілісність гепатоцитів, відсутній набряк вакуоль) та менший рівень фіброзу у порівнянні з групою 21 день ЛПС + 7 днів МСК. Ступінь експресії TGF- β 1 у тканинах печінки групи 14 днів ЛПС + 14 днів МСК знижується в 1,8 раза ($p < 0,001$) в порівнянні з групою без корекції (28 днів ЛПС), у той час як аналогічний показник у групі 21 день ЛПС + 7 днів МСК становить лише 1,2 раза ($p < 0,05$). Це свідчить про вищу терапевтичну (регенеративну, антифібротичну, протизапальну) ефективність мезенхімальних стовбурових клітин, якщо вона проведена у більш ранні терміни розвитку патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гнатюк МС, Доброродній АВ. Структурно-клітинні зміни в печінці при експериментальному гострому респіраторному дистрес-синдромі. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2011;(4)10:6-8.
2. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононський ОІ. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Житомир: Полісся; 2015.
3. Палій І, Загричук Ю, Редько О. Аналіз ростових властивостей та каріотипу стовбурових клітин пуповини щурів. В: Матеріали XXV міжнародного медичного конгрес студентів та молодих вчених; 2021 Квіт. 12-14; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с. 285-286.
4. Полінкевич СГ. Особливості ультраструктури печінки молодих статевонезрілих щурів при хронічному токсичному гепатиті. Вісник морфології, 2014;20(2):375-379.
5. Редько ОС, Довгалюк АІ. Морфологічні зміни печінки щура при гострому респіраторному дистрес-синдромі у різні терміни експерименту. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2022;(4):52– 57.
6. Редько О, Довгалюк А. Ультраструктурні зміни печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом та після корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами у ранні терміни експерименту. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2023;22(3):84– 90.
7. Редько ОС, Довгалюк АІ, Палій ІР. Підбір моделі ГРДС для вивчення ефективності методів корекції важких станів при COVID-19. В: Матеріали XXI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 35-ій річниці Чорнобильської катастрофи Довкілля і здоров'я; 2021 Квіт. 22-24; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с. 51-53. Редько ОС, Довгалюк АІ, Крамар СБ. Гістологічні зміни печінки щура при експериментальному гострому респіраторному дистрес-синдромі. В.

Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю від дня народження професорки Вікторії Антонівни Малішевської Прикладні питання сучасної морфології; 2022 Берез. 23-24; Чернівці. Чернівці; 2022, с. 97-100.

8. Редько О, Тесля В, Поліщук Н. Мікроскопічний стан печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом у пізні терміни експерименту. В: Матеріали XXVI міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2022, с. 220.

9. Редько О, Довгалюк Б, Саковець А. Імуногістохімічне виявлення TGF- β у тканинах печінки щурів при змодельованому гострому респіраторному дистрес-синдромі та його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. В: Матеріали XXVII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2023 Квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с. 282.

10. Редько ОС, Крамар СБ, Андрієшин ОП. Імуногістохімічне виявлення CD68 у тканинах печінки щурів при змодельованому гострому респіраторному дистрес-синдромі та його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. В: Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої пам'яті члена-кореспондента НАМН України д. мед. н. професора Ю. Б. Чайковського Тканинні реакції в нормі експерименті та клініці; 2023 Черв. 8-9; Київ. Київ; 2023, с. 137.

11. Редько ОС, Довгалюк АІ, Крамар СБ, Довбуш АВ. Застосування мезенхімальних стовбурових клітин для корекції ураження печінки у щурів, викликаного гострим респіраторним дистрес-синдромом. В: Матеріали підсумкової LXVI науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2023 Черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с. 136-137.

12. Abdellatif H. Oval Cells: Potential Role in Liver Regeneration. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*. 2018;2(1):001–8.
13. Albillos A, Gottardi A de, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*. 2020 Mar 1;72(3):558–77.
14. Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Mauricio AC. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity—Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 9;14(2):381.
15. Amato MBP, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa ELV, Schoenfeld DA, et al. Driving Pressure and Survival in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2015 Feb 19;372(8):747–55.
16. An SY, Jang YJ, Lim HJ, Han J, Lee J, Lee G, et al. Milk Fat Globule-EGF Factor 8, Secreted by Mesenchymal Stem Cells, Protects Against Liver Fibrosis in Mice. *Gastroenterology*. 2017 Apr 1;152(5):1174–86.
17. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018 Apr 1;223(4-5):383–96.
18. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet (London, England)*. 1967;2(7511):319–23.
19. Ayatollahi M, Hesami Z, Jamshidzadeh A, Gramizadeh B. Antioxidant Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell against Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Damage in Rat Livers. *International journal of organ transplantation medicine*. 2014;5(4):166–73.
20. Barnett-Vanes A, Sharrock A, Birrell MA, Rankin S. A single 9-colour flow cytometric method to characterise major leukocyte populations in the rat: validation in a model of LPS-induced pulmonary inflammation. *PLoS One*. 2016;11(1):e0142520.

21. Bellani G, Grasselli G, Cecconi M, Antolini L, Borelli M, De Giacomo F, et al. Noninvasive Ventilatory Support of Patients with COVID-19 outside the Intensive Care Units (WARD-COVID). *Annals of the American Thoracic Society*. 2021 Jun;18(6):1020–6.
22. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*. 2016;315(8):788–800.
23. Bellani G, Pham T, Laffey JG. Missed or delayed diagnosis of ARDS: a common and serious problem. *Intensive Care Medicine*. 2020 Apr 23;46(6):1180–3.
24. Bernal-Monterde V, Casas-Deza D, Letona-Giménez L, et al. SARSCoV- 2 Infection Induces a Dual Response in Liver Function Tests: Association with Mortality during Hospitalization. *Biomedicines*. 2020;8:328.
25. Bourenne J, Carvelli J, Papazian L. Evolving definition of acute respiratory distress syndrome. *Journal of Thoracic Disease*. 2019 Mar;11(S3):S390–3.
26. Cai Y, Zou Z, Liu L, Chen S, Chen Y, Lin Z, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015 Jan 1;8(1):107–16.
27. Campana L, Iredale J. Regression of Liver Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*. 2017 Feb 15;37(01):001-010.
28. Chai NL, Zhang XB, Chen SW, Fan KX, Linghu EQ. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(26):6036.
29. Chang JC. Acute Respiratory Distress Syndrome as an Organ Phenotype of Vascular Microthrombotic Disease: Based on Hemostatic

Theory and EndothelialMolecular Pathogenesis. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2019 Jan 1;25:107602961988743.

30. Chen J, Li X, Ge C, Min J, Wang F. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease. *Cell Death & Differentiation*. 2022 Jan 24;29(3):467–80.

31. Chen L, Xiang B, Wang X, Xiang C. Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017 Jan 23;8(1).

32. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395:507-513.

33. Chen X, Tang J, Shuai W, Meng J, Feng J, Han Z. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Inflammation Research*. 2020 Jul 10;69(9):883–95.

34. Combes A, Hajage D, Capellier G, Demoule A, Lavoué S, Guervilly C, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2018 May 24;378(21):1965–75.

35. Coronado RE, Somaraki-Cormier M, Ong JL, Halff GA. Hepatocyte-like cells derived from human amniotic epithelial, bone marrow, and adipose stromal cells display enhanced functionality when cultured on decellularized liver substrate. *Stem Cell Research*. 2019 Jul;38:101471.

36. Cuccurullo A, Greco E, Lupia E, De Giuli P, Bosco O, Martin-Conte E, et al. Blockade of Thrombopoietin Reduces Organ Damage in Experimental Endotoxemia and Polymicrobial Sepsis. Hirsch E, editor. *PLOS ONE*. 2016 Mar 10;11(3):e0151088.

37. Dale CM, Carbone S, Istanboulian L, Fraser I, Cameron JJ, Herridge MS, et al. Support needs and health-related quality of life of family caregivers of patients requiring prolonged mechanical ventilation and admission to a specialised weaning centre: A qualitative longitudinal interview study. *Intensive and Critical Care Nursing*. 2020 Jun;58:102808.

38. Dawood RM, Salum GM, El-Meguid MA. The Impact of COVID-19 on Liver Injury. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2021 Nov;
39. de Jong PR, González-Navajas JM, Jansen NJG. The digestive tract as the origin of systemic inflammation. *Critical Care*. 2016 Oct 18;20(1).
40. Deng H, Wu L, Liu M, Zhu L, Chen Y, Zhou H, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate LPS-Induced ARDS by Modulating Macrophage Polarization Through Inhibiting Glycolysis in Macrophages. *Shock*. 2020 May 18.
41. de Souza Xavier Costa N, Gabriel Ribeiro Júnior, Alemany S, Belotti L, Douglas Hidalgo Zati, Marcela Frota Cavalcante, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PLOS ONE*. 2017 Sep 27;12(9):e0185474–4.
42. Dhayalan M. *An Epidemiological Update on COVID-19*. Bentham Science Publishers; 2022.
43. Dickson RP. The Lung Microbiome and ARDS. It Is Time to Broaden the Model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Mar 1;197(5):549-551
44. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Standiford TJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol*. 2016; 1(10):1-9.
45. Dizier S, Forel JM, Ayzac L, Richard JC, Hraiech S, Lehingue S, et al. Early Hepatic Dysfunction Is Associated with a Worse Outcome in Patients Presenting with Acute Respiratory Distress Syndrome: A Post-Hoc Analysis of the ACURASYS and PROSEVA Studies. Groeneveld ABJ, editor. *PLOS ONE*. 2015 Dec 4;10(12):e0144278.
46. Domscheit H, Hegeman MA, Carvalho N, Spieth PM. Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. *Frontiers in Physiology*. 2020 Feb 5;11.

47. Dooley S, Ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell and tissue research*. 2012 Jan;347(1):245-256.
48. Dovgalyuk A, Redko O, Dovbush A, Kramar S, Sverstyuk A. The effect of MMSCs on the cytokine profile in the lungs of rats with simulated ARDS. 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences; 2022 Apr 7 — 8; Prague, Czech Republic. Prague; 2022, p. 115.
49. Dutra Silva J, Su Y, Calfee CS, Delucchi KL, Weiss D, McAuley DF, et al. Mesenchymal stromal cell extracellular vesicles rescue mitochondrial dysfunction and improve barrier integrity in clinically relevant models of ARDS. *European Respiratory Journal*. 2020 Dec 17;58(1):2002978.
50. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beaufils F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut- Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020 Feb 19;10.
51. Fathy M, Okabe M, Saad Eldien HM, Yoshida T. AT-MSCs antifibrotic activity is improved by eugenol through modulation of TGF- β /Smad signaling pathway in rats. *Molecules*. 2020 Jan;25(2):348.
52. Feng J, Yao W, Zhang Y, Xiang A, Yuan D, Hei Z. Intravenous Anesthetics Enhance the Ability of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Alleviate Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in a Receptor-Dependent Manner. 2018 Jan 1;47(2):556–66.
- a. Fikry H, Gawad SA, Baher W. Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Experimental Liver Injury Induced by *Schistosoma mansoni*: A Histological Study. *International Journal of Stem Cells*. 2016 May 31;9(1):96–106.
53. Fiore EJ, Domínguez LM, Bayo J, García MG, Mazzolini GD. Taking advantage of the potential of mesenchymal stromal cells in liver regeneration: Cells and extracellular vesicles as therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*. 2018 Jun 21;24(23):2427–40.

54. Fiore E, Malvicini M, Bayo J, Peixoto E, Atorrasagasti C, Sierra R, et al. Involvement of hepatic macrophages in the antifibrotic effect of IGF-I-overexpressing mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016 Nov 22;7(1).
55. Fröhlich E. Acute Respiratory Distress Syndrome: Focus on Viral Origin and Role of Pulmonary Lymphatics. *Biomedicines*. 2021 Nov;9(11):1732.
56. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
57. Gando S, Fujishima S, Saitoh D, Shiraishi A, Yamakawa K, Kushimoto S, et al. The significance of disseminated intravascular coagulation on multiple organ dysfunction during the early stage of acute respiratory distress syndrome. *Thrombosis Research*. 2020 Jul 1;191:15–21.
58. George T, Chakraborty M, Giembycz MA, Newton R. A bronchoprotective role for Rgs2 in a murine model of lipopolysaccharide-induced airways inflammation. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018 Oct 1;14(1).
59. Golchin A, Seyedjafari E, Ardeshirylajimi A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2020 Apr 13;1–7.
60. Goligher EC, Hodgson CL, Adhikari NKJ, Meade MO, Wunsch H, Uleryk E, et al. Lung Recruitment Maneuvers for Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of the American Thoracic Society*. 2017 Oct;14(Supplement_4):S304–11.
61. Oct;14(Supplement_4):S304–11.
62. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. N Engl J Med*. 2020; 382:1708-1720
63. Guérin C, Papazian L, Reignier J, Ayzac L, Loundou A, Forel JM. Effect of driving pressure on mortality in ARDS patients during lung protective mechanical ventilation in two randomized controlled trials. *Critical Care*. 2016 Nov 29;20(1).

64. Guervilly C, Prud'homme E, Pauly V, Bourenne J, Hraiech S, Daviet F, et al. Prone positioning and extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome: time for a randomized trial? *Intensive Care Med.* 2019 Jul;45(7):1040-1042.
65. Guillot A, Tacke F. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatology Communications.* 2019 Apr 22;3(6):730–43.
66. Han YJ, Kang YH, Shivakumar SB, Bharti D, Son YB, Choi YH, et al. Stem Cells from Cryopreserved Human Dental Pulp Tissues Sequentially Differentiate into Definitive Endoderm and Hepatocyte-Like Cells in vitro. *International Journal of Medical Sciences.* 2017 Nov 2;14(13):1418–29.
67. Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2022 Mar 21;7(1):1–19
68. Harnisch LO, Baumann S, Mihaylov D, Kiehntopf M, Bauer M, Moerer O, et al. Biomarkers of Cholestasis and Liver Injury in the Early Phase of Acute Respiratory Distress Syndrome and Their Pathophysiological Value. *Diagnostics.* 2021 Dec 14;11(12):2356.
69. Herrero R, Sánchez G, Asensio I, López E, Ferruelo A, Vaquero J, et al. Liver-lung interactions in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine Experimental.* 2020 Dec 18;8(Suppl 1):48.
70. Herta T, Berg T. COVID-19 and the liver – Lessons learned. *Liver International.* 2021 Jun;41(S1):1–8.
71. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015; 49(1):12-20.
72. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2017 Nov;121:27–42.
73. Hilliard KL, Allen E, Traber KE, Yamamoto K, Stauffer NM, Wasserman GA, et al. The Lung-Liver Axis: A Requirement for Maximal Innate

Immunity and Hepatoprotection during Pneumonia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2015 Sep;53(3):378–90.

74. Horvatits T, Drolz A, Trauner M, Fuhrmann V. Liver Injury and Failure in Critical Illness. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2019 Dec 1;70(6):2204–15.

75. Hu C, Zhao L, Zhang L, Bao Q, Li L. Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 Sep 3;11(1).

76. Hu C, Wu Z, Li L. Pre-treatments enhance the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in liver diseases. *JCMM*. 2020; 24(1):40-49.

77. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395:497-506.

78. Huang B, Cheng X, Wang H, Huang W, la Ga hu Z, Wang D, et al. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively. *Journal of Translational Medicine*. 2016 Feb 9;14(1).

79. Huang S, Wang Y, Xie S, Lai Y, Mo C, Zeng T, et al. Hepatic TGF β 1 Attenuates Lipopolysaccharide/D-Galactosamine-Induced Acute Liver Failure Through Inhibiting GSK3 β -Nrf2-Mediated Hepatocyte Apoptosis and Ferroptosis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2022 Jan 1;13(6):1649–72.

80. Huang X, Xiu H, Zhang S, Zhang G. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. *Mediators of Inflammation*. 2018 May 13;2018:1–8.

81. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(1):31-39.

82. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, O'Kane CM, Krasnodembskaya AD. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells*. 2016 Aug;34(8):2210-23.

83. Jang SC, Kim OY, Yoon CM, Choi DS, Roh TY, Park J, et al. Bioinspired Exosome-Mimetic Nanovesicles for Targeted Delivery of Chemotherapeutics to Malignant Tumors. *ACS Nano*. 2013 Sep 4;7(9):7698–710.
84. Jang YO, Kim YJ, Baik SK, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. *Liver Int*. 2014; 34:33-41.
85. Jang YO, Cho MY, Yun CO, Baik SK, Park KS, Cha SK, et al. Effect of Function-Enhanced Mesenchymal Stem Cells Infected With Decorin- Expressing Adenovirus on Hepatic Fibrosis. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016 Jun 30;5(9):1247–56.
86. Jang YO, Kim SH, Cho MY, Kim KS, Park KS, Cha SK, Park HJ, Yu E, Lee YB, Kim MY, Baik SK. Synergistic effects of simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018 Jan 1;497(1):264-71.
87. Ji D, Qin E, Xu J, Zhang D, Cheng G, Wang Y, Lau G. Non-alcoholic fatty liver diseases in patients with COVID-19: A retrospective study. *J Hepatol*. 2020 Aug;73(2):451-453.
88. Jiang Y, Rubin L, Peng T, Liu L, Xing X, Lazarovici P, Zheng W. Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. *Int J Biol Sci* 2022; 18(2):459-472.
89. Kadota Y, Yagi H, Inomata K, Matsubara K, Hibi T, Abe Y, et al. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis*. 2014; 10(2):268-277.
90. Kallet RH, Lipnick MS, Zhuo H, Pangilinan LP, Gomez A. Characteristics of Nonpulmonary Organ Dysfunction at Onset of ARDS Based on the Berlin Definition. *Respiratory Care*. 2019 May 1;64(5):493–501
91. Kang H, Kim MY, Eom YW, Baik SK. Mesenchymal stem cells for the treatment of liver disease: present and perspectives. *Gut and liver*. 2020; 14(3):306.

92. Khoury M, Cuenca J, Cruz FF, Figueroa FE, Rocco PRM, Weiss DJ. Current Status of Cell-Based Therapies for Respiratory Virus Infections: Applicability to COVID-19. *European Respiratory Journal*. 2020 Jan 1
93. Kim G, Eom YW, Baik SK, Shin Y, Lim YL, Kim MY, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells for patients with chronic liver diseases: systematic review and meta-analysis. *Journal of Korean Medical Science*. 2015; 30(10):1405-1415.
94. Kolaczkowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Lee W-Y, Sanz M-J, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*. 2015; 6(1):1-13.
95. Kruepunga N, Hakvoort TB, Hikspoors JP, Köhler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865.5: 869- 878.
96. Krynytska I, Marushchak M, Birchenko I, Dovgalyuk A, Tokarskyy O. COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome versus classical acute respiratory distress syndrome (a narrative review). *Iran J Microbiol*. 2021;13(6):728-738.
97. Kucharski AJ, Russell TW, Diamond C, et al. Early dynamics of transmission and control of COVID-19: a mathematical modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20:553-558.
98. Kulkarni AV, Kumar P, Tevethia HV, et al. Systematic review with meta- analysis: liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52.
99. Kumar-M P, Mishra S, Jha DK, Shukla J, Choudhury A, Mohindra R, Mandavdhare HS, Dutta U, Sharma V. Coronavirus disease (COVID-19) and the liver: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int*. 2020 Sep;14(5):711-722.

100. Kumar P, Kandoi S, Misra R, Vijayalakshmi S, Rajagopal K, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46:1-9.
101. Kwon JH, Kim M, Bae YK, Kim GH, Choi SJ, Oh W, et al. Decorin secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells induces macrophage polarization via CD44 to repair hyperoxic lung injury. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.19: 4815
102. Lax SF, Skok K, Zechner P, et al. Pulmonary arterial thrombosis in covid-19 with fatal outcome: results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series. *Ann Intern Med.* 2020.
103. Lee JW, Chun W, Lee HJ, Min JH, Kim SM, Seo JY, Ahn KS, Oh SR. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Cells.* 2021 Apr 14;10(4):897.
104. Levick C. How to interpret liver function tests. *South Sudan Med J.* 2017;10(2):40-43.
105. Li J, Fan JG. Characteristics and mechanism of liver injury in 2019 coronavirus disease. *Journal of clinical and translational hepatology.* 2020; 8(1):13.
106. Li J, Li RJ, Lv GY, Liu HQ. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19:2036-2047.
107. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert opinion on biological therapy*, 2015, 15.9: 1293-1306.
108. Li YH, Xu Y, Wu HM, Yang J, Yang LH, Yue-Meng W. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation in hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure treated with plasma exchange and Entecavir: a 24-month prospective study. *Stem Cell Rev.* 2016; 12:645-53.

109. Li Y, Sheng Q, Zhang C, Han C, Bai H, Lai P, et al. STAT6 up-regulation amplifies M2 macrophage anti-inflammatory capacity through mesenchymal stem cells. *International Immunopharmacology*. 2021 Feb 1;91:107266.
110. Lin BL, Chen JF, Qiu WH, et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled trial. *Hepatology*. 2017; 66:209-219
111. Licata A, Minissale MG, Distefano M, Montalto G. Liver injury, SARS-COV-2 infection and COVID-19: What physicians should really know? *GastroHep*. 2021 May;3(3):121–30.
112. Liu C, Xiao K, Xie L. Advances in the Regulation of Macrophage Polarization by Mesenchymal Stem Cells and Implications for ALI/ARDS Treatment. *Frontiers in Immunology*. 2022 Jul 8;13.
113. Liu F, Li W, Pauluhn J, Trübel H, Wang C. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats: Comparative assessment of intratracheal instillation and aerosol inhalation. *Toxicology*. 2013 Feb;304:158–66.
114. Liu J, Li S, Liu J, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020; 55:102763.
115. Liu, Q., Wang, R., Qu, G., Wang, Y., Liu, P., & Zhu, Y. General anatomy report of novel coronavirus pneumonia death corpse. *J Forensic Med*, 2020, 36.1: 19-21.
116. Liu Q, Lv C, Jiang Y, Luo K, Gao Y, Liu J, et al. From hair to liver: emerging application of hair follicle mesenchymal stem cell transplantation reverses liver cirrhosis by blocking the TGF- β /Smad signaling pathway to inhibit pathological HSC activation. *PeerJ*. 2022 Feb 15;10:e12872.
117. Liu Q, Lv C, Huang Q, Zhao L, Sun X, Ning D, et al. ECM1 modified HF-MSCs targeting HSC attenuate liver cirrhosis by inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway. *Cell Death Discovery*. 2022 Feb 8;8(1).

118. Livingstone SA, Wildi KS, Dalton HJ, Usman A, Ki KK, Passmore MR, et al. Coagulation Dysfunction in Acute Respiratory Distress Syndrome and Its Potential Impact in Inflammatory Subphenotypes. *Frontiers in Medicine*. 2021 Aug 20;8:723217.
119. Lopes-Pacheco M, Robba C, Rocco PRM, Pelosi P. Current understanding of the therapeutic benefits of mesenchymal stem cells in acute respiratory distress syndrome. *Cell Biology and Toxicology*. 2020 Feb 1;36(1):83–102.
120. Joanna Maria Łotowska, M Sobaniec-Łotowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Daniluk U, Piotr Sobaniec, Krzysztof Sendrowski, et al. Ultrastructural Characteristics of Rat Hepatic Oval Cells and Their Intercellular Contacts in the Model of Biliary Fibrosis: New Insights into Experimental Liver Fibrogenesis. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017 Jan 1;2017:1–9.
121. Luque-Campos N, Bustamante-Barrientos FA, Pradenas C, García C, Araya MJ, Bohaud C, et al. The Macrophage Response Is Driven by Mesenchymal Stem Cell-Mediated Metabolic Reprogramming. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jun 4;12.
122. Máca, J., Jor, O., Holub, M., Sklienka, P., Burša, F., Burda, M., & Ševčík, Past and present ARDS mortality rates: a systematic review. *Respiratory care*, 2017, 62.1: 113-122.
123. Massey VL. Potential role of the gut/liver/lung axis in alcohol-induced tissue pathology. *Biomolecule*. 2015; 5(4):2477-2503.
124. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Investig*. 2012; 122(8): 2731-2740.
125. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019 Mar 14;5(1).
126. Maynard RL, Downes N. *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research*. Academic Press, 2019.

127. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J.* 2016;15:817.
128. Michael AM, Zemans RL, Zimmerman GA, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5:18.
129. Moawad RS, Hegab AS, Barey MAE, Sabry RM. Prenatal development of the liver in albino rat. *Brit J Sci.* 2014;1:1–20.
130. Moriles K, Azer S. Alanine Amino Transferase. *StatPearls.* 2022.
131. Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, Kissenpfennig A, McAuley DF, O'Kane CM, et al. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Nov 15;196(10):1275-1286.
132. Mou X, Lin J, Chen J, Li Y, Wu X, Xiang B, et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* 2013 Nov;14(11):961– 72.
133. Mouton AJ, Li X, Hall ME, Hall JE. Obesity, Hypertension, and Cardiac Dysfunction: Novel Roles of Immunometabolism in Macrophage Activation and Inflammation. *Circulation research.* 2020 Mar 13;126(6):789–806
134. Mukherjee S, Hanidziar D. More of the Gut in the Lung: How Two Microbiomes Meet in ARDS. *Yale J Biol Med.* 2018 Jun 28;91(2):143-149.
135. Nafady AM, Ahmed OB, Ghafeer HH. Scanning and transmission electron microscopy of the cells forming the hepatic sinusoidal wall of rat in acetaminophen- and Escherichia coli endotoxin-induced hepatotoxicity. *Journal of Microscopy and Ultrastructure.* 2017 Mar 1;5(1):21–7.
136. Nardo AD, Schneeweiss-Gleixner M, Bakail M, Dixon ED, Lax SF, Trauner M. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2021 Jan 1;41(1):20–32.
137. Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Yuyama K, Nakamura H, et al. Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells

Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. *Stem Cells International*. 2018 Dec 24;2018:1–15.

138. Paliogiannis P, Zinellu A. Bilirubin levels in patients with mild and severe Covid-19: A pooled analysis. *Liver Int*. 2020 Jul;40(7):1787-1788.

139. Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche JD, Combes A, Dreyfuss D, et al. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Annals of Intensive Care*. 2019 Jun 13;9(1)

140. Parasa S, Desai M, Thoguluva Chandrasekar V, Patel HK, Kennedy KF, Roesch T, Spadaccini M, Colombo M, Gabbiadini R, Artifon ELA, Repici A, Sharma P. Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Fecal Viral Shedding in Patients With Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2020 Jun 1;3(6):e2011335.

141. Park SJ, Kim HJ, Kim W, Kim OS, Lee S, Han SY, Jeong EJ, Park HS, Kim HW, Moon KS. Tumorigenicity Evaluation of Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells. *Toxicol Res*. 2016 Jul;32(3):251-8.

142. Parotto M, Herridge MS. Recovery after prolonged treatment in the

143. intensive care unit. *CMAJ*. 2020 30;192(48):E1637

144. Parotto M, Myatra SN, Munblit D, Elhazmi A, Ranzani OT, Herridge MS. Recovery after prolonged ICU treatment in patients with COVID-19. *Lancet Respir Med*. 2021;9(8):812-814.

145. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(3):181–94.

146. Prakash MD, Miller S, Randall-Demllo S, Nurgali K. Mesenchymal stem cell treatment of inflammation-induced cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2016; 22(11):2694-2703.

147. Qing, J., Zhang, Z., Novák, P., Zhao, G., & Yin, K. Mitochondrial metabolism in regulating macrophage polarization: an emerging regulator of

metabolic inflammatory diseases. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2020, 52.9: 917-926.

148. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Definition Task Force ARDS. Acute respiratory distress syndrome. *Jama*, 2012; 307(23): 2526-2533.

149. Redko O, Dovhalyuk A, Dovbush A, Nebesna Z, Yakubyshtyna L, Krynytska I. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stem cells therapy for liver failure. *Cell Organ Transpl.* 2021;9(2):136-142.

150. Redko O, Dovgalyuk A, Nebesna Z, Kramar S, Sverstyuk A, Korda M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells mitigate lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(1):34-45.

151. Redko O, Dovgalyuk A, Kramar S, Ohinska N, Nebesna Z, Korda M. Mesenchymal stem cell therapy modulates macrophage dynamics in ARDS-associated liver injury in rats. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(2):114-121.

152. Redko O, Dovhaliuk B, Sakovets A. Histological analysis of mesenchymal stem cell therapy efficacy for liver injury in rat model of acute respiratory distress syndrome. 5th RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences; 2023 Apr 20 — 21; Budapest, Hungary. Budapest; 2023, p. 52.

153. Redko O., Dovgalyuk A., Kramar S., Korda M. M1-M2 macrophage shift in the liver of rats with simulated ARDS: impact of MSC therapy. В: Матеріали XI наукового симпозиуму з міжнародною участю Імунопатологія при захворюваннях органів дихання і травлення; 2023 Жовт. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с.40-43.

154. Ren M Jie L, Jun S, Subrata G, Liang-Ru Z, Hong Y, et al. Implications of COVID-19 for patients with pre-existing digestive diseases. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. 2020 May 1;5(5):425–7.

155. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW; the Northwell COVID-19 Research Consortium; Barnaby DP, Becker LB, Chelico JD, Cohen SL, Cookingham J, Coppa K, Diefenbach MA, Dominello AJ, Duer-Hefele J, Falzon L, Gitlin J, Hajizadeh N, Harvin TG, Hirschwerk DA, Kim EJ, Kozel ZM, Marrast LM, Mogavero JN, Osorio GA, Qiu M, Zanos TP. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*. 2020 May 26;323(20):2052-2059.
156. Rice TW, Janz DR. In Defense of Evidence-based Medicine for the Treatment of COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann Am Thorac Soc*. 2020 Jul;17(7):787-789.
157. Ridruejo E, Soza A. The liver in times of COVID-19: What hepatologists should know. *Annals of hepatology*. 2020;19(4):353-358.
158. Rong X, Liu J, Yao X, Jiang T, Wang Y, Xie F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019 Mar 18;10(1).
159. Roos AB, Berg T, Ahlgren KM, Grunewald J, Nord M. A Method for Generating Pulmonary Neutrophilia Using Aerosolized Lipopolysaccharide. *Journal of Visualized Experiments*. 2014 Dec 15;(94).
160. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014; 4:177-197.
161. Salama H, Zekri AR, Medhat E, et al. Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV-positive patients with end-stage liver disease. *Stem Cell Res Ther*. 2014; 5:70.
162. Salomone F, Barbagallo I, Puzzo L, Piazza C, Li Volti G. Efficacy of adipose tissue-mesenchymal stem cell transplantation in rats with acetaminophen liver injury. *Stem Cell Research*. 2013 Nov;11(3):1037-44.

163. Sato K, Hall C, Glaser S, Francis H, Meng F, Alpini G. Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury. *The American Journal of Pathology*. 2016 Sep;186(9):2238–47.
164. Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*. 2015 Oct;67(5):793-807.
165. Shi D, Xin J, Lu Y, Ding W, Jiang J, Zhou Q, et al. Transcriptome Profiling Reveals Distinct Phenotype of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-derived Hepatocyte-like cells. *International Journal of Medical Sciences*. 2020 Jan 1;17(2):263–73.
166. Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014 Dec;3(6):386- 406.
167. Sonzogni A, Previtali G, Seghezzi M, Grazia Alessio M, Gianatti A, Licini L, et al. Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations. *Liver International*. 2020 Jul 20;40(9):2110–6.
168. Stan FG. Comparative Study of the Liver Anatomy in the Rat, Rabbit, Guinea Pig and Chinchilla. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 2018, 75.1.
169. Suk KT, Yoon JH, Kim MY, et al. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology*. 2016; 64:2185-2197.
170. Sun X, Wang T, Cai D, Hu Z, Chen J, Liao H, Zhi L, Wei H, Zhang Z, Qiu Y, Wang J, Wang A. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020 Jun;53:38-42.
171. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2017 Jun;66(6):1300–12.

172. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Frontiers in Immunology*. 2020 Jul 10;11.
173. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodriguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, et al. Comparison of the Berlin Definition for Acute Respiratory Distress Syndrome with Autopsy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013 Apr;187(7):761–7.
174. Thille AW, Muller G, Gacouin A, Coudroy R, Decavèle M, Sonnevile R, et al. Effect of Postextubation High-Flow Nasal Oxygen With Noninvasive Ventilation vs High-Flow Nasal Oxygen Alone on Reintubation Among Patients at High Risk of Extubation Failure. *JAMA*. 2019 Oct 15;322(15):1465.
175. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. Drazen JM, editor. *New England Journal of Medicine*. 2017 Aug 10;377(6):562–72.
176. Tonelli R, Andreani A, Castaniere I, Fantini R, Mengoli C, Rossi G, et al. When Acute Respiratory Distress Syndrome is not ARDS. *Lung*. 2016;194(5):865-6.
177. Treuting, P. M., Dintzis, S., & Montine, K. S. (Eds.). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*. Academic Press, 2017.
178. Tsai TH, Chen E, Li L, Saha P, Lee HJ, Huang LS, Shelness GS, Chan L, Chang BH. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy*. 2017 Jul 3;13(7):1130-1144.
179. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018 Jan 17;19(4):213–28.
180. Vdoviaková K, Vdoviaková K, Petrovová E, Krešáková L, Maloveská M, Teleky J, Jenčová J, Živčák J, Jenča A Jr. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Med Sci Monit*. 2016 Dec 2;22:4716-4728.

181. Vieillard-Baron A, Naeije R, Haddad F, Bogaard HJ, Bull TM, Fletcher N, Lahm T, Magder S, Orde S, Schmidt G, Pinsky MR. Diagnostic workup, etiologies and management of acute right ventricle failure : A state- of-the-art paper. *Intensive Care Med.* 2018 Jun;44(6):774-790.
182. Villar J, Ariff S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and Neonatal Morbidity and Mortality Among Pregnant Women With and Without COVID-19 Infection. *JAMA Pediatrics.* 2021 Apr 22;175(8).
183. Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise Review: Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Liver Failure and Cirrhosis. *STEM CELLS.* 2014 Oct 14;32(11):2818–23.
184. Wang CH, Chen CY, Wang KH, Kao AP, Chen YJ, Lin P, et al. Comparing the Therapeutic Mechanism and Immune Response of Human and Mouse Mesenchymal Stem Cells in Immunocompetent Mice With Acute Liver Failure. *Stem Cells Translational Medicine.* 2023 Jan 1;12(1):39–53.
185. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020; 323:1061-1069.
186. Wang J, Cen P, Chen J, Fan L, Li J, Cao H, et al. Role of mesenchymal stem cells, their derived factors, and extracellular vesicles in liver failure. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8:137.
187. Wang J, Zhu L, Xue L, Liu L, Yan X, Yan X, et al. Risk factors of liver injury in patients with coronavirus disease 2019 in Jiangsu, China: A retrospective, multi center study. *Journal of Medical Virology.* 2021;93(6):3305-3311.
188. Wang L, Han Q, Chen H, et al. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with UDCA-resistant primary biliary cirrhosis. *Stem Cells Dev.* 2014;23:2482-2489.
189. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. *Stem Cells Int.* 2018;2018:3057624.

190. Wang YH, Wu DB, Chen B, Chen EQ, Tang H. Progress in mesenchymal stem cell-based therapy for acute liver failure. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018 Aug 24;9(1).
191. Wang Y, Liu S, Liu H, Li W, Lin F, Jiang L, Li X, Xu P, Zhang L, Zhao L, Cao Y, Kang J, Yang J, Li L, Liu X, Li Y, Nie R, Mu J, Lu F, Zhao S, Lu J, Zhao J. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol*. 2020 Oct;73(4):807-816.
192. Wang Y, Lu F, Zhao J. Reply to: Correspondence relating to “SARSCoV- 2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19”. *J Hepatol*. 2020.
193. Waseem N, Chen P-H. Hypoxic Hepatitis: A Review and Clinical Update. *J Clin Transl Hepatol*. 2016; 4:263-268.
194. Weiskirchen R, Tacke F. Liver Fibrosis: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Digestive Diseases*. 2016;34(4):410–22.
195. Xie F, Dong J, Zhu Y, Wang K, Liu X, Chen D, et al. HIF1a Inhibitor Rescues Acute-on-Chronic Liver Failure. *Annals of Hepatology*. 2019 Sep 1;18(5):757–64.
196. Xie H, Zhao J, Lian N, Lin S, Xie Q, Zhuo H. Clinical characteristics of non ICU hospitalized patients with coronavirus disease 2019 and liver injury: a retrospective study. *Liver Int*. 2020;40:1321-1326
197. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 Dec;11(1).
198. Xu L, Gong Y, Wang B, et al. Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29:1620-1628.
199. Xu Q, Guo J, Li X, Wang Y, Wang D, Xiao K, et al. Necroptosis Underlies Hepatic Damage in a Piglet Model of Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. *Frontiers in Immunology*. 2021 Mar 12;12.

200. Xuan J, Wang F, An ZT, Yang J, Xu HB, Li J, et al. Anti-TGF β -1 receptor inhibitor mediates the efficacy of the human umbilical cord mesenchymal stem cells against liver fibrosis through TGF β -1/Smad pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017 Feb 8;429(1-2):113–22.
201. Yadav DK, Singh A, Zhang Q, Bai X, Zhang W, Yadav RK, Singh A, Zhiwei L, Adhikari VP, Liang T. Involvement of liver in COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2021 Apr;70(4):807-809.
202. Yang N, Ma W, Ke Y, Liu H, Chu J, Sun L, Zhang C, Lin R. Transplantation of adipose-derived stem cells ameliorates *Echinococcus multilocularis*-induced liver fibrosis in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2022 Jan;16(1):e0010175.
203. Yang P, Formanek P, Scaglione S, Afshar M. Risk factors and outcomes of acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with cirrhosis. *Hepatol Res*. 2019; 49(3):335-343.
204. Yang W, Hao Y, Hou W, Fang X, Fang P, Jiang T, et al. Jieduan-Niwan Formula Reduces Liver Apoptosis in a Rat Model of Acute-on-Chronic Liver Failure by Regulating the E2F1-Mediated Intrinsic Apoptosis Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2019 Nov 11;2019:1–11.
205. Yang Y, Zhao Y, Zhang L, Zhang F, Li L. The Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Liver Diseases: Mechanism, Efficacy, and Safety Issues. *Front Med (Lausanne)*. 2021 May 31;8:655268.
206. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *Journal of Infection*. 2020 Apr;80(6).
207. Yin L, Zhu Y, Yang J, Ni Y, Zhou Z, Chen Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Rep Med*. 2015, 11(3):1722-1732.
208. Young RP, Hopkins RJ, Marsland B. The gut–liver–lung axis. Modulation of the innate immune response and its possible role in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016; 54(2):161- 169.

209. Yu Z, Wu F, Tian J, Guo X, An R, Guo Y. Ammonium glycyrrhizin counteracts liver injury caused by lipopolysaccharide/amoxicillin-clavulanate potassium. *Oncotarget*. 2017 May 30;8(57).
210. Zarrabi M, Mousavi SH, Abroun S, Sadeghi B. Potential uses for cord blood mesenchymal stem cells. *Cell J*. 2014 Winter;15(4):274-81.
211. Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;5(5):428-430.
212. Zhang L, Wang X, Chen S, Wang S, Tu Z, Zhang G, et al. Medium-Chain Triglycerides Attenuate Liver Injury in Lipopolysaccharide-Challenged Pigs by Inhibiting Necroptotic and Inflammatory Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Nov 1;19(11):3697.
213. Zhang S, Yang Y, Fan L, Zhang F, Li L. The clinical application of mesenchymal stem cells in liver disease: the current situation and potential future. *Annals of Translational Medicine*. 2020 Apr;8(8):565–5.
214. Zhang Y, Zheng L, Liu L, Zhao M, Xiao J, Zhao Q. Liver impairment in COVID-19 patients: a retrospective analysis of 115 cases from a single center in Wuhan city, China. *Liver International*. 2020 Apr 2;
215. Zhang Y, Li Y, Li W, Cai J, Yue M, Jiang L, et al. Therapeutic Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells at Various Passages on Acute Liver Failure in Rats. *Stem Cells International*. 2018 Nov 14;2018:e7159465.
216. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020 Jan 24;382(8).
217. Zu ZY, Jiang MD, Xu PP, Chen W, Ni QQ, Lu GM, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A perspective from China. *Radiology*. 2020

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Redko O, Dovhalyuk A, Dovbush A, Nebesna Z, Yakubyshyna L, Krynytska I. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stem cells therapy for liver failure. *Cell Organ Transpl.* 2021;9(2):136-142. DOI: 10.22494/cot.v9i2.130
2. Редько ОС, Довгальок АІ. Морфологічні зміни печінки щура при гострому респіраторному дистрес-синдромі у різні терміни експерименту. *Вісник медичних і біологічних досліджень.* 2022;(4):52–57. DOI: 10.11603/bmbr.2706- 6290.2022.4.13317
3. Redko O, Dovgalyuk A, Nebesna Z, Kramar S, Sverstyuk A, Korda M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells mitigate lipopolysaccharide- induced liver injury in rats. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(1):34-45. Q4. DOI: 10.22494/cot.v11i1.148
4. Редько О, Довгальок А. Ультроструктурні зміни печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом та після корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами у ранні терміни експерименту. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* 2023;22(3):84–90. DOI: 10.24061/1727-0847.22.3.2023.34
5. Redko O, Dovgalyuk A, Kramar S, Ohinska N, Nebesna Z, Korda M. Mesenchymal stem cell therapy modulates macrophage dynamics in ARDS-associated liver injury in rats. *Cell Organ Transpl.* 2023;11(2):114-121. Q4. DOI: 10.22494/cot.v11i2.157
6. Палій І, Загричук Ю, Редько О. Аналіз ростових властивостей та каріотипу стовбурових клітин пуповини щурів. В: *Матеріали XXV міжнародного медичного конгрес студентів та молодих вчених; 2021 Квіт. 12-14; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с. 285-286.*

7. Редько ОС, Довгальок АІ, Палій ІР. Підбір моделі ГРДС для вивчення ефективності методів корекції важких станів при COVID-19. В: Матеріали XXI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 35-ій річниці Чорнобильської катастрофи Довкілля і здоров'я; 2021 Квіт. 22-24; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2021, с. 51-53.

8. Редько ОС, Довгальок АІ, Крамар СБ. Гістологічні зміни печінки щура при експериментальному гострому респіраторному дистрес-синдромі. В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю від дня народження професорки Вікторії Антонівни Малішевської Прикладні питання сучасної морфології; 2022 Берез. 23-24; Чернівці. Чернівці; 2022, с. 97-100.

9. Dovgalyuk A, Redko O, Dovbush A, Kramar S, Sverstyuk A. The effect of MMSCs on the cytokine profile in the lungs of rats with simulated ARDS. 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences; 2022 Apr 7-8; Prague, Czech Republic. Prague; 2022, p. 115.

10. Редько О, Тесля В, Поліщук Н. Мікроскопічний стан печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом у пізні терміни експерименту. В: Матеріали XXVI міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2022, с. 220.

11. Редько О, Довгальок Б, Саковець А. Імуногістохімічне виявлення TGF- β у тканинах печінки щурів при змодельованому гострому респіраторному дистрес-синдромі та його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. В: Матеріали XXVII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2023 Квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с. 282.

12. Redko O, Dovhaliuk B, Sakovets A. Histological analysis of mesenchymal stem cell therapy efficacy for liver injury in rat model of acute respiratory distress syndrome. 5th RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences; 2023 Apr 20-21; Budapest, Hungary. Budapest; 2023, p. 52.

13. Редько ОС, Крамар СБ, Андрієшин ОП. Імуногістохімічне виявлення CD68 у тканинах печінки щурів при змодельованому гострому респіраторному дистрес-синдромі та його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами. В: Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої пам'яті члена- кореспондента НАМН України д. мед. н. професора Ю. Б. Чайковського Тканинні реакції в нормі експерименті та клініці; 2023 Черв. 8-9; Київ. Київ; 2023, с. 137.

14. Редько ОС, Довгальок АІ, Крамар СБ, Довбуш АВ. Застосування мезенхімальних стовбурових клітин для корекції ураження печінки у щурів, викликаного гострим респіраторним дистрес-синдромом. В: Матеріали підсумкової LXVI науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2023 Черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с. 136-137.

15. Redko O., Dovgalyuk A., Kramar S., Korda M. M1-M2 macrophage shift in the liver of rats with simulated ARDS: impact of MSC therapy. В: Матеріали XI наукового симпозиуму з міжнародною участю Імунопатологія при захворюваннях органів дихання і травлення; 2023 Жовт. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023, с.40-43.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- XXI Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Довкілля і здоров'я», присвячена 35-ій річниці Чорнобильської катастрофи (м. Тернопіль, 22–24 квітня 2021 р.) *(публікація)*;
- XXV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 12-14 квітня 2021 р.) *(публікація)*;
- Науково-практична конференція з міжнародною участю «Прикладні питання сучасної морфології», присвячена 100- річчю від дня народження професорки Вікторії Антонівни Малішевської (м. Чернівці, 23-24 березня 2022 р.) *(публікація)*;
- 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (Чехія, Прага, 7-8 квітня 2022 р.) *(публікація)*;
- XXVI Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 13-15 квітня 2022 р.) *(публікація)*;
- XXVII Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 10-12 квітня 2023 р.) *(публікація та усна доповідь)*;
- 5th RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (Угорщина, Будапешт, 20 — 21 квітня 2023 р.) *(публікація та усна доповідь)*;
- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Тканинні реакції в нормі експерименті та клініці», присвячена пам'яті члена-кореспондента НАМН України д. мед. н. професора Ю. Б. Чайковського (м. Київ, 8 – 9 червня 2023 р.) *(публікація)*;
- Підсумкова LXVI науково-практична конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 16-17 червня 2023 р.) *(публікація та стендова доповідь)*;

- XI науковий симпозіум з міжнародною участю "Імунопатологія при захворюваннях органів дихання і травлення" (м. Тернопіль, 12-13 жовтня 2023 р.) *(публікація)*.

ДОДАТОК В.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені

І. Я. Горбачевського МОЗ України

проф., докт. біол. наук Іван КлішСверстюк 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали дисертаційної роботи «Морфо-функціональний стан печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі та за умов його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами».
2. **Установа розробника, автор:** заклад вищої освіти Тернопільський національний медичний університет, кафедра гістології, цитології та ембріології, аспірантка кафедри Редько Олеся Сергіївна.
3. **Джерело інформації:**
 1. Redko O., Dovgalyuk A., Dovbush A., Nebesna Z., Yakubyshyna L., Krynytska I. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stem cells therapy for liver failure. Cell Organ Transpl. 2021. Vol. 9, № 2. P. 136-142. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v9i2.130>
 2. Редько О.С., Довгалюк А.І. Морфологічні зміни печінки щура при гострому респіраторному дистрес-синдромі у різні терміни експерименту. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2022; № 4. С. 52–57. <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2022.4.13317>
 3. Redko O., Dovgalyuk A., Kramar S., Nebesna Z., Sverstyuk A., Korda M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells mitigate LPS-induced liver injury in rats. Cell Organ Transpl. 2023; 11(1): 34-45. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v11i1.148>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** у навчальну роботу кафедри гістології та ембріології, в матеріали лекцій та практичних занять, у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** вересень 2023 року – листопад 2023 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
8. **Затверджено на засіданні кафедри** 29.08. 2023 (протокол № 7).

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри гістології та ембріології
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
доктор біологічних наук, професор

Зоя Небесна

ДОДАТОК В.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з наукової
роботи Тернопільського національного
медичного університету імені

Я. Горбачевського МОЗ України
проф., докт. біол. наук **Іван Кліш**

2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи «Морфо-функціональний стан печінки при гострому респіраторному дистрес-синдромі та за умов його корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами».

2. Установа розробника, автор: заклад вищої освіти Тернопільський національний медичний університет, кафедра гістології, цитології та ембріології, аспірантка кафедри Редько Олеся Сергіївна.

3. Джерело інформації:

1. Redko O., Dovgalyuk A., Dovbush A., Nebesna Z., Yakubyshyna L., Krynytska I. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stem cells therapy for liver failure. Cell Organ Transpl. 2021. Vol. 9, № 2. P. 136-142. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v9i2.130>

2. Редько О.С., Довгалюк А.І. Морфологічні зміни печінки щура при гострому респіраторному дистрес-синдромі у різні терміни експерименту. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2022; № 4, С. 52–57. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2022.4.13317

3. Redko O., Dovgalyuk A., Kramar S., Nebesna Z., Sverstyuk A., Korda M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells mitigate LPS-induced liver injury in rats. Cell Organ Transpl. 2023; 11(1): 34-45. DOI: 10.22494/cot.v11i1.148

4. Редько Олеся, Довгалюк Аліна. Ультраструктурні зміни печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом та після корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами у ранні терміни експерименту. Клінічна анатомія та оперативна хірургія, 2023, 22.3: 84-90. DOI: 10.24061/1727-0847.22.3.2023.34

5. Redko O, Dovgalyuk A, Kramar S, Ohinska N, Nebesna Z, Korda M. Mesenchymal stem cell therapy modulates macrophage dynamics in ARDS-associated liver injury in rats. Cell Organ Transpl. 2023; 11(2): 114-121. DOI: 10.22494/cot.v11i2.157

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.

5. Форма впровадження: у навчальну роботу кафедри патологічної фізіології, в матеріали лекцій та практичних занять, у науково-дослідну роботу кафедри.

6. Термін впровадження: грудень 2023 року – січень 2024 року.

7. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

8. Затверджено на засіданні кафедри 12 січня 2024 (протокол № 1).

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри патологічної фізіології
Тернопільського національного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
доктор медичних наук, професор


Ольга Денефіль