

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н.
КАРАЗІНА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА Молекулярної біології та біотехнології

Дослідження тропності вітаміну А до печінки на різних стадіях
формування Си-індукованого фіброзу

Допущена до захисту
«___» _____ 2024 р.
Зав. кафедрою

_____ Божков А.І.

Оцінка «_____»
Голова ЕК

підпис прізвище, ініціали

МП
«___» _____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота
виконана студенткою 4 курсу
заочної форми навчання
групи БЗБТ-41
Бабенко Евеліни Олегівни

Науковий керівник:
завідувач кафедри
молекулярної біології і
біотехнології, д.б.н., професор
Божков Анатолій Іванович
Науковий консультант:
Акжигітов Рустам Анвярович

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Об'єкт дослідження – модель Cu-індукованого фіброзу печінки.

Предмет дослідження – вплив вітаміну А на різних стадіях Cu-індукованого фіброзу печінки тварин.

Мета дослідження – Дослідити потенційну роль вітаміну А у запобіганні розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки на різних стадіях його формування.

Методи – Експерименти проводили на статевозрілих 3-х місячних самцях пацюків лінії Вістар (Wistar). Всі процедури з тваринами виконувалися з дотриманням біоетичних правил і з урахуванням циркадних ритмів формування 20 біологічних відповідей. У кожній групі було по 4-6 тварин. Всього було 5 експериментальних груп: 1 – інтактні тварини (контроль); 2 – тварини, що отримували per os масляний розчин ретинолу ацетату (0,1 мг/100 г маси тіла); 3 – тварини, що отримували серію введеннь сірчаноокислої міді (1 г/100г маси тіла) з інтервалом 48 годин, потім чотири дні або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); 4 – тварини, що отримували дві серії сірчаноокислої міді, потім чотири дні або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); 5 – тварини, що отримували дві серії введення сірчаноокислої міді, між якими вводили масляний розчин CCl_4 per os (0,1 мл/100 г маси тіла), потім чотири дні або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла). Через 24 години після останнього ведення тварини виводилися з експерименту шляхом декапітації.

Контролювали динаміку маси тіла, визначали вміст вітаміну А в печінці у тварин з Cu-індукованим фіброзом.

Ключові слова: Cu-індукований фіброз печінки, характеристики фіброзу, вітамін А, хлорогенова кислота, роль вітаміну А в фіброзі.

Роботу викладено на 47 с. друкованого тексту, ілюстровано 3 таблицями, 4 рисунками. Використано 58 джерел літератури, з яких 7 українських, інші - іншомовні.

SUMMARY

Object of study - morphofunctional parameters of rat liver preparations.

Subject of the study - the effect of vitamin A at different stages of Cu-induced liver fibrosis in animals.

Purpose of the study - to investigate the potential role of vitamin A in preventing the development of Cu-induced liver fibrosis at different stages of its formation.

Methods - The experiments were performed on sexually mature 3-month-old male Wistar rats. All procedures with animals were performed in compliance with bioethical rules and taking into account the circadian rhythms of formation of 20 biological responses. There were 4-6 animals in each group. There were 5 experimental groups in total: 1 - intact animals (control); 2 - animals receiving per os retinol acetate oil solution (0.1 mg/100 g body weight); 3 - animals receiving a series of injections of copper sulfate (1 g/100 g body weight) with an interval of 48 hours, then four days of either oil (control) or retinol acetate oil solution per os (0.1 mg/100 g body weight); 4 - animals receiving two series of copper sulfate, then four days of either oil (control) or retinol acetate oil solution per os (0.1 mg/100 g body weight); 5 - animals that received two series of copper sulfate administration, followed by an oil solution of CCl₄ per os (0.1 ml/100 g body weight), then four days of either oil (control) or an oil solution of retinol acetate per os (0.1 mg/100 g body weight). Twenty-four hours after the last treatment, the animals were withdrawn from the experiment by decapitation. The dynamics of body weight was monitored, and the content of vitamin A in the liver was determined in animals with Cu-induced fibrosis.

Keywords: Cu-induced liver fibrosis, characteristics of fibrosis, vitamin A, chlorogenic acid, role of vitamin A in fibrosis.

The work is presented on 47 pages of printed text, illustrated with 3 tables and 4 figures. The article uses 58 sources of literature, 7 of which are Ukrainian, the rest are foreign.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СПЕЦІАЛЬНИХ ТЕРМІНІВ	7
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Загальні уявлення і методи діагностики фіброзу печінки ...	11
1.1.1. Загальні відомості про фіброз печінки	11
1.1.2. Характеристика стадій розвитку фіброзу печінки	13
1.1.3. Існуючі методи діагностики фіброзу печінки.....	15
1.1.3.1. Біопсія як метод в дослідженні фіброзу печінки ...	16
1.1.3.2. Неінвазивні методи діагностики фіброза печінки ..	18
1.1.4. Роль сполучної тканини в розвитку фіброзу, його особливості на різних стадіях фіброзу печінки	20
1.2. Роль, вміст і метаболізм вітаміну А в контексті печінкового фіброзу	22
1.2.1. Роль вітаміну А в розвитку печінки	22
1.2.2. Вміст вітаміну А в печінці, яка знаходиться на різних стадіях розвитку фіброзу	24
1.2.3. Метаболізм вітаміну А в зірчастих клітинах	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Експериментальна схема підготовки тварин та забір біологічного матеріалу	27

2.2. Препаративні та аналітичні методи	28
2.2.1. Розведення розчину сірчаноокислої міді	28
2.2.2. Розведення розчину тетрахлорометану	28
2.2.3. Визначення вітаміну А	29
2.3. Статистичні методи	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Динаміка маси тіла щурів з Си-індукованим фіброзом.....	30
3.2. Кількість вітаміну А в печінці пацюків з Си-індукованим фіброзом	35
3.3. Підсумок	38
ВИСНОВКИ	40
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СПЕЦІАЛЬНИХ ТЕРМІНІВ

aHSC	Активовані зірчасті клітини печінки (activated Hepatic Stellate Cells)
ACT	Аспартатамінотрансфераза
ALT	Аланінамінотрансфераза
CCl ₄	Тетрахлорметан (Carbon Tetrachloride)
ECM	Позаклітинна матриця (Extracellular Matrix)
ЕЦМ	Екстрацелюлярний матрикс
ГК	Гіалуронова кислота
HBV	Вірус гепатиту В (Hepatitis B Virus)
HCV	Вірус гепатиту С (Hepatitis C Virus)
КТ	Комп'ютерна томографія
MPT	Магнітно-резонансна томографія
MRE	Магнітно-резонансна еластографія
PDGF	Тромбоцитарний фактор росту (Platelet-Derived Growth Factor)
ПМ	Позаклітинний матрикс
ПСЛ	Перисинусоїдальні ліпоцити
qHSC	Квазі-зірчасті клітини печінки (quiescent Hepatic Stellate Cells)

РСБ	Ретинолзв'язуючий білок
TGF β	Трансформуючий фактор росту β (Transforming Growth Factor β)
УЕП	Ультразвукова еластометрія печінки
ЗКП	Зірчасті клітини печінки

ВСТУП

Актуальність роботи. Дослідження тропності вітаміну А до печінки на різних стадіях формування Cu-індукованого фіброзу є актуальною темою з кількох важливих причин. Фіброз печінки, зокрема той, що індукований токсичними речовинами, як мідний купорос (CuSO_4), є серйозним медичним станом. Захворювання печінки, такі як цироз і хронічний гепатит, залишаються однією з провідних причин смертності в усьому світі. Розуміння механізмів фіброзу та потенційних методів його лікування є критично важливим для розробки ефективних терапій.

Вітамін А є ключовим компонентом, який впливає на функціонування печінки. Він бере участь у регуляції імунної відповіді, рості клітин, і підтриманні епітеліальних бар'єрів. Дослідження його тропності (селективної дії) до печінкової тканини може відкрити нові можливості для терапевтичного використання цього вітаміну у лікуванні печінкових захворювань. Останні дослідження показують, що фіброз печінки може бути зворотним процесом. Вивчення дії вітаміну А на різних стадіях фіброзу може допомогти визначити оптимальні часи для втручання і розробити стратегії для реверсії фіброзних змін у печінці.

В умовах зростаючого техногенного забруднення проблема інтоксикації важкими металами, такими як мідь, стає все більш актуальною. Знання про те, як вітамін А може модулювати пошкодження печінки, викликане важкими металами, має важливе значення для охорони здоров'я. Вивчення механізмів дії вітаміну А може сприяти розробці нових фармакологічних засобів для лікування печінкових захворювань. Це може включати створення нових препаратів або оптимізацію існуючих терапій, щоб підвищити їх ефективність і безпеку.

Дослідження тропності вітаміну А сприяє інноваціям у галузі біомедичних досліджень, включаючи розробку нових моделей для вивчення печінкових захворювань, удосконалення методів дослідження та аналізу, а також підвищення точності діагностики і прогнозування результатів лікування. Таким чином, вивчення тропності вітаміну А до печінки у контексті Си-індукованого фіброзу є важливим кроком у розумінні і лікуванні печінкових захворювань, що має потенціал значно покращити якість життя пацієнтів і сприяти розвитку медичної науки.

Мета дослідження: Дослідити потенційну роль вітаміну А у запобіганні розвитку Си-індукованого фіброзу печінки на різних стадіях його формування.

Завдання дослідження:

1. Дослідити динаміку маси тіла пацюків з Си-індукованим фіброзом печінки.
2. Дослідити динаміку маси тіла пацюків з Си-індукованим фіброзом печінки та введенням вітаміну А фіброзу при введенні ретинолу ацетату.
3. Дослідити кількість вітаміну А в печінці у пацюків на різних стадіях Си-індукованого фіброзу.
4. Дослідити вплив вітаміну А у пацюків на різних стадіях Си-індукованого фіброзу при введенні ретинол ацетату.

Наукова новизна. Було досліджено вплив вітаміну А на фізіологічні прояви при різних стадіях Си-індукованого фіброзу.

Практичне значення. Багато робіт показують, що вітамін А є важливим компонентом у тварин, і бере участь у різних реакціях, у тому числі в запальних процесах. Також відомо, що іони міді можуть призводити до фіброзу печінки, що супроводжується запальним процесом. У зв'язку з цим дослідження дії вітаміну А при моделі

купрум індукованого фіброзу печінки на різних стадіях є актуальним для пошуку способів лікування, запобігання фіброзу печінки.

Особистий внесок бакалавра. Самостійне опрацювання літературних джерел, статистична обробка результатів дослідження, написання кваліфікаційної роботи, проведення експериментів під наглядом наукового консультанту.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні уявлення і методи діагностики фіброзу печінки

1.1.1. Загальні відомості про фіброз печінки.

Фіброз печінки — це розростання сполучної тканини в печінці, яке відбувається при пошкодженні гепатоцитів вірусами гепатитів В, С, D, алкоголем, токсичними речовинами та іншими факторами. Цей процес є результатом хронічного запалення, яке призводить до активації зірчастих клітин печінки і продукції колагену та інших компонентів міжклітинного матриксу. Прогресування фіброзу печінки призводить до цирозу печінки, печінкової недостатності та портальної гіпертензії [1].

Багато десятиліть фіброз вважали незворотним процесом, що знижувало інтерес до ранньої діагностики, динамічного контролю і пошуку способів його лікування. Водночас помічено, що в разі усунення етіологічного фактора, таких як утримання від вживання алкоголю, успішна протівірусна терапія хронічної HCV (hepatitis C virus) або HBV (hepatitis B virus) інфекцій, імуносупресивна терапія аутоімунного гепатиту, кровопускання за гемохроматозу, застосування урсодезоксихолієвої кислоти в лікуванні первинного біліарного цирозу, — вдається досягти зворотного розвитку фіброзу або зменшити вираженість клінічних проявів цирозу печінки. Однак чим вираженіший фіброз або довше він існує, тим менше можливостей його корекції [1].

Таким чином, раннє виявлення й уточнення стадії фіброзу дає змогу вчасно розпочати терапію, спрямовану на зменшення темпів його прогресування, тобто провести своєчасну профілактику цирозу печінки. Це підкреслює важливість розробки та впровадження нових методів діагностики, які

можуть більш точно визначати стадії фіброзу на ранніх етапах, а також розширення досліджень у сфері регенеративної медицини та гепатології.

Останніми роками з'явилися нові підходи до лікування фіброзу печінки, включаючи використання антивірусних препаратів, антиоксидантів, інгібіторів колагенази та інших фармакологічних агентів, що можуть знижувати продукцію колагену або сприяти його розщепленню. Дослідження також фокусуються на можливостях використання вітаміну А та його похідних у терапії фіброзу печінки. Відомо, що вітамін А бере участь у регуляції клітинного зростання і диференціації, що може мати позитивний вплив на процеси регенерації печінкової тканини і зменшення фіброзу [2-3].

Крім того, актуальними є дослідження ролі зірчастих клітин у метаболізмі вітаміну А, оскільки ці клітини відіграють ключову роль у накопиченні та мобілізації ретиноїдів. Зміни у функції зірчастих клітин під час фіброзу можуть впливати на рівні вітаміну А в печінці і його доступність для регенеративних процесів. Це відкриває нові можливості для терапевтичних втручань, спрямованих на відновлення нормальної функції зірчастих клітин і корекцію дефіциту вітаміну А [3].

Окрім того, варто зазначити, що вітамін А має антиоксидантні властивості, що допомагає зменшувати оксидативний стрес, який відіграє важливу роль у розвитку фіброзу. Використання вітаміну А та його похідних може сприяти зниженню рівня оксидативного стресу та запалення, що, в свою чергу, може уповільнити або зупинити прогресування фіброзу.

Таким чином, поглиблене розуміння механізмів розвитку фіброзу печінки та ролі вітаміну А у цих процесах може привести до створення ефективніших стратегій для попередження і лікування цього серйозного стану. Інтеграція даних про біохімічні шляхи, генетичні фактори та клітинні механізми допоможе розробити інноваційні терапевтичні підходи, які

можуть забезпечити більш ефективне управління фіброзом печінки та поліпшення якості життя пацієнтів [4].

1.1.2. Характеристика стадій розвитку фіброзу печінки.

Фіброз печінки характеризується розростанням сполучної тканини в печінці внаслідок хронічного пошкодження гепатоцитів. Цей процес є поступовим і має декілька стадій, які визначаються ступенем ураження печінкової тканини. Стадії фіброзу печінки не часто можна визначити за одними лише симптомами, адже в більшості випадків фіброз тривалий час протікає безсимптомно[2].

Виділяють 5 стадій фіброзу печінки за шкалою METAVIR:

F0 - відсутність ознак фіброзу:

У цій стадії печінка є здоровою, без жодних ознак фіброзу. Структура і функція печінкової тканини не порушені.

F1 - початковий фіброз:

Зміни спостерігаються тільки в портальних і перипортальних ділянках без утворення септ. На цій стадії фіброзу симптоми практично відсутні, і захворювання можна визначити лише гістологічно.

F2 - помірний фіброз:

Портальний і перипортальний фіброз з утворенням септ. Як і при першій стадії, симптоми майже відсутні, і виявити фіброз можна тільки за допомогою гістологічного дослідження. На цій стадії можуть починати з'являтися незначні порушення функції печінки.

F3 - виражений фіброз:

Портальний і перипортальний фіброз із безліччю септ. Третя стадія зазвичай настає через 6-8 років після початкового ураження печінки. У цій стадії починають з'являтися перші симптоми: підвищена стомлюваність, сонливість, загальна слабкість, знижена працездатність, анемія, кровотечі та інші ознаки погіршення функції печінки.

F4 - цироз печінки:

Фіброз заміщує значну частину здорової паренхіми, утворюючи мостикові структури, які порушують архітектуру печінки. Ця стадія характеризується серйозними ураженнями функції печінки, які можуть призвести до печінкової недостатності та портальної гіпертензії. Симптоми можуть включати жовтяницю, асцит, варикозне розширення вен стравоходу, печінкову енцефалопатію та інші ускладнення, які становлять загрозу для життя пацієнта [3,4].

Окрім шкали METAVIR, існують інші системи класифікації фіброзу печінки, які також використовуються в клінічній практиці для оцінки ступеня фіброзу:

Шкала Ishak:

Ця шкала більш детально розглядає стадії фіброзу, розділяючи їх на 6 рівнів: від 0 до 6, де 0 - відсутність фіброзу, а 6 - виражений цироз. Шкала Ishak часто використовується в наукових дослідженнях через її детальність.

0 - Відсутність фіброзу.

1-2 - Мінімальний фіброз з незначними змінами в портальних зонах.

3-4 - Помірний фіброз із розширенням портальних зон і перипортальними септами.

5 - Виражений фіброз з утворенням мостикових септ між портальними зонами і центральними венами.

6 - Цироз із порушенням структури печінкової тканини [3,5].

Шкала Knodell (NAI - Hepatic Activity Index):

Ця шкала використовується для оцінки активності гепатиту і фіброзу.

Вона включає кілька компонентів, таких як некроз, запалення і фіброз, кожен з яких оцінюється окремо.

Фіброз оцінюється від 0 до 4:

0 - Відсутність фіброзу.

1 - Фіброз тільки в портальних зонах.

2 - Фіброз з незначним розширенням за межі портальних зон.

3 - Помірний фіброз з мостиковими септами.

4 - Важкий фіброз або цироз [4].

Ці стадії використовуються для класифікації та оцінки тяжкості фіброзу печінки, що є важливим для планування лікування та передбачення прогнозу для пацієнтів.

Класифікація стадій фіброзу печінки є важливою для оцінки тяжкості захворювання, планування лікування та прогнозу для пацієнтів. Визначення стадії фіброзу допомагає лікарям ухвалювати рішення щодо необхідності втручання та вибору оптимальних терапевтичних стратегій. Раннє виявлення і своєчасна терапія можуть зупинити прогресування фіброзу та запобігти розвитку цирозу і пов'язаних з ним ускладнень. Інтеграція даних різних класифікацій дозволяє більш точно оцінювати стан печінки і забезпечувати пацієнтів найкращим лікуванням.

1.1.3. Існуючі методи діагностики фіброзу печінки.

Тривалий час інформацію про тяжкість фіброзу отримували тільки за допомогою вивчення морфологічних змін тканини печінки, біопсії, яка й нині залишається "золотим стандартом" у діагностиці хронічних захворювань печінки. [5] Але зараз ще використовують еластографію з використанням ультразвуку, комп'ютерну томографію (КТ), магнітно-резонансну томографію (МРТ), сироваткові маркери, фіброеластографію печінки з використанням ядерного магнітного резонансу (МРЕ).

1.1.3.1. Біопсія як метод в дослідженні фіброзу печінки.

Біопсія дає змогу уточнити природу захворювання й активність печінкового процесу, судити про ефективність лікування, верифікувати об'ємні утворення, отримати дані про стан трансплантата печінки тощо. Біопсія, будучи «статичним», «застиглим» дослідженням, не дає змоги

повною мірою оцінити динаміку подій. [5] Судять про характер ураження печінки з використанням напівкількісних методів оцінки змін печінки [1] (табл. 1).

*Таблиця. 1.1. ШКАЛИ ПОЛУКОЛИЧНОЇ ОЦІНКИ ФІБРОЗУ
ДРУКУ*

Бали	Knodel R.G. <i>Knodel R.G. et al.</i> [6]	Scheuer P. J. <i>Scheuer P.J.</i>	Batts, K. P. <i>Batts KP, Ludwig J.</i> [8]	Ishak K.G. <i>Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al.</i> [9]	Bedossa P., Poynard T. METAVIR <i>Bedossa P., Poynard T.</i> [4]
0	Відсутнє	Відсутнє	Відсутнє	Відсутнє	Відсутнє
1	Розширення портальних трактів	Подовжені склерозовані портальні тракти	Портальний фіброз	Фіброзне розширення частини трактів з або без фіброзних септ	Розширення портальних трактів без утворення септ
2	-	Перипортальн і або порто- портальні септи без порушення будови органу	Фіброз з одиничними мостоподібни ми септами	Фіброзне розширення більшості трактів з або без фіброзних септ	Розширення портальних трактів з одиничними портально- портальними септами септ
3	Мостоподібний фіброз (порто- портальний або порто-центральный	Фіброз із порушенням будови органу, але без явного цирозу	Фіброз з безліччю мостоподібних септ	Фіброзне розширення більшості трактів з одиничними порто- портальними септами	Численні поро- портальні септи без цирозу

4	Цироз	Ймовірний чи певний цироз	Цироз	Фіброзне розширення більшості трактів з портопортальними і портоцентральноними септами	Цироз
5	-	-		Численні септи з одиничними вузлами (неповний цироз)	-
6	-	-		Цироз (імовірний або певний)	-

Існуючі нині системи оцінки стадій фіброзу є модифікаціями схеми Knodell. Найширшого поширення набула шкала, запропонована французькою групою METAVIR, що розмежовує стадії фіброзу незалежно від некротично-запальних змін. Більшість цих систем розроблено для вірусних гепатитів В і С [4].

Розбіжність в інтерпретації матеріалу, отриманого під час пункційної біопсії, зберігається і під час застосування комп'ютеризованих систем для оцінки вираженості фіброзу за аналізом електронного зображення гістологічного препарату [10].

У зв'язку із суб'єктивністю інтерпретації морфологічних результатів велике значення має кваліфікація морфологів. Часто спостерігаються відмінності в гістологічних висновках одного матеріалу двома різними патологами і навіть у разі повторного огляду одним і тим самим фахівцем. Як будь-яка інвазивна процедура, біопсія печінки супроводжується низкою ускладнень, розвиток яких залежить від досвіду лікаря, що виконує

процедуру, виду і кількості одномоментних біопсій, об'єму, отриманого зразка тощо [11]. Однак серйозні ускладнення, що потребують певних оперативних втручань, спостерігаються рідко (0,06-0,32 %) [12]. Летальність варіює від 0,01 до 0,1 % [13,14]. Саме інвазивність біопсії, ризик ускладнень визначає небажання пацієнтів піддаватися цій процедурі.

Проте біопсія залишається еталонним методом у діагностиці захворювань печінки. Зокрема, за допомогою молекулярно-біологічних тестів (ПЛР) отриманий матеріал можна досліджувати на предмет наявності РНК або ДНК вірусів гепатиту С і В, що особливо важливо за відсутності геному вірусів у крові на тлі змінених біохімічних показників.

1.1.3.2. Неінвазивні методи діагностики фіброза печінки.

Існуючі в даний час неінвазивні методи засновані на двох різних, але таких, що доповнюють один одного, підходах: "біологічному" підході — визначенні в сироватці маркерів фіброзу та "фізичному" — вимірі жорсткості печінки (непряма ультразвукова еластометрія, вимір швидкості кровотоку в портальній системі, магнітно-резонансна еластографія і т. д.). Однак найширшого поширення набули непряма ультразвукова еластометрія печінки (УЕП) і визначення сироваткових маркерів фіброзу. Їхні основні переваги полягають у простоті відтворення, швидкому отриманні результату, можливості простежити за динамікою процесу, зручності застосування як скринінгу, використання в амбулаторних умовах.

В основі "біологічного" підходу визначення ступеня фіброзу лежать методи виявлення сполук, зміни вмісту яких дають змогу побічно судити про процеси фіброгенезу та фібринолізу. Трасформувальний фактор росту, колаген IV типу, амінотермінальний пропептид III проколаген (Р III Р), гіалуронова кислота (ГК), матричні металопротеїнази, тканинні інгібітори матричних металопротеїназ належать до істинних або "прямих" маркерів фіброзу. Застосування істинних маркерів обмежене, оскільки вони

неспецифічні для печінкової тканини, відображають процеси в інших органах і системах. За наявності активного запального процесу в печінці можуть давати хибнопозитивний результат. Сурогатні маркери фіброзу досить просто визначити в рутинній клінічній практиці. До них належать кількість тромбоцитів, протромбіновий час, співвідношення АСТ/АЛТ тощо. Як поодинокі тести для діагностики або виключення цирозу печінки придатні як справжні, так і сурогатні маркери [15] Їх поєднання призвело до підвищення інформативності у визначенні окремих стадій фіброзу за рахунок збільшення специфічності. [16]

Слід зазначити, що ефективне використання сироваткових маркерів фіброзу в клінічній практиці дещо обмежене, оскільки результати можуть змінюватися за захворювань інших органів і систем, а також під впливом низки лікарських засобів [17,18].

Вимірювання щільності печінки, за допомогою ультразвукової еластометрії, інформативне на всіх стадіях фіброзу. Однак найточніше ультразвукова непряма еластометрія дає змогу діагностувати виражений фіброз і цироз печінки (чутливість і специфічність досягає 90 %) [19].Щодо розмежування мінімального фіброзу (F-0) та окремих його стадій цей метод має меншу чутливість. Імовірно, це пов'язано з відсутністю загальноприйнятих порогових значень. [20,21,22]

Для інтерпретації результатів непрямої ультразвукової еластометрії необхідно мати інформацію про етіологію захворювання печінки, спектр супутньої патології, основні лабораторні параметри (рівень трансаміназ, показники холестазу).

У зв'язку з поширенням магнітно-резонансних томографів вельми перспективним є магнітно-резонансна еластографія. В її основі лежить визначення і візуалізація акустичних хвиль, що генеруються передавачем і реєструються в тканині печінки. Значення щільності печінки відображаються у вигляді еластограм. Магнітно-резонансна еластографія

оцінює щільність печінки загалом, може визначати топографію розподілу фіброзної тканини та її відсоток відносно маси всього органа, здатна виявляти відмінності в щільності печінки в пацієнтів зі стадією фіброзу F0 у порівнянні зі здоровими добровольцями. Метод має високу чутливість і специфічність у діагностиці фіброзу.[23,24].

1.1.4. Роль сполучної тканини в розвитку фіброзу, його особливості на різних стадіях фіброзу печінки.

Сполучна тканина є одним з основних типів тканин у тілі людини і тварин, і вона відіграє важливу роль у підтримці та з'єднанні різних органів і тканин. Вона складається з міжклітинного матриксу, що містить волокна колагену, еластину та ретикуліну, а також з різних клітин, таких як фібробласти, макрофаги та міофібробласти.

Сполучна тканина відіграє ключову роль в розвитку фіброзу.

Зірчасті клітини печінки (ЗКП) - основні попередники міофіброblastів, які виробляють волокна позаклітинного матриксу (ПМ) під час формування фіброзу. Трансформуючий фактор росту β (TGF β) та тромбоцитарний фактор росту (PDGF) - два основні цитокіни, які ініціюють активацію та проліферацію ЗКП. [25,26]

У нормальних тканинах міофібробласти відсутні. Тимчасова активація міофіброblastів сприяє відновленню цілісності тканини після ушкодження шляхом утворення рубця, який зазвичай зменшується під час відновлення тканин - відбувається видалення міофіброblastів шляхом апоптозу або інактивації [27,28]. Натомість постійна активація міофіброblastів призводить до накопичення колагенового позаклітинного матриксу, що в кінцевому підсумку призводить до фіброзу.

Встановлено, що міофібробласти продукують компоненти сполучної тканини в нирках, легенях та печінці, будучи при цьому гетерогенною популяцією клітин. Походження міофіброblastів залежить від типу

ушкодженої тканини та характеру її ураження. Згідно з літературними даними, джерелами міофібробластів при фіброзі печінки можуть бути епітеліальні, мезенхімні, стромальні, мезотеліальні клітини, фіброцити, зірчасті клітини печінки та портальні фібробласти. [29]

Особливості сполучної тканини на різних стадіях фіброзу печінки:

- Ініціація фіброзу:

Початкова стадія розвитку фіброзу характеризується активацією гепатоцитів, які починають виділяти цитокіни та фактори росту. Ці сигнальні молекули стимулюють процес активації та проліферації фібробластів, а також синтез позаклітинної матриці (ЕСМ). Колагени, фібронектин та інші компоненти ЕСМ осідають у печінці, що призводить до утворення рубцевої тканини.

- Прогресія фіброзу:

На цій стадії фіброзу спостерігається посилене осідання колагену та інших компонентів ЕСМ, що призводить до збільшення товщини рубців та скорочення судинного простору печінки. Це може супроводжуватися дистрофією гепатоцитів та порушенням їх функцій.

- Цироз печінки:

Коли фіброз прогресує до стадії цирозу, спостерігається наявність обширних фібротичних змін, включаючи утворення сильно рубцевої тканини, обструкцію портальних судин та можливі регенеративні вузли. Це призводить до порушення структури та функцій печінки, що може призвести до розвитку ускладнень, таких як портальна гіпертензія, асцит, гепатична енцефалопатія та навіть рак печінки.

Розвиток фіброзу - це складний процес, в якому сполучна тканина та вітамін А відіграють ключову роль. Сполучна тканина, шляхом продукції екстрацелюлярного матриксу, формує основу фіброзу в органах, таких як печінка. З іншого боку, вітамін А здатний регулювати функції міофібробластів та мати протизапальні властивості, що впливає на розвиток

фіброзу. Взаємодія цих факторів визначає характер та тяжкість фіброзу, впливаючи на стан здоров'я організму.

1.2. Роль, вміст і метаболізм вітаміну А в контексті печінкового фіброзу

1.2.1. Роль вітаміну А в розвитку печінки.

Близько 80% вітаміну А та до 80% всіх ретиноїдів в організмі людини депоновано в жирових краплях ПСЛ (перисинусоїдальні ліпоцити). Ефіри ретинолу в складі хіломікронів потрапляють до гепатоцитів, де конвертуються в ретинол, утворюючи комплекс вітаміну А з ретинолзв'язуючим білком (РСБ), який виділяється в перисинусоїдальне простір'я, звідки депонується клітинами. [30]

ПСЛ відносяться до мезенхімального типу і при пошкодженні паренхіми печінки у процесі мезенхіально-епітеліального переходу трансдиференціюються з "спокійного" фенотипу (qHSC) в "активований" (aHSC) міофібробластоподібний фенотип, відповідальний за відкладання колагену в тканинах печінки [31]. Активовані aHSC синтезують великі кількості білків ЕЦМ(екстрацелюлярний матрикс) (колагену I та III типів) і відіграють ключову роль у розчиненні пошкодження печінки. У той же час неконтрольована активація ПСЛ є основним фактором розвитку фіброзу печінки [32].

Припускається, що вітамін А (ретинол) та його похідні (ретиноїди) відіграють регулюючу роль у відношенні до активації та трансформації ПСЛ у процесі фіброгенезу. Активація ПСЛ супроводжується втратою характерних для них ліпідних включень, проте неясно, чи втрата є стимулом для активації ПСЛ. Багато досліджень *in vitro* показали, що активація спочиваючих ПСЛ подібними до міофібробластів клітками, які діляться, може бути пригнічена додаванням до середовища ретинолу та

ретиноїдної кислоти [33]. Було показано, що прийом пацюкам ретинолу в дозі 15 мг/кг двічі на тиждень пригнічував експериментальний фіброз, індукований CCl₄ [34], а β-каротин (провітамін А) знижував важкість запалення та фіброзу, спричиненого CCl₄ [35].

У інших дослідженнях було встановлено, що вітамін А разом з додаванням етанолу викликав фіброз та цироз печінки у пацюків [36], тоді як аналог ретиноєвої кислоти прискорював індукований сироваткою крові фібропроліферативний процес у пацюків за рахунок підвищення рівня трансформуючого фактора росту (TGF)-β та підвищення рівнів колагену у печінці [37]. Було висловлено припущення, що дефіцит вітаміну А з низьким рівнем ретинілових ефірів в ПСЛ сприяє розвитку фібропроліферативного процесу, індукованого CCl₄ [38].

Кількість aHSC безпосередньо пов'язана з важкістю фіброзу. Втрата ліпідних крапель з ПСЛ, що містять ретиноїди, довгий час розглядалась як ознака їх трансдиференціації в активовані міофібробласти, які спричиняють фіброз печінки. Показано, що ПСЛ, активовані в культурі та після пошкодження печінки *in vivo*, зберігають свої ліпідні краплі, які стають меншими та більшими в кількості, причому зниження концентрації ретиноїдів у краплях відбувається лише після початку клітинної трансдиференціації [39].

1.2.2. Вміст вітаміну А в печінці, яка знаходиться на різних стадіях розвитку фіброзу.

Вітамін А (ретинол) здатен потенційно змінити баланс у печінці на користь регенерації. Він може змінювати швидкість проліферації епітеліальних клітин [40], приблизно 80 % вітаміну А локалізується в зірчастих клітинах печінки, які відіграють центральну роль у фіброгенезі, і при розвитку фіброзу вміст вітаміну А у печінці зменшується [41]. Є дані, що вказують на те, що вітамін А інгібує формування фібротичної тканини

печінки [42]. У той же час є данні, що вітамін А, навпаки, може прискорювати розвиток фіброзу [43].

У здоровій печінці вітамін А накопичується у гепатоцитах зірчатих клітинах (HSC), спеціалізованих клітинах печінки, відповідальних за накопичення вітаміну А у вигляді ретинілових ефірів.

При ураженні або запаленні печінки, на ранніх стадіях фіброзу, відбувається активація гепатоцитів зірчатих клітин (HSC). Активовані HSC втрачають вміст вітаміну А і перетворюються в клітини типу міофібробластів, сприяючи розвитку фіброзу. На цьому етапі втрата вітаміну А у HSC пов'язана з прогресуванням фіброзу. Зниження рівня вітаміну А і сигналізації ретиноїдів може призвести до неконтрольованого утворення позаклітинного матриксу та утворення фібротичної тканини.

На пізніших стадіях фіброзу та цирозу порушується обмін вітаміну А. Зі зростанням фіброзу може відбуватися зменшення кількості гепатоцитів зірчастих клітин в цілому через їх перетворення в міофібробласти або апоптоз.

Зниження рівня накопичення та обміну вітаміну А може сприяти системним ускладненням, пов'язаним з продвинутим захворюванням печінки, таким як порушення імунної функції та зміна процесу загоєння ран.

1.2.3. Метаболізм вітаміну А в зірчастих клітинах.

Зірчасті клітини печінки (ЗКП) відіграють важливу роль у зберіганні вітаміну А та регулюванні його метаболізму в організмі. У нормальних умовах, до 80% загального вмісту вітаміну А знаходиться у специфічних ліпідних краплях у ЗКП. Ці клітини мають здатність зберігати вітамін А у формі ретинілових ефірів, що відіграє важливу роль у здоровому функціонуванні печінки. [44]

Проте при печінкових захворюваннях, зокрема у хронічному або алкогольному фіброзі, ЗКП можуть переходити до фенотипу "міофібробластоподібних клітин". У цьому стані відбувається втрата ліпідних крапель з вмістом вітаміну А, збільшення проліферації ЗКП та зміна складу позаклітинного матриксу, що сприяє розвитку фіброзу та формуванню фібротичної тканини. [45,46]

В здорових умовах ЗКП зберігають велику кількість вітаміну А у специфічних ліпідних краплях. Проте при печінковому фіброзі ці ліпідні краплі можуть бути втрачені, що призводить до втрати вмісту вітаміну А у ЗКП.[47,48]

У міофібробластоподібному фенотипі ЗКП спостерігається збільшена проліферація клітин. Це означає, що ЗКП починають швидко ділитися та збільшувати свою кількість, що сприяє утворенню фіброзної тканини.[47,49]

В міофібробластоподібному стані ЗКП виділяють збільшену кількість позаклітинного матриксу, який складається з різних білків і молекул. Ця зміна складу матриксу також сприяє формуванню фіброзної тканини в печінці.[47]

Дослідження показують, що зміни у метаболізмі вітаміну А у ЗКП можуть бути ключем до їхньої активації чи реверсії. Зокрема, підсилення метаболізму вітаміну А у ЗКП може сприяти реверсії їх "активованого фенотипу" до "квієсцентного фенотипу", що є бажаним для відновлення нормальної структури та функції печінки у разі захворювань. [50,51]

Ці відкриття мають важливе значення для розуміння механізмів розвитку фіброзу печінки та визначення можливих стратегій лікування, спрямованих на нормалізацію функції ЗКП та збереження вмісту вітаміну А у клітинах печінки.

Наразі відомо, що вітамін А відіграє важливу роль в розвитку фіброзу печінки, але точно не відомо яку саме. Через те, що є багато суперечних

думок: вітамін А пригнічує розвиток фіброзу або, навпаки, викликає, у цій роботі були проведені експерименти, які допоможуть визначити дію вітаміну А в фіброзі.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Експериментальна схема підготовки тварин та забір біологічного матеріалу

Для проведення дослідження впливу вітаміну А на Cu-індукований фіброз печінки використовували здорових трьох місячних (150–175 г) пацюків – самців лінії Wistar (Вістар), віварію науково дослідного інституту Біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Тварини були поділені на 8 груп (Рис. 2.1), які утримувалися за стандартних умов віварію з вільним доступом до їжі та води. Усі маніпуляції проводили згідно з біоетичним комітетом Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, що керується положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986) [52].

	n	Цикл = 3 ін'єкції 1 г/100 г маси тіла	ССІ4 0,1 мл/100 г маси тіла	Цикл = 3 ін'єкції 1,5 г/100 г маси тіла	Вітамін А 0,1 мг/100 г маси тіла	Декапітація
 Інтакт	5	Фізичний розчин	Олія	Фізичний розчин	Олія	Забір печінки для дослідження вмісту вітаміну А
 Віт. А	5	Фізичний розчин	Олія	Фізичний розчин		
 1 Цикл Контроль/Віт. А	5/5	Фізичний розчин	Олія			
 2 Цикла Контроль/Віт. А	5/5	CuSO ₄ x 5H ₂ O	Олія	CuSO ₄ x	Per os	
 2 Цикла +ССІ4 Контроль/Віт. А	5/5		Per os			
		кожні 48 годин		кожні 48 годин		кожні 24 години

Рис. 2.1. Схема експериментальних введень досліджуваним групам тварин: **Інтакт** — інтактний контроль, пацюки отримували відповідні дози фізичного розчину або олії (оливкова); **Віт. А** – експериментальні тварини

отримували чотири дні масляний розчин ретинолу ацетату (0,1 мг/100 г маси тіла) per os; **1 цикл** (контроль/Вит.А) — отримували внутрішньочеревні три введення сірчаноокислої міді в дозі 1 г/100г маси тіла з інтервалом 48 годин, потім чотири дні або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); **2 цикли** (контроль/Вит.А) — отримували x2 три введення сірчаноокислої міді, потім чотири дні або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); **2 цикли+CCl₄** (контроль/Вит.А) — отримували x2 три введення сірчаноокислої міді, між якими вводили масляний розчин CCl₄ per os (0,1 мл/100 г маси тіла), потім чотири дні або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла).

Розчин введених речовин перераховували на масу тіла (одноразова доза не перевищувала об'єм 1 мл на тварину). Маса тіла вимірювалась у кожен день маніпуляцій для дослідження зміни динаміки.

2.2. Препаративні та аналітичні методи

2.2.1. Розведення розчину сірчаноокислої міді.

Розчин сірчаноокислої міді отримували, розчиняючи 83,4 мг CuSO₄ x 5H₂O у 0,9% NaCl (20 мл). Робочий розчин складав 0,24 мл/100 г маси тіла.

2.2.2. Розведення розчину тетрахлорометану.

40% розчин тетрахлорометану отримували розводячи 3,0 мл концентрату CCl₄ у 4,5 мл оливкового масла. Робочий розчин складав 0,25 мл/100 г маси тіла.

2.2.3. Визначення вітаміну А.

Вміст вітаміну А в печінці визначали за методом Іонов та ін., яка базується на комплексоутворенні вітаміну А з ефіратом трифториду бору та визначенні швидкості розпаду цього комплексу, яка прямо пропорційна концентрації вмісту вітаміну А в дослідному зразку.

Хід аналізу. Наважку печінки 0,5 г розтирають з безводним сульфатом натрію до однорідної маси у фарфоровій ступці. Додають 7-10 мл хлороформу, перемішуючи вміст, залишають для екстракції на 10-15 хвилин. Після цього вміст ступки фільтрують у мірну пробірку через паперовий фільтр, промивають ступку та вміст на фільтрі малими порціями хлороформу та об'єм у пробірці доводять до 15 мл. Для аналізу відбирають 0,5-5,0 мл хлороформеного екстракту (загальний обсяг доводять до 5 мл хлороформом). По стінках пробірки нашаровують 1 мл кольорореагенту (ефірату трифториду бору) на екстракт, щоб він не перемішувався з екстрактом. Через 30 секунд після початку збовтування проводять перше вимірювання оптичної щільності на СФ UV-2600 (SHIMADZU, Японія) на помаранчевому (7-му) світлофільтрі (довжина хвилі 610 нм) в кюветі проти повітря. Через 1 хвилину після першого виміру (тобто через 1,5 хвилини після початку збовтування) проводять другий вимір на тій же довжині хвилі.

2.3. Статистичні методи.

Візуалізація даних робилася за допомогою програмного забезпечення 1 та 2. Статистичний аналіз робився за в програмі 2. Достовірні відмінності в групах визначалися за допомогою непараметричного критерія Mann–Whitney U-test при $p \leq 0,05$ з поправкою Бонфероні.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

3.1. Динаміка маси тіла щурів з Си-індукованим фіброзом.

Інтенсивність росту маси тіла тварин є інтегральним показником функціонального стану організму. Маса тіла в інтактній групі тварин протягом експерименту (25 діб) збільшилася на 20-22% порівняно з початковою (Рис. 3.1, крива I), що відповідає прийнятій нормі для пацюків.

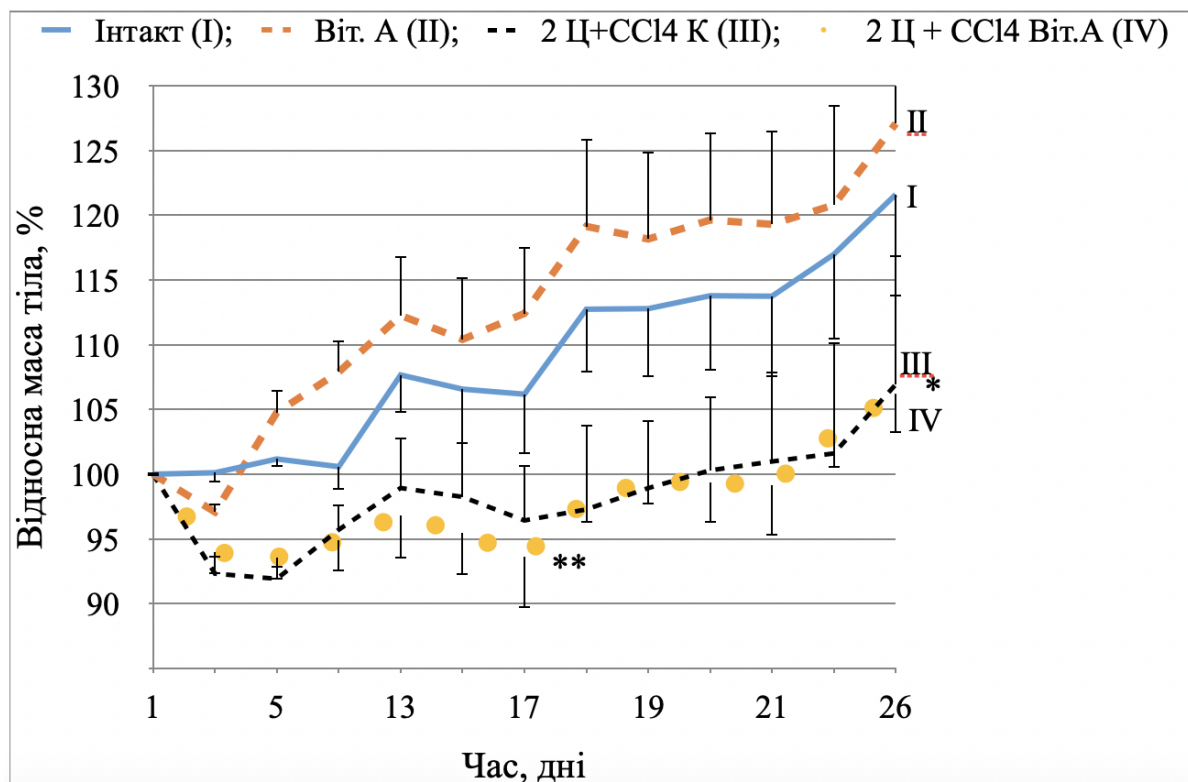


Рис. 3.1. Зміна динаміки маси тіла у дослідних тварин: **Інтакт** — інтактний контроль, пацюки отримували відповідні дози фізичного розчину або олії (оливкова); **Віт. А** — експериментальні тварини отримували чотири дні масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); **2 цикли+CCl₄ К** — отримували x2 три внутрішньочеревні введення сірчаноокислої міді в дозі 1 г/100г маси тіла з інтервалом 48 годин, між якими вводили масляний розчин CCl₄ per os (0,1 мл/100 г маси тіла), потім чотири дні олію (контроль); **2 цикли+CCl₄ Віт. А** — отримували x2 три

внутрішньочеревні введення сірчаноокислої міді в дозі 1 г/100г маси тіла з інтервалом 48 годин, між якими вводили масляний розчин CCl_4 per os (0,1 мл/100 г маси тіла), потім чотири дні масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); * — достовірні відмінності $p \leq 0,05$ групи 2 цикли CCl_4 контроль порівняно з групами інтактною та віт. А; ** — достовірні відмінності $p \leq 0,05$ групи 2 цикли CCl_4 Віт. А порівняно з групами інтактною та віт. А (Mann–Whitney U-test з поправкою Бонфероні).

Якщо тваринам вводили 3 ін'єкції сульфату міді (перший цикл інтоксикації), то приріст маси тіла припинявся на момент введення, поки сульфат міді не вивівся з організму пацюка (Рис. 3.2, крива I). Якщо ж тварини проходили другий цикл інтоксикації, то вони втрачали вагу в період введення, але потім знов набирали масу, перед декапітацією маса пацюків не перевищувала вихідну. (Рис. 3.2, крива III).

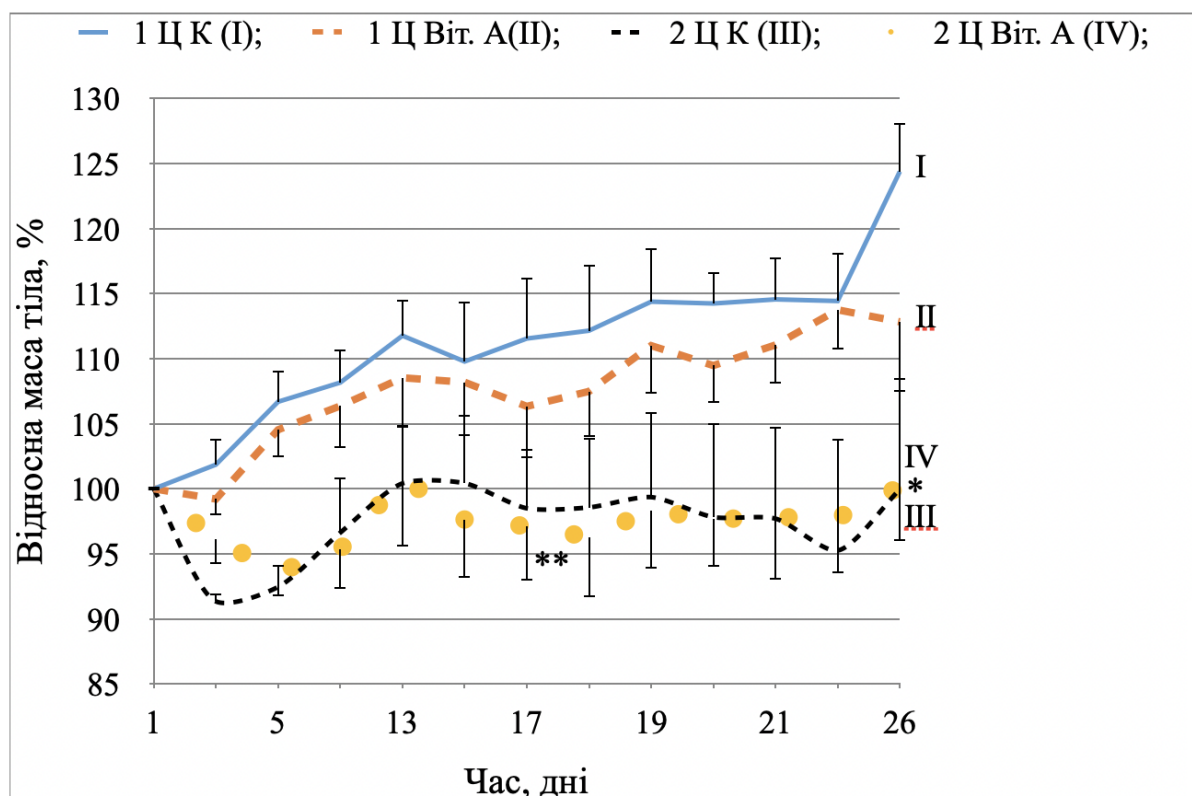


Рис. 3.2. динаміка маси тіла у дослідних тварин: **1 цикл К** — отримували внутрішньочеревні три введення сірчаноокислої міді в дозі 1 г/100г маси тіла з інтервалом 48 годин, потім чотири дні олію (контроль); **1 цикл Віт. А** — отримували внутрішньочеревні три введення сірчаноокислої міді в дозі 1 г/100г маси тіла з інтервалом 48 годин, потім чотири дні масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); **2 цикли К** — отримували x2 три введення сірчаноокислої міді, потім чотири дні олію (контроль), **2 цикли Віт. А** — отримували x2 три введення сірчаноокислої міді, потім чотири дні масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла); * — достовірні відмінності $p \leq 0,05$ групи 2 цикли контроль порівняно з групами інтактною та віт. А; ** — достовірні відмінності $p \leq 0,05$ групи 2 цикли Віт. А порівняно з групами інтактною та віт. А (Mann–Whitney U–test з поправкою Бонфероні).

Якщо тварини отримували 2 цикли сульфату міді і тетрахлометану, то спостерігається пригнічення росту маси порівняно з інтактною групою (Рис. 3.1, крива III).

Пацюки, які отримували лише ретинол ацетат, у них спостерігається приріст маси тіла на 27%. Якщо тварини отримували 1 цикл інтоксикації, а потім ретинол ацетат, то варіювання мас схоже з групою тварин, які отримували 1 цикл сульфату міді (Рис. 3.2, криві I-II). Якщо тварини отримували ретинол ацетат після 2-х циклів інтоксикації, то маси тіла подібні до групи тварин, які отримували 2 цикли сульфату міді без ретинол ацетату (Рис. 3.2, крива IV). У пацюків, які отримували 2 цикли інтоксикації, а між циклами - тетрахлометан, маси тіла подібні до групи, яка отримувала 2 цикли сульфату міді і тетрахлометану (Рис. 3.1 крива IV).

Отже, введення тваринам ретинол ацетату на наступний день після останнього введення 2-го циклу сульфату міді, тобто після розвитку фіброзу печінки, суттєво не вплинуло на маси тіла тварин.

Схоже дослідження, щодо впливу вітаміну А на розвиток печінки, показало, що введення ретинол ацетату нормалізує швидкість росту таких тварин[53]. Можливо розбіжність результатів пов'язана з ходом експерименту.

У роботі [53] досліджували вплив медного купоросу (сульфату міді) та вітаміну А на пацюків. У цьому експерименті проводили багаторазові послідовні ін'єкції медного купоросу пацюкам. Виявилося, що такі ін'єкції призвели до загибелі значної кількості експериментальних тварин: у групі з 34 пацюків за період спостереження (21 день) загинуло 41%. Маса тіла пацюків у цій групі спочатку знижувалася в перші кілька днів після початку введення сульфату міді, але через 5-6 днів почала відновлюватися. Однак ці тварини відставали в рості порівняно з контрольними пацюками протягом усього періоду спостереження. Відомо, що клітини Іто активно беруть участь в індукції фіброгенезу, а вітамін А активує ці клітини печінки.

У наступній серії експериментів 34 пацюкам щодня протягом 21 дня вводили вітамін А у дозі 300 МО/100 г маси тіла. Було встановлено, що через 14 днів від початку експерименту тварини почали інтенсивно набирати масу тіла і перевищили контроль на 20-30%. Усі 34 тварини цієї групи вижили, і не було виявлено жодних анатомічних змін, включаючи індукцію росту сполучної тканини в області печінки. Таким чином, повторне введення вітаміну А після інтоксикації медним купоросом суттєво знижувало смертність тварин, а у виживших тварин збільшувалася кількість сполучної тканини навколо печінки. Це також призводило до збільшення приросту маси тіла, що перевищувало показники контрольної групи. Отже, розростання сполучної тканини або "спайкова" хвороба можна розглядати як прояв адаптивної реакції організму.

Порівняння робіт показує, що обидва експерименти досліджували вплив сульфату міді на пацюків, але з різними підходами та результатами. У першому експерименті було встановлено, що введення вітаміну А після інтоксикації сульфатом міді значно знижувало смертність тварин і сприяло приросту маси тіла. У другому (нашому) експерименті введення ретинол ацетату після другого циклу інтоксикації сульфатом міді суттєво не вплинуло на масу тіла тварин.

Перша робота показує, що вітамін А може мати захисний ефект після інтоксикації сульфатом міді, тоді як ця робота свідчить, що ретинол ацетат не має такого ефекту в умовах дворазової інтоксикації.

Така відмінність результатів можлива через постановку експерименту, умов тримання пацюків, зовнішніх чинників, індивідуальних особливостей пацюків тощо.

3.2. Кількість вітаміну А в печінці пацюків з Cu-індукованим фіброзом.

Спрямованість дії вітаміну А на певні метаболічні системи залежить не тільки від часових характеристик метаболічних процесів, що беруть участь у формуванні адаптивної відповіді, а й від його концентрації в біологічних тканинах. У цій роботі показано, що високі концентрації вітаміну А в печінці збільшували смертність тварин після введення високих доз сульфату міді, тоді як малі дози вітаміну А можуть забезпечувати, хоча і несуттєвий, захист від цього токсиканта (Табл. 3.1, 2).

Таблиця 3.1. Кількість віт А

	Групи			
	Інтакт	Віт. А	2 цикли+CCl ₄ К	2 цикли+CCl ₄ Віт. А
Вихідні дані	5,36	59,88	13,8	32,85
	9,88	36,42	12,85	20,61
	8,85	37,22	2,68	30,77
	0,96	76,23	26,57	36,96
	18,70	36,05	-	29,73
$\bar{X}$	8,75	49,16	13,98	30,18
$\bar{X} \pm SD$	6,57	18,20	9,79	6,03
$\bar{X} \pm SE$	2,94	8,14	4,89	2,69

Печінка інтактних тварин містила майже в 6 раз менше ретинол ацетату, ніж тварини, які отримували 4 дні масляний розчин вітаміну А наприкінці експерименту (Табл. 3.1, 1-2).

Таблиця 3.2. Кількість віт А

	Групи			
	1 Цикл К	1 Цикл Віт. А	2 цикли К	2 цикли Віт. А
Вихідні дані	7,72	31,94	2,94	36,67
	14,44	25,26	17,38	20,08
	44,40	3,13	2,50	54,68
	-	28,71	13,81	35,01
	-	-	1,25	37,42
<i>X</i>	22,19	22,26	7,58	36,77
<i>X</i> ± <i>SD</i>	19,53	13,04	7,45	12,28
<i>X</i> ± <i>SE</i>	11,27	6,52	3,33	5,49

На тлі збільшення введення сульфату міді, рівень ретинол ацетату знизився в 2 рази у тварин, які отримували 1 цикл інтоксикації (Табл. 3.2, 1); у 6,5 разів, у тварин, які отримували 2 цикли інтоксикації.

Рівень вітаміну А в 3,5 рази нижче у групи, яка отримувала 2 цикли сульфату міді і тетрахлорметан, порівняно з групою, яка отримували лише вітамін А (Табл. 3.1, 2-3).

Рівень вітаміну А у групи, яка отримувала 1 цикл сульфату міді і цикл введення ретинол ацетату, у 2 рази нижче порівняно з групою, яка отримувала лише вітамін А; і в 1 раз вище порівняно з тваринами, які отримували 1 цикл інтоксикації (Табл. 3.2, 1-2).

Кількість ретинол ацетату у тварин, які отримували 2 цикли введення сульфату міді і цикл введення вітаміну А, у 1,3 менше порівняно з групою пацюків, які отримували лише вітамін А; і майже в 5 разів вище, ніж у тварин, які отримували 2 цикли інтоксикації (Табл. 3.2, 3-4).

Якщо тварини отримували 2 цикли інтоксикації і тетрахлорметан, то рівень вітаміну А вище в 1,6 раз, порівняно з групою тварин, які отримували ретинол ацетат; і в 2 рази вище, ніж у тварин, які отримували 2 цикли інтоксикації і тетрахлорметан.

Отже, спираючись на дані з Таблиці 1 і Таблиці 2, можна припустити, що вітамін А грає роль у відновленні печінки після інтоксикації, через те, що рівень ретинол ацетату нижче у груп, які піддали дії гепатотоксинів, порівняно з групою, яка отримували вітамін А.

Попередні дослідження впливу вітаміну А на розвиток фіброзу печінки свідчать про досить суперечливі результати: одні автори вказують на позитивний вплив вітаміну А [54,55], а інші - на негативний, тобто здатність прискорювати формування цирозу печінки [56,57].

Можна припустити, що така суперечливість наявних даних щодо впливу вітаміну А на розвиток фіброзу печінки відображає низку фундаментальних властивостей біологічних систем і, насамперед, принцип "часової оптимальності" - принцип "ТОП". Під "оптимальністю" мається на увазі, що організм як саморегулююча система вибирає такі варіанти метаболізму у відповідь на зміни навколишнього середовища і формує такі нові патерни, які можуть забезпечити збереження гомеостазу в стані, близькому до нормального в даний конкретний момент часу, на тлі постійно діючих негативних факторів. Іншими словами, організм завжди прагне вижити "тут і зараз" з мінімальними витратами, без урахування можливих майбутніх наслідків. Реалізація принципу ТОП можлива завдяки багатофункціональності більшості елементів біологічних систем у вирішенні адаптаційних завдань, тобто організм може використовувати одні й ті ж елементи (ферменти та інші молекули) для вирішення різних завдань [58]. Крім того, високий ступінь стійкості біологічних систем забезпечується багаторівневою системою регуляції.

3.3. Підсумок.

Як відомо, іони міді в організмі зв'язуються з різними білками, в першу чергу з церулоплазміном та альбуміном. Крім того, іони міді здатні індукувати синтез металотіонеїнів та інших стресових білків у печінці, які також здатні специфічно зв'язувати іони міді та певною мірою нівелювати їх токсичну дію. У випадку, якщо іони міді залишаються «вільними», тобто не зв'язуються та/або не утримуються тривалий час цими білками, вони зв'язуються з функціонально активними ферментами і пригнічують їхню активність, що проявляється у вигляді токсичності. Можна припустити, що у 7,5 % тварин початкової кількості елементів (церулоплазмін, альбумін та ін.), здатних специфічно зв'язувати іони міді, недостатньо для усунення їх гострої токсичності, тобто забезпечення першого рівня захисту (Рис. 3.3). Наприклад, відомо, що іони міді, не зв'язані зі специфічними мідьзв'язуючими білками, проявляють гемолітичну дію, порушують функції нервової системи, шлунково-кишкового тракту (діарея), пригнічують функції дихання та видільної системи, тобто смерть настає внаслідок системних змін функцій низки життєво важливих органів.

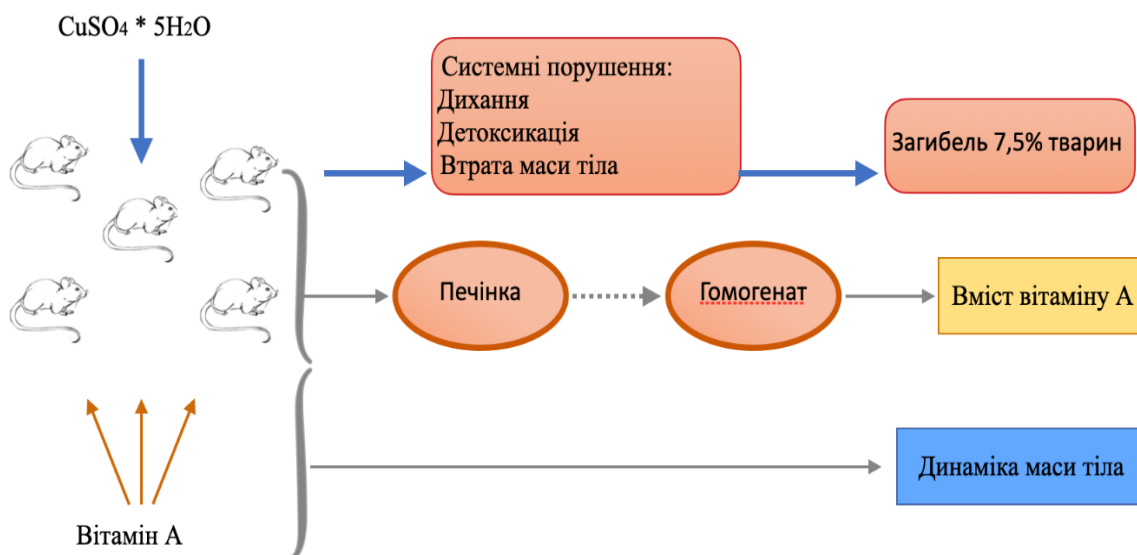


Рис. 3.3. Схема, яка демонструє основні показники, які оцінювались у експериментальних тварин.

Водночас у групі тварин (92,5 %), що проявили стійкість до токсичного впливу іонів міді, зафіксовано: пригнічення швидкості росту.

Підвищення вмісту вітаміну А в печінці при фіброзі, на початкових етапах його розвитку, супроводжувалося нормалізацією функціональної активності печінки, відновленням і, більше того, активацією темпів росту тварин.

Таким чином, можна зробити висновок, що багаторазові послідовні ін'єкції мідного купоросу в дозі 1 мг/100 г маси тіла піддослідним тваринам призвели до загибелі до 7,5 % тварин протягом 25 днів. У решти тварин, що вижили, спостерігалось відставання у прирості маси тіла, а також відзначалося пригнічення функціональної активності печінки, тобто відбувалася індукція фіброзу печінки на початкових стадіях розвитку (F0/F1). Формування фіброзу супроводжувалося зниженням вмісту вітаміну А в печінці в 4 рази порівняно з вихідним рівнем.

ВИСНОВКИ

Пероральні введення щурам вітаміну А в дозі 300 ме/100 г маси тіла призвела до його збільшення в печінці.

1. Триразове введення тваринам сульфату міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла інгібує ріст маси тіла тварин.

2. Триразове введення тваринам сульфату міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла супроводжується проявом гострої токсичності (у 7,5 %), так і формуванням резистентності (у 92,5 %) до іонів міді.

3. На тлі багаторазового збільшення іонів міді в печінці вміст вітаміну А залежав від стадій купрум фіброзу

4. Введення тваринам ретинол ацетату після розвитку фіброзу печінки знижувало токсичну дію міді.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пентюк, Н. О. (2011). Метаболічні предиктори фіброзу печінки у хворих на хронічні гепатити. *ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА*.
2. Як зупинити фіброз печінки. (2019, 8 квітня). Consilium medical. <https://consilium-medical.com.ua/ua/articles/kak-ostanovit-fibro-z-pecheni>
3. Bedossa, P., & Poynard, T. (1996). An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 24(2), 289-293.
4. RG, K. (1997). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis C. *Scand J Gastroenterol*, 32, 169-174.
5. Scheuer, P. J. (1991). Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of hepatology*, 13(3), 372-374.
6. Batts, K. P., & Ludwig, J. (1995). An update on terminology and reporting. *The American journal of surgical pathology*, 19(12), 1409-1417.
7. Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., ... & Thaler, H. (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*, 22(6), 696-699.
8. Bedossa, P., Dargère, D., & Paradis, V. (2003). Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38(6), 1449-1457.
9. Tobkes, A. I., & Nord, J. (1995). Liver biopsy: review of methodology and complications. *Digestive diseases*, 13(5), 267-274.
10. Cadranel, J. F., Rufat, P., & Degos, F. (2000). Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. *Hepatology*, 32(3), 477-481.
11. Poynard, T., Ratziu, V., & Bedossa, P. (2000). Appropriateness of liver biopsy. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14, 543-548.

- 12.Lackner, C., Struber, G., Liegl, B., Leibl, S., Ofner, P., Bankuti, C., ... & Stauber, R. E. (2005). Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 41(6), 1376-1382.
- 13.Poynard, T., Morra, R., Halfon, P., Castera, L., Ratziu, V., Imbert-Bismut, F., ... & De Ledinghen, V. (2007). Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC gastroenterology*, 7, 1-11.
- 14.Afdhal, N. H., & Nunes, D. (2004). Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Official journal of the American College of Gastroenterology|ACG*, 99(6), 1160-1174.
- 15.Pinzani, M. (2006). Non-invasive evaluation of hepatic fibrosis: don't count your chickens before they're hatched. *Gut*, 55(3), 310-312.
- 16.Ganne-Carrié, N., Ziol, M., de Ledinghen, V., Douvin, C., Marcellin, P., Castera, L., ... & Beaugrand, M. (2006). Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology*, 44(6), 1511-1517.
- 17.Friedrich–Rust, M., Ong, M. F., Martens, S., Sarrazin, C., Bojunga, J., Zeuzem, S., & Herrmann, E. (2008). Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134(4), 960-974.
- 18.Huwart, L., Sempoux, C., Vicaud, E., Salameh, N., Annet, L., Danse, E., ... & Van Beers, B. E. (2008). Magnetic resonance elastography for the noninvasive staging of liver fibrosis. *Gastroenterology*, 135(1), 32-40.
- 19.Yin, M., Talwalkar, J. A., Glaser, K. J., Manduca, A., Grimm, R. C., Rossman, P. J., ... & Ehman, R. L. (2007). Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *Clinical Gastroenterology and hepatology*, 5(10), 1207-1213.

- 20.Seki, E., & Brenner, D. A. (2015). Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 22(7), 512-518.
- 21.Seki, E., & Schwabe, R. F. (2015). Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*, 61(3), 1066-1079.
- 22.Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., ... & Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American journal of pathology*, 180(4), 1340-1355.
- 23.Hinz, B. (2016). Myofibroblasts. *Experimental eye research*, 142, 56-70.
- 24.Seki, E., & Brenner, D. A. (2015). Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 22(7), 512-518.
- 25.Senoo, H., Kojima, N., & Sato, M. (2007). Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitamins & Hormones*, 75, 131-159.
- 26.Yavuz, B. G., Pestana, R. C., Abugabal, Y. I., Krishnan, S., Chen, J., Hassan, M. M., ... & Kaseb, A. O. (2020). Origin and role of hepatic myofibroblasts in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 11(13), 1186.
- 27.Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 151-166.
- 28.Davis, B. H., Kramer, R. T., & Davidson, N. O. (1990). Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. *The Journal of clinical investigation*, 86(6), 2062-2070.
- 29.Senoo, H., & Wake, K. (1985). Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 52(2), 182-194.

30. Seifert, W. F., Bosma, A., Hendriks, H. F. J., Van Leeuwen, R. E. W., van Thiel-de Ruiter, G. C. F., Seifert-Bock, I., ... & Brouwer, A. (1995). Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl₄-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. *Liver*, 15(1), 1-8.
31. Leo, M. A., & Lieber, C. S. (1983). Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. *Hepatology*, 3(1), 1-11.
32. Okuno, M., Moriwaki, H., Imai, S., Muto, Y., Kawada, N., Suzuki, Y., & Kojima, S. (1997). Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF- β in liver stellate cells. *Hepatology*, 26(4), 913-921.
33. Seifert, W. F., Bosma, A., Brouwer, A., Hendriks, H. F., Roholl, P. J., van Leeuwen, R. E., ... & Knook, D. L. (1994). Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology*, 19(1), 193-201.
34. Joplin, L. L., Koutalos, Y., Chen, C., Shah, V., & Rockey, D. C. (2018). Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 315(5), G713-G721.
35. Haaker, M. W., Vaandrager, A. B., & Helms, J. B. (2020). Retinoids in health and disease: A role for hepatic stellate cells in affecting retinoid levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(6), 158674.
36. Nollevaux, M. C., Guiot, Y., Horsmans, Y., Leclercq, I., Rahier, J., Geubel, A. P., & Sempoux, C. (2006). Hypervitaminosis A-induced liver fibrosis: stellate cell activation and daily dose consumption. *Liver International*, 26(2), 182-186.
37. El-Mezayen, N. S., El-Hadidy, W. F., El-Refaie, W. M., Shalaby, T. I., Khattab, M. M., & El-Khatib, A. S. (2018). Oral vitamin-A-coupled

- valsartan nanomedicine: High hepatic stellate cell receptors accessibility and prolonged enterohepatic residence. *Journal of controlled release*, 283, 32-44.
- 38.Hwang, I., Lee, E. J., Park, H., Moon, D., & Kim, H. S. (2021). Retinol from hepatic stellate cells via STRA6 induces lipogenesis on hepatocytes during fibrosis. *Cell & Bioscience*, 11, 1-19.
- 39.Blaner, W. S., O'Byrne, S. M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D. M., Jiang, H., ... & Libien, J. (2009). Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 467-473.
- 40.Arthur, M. J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(2), G245-G249.
- 41.Friedman, S. L. (2003). Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38, 38-53.
- 42.Friedman S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, 88(1), 125–172. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
- 43.Hui, A. Y., & Friedman, S. L. (2003). Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert reviews in molecular medicine*, 5(5), 1-23.
- 44.Iredale, J. P. (2001). Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. In *Seminars in liver disease* (Vol. 21, No. 03, pp. 427-436). Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- 45.Abergel, A., Sapin, V., Dif, N., Chassard, C., Darcha, C., Marcand-Sauvant, J., ... & Sauvant, P. (2006). Growth arrest and decrease of α -SMA and type I collagen expression by palmitic acid in the rat hepatic stellate cell line PAV-1. *Digestive diseases and sciences*, 51, 986-995.

- 46.Sauvant, P., Sapin, V., Abergel, A., Schmidt, C. K., Blanchon, L., Alexandre-Gouabau, M. C., ... & Azaïs-Braesco, V. (2002). PAV-1, a new rat hepatic stellate cell line converts retinol into retinoic acid, a process altered by ethanol. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(8), 1017-1029.
- 47.Вишневецький, Є. М. (2000). Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей/Страсбург, 18 березня 1986 року: Збірка договорів Ради Європи: Українська версія. К.: Парламентське видавництво.
- 48.Bozhkov, A. I., Akzhyhitov, R. A., Bilovetska, S. G., Ivanov, E. G., Dobrianska, N. I., & Bondar, A. Y. (2024). The effect of retinol acetate on liver fibrosis depends on the temporal features of the development of pathology. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 14(3), 101338.
- 49.Seifert, W. F., Bosma, A., Hendriks, H. F. J., Van Leeuwen, R. E. W., van Thiel-de Ruiter, G. C. F., Seifert-Bock, I., ... & Brouwer, A. (1995). Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl₄-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. *Liver*, 15(1), 1-8.
- 50.Senoo, H., & Wake, K. (1985). Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 52(2), 182-194.
- 51.Leo, M. A., & Lieber, C. S. (1983). Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. *Hepatology*, 3(1), 1-11.
- 52.Okuno, M., Moriwaki, H., Imai, S., Muto, Y., Kawada, N., Suzuki, Y., & Kojima, S. (1997). Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF- β in liver stellate cells. *Hepatology*, 26(4), 913-921.

53. Zanzoni, A., Ribeiro, D. M., & Brun, C. (2019). Understanding protein multifunctionality: from short linear motifs to cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 4407-4412.