

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ МОНОЦИТІВ У РОЗВИТКУ ІНДУКОВАНОГО
ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ**

Допущено до захисту

«__»_____2023р.

Кваліфікаційна робота

студентки 4 курсу, група БТ-41

Онопи Тетяни Віталіївни

Науковий керівник:

Асистент Бондар Анастасія Юріївна

Завідувач кафедри _____

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Голова ЕК _____

Оцінка «_____»

«__»_____2023р

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота була виконана студенткою кафедри молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна Онопою Тетяною під керівництвом Бондар Анастасії Юріївни.

Метою роботи є огляд та аналіз наукової літератури стосовно фіброзу печінки та факторів, які впливають на його розвиток; дослідження функцій моноцитів при різних запаленнях зокрема при фіброзі, а також аналіз дії молозива, вітаміну А і мікс-фактору як біотехнологічних речовин.

Робота включає 55, сторінок, 20 рисунків та 7 таблиць. Для аналізу літератури були використані 41 наукове джерело, 3 електронні ресурси та 2 етичні протоколи.

Ключові слова: фіброз печінки, моноцити, моноцитарно-макрофагальна система, молозиво, вітамін А, ретинол, мікс-фактор, клітинний імунітет

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Характеристика імунокомпетентних клітин	6
1.1.1. Характеристика моноцитів.....	8
1.1.2. Загальна схема гемопоезу та утворення моноцитів	11
1.1.3. Різноманітність і функції моноцитів-макрофагів	16
1.2 Вплив деяких лікарських препаратів і біотехнологічних продуктів характеристики моноцитів-макрофагів	18
1.2.1 Вплив молозива на фактори імунітету	19
1.2.2 Вплив мікс-фактору на фактори імунітету.....	20
1.2.3 Вплив вітаміну А на фактори імунітету	22
1.3 . Роль моноцитів при різних патологіях печінки	25
1.3.1. Алкогольна хвороба печінки.....	26
1.3.2. Гостра печінкова недостатність	27
1.3.3 Гостра хронічна печінкова недостатність.....	29
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	31
2.1. Дослідження мікс-фактору.....	31
2.1.1. Кількісний аналіз імунокомпетентних клітин	32
2.2.2. Визначення вмісту іонів міді в біологічних пробах	36
2.2.3 Визначення вмісту вітаміну А	36
2.2.4. Статистичний аналіз.....	36
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	38
3.1. Дані щодо дослідження мікс-фактору.....	38
3.2. Дослідження впливу вітаміну А	43
3.2.2 Морфологія печінки та ознаки фіброзу	45
3.2.3. Функціональна активність печінки.....	46
3.2.4. Показники крові тварин	48
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ – антигени

АПК – антигенпрезентуючі клітини

АТ – антитіла

ГСК – гемопоетичні стовбурові клітини

ДК – дендритні клітини

КСФ – колонієстимулюючий фактор

МКХ-10 – Міжнародна класифікація хвороб десятого перегляду

МФ – Міксфактор

РК – ретиноева кислота

ПКС – постковідний синдром

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

DAMP – пошкодження-асоційовані молекулярні структури (damage-associated molecular patterns)

IL – інтерлейкіни – interleukin

MHC – головний комплекс гістосумісності – major histocompatibility complex

NK-клітини – природні кілери (natural killer cells)

PAMP – патоген-асоційовані молекулярні структури (pathogen-associated molecular patterns)

ВСТУП

Фіброз печінки є високо динамічним функціональним станом печінки, що характеризується надмірним накопиченням білків позаклітинного матриксу. Він може супроводжуватися зворотним відновленням функціональної активності, переходом у хронічний стан або ж переходом у необоротний стан – цироз.[1;2]

Якою є стратегія еволюції фіброзу і які чинники на неї впливають залишається незрозумілим. Разом з тим, вирішення цього актуального питання має велике теоретичне і практичне значення, адже смертність від захворювань печінки на 5 місці серед причин смерті у світі. При цьому багато печінкових патологій залишаються недіагностованими, а тому не входять до статистики.[1]

Відомо, що в процесі відновлення (регенерації) печінки відіграють важливу роль синусоїдальні клітини печінки та клітини кісткового мозку, зокрема й моноцити. Моноцити та макрофаги зазнають ряд функціональних та фенотипічних змін для ініціації та підтримки відновлення тканин. Дослідження демонструють, що нокаутування макрофагів у печінці на стадії відновлення значно погіршує регенерацію. [3]

У зв'язку з цим у роботі досліджували роль моноцитів у формуванні імунної відповіді на моделі фіброзу печінки та впливу деяких продуктів біотехнологічного походження на ці процеси.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика імунокомпетентних клітин

Моноцити є імунними клітинами. І для кращого розуміння їх функцій та ролі, необхідно мати загальне уявлення про функціонування та роль інших клітин клітинного імунітету.

При дослідженні моноцитів необхідно перш за все звернути увагу на макрофаги, адже разом вони складають єдину моноцитарно-макрофагальну систему, а також циркулюючі моноцити є попередниками резистентних макрофагів тканин.

Макрофаги – це гістоцити, фагоцитарні клітини тканин, які здатні знешкоджувати бактерії, залишки відмерлих клітин, різні токсичні та чужорідні елементи. Мішенями для макрофагів є PAMPи та DAMPи. Крім основної функції – фагоцитозу, макрофаги беруть участь в індукції утворення АТ стимуляцією лімфоцитів, мають про- або протизапальні функції, що залежить від потреб організму, секретують цитокіни (IL-1; TNF- α), підтримують гомеостаз у тканинах. [5]

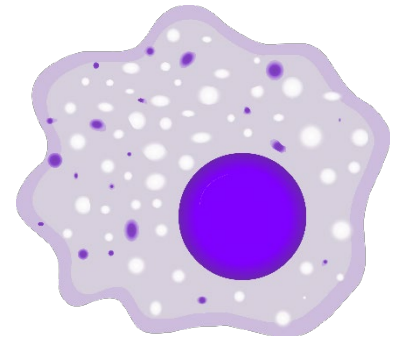


Рис. 1. Схематичне зображення макрофага [4]

Ще один тип клітин, тісно пов'язаний з моноцитами – дендритні клітини (ДК), адже моноцити виступають у ролі їх попередників. ДК – це лейкоцити мієлоїдного чи мезенхімального походження, розміром 15-20мкм, овальної форми, ядерні, з довгими цитоплазматичними виростами (схожі на дендрити). Вони є основними АПК, схема їх роботи така: захоплення АГ -> перетворення його на пептид, що може бути представлений Т-лімфоциту -> міграція до лімфатичних вузлів -> представлення АГ Т-клітинам через МНС. Крім того ДК представляють власні клітини організму Т-лімфоцитам, що призводить до імуносупресії. Іншими відомими функціями ДК є коstimуляція Т-клітин

рецепторами CD80 і CD-60; секреція цитокінів (IL-12), молекул МНС; протипухлинна дія. Мішенями для ДК є РАРи вірусів та бактерій. [6-8]



Рис. 2. Схематичне зображення нейтрофіла [4]

Також до імунних клітин відносять нейтрофіли – гранулоцити крові з фагоцитарною функцією, направленою проти бактерій, грибків, протистів, продуктів розпаду клітин; також вони мають експресуючі (МНС-I, II, про- та протизапальні та імунорегулюючі цитокіни, TNFи, фактори ангіогенезу, фіброгенезу тощо) властивості. Нейтрофіли здатні до нетозу – формування позаклітинних пасток при специфічному апоптозі. Нейтрофіли не є першою лінією оборони, вони реагують на наявність цитокінів (IL-1, IL-8 TNF- α , γ -IFN), компонентів системи комплементу, імунних комплексів, ендотоксинів, бактеріальних пептидів тощо [4-5]

Серед інших до імунних клітин відносяться НК-клітини – гранулоцити вродженого імунітету. Вони володіють протипухлинною, цитотоксичною (вивільнення перфоринів та гранзимів), секреторною (INF- γ) функціями; беруть участь у формуванні імунної пам'яті; регулятивній



Рис. 4. Схематичне зображення еозинофіла [4]

регулятивній сигналізації

дендритними

клітинами тощо. Активуються НК-клітини лігандами інфікованих вірусами та бактеріями клітин, наприклад, KIRs чи лектинами типу C. Інгібуються лігандами нормальних клітин (МНС-I) [5; 8]

Еозинофіли – це ще один клас гранулоцитів, але їхня основна задача – боротьба з

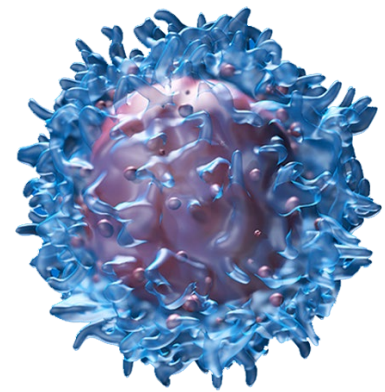


Рис. 3. Схематичне зображення НК-клітини [4]

багатоклітинними паразитами методом цитолізу клітин гельмінтів. Еозинофіли притягуються до місця запалення хемокінами (еотаксин, RANTES), і зв'язуються з ними специфічними рецепторами на своїй поверхні. Потім відбувається вивільнення цитотоксичних гранул з білком PR2 та еозинофільною пероксидазою. У додаток вони секретуюють цитокіни, хемоціни і фактори росту, які беруть участь у модуляції запалення та активують тучні клітини та базофіли (IL-2-6, IL-8, IL-10, IL-12-13, IL-16, IL-18, TNF- α тощо). Разом з тим, еозинофіли сприяють ремоделюванню та відновленню тканин шляхом вивільнення факторів, що стимулюють

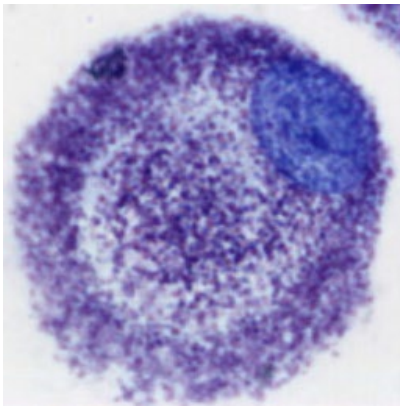


Рис. 5. Схематичне зображення мастоциста [4]

проліферацію фібробластів і вироблення колагену та впливають на позитивну селекцію Т-клітин у тимусі [9-10]

Мастоцисти, також відомі як тучні клітини, секретують прозапальні медіатори (гістамін, цитоціни, протеази); беруть участь у імунних відповідях, регулюючи активацію, диференціацію та роботу Т- та НК-клітин. [5]

Базофіли морфологічно споріднені з тучними клітинами, беруть участь у підтриманні алергічних реакцій, продукують цитокіни, задіяні у алергічних реакціях (IL-4 та IL-13), можуть бути АПК, впливати на диференціацію Т-хелперів тощо. [11]

1.1.1. Характеристика моноцитів

Циркулюючі моноцити – це фагоцитарні клітини вродженого імунітету (лейкоцити), які є попередниками тканинно-резистентних макрофагів або ДК і відносяться до системи мононуклеарних фагоцитів. Тривалість життя моноцита людини перед трансформацією складає 1-3 доби. [5]

З морфологічної точки зору моноцити – це великі округлі або ниркоподібні клітини діаметром 12-20 мкм з ниркоподібним ядром та великою кількістю лізосом і гранул. [12]

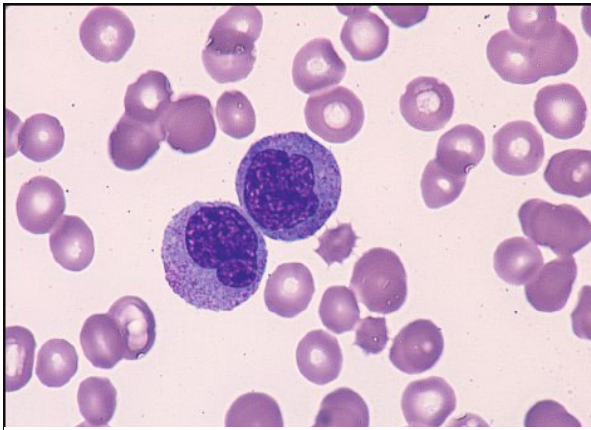


Рис. 6. Моноцити у мазку периферичної крові людини x100 [17]

Моноцити становлять 10% лейкоцитів у крові людини і 4% лейкоцитів у крові миші. Частка циркулюючих моноцитів змінюється не лише у відповідь на запалення, а й залежно від монопоезу, тканинної інфільтрації та їх вивільнення з центральних (у кістковому мозку) або периферичних (у тканинах) резервуарів [12-14].

Моноцити експресують різноманітні поверхневі маркери за рівнями експресії яких відбувається поділ на CD14⁺⁺CD16⁻ популяцію (дуже високий рівень експресії CD14 – 80-90% від усіх моноцитів, так звані «класичні моноцити»); і решта 10-20% CD14⁻CD16⁺ («некласичні»), а також проміжна популяція, яку почали відокремлювати в окрему популяцію відносно недавно. На співвідношення субпопуляцій моноцитів може впливати вік, фізичні вправи та загальний фізіологічний статус організму. [12; 14-16]

Також моноцити експресують маркери CD11b, CD64, CD115, CD163, CCR2 і CX3CR, за рівнями експресії яких їх можна поділити на більше підмножин. [12; 14–16]

Поділ на класичні та некласичні моноцити за рівнем експресії маркерів CD14 та CD16, а також їх співвідношення характерний лише для людей. Наприклад, у мишей аналог «класичних» моноцитів характеризується експресією поверхневих маркерів LybC⁺⁺, а «некласичних» LybC⁻. При цьому їх кількісне співвідношення у мишей приблизно 1:1. [12; 14]

Тривалість життя некласичних моноцитів є довшою за тривалість життя класичних і складає приблизно 2 доби у мишей і 7 діб у людей. При цьому

тривалість життя моноцитів Ly6C- можна подовжити до 2 тижнів, що залежить від наявності критичного фактору CSF1, який регулює підтримку моноцитів/макрофагів. Можливість подовження тривалості життя неklasичних моноцитів може забезпечити постійну кількість клітин навіть за патологічних умов, коли більшість класичних моноцитів залучаються до периферичних запальних уражень або коли їхній функціональний перехід у неklasичні моноцити блокується через запальні стимули [14].

Морфологічна гетерогенність моноцитів стає більш вираженою у

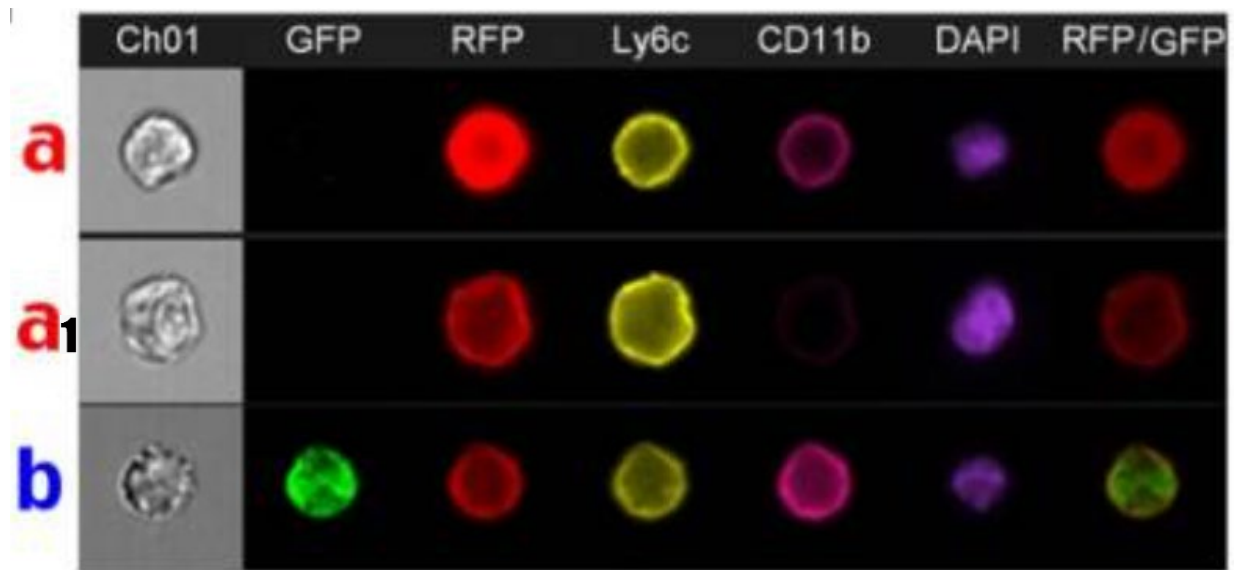


Рис. 7. Зображення типових моноцитів кісткового мозку мишей, отримане під час проточної цитофлуориметрії: a – CCR2RFP+ CX3CR1GFP-Ly6C+ CD11b+; a1 – CCR2RFP+ CX3CR1GFP-Ly6C+ CD11b-; b – RFP+/GFP++ CCR2RFP+ CX3CR1GFP-Ly6C+ CD11b+ [18]

відповідь на запалення та під час імунної відповіді організму. У звіті [19] було продемонстровано морфологічні зміни нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів у пацієнтки 58 років з цукровим діабетом, гіпертонією та позитивним ПЛР тестом на Covid-19. Більш детальні морфологічні зміни моноцитів представлені на рисунку 8.

На основі яскраво вираженої клінічної картини зміни морфології клітин автори [19] припускають можливість використання периферичного мазку крові як методу базового скринінгу на Covid-19 під час очікування результатів ПЛР. А також пропонують його використання для моніторингу перебігу захворювання.

Питання гетерогенності моноцитів досі не є вирішеним повністю.

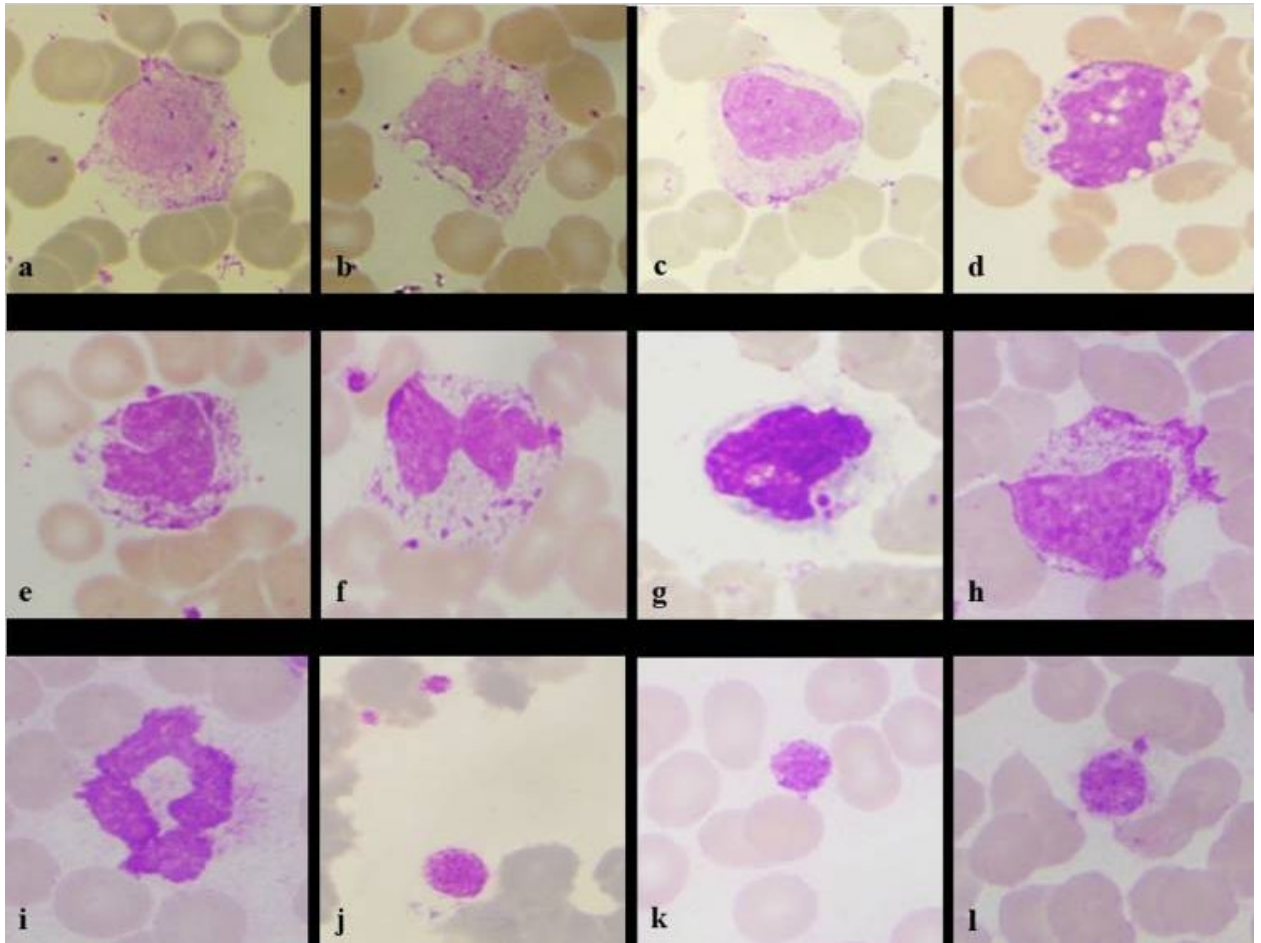


Рис. 8. Морфологічні зміни моноцитів під час Covid-19: а – неправильний контур цитоплазми; б – цитоплазматична вакуолізація с – ядерна бульбашка; д – інтерцитоплазматична та внутрішньоядерна вакуолізація; е - підковоподібні ядра; ф – дволопатевий та тромбоцитарний сателітизми; г – поглинений тромбоцит; h – підвищена зернистість цитоплазми; і – цільцеподібні клітинні плями; к – гігантські тромбоцити; л – адгезія тромбоцитів. Знімок плями Лейшмана x100 [20]

Сьогодні перед дослідниками стоїть задача у визначенні, чи перетворюються окремі популяції моноцитів на специфічні популяції макрофагів (або значення ніші переважає при диференціації), та чи можна використовувати зміну експресії різних маркерів у діагностичних цілях [16].

1.1.2. Загальна схема гемопоезу та утворення моноцитів

Гемопоез – це процес кровотворення, який є спільним для більшості хребетних. Він характеризується рядом характерних змін у клітині-попередниці з втратою тотипотентності та набуттям високої специфічності, що

призводить до створення усіх популяцій циркулюючих клітин крові. Ця модель схожа на дерево, що розростається з єдиного стовбура і поступово утворює велику крону. [14]

Процес гемопоезу починається з невеликого за кількістю пулу гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) – клітин-попередниць усіх інших клітин крові, які знаходяться у кістковому мозку. У популяції ГСК частка клітин здатні до самовідновлення для поповнення пулу крові, а інші клітини йдуть одним з двох шляхів: перетворюються на загальні клітини-попередниці мієлоїдного (КПМР) або лімфоїдного (КПЛР) ряду. КПЛР утворює лімфоїдні клітини, включаючи Т-, В- та НК-клітини. КПМР в свою чергу дають початок клітинам мієлоїдного ряду – мегакаріоцитам та попередникам еритроцитів, гранулоцитів і макрофагів. [14]

КПМР диференціюються на попередників мегакаріоцитів та еритроцитів або на попередників гранулоцитів і макрофагів, які в свою чергу утворюють гранулоцитарну або моноцитарно-макрофагову/дендритну клітину-попередник (МДКП). МДКП – біпотентна клітина, що перетворюється на загального попередника ДК (ПДК) або на загального попередника моноцитів (ПМ). А ПМ вже здатні диференціюватися у моноцити. [14]

Також важливо зазначити, що деякі клітини-попередниці, які знаходяться ще в недиференційованому стані можуть демонструвати загальний поверхневий маркерний профіль зрілих клітин. Тож процес диференціації клітини крові є скоріш поступовою зміною клітини, а не чітким переходом від одного типу до іншого. [14]

Слідування моноцитарній лінії диференціації підтримується низкою гемопоетичних факторів росту та транскрипції. Наприклад, SPI1 (кодується PU1), IRF8, GATA2, KLF4. Видалення цих факторів призводить до порушення складу ПМ у кістковому мозку, що спричиняє редукцію кількості периферичних моноцитів. [14]

При цьому IRF8 і KLF4 створюють регуляторний контур, оскільки ектопічна надмірна експресія саме цих факторів змогла частково усунути дефіцит моноцитів. При цьому аутосомно-рецесивна недостача IRF8 у людей призводить до зменшення кількості циркулюючих моноцитів. [14]

У мишей VASH2 є негативним регулятором диференціації моноцитів, адже миші з дефіцитом цього білку показали підвищений рівень моноцитів. [14]

Загальну схему гемопоезу у мишей з позначеними основними факторами транскрипції у шляху утворення моноцита можна побачити на рис. 9.

Хоча твердження, що усі моноцити походять з кісткового мозку, є загальноприйнятим, існує припущення, що частина моноцитів може походити з селезінки. Воно ґрунтується на дослідженнях, які виявили частину МДКП і ПМ у селезінці здорових мишей з одночасною відсутністю попередників моноцитів у циркулюючій крові. Разом з тим селезінка є периферичним резервуаром як класичних, так і некласичних моноцитів. [14; 20]

Також при запаленні та патологічних станах, коли організму необхідне швидке залучення мієлоїдних клітин до місць ураження, можливий обхід класичного шляху утворення моноцитів МДКП-ПМ у процесі екстреного монопоезу. У такому разі альтернативними попередниками виступають КПМР або МПКП без стадії ПМ. Складністю під час вивчення процесів альтернативного дозрівання моноцитів є те, що на сьогоднішній день не було запропоновано надійних способів ідентифікації моноцитів, диференційованих альтернативним шляхом від звичайних моноцитів. [14]

Одним із найважливіших хемокінів є MCP1 (моноцитарний хемоаттрактантний білок 1), який рекрутує моноцити CD14⁺⁺ у людей завдяки високій експресії рецептора клітинної поверхні CCR2. Потім під впливом клітинних ніш (КСФ, IL-4) відбувається імпринг у макрофаги зі змінами в апоптозі, метаболічних шляхах, програмах транскрипції, формі і розмірі клітини. За повідомленнями [16] PAQR11 та AdipoQ регулюють диференціацію моноцитів у макрофаги *in vitro* та *in vivo*.

Після диференціювання зрілі клітини адаптуються до місцевого середовища і функціонують як резидентні макрофаги, можуть зазнавати поляризації в залежності від дії мікрооточення на про- (M1) чи протизапальний (M2) фенотипи. [5]

Процес диференціації моноцитів у макрофаги є достатньо добре вивченим, проте молекулярні механізми цих подій не були ще достатньо добре висвітлені. [13]

Інший варіант долі моноцита – залучення у тканини без подальшої диференціації у макрофаги для підтримання пулу моноцитів у тканинах. За певних запальних обставин ці моноцити вивільняються в кровообіг і екстрений екстрамедулярний моноцитоз посилюється IL-1 β -залежним способом. Це одна зі стратегій розвитку моноцитів мишей Ly6C⁺. У такому випадку вони демонструють мінімум транскрипційних змін. Такі резервуари моноцитів були знайдені у легенях та шкірі [14]

Продемонстровано, що мобілізовані моноцити селезінки швидко рекрутуються до пошкоджених тканин при атеросклерозі та ішемічній хворобі серця. [14]

Альтернатива для моноцитів Ly6C⁺ – перехід у моноцити Ly6C⁻ у кістковому мозку замість виходу у кровоток. Цьому процесу сприяють дельта-подібні сигнали від ендотеліальних клітин, які взаємодіють з NOTCH2 на моноцитах Ly6C⁺ і полегшують їх перетворення. [14]

Моноцити Ly6C⁺ та Ly6C⁻ біологічно взаємопов'язані, доказом чого також є дослідження на епігенетичному рівні, оскільки обидві підмножини

моноцитів використовують переваги того самого репертуару промоторів і лише демонструють незначні відмінності в організації хроматину. Ці відмінності зумовлені встановленням енхансерів *de novo* та активацією енхансерів шляхом ацетилювання гістонів. Єдиний визначений на сьогоднішній день енхансер, специфічний для моноцитів – Nr4a1 (E2). Схема його роботи така: KLF2 і C/EBP β зв'язуються E2, що індукує експресію Nr4a1. [14; 21-22]

На молекулярному рівні перетворення з класичних моноцитів на некласичні супроводжується посиленням C/EBP β , NR4A1 і KLF2. Відсутність NR4A1 призводить до зниження виживаності та кількості моноцитів Lu6C-.

1.1.3. Різноманітність і функції моноцитів-макрофагів

Поняття моноцитарно-макрофагальної системи було введене наприкінці 1960-х років. Введення цього формулювання було обґрунтоване подібністю у морфології, функціях, походженні та кінетиці фагоцитів. У цій роботі резюмували, що промоноцити кісткового мозку діють як попередники циркулюючих моноцитів, які згодом можуть диференціюватися у тканинні макрофаги. У наступні десятиліття вважалося, що моноцити є попередниками усіх макрофагів [14; 23]

Але з плином наукового прогресу висновок щодо того, що усі макрофаги походять з моноцитів поставили під сумнів. Наступні дослідження показали, що популяції певних тканинних резидентних макрофагів не залежать від притоку моноцитів:

- Відсутність впливу індукованої моноцитопенії на кількість тканинних макрофагів;
- Визначення появи макрофагів у ембріогенезі до моменту формування остаточного кровотворення. [14]

Хоча більшість тканинно-резистентних макрофагів походять від ембріональних попередників, циркулюючі моноцити здатні диференціюватися в тканинні макрофаги кісток кісткового мозку, мікроглії, гістіоцитів, клітин Купфера, селезінки, ШКТ, серця, шкіри тощо. Кількість макрофагів, що були диференційовані з моноцитів відрізняється у різних типах тканин. [13; 15]

Класичні моноцити – це тимчасова популяція з високою здатністю до диференціації. Під час запалення вони мають чіткі функції, які не можуть бути виконані макрофагами. Перш за все вони оснащені програмою експресії генів, що надає їм змогу мігрувати до тканин навіть у гомеостатичних умовах (чого позбавлені неklasичні моноцити), тому найвідоміша функція моноцитів – бути системним резервуаром мієлоїдних попередників для оновлення деяких тканинних макрофагів і ДК. Моноцити можуть набувати запальних, регенеративних або АПК здібностей, потрапляючи в запалені тканини. [12; 14; 15, 24]

Також моноцити відіграють важливу роль у гомеостазі через здатність до знищення апоптотичних та патогенних клітин, їхніх ліпідів та інших токсичних сполук у організмі під час запальних процесів. Моноцити здатні виробляти ряд цитокінів (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α). Крім того, моноцити активують систему комплементу, зокрема C3 і C4 [12; 14-15, 24]

Сучасні дослідження показали, що система моноцитів-макрофагів виконує надзвичайно широкі та різноманітні регуляторні функції, включаючи ауторегуляцію кісткового мозку. [24]

Однак оновлення тканинних макрофагів і ДК не залежить виключно від моноцитів крові, адже деякі тканинні популяції макрофагів здатні підтримувати свій рівень і без надходження моноцитів, у той час як інші потребують постійного поповнення. [12]

Наприклад, довго вважалося, що макрофаги кишечника вимагають постійного залучення моноцитів, а самопідтримання цієї популяції макрофагів неможливе, проте згодом виявилось, що кишечник містить серед інших

макрофаги T1M4+CD4+, які здатні самопідтримуватися протягом місяців без поповнення пулу моноцитами. [14]

Існує припущення, що задля постійного залучення моноцитів у тканини необхідне тонічне запалення, адже вільні від бактерій особини показали зменшення рівня макрофагів, отриманих з моноцитів. [14]

Якщо говорити про функції неklasичних моноцитів, то у мишей було виявлено, що неklasичні моноцити безперервно контролюють кровоносні судини в фізіологічних умовах стану спокою LFA/ICAM-залежним механізмом зв'язування на ендотеліальних клітинах. Цей процес можна зустріти у артеріолах, венулах та капілярах. Також CD14- моноцити людини показали аналогічну поведінку при адаптивному донорстві людських моноцитів мишам. Цей процес дозволяє неklasичним моноцитам ефективно очищати мікрочастинки просвіту і сприяє загальній цілісності ендотеліальних клітин васкулатури [14; 25]

Згідно тверджень [12] через велику роль у розвитку та підтриманні запалення, моноцити відіграють також важливу роль у розвитку довгострокових запальних захворювань (артрит і атеросклероз), а також у загальному старінні тканин та цілого організму. Це не є їх функцією, а скоріше побічним ефектом, але на цей факт необхідно зважати у контексті розгляду впливу моноцитів на розвиток хвороб.

Проблемою у дослідженнях моноцитів є їх легка зміна поведінки під час маніпуляцій на кшталт ізоляції, очищення, культивування *in vitro* тощо. [12]

1.2 Вплив деяких лікарських препаратів і біотехнологічних продуктів на характеристики моноцитів-макрофагів

Для детального розгляду було обрано біотехнологічні препарати, які досліджуються на нашій кафедрі (кафедра Молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна),

так як дана робота є частиною Project Based Learning. Тому нижче буде обговорено вплив молозива, мікс-фактору та вітаміну А на показники моноцитів крові.

1.2.1 Вплив молозива на фактори імунітету

Молозиво (лат. colostrum) - секрет молочної залози ссавців, що виробляється в останні дні вагітності та в перші дні після пологів. Це густа жовтувата речовина, що виробляється молочними залозами. Молозиво служить початковим джерелом харчування для новонароджених та забезпечує їх необхідними поживними речовинами, а також факторами імунітету, факторами росту та іншими корисними компонентами. [26]

Молозиво відрізняється від грудного молока як за складом, так і за функціями. Хоча кількість молозива порівняно незначна, але концентрація поживних речовин та імунних стимуляторів є значно вищою, ніж у молока. Це має вирішальне значення у розвитку здоров'я новонародженого. [26]

За даними різних авторів молозиво містить:

- Антитіла (sIgA; IgA, IgM, IgG);
- Лізоцим;
- Лактоферин;
- Цитокіни (IL-6, TGF- β , IL-8, IL-10, КСФ тощо);
- Фактори росту, які підтримують ріст, відновлення та розвиток тканин;
- Вітаміни (А, Е, К)
- Мікроелементи (Са, Mg, Zn)
- Трансфер-фактори тощо. [3; 26-27]

Крім того, молозиво забезпечує створення здорового мікробіому ШКТ, сприяє «запуску» травлення у новонароджених і полегшує перше виведення відходів з травної системи. [3]

Хоча природня задача молозива – забезпечення новонароджених поживними речовинами та формування імунітету, концентрація поживних речовин і дослідження, що вказують на імуномодулюючий ефект у людей різного віку призвело до створення ряду препаратів та БАДів на основі молозива. [28-29]

Наприклад, трансфер-фактори, які отримують у тому числі з молозива великої рогатої худоби сьогодні активно використовуються для посилення імунної відповіді та для терапії при ПКС у людей різного віку. Крім того, їх можна доволі легко придбати і вони широко представлені на ринку [29]

Так як молозиво – природній імуномодулятор, то вплив на рівень моноцитів є очікуваним. У дослідженні [28] було показано, що телята, які отримували молозиво мали вищий рівень моноцитів ($4,76 \times 10^9/\text{л}$) у порівнянні з контролем, що отримував замітник молозива ($0,06 \times 10^9/\text{л}$). Також у таких телят був вищий рівень нейтрофілів.

Таким чином, молозиво та препарати з нього мають значний сприятливий вплив на біохімічні та морфологічні показники препаратів крові, зокрема і на моноцити.

1.2.2 Вплив мікс-фактору на фактори імунітету

Мікс-фактор – це БАП з яскраво вираженою антиоксидантною активністю, що впливає на АПК. Цей комплекс низькомолекулярних білків полісахаридів і вітамінів був отриманий з *Pleurotus ostreatus* і *Saccharomyces cerevisiae*. Допускається, що активність або експресія МФ може мати модулюючий ефект на окисно-відновний баланс, потенційно впливаючи на процес старіння та тривалість життя тварин [13]

Згідно з роботою [30] компоненти МФ активували ізоформи глутатіонпероксидази, локалізовані в різних компартментах клітин печінки, еритроцитів і сироватки крові. Ферменти сімейства глутатіонпероксидази захищають організм від окисного стресу, що також пов'язано з функціями

макрофагів та дією окисного вибуху під час оксиген-залежного фагоцитозу. [31]

Введення субстанції МФ змінює імунометаболічні характеристики та формує новий імунний «ландшафт» в організмі, що впливає серед іншого і на рівень моноцитів. МФ брав участь у активації клітинної ланки імунітету при фіброзі печінки. [24; 31-32]

Також у більш ранніх досліджах цієї добавки було продемонстровано, що вона усуває патологічні прояви, індуковані іонами важких металів, у тому числі Cu-індукований фіброз печінки [30-32].

У відповідь на введення щурам препарату МФ спостерігається збільшення кількості фагоцитів та фагоцитарного індексу, при цьому активність киснезалежного фагоцитозу дещо знижується [13].

У відповідь на запалення, спричинене введенням щурам плазми крові людей з ПКС, було показано збільшення рівня моноцитів майже у 2 рази, також щури продемонстрували зміни гематологічних показників у відповідь на введення МФ без елементу запалення. Детально зміни числа моноцитів можна побачити у Таблиці 1.

Таблиця 1

Зміна рівня числа моноцитів у дослідженні [13]	
Контрольна група	0.33 ± 0.09
3-разове введення МФ	0.73 ± 0.28
3-разове введення ПКС сироватки	0.63 ± 0.15
3-разове введення МФ + 3-разове введення ПКС сироватки	0.67 ± 0.18

За зміною рівня кількості моноцитів та гранулоцитів, автори [13] приходять до висновку, що МФ має виражену імунотропну дію та активує проліферацію та диференціювання клітин крові.

1.2.3 Вплив вітаміну А на фактори імунітету

Він відноситься до жиророзчинних вітамінів. З хімічної точки зору вітамін А – це група ненасичених одноатомних спиртів, які мають ациклічне кільце. Вітамін А існує у вигляді ретинолу, ретиналю та ретиноєвої кислоти (РК). При чому РК виявляє найбільшу біологічну активність. [29]

Перетворення ретинолу на РК відбувається під час двостадійної окислювальної реакції (рис. 10):

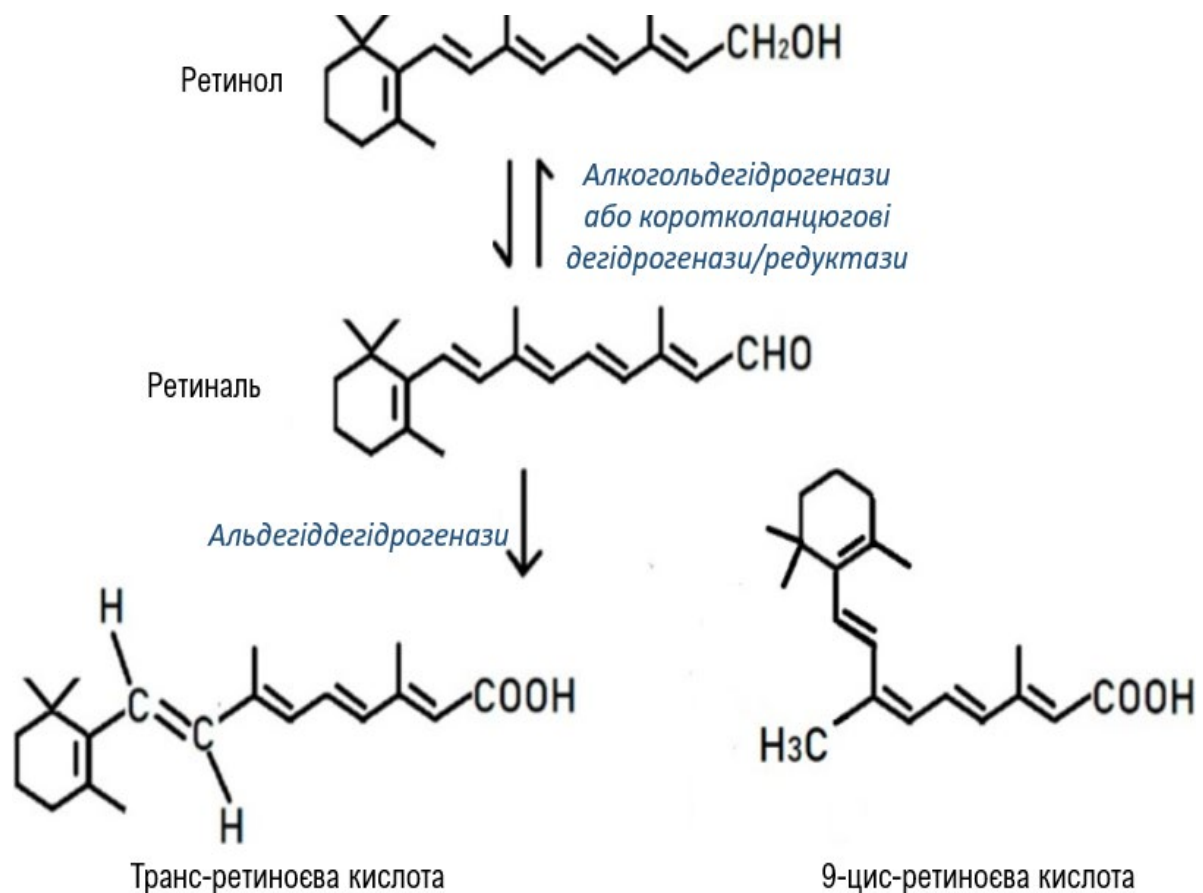


Рис. 10. Схема утворення РК з ретинолу [29]

- 1) ретинол перетворюється на ретиналь під дією каталітичних ферментів групи алкогольдегідрогеназ або деяких коротколанцюгових дегідрогеназ/редуктаз, які мають широку спорідненість до спиртів та альдегідів
- 2) ретиналь каталізується у РК під дією альдегіддегідрогеназ. [29]

Добре вивченим є значення вітаміну А у підтримці зору, захисті епітелію та слизу, рості та розвитку. Вітамін А відіграє вирішальну роль у морфологічному формуванні та кератинізації епітелію, стратифікації, диференціації та функціональному дозріванні епітеліальних клітин. Оскільки вітамін А впливає на слизовий шар як дихальних шляхів, так і ШКТ, сприяючи секреції муцину, то це також має опосередкований ефект на АГ неспецифічний імунітет. [29]

За умов дефіциту вітаміну А епітеліальні клітини зменшуються і різні типи епітелію можуть перетворюватися на багатошаровий ороговілий епітелій. Це має негативний вплив на клітини шкіри, ШКТ, дихальних шляхів, сечостатевої системи та рогівки і здатне призводити до таких клінічних симптомів як сухість шкіри, діарея, кашель, сухість чи помутніння рогівки, сечокам'яна хвороба, зниження рівня вродженого імунітету тощо. [29]

Якщо говорити про прямий вплив на імунітет, то вітамін А має протизапальні функції, через що його інколи називають «протизапальним вітаміном». Крім того, він бере участь у регулюванні як клітинних, так і гуморальних імунних реакцій, відіграє роль у розвитку та зміцненні імунної системи в цілому. РК сприяє проліферації і регулює апоптоз тимоцитів. Було показано, що ретиноїди модулюють експресію кератинів і муцинів, лімфопоез, апоптоз, продукцію цитокінів, функцію нейтрофілів, НК-клітин, моноцитів, макрофагів, Т- і В-лімфоцитів, а також вироблення імуноглобуліну [29; 33]

Дефіцит вітаміну А призводить до збільшення кількості мієлоїдних клітин у кістковому мозку, що вказує на його роль у нормальному апоптозі клітин кісткового мозку. Припускається, що вітамін А регулює популяцію клітин кісткового мозку через зв'язування рецептора РК у ядрі клітин кісткового мозку, що змінює рівень експресії генів апоптозу (Bcl-2, Fas тощо). [29]

РК відіграє вирішальну роль у регуляції диференціювання, дозрівання та функцій клітин вродженого імунітету. Згідно з дослідженням [40], вітамін А

необхідний для правильного розвитку та диференціювання CD169+ макрофагів товстої кишки.

Транс-ретиноева кислота індукує диференціювання моноцитів у бік лінії макрофагів, але при цьому пригнічує вивільнення факторів запалення макрофагів, таким чином спонукаючи M1 у кістковому мозку до трансформації в M2, що призводить до пригнічення запалення. [29]

При цьому роботи, присвячені дослідженню впливу вітаміну А на розвиток фіброзу печінки демонструють неоднозначні результати.

У щурів з Cu-індукованим фіброзом печінки введення вітаміну А призводить до збільшення рівня моноцитів порівняно з контрольними тваринами на 94%. Більш детальний результат дослідження [17] представлений у Таблиці 2.

Таблиця 2

Зміна числа моноцитів як реакція на введення вітаміну А щурам з Cu-індукованим синдромом у дослідженні [33]	
Контрольна група	0.17 ± 0.17
Група з фіброзом	0.25 ± 0.05
Група з фіброзом і введенням вітаміну А	0.33 ± 0.15

Спираючись на те, що введення вітаміну А тваринам з Cu-індукованим фіброзом печінки підвищує вміст моноцитів (і гранулоцитів), автори [33] приходять до висновку, що введення вітаміну А призводить до активації клітинної ланки імунної системи, що також підтверджується більш ранніми роботами.

1.3. Роль моноцитів при різних патологіях печінки

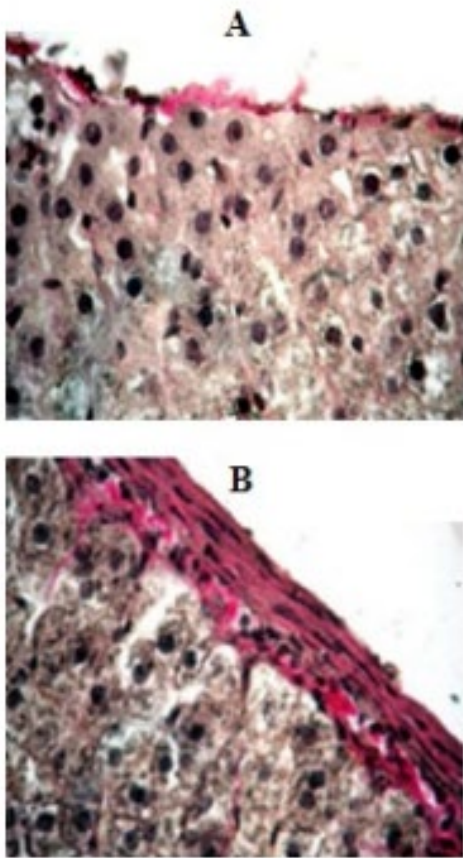


Рис. 11. Мікрофотографія печінки інтактних тварин (А) і печінки тварин з Си-індукованим фіброзом печінки. Збільшена фокусна відстань Х400 [32]

Печінка є унікальним вродженим імунним середовищем і виконує важливі функції імунного нагляду під час гомеостазу. Вона має подвійне кровопостачання, тому постійно піддається впливу циркулюючих АГ, патогенів, асоційованих із патогенами токсинів і сигналів небезпеки, які надходять зі шлунково-кишкового тракту, через ворітну вену або з системного кровообігу через артеріальну кров. [34]

Так як печінка виступає однією з ліній захисту організму, вона відіграє центральну роль у регуляції толерогенних і запальних реакцій. Для таких цілей анатомічно печінці

притаманні висока концентрація кровоносних судин, повільний кровотік через синусоїдальну систему та високопроникний фенестрований ендотелій, що забезпечує прямий доступ до імунних клітин печінки з кровотоку. [34]

У печінці міститься велика популяція тканинних макрофагів (інтрасинусоїдних клітин Купфера), які функціонують як домінуючі фагоцити в печінці та складають понад 80% макрофагів здорової людини. Також печінка містить нейтрофіли, ДК, Т- та НК-клітини, які формують імунні відповіді. Усі ці клітини організовані таким чином, аби максимізувати скринінг системних і кишкових патогенів, і уникати їх поширення. [34]

Хоча макрофаги підтримують гомеостаз, вони також важливі у відповідях на пошкодження печінки. Збільшення кількості печінкових макрофагів – одна з ознак гострого ураження печінки. Макрофаги відіграють ключову роль у ініціації та прогресуванні захворювань печінки. Під час пошкодження пул макрофагів печінки збільшується за рахунок рекрутування моноцитів, які дозрівають *in situ* в макрофаги та сприяють як розвитку, так і зникненню запалення. Дослідження мишей виявили, що на кожні 100 гепатоцитів приходить 20-40 макрофагів. [34]

Через здатність до зміни фенотипу макрофаги у печінці під час запалення мають багато функцій, які включають в себе як руйнування тканин, так і подальше їх відновлення, очищення, ремоделювання тощо. Макрофаги печінки виділяють активні форми кисню/азоту та запальні цитокіни і хемокіни. [34]

Запалення печінки може бути ініційоване різними DAMP і PAMP. Вони є основним компонентом імунопатології різноманітних захворювань печінки, включаючи хронічну та гостру хронічну печінкову недостатність, цироз, алкогольне захворювання, фіброз та рак печінки. [34]

1.3.1. Алкогольна хвороба печінки

У більшості людей з хронічним алкоголізмом (F10.2 за МКХ-10) розвивається паралельно жирова печінка (K76.0 за МКХ-10), що може прогресувати у алкогольний гепатит (K70.1). K70.1 характеризується запаленням печінки та збільшенням розмірів гепатоцитів. Алкогольний гепатит може перерости у фіброз (K74.0), цироз (K70.3) чи карциному печінкових клітин (C22.0) [2; 35-36]

Механізми розвитку алкогольних хвороб печінки (K70.0) залишаються невивченими, але припускається, що у цьому процесі важливу роль можуть

відігравати взаємозв'язки печінки та органів ШКТ. Було показано зв'язок між розвитком K70.0 і підвищенням рівня запальних цитокінів, що виробляються у відповідь на мікробну транслокацію ліпополісахаридів і пептидогліканів у людей. Мікробна транслокація – це процес, при якому бактерії чи бактеріальні продукти, які мають бути у просвіті кишечника, потрапляють у системний кровотік, що спричиняє запалення та патогенез. [2; 34; 37]

Крім того, у здорових мишей спостерігалось підвищення конверсії класичних моноцитів у неklasичні за NOD-2 залежним механізмом у відповідь на пептидоглікан мураміддипептид. [14]

У здорових людей ін'єкції ендотоксичного ліпополісахариду спричинили швидке зниження моноцитів у перші 2 години після введення, а потім послідовний ріст рівня класичних, проміжних і неklasичних моноцитів.

Однозначно було показано збільшення рівня моноцитів у людей з алкогольними хворобами печінки на відміну від здорової контрольної групи. Крім того, проточна цитофлуорометрія показала збільшення відсотку проміжних та неklasичних моноцитів та зменшення класичних моноцитів у людей з K70.0. [2]

1.3.2. Гостра печінкова недостатність

Гостра печінкова недостатність (K72.0 за МКХ-10) та хронічна печінкова недостатність (K72.1) мають різні клінічні прояви, але обидві вважаються синдромами вродженої імунної дисфункції. Вони характеризуються локальним запаленням печінки, що ускладнюється системним запаленням і подальшою системною імуносупресією. У пацієнтів спостерігаються симптоми декомпенсації печінки, що супроводжується системною запальною відповіддю, яка включає ендотеліальну дисфункцію та може прогресувати до поліорганної недостатності зі сприйнятливістю до вторинних інфекцій. [34]

Гостра печінкова недостатність – це рідкісний стан, при якому за відсутності хронічного захворювання печінки виникають коагулопатія,

жовтяниця та печінкова енцефалопатія у контексті гострого ураження печінки. Також наслідком K72.0 є гепатоцелюлярна втрата величини печінки зі швидкістю, яка перевищує регенеративну здатність. [34]

У більшості країн світу основною причиною K72.0 є гострий вірусний гепатит. У Великобританії та США основна причина – передозування парацетамолу, яке також характеризується швидким прогресуванням симптомів протягом кількох днів. Значну меншість випадків і повільніший перебіг хвороби становлять ідіосинкратичні реакції на ліки, ішемічні ураження печінки, аутоімунний гепатит і серонегативні захворювання. [34]

Перебіг гострої печінкової недостатності (який є спільним з перебігом гострої хронічної печінкової недостатності, особливості якої уточнені у розділі 1.3.3 Гостра хронічна печінкова недостатність цієї роботи) можна розглянути у вигляді наступних стадій:

1. Загибель гепатоцитів відбувається в тому числі некротичним шляхом, що спричиняє вивільнення DAMP (наприклад, HMGB-1 або гістонів, що у позаклітинному просторі діють як DAMP), які посилюють секрецію прозапальних цитокінів.
2. Клітини Купфера експресують рецептори DAMP, наприклад P2X7, TLR4, TLR9 і RAGE, опосередковуючи початкову реакцію на пошкодження. Після передозування парацетамолом в гепатоцитах індукується окислювальний стрес, що спричиняє пряме пошкодження мітохондрій, які, вивільняють розпізнавані клітинами Купфера DAMP.
3. Моноцити кісткового мозку рекрутуються в печінку та диференціюються в запальні макрофаги, розширюючи пул макрофагів і сприяючи руйнуванню тканин
4. Системна запальна відповідь провокує зростання вивільнення цитокінів макрофагами та моноцитами, що сприяє дисфункції ендотелію судин, порушенню мікроциркуляції і призводить до дисфункції позапечінкових органів

5. Паралельно розвивається протизапальний синдром, що виражається функціональним перепрограмуванням макрофагів в бік відновлювального фенотипу у відповідь на дію протизапальних цитокінів. Це сприяє розсмоктуванню та відновленню тканин, що у подальшому розвивається як імуносупресія і зумовлює сприйнятливність до інфекційних ускладнень. [34]

1.3.3 Гостра хронічна печінкова недостатність

Гостра хронічна печінкова недостатність (K72.1), навпаки, виникає у пацієнтів із наявним захворюванням печінки. За визначеннями 2014 року Всесвітньої гастроентерологічної організації, гостра хронічна печінкова недостатність – це синдром у пацієнтів із хронічним захворюванням печінки з або без раніше діагностованим цирозом, який характеризується гострою печінковою декомпенсацією, що призводить до печінкової недостатності (жовтяниця + тривале міжнародне нормалізоване співвідношення) і однією або більше позапечінковою органною недостатністю, яка пов'язана зі збільшенням смертності протягом 28 днів і до 3 місяців від початку перебігу хвороби. [34]

При гострій печінковій хронічній недостатності початковою подією може бути загибель гепатоцитів меншого об'єму, яка спричиняє вивільнення DAMP і розвиток запалення. Або системна інфекція може призвести до розвитку хвороби, що посилюється впливом PAMP. [34]

Збільшення кількості макрофагів у відповідь на запалення печінки спричинене інфільтрацією моноцитів CCR2+ Ly6C+, які пізніше диференціюються у макрофаги. При чому саме експресія CCR2/CCL2 і CCR5 є вирішальною для рекрутування моноцитів до печінки. [34]

Дослідження [38] показує, що у пацієнтів з парацетамол індукованою гострою хронічною печінковою недостатністю рівень CCL2 у проміжних

моноцитах підвищений. Також у них був підвищений рівень моноцитів S100A8/9+ у зонах некрозу печінки. Протизапальне мікрооточення печінки (CCL2, IL-10, TGF- β тощо) у таких пацієнтів залучає ці клітини до відновних реакцій. Проте важкість перебігу хвороби у них обернено пропорційна кількості моноцитів та прямо корелює з рівнем CCL2, що свідчить про те, що пацієнти з гіршими результатами залучали більше моноцитів до печінки.

Те, чи будуть рекрутовані моноцити сприяти запаленню, або матимуть протизапальний ефект, а також їх роль у пошкодженні печінки залежить від стадії перебігу захворювання. [34]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У даній роботі аналізувалися механізми та результати досліджень, проведених на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

2.1. Дослідження мікс-фактору

Дослідження у роботі [13] складалося з 2 етапів:

- 1) Клінічного: було проведено оцінку деяких імунологічних показників пацієнтів ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України». У пацієнтів з патологіями ШКТ через 2 місяці після вірусної інфекції визначали лейкоцитарний профіль, імунологічні показники та наявність антитіл IgG до SARS-CoV-2.
- 2) Клінічному: щурів *Wistar* імунізували сироваткою крові пацієнтів із ПКС та визначали деякі гематологічні параметри, клітинні та сироваткові характеристики. Тварини були розділені на чотири групи. Тваринам контрольної (I) групи вводили фізіологічний розчин об'ємом 0,1 мл. Для вивчення впливу біоактивної речовини МФ у дозі 0,05 мл/100 г маси тіла згідно з протоколом вводили II групі. III групі тварин тваринам підшкірно вводили 0,1 мл/100 г маси тіла ПКС сироватку згідно з протоколом. IV група отримувала профілактичний пероральний МФ у дозі 0,05 мл/100 г маси тіла, а через 24 години після останньої дози вводили ФКС сироватку згідно з протоколом. Кожна дослідна група складалася з 5 дорослих самців віком 3-4 міс.

Усі тварини містилися в стандартних умовах утримання та мали вільний доступ до їжі та води. Експерименти на тваринах проводилися за згодою Комітету з біоетики В.Н. Каразіна [39], та відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин для експериментальних

та інших наукових цілей (Страсбург) за рекомендаціями 18.03.2018 р. 1986. [40]

Схема досліду над тваринами представлена на рис. 12



Рис. 12. Схема досліду [13]. На схемі показана часова послідовність введення препаратів дослідним тваринам чотирьох груп. Визначення досліджуваних параметрів проводили в усіх групах одночасно. Така схема маніпулювання тваринами дозволяла виключити вплив циркадних ритмів на досліджувані параметри

2.1.1. Кількісний аналіз імунокомпетентних клітин

За допомогою проточної цитометрії визначили абсолютні рівні лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів і нейтрофілів. Кров відбирали в пробірки з КЗ ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для подальшого дослідження гематологічних показників на автоматичному аналізаторі Mindray BC-2800 Vet (США).

2.1.2. Статистичний аналіз

Дані представлені як середнє (\bar{x}) і стандартна помилка (SE). Достовірні відмінності між групами визначали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні (U-критерію). Відмінності між контрольною та дослідною групами проводили на рівні значущості $p < 0,05$. Статистичний аналіз проводили за допомогою програми STATISTICA 10 (Statsoft, США).

2.2 Дослідження Вітаміну А

Досліди на тваринах проводилися за погодженням з Комітетом з біоетики В.Н. Каразіна, керуючись положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [40].

Дослід проводили на молодих 3 місячних щурах-самцях лінії Wistar. Протягом експерименту тварин утримували в стандартних умовах з вільним доступом до їжі та води. Вибірка досліджуваних тварин є випадковою.

Дослідній групі ($n=68$) для індукції фіброзу печінки тричі внутрішньочеревно вводили мідний купорос з інтервалом між ін'єкціями 48 годин. Контрольна група ($n=27$) отримувала фізіологічний розчин замість сульфату міді.

Після цього для моделювання стану гіпервітамінозу на тлі фіброзних змін у печінці вводили олійний розчин вітаміну А в концентрації 300 МО на 100 г маси тіла (90 мкг/100 г маси тіла). Ця доза була визначена у попередніх дослідженнях, вона забезпечувала терапевтичний ефект і не призводила до токсичності. Групу тварин ($n=34$), які отримували лише вітамін А, використовували як контроль для групи з фіброзом, яка отримувала вітамін А.

Після 4, 7, 14 і 21 дня ін'єкції вітаміну А вилучали 3-5 щурів з кожної групи, залежно від експериментальної серії для відбору матеріалу.

Схема дослідження представлена на рис. 13

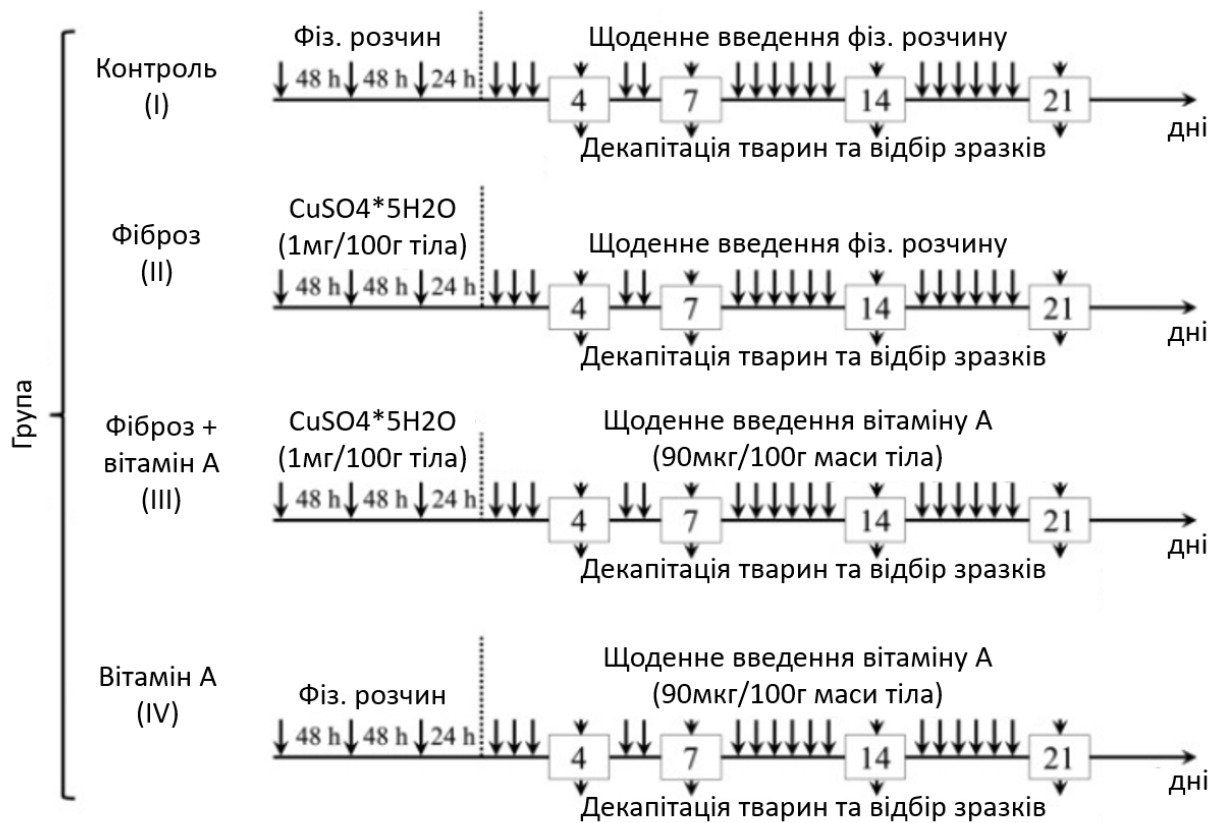


Рис. 13. Схема дослідження

Тварин декапітували під ефірним наркозом. Після декапітації оцінювали наявність і об'єм сполучної тканини між частками печінки і жирової тканини, вираженої в умовних одиницях. Першу кров відбирали в пробірки з ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для дослідження гематологічних показників, які оцінювали на автоматичному аналізаторі Mindray BC-2800 Vet. (США), і оцінювали фагоцитарну активність нейтрофілів гепарином *in vitro*¹⁶, а також отримували сироватку. Для цього

зразки центрифугували при 1500 g протягом 20 хвилин після утворення згустку.

Для забору гістологічного матеріалу брали фрагменти печінки, які фіксували в 10% розчині формаліну. Зразки направляються, як описано в [9].

Решта печінка ділилася на 3 частини. Першу частину використовували для оцінки регенерації печінки *in vitro* за методом В.С. Хавінсона модифікації Н. І. Чалісової [41].

У 2 частині визначали вміст іонів міді.

У 3 частині визначали вміст вітаміну А як описано у роботі [43].

2.2.1. Оцінка регенерації печінки *in vitro*

Органотипові посіви печінки були отримані за методом В.С. Хавінсона модифікації Н. І. Чалісової. Фрагменти печінки розміром 1×1 см поміщали в 0,9% розчин натрію хлориду («Юрія Фарм», Україна). Охолодити заготовки до температури +26°C. Циліндричні експланти виділяли та поміщали на живильне середовище (90% середовище DMEM/F12, 10% фетальна бичача сироватка (Biowest, Франція), 50 мкг/мл гентаміцину («Здоров'я», Україна) у стерильні одноразові пластикові чашки Петрі (Biosigma, Італія) та амфотерицин (БіолоТ, Росія)) інкубували при 37,0 ± 0,5 °C протягом 48 годин в умовах гіпоксії та високої концентрації вуглекислого газу.

Розраховували ступінь адгезії (DA) – відношення кількості прикріплених експлантів до загальної кількості експлантів. Для цього на отриманих фотознімках культур визначали площі центральної зони (зони експлантації) та периферійної зони (зони відчуження та росту) за формулою:

$$AI(\%) = \left(\frac{CZ+GZ}{CZ} \times 100\% \right) - 100\%, de$$

CZ – площа центральної зони (експланта), мм²

GZ – зона росту, мм²

2.2.2. Визначення вмісту іонів міді в біологічних пробах

Визначення вмісту іонів міді у внутрішньоклітинних фракціях печінки проводилося методом електротермічного розпилення атомно-абсорбційної спектрометрії (ААС) на спектрофотометрі КАС 120 модель С 115-МІ (Україна). Вміст міді визначали шляхом попереднього висушування печінки та розчинення 50 мкг зразка в 2 мл суміші сірчаної та азотної кислот (1:1).

Принцип методу ААС заснований на вимірюванні рівня поглинання світла, що проходить через атомні пари зразка (324,7 нм для Cu^{2+}). Омічний опір графітової комірки (розпилювача) при проходженні струму забезпечує її нагрівання до 2500°C, ця температура необхідна для переходу Cu^{2+} в газоподібний стан.

2.2.3 Визначення вмісту вітаміну А

Вміст вітаміну А в печінці визначали за методикою, яка базується на комплексоутворенні вітаміну з ефіратом трифториду бору та визначенні швидкості розпаду цього комплексу згідно з [44].

2.2.4. Статистичний аналіз

Дані представлені як групові середні та стандартні помилки ($\bar{x} \pm SE$). Аналіз даних проводили за допомогою Excel 2013 (Microsoft Corporation., США) та STATISTICA 8 (Statsoft, США). Візуалізацію проводили за допомогою Microsoft Excel Package 2013.

За даними виявлено достовірні відмінності між групами: динаміка маси тіла, визначена за допомогою непараметричного тесту Манна-Уїтні, зміни

біохімічних показників та вмісту вітамінів – r/ANOVA, показники для оцінки регенеративного потенціалу печінки – тест Манна-Уїтні U для індексу площі та тест Фішера для ступеня адгезії (пропорція проби).

Відмінності між контрольною та експериментальною групами вважалися достовірними при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дані щодо дослідження мікс-фактору

3.1.1 Гематологічні та імунологічні показники у пацієнтів з ПКС та патологіями ШКТ

Кількість лейкоцитів у пацієнтів з ПКС через 2 місяці після гострої фази не відрізнялася від референсних значень. Ці дані наведені у Таблиці 3.

Таблиця 3

Кількість та швидкість лейкоцитів у пацієнтів з ПКС [24]		
Тип клітин	Референтні значення	Пацієнти з ПКС
Лейкоцити, $\times 10^9$ г/л	6.5 ± 1.6	6.71 ± 2.8

Спонтанний рівень киснезалежного фагоцитозу, індикатора утворення активних форм кисню у відповідь на NADPH-H за відсутності стимуляції зимозаном, був підвищений у 3,7 рази у пацієнтів із ПКС порівняно з референсними значеннями. Ці результати представлені на рис. 14.

Додавання зимозану до суспензії фагоцитів не стимулювало подальший фагоцитоз; він залишався майже на спонтанному рівні. Низький рівень індексу стимуляції киснезалежного фагоцитозу ($1,44 \pm 0,45$) порівняно з еталонним ($7,5 \pm 1,87$) також свідчить про відсутність можливості додаткової стимуляції фагоцитозу у пацієнтів з ПКС.

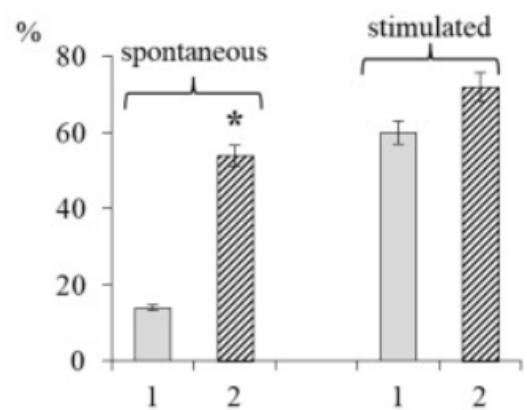


Рис. 14. Рівні спонтанного та стимульованого оксизалежного фагоцитозу у 1 – референсних груп; 2 – пацієнтів з ПКС [24]

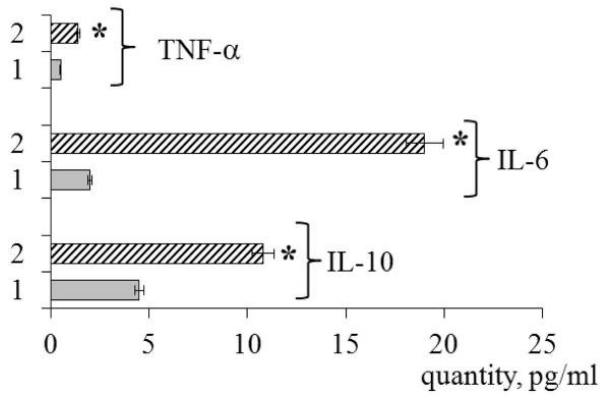


Рис. 15. Рівні TNF- α , IL-6, IL-10 у 1 – референтних груп; 2 – пацієнтів з ПКС

У пацієнтів з ПКС була підвищена TNF- α в 3 рази у пацієнтів з PCS. Тоді як зазвичай при гострих вірусних інфекціях він не перевищує референтних значень. Прозапальний IL-6 був у 15 разів вищим у пацієнтів з ПКС, досягаючи 30,2 пг/мл порівняно з контрольним рівнем 2,0 пг/мл. Ці пацієнти також мали 2-кратне

збільшення протизапального IL-10. Дані представлені на рис. 15.

У довгостроковій перспективі прозапальний IL-18, який належить до сімейства IL-1, був значно підвищений у пацієнтів з патологіями шлунково-кишкового тракту та ПКС. Слід зазначити, що в обстежених пацієнтів із тривалим перебігом захворювання спостерігалася висока варіабельність цього цитокіну – від 400 до 2500 пг/мл при референтному значенні від 261,0 до 360,3 пг/мл. Дані представлені на рис. 16

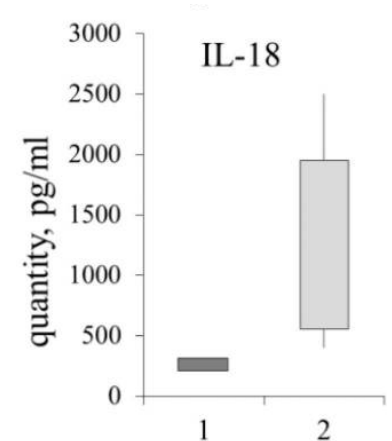


Рис. 16. Рівень IL-18 у референтних групах та у пацієнтів з ПКС

Встановлено, що поглинання компонентів сироватки крові у пацієнтів з ПКС у олігопептидній фракції (при $\lambda = 238$ нм) знижується на 23%, у пептидній фракції (при $\lambda = 254$ нм) підвищується на 33%, у нуклеотидній фракції (при $\lambda = 260$ нм) зросла на 30%, а оптична щільність у ароматичній амінокислотній фракції (при $\lambda = 280$ нм) зросла на 55% порівняно з референтними значеннями. Слід зазначити, що спостережуване підвищення пептидного та нуклеотидного компонентів у сироватці крові хворих ПКС може свідчити про дисфункцію мітохондрій та їх структурні порушення. Детальні дані наведені у Таблиці 4.

Спектри поглинання компонентів сироватки крові у пацієнтів з ПКС порівняно з референтними значеннями			
Довжина хвилі, нм	Фракція	Референтні значення	Значення у пацієнтів з ПКС
238	Олігопептидна	0.620±0.012	0.502±0.017
254	Пептидна	0.240±0.011	0.319±0.078
260	Нуклеотидна	0.240±0.010	0.312±0.019
280	Ароматичних амінокислот	0.250±0.018	0.383±0.116



Рис. 17. Ступінь лімфоцитотоксичності сироватки в тесті Тerasакі (А) та інтегральний коефіцієнт цитотоксичності в клітинному тесті з *D. viridis* (В) у здорових донорів (1) і пацієнтів з ПКС (2). Представлені середні значення для 16 пацієнтів і стандартні помилки ($x \pm SE$). * – $P < 0,05$ порівняно з контрольними значеннями (U тест)

компонентів, що виробляються у пацієнтів із ПКС, оскільки мікроводорості є рослинними об'єктами. Це підтверджує широку токсичність DAMP у сироватці крові. Результати тестів на цитотоксичність представлені на рис. 17

Таким чином, через 2 місяці у пацієнтів із патологією ШКТ та ПКС розвинулася специфічна гуморальна картина, яка включала в себе також неспецифічні цитотоксичні компоненти. Ці компоненти можуть викликати пошкодження різних тканин в організмі та утворювати відбитки патогенних мікроорганізмів. Тому можна було очікувати, що введення компонентів сироватки таких пацієнтів експериментальним тваринам призведе до виражених імунних і фізіологічних реакцій.

На наступному етапі роботи експериментальним тваринам вводили сироватку крові хворих на ПКС і визначали важливі імунофізіологічні показники.

3.1.2. Оцінка цитотоксичності сироватки крові пацієнтів з ПКС на тваринах та можливість модифікації дії цих сироваток шляхом попереднього введення тваринам біологічно мікс-фактору

Після введення сироватки хворим на ПКС спостерігалися зміни деяких фізіологічних особливостей тварин: підвищення температури тіла на 1,5-2,5 градуси, зниження маси тіла, легка діарея. Порівняно з контрольною групою кількість лейкоцитів у цих тварин зросла на 59%, лімфоцитів – на 51%, гранулоцитів – на 76%, моноцитів – майже в 2 рази.

Введення тваринам лише МФ не вплинуло на кількість лейкоцитів і лімфоцитів, а кількість гранулоцитів і моноцитів збільшилася на 59 і 120 % відповідно порівняно з контролем. Профілактичне введення субстанцій МФ експериментальним тваринам перед введенням сироваток хворих на ПКС не змінювало кількості гранулоцитів на рівні контролю. Кількість інших типів імунокомпетентних клітин була на тому ж рівні, що й у тварин, яким вводили лише сироватку крові хворих на ПКС. Детальні дані щодо зміни рівня числа імунокомпетентних клітин у тварин у дослідженні [16] представлений у таблиці 5.

Таблиця 5

Показники крові дослідних тварин [16]				
Клітини	Схема проведення експерименту			
	Контроль	Мікс-фактор	ПКС	Профілактичний МФ + ПКС
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	11.9±1.27	13.8±0.58	18.9±2.34	19.07±5.22
Лімфоцити, 10 ⁹ /л	8.3±0.78	7.87±1.05	12.53±1.03	13.47±3.82
Гранулоцити, 10 ⁹ /л	3.27±0.49	5.2±0.5	5.77±1.19	4.93±1.24
Моноцити, 10 ⁹ /л	0.33±0.09	0.73±0.28	0.63±0.15	0.67±0.18

Таким чином, компоненти сироватки крові хворих на ПКС індукували посилення проліферації та диференціації імунокомпетентних клітин у щурів, тоді як профілактичне введення МФ практично не впливало на цей процес.

Виявилося, що зимозан не активував фагоцити, отримані від тварин, яким вводили сироватку пацієнтів із ПКС. Отримані результати показали, що киснезалежний фагоцитоз досяг функціональної межі у тварин, яким вводили сироватку крові хворих на ПКС, що також характерно і для самих хворих на ПКС.

При введенні тваринам лише субстанції МФ спостерігалось збільшення кількості фагоцитарних клітин та фагоцитарного індексу порівняно з контролем. У таких тварин активність кисневозалежного фагоцитозу була дещо знижена. Враховуючи, що МФ викликають у тварин збільшення кількості моноцитів і гранулоцитів, можна вважати, що він має значну імунну дію та активує проліферацію та диференціювання клітин крові.

3.2. Дослідження впливу вітаміну А

3.2.1. Токсична дія іонів міді та вплив вітаміну А на деякі фізіологічні та анатомічні показники

Багаторазові послідовні ін'єкції мідного купоросу щурам призвели до більшої смертності піддослідних тварин, які отримували мідний купорос: у групі з 34 тварин 41% загинули протягом 21 дня (періоду спостереження). Дані смертності та виживання щурів у кожній групі, а також відсоток особин з фіброзними утвореннями навколо печінки представлені у Таблиці 6.

Таблиця 6

Кількість тварин, що вижили після інтоксикації мідним купоросом, а також наявність сполучнотканинних утворень навколо печінки у відсотках до загальної кількості тварин у групі					
Група	Кількість тварин	Виживання		Фіброзні утворення печінки у тварин, %	
		Число виживших	Летальність, %	Відсутність	Наявність
Контроль (I)	27	27	0	100	0
Купорос (II)	34	20	41	25	75
Купорос + віт. А (III)	34	32	6	9	91
Вітамін А (IV)	34	34	0	100	0

Маса тіла тварин груп, яким вводили мідний купорос, знижувалася в першу добу після введення мідного купоросу і починала відновлюватися через 5-6 діб, однак відновлення тварин відставало від контролю протягом усіх днів спостереження.

Багаторазові послідовні ін'єкції мідного купоросу призводять до розростання сполучної тканини навколо печінки, що є проявом «спайкової» хвороби. У 75% тварин, що вижили в II групі (прийом мідного купоросу) спостерігався інтенсивний синтез сполучної тканини, що супроводжувалося утворенням спайок між частками печінки та утворенням спільної сполучної капсули тканин навколо печінки, а в деяких випадках і селезінки. Тим часом у 25% тварин, які отримували мідний купорос, не було спайок навколо печінки; печінка анатомічно не відрізнялася від контрольної. Приклад фіброзної печінки та печінки контрольної групи з цього дослідження зображений на рис. 18

1



2



Рис. 18. Печінка в групі інтактних тварин без сполучнотканинних утворень (1) і печінка з сполучнотканинними утвореннями з утворенням фіброзної капсули (2)

У печінці тварин, які отримували вітамін А, анатомічних змін, у тому числі індукції росту сполучної тканини, не виявлено.

При щоденному введенні тваринам вітаміну А після 3 ін'єкцій мідного купоросу кількість загиблих тварин не перевищувала 6% (III група), тобто смертність зменшилась у 6,8 разів порівняно з групою тварин, які отримували тільки мідний купорос. При цьому швидкість росту тварин III групи перевищувала показники контролю (I група) та значно перевищувала показник

тварин, які отримували лише сульфат міді (II група) і не відрізнялася від тварин, які отримували лише вітамін А (IV група).

Водночас у III групі тварин, у 91% тварин, що вижили, спостерігався ріст щільної сполучної тканини, що є вищим показником, ніж у тварин, які отримували лише ін'єкції мідного купоросу.

Так, повторні серійні ін'єкції вітаміну А тваринам після інтоксикації мідним купоросом значно знижували загибель тварин, а у тих тварин, які вижили, збільшувалася кількість сполучної тканини навколо печінки. За приростом маси тіла ці тварини перевищували контрольну групу. Можна припустити, що розростання сполучної тканини або «зрощення» є проявом пристосувальної реакції організму.

3.2.2 Морфологія печінки та ознаки фіброзу

Інтоксикація іонами міді супроводжувалася морфологічними змінами в тканині печінки, характерними для токсичного ураження. Були наявні аутоліз гепатоцитів, дисконфлексія печінкових пучків, наповнення судин кров'ю, редукція простору Діссе та наявність у ньому клітин Іто, дистрофія ендотелію, потовщення капсули печінки тощо. На рис. 19 представлені мікрофотографії патологічних змін у морфології печінки піддослідних тварин.

У тварин з індукованим фіброзом при прийомі вітаміну А, спостерігалися більш виражені зміни порівняно з простим фіброзом печінки. При цьому зменшується наповнення тканини печінки, що є прямою ознакою ішемічних проявів органу і непрямою – підвищеного вмісту токсинів (метаболітів, іонів металів тощо).

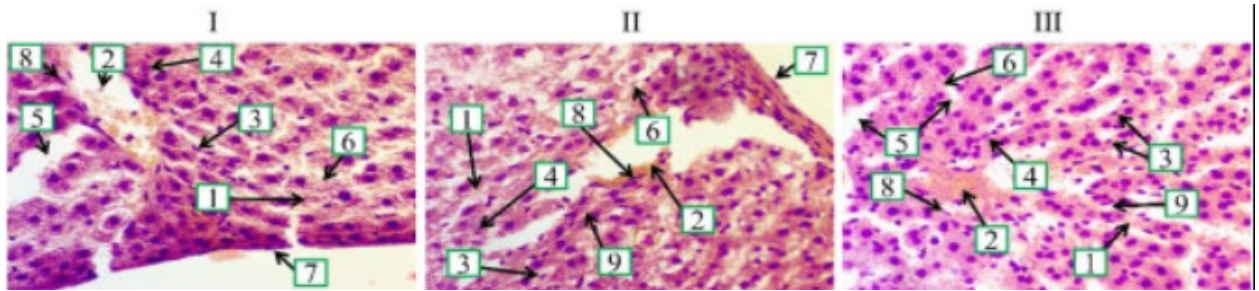


Рис. 19. Мікрофотографії препаратів печінки контрольних тварин I; II та III груп; мікроскоп GRANIUM R6003, камера SIGETA M3CVOS 14000, збільшення 400×; відзначено такі структури: 1 – дисконплексація печінкових пучків, 2 – кровоносна судина, 3 – клітини Іто, 4 – лімфоцити, 5 – множинні розриви тканин, 6 – аутоліз гепатоцитів, 7 – капсула печінки, 8 – ендотеліоцити, 9 – простір Діссе

Ці зміни вказують на активацію імунної системи після ін'єкцій вітаміну А на тлі індукованого міддю фіброзу. Можна припустити, що ін'єкції вітаміну А посилюють індукцію адаптаційних реакцій організму на вплив токсичних сполук.

3.2.3. Функціональна активність печінки

Про функціональну активність печінки судили за активністю аланінамінотрансферази (АЛТ), гамма-глутамінтрансферази (ГГТ), рівнем сечовини та креатиніну в сироватці крові. Встановлено, що через 7 діб підвищеного вмісту іонів міді в печінці активність АЛАТ знижується, що характерно для ранньої стадії розвитку фіброзу, і підвищується порівняно з контролем на 21 добу спостереження. Активність ГГТ також трохи зросла на 7 день і залишилася на контрольному рівні на 21 день. Рівні сечовини та креатиніну залишалися на контрольних рівнях.

Таким чином, незважаючи на деякі порушення в структурі печінки та індукцію запальних процесів, функціональна активність печінки була близькою до контрольних значень, що свідчить про початкову стадію фіброзу.

Коли тварини з фіброзом печінки отримували вітамін А щодня протягом 7 днів поспіль, активність АЛТ не відрізнялася від такої в контрольній групі і була на 26% нижчою, ніж у фіброзних тварин на 21 день, досягаючи контрольної групи.

Активність ГГТ після введення вітаміну А у фіброзних тварин була подібною до контрольних груп на 7 добу від початку експерименту. Так, його активність була знижена на 31% після ін'єкції вітаміну А порівняно з фіброзом, який не відрізнявся від інтактного контролю.

Судячи з вмісту в сироватці крові сечовини та креатиніну, введення вітаміну А експериментальним тваринам із Си-індукованим фіброзом не впливало на діяльність видільної системи.

Співвідношення досліджуваних показників проілюстроване на рис. 21

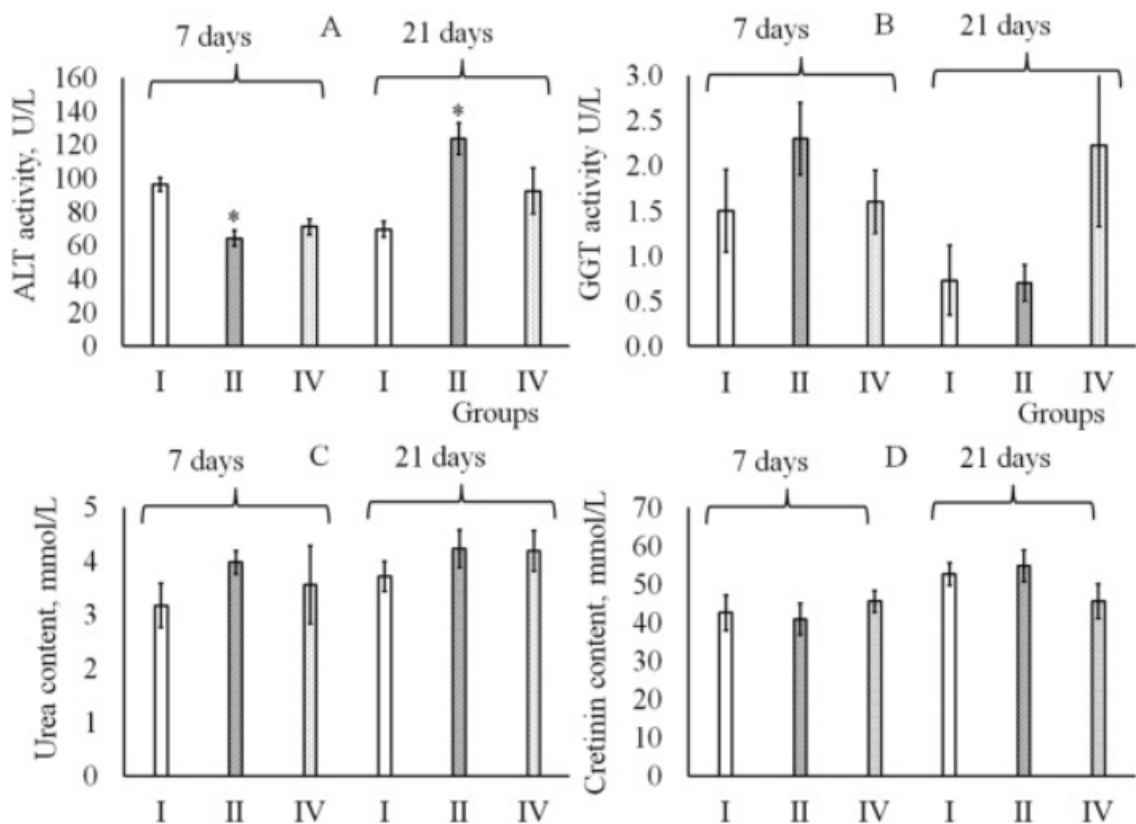


Рис. 20. Активність АЛТ (А), ГГТ (В), сечовини (С) і креатиніну (D) у сироватці крові на 7-му та 21-му дні у тварин I, II та III груп; * – відзначаються значущі значення ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем (t/ANOVA). Розподіл дослідних груп (n = 5 тварин на групу).

Можна зробити висновок, що підвищення вмісту вітаміну А в печінці при Си-індукованому фіброзі призводить до нормалізації активності АЛТ і ГГТ, функціональна активність печінки не відрізняється від контролю.

3.2.4. Показники крові тварин

Підвищення вмісту іонів міді в печінці суттєво не вплинуло на кількісні показники клітин крові через 7 діб після останнього введення іонів міді. Кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну в еритроцитах, гематокрит порівняно з контролем не змінювалися. Введення вітаміну А тваринам з фіброзом не впливало на кількість еритроцитів.

Кількість клітин крові у дослідних тварин на 7 день після початку введення вітаміну А представлена у таблиці 7

Таблиця 7

Кількість деяких типів клітин у крові дослідних груп тварин через 7 днів після введення вітаміну А			
Клітини крові	Група тварин		
	I	II	III
Абсолютне число лейкоцитів, $10^9/л$	9.20 ± 0.10	6.65 ± 1.25	11.85 ± 1.85
Абсолютне число гранулоцитів, $10^9/л$	1.83 ± 0.29	2.50 ± 0.70	2.90 ± 0.85
Абсолютне число моноцитів, $10^9/л$	0.17 ± 0.17	0.25 ± 0.05	0.33 ± 0.15

Абсолютне число еритроцитів, $10^{12}/л$	8.54 ± 0.67	8.07 ± 0.51	8.42 ± 0.29
Гемоглобін, г/л	145.33 ± 10.20	142.50 ± 2.5	146.33 ± 4.06
Гематокрит, %	44.43 ± 3.12	43.25 ± 0.95	44.97 ± 1.04

У групі інтактного контролю було приблизно $9 \cdot 10^9$ лейкоцитів/л, тоді як у тварин із фіброзом їх кількість була знижена на 28-30 % порівняно з контрольною групою. Введення тваринам вітаміну А після інтоксикації іонами міді супроводжувалося збільшенням кількості лейкоцитів на 78%, що перевищує контрольний рівень.

Введення вітаміну А призводило до збільшення кількості гранулоцитів і моноцитів на 58% і 94% порівняно з контрольними тваринами, що свідчить про активацію клітинних зв'язків імунної системи.

ВИСНОВКИ

У даній роботі було досліджено головним чином роль моноцитів при індукованому фіброзі печінки, а також вплив певних речовин (а саме вітаміну А, мікс-фактору та молозива) на кількісні та якісні показники моноцитів.

У результаті, були отримані наступні висновки:

1. Було обґрунтовано актуальність дослідження: проаналізовано схему розвитку фіброзу печінки та супутніх патологій, їх причини, прогнози перебігу хвороби та наслідки як для окремого індивідуума так і для сфери суспільного здоров'я.
2. Досліджено взаємозв'язок між моноцитами та їх функціями та фракціями інших імунокомпетентних клітин, зокрема, макрофагів та дендритних клітин.
3. Розглянуто роль моноцитів у формуванні імунних реакцій при системному запаленні, зокрема, при патологіях печінки.
4. Вивчено зміни кількісних та якісних показників моноцитів при різних патологіях (фіброз печінки, Covid) та при впливі деяких біотехнологічних речовин (молозиво, вітамін А, мікс-фактор).
5. Підтверджено імунотропні властивості мікс-фактору та молозива, гепатопротекторні властивості вітаміну А.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tang, Chaoliang, et al. Liver regeneration: changes in oxidative stress, immune system, cytokines, and epigenetic modifications associated with aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022.
2. Maccioni, Luca, et al. Toll-like receptor 2 activation in monocytes contributes to systemic inflammation and alcohol-associated liver disease in humans. *Hepatology Communications*, 2023, 7.5.
3. Brandtzaeg, Per. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of pediatrics*, 2010, 156.2: S8-S15.
4. Marshall, Jean S., et al. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2018, 14.2: 1-10.
5. Crooke, Stephen N., et al. Immunosenescence: a systems-level overview of immune cell biology and strategies for improving vaccine responses. *Experimental gerontology*, 2019, 124: 110632.
6. Barry, Kevin C., et al. A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nature medicine*, 2018, 24.8: 1178-1191.
7. Mayer, Christian Thomas, et al. Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103+ dendritic cells from mouse bone marrow. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2014, 124.20: 3081-3091.
8. Auffray, Cedric; sieweke, Michael H.; geissmann, Frederic. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, 2009, 27: 669-692.
9. Melo, Rossana CN; Weller, Peter F. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *Journal of leukocyte biology*, 2018, 104.1: 85-93.0000
10. Fujieda, Shigeharu, et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergology international*, 2019, 68.4: 403-412.

11. Siracusa, Mark C., et al. Basophils and allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 132.4: 789-801.
12. ZIEGLER-HEITBROCK, Loems; HOFER, Thomas PJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology*, 2013, 4: 23.
13. Klimova, Elena M., et al. Low molecular weight cytotoxic components (DAMPs) form the post-COVID-19 syndrome. *Immunobiology*, 2023, 228.1: 152316.
14. Guilliams, Martin; mildner, Alexander; YONA, Simon. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*, 2018, 49.4: 595-613.
15. Mosser, David M.; edwards, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*, 2008, 8.12: 958-969.
16. Lin, Yijun, et al. Paqr11 modulates monocyte-to-macrophage differentiation and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunology*, 2021, 163.1: 60-73.
17. Won, Elizabeth, et al. Management of a patient diagnosed with pancreatic cancer and myelodysplastic syndrome. *Gastrointestinal Cancer Research: GCR*, 2013, 6.2: 56.
18. Semba, R. D. Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1999, 58.3: 719-727.
19. Chen, Hong-Ru, et al. Monocytes promote acute neuroinflammation and become pathological microglia in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Theranostics*, 2022, 12.2: 512.
20. Tummidi, Santosh; SHANKARALINGAPPA, Arundhathi. Peripheral smear in COVID 19: a case report. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 2021, 43: 545-547.
21. Hettinger, Jan, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature immunology*, 2013, 14.8: 821-830.
22. Mildner, Alexander, et al. Genomic characterization of murine monocytes reveals C/EBP β transcription factor dependence of Ly6C⁻ cells. *Immunity*, 2017, 46.5: 849-862. e7.
23. Kang, Yoon-Koo, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous

- chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 2017, 390.10111: 2461-2471.
24. Van furth, rzjjwh, et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 1972, 46.6: 845.
25. Kurguzova, N. I., Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Al Begai, M. A. Y., Goltvyansky, A. V., Alsardia, M. M. A., & Bozhkov, A. A. (2015). Interconnection of antitoxic and antioxidant systems of the organism under the action of natural low molecular complex–fungidol. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, 2(6-1), 25-32.
26. Gelman, Andrew, et al. *Bayesian data analysis*. CRC press, 2013.
27. Garofalo, Roberto. Cytokines in human milk. *The Journal of pediatrics*, 2010, 156.2: S36-S40.
28. Lönnerdal, Bo. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *The Journal of pediatrics*, 2010, 156.2: S26-S30.
29. Grigaleviciute, Ramune, et al. The Influence of feeding with colostrum and colostrum replacer on major blood biomarkers and growth performance in dairy calves. *Veterinary Sciences*, 2023, 10.2: 128.
30. Трансфер Фактор [Електронний ресурс] // Компанія 4life в Україні – Режим доступу до ресурсу:
https://4life.od.ua/?gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jEP1pHJiH4TbSpryalKqsPowpUcoGSwL6KNMvBvCKjJT1XZGDQ5ZCdBoC8NAQAvD_BwE.
31. Bozhkov, a. I., et al. Low-molecular weight components of cow colostrum regulate bone marrow functions by modelling the redox-system of the organism. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2020, 11.2: 272-277.
32. Antoniades, c. G., et al. Visualizing spatial distribution of alectinib in murine brain using quantitative mass spectrometry imaging. *Hepatology*, 2012.

- 33.Bozhkov, Anatoly, et al. “Mix-Factor” is involved in the regulation of the organism's redox systems in the late stages of ontogenesis and affects the lifespan of animals. *Ageing and longevity*, 2021, 2.2: 24-36.
- 34.Bozhkov, Anatoly I., et al. Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2023, 13.1: 48-63.
- 35.Hiemstra, Ida H., et al. The identification and developmental requirements of colonic CD 169+ macrophages. *Immunology*, 2014, 142.2: 269-278.
- 36.ICD-10 [Електронний ресурс] // 2019 – Режим доступу до ресурсу: <https://icd.who.int/browse10/2019/en#/F10>.
- 37.Формуляр ЛК. Класифікатори [Електронний ресурс]. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: <http://kod.poltavalk.com.ua/>.
- 38.Zevin, Alexander S., et al. Microbial translocation and microbiome dsybiosis in HIV-associated immune activation. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2016, 11.2: 182.
- 39.Triantafyllou, Evangelos, et al. The role of monocytes and macrophages in acute and acute-on-chronic liver failure. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 2948.
- 40.Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells // *Journal of Experimental Medicine*. 1999. Vol. 189(7). P. 1139-48.
- 41.Ausems, e. J. The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. In: *zeitschrift fur versuchstierkunde*. Villengang 2, d-07745 jena, germany: gustav fischer verlag jena, 1986. p. 219-219.
- 42.Chalisova, n. I.; korovin, a. E.; menshikov, n. O. Influence of encoded amino acids and their combinations on the development of organotypic liver culture. *Clin Pathophysiol*, 2019, 25: 50-55.
- 43.Huang, Zhiyi, et al. Role of vitamin A in the immune system. *Journal of clinical medicine*, 2018, 7.9: 258.

44. Vahl, h. A.; van 't klooster, A. Th. Effects of excessive vitamin A levels in broiler rations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1987, 57.1-5: 204-218.
45. Pechkurenko, A, et. al. Method of drying and embedding histological material in paraffin and coloring of sections using isopropyl alcohol. *Selected Issues of Forensic Examination*. 1998, 69-70
46. Bozhkov, a. I., et al. Low molecular weight components from various sources eliminate oxidative stress and restore physiological characteristic of animals at early stages of Cu-induced liver fibrosis development. *Translational Biomedicine*, 2017, 8.2: 2172-0479.1000107.