

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ ХАРКІВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Дослідження механізмів регуляції утворення сполучнотканинного
матриксу в разі ушкодження печінки, та роль клітин Іто в цьому
процесі**

Допуск до захисту

«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота
студентки кафедри молекулярної
біології та біотехнології
Панкратової Альони Олександрівни

Науковий керівник:
д-р. біол. наук, Божков А.І.

Завідувач кафедри _____

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 20 р.

Харків 2024

Панкратова А.О. Дослідження механізмів регуляції утворення сполучнотканинного матриксу в разі ушкодження печінки, та роль клітин Іто в цьому процесі. Дипломна робота магістра: 61 с., 17 рисунків, 49 використаних джерел.

Метою теоретичної частини роботи стало дослідження складу позаклітинного матриксу у здоровій печінці та його зміни при пошкодженнях печінки, а також роль у розвитку фіброзу печінки. Була досліджена участь клітин Іто у прогресуванні захворювань печінки та умови активації цих клітин. Практична частина роботи присвячена впливу вітаміну А тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки та на виживання тварин при отриманні летальних доз токсину з попереднім вживанням різних доз вітаміну А.

Експериментальна частина містить в собі індукцію фіброзу печінки з використанням сірчаноокислої міді та оцінки впливу вітаміну А на Cu-індукований фіброз. На протязі усього експерименту фіксувалася маса тварин. Через 20 днів експерименту з введенням одного або двох циклів сірчаноокислої міді піддослідним тваринам визначалися гематологічні та біохімічні показники, було проведено гістологічне дослідження печінки.

Велика кількість випадків захворювання печінки, в тому числі фіброзу, вимагає детального вивчення процесів та механізмів, задіяних у їхньому розвитку. Зміни у позаклітинному матриксі є однією з основних причин розвитку фіброзу печінки, а клітини Іто є одним з основних джерел компонентів матриксу у печінці. Активація клітин Іто розглядається як ключовий процес у розвитку фіброзу печінки, тому детальне вивчення цього процесу сприяє пошуку методів лікування цього захворювання печінки.

Ключові слова: *позаклітинний матрикс, клітини Іто, фіброз печінки, активація клітин Іто, вітамін А.*

Pankratova A.O. Research into the mechanisms of regulation of connective tissue matrix formation in case of liver damage, and the role of Ito cells in this process. Master's thesis: 61 pages, 17 figures, 49 sources used.

The aim of the theoretical part of the work was to study the composition of the extracellular matrix in a healthy liver and its changes in liver damage, as well as the role in the development of liver fibrosis. The participation of Ito cells in the progression of liver diseases and the conditions of activation of these cells were investigated. The practical part of this work is looked at the effect of vitamin A on animals with Cu-induced liver fibrosis and on the survival of animals after receiving lethal doses of the toxin with the previous use of different doses of vitamin A.

The experimental part includes the induction of liver fibrosis using copper sulfate and the assessment of the effect of vitamin A on Cu-induced fibrosis. The weight of the animals was recorded throughout the experiment. After 20 days of the experiment with the one or two cycles injection of copper sulfate to the experimental animals, hematological and biochemical parameters were determined, and a histological examination of the liver was performed.

The large number of cases of liver disease, including fibrosis, requires a detailed study of the processes and mechanisms involved in their development. Changes in the extracellular matrix are one of the main causes of liver fibrosis, and Ito cells are one of the main sources of matrix components in the liver. Activation of Ito cells is considered a key process in the development of liver fibrosis, so a detailed study of this process contributes to the search for methods of treating this liver disease.

Key words: *extracellular matrix, Ito cells, liver fibrosis, activation of Ito cells, vitamin A.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Анатомія печінки та характеристика її клітин	8
1.2. Механізм розвитку фіброзу печінки.....	10
1.3. Позаклітинний матрикс	12
1.3.1. Склад та характеристика позаклітинного матриксу	12
1.3.2. Роль позаклітинного матриксу у пошкодженнях печінки	18
1.4. Клітини Іто	22
1.4.1. Номенклатура та відкриття клітин Іто	23
1.4.2. Характеристика клітин Іто	24
1.4.3. Функції клітин Іто	26
1.4.4. Активація клітин Іто та їхня роль при пошкодженнях печінки ..	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	39
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	43
3.1. Відповідь клітинної ланки імунітету на токсичний вплив сірчаноокислої міді	43
3.2. Вплив ретинолу на функціональну активність печінки на ранніх стадіях розвитку фіброзу	46
3.3. Вплив ретинолу на анатомічні та морфологічні зміни печінки з Cu- індукованим фіброзом	47
3.4. Гістологічні особливості печінки на початкових етапах фіброзу	49
3.5. Вплив ретинолу на динаміку маси тіла тварин з початковою стадією розвитку фіброзу печінки	51
3.6. Вплив різних доз вітаміну А на стійкість до наступної дії летальних доз сірчаноокислої міді.....	52
ВИСНОВКИ.....	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	57

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АЛТ – аланінамінотрансфераза
АПК – антигенпрезентуючі клітини
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АФК – активні форми кисню
ГГТ – γ -глутамінамінотрансфераза
ЗКП – зірчасті клітини печінки
КК – клітини Купфера
ММП – матриксні металопротеїнази
ПКМ – позаклітинний матрикс
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів
ТІМП – тканинний інгібітор металопротеїнази
 α -SMA – α -актин гладких м'язів
ADAM – дезінтигрин та металопротеази
CTGF – фактор росту з'єднувальної тканини
DDR – дискоїдиновий домен
EGF – епідермальний фактор росту
GFAP – гліальний фібрилярний кислий білок
IL – інтерлейкіни
IP – внутрішньочеревинна ін'єкція
LOX – лізилоксидази
LOXL – лізилоксидазоподібні ферменти
NK – природні кілери
NOX – НАДФН-оксидаза
PDGF – тромбоцитарний фактор росту
TGF- α – трансформуючий фактор росту α
TGF- β – трансформуючий фактор росту β
TNF – фактор некрозу печінки

ВСТУП

У сучасному світі велика частина смертей припадає на хвороби печінки, зокрема на хронічні фіброзні захворювання. Фіброз печінки є наслідком патологічного пошкодження, що характеризується накопиченням позаклітинного матриксу у перисинусоїдальному просторі, в першу чергу, за рахунок зірчастих клітин печінки. За відсутності лікування та при хронічному негативному впливі на печінку фіброз з часом прогресує до цирозу та раку печінки, які дуже важко піддаються лікуванню та у багатьох випадках стають летальними [10, 13].

Існує зростаюча потреба у варіантах лікування фіброзних станів, що, у свою чергу, вимагає детального вивчення факторів фіброзоутворення та механізмів, задіяних у його розвитку. Для розробки стратегії боротьби з фіброзом необхідні знання про молекули, пов'язані з позаклітинним матриксом, його участі у прогресуванні захворювань печінки, а також механізми активації та проліферації зірчастих клітин Іто. Ці дослідження надають змогу розробити нові та ефективні методи лікування фіброзу та цирозу печінки [3, 30].

Зірчасті клітини печінки вважаються основним джерелом позаклітинного матриксу при пошкодженнях печінки, тому знання про механізми активації та регуляції цих клітин можуть стати вирішальними у пошуках способів лікування фіброзу печінки. Так само важливо дослідити усі джерела компонентів позаклітинного матриксу та способи його деградації при надмірній експресії [40].

Метою цієї роботи є опис ролі позаклітинного матриксу та клітин Іто при пошкодженнях печінки, визначення умов активації клітин Іто, аналіз можливих мішеней для регуляції їхньої активності, а також дослідження впливу вітаміну А на Си-індукований фіброз печінки.

Завданнями кваліфікаційної роботи є:

- розглянути механізми розвитку фіброзу печінки та ролі позаклітинного матриксу в його прогресування;
- описати основні умови активації клітин Іто та їхнього внеску у розвиток фіброгенезу;
- визначити основні мішені для регуляції активності клітин Іто при пошкодженнях печінки;
- визначити вплив ретинолу на Cu-індукований фіброз печінки та його роль у виживанні тварин після отримання летальних доз сірчаноокислої міді.

Об'єктом дослідження є молоді щури (3 міс.) лінії *Wistar*. Предметом дослідження – печінка, її імунокомпетентні клітини та ферменти, які характеризують її стан.

При виконанні роботи були використані такі теоретичні методи дослідження, як: аналіз наукової літератури, передусім праць Senoo H., Karsdal M. та Friedman S.; моделювання, а також практичні методи: експеримент, спостереження та вимірювання.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Анатомія печінки та характеристика її клітин

Печінка людини є паренхіматозним органом та є найбільшим з усіх внутрішніх органів. Вона майже суцільно вкрита очеревиною, під якою знаходиться фіброзна оболонка печінки – глісонова капсула. Сама печінки поділена на дві долі (праву та ліву) серпоподібною зв'язкою, однією з тих, що утримують печінку у природньому положенні [4].

Печінкова паренхіма включає в себе епітеліальні клітини (гепатоцити), тоді як до непаренхіматозних клітин належать зірчасті клітини Іто, клітини Купфера, блукаючі лімфоцити та ендотеліальні клітини [11, 31].

Мікросудинною одиницею печінки є синусоїд. Синусоїди – це кровоносні капіляри, що містять шар фенестрованих ендотеліальних клітин, та обмежені по периметру гепатоцитами. Кров з кінцевих гілок печінкової ворітної вени та печінкової артерії змішується під час потрапляння у синусоїди, після чого змішана кров впадає в центральну вену кожної часточки печінки [4, 31].

Коли кров тече через синусоїди, значна кількість плазми фільтрується в перисинусоїдальний простір між ендотеліальним шаром і гепатоцитами – простір Діссе, де утворюється лімфа. Простір Діссе містить компоненти позаклітинного матриксу, передусім, волокна колагену [4, 5]. В просторі Діссе розташовані зірчасті клітини Іто, з іншого боку, клітини Купфера та дендритні клітини звернені до просвіту (Рис.1.1) [47].

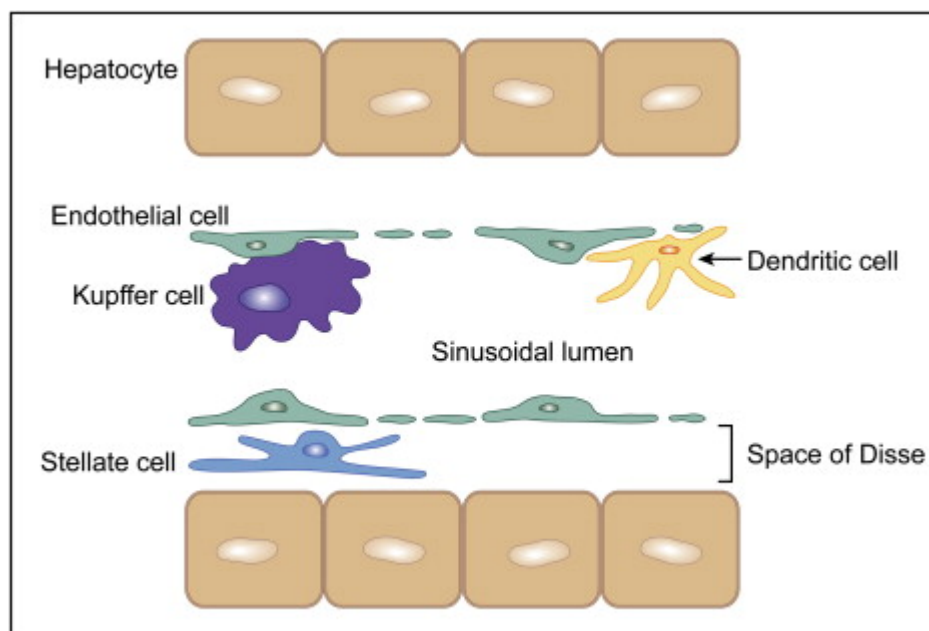


Рис.1.1. Клітини печінки [47]

Щільні гранули глікогену розподілені по всій цитоплазмі. Базальна поверхня гепатоцита, що прилягає до синусоїдального капілярного простору, характеризується утворенням мікрворсинок у просторі Діссе. Сусідні гепатоцити розділені вузьким міжклітинним простором із міжклітинними сполучними комплексами [11].

Клітини Купфера (синусоїдальні макрофаги) – ендотеліальні антигенпрезентуючі клітини печінки, що мають зірчасту форму та здатні перетворюватися в спеціалізовані макрофаги. Вони розташовані в синусоїдах печінки поряд з ямковими клітинами та клітинами Іто. Основна функція клітин Купфера полягає в очищенні крові від сторонніх елементів (ендотоксинів, пухлинних клітин, патогенних комплексів) шляхом фагоцитозу або піноцитозу [4].

Зірчасті клітини печінки (клітини Іто) складають близько 5% клітин печінки та розташовані в просторі Діссе. Ці клітини мають довгі цитоплазматичні відростки, що контактують з гепатоцитами та синусоїдним ендотелієм [4,5]. У здоровій печінці клітини Іто є основним місцем зберігання вітаміну А в ліпідних краплях. Однак за умов

пошкоджень печінки та під дією різних факторів зрчасті клітини активуються та зазнають трансформації у міофібробласти [4,11].

1.2. Механізм розвитку фіброзу печінки

Фіброз печінки є патологічним результатом практичного будь-якого хронічного пошкодження печінки. Станами, що сприяють розвитку фіброзу печінки, є: надмірне споживання алкоголю, наркотичних речовин; дія токсинів (миш'яку, заліза, купруму); прийом лікарських препаратів; радіація; механічні пошкодження; вірусні гепатити В і С, аутоімунні захворювання печінки (первинний склерозуючий холангіт, первинний біліарний цироз); неалкогольна жирова хвороба печінки; неалкогольний стеатогепатит; метаболічні розлади [6,13,39].

Фіброз є частиною нормального процесу загоєння ран. Однак внаслідок невеликого, але постійного пошкодження печінки цей процес порушується. З часом неконтрольована фіброзна передача сигналів над можливостями ферментного розщеплення білків позаклітинного матриксу призводить до послідовної заміни здорової паренхіматозної тканини [6,31]. Під час розвитку фіброзу спостерігається порушення нормальної архітектури печінки. Якщо фіброз печінки не лікувати, він може прогресувати до цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми, що з високою ймовірністю може призвести до смерті [13].

Розвиток фіброзу печінки є динамічною серією подій, що включають складні клітинні та молекулярні механізми. Цей процес характеризується наступними стадіями: запалення, синтез колагенових і неколагенових компонентів ПКМ, ремоделювання тканини печінки. Під час цього відбувається збільшення ПКМ до 10 разів, що включає кілька типів колагенів (зокрема I та III тип), структурних глікопротеїнів, сульфатованих протеогліканів (глікозаміногліканів) і гіалуронану. Спочатку відкладення матриксу спостерігається вздовж простору Діссе, що створює бар'єри між гепатоцитами та синусоїдом печінки («капіляризація синусоїдів»), з

поступовою зміною профілю ПКМ та його компонентів [16,29,46]. Руйнування нормальної архітектури печінки порушують синтетичну та метаболічну функції печінки, що згодом призводить до цирозу, печінкової недостатності та гепатоцелюлярного раку.

На даний момент надмірне накопичення та ремоделювання позаклітинного матриксу вважається однією з основних причин розвитку фіброзу. При постійному відкладенні матриксу порушується баланс між його безперервним накопиченням та деградацією, головним чином фібрилярного колагену [26,35]. Раннє руйнування нормального печінкового матриксу протеазами, що руйнують матрикс, прискорює його заміну матриксом рубця, що має шкідливий вплив на функцію клітин, а також є умовою розвитку пухлини та десмоплазії [15].

Головними клітинами, задіяними у розвитку фіброзу печінки, є зірчасті клітини печінки та клітини Купфера. Ушкодження призводять до залучення запальних клітин (дендритні клітини, природні клітини-кілери, лімфоцити), а синтезовані ними медіатори міжклітинної взаємодії – цитокіни, інтерферони та інтерлейкіни – прямо або опосередковано призводять до активації ЗКП та клітин Купфера (Рис.1.2). Ці клітини продукують патологічний фібрилярний колаген та інші компоненти ПКМ [2, 6].

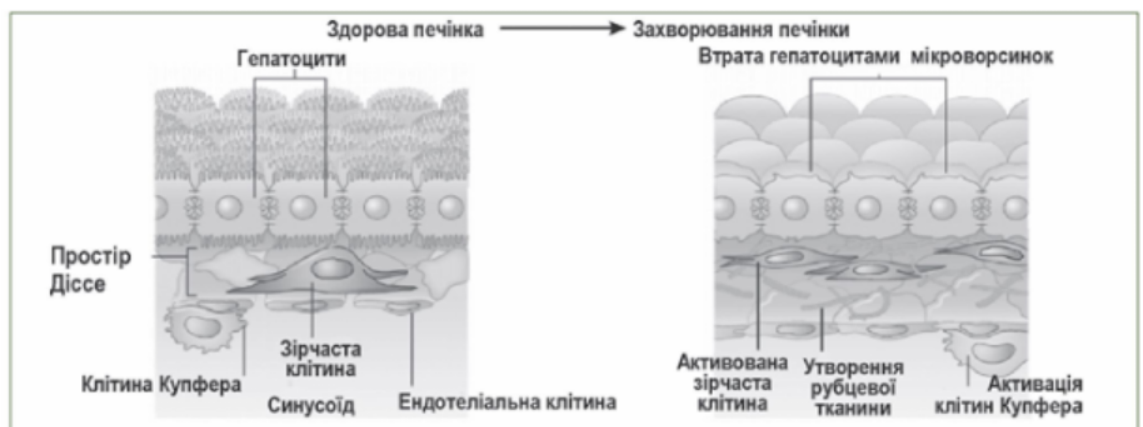


Рис.1.2. Печінкові клітини у неушкодженій печінці (ліворуч) та при вираженому фіброзу (праворуч) [6]

Основне джерело ПКМ при фіброзі – печінкові міофібробласти – відсутні у здоровій печінці, але трансдиференціюються з клітин печінки, зокрема з клітин Іто, у відповідь на фіброгенні стимули (трансформуючий фактор росту, продукти перекисного окислення ліпідів, тощо) [6, 26]. Активовані клітини Іто перетворюються на проліферативні та скоротливі міофібробласти, здатні виділяти білки позаклітинного матриксу, зокрема колагени, глікопротеїни та протеоглікани. Цей процес забезпечує загоєння ран при пошкодженнях печінки, однак за умов тривалого впливу ЗКП залишаються активними та виділяють надмірну кількість колагену, в першу чергу I та III типів [2, 4].

Після ураження печінки паренхіматозні клітини регенерують та замінюють собою некротичні та апоптичні. Було досліджено, що окрім клітин Іто, джерелами міофібробластів при фіброзі є портальні міофібробласти, клітини кісткового мозку, циркулюючі фіброцити, клітини жовчного епітелію або гепатоцити. Пошкоджені клітини замінюються фібрилярним колагеном, розподіл якого залежить від походження ураження печінки. При хронічному вірусному гепатиті фіброзна тканина спочатку накопичується навколо портальних шляхів, при впливі алкоголю – в периферичній та перисинусоїдній областях [18,29].

1.3. Позаклітинний матрикс

1.3.1. Склад та характеристика позаклітинного матриксу

Тканини складаються не лише з клітин, а й з міжклітинного простору, який більшою мірою заповнений мережею макромолекул, які утворюють позаклітинний матрикс (ПКМ). Позаклітинний матрикс – складна 3-D мережа, неклітинна структура, що забезпечує фізичну та біохімічну основу для клітин та є критичним елементом їхнього мікрооточення. Окрім цього, компоненти ПКМ впливають на морфологію, розвиток, диференціацію, проліферацію та міграцію клітин [14, 30]. У

здоровій печінці ПКМ складає близько 0,5% від загальної маси печінки і розподілений між порталними тріадами, центральними венами та капсулою Гліссона, лише невелика кількість присутня в просторі Діссе [36].

Склад позаклітинного матриксу відображає функціональні потреби тканини та визначають механічні властивості матриксу. ПКМ складається із сітки білків та небілкових компонентів, які зв'язують одне одного у стабільну композицію, а також розчинні фактори, цитокіни та біоактивні молекули [33, 44]. Двома основними класами макромолекул ПКМ є протеоглікани (глікозаміноглікани) та волокнисті білки. Волокнистими білками матриксу є колагени, еластини, фібронектини та ламініни. Кожен з цих елементів виконує свою унікальну функцію [14, 36]. Окрім цього, ПКМ містить ферменти, такі як матриксні металопротеїнази (ММП), тканинні інгібітори металопротеїназ (ТІМП), лізилоксидази (LOX), лізилоксидазоподібні (LOXL) ферменти (Рис.1.3.) [24, 49].

Позаклітинний матрикс поділяють на три типи. Перший – це перицелюлярний матрикс, розташований у тісному контакті з компонентами клітинної мембрани. Другий тип – інтерстиціальний матрикс, який заповнює простір між клітинами та становить більшу частину ПКМ в організмі та в основному складається з колагенів I та III типу та фібронектину. Третій тип матриксу – базальна мембрана, яка взаємодіє з епітеліальними, ендотеліальними та мезенхімальними клітинами та складається з колагену IV типу, ламінінів та протеогліканів. При фіброзі печінки найбільше накопичується інтерстиціальний матрикс [29, 31].

ПКМ є динамічною сутністю, компоненти якого зв'язують одне одного, а також рецептори клітинної адгезії, сигнальні молекули. Рецептори клітинної поверхні передають сигнали в клітини від матриксу, який регулює поведінку та функції клітин зокрема диференціювання, проліферація, адгезія, ріст, міграція, полярність, апоптоз [10, 44].

Протеоглікани заповнюють більшу частину позаклітинного інтерстиціального простору у формі гідратованого гелю. Вони модулюють клітинну адгезію, підтримують високий осмотичний тиск, та підтримують структуру тканин [31]. Одним з протеогліканів є декорин, який тісно пов'язаний із TGF- β , та пригнічує надмірну активність цього цитокіну при пошкодженнях. Декорин також регулює експресію фібронектину та колагенази [31].

Колагени є найпоширенішим волокнистим білком позаклітинного матриксу і становить близько 30% від загальної маси білка тварин. Найчастіше в здоровому організмі зустрічаються колагени типу I, II, III і V. Колагеновий хребет визначає архітектуру, форму та організацію тканини, та забезпечує міцність, регулюють адгезію клітин, підтримують хемотаксис і міграцію, а також спрямовують розвиток тканин [14, 49].

Колаген зв'язується з еластином, який є іншим основним волокном ПКМ. Волокна еластину забезпечують віддачу тканинам, які зазнають багаторазового розтягування, однак це розтягнення обмежується колагеновими фібрилами. Еластинові волокна вкриті глікопротеїновими мікрофібрилами, в основному фібрилінами, завдяки чому вони можуть регулювати активність трансформуючих факторів росту β [14, 19].

LOX і LOXL2 є залежними від лізилтирозилхінону та міді аміноксидазними ферментами, що є каталізаторами зшивання колагену та еластину. LOXL2 локалізовані на поверхні екзосом, отриманих з ендотеліальних клітин. Це полегшує перехресне зшивання колагенових і еластинових волокон шляхом селективного окислювального дезамінування залишків лізину, таким чином забезпечуючи жорсткість печінкової паренхіми [31].

Одним з найпоширеніших глікопротеїнів є фібронектин, який буває двох типів: клітинний та фібронектин плазми. Клітинний фібронектин збільшується при пошкодженнях тканини та сприяє накопиченню колагену

при фіброзі. Фібронектин діє як хемоаттрактант, а також є фактором росту мезенхімальних клітин [28, 31].

Вітронектин є однією з молекул адгезії в ПКМ, чия роль полягає у зв'язуванні колагену, еластину та протеогліканів у матриксі. Він є показником іронічності пошкоджень. Інший білок ПКМ, ламінін, є основним компонентом базальної мембрани та взаємодіє з колагеном IV типу, гепарансульфатом, протеогліканом і ентактином [31].

Інтегрини є трансмембранними білковими рецепторами, які забезпечують зв'язок між клітинами та оточуючим їх ПКМ. Ці молекули діють як двонаправлений канал, передаючи сигнали ззовні всередину клітини та з клітини назовні [31, 49]. Інтегрини та забезпечені ними взаємодії є важливими для регуляції клітинної проліферації, міграції, локалізації, адгезії, апоптозу, росту та функціонування клітин у тканинах [41].

Інтегрини зв'язують ПКМ з цитоскелетом клітини, а їх позаклітинний домен відповідає за сприйняття мікрооточення шляхом взаємодії з ПКМ. Окрім зазначених функцій, інтегрини можуть контролювати вивільнення та активацію TGF- β , що робить їх потенційною мішенню для інгібування його активації. Інтегрин $\beta 1$ також регулює профіброгенний фенотип активованих ЗКП. Серин/треонінпротеїнкіназа RAK1 і yes-асоційований білок 1 (YAP1) є основними медіаторами передачі сигналів профіброзного інтегрину $\beta 1$ [28, 45].

У здоровій печінці позаклітинний матрикс складається в основному з колагену типу IV та суміші протеогліканів. У просторі Діссе ПКМ відіграє роль у підтримці гомеостазу печінки та забезпечує простору структуру тканини печінки. Колагени типу I та III присутні між зірчастими клітинами та гепатоцитами у нормальній печінці, однак їхня кількість значно збільшується у фіброзній печінці [36, 45].

ПКМ печінки секретується клітинами, що оточують простір Діссе, а саме гепатоцитами, ендотеліальними клітинами та клітинами Іто. Усі вони

експресують колаген типу I, гепатоцити в основному продукують фібронектин, ендотеліальні клітини експресують колаген IV, а зірчасті клітини в основному виробляють ламінін та колаген типів III і IV [35, 36].

Підтримка здорової тканини, її розвиток, відновлення, регенерація та гомеостаз забезпечуються позаклітинним матриксом завдяки його динамічному характеру. Це вимагає процесу ре моделювання матриксу – розщеплення старих або пошкоджених білків матриксу та їхня заміна новими за допомогою протеолітичних ферментів. Одним з головних класів таких ферментів є металопротеїнази, а саме матриксні металопротеїнази (ММП). ММП жорстко регулює склад та функції позаклітинного матриксу. Матрикс також розщеплюють дезінтегрин та металопротеази (ADAM), ADAM з мотивами тромбоспондину, та протеази, серед яких катепсин G, колаген аза, еластаза [28, 29].

Матриксні металопротеїнази є сімейством цинк- та кальцій-залежних ендопептидаз, здатних розщеплювати позаклітинний матрикс. У нормальних умовах активність ММП є низькою, однак збільшується під час процесів ре моделювання тканин, а також у пошкоджених або запалених тканинах. ММП утворюються у вигляді розчинних або прикріплених до клітинної мембрани протеїназ і володіють широкою субстратною специфічністю [12, 24]. Загалом усі ММП поділяють на п'ять категорій за їхньою специфічністю до субстратів: 1) інтерстиціальні колагенази (ММП-1, -8, -13); 2) желатинази (ММП-2, -9 та білок активації фібробластів); 3) стромелізени (ММП-3, -7, -10, -11); 4) мембранний тип (ММП-14, -15, -16, -17, -24, -25); 5) металоеластази (ММП-12) [15].

Матриксні металопротеїнази виробляються клітинами сполучної тканини та клітинами запалення, у печінці це, в першу чергу, є клітинами Купфера, гепатоцитами та зірчастими клітинами [24]. Зірчасті клітини є джерелом ММП-2, ММП-9, ММП-13 і стромелізину, а також ADAM-13 і -28. ММП-2 (желатиназа А) здебільшого синтезується активованими зірчастими клітинами, але ця ММП також впливає на проліферацію ЗКП

при пошкодженнях печінки. ММП-9, як і ММП-2, беруть участь у деградації нормального колагенового скелету. ММП1 індукує експресію колагенази, що забезпечує деградацію колагену. ММП8 розщеплює інтерстиціальний колаген I і III [15, 31].

Для перешкодження надмірної та шкідливої деградації тканин протеоліз позаклітинного матриксу вимагає ретельного контролю. Діяльності ММП протидіють тканинні інгібітори металопротеїназ – ТІМП, чиє сімейство складається з чотирьох членів (ТІМП-1-ТІМП-4), а також інші інгібітори, серед яких інгібітори сери нових протеаз (серпіни). Дисбаланс між ММП та ТІМП може призвести до патологій печінки [12, 35].

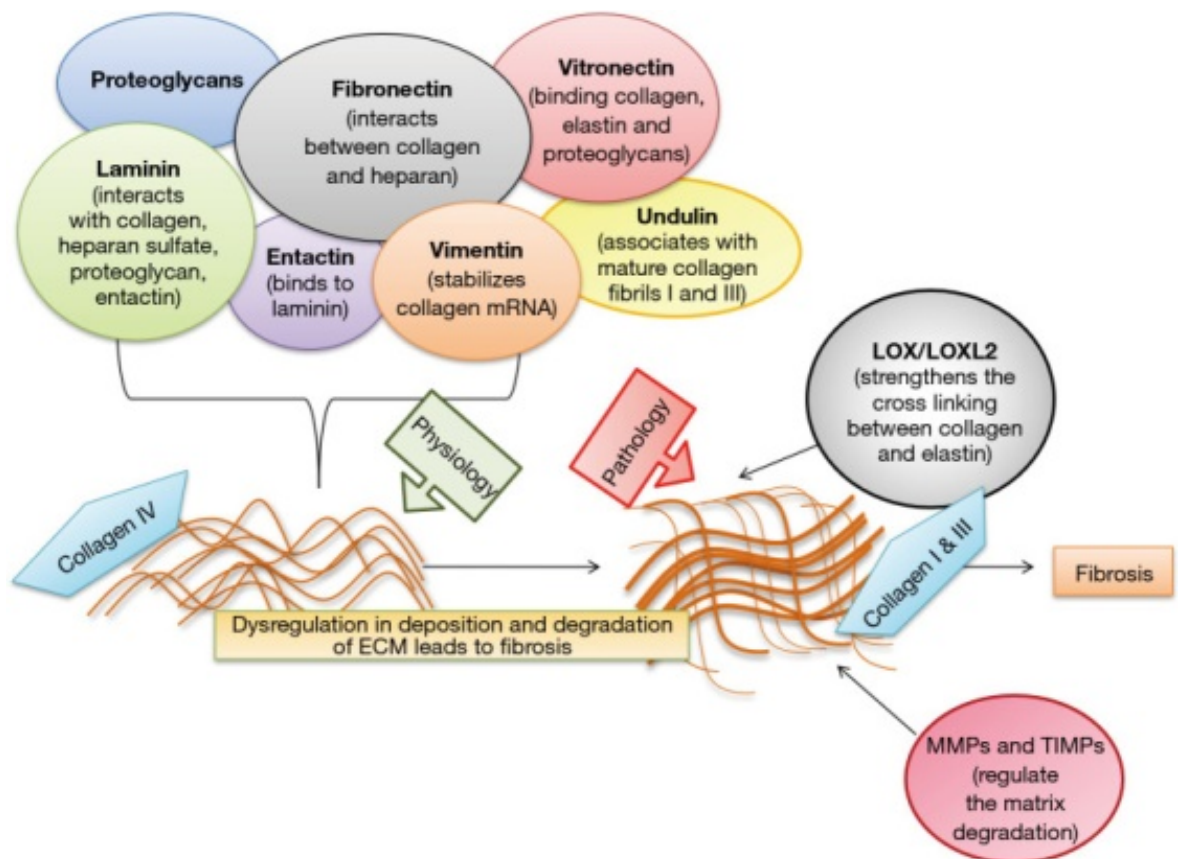


Рис.1.3. Склад та функція білків позаклітинного матриксу здорової печінки та при патологіях. Зображено активність протеогліканів та ферментів [31]

1.3.2. Роль позаклітинного матриксу у пошкодженнях печінки

Хронічні ураження печінки різного походження (вірусні гепатити, зловживання алкоголем, ожиріння тощо), що призводять до надмірного виробництва білків позаклітинного матриксу, можуть прогресувати до фіброзу печінки. Порушення балансу відновлення матриксу призводить до заміни оригінальних білків ПКМ у печінці іншими складовими, що порушує усю архітектуру тканини та згодом може прогресувати до цирозу печінки [8, 12].

У здоровій печінці загоєння ран є динамічним процесом, у якому позаклітинний матрикс відіграє дуже важливу роль, а з часом запускаються механізми відновлення тканинного гомеостазу та повернення тканини у нормальний стан. Однак безперервне ремоделювання ПКМ під час хронічних пошкоджень призводить до стану, у якому порушується баланс між синтезом та деградацією білків матриксу, а виробництво ТІМП переважає над синтезом ММП [10, 14]. Таке нерегульоване загоєння ран призводить до утворення рубців зі зміненою механічною структурою і зниженою еластичністю, які підтримують цілісність органу, але втрачають свої функції [29, 41].

Одним з перших процесів, що ініціюється у відповідь на ушкодження печінки, є пошкодження судин і утворення фібринового згустку, який стимулює інфільтрацію моноцитів до пошкодженої ПКМ. Після зв'язування з компонентами матриксу і цитокінами моноцити диференціюються в макрофаги та починають секретувати численні ММП та цитокіни, які, у свою чергу, стимулюють проліферацію міофібробластів. Це призводить до синтезу великої кількості білків ПКМ та розростання сполучної тканини на місцях пошкодження, зазвичай утвореної з колагенових волокон [3, 14].

Перебудова позаклітинного матриксу у печінці відбувається переважно в субендотеліальному просторі Діссе та в перивенуальній зоні ацинусів. Відкладення сполучної тканини у просторі Діссе порушує

нормальну анатомію синусоїдів, перешкоджає нормальному метаболічному трафіку між синусоїдами та гепатоцитами, та сповільнює обміну молекулами. Такий процес називається капіляризацією синусоїдів [6, 34]. Капіляризація порушує двонаправлений обмін між портальною венозною кров'ю та гепатоцитами, внаслідок чого речовини, які мали бути метаболізовані гепатоцитами, досягати кровообігу у незмінному вигляді, та навпаки. Цей процес призводить до портальної гіпертензії, зниження гепатоцелюлярної синтетичної функції, дефіциту факторів згортання крові. Коли накопичення ПКМ збільшується далі, судинні структури можуть з'єднатися, а в щільних ділянках рубців відбувається ангиогенез, що остаточно змінює архітектуру печінки [24, 34].

Пошкодження печінки індукують трансдиференціацію клітин печінки (епітеліально-мезенхімальний перехід епітеліальних клітин) або циркулюючих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку в міофібробласти. Такі клітини синтезують у великих кількостях компоненти позаклітинного матриксу, мають скорочувальні властивості та сприяють механічному зміцненню пошкодженої тканини. Окрім міофібробластів, компоненти ПКМ синтезують портальні фібробласти, клітини кісткового мозку та паренхіматозні клітини за участі макрофагів [14, 24].

Більша частина нормального позаклітинного матриксу представлена у фіброзній печінці. Найбільш поширеними білками є колагени I та III типів та еластин, а також адгезивні глікопротеїни та вуглеводи, однак відсоток колагену I типу у рубцевій тканині набагато більший, як і вміст ламініну та сульфатованих протеогліканів [24, 34]. Ремоделювання матриксу при фіброзі полягає в пригніченні колагенів типу FACIT – фібрил, пов'язаних із перерваними потрійними спіралями. Ці колагени у нормальній печінці при взаємодії з колагенами I та III типів надають їм гнучкості, тому їхнє пригнічення у фіброзній печінці обумовлює щільність структури [10].

Окрім колагенів I та III типів, при фіброзі значні збільшується як кількість колагену IV типу, так і його деградація, а сам білок піддається помітному ремоделюванню. Підвищується також експресія протеаз в ураженій печінці. Самі властивості колагену змінюються в печінці внаслідок модифікації білку, включаючи перехресне зшивання матриксу, що посилює жорсткість тканини, сприяє активації фібробластів та порушенню функції гепатоцитів [29, 30].

Під час процесу загоєння ран мезенхімальні клітини виділяють колагеназу в позаклітинний матрикс, фагоцити лізують колаген, тим самим розщеплюючи надлишок сполучної тканини. Синтезу колагенази сприяють IL-1, IL-6, PDGF, і після активації колагенази прискорюють процесу загоєння ран шляхом залучення макрофагів, що, у свою чергу, стимулює продукцію цитокінів у пошкодженій ділянці. Макрофаги, зокрема підгрупи M1 та M2, є важливими регуляторами фіброгенезу печінки. При фіброзних патологіях надлишковий синтез колагену спричинений гіперактивністю колагеназ, що призводить до аномального накопичення колагену [30, 31].

Накопичення позаклітинного матриксу відбувається як в результаті надмірного виробництва компонентів матриксу, так і зниження їхньої деградації. У здоровій печінці основними ферментами, що регулюють ПКМ, є матричні металопротеїнази, лізілоксидаза та лізілоксидазоподібні ферменти. У нормальному стані печінки ММП деградують матрикс, однак в умовах пошкодження печінки активність цього ферменту пригнічується внаслідок надлишкової експресії активованими зірчастими клітинами тканинних інгібіторів металопротеїназ [31, 34].

Майже всі ММП, які були описані, відіграють важливу роль у прогресуванні та деградації фіброзу печінки. ММП-1 здатна розкласти колагени I та III типів, які є основними елементами фіброзного рубця на ранніх стадіях розвитку патології [15, 39]. Синтез ММП-2 збільшується при розвитку фіброзу, і ця протеаза пригнічує експресію колагену I типу, а її відсутність підтримує фіброз. ММП-9 руйнує базальну мембрану та

стимулює вироблення фібрилярного колагену, її синтез підвищується при цирозі печінки [29, 39].

Регуляція активності матриксних металопротеїназ відбувається різними шляхами, одним з яких є інактивація шляхом зв'язування з тканинними інгібіторами металопротеїназ. У здоровій печінці підтримується баланс між рівнями ММП та ТІМП (Рис.1.4), які контролюють накопичення та деградацію ПКМ. Під час розвитку фіброзу ця рівновага порушується, експресія ТІМП переважає, через що пригнічується деградація матриксу [15, 39].

У пошкодженій печінці спостерігається високий рівень експресії ТІМП-1 та ТІМП-2, частина яких синтезується активованими зірчастими клітинами. Окрім пригнічення ММП, при патологіях печінки ТІМП можуть пригнічувати активність колагеназ, що сприяє накопиченню ПКМ. ТІМП-1 перешкоджає локальну деградацію колагену шляхом блокування ММП-1, ММП-8 та ММП-13, а також сприяє активації міофібробластів. Однак активовані ЗКП можуть сприяти вивільненню протеаз, які розкладають матрикс [15, 30].

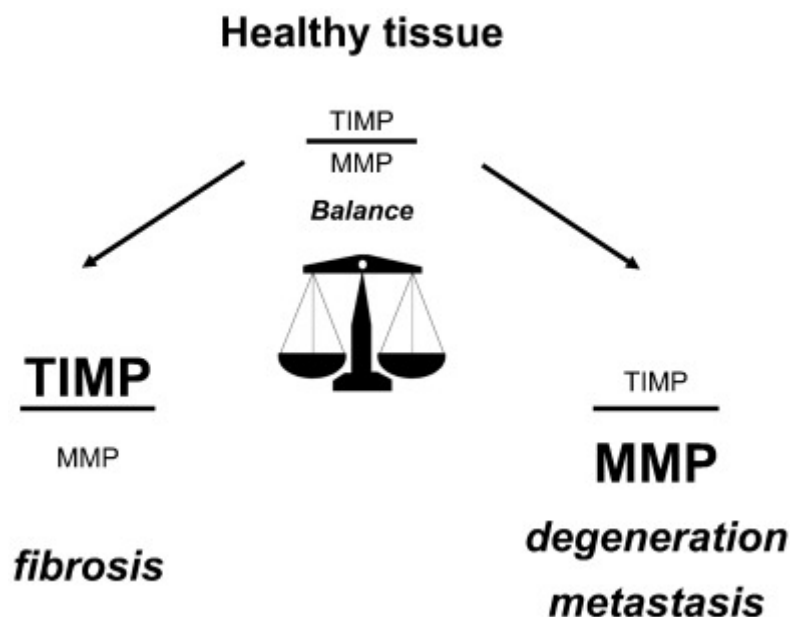


Рис.1.4. Вплив балансу між деградацією та накопиченням ПКМ [39]

Початкові стадії фіброзу характеризуються накопиченням фібрилярного колагену (I та III типів), тоді як досягнення важкої стадії фіброзу та цирозу вимагає накопичення великої кількості еластичних волокон (надмірна експресія еластину) зі зниженням вмісту колагенів I та III типів. З'являються ділянки щільного позаклітинного матриксу, багатого еластином, що змінює жорсткість печінки під час прогресування фіброзу печінки до цирозу. Фіброзні перетинки, багаті на еластичні волокна, більш стійкі до деградації, опосередкованої ММП, що сприяє необоротності пошкодження. Таке глибоке порушення архітектури печінки призводить до розвитку портальної гіпертензії, яка характеризується високою смертністю у хворих на цироз печінки [10, 24].

1.4. Клітини Іто

Клітини Іто (печінкові зірчасті клітини) відіграють істотну роль у процесах формування фіброзу, будучи одним з основних джерел позаклітинного матриксу у печінці. У спокійному стані клітини Іто є джерелом вітаміну А та відіграють провідну роль у регуляції гомеостазу ретиноїдів, тому наявність ліпідних вакуолей є характерною ознакою цих клітин. ЗКП є динамічною популяцією клітин, що здатні трансдиференціюватися у міофібробласти під впливом факторів ризику, проявляючи таким чином подвійний фенотип [3,20].

Участь клітин Іто у розвитку фіброзу печінки, механізми їхньої активації та особливості клітин були детально вивчені на різних тваринних моделях пошкодження печінки, таких як токсичні (введення чотирихлористого вуглецю, сполук купруму), метаболічні (моделі жирових дієт, надмірного вживання алкоголю), холестатичні моделі, а також при культивуванні зірчастих клітин у культурі [43].

1.4.1. Номенклатура та відкриття клітин Іто

Зірчасті клітини, розташовані у просторі Діссе, мають цікаву історію вивчення та відкриття, а також велику кількість назв, під якими ці клітини відомі світу. Вперше ці клітини були описані фон Купфером як «Sternzellen» (зірчаста клітина) у 1876 році, який ідентифікував у синусоїдах печінки клітини, що містили краплі вітаміну А, з використанням хлориду золота для морфологічного дослідження печінки [17, 20]. Однак пізніше фон Купфер переплутав ці клітини з макрофагами печінки (які сьогодні носять ім'я цього вченого), внаслідок чого зірчасті клітини деякий час вважали фагоцитарними [15, 20].

Після відкриття зірчастих клітин вони на довгий час зникли з радарів дослідників через їхню хибну ідентифікацію. У 1898 році фон Купфер виправив свою попередню думку та визнав зірчасті клітини особливими ендотеліальними клітинами синусоїди. Їхнє повторне відкриття відбулося у 1951 році, коли у 1951 році японський анатом Тошіо Іто визначив зірчасті клітини як ті, що здатні запасати ліпіди в цитоплазмі, внаслідок чого вони були названі «ліпоцитами». У 1971 році Вейк продемонстрував здатність цих клітин зберігати вітамін А [25, 41].

Під час досліджень зірчастої клітини печінки їй було присвоєно велику кількість назв. Ці назви базувалися на вигляді клітин (печінкові зірчасті клітини, зернисті клітини); їх можливому походженні (мезенхімальні клітини); їхній локалізації всередині печінки або їх оточенню (перицити, інтерстиціальні клітини, перисинусоїдальні клітини, парасинусоїдальні клітини, клітини простору Діссе та синусоїдальні мезенхімальні клітини); особливих цитоплазматичних ознаках клітин (зернисті клітини, клітини, що накопичують жир, клітини, що накопичують ліпіди, ліпоцити, клітини, багаті на ліпіди); їх спорідненість до металів (клітини-металофіли); їхній високий вміст вітаміну А (клітини, що зберігають або поглинають вітамін А); їх подібність до нервових волокон (клітини, що передають сигнал); їх участь у процесі фіброгенезу

(трансдиференціюючі клітини); а також назва на честь вченого, що зробив великий внесок в ідентифікацію та характеристику клітин, – клітини Іто [37, 43].

Через велику кількість назв, у сфері досліджень цих клітин виникла велика плутанина. Це стало перешкодою для дослідників у вивченні зірчастих клітин, тому у 1996 році група з 98 вчених узгодили стандартизовану номенклатуру, а саме «зірчасті клітини печінки» (Hepatic stellate cell), хоча термін «клітини Іто» також є досі поширеним при дослідженнях цих клітин [16, 41].

1.4.2. Характеристика клітин Іто

Клітини Іто розташовані в перисинусоїдальному просторі Діссе, між антилюмінальною стороною ендотеліальних клітин синусоїдів та базолатеральною поверхнею гепатоцитів. Свою характерну зірчастоподібну форму клітини мають завдяки їхнім довгим цитоплазматичним відросткам, які знаходяться під ендотелієм і охоплюють сусідні клітини (синусоїд з одного боку та гепатоцити з іншого) [15, 20].

Зірчасті клітини печінки складають близько 1,4% загального об'єму печінки та близько 5-8% від загальної кількості клітин у здоровій печінці, а також близько третини непаренхіматозних клітин печінки. При чому їхнє співвідношення до гепатоцитів у нормальній печінці складає 1:20 [17, 34].

ЗКП є перицитами печінки з веретеноподібним тілом розміром близько 700 мкм^3 з дендритною морфологією (Рис.1.5). Їхні шилоподібні виступи мають середню довжину 20-39 мкм та забезпечують зірчастим клітинам фізичний контакт з навколишнім середовищем [16]. Найбільш характерною особливістю клітин Іто є велика кількість багатих на тригліцериди вакуолей, в яких розчинені та зберігаються метаболіти вітаміну А (ретиноїди), холестерин та вільні жирні кислоти [43, 47].

У здоровій печінці зірчасті клітини демонструють помірно розвинений шорсткий ендоплазматичний ретикулум з мембранозалежними рибосомами та слабо виражений гладкий ендоплазматичний ретикулум. ЗКП мають невеликий перинуклеарний комплекс Гольджі та невеликі частинки глікогену у цитоплазмі. Клітини містять невелику кількість мітохондрій, пероксидом, пучків мікрофіламентів, мікротрубочок і проміжних ниток, а також лізосоми, що вказує на фагоцитарну активність. У ЗКП були наявні ранні та пізні ендосоми та мультисекулярне тіло, яке є важливою органелою для розвитку ліпідних крапель [9, 41]. Ядро клітин Іто при електронній мікроскопії має овальну або подовжену форму, часто подрібнене крапельками ліпідів у цитоплазмі. Окрім того, можна побачити одне або декілька ядерець [15, 17].

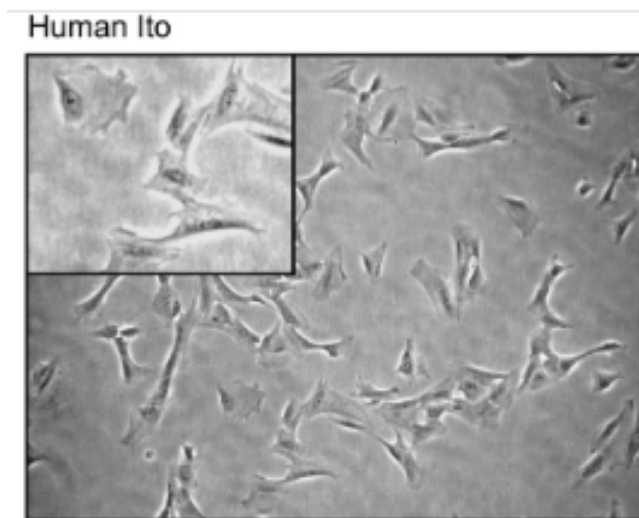


Рис.1.5. Зображення клітин Іто [48]

Довгі субендотеліальні цитоплазматичні відростки зірчастих клітин печінки обертаються навколо синусоїди між ендотеліальними клітинами та гепатоцитами у просторі Діссе. Одна зірчаста клітина зазвичай оточує більше двох сусідніх синусоїди, а з іншого боку численні відростки тягнуться для встановлення зв'язку з гепатоцитами. На кожному з виступів зірчастих клітин є шипуваті мікровиступи, які забезпечують сприйняття

хемотаксичних сигналів, здатних індукувати генерацію скорочувальної сили ЗКП. Такий тісний контакт сприяє міжклітинному транспорту розчинних медіаторів та цитокінів [15, 17]. Зірчасті клітини знаходяться у прямому контакті з нервовими закінченнями, що говорить про їхні нейрогуморальні взаємодії [9, 36].

Зірчасті клітини мають актинові нитки та мікротрубочки, розподілені на периферії та в ядрі їхніх відростків. Мікротрубочки відіграють роль у розширенні та втягуванні клітинних відростків. Окрім того, ЗКП експресують віментин, філаменти, десмин та гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) [41, 47], які є маркерами цих клітин.

У разі пошкодження печінки структура зірчастих клітин змінюється та відбувається їхня трансдиференціація до клітини, подібної до міофібробластів. При такій активації клітини втрачають свої характерні ліпідні краплі. Шорсткий ендоплазматичний ретикулум стає збільшеним, що супроводжується добре розвиненим апаратом Гольджі, що, в свою чергу, може свідчити про активний синтез білка. Відбувається гофрування ядерної мембрани, під клітинною мембраною з'являються скорочувальні нитки. Посилюється проліферація клітин, вони набувають скоротливої здатності. Загалом, відбуваються зміни в організації цитоскелета та морфології клітин [15, 34].

1.4.3. Функції клітин Іто

Зірчасті клітини печінки та міофібробластоподібні клітини, які походять від них при пошкодженнях печінки, виконують безліч важливих функцій у здоровій печінці та при патологіях. Головною роллю спокійних клітин Іто є зберігання та вивільнення ретиноїдів, зокрема вітаміну А, однак на додаток до цього вони виконують наступні функції: 1) роль ЗКП у модуляції імунних клітин; 2) роль у відновленні та регенерації печінки, так як вони є клітинами-попередниками CD133⁺ зі здатністю диференціюватися у гепатоцити; 3) участь в ендоцитозі апоптичних

паренхіматозних клітин; 4) секреція матриксних металопротеїназ (ММП), інгібіторів ММП та факторів росту, що говорить про їхню роль у ремоделюванні матриксу та його деградації; 5) підтримка регенерації печінки шляхом стимуляції проліферації гепатоцитів; 6) продукція компонентів позаклітинного матриксу, зокрема колагени I, III, IV, V і VI типів, фібронектин, ламінін, тенасцин, ундулін, гіалуронан і протеоглікани; 7) секреція цитокінів і хемокінів, що підтримує запалення печінки; 8) гемодинамічні функції – здатність скорочуватися у відповідь на вазоактивні речовини, що вказує на участь у регуляції синусоїдального тонуусу печінки. Деякі з цих функцій не виражені у стані спокою клітин Іто, але запускаються після трансдиференціації клітин [16, 20, 43].

Найбільш характерною особливістю зірчастих клітин є зберігання вітаміну А у вигляді цитоплазматичних ліпідних крапель. У здоровій печінці зберігається близько 50-80% загального ретинолу в організмі, з яких 80-90% припадає на клітини Іто [48]. Екзогенний вітамін А всмоктується в кишечнику, естерифікується жирними кислотами, та транспортується в печінку хіломікронами через мезентеріальні лімфатичні шляхи. У печінці ці ретинолвмісні хіломікрони поглинаються гепатоцитами, після чого переносяться в ЗКП для зберігання, при чому невелика частина залишається в гепатоцитах. Більша частина вітаміну А зберігається у формі ретинілових ефірів, переважно ретинілпальмітату, але склад цих ліпідних крапель залежить від природи спожитого вітаміну А. Вони також можуть містити тригліцериди, фосфоліпіди, холестерин та вільні жирні кислоти [15, 17].

Зірчасті клітини відіграють важливу роль у підтримці позаклітинного матриксу печінки, синтезуючи колагени різних типів, але також у деградації матриксу шляхом синтезу матриксних металопротеїназ. Окрім того, вони приймають участь у контролі синусоїдального кровотоку та тиску портальної венозної системи [20, 34].

За деякими джерелами, ЗКП здатні функціонувати як антигенпрезентуючі клітини для Т-клітин, однак останні дослідження вказують, що напряду клітини Іто не стимулюють імунні клітини, натомість вони мають потенціал для спільної модуляції поблизу професійної АПК. Зірчасті клітини можуть сприяти супресивним і толерогенним властивостям печінки [23].

При пошкодженнях печінки та патологічних станах зірчасті клітини змінюють свій фенотип та трансдиференціюються у міофібробласти (Рис.1.6). При чому вони втрачають свої ліпідні краплі з вітаміном А та починають синтезувати велику кількість компонентів позаклітинного матриксу, серед яких колагени різних типів, протеоглікан, глікозаміноглікан і адгезивні глікопротеїни, а також вивільняють запальні, проліферативні та фіброгенні цитокіни через прямий контакт з сусідніми клітинами [27, 41].

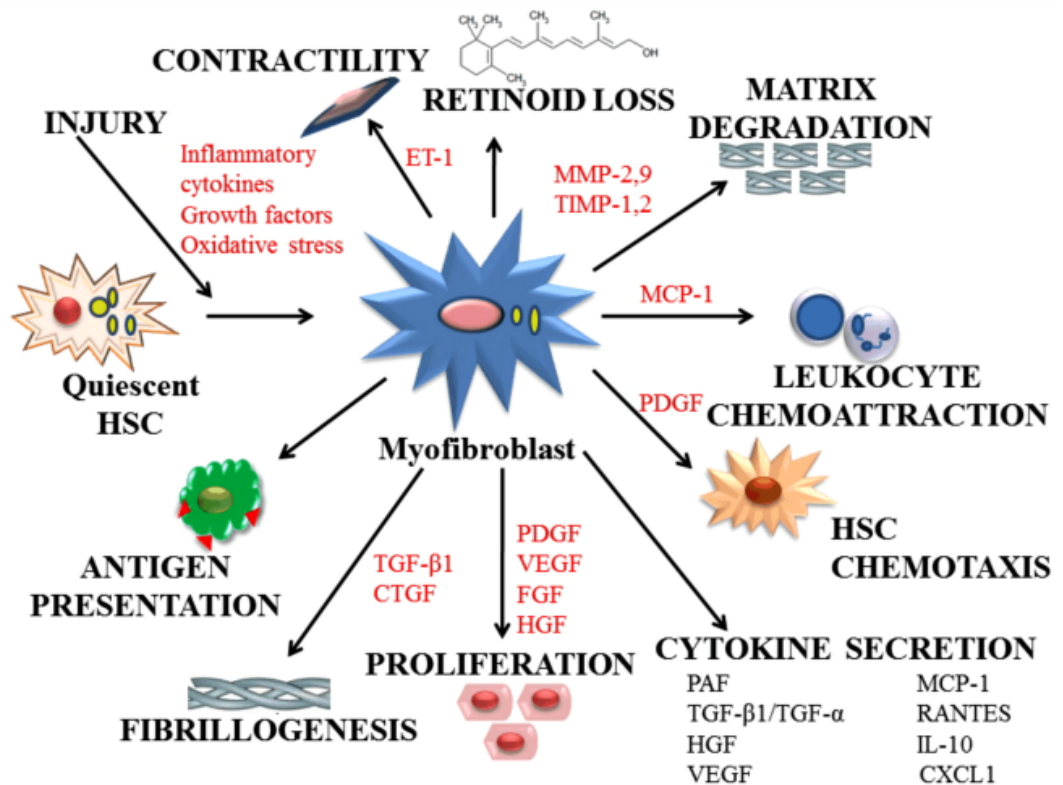


Рис.1.6. Функції, що виконує активована зірчаста клітина (міофібробласт) [17]

Активовані зірчасті клітини відіграють важливу роль у ремоделюванні позаклітинного матриксу при пошкодженнях печінки. Зокрема, вони починають синтезувати велику кількість колагену типів I та III, що регулюється як транскрипційно, так і посттранскрипційно, в тому числі фактором росту TGF- β 1 [20, 36].

Протеоглікани, що синтезуються активованими ЗКП, включають протеоглікани гепарансульфату, гіалуронан, синдекани та невеликі багаті лейцином протеоглікани, є важливими компонентами реакції загоєння ран та сприяють складанню матриці при пошкодженнях та вбудовуванню факторів росту до ПКМ. Синдекани є класом протеогліканів гепарансульфату, які впливають на фіброз печінки. Ендотелін-1 є потужним вазоконстриктор, секретованим ЗКП, що сприяє клітинній проліферації та скороченню цих клітин [22, 32].

Активовані зірчасті клітини експресують рецептори колагену, інтегрини та рецептори, що містять дискоїдиновий домен (DDR). DDR є рецепторними тирозинкіназами, що отримують та передають сигнали від компонентів ПКМ, зокрема від колагену, для регуляції клітинної адгезії, диференціації, проліферації та міграції [45].

Зірчасті клітини після активації приймають участь у модуляції запальних реакцій печінки, посилюючи місцеву запальну реакцію печінки та інфільтрацію паренхіми мононуклеарними клітинами, а також нейтрофілами. Активовані ЗКП виробляють хемокіни, серед яких хемотаксичний пептид моноцитів (MCP)-1, CCL21, RANTES і CCR5, інтерлейкін-6. Вони експресують toll-подібні рецептори, що вказує на можливу взаємодію з бактеріальним ліпополісахаридом [15, 17].

Зірчасті клітини печінки сприяють накопиченню нейтрофілів при захворюваннях печінки шляхом синтезу нейтрофільних хемоаттрактантів, зокрема інтерлейкіну-8 та фактора активації тромбоцитів, а також білок системи комплементу C4. ЗКП також секретують простагландини, які

відіграють важливу роль у метаболізмі та запаленні печінки, а також у нейрорегуляції судин [9, 15].

Активовані зірчасті клітини синтезують TGF- α (трансформуючий фактор росту α), TGF- β (трансформуючий фактор росту β) та EGF (епідермальний фактор росту), потужні епітеліальні фактори росту, які беруть участь у проліферації гепатоцитів, особливо під час регенерації печінки. TGF- β експресується після пошкодження печінки, і він проявляє потужні фіброгенні ефекти. TGF- α і EGF стимулюють мітоз у зірчастих клітинах, чим створюють аутокринну петлю для клітинної активації [15, 17]. Також під час пошкодження печінки ЗКП синтезують PDGF (тромбоцитарний фактор росту), який є потужним міогеном ЗКП та регулює проліферацію гепатоцитів. Іншими міогенами та цитокінами, що продукуються клітинами Іто, є фактор стовбурових клітин, інсуліновий фактор росту I та II [9, 15].

1.4.4. Активація клітин Іто та їхня роль при пошкодженнях печінки

Зірчасті клітини печінки у спокійному стані локалізовані у просторі Діссе та відомі своєю роллю у зберіганні вітаміну А та характерною зірчастою подібною формою. Однак внаслідок активації при пошкодженні печінки ЗКП проходять через фенотипову транс диференціацію до міофібробластів та втрачають цитоплазматичні накопичення вітаміну А, який перетворюється у ретиноеву кислоту, яка визначає взаємодію між активованими клітинами Іто та природними кілерами [3, 16]. Окрім цього, ЗКП характеризуються значним розвитком шорсткого ендоплазматичного ретикулуму та апарату Гольджі, що підтримує посилений синтез компонентів позаклітинного матриксу [17].

Активація зірчастих клітин є однією з центральних патогенетичних подій при розвитку фіброзу печінки. Вони є одним з основних джерел позаклітинного матриксу, а також джерелом експресії цитокінів та факторів росту. У зонах запалення клітини Іто контактують з

пошкодженими паренхіматозними клітинами у безпосередній близькості з ними, що стимулює їхню активацію. ЗКП при пошкодженнях печінки розповсюджується за межі простору Діссе та оточені великою кількістю пучків колагену [16, 20].

При прогресуванні фіброзну лишається невелика кількість зірчастих клітин, які зберігають свій фенотип та здійснюють звичайні метаболічні функції. Однак більша частина популяції клітин Іто втрачає свої ліпідні краплі з вітаміном А, починають експресувати цитоскелетний білок гладких м'язів α -актину (α -SMA), гельсолін, десмін та компоненти позаклітинного матриксу, разом зі зниженням продукції гліального фібрилярного кислотного білка [16, 17].

Після активації ЗКП відбувається збільшення синтезу ДНК, клітинної проліферації, осередкова проліферація ліпоцитів, гіперплазією гранулярної цитоплазматичної мережі та мітохондрій, а також формуванням перицелюлярних колагенових волокон у просторі Діссе. Клітини Іто також експресують на своїй поверхні молекули адгезії та здатні стимулювати активність Т- і НК-клітин, що утворює патологічний ланцюг загибелі гепатоцитів та постійного відкладення колагену в ПКМ [6, 18].

Зірчасті клітини після активації починають синтезувати компоненти позаклітинного матриксу. Серед компонентів матриксу виділяють велику кількість колагену типів I та III, в менших кількостях – колагени типів IV, V і VI, а також глікопротеїни та протеоглікани, серед яких фібронектин, ламінін і тенасцин [26, 32]. Окрім збільшення продукції матриксу, зірчасті клітини також сприяють розвитку фіброзу за рахунок збільшення загальної кількості клітин [15].

На початку процесу загоєння ран міофібробласти починають у збільшених кількостях виробляти колаген III типу, що забезпечує певну пластичність рубцевої тканини на ранній фазах фіброзу. За відсутності повторного пошкодження грануляційна тканина з часом розсмоктується,

міофібробласти піддаються апоптозу, а в матриксі починають переважати колагени I типу [32].

У випадку, коли негативний вплив на печінку є повторним або хронічним, ПКМ набуває щільності та жорсткості за рахунок відкладення великої кількості колагену I типу, а також колагени III та IV типу у менших кількостях. При цьому у вогнищі запалення спочатку відбувається активна проліферація клітин Іто, а тоді їхнє перетворення у міофібробласти [22, 41].

Однією з характерних особливостей активованих зірчастих клітин є експресія цитоскелетного білка α -SMA у стресових волокнах, що визначає високу скорочувальну активність цих клітин [15, 32]. Міофібробласти відповідають за скорочувальну здатність рубцевої тканини під час загоєння ран, а також є основним фактором, відповідальним за підвищення опору тканини під час фіброзу печінки [15, 38].

Активація зірчастих клітин печінки є складною багатоетапною послідовністю подій (Рис.1.7), яка ініціюється пошкодженням печінки різного походження. Саму активацію зазвичай поділяють на кілька етапів: ініціацію та перпетуацію, за якими слідує послаблення фіброзу у разі припинення негативного стимулу [15, 16].

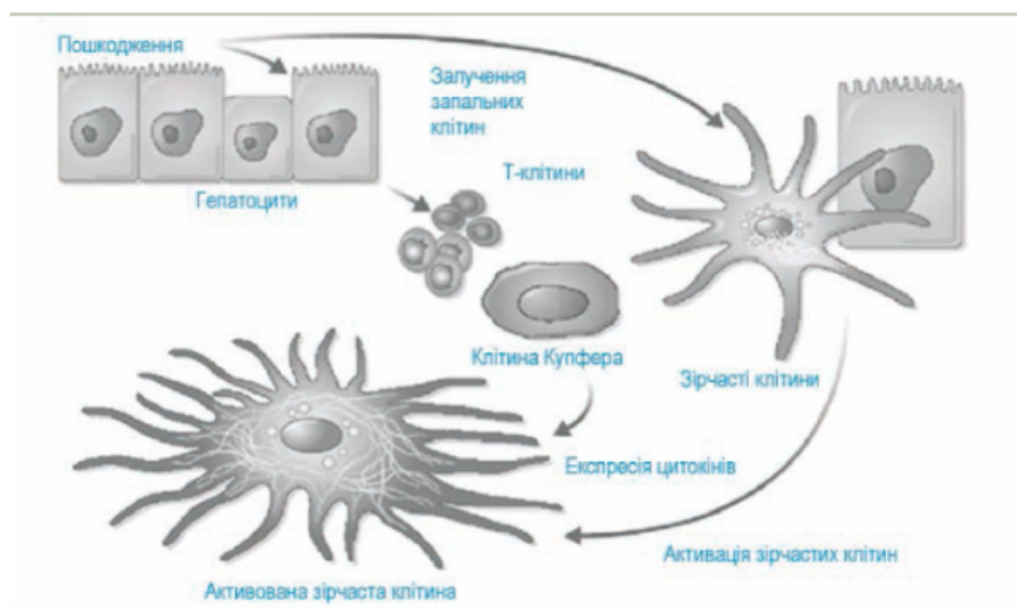


Рис.1.7. Активація зірчастих клітин печінки [6]

У фазі ініціації (передзапальна стадія) передбачає зміну структури експресії генів і фенотипу зірчастих клітин у бік міофібробластоподібної диференціації клітин, внаслідок чого клітини стають чутливими до проліферативних та фібро генних цитокінів та інших подразників шляхом посилення мембранних рецепторів [18, 34]. Ініціація виникає внаслідок паракринної стимуляції через зміни в оточуючому позаклітинному матриксі, вплив продуктів пошкоджених та некротичних гепатоцитів з вивільненням активуючих цитокінів, а також вплив пероксидів ліпідів. Ці процеси приводять до різкого збільшення синтезу білків позаклітинного матриксу зірчастими клітинами [15, 16].

Друга стадія (стадія перпетуації) є результатом впливу медіаторів запалення. Загалом, перпетуація – це «увічнення» активованого фенотипу зірчастих клітин з надмірною експресією рецепторів цитокінів, втрата ретиноїдів, посилений фіброгенез, запальна клітинна інфільтрація та підвищена клітинна проліферація [15, 34]. У цій фазі попередньо стимульовані зірчасті клітини додатково посилюються іншими клітинами печінки, зокрема інвазією лейкоцитів і тромбоцитів, активованими клітинами Купфера, гепатоцитами та синусоїдними ендотеліальними клітинами, які залучені до секреції фібро генних цитокінів та медіаторів запалення. Після активації ЗКП посилюють експресію компонентів ПКМ, ферментів, що руйнують матрицю, та їх інгібіторів, що сприяє ремоделюванню матриксу та накопиченню великої кількості білків ПКМ. Деякі з цитокінів можуть стимулювати міофібробласти аутокринним шляхом паракринним способом, таким чином, що після запальна фаза може сприяти збереженню фіброгенезу навіть після усунення попередніх фаз [16, 34].

Активація та трансдиференціація ЗКП є результатом взаємодій з резидентними та нерезидентними клітинами печінки (Рис.1.8). Зокрема, трансдиференціація зірчастих клітин регулюється складною мережею

міжклітинних взаємодій між клітинами Іто та активованими клітинами Купфера, пошкодженими гепатоцитами, тромбоцитами, ендотеліальними та запальними клітинами, за участю цитокінів і непептидних медіаторів, таких як активні форми кисню, ейкозаноїди та ацетальдегід. Окрім цих сигналів, активації ЗКП також сприяють сигнали від фіброзного мікрооточення тканини, імунної та системної метаболічної дисрегуляції, кишкового дисбактеріозу та продукти вірусних гепатитів [20, 22].

Гепатоцити є джерелом фіброгенних пероксидів ліпідів, що можуть впливати на активацію ЗКП. Різноманітний вплив призводить до зменшення кількості гепатоцитів у печінці, дисфункції мікрооточення клітин паренхіми, що призводить до загибелі гепатоцитів [6, 15]. Апоптозні тільця, що утворюються після пошкодження гепатоцитів, сприяють активації клітин Купфера та трансдиференціації зірчастих клітин печінки [17].

Інфільтрація та власна активація клітин Купфера у запальні макрофаги сприяє активації зірчастих клітин печінки. Клітини Купфера стимулюють синтез матриксу, клітинну проліферацію та вивільнення ретиноїдів ЗКП шляхом впливу цитокінів (особливо TGF- β) та реактивних проміжних продуктів кисню або ліпідних пероксидів [15, 43].

Мертві та відмираючи епітеліальні клітини та фагоцитуючі лейкоцити вивільняють медіатори запалення, пов'язані з пошкодженням молекулярні структури (DAMP) або сигнали небезпеки, які ініціюють запальну відповідь. Серед таких медіаторів виділяють фактор некрозу пухлини (TNF), IL-6, IL-1 β , IL-8, активні форми кисню, що сприяють активації зірчастих клітин [1, 22].

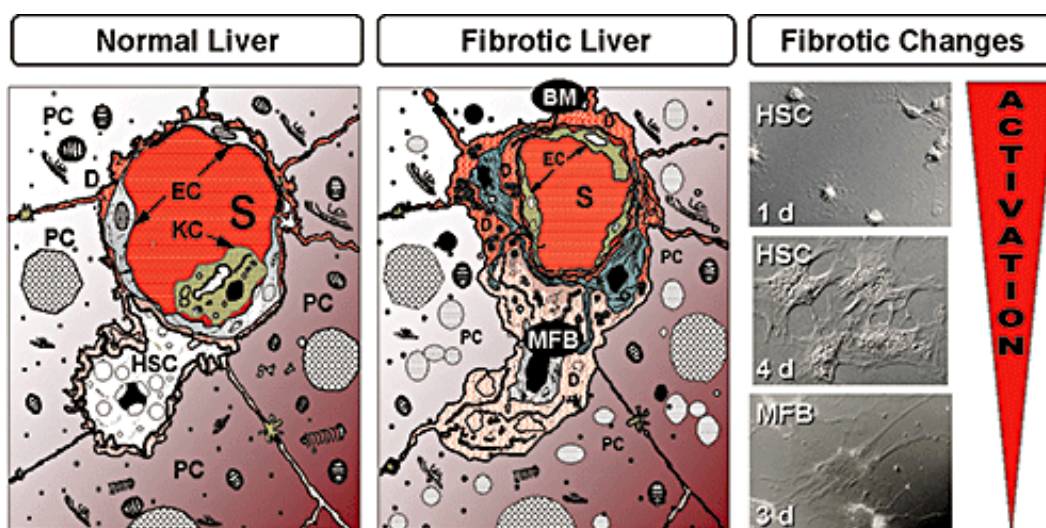


Рис.1.8. Схематичне зображення зірчастих клітин печінки (HSC), розташованих поблизу сусідніх гепатоцитів (PC) під синусоїдальними ендотеліальними клітинами (EC) у нормальній печінці (зліва). Перетворення ЗКП на міофібробласти (в центрі). Праворуч показано морфологічні зміни первинних культур ЗКП на першу та четверту добу після посіву та міофібробласти (3-тя доба вторинної культури). S – синусоїди печінки; КС – клітини Купфера; ВМ – базальна мембрана; D – простір Діссе [16]

Продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), такі як реактивні проміжні продукти кисню, активні форми кисню та реактивні альдегіди (зокрема малоновий альдегід), можуть виступати в ролі медіаторів та активаторів клітин Іто [1, 18]. Виробленні активні форми кисню стимулюють зірчасті клітини печінки, чому сприяє цитохром CYP2E1 [15].

Продукти ПОЛ (гідроксильні радикали, радикали кисню, супероксид-аніони, перекис водню) беруть участь у процесі фіброгенезу, підвищуючи продукцію макрофагами трансформуючого фактора росту β , а також стимулюючи експресію колагену шляхом активації зірчастих клітин печінки. Активні форми кисню забезпечують паракринні сигнали активації клітин Іто. НАДФН-оксидаза (NOX) є трансмембранним ферментним комплексом, який утворює АФК у відповідь на подразнення, тому зменшення активності NOX послаблює запалення та пошкодження печінки [7, 16, 45].

Трансформовані із зірчастих клітин міофібробласти мають здатність синтезувати не тільки елементи позаклітинного матриксу, а й до експресії та секреції різноманітних про- і протизапальних цитокінів і факторів росту [6, 8]. Головним профіброгенним цитокіном серед пептидних медіаторів, який виробляється у тому числі і активованими зірчастими клітинами, є TGF- β . Окрім цього, додатковими цитокінами та факторами росту, які беруть участь у фіброгенезі, є епідермальний фактор росту, мітогени гепатоцитів (IL-6, фактор росту гепатоцитів); макрофагальний колонієстимулюючий фактор, фактор росту стовбурових клітин, хемотаксичні фактори макрофагів (MCP-1 і TNF- α); мітогени ЗКП (PDGF-B і PDGF-D), профіброгенні фактори (OPN, HMGB1 і TIMP); кілька факторів росту фібробластів; інсуліноподібний фактор росту I, адипоцитокіни (лептин, адипонектин) та інші, які частково зв'язані з позаклітинним матриксом [1, 8, 16]. Активовані ЗКП також реагують на медіатори, що синтезуються іншими клітинами печінки, серед яких ендотелін-1, OPN і HMGB1, посилюючи профіброгенну відповідь [8].

PDGF є одним з ключових мітогенів та хемоатрактантів для активації зірчастих клітин печінки. Цей паракринний фактор сприяє активації клітинних сигнальних шляхів клітинної проліферації, міграції, секреції білків ПКМ і скоротливості, сприяють трансдиференціації ЗКП та підтримці активованого стану [22, 41]. Димерна ізоформа PDGF-BB є найсильнішою для стимуляції росту та пов'язана з переважною експресією рецепторів PDGF- β , які індукуються на поверхні міофібробластів та їхніх попередників для формування позитивних петель зворотного зв'язку для їх постійної активації [18, 22].

Добре описаним фіброгенним цитокіном, що сприяє активації ЗКП, є білки CCN. Вони отримали таку назву завдяки трьом першим ідентифікованим членам цієї родини: збагачений сістеїном (CYR61), фактор росту з'єднувальної тканини (CTGF) і гіперекспресія ефробластоми (NOV). Ці білки є невід'ємними компонентами позаклітинного матриксу, а

CTGF значно підвищується при пошкодженнях печінки та сприяє профіброзній активності та активації клітин Іто [32, 36].

Важливу роль у розвитку фіброзу відіграє основний профіброгенний цитокін – трансформуючий фактор росту β , який стимулює трансдиференціацію зірчастих клітин в міофібробласти [6, 47]. TGF- β секретується у високомолекулярній латентній формі синусоїдальними ендотеліальними клітинами та клітинами Купфера та вивільняється тромбоцитами та гепатоцитами. В активованих ЗКП TGF- β посилює експресію матриксних генів, зокрема тих, що кодують фібрилярні колагени та інші компоненти позаклітинного матриксу. Крім того, TGF- β індукує зниження вироблення матриксних металопротеїназ (ММП-1) та збільшує продукцію їх тканинних інгібіторів (ТІМП-1), що пригнічує деградацію білків ПКМ та сприяє накопиченню матриксу. Окрім вищезазначених функцій, TGF- β індукує апоптоз гепатоцитів, пригнічує проліферацію клітин печінки та сприяє виробництву клітинного фібронектину і протеогліканів [16, 18]. TGF- β також активує сигнальні шляхи мітогенактивованої протеїнкінази (МАРК), включаючи позаклітинну сигнально-регульовану кіназу (МАРК1), p38 і cjun N-кінцеву кіназу (JNK), що сприяє активації зірчастих клітин [45].

Зв'язування TGF- β і фосфорилування рецептора типу I індукує фосфорилування білків сімейства SMAD, розташованих нижче, які приймають участь у налаштуванні та посиленні ефектів TGF- β під час фіброгенезу [22, 45]. Секреція TGF- β активованими ЗКП у відповідь на пошкодження печінки формує аутокринну петлю позитивного зворотного зв'язку, яка керує фіброгенезом через SMAD2/SMAD3. SMAD2/SMAD3 сприяють експресії генів компонентів позаклітинного матриксу, таких як COL1A1, COL3A1 і ТІМП1, а також близько 60 інших генів, пов'язаних з ПКМ. Активація SMAD3 сприяє транскрипції колагену I та III типів, в той час як SMAD7 діє як негативний регулятор у циклі ауторегуляційного зворотного зв'язку [12, 45].

Інактивація зірчастих клітин печінки зумовлює зупинку надмірного синтезу колагену та сприяє регресії позаклітинного матриксу. Відкладення ПКМ зазвичай врівноважується збільшеною активністю ММП, однак при пошкодженнях печінки вони можуть блокуватися ТІМП та сприяти розвитку фіброзу печінки. Деградація матриксу також можлива завдяки генетичним сигналам, які здатні викликати апоптоз міофібробластів та їхню інактивацію (зокрема за допомогою гена PPAR γ). Апоптотичні гени експресуються в мір фібробластах під кінець процесу загоєння ран [17, 32].

Серед механізмів, що регулюють активність зірчастих клітин, також виділяють синусоїдні ендотеліальні клітини печінки та цитокіни загалом. Перші підтримують ЗКП у стані спокою, таким чином пригнічуючи розвиток фіброзу та внутрішньопечінкову вазоконстрикцію. Цитокіни регулюють активність клітин Іто шляхом зв'язування зі специфічними мембранними рецепторами, їхня активність пригнічується після завершення закриття рани [15, 22].

Активація ЗКП вимагає кооперації багатьох факторів транскрипції. Проліфератори пероксисом активують рецептор γ (PPAR- γ), який є рецептором ядерного гормону, який починає функціонувати як фактор транскрипції після зв'язування ліганду [18]. Регуляція транскрипції також відіграє важливу роль у процесі активації ЗКП. Транскрипційний фактор MEF2 (фактор енхансера міоцитів 2) регулює аспекти активації клітин Іто. Сімейство факторів транскрипції Forkhead FoxO (ген Forkhead box, група O) відіграє ключову роль у трансдиференціації та проліферації ЗКП при фіброзі [41].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експерименти проводилися на щурах лінії Wistar, молодих самцях (3 міс.). Експерименти на лабораторних тваринах проводилися згідно з біотичним комітетом Харківського національного університету ім.В.Н.Каразіна (протокол біоетичної комісії Харківського університету № 3 від 28.05.2021 р.), який керується положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 18.03.1986). Тварини утримувалися у стандартних умовах віварію НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Протягом експерименту тварини утримувалися у стандартних умовах та мали вільний доступ до їжі та води.

Тварин розділили на чотири групи: I – контрольні, які містилися у стандартних умовах; II – перша експериментальна група тварин, які отримували 1 цикл введення розчину сірчаної кислоти міді (три внутрішньочеревинні введення кожні 48 годин у розрахунку 1 мг/100 г маси тіла тварини); III – друга експериментальна група, яка отримувала 1 цикл введення сірчаної кислоти міді як перша група, потім три дні – фізіологічний розчин *per os*, а потім другий цикл введення сірчаної кислоти міді; IV – третя експериментальна група тварин, яка отримувала 1 цикл введення сірчаної кислоти міді, а потім три дні отримували масляний розчин ретинолу (0,10 мг/100 г маси тіла) *per os*, а після цього – другий цикл введення міді (Рис.2.1).

На протязі усього експерименту проводилася фіксація маса тіла тварин. Через шість днів після останнього введення дози сірчаної кислоти міді було здійснено забій тварин під ефірним наркозом. Для аналізу було зібрано цільну кров для визначення гематологічних показників, сироватка крові для біохімічних показників та печінка для гістологічного дослідження.

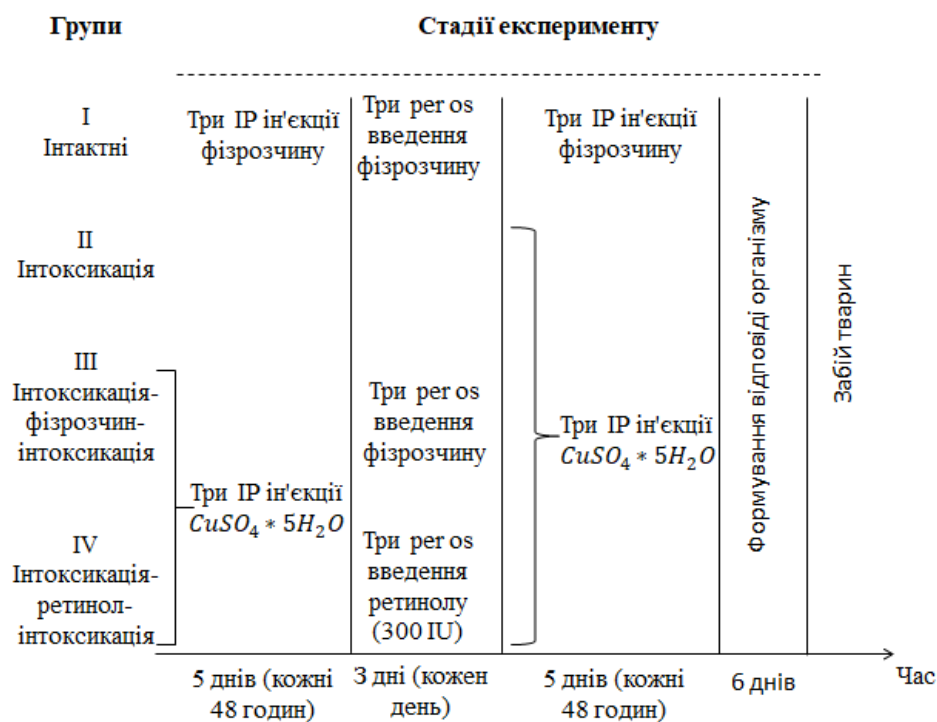


Рис.2.1. Схема проведеного дослідження

Перші краплі крові збиралися у пробірки з ЕДТА для вивчення гематологічних показників (кількість лейкоцитів, лімфоцити, моноцити, гранулоцити, тромбоцити та еритроцити), які оцінювалися на автоматичному аналізаторі Mindray BC-2800 Vet. (США). Іншу кров збирали у стерильні пробірки та інкубували їх при 37°C протягом 20 хвилин, після чого її центрифугували при 1500 g 20 хвилин. Супернатант переносили у чисті пробірки та використовували для визначення ферментів сироватки.

Після розтину черевної порожнини оцінювали ступінь утворення сполучнотканинних спайок навколо часточок печінки. Для гістологічного вивчення печінки брали фрагменти органу та фіксували їх у 10% розчині формаліну. Після 1-2 діб фіксування зразків таким чином проводили зневоднення зразків з допомогою етилового спирту. Для цього зразки переносили в етиловий спирт зі зростаючою концентрацією (від 70% до 96%) та витримували по 12 годин у кожній з концентрацій. Після цього зразки переносили на 1-3 години у ксилол, потім на 2-3 години до жидкого

парафіну до 57°C. Готували напівтонкі зрізи на мікротомі та фарбували зразки гематоксиліном-еозином. Мікроскопія проводилася на microscope Carl Zeiss, camera SIGETA M3CVOS 14000, magnification 200.

Проводилося визначення ферментів печінки на біохімічному аналізаторі STAT-FAX 1908 (США). Аспартатамінотрансфераза (АСТ) методом, заснованому на тому факті, що АСТ каталізує перенесення аміногрупи від L-аспартату до α -кетоглутарату з утворенням оксалацетату та L-глутамату. Надалі оксалацетат піддається відновленню з одночасним окисненням NADH до NAD в реакції індикатора, каталізованої малатдегідрогеназою. Отримана швидкість зменшення поглинання при 340 нм прямо пропорційна активності АСТ.

Визначали активність аланінамінотрансферази (АЛТ) у сироватці крові. АЛТ каталізує перехід аміногрупи від L-аланіну до α -кетоглутарату, що призводить до утворення пірувату та L-глутамату. Отримана швидкість зниження абсорбції пропорційна активності АЛТ, що визначали спектрофотометрично.

Визначали активність лужної фосфатази сироватки крові. У реакції визначення цього ферменту *p*-нітрофенілфосфат гідролізується до *p*-нітрофенолу та неорганічного фосфату. Рівень гідролізу *p*-NPP прямо пропорційний активності лужної фосфатази. Поглинання визначали при довжині хвилі 405 нм, температурі 37 градусів, інкубації протягом 60 секунд і часу визначення 60 секунд на аналізаторі. Активність виражали в умовних одиницях.

Метод визначення активності γ -глутаміламінотрансферази (ГГТ) заснований на тому, що γ -глутаміламінотрансфераза каталізує перехід глутамільної групи L- γ -глутамілкарбокси-4-нітроаніліду в гліцилгліцин з утворенням 5-аміно-2-нітробензоату, сума якого прямо пропорційна активності ГГТ. Активність ферменту вимірюється кінетично при довжині хвилі 405 нм на біохімічному аналізаторі.

З метою визначення можливої дії вітаміну А надавати «захисну» дію організму на токсичну дію сірчаноокислої міді було додатково сформовано 4 групи тварин, у кожній з яких було по 13 щурів з масою тіла 80-130 г. Перша група протягом 3 днів щодня отримувала замість вітаміну А олію, друга група — вітамін А у дозі 0,03 мг/100 г маси, третя – вітамін А у дозі 0,10, а четверта – 0,31. Через 24 години після останнього запровадження вітаміну А всім групам тварин кожену групу розбили на дві підгрупи; в одній з них (по 3 щури в підгрупі) визначали вміст вітаміну А в печінці, а тваринам другої підгрупи (у кожній було по 10 щурів) вводили внутрішньочеревно сірчаноокислу мідь у дозі 3,25 мг/100 г маси та фіксували час смерті.

Дані представлені як групові середні та стандартна помилка ($x \pm SE$). Аналіз та візуалізація даних були проведені за допомогою допомогою Excel 2013 (Microsoft Corporation., USA). Достовірні відмінності між групами визначали за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Вітні та ANOVA. Відмінності між контрольною та дослідною групами вважали достовірними при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Відповідь клітинної ланки імунітету на токсичний вплив сірчаноокислої міді

Сумарна кількість основних типів імунокомпетентних клітин (лейкоцити, лімфоцити, моноцити та гранулоцити) у кровотоку збільшувалася після першого циклу інтоксикації на 47 % та на 140 % після другого циклу інтоксикації порівняно з контролем (Рис.3.1.).

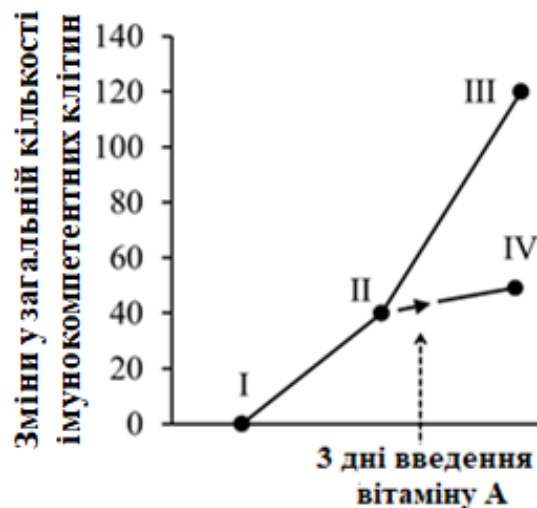


Рис.3.1. Зміна загальної кількості імунокомпетентних клітин у кровотоці, де інтактні тварини прийняті за нульовий рівень

Введення досліджуваним тваринам дози вітаміну А між двома циклами інтоксикації сірчаноокислою міддю перешкоджало збільшенню кількості імунокомпетентних клітин у крові у порівнянні з тваринами, які не отримували дози ретинолу, і їхня кількість залишалася на рівні, характерному для тварин з одним циклом інтоксикації (Рис.3.1.II-IV). Отже, введення ретинолу тваринам на початкових стадіях формування фіброзу печінки запобігало прояву його подальшого розвитку на рівні імунокомпетентних клітин крові.

Збільшення кількості імунокомпетентних клітин у кровотоку тварин може бути пов'язане зі збільшенням швидкості їхнього транспорту з кісткового мозку до кровотоку, на що також справляю вплив кількість вітаміну А в організмі.

Було визначено окремий вміст різних типів імунокомпетентних клітин – лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів та моноцитів – у крові всіх експериментальних тварин. З отриманих даних видно, що два цикли введення сірчаної кислоти міді супроводжувалися збільшенням кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів (Рис.3.2.А-D), однак динаміка їхнього збільшення різнилася для різних типів імунокомпетентних клітин. Кількість лейкоцитів та лімфоцитів збільшувалася після першого циклу інтоксикації на 47 та 22 % відповідно (Рис.3.2.А,В-II), а після другого циклу – на 156% та 116% (Рис.3.2.А,В-III). У той же час кількість моноцитів і гранулоцитів різко збільшувалася вже після першого циклу інтоксикації, на 100 і 82% відповідно (Рис.3.2.С, D-II), тоді як після другого циклу кількість цих клітин змінювалася незначно у порівнянні з першим циклом (Рис.3.2.С, D-III).

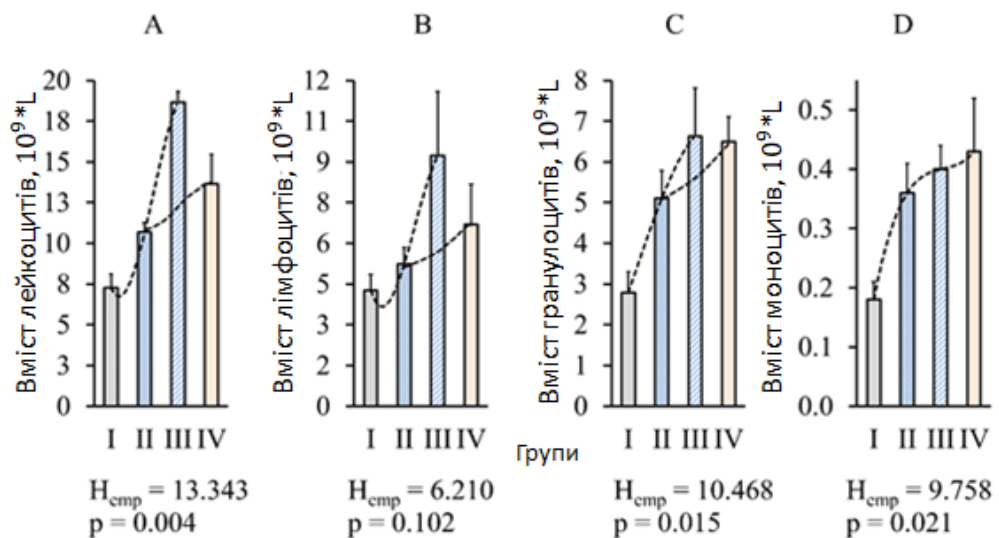


Рис.3.2. Кількість лейкоцитів (А), лімфоцитів (В), гранулоцитів (С) та моноцитів (D) у досліджуваних груп тварин

Кількість лейкоцитів після двох циклів інтоксикації збільшувалася в 2.6 рази в порівнянні з вихідним рівнем, кількість лімфоцитів – у 2.2, моноцитів – у 2.2, а гранулоцитів у 2.4 рази, тобто у результаті всі типи досліджуваних клітин збільшувалися в порівнянні з контролем (Рис.3.2.A-D-III).

Отже, у процесі розвитку фіброзу печінки темпоральний характер реакції на рівні імунокомпетентних клітин був різним для різних типів клітин.

У тому випадку, коли після першого циклу інтоксикації тварини отримували дозу вітаміну А, то кількість лейкоцитів після другого циклу інтоксикації збільшувалася лише на 27%, а не на 74 %, як у випадку двох послідовних циклів інтоксикації без отримання ними вітаміну А (Рис.3.2.A-IV). Введення вітаміну А викликало зменшення кількості лімфоцитів у порівнянні з групою тварин, які його не отримували (Рис.3.2.B-IV). У той же час введення вітаміну А не впливало на кількість моноцитів і гранулоцитів, їхня кількість була подібною до такої у тварин, які не отримували вітамін А (Рис.3.2.C,D-IV).

Отже, дія ретинолу на імунокомпетентні клітини залежала від темпоральних характеристик тієї чи іншої типу імунокомпетентних клітин. У тому випадку, коли збільшення кількості моноцитів і гранулоцитів завершено в першому циклі інтоксикації, ретинол не впливав на їх кількість. У тому ж випадку, коли ретинол вводиться тваринам, у яких збільшення кількості лейкоцитів та лімфоцитів знаходиться на стадії зростання, то ретинол частково зупиняє подальше зростання їхньої кількості, індуковане додатковим введенням сірчаної кислоти міді, тобто дія ретинолу на зміну кількості імунокомпетентних клітин залежить від характеру динаміки клітинної системи на момент впливу, тобто їх темпоральних особливостей у момент дії.

3.2. Вплив ретинолу на функціональну активність печінки на ранніх стадіях розвитку фіброзу

Після першого циклу інтоксикації активність АСТ у сироватці крові залишалася незмінною порівняно з контролем та зменшувалася після другого циклу інтоксикації (Рис.3.3.А-I-III), тобто відбулося невелике падіння активності цього ферменту у процесі двох послідовних циклів інтоксикації. Якщо тварини після першого циклу інтоксикації отримували ретинол, активність АСТ відповідала активності контрольній групі тварин, тобто повторне введення тваринам сірчаноокислої міді на тлі дії ретинолу не пригнічувало її активності (Рис.3.3.А-IV).

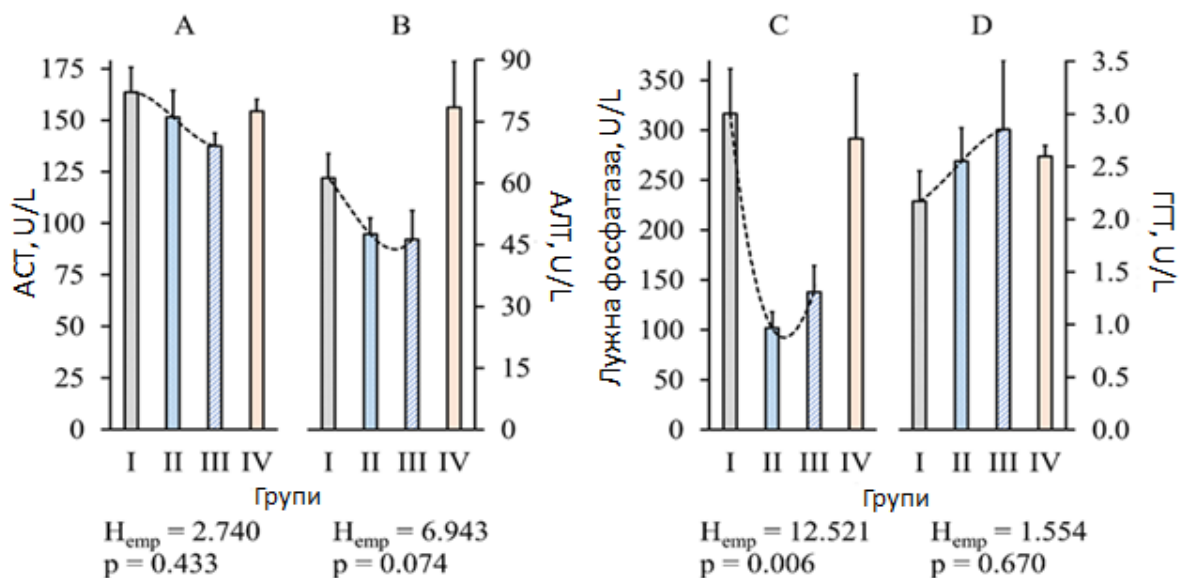


Рис.3.3. Активність ферментів у сироватці крові: аспаратамінотрансферази (АСТ) (А), аланінамінотрасферази (АЛТ) (В), лужної фосфатази (С) та глутаміламінотрансферази (ГГТ) (D) — у досліджуваних груп тварин

Активність АЛТ у сироватці крові після першого циклу інтоксикації була зниженою після першого циклу інтоксикації та залишалася на цьому рівні після другого (Рис.3.3.В-I-III). У тому випадку, якщо після першого циклу інтоксикації тварини отримували 3 послідовні введення ретинолу, то активність АЛТ у сироватці крові збільшувалася навіть після повторного введення сірчаноокислої міді та рівень контролю (Рис.3.3.В-IV).

Активність лужної фосфатази зменшувалась після першого циклу введення сірчаноокислої міді, і після другого циклу вона залишалася на тому ж рівні (Рис.3.3.С-II, III). У тому випадку, якщо тварини після першого циклу інтоксикації отримували ретинол, активність лужної фосфатази відновлювалася до контрольного рівня, а повторні введення сірчаноокислої міді не впливали на активність цього ферменту в сироватці крові (Рис.3.3.С-IV).

Активність ГГТ у сироватці крові зберігалася приблизно на рівні контролю в усіх досліджених груп тварин (Рис.3.3.D). Необхідно відзначити, що вітамін А не надавав жодного впливу на показники, які залишалися в межах гомеостатичних значень.

Отже, введення ретинолу на початкових стадіях процесу розвитку Си-індукованого фіброзу печінки забезпечувало відновлення рівня функціональної активності цього органу з боку ферментної активності. При цьому дія ретинолу на функціональні показники печінки залежала від «ступеня» відхилення того чи іншого показника від гомеостатичної норми та темпоральних характеристик активності ферментів під час дії вітаміну А.

3.3. Вплив ретинолу на анатомічні та морфологічні зміни печінки з Си-індукованим фіброзом

Морфологія печінки в інтактній групі тварин відповідала прийнятій нормі за формою долей та їх кольором для всіх експериментальних тварин цієї групи (рис.3.4., D-I). У тому випадку, якщо експериментальні тварини піддавалися одному циклу інтоксикації, у 60% тварин спостерігали розростання сполучної тканини навколо долей печінки, та їх часткове «зростання» за рахунок сполучної тканини, яке було оцінено в 1–3 бали (Рис.3.4.В,D-II), а у 40% тварин цієї групи розростання сполучної тканини та зрощення долей було виражено сильніше, і такі зміни оцінювали в 4-5 бали (Рис.3.4.С,D-II). У тому ж випадку, якщо тварини отримували два

цикли інтоксикації, то кількість тварин з яскраво вираженим розростанням сполучної тканини навколо доль печінки збільшувалася на 10% у порівнянні з одним циклом інтоксикації, а розподіл за балами 1–3 та 4–5 відповідно становив по 50% (Мал.3.4.D-III).

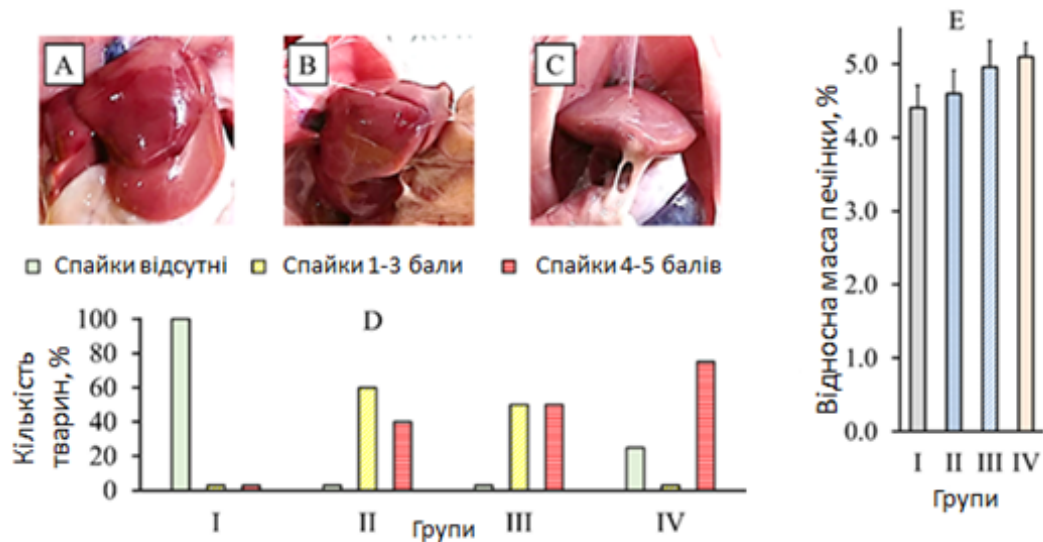


Рис.3.4. Зовнішній вигляд печінки контрольної групи тварин (А), зовнішній вигляд печінки тварин, у якій присутні спайки, які оцінювалися в 1-3 бали (В) та у 4-5 балів (С); кількість тварин у відсотках (D), у печінці яких не виявлялися спайки, були спайки в 1-3 бали і були спайки в 4-5 балів, а також відносна маса печінки ($X \pm SE$) (E) досліджуваних груп тварин.

Якщо тварини між двома циклами інтоксикації отримували дозу ретинолу, то у 25% тварин сполучнотканинних утворень між долями печінки виявлено не було, тобто за анатомічними особливостями вони не відрізнялися від інтактних тварин, тоді як у 75% тварин, навпаки, зростання сполучної тканини навколо доль печінки було сильно вираженим і оціненим у 4-5 балів (Рис.3.4.C,D-IV); долі печінки у цих тварин формували єдиний «конгломерат», а випадки з незначним формуванням сполучнотканинних утворень (1–3 бали) були відсутні (Рис.3.4.D-IV).

Отже, вітамін А надавав два різноспрямовані ефекти на утворення сполучнотканинних спайок навколо доль печінки, якщо його вводили на початкових стадіях розвитку фіброзу: як їх деградацію, так і індукцію розростання сполучної тканини, що може бути пов'язано з індивідуальними особливостями структурно-функціональної організації печінки і темпоральними особливостями показників, що беруть участь у формуванні спайок в момент послідовної дії сірчаноокислої міді та ретинолу.

Відносна маса печінки у досліджуваних груп тварин достовірно не відрізнялася між собою (Рис.3.4.Е), проте варто зазначити, що у випадку, коли між двома циклами інтоксикації тваринам отримували дозу ретинолу, то маса печінки незначно збільшувалася порівняно з інтактною групою (Рис.3.4.Е-IV). Таке збільшення відносної маси печінки може бути пов'язане з деяким посиленням регенеративних процесів та гіпертрофією клітин печінки.

3.4. Гістологічні особливості печінки на початкових етапах фіброзу

Тварини, які отримували один цикл інтоксикації сірчаноокислої міді, мали морфологічні зміни капсули Гліссона (1), вона була потовщена і без розривів порівняно зі зразком контрольної групи, кількість двоядерних гепатоцитів була менше у порівнянні з інтактним контролем (Рис.3.6.). Кровонаповнення та кількість клітин Іто у інтактних тварин та тварин після інтоксикації були подібними (Рис.3.5.А,В).

Після двох циклів інтоксикації ці показники залишилися без виражених змін: капсула Гліссона (1) не змінена, з множинними розривами, гіперемія судин (2) відсутня, крім центральних судин; Клітини Іто (3) зустрічаються рідко, кількість двоядерних гепатоцитів менша, ніж у контрольних груп (Рис.3.5.,С, 3.6.-III).

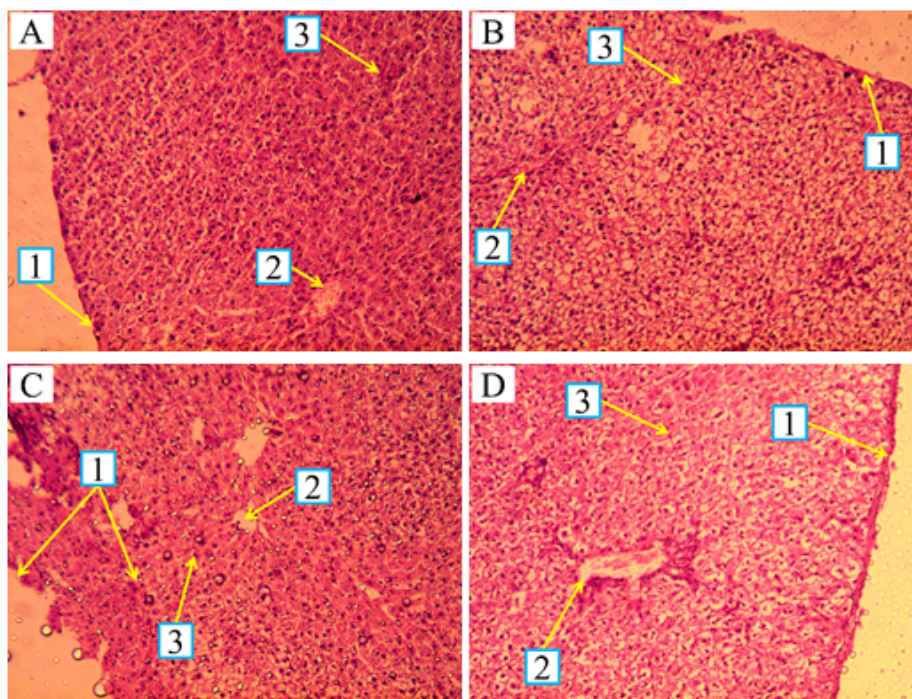


Рис.3.5. Гістологічні зрізи печінки досліджуваних тварин, де 1 – капсула Гліссона, 2 – кровонаповнення, 3 – клітини Іто

У випадку, коли між двома циклами інтоксикації тваринам вводили вітамін А, то капсула Гліссона (1) була без розривів. Кровонаповнення (2): у центральних судинах – гіперемія порівняно з другим циклом інтоксикації; клітин Іто (3) мало так само, як і після двох циклів інтоксикації. Кількість двоядерних гепатоцитів була збільшена у 2 рази у порівнянні з випадком інтоксикації та меншою мірою порівняно з контролем (Рис.3.5.D,3.6.-IV).

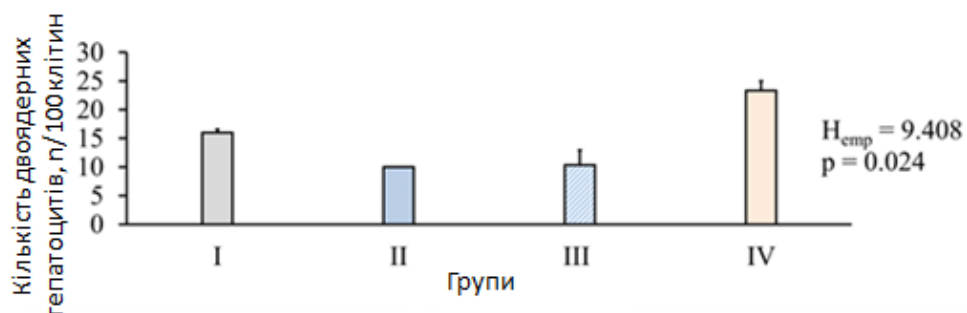


Рис.3.6. Кількість двоядерних гепатоцитів у печінці досліджуваних тварин

Отже, найбільш виражені гістологічні зміни печінки виявлялися на рівні структурних змін капсули Гліссона, кровонаповнення та кількості двоядерних гепатоцитів, що відображає стимуляцію регенеративних процесів в органі після введення вітаміну А та нормалізацію її функціональної активності.

3.5. Вплив ретинолу на динаміку маси тіла тварин з початковою стадією розвитку фіброзу печінки

Інтенсивність зростання маси тіла тварин є інтегральним показником функціонального стану організму. Маса тіла в інтактній групі тварин за час експерименту (20 днів) збільшилася на 20-25% від вихідної (Рис.3.7.І), що відповідає прийнятому стандарту для щурів. Тварини, які отримували один цикл інтоксикації сірчаною кислотою міді, майже не мали приросту маси за час експерименту (Рис.3.7.ІІ). Група тварин, що піддавалася двом циклам інтоксикації, втрачала здатність до зростання та продовжували втрачати масу тіла навіть після припинення впливу токсину (Рис.3.7.ІІІ).

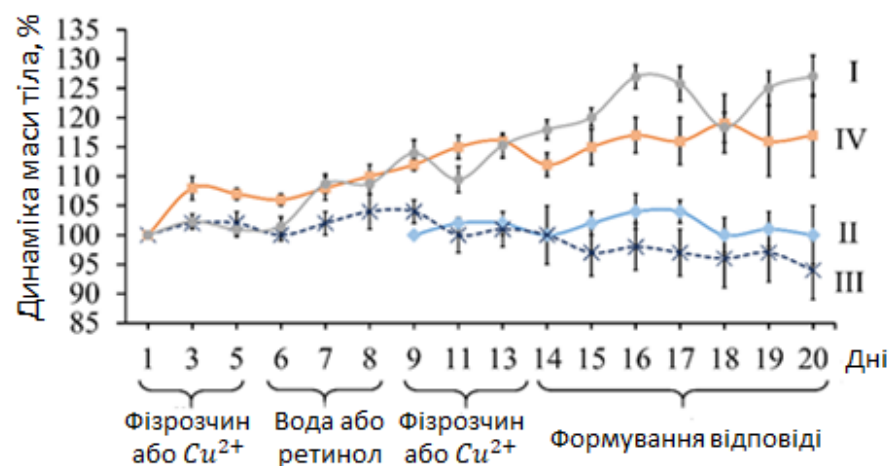


Рис.3.7. Динаміка маси тіла досліджуваних тварин

У тому випадку, якщо тварини отримували вітамін А після першого циклу інтоксикації, другий цикл інтоксикації не пригнічував швидкість росту таких тварин. Вони перевищували швидкість росту тварин з

фіброзом печінки і достовірно не відрізнялися від контрольної групи тварин за цим показником (Рис.3.7.,IV).

Отже, введення тваринам ретинолу в процесі розвитку фіброзу печінки (між двома циклами інтоксикації сірчаною кислотою міддю) нормалізувало інтенсивність росту таких тварин: вони не відрізнялися від інтактних тварин і значно перевищували швидкість росту тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки.

3.6. Вплив різних доз вітаміну А на стійкість до наступної дії летальних доз сірчаною кислотою міді

Найбільш виражені дії вітаміну А виявляються на інтегративному, фізіологічному рівні. З метою визначення можливої дії вітаміну А надавати «захисну» дію організму на токсичну дію сірчаною кислотою міді оцінювали додатково сформовані групи тварин.

Інтактні молоді щури (3-4 міс.), що перебувають на стандартному раціоні, містять близько 4,5 мкг вітаміну А на 1 г тканини печінки (Рис.3.8.А,I). Тварини, що отримували вітамін А у дозі 0,03 мг/100 г маси тіла протягом трьох днів, мали вміст вітаміну А у печінці більше 10 мкг/1 г тканини (Рис.3.8.А,II). Збільшення дози вітаміну А до 0,10 мг супроводжувалося збільшенням вмісту вітаміну А в печінці у 3 рази у порівнянні з меншою дозою (Рис.3.8.А,III). У випадку, коли тварини отримували вітамін А у дозі 0,31 мг/100 г маси тіла на протязі 3 днів, то кількість вітаміну А у печінці збільшувалося у порівнянні з дозою 0,10 мг у 4 рази (Рис.3.8.А, IV). При найбільшій дозі вміст вітаміну А був більшим за контрольний рівень у 27 разів.

Після цього було проведено серію експериментів для визначення впливу збільшеного вмісту вітаміну А у печінці на рівень виживання тварин у випадку дії летальної дози сірчаною кислотою міді у порівнянні з тваринами зі стандартним вмістом вітаміну А.

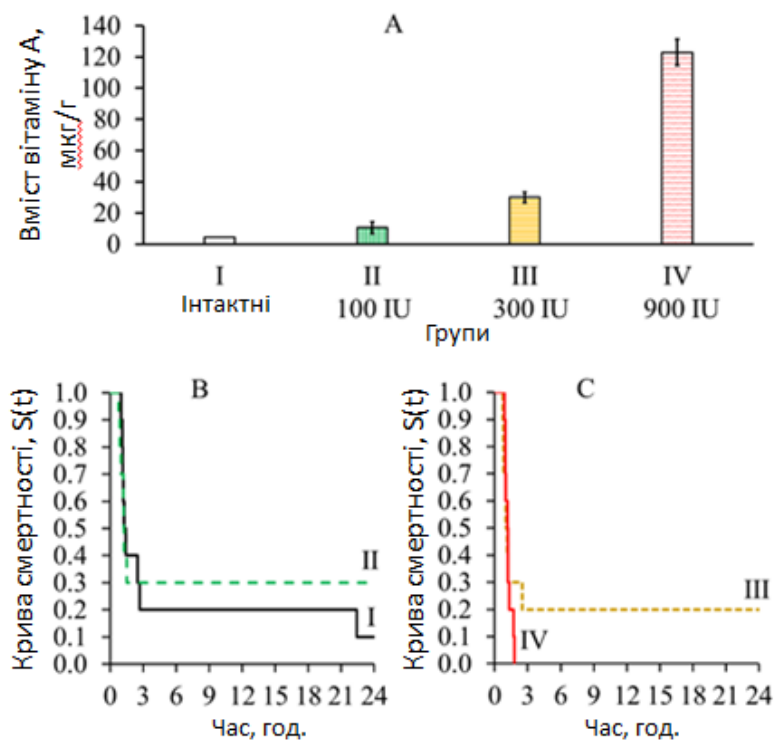


Рис.3.8. Вміст вітаміну А в печінці щурів, які не отримували вітамін А (А,І), яким щодня тричі вводили відповідно по 0.03, 0.10 та 0.31 мг вітаміну А per os на 100 г маси тіла (А,ІІ-ІV). Кожна групі містила по 10 щурів. Криві смертності (В та С) для груп досліджуваних тварин. Представлені середні значення групи та стандартні помилки.

Якщо контрольній групі тварин вводили сірчаноокислу мідь у дозі 3,25 мг/100 г маси, то через годину вони починали гинути і через 3 години живих залишалося 20%, через 24 години залишалося тільки 10% (група містила 10 тварин) (Рис.3.8.В,І).

У тому випадку, якщо цю ж дозу сірчаноокислої міді отримували тварини, яким попередньо вводили вітамін А в дозі 0,03 мг/100 г маси тіла, то живих залишалося 30% протягом усього експерименту (Рис.3.8.В,ІІ). Отже, збільшення кількості вітаміну А в печінці до 10 мкг/1 г тканини супроводжувалося хоч і незначною, але збільшеною кількістю тварин, що вижили після дії високих доз сірчаноокислої міді. Подальше збільшення дози вітаміну А до 0,10 мг/100 г маси тіла не впливало на виживання експериментальних тварин, що отримували високі дози сірчаноокислої міді,

у порівнянні з інтактним варіантом, тобто виживало 20% від усіх тварин групи (Рис.3.8.С, III).

Однак, якщо вміст вітаміну А в печінці було збільшено до 123 мкг/1 г тканини печінки шляхом введення ним вітаміну А в дозі 0,31 мг/100 г, всі 10 експериментальних тварин гинули протягом 60-80 хвилин після введення їм летальної дози сірчаноокислої міді (Рис.3.8.С,IV).

Отже, для вітаміну А існує U-подібна дозова залежність у прояві стійкості до летальної дози сірчаноокислої міді. Відносно невелике збільшення кількості вітаміну А в печінці супроводжувалося деяким збільшенням стійкості до токсичної дії міді, помірні збільшення вмісту вітаміну не впливали на цей параметр, а значне збільшення вмісту вітаміну А (до 123 мкг/1 г) у печінці зменшувало стійкість до подальшої дії токсичних іонів міді. Ці дані демонструють наявність дозової залежності впливу вітаміну А на процеси адаптації організму до дії токсичних сполук.

ВИСНОВКИ

1. Було розглянуто компоненти позаклітинного матриксу здорової тканини печінки та зміни у ньому, що призводять до розвитку фіброзу печінки. Вказано умови, що призводять до накопичення надмірного позаклітинного матриксу, та наслідки цього процесу.

2. Пошкодження печінки призводять до активації клітин Іто, внаслідок чого вони трансдиференціюються та набувають міофібробласто подібного фенотипу. Активовані клітини Іто є основним джерелом позаклітинного матриксу при розвитку фіброзу печінки.

3. Активатори та регулятори клітин Іто є потенційними мішенями для лікарських засобів при терапії захворювань печінки, пов'язаних з надмірним накопиченням позаклітинного матриксу.

4. Два послідовні цикли введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді з трьохденним інтервалом між ними прискорювала процес формування Си-індукованого фіброзу печінки.

5. Введення невеликої дози вітаміну А (0,1 мг/100 г маси тіла) на початкових стадіях розвитку фіброзу забезпечувало відновлення його концентрації до нормальних значень та запобігало подальшому розвитку фіброзу. Така доза вітаміну А сприяла зменшенню кількості імунокомпетентних клітин у кровотоці до контрольних значень після токсичної дії сірчаноокислої міді; відновленню до рівня контролю активності ряду ферментів; збільшенню кількості двоядерних гепатоцитів; відновленню динаміки росту маси тіла тварин навіть на фоні повторної дії іонів міді.

6. Вплив вітаміну А на печінку піддослідних тварин залежить від етапів розвитку фіброзу та темпоральних характеристик, клітинних та метаболічних показників, що приймають участь у формуванні адаптивної відповіді організму на дію вітаміну А на фоні фібротичних змін.

7. Для вітаміну А існує U-подібна дозова залежність у прояві стійкості та адаптації до летальної дози сірчаноокислої міді. Відносно невелике збільшення кількості вітаміну А в печінці супроводжувалося деяким збільшенням стійкості до токсичної дії міді, помірні збільшення вмісту вітаміну не впливали на цей параметр, а значне збільшення вмісту вітаміну А у печінці зменшувало стійкість до подальшої дії токсичних іонів міді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Боднар П.М., Михальчишин Г.П., Кобиляк Н.М. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет типу 2: патогенез, діагностика та лікування. *Ендокринологія*. 2012. Т. 17, № 1. С. 94-101.
2. Козачок М.М., Осьодло Г.В., Куц Т.В. Роль та місце есенціальних фосфоліпідів у лікуванні хронічних дифузних хвороб печінки. *Сучасна гастроентерологія*. 2006. № 4 (30). С. 95-101
3. Михайлюк І.О., Гурик З.Я. Клітини Іто: роль у фіброгенезі печінки при хронічних гепатитах. *Архів клінічної медицини*. 2010. №1. С. 58-61.
4. Мустафіна Г.М., et al. Сучасні погляди на функціональну морфологію та репаративні властивості печінки. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. №2 (156). С. 43-48.
5. Редько О., Довгалюк А. Ультраструктурні зміни печінки щурів зі змодельованим гострим респіраторним дистрес-синдромом та після корекції мезенхімальними стовбуровими клітинами у ранні терміни експерименту. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. 2023. Т. 22, №3. С. 84-90.
6. Степанов Ю.М., Філіппова О.Ю. Стеатоз і стеатогепатит—тригери печінкового фіброгенезу?. *Гастроентерологія*. 2013. №2 (48). С. 97-107.
7. Чумак А.А. Особливості молекулярних механізмів розвитку неалкогольної жирової хвороби печінки. *Український медичний часопис*. 2013. № 6. С. 33-40
8. Arriazu E., et al. Extracellular matrix and liver disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2014. Vol. 21, №7. P.1078-1097.
9. Atzori L., Poli G., Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009. Vol. 41, №8-9. P.1639-1642.

10. Baiocchi A., Montaldo C., Conigliaro A., Grimaldi A., Correani V., Mura F., Mancone C. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. *PloS one*. 2016. Vol. 11, №3. e0151736.
11. Baratta J.L., Ngo A., Lopez B., Kasabwalla N., Longmuir K.J., Robertson R.T. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry and cell biology*. 2009. Vol. 131, P.713-726.
12. Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014. Vol. 15, №12. P.786-801.
13. Ezhilarasan D., Sokal E., Najimi M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2018. Vol. 17, №3. P.192-197
14. Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 2010. Vol. 123, №24. P.4195-4200.
15. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008. Vol. 88, №1. P.125-172.
16. Gressner O.A., Rizk M.S., Kovalenko E., Weiskirchen R., Gressner A.M. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008. Vol. 23. P.1024-1035.
17. Grigoraş A., Giuşcă S.E., Avădănei E.R., Amălinei C., Căruntu I.D. Pointing at Ito cell, from structure to function (... or Cinderella story in liver histology). *Rom J Morphol Embryol*. 2016. Vol. 57, №3. P.915-923.
18. Gutiérrez-Ruiz M.C., Gómez-Quiroz L.E. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver International*. 2007. Vol. 27 №4. P.434-439.
19. Halper J. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: fibronectin, fibrinogen, laminin, elastin, fibrillins, fibulins, matrilins, tenascins and thrombospondins. *Progress in heritable soft connective tissue diseases*. 2021. P.105-126.

20. Hautekeete M.L., Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Archiv*. 1997. Vol. 430. P.195–207
21. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E: Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis—a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007. Vol. 46, №5. P.955–975.
22. Higashi T., Friedman S.L., Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced drug delivery reviews*. 2017. Vol. 121 P.27-42.
23. Ichikawa S., Mucida D., Tyznik A.J., Kronenberg M., Cheroutre H. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *The Journal of Immunology*. 2011. Vol. 186, №10. P.5549-5555.
24. Iredale J.P., Thompson A., Henderson N.C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: biochemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013. Vol. 1832, № 7. P.876-883.
25. Ito T., Nemoto M. Kupffer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver. *Okajimas folia anatomica Japonica*. 1952. Vol. 24, №4. P.243–258.
26. Iwaisako K., Brenner D.A., Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012. Vol. 27. P. 65–68.
27. Kamm D.R., McCommis K.S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *The Journal of physiology*. 2022. Vol. 600, №8. P.1825-1837.
28. Karamanos N.K., et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS journal*. 2021. Vol. 288, №24. P.6850-6912.
29. Karsdal M.A., et al. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay and drug development technologies*. 2013. Vol. 11, №2. P.70-92.
30. Karsdal M.A., et al. Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015. Vol. 308, №10. P.807-830.

31. Khurana A., Sayed N., Allawadhi P., Weiskirchen R. It's all about the spaces between cells: Role of extracellular matrix in liver fibrosis. *Annals of translational medicine*. 2021. Vol. 9, №8.
32. Klingberg F., Hinz B., White E.S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013. Vol. 229, №2. P.298-309.
33. McKee T.J., Perlman G., Morris M., Komarova S.V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, №1. 10542
34. Moreira R.K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007. Vol. 131, №11. P.1728-1734.
35. Muntz I., Fenu M., van Osch G.J., Koenderink G.H. The role of cell–matrix interactions in connective tissue mechanics. *Physical biology*. 2022. Vol. 19, № 2. 021001
36. Puche J.E., Saiman Y., Friedman S.L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013. Vol. 3, №4. P.1473-1492.
37. Reuben A. Ito becomes a star. *Hepatology*. 2002. Vol. 35, №2. P. 503–504.
38. Rockey D.C. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology*. 2003. Vol. 37, №1. P.4–12.
39. Roeb E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biology*. 2018. Vol. 68. P.463-473.
40. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG: Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease*. 2001. Vol. 21, №3. P.351–372.
41. Senoo H., Yoshikawa K., Morii M., Miura M., Imai K., Mezaki Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative–past, present and future. *Cell biology international*. 2010. Vol. 34, №12. P.1247-1272.
42. Shang L., Hosseini M., Liu X., Kisseleva T., Brenner D.A. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *Journal of gastroenterology*. 2018. Vol. 53. P.6-17.

43. Tacke F., Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2012. Vol. 6, №1. P.67-80.
44. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*. 2016. Vol. 97. P.4-27.
45. Tsuchida T., Friedman S.L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2017. Vol. 14, №7. P.397-411.
46. Tsukada S., Parsons C.J., Rippe R.A. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica chimica acta*. 2006. Vol. 364. P.33–60.
47. Unanue E.R. Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity*. 2007. Vol. 26, №1. P.9-10.
48. Winau F., et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*. 2007. Vol. 26, №1. P.117-129.
49. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of glaucoma*. 2014. Vol. 23. P.20-23.