

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ДЕПОНУВАННЯ ВІТАМІНУ А
В ПЕЧІНЦІ З ФІБРОЗОМ ТА ЙОГО РОЛЬ У ПАТОГЕНЕЗІ**

Допущена до захисту

«__»_____2023р.

Кваліфікаційна робота

Студентки 4 курсу, кафедри молекулярної
біології та біотехнології, група БТ-41,

Пашенко Катерини Павлівни

Науковий керівник:

викладач Новікова Анна Вікторівна

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

Завідувач кафедри

д.б.н., проф. Божков Анатолій

Іванович

Голова ЕК _____

Оцінка «_____»

«__»_____2023р

Харків 2023

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВІТАМІНУ А	8
1.1. Характеристика вітаміну А та шляхи його синтезу в організмі тварин.....	8
1.2. Біологічні ефекти, що викликає вітамін А.....	11
1.3. Метаболізм вітаміну А в організмі.....	12
1.4. Механізм накопичення вітаміну А в організмі, роль ретинол-зв'язуючого білка	15
1.5. Характеристика клітин Іто та форма депонування вітаміну А.....	16
1.6. Пошкодження печінки та вміст вітаміну А при фіброзі.....	19
1.7. Дія вітаміну А на фібротичну печінку.....	21
Висновки до розділу 1.....	23
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
2.1. Схема експерименту	24
2.2. Забір біологічного матеріалу	26
2.3. Аналітичні методи	27
2.4. Обладнання	29
2.5. Статистичні методи.....	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1. Фібротичні зміни, наявність сполучної тканини	32
3.2. Концентрація вітаміну А в печінці	33
3.3. Функціональна активність печінки.....	35
3.4. Гематологічні показники	40
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	48

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота складається з 59 листків друкованого тексту, 11 рисунків, і налічує 98 джерел використаної літератури.

Актуальність. Вітамін А відіграє важливу роль у регуляції процесів росту, репарації тканин та диференціації клітин, а його недостатність або надлишок може впливати на баланс між регенерацією та фіброгенезом в печінці, тому дослідження впливу цього вітаміну на фібротичну печінку є перспективним шляхом вирішення проблеми лікування фіброзу.

Метою даної роботи стало дослідження механізмів депонування вітаміну А в печінці з фіброзом та його роль в патогенезі.

Схема експерименту: групи тварин: I — Інтактний контроль; II — Фіброз; III — Фіброз + Вітамін А.

Результати. Показано, що щоденне введення у продовж 21 дня вітаміну А в дозі 300 МО на 100 г маси тіла фіброзним тваринам сприяло його накопиченню в клітинах печінки, прогресування сполучнотканинних утворень та відновленню функцій печінки, спостерігалось підвищення активності ЛФ в порівнянні з контрольними показниками; значущих розбіжностей у вмісті імунокомпетентних клітин у крові у всіх трьох групах виявлено не було.

Висновок. Отримані результати посприяють пошуку та розробці новітніх ефективних підходів до лікування та профілактики фіброзу шляхом регулювання рівня вітаміну А та його метаболізму.

Ключові слова: *вітамін А, печінка, фіброз, токсичність, метаболізм, шляхи синтезу, біологічні ефекти.*

ABSTRACT

The qualification work consists of 59 sheets of printed text, 11 figures, and includes 98 sources of used literature.

Topicality. Vitamin A plays an important role in the regulation of growth processes, tissue repair and cell differentiation, and its deficiency or excess can affect the balance between regeneration and fibrogenesis in the liver, so the study of the effect of this vitamin on the fibrotic liver is a promising way to solve the problem of treating fibrosis.

Goal. The aim of this work was to study the mechanisms of vitamin A deposition in the liver with fibrosis and its role in pathogenesis.

Scheme of the experiment: groups of animals: I — Intact control; II — Fibrosis; III — Fibrosis + Vitamin A.

The results. It was shown that the daily received of vitamin A for 21 days at a dose of 300 IU per 100 g of body weight to fibrotic animals contributed to its accumulation in liver cells, the progression of connective tissue formations and the restoration of liver functions, an increase in AP activity was observed in comparison with control indicators; no significant differences in the content of immunocompetent cells in the blood were found in all three groups.

Conclusion. The obtained results will contribute to the search and development of the latest effective approaches to the treatment and prevention of fibrosis by regulating the level of vitamin A and its metabolism.

Key words: *vitamin A, liver, fibrosis, toxicity, metabolism, synthesis pathways, biological effects.*

ВСТУП

Вітамін А є загальною назвою для усіх жиророзчинних ретиноїдів, які необхідні для нормального фізіологічного функціонування організму. Вітамін А сприяє поділу клітин та регенерації тканин, забезпечує нормальне функціонування імунної системи та слизових оболонок, бере участь у процесі спеціалізації клітин, допомагає підтримувати епітеліальні тканини, важливий для стабільності лізосом і синтезу глікопротеїнів. Він виступає основним компонентом для функціонування сітчастої оболонки ока, оскільки утворює фоторецепторний пігмент в сітківці — родопсин. Вітамін А має антитоксичну дію, протизапальний ефект та інші регуляторні властивості [1-6].

У зв'язку з такою багатфункціональністю вітаміну А, його дефіцит може приводити до ксерофтальмії — порушень зору та адаптації очей до темряви («куряча сліпота») [7], порушення нормального функціонування залоз та слизових оболонок [2], ламкості нігтів та волосся [8], порушень росту та розвитку, патологій статевої системи [3], ожиріння [9, 10], підвищення ризику розвитку злоякісних новоутворень [11], пригнічення функціонування імунної системи та збільшення ризику захворювання на інфекційні хвороби [2, 3].

Вплив вітаміна А на розвиток організму має вік-залежний характер, це пов'язано з тим, що відповідність між функціями вітаміну А і розвитком організму є критично важливою в період зародження, перші роки життя та дитинства. Так у роботах [12-14] показано, що дефіцит вітаміну А у дітей має важчі наслідки, чим у дорослих, що проявляється у вигляді затримки росту та розвитку, значного зниження імунітету, дистрофії скелетних м'язів, значного погіршення зору, порушення фізіології легенів і легеневих захворювань [15-18]. Через збій імунної системи підвищується смертність дітей від хвороби [19]. Крім того, недостатня кількість цього вітаміну може призводити до вроджених патологій плоду, це пов'язано з тим, що у вагітних жінок при

неправильному харчуванні зустрічається дефіцит цієї сполуки в організмі, а вона необхідна для нормального розвитку плоду [20]. Патології, пов'язані з дефіцитом вітаміну А, на сьогоднішній день найбільш поширені в країнах третього світу та являють собою актуальну медико-біологічну проблему [15-17, 21-23].

У той же час великі дози вітаміну А призводять до прояву токсичності: гострого або хронічного отруєння [24] — гіпервітамінозу, до якого відносять таку групу симптомів: сильний головний біль; зниження апетиту; нудота та блювання [24, 25]; втрату кісткової маси [26]; ідіопатичну внутрішньочерепну гіпертензію [27]; облісіння; еритему; десквамацію; міалгію [28]. Токсичність гіпервітамінозу А опосередковує його форма — ретинолієвий ефір, який забезпечує аномальну передачу сигналів клітин, що в свою чергу веде до руйнування клітинних мембран [29].

Гостра токсичність викликає підвищення внутрішньочерепного тиску [27], може призводити до кортикального гіперостозу кісток і артралгії [30-32].

Усі ці проблеми з гіпервітамінозом А пов'язані з тим, що у людей немає механізмів пригнічення всмоктування або виведення надлишку цього вітаміну з організму [28], тому надмірне споживання призводить до накопичення цієї сполуки більшою мірою у печінці та меншою мірою у периферичних тканинах [33], як наслідок — формуються тяжкі пошкодження печінки і хронічна інтоксикація організму в цілому [34].

Печінка відіграє важливу роль не тільки тому, що бере на себе удар при надлишку вітаміну А, а ще й тому, що в нормальних фізіологічних умовах депонує понад 80% цієї сполуки, дев'яносто відсотків з яких локалізується у її зірчастих клітинах [35, 36].

Зірчасті клітини печінки або клітини Іто були названі на честь Тосіо Іто, який ввів метод фарбування жиру для ідентифікації «жирозберігаючих клітин» печінки [37]. На сьогоднішній день відомо, що в печінці з нормальним

гомеостазом ці клітини знаходяться у стані спокою, але коли організм зустрічається з екзогенними або ендогенними токсичними факторами біологічної або хімічної природи, перші удари яких бере на себе печінка, клітині Іто переходять в активний стан. У активному стані вони починають виробляти позаклітинний матрикс. Таким чином клітини Іто, які характеризуються високим вмістом вітаміну А, відіграють центральну роль у розвитку фіброзу печінки [38] — процесу утворення сполучної тканини з метою залатати пошкоджені ділянки з одного боку, а з іншого — призвести до високоімовірно розвитку спайкової хвороби [39]. Це узгоджується і з тим, що данні про роль вітаміну А у розвитку фіброзу печінки суперечливі.

Деякі дослідники вважають, що вітамін А може забезпечувати відновлення функції печінки при фіброзі [40]. Проте є дані про те, що додаткове введення вітаміну А може прискорювати процес переходу фіброзу в цироз [28]. Вирішення цієї суперечності має велике значення в лікуванні та профілактиці патологій печінки. У зв'язку з цим метою роботи було вивчення ролі вітаміну А у розвитку фіброзу печінки та профілактики хвороб печінки.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВІТАМІНУ А

1.1. Характеристика вітаміну А та шляхи його синтезу в організмі тварин

Вітамін А — це загальна назва для класу сполук з ретиноїдною активністю, які у природі зустрічаються у трьох основних формах: ретинол, ретиналь та ретиноева кислота [41]. Усі форми вітаміну А мають подібну структуру та однакові фізіологічні функції в організмі. Ретиноїди — жиророзчинні сполуки і на відміну від водорозчинних вітамінів, вони не виводяться з організму, а легко накопичуються, особливо в печінці та жировій тканині [24]. При надмірному вживанні вітаміну А, в наслідок його накопичення в організмі, проявляється токсичність [42].

Вітамін А відіграє ключову роль у правильному функціонуванні багатьох фізіологічних функцій. Він необхідний для розвитку та росту ембріона, для підтримки імунної системи та для зору. Організм людини може метаболізувати природні форми вітаміну А і провітаміну А в біологічно активні форми (ретинол, ретиналь, ретиноева кислота), які взаємодіють з багатьма молекулярними мішенями, включаючи ядерні рецептори, опсин в сітківці і, згідно з останніми дослідженнями, також деякі ферменти [24].

Вітамін А у різних біохімічних процесах відіграє роль кофактора, підвищує мітотичну активність епітеліальних клітин, а також запобігає гіперкератозу через синтез РНК та сульфатовані мукополісахариди. Ретинол всмоктується у тонкій кишці за участю жовчних кислот. З кишечника він надходить у печінку, де близько 90% депонується у зірчастих клітинах печінки [35, 36, 38].

Вітамін А може бути отриманий з їжі у формі преформованого вітаміну А (ретинолу) або у вигляді каротиноїдів провітаміну А, які в організмі

перетворюються на ретинол [24]. Однак деякі тварини не можуть отримувати достатньо вітаміну А зі свого раціону і повинні синтезувати його з попередників у своєму організмі.

Явище утворення вітаміну А в організмі тварин вперше пояснив Мур у 1930 році [43]. Мур описав перетворення β -каротину на вітамін А в тонкому кишечнику, надаючи перші докази того, що ці каротиноїди є прямими попередниками вітаміну А у тварин. В організмі тварин вітамін А синтезується з провітамінів А, а саме під час розпаду рослинного β -каротину. Оскільки тварини не можуть синтезувати ретиноїди *de novo*, основними джерелами цих сполук є каротиноїди (C_{40}) рослинного походження [44].

У 1965 році дослідники Джеймс Аллен Олсен і Девітт Гудмен продемонстрували в безклітинних екстрактах, отриманих із тонкої кишки шурів, що β -каротин ферментативно розщеплюється в центральній частині 15,15' вуглецевого подвійного зв'язку, утворюючи дві молекули альдегіду вітаміну А (ретинолю) [45, 46]. Отриманий ретиналь потім швидко відновлюється до ретинолу за допомогою ферменту ретинолдегідрогенази [47, 48].

Загалом існує декілька можливих механізмів синтезу в організмі тварин вітаміну А [49]: ацетиленовий та альдегідний механізми, а також побічні шляхи, які включають перетворення різних форм вітаміну А на інші:

До ацетиленового шляху, по-перше, відноситься перетворення бета-каротину на ретинол. Бета-каротин — це каротиноїд провітаміну А, який в організмі може перетворюватися на ретинол. Цей процес відбувається у слизовій оболонці кишечника та печінки. Бета-каротин всмоктується з тонкого кишечника та транспортується до печінки, де розщеплюється ферментом бета-каротин 15,15'-діоксигеназою з утворенням двох молекул ретинолю. Потім ретиналь відновлюється до ретинолу під дією ферменту ретинальредуктази.

Після цього ретинол транспортується ретинол-зв'язуючим білком (RBP) у тканини-мішені, такі як очі, шкіра та слизова оболонка [44, 49].

По-друге, до ацетиленового шляху відноситься перетворення інших каротиноїдів на ретинол. Інші каротиноїди, такі як альфа-каротин, гамма-каротин та криптоксантин, також можуть перетворюватися на ретинол в організмі. Перетворення цих каротиноїдів на ретинол відбувається за механізмом, аналогічним перетворенням бета-каротину на ретинол. Однак ефективність перетворення цих каротиноїдів нижча, ніж у бета-каротину [44, 50, 51].

До альдегідного шляху можуть відноситися перетворення різних форм вітаміну А на інші форми, так, наприклад, до нього відносяться перетворення ретинолу до ретиналю і навпаки, а ретинол, у свою чергу, може перетворюватися у ретинову кислоту. Так, коли ретинол окисляється ферментом ретинолдегідрогеназою у сітківці ока у процесі зору, утворюється ретиналь необхідний для нормального функціонування органу. Крім того, ретиналь може виступати проміжною формою вітаміну А під час перетворення каротиноїдів на ретинол. Сам ретиналь може бути знов перетворений на ретинол за допомогою ферменту ретинальредуктази, що відбувається у печінці та інших тканинах; або він може бути окислений ферментом ретинальдегіддегідрогеназою до ретиноєвої кислоти. Ретиноєва кислота є активною формою вітаміну А, яка регулює експресію генів та диференціювання клітин [52, 53].

Ще одним механізмом синтезу є перетворення складних ефірів ретинілу на ретинол. Ретинілові ефіри є запасними формами вітаміну А, які знаходяться в печінці та інших тканинах. Ці складні ефіри гідролізуються ферментом гідролазою ретинілових ефірів із утворенням ретинолу. Потім ретинол транспортується ретинол-зв'язуючим білком (RBP) до тканин-мішеней.

Таким чином, розуміння шляхів синтезу вітаміну А в організмі тварин є дуже важливим для дослідження біологічних ефектів, які він викликає. Дефіцит вітаміну А, і, відповідно, біологічні ефекти, які він викликає може бути напряду пов'язаний зі шляхами синтезу цього вітаміну в організмі. Тому що людина отримує ретиноїди з їжею, а вже з них синтезує вітамін А, відповідно споживання недостатньої кількості багатой на ретиноїди їжі, може призвести до дефіциту. Окрім цього, через те, що цей вітамін жиророзчинний, він здатен накопичуватись в організмі і тому споживання надмірних доз навпаки може викликати гіпервітаміноз А, який так само як і дефіцит має ряд негативних впливів на тканини, і навіть може призвести до розвитку тяжких уражень. При цьому, в достатній кількості вітамін А дозволяю нормально функціонувати багатьом системам організму.

1.2. Біологічні ефекти, що викликає вітамін А

Вітамін А є дуже важливою речовиною для забезпечення нормального функціонування багатьох систем організму людини. Зокрема він має великий вплив на зіниці, шкіру, кістки та імунну систему [4, 8, 54, 55]. Одним із головних біологічних ефектів вітаміну А є його вплив на сітчасту оболонку ока. Він забезпечує нормальну роботу фотоперетворювальної системи ока, оскільки утворює пігмент родопсин, що дозволяє людині добре бачити в умовах недостатнього освітлення [4, 5, 56] Крім того, вітамін А має важливий вплив на шкіру та волосся, забезпечуючи їх здоров'я та красу. Він регулює процеси росту та диференціації клітин шкіри, що сприяє її зміцненню та збереженню її захисних властивостей [8]. Автори Polcz та інші у роботі [57] наголошують на важливості вітаміну А у підтримці оптимальних умов для швидкого і ефективного загоєння ран, бо він виконує кілька ключових функцій в процесі загоєння ран, включаючи регулювання диференціації та проліферації

клітин, зменшення запалення та підвищення синтезу колагену. Автори статті також зазначають, що вітамін А може бути корисним у профілактиці та лікуванні рубців та гіперпигментації шкіри, які можуть виникати після загоєння ран.

Важливим також є й вплив вітаміну А на здоров'я кісток, бо він забезпечує їх правильний ріст та розвиток. Вітамін А може впливати на проліферацію та дозрівання клітин кісткової тканини [54]. Він сприяє збереженню кісткової маси, що дуже важливо для попередження остеопорозу та інших захворювань кісткової системи, пов'язаних зі складністю кісток.

Крім цього, згідно із матеріалами статті Gürbüz та інших [55], вітамін А є важливим фактором для здоров'я імунної системи. Він впливає на різноманітні процеси, такі як розвиток та диференціація імунних клітин, вироблення антитіл та запобігання запальних реакцій. Автори стверджують, що каротиноїди можуть мати антиоксидантні властивості та підтримувати здоров'я імунної системи. Вітамін А допомагає організму боротися з інфекційними хворобами, підтримує нормальну роботу лімфоїдних органів.

Оскільки вітамін А є важливим для правильного функціонування багатьох систем, його нестача в організмі може викликати ряд серйозних проблем. Тому, за умови дефіциту додатковий прийом вітаміну А може посприяти відновленню функціонування, ушкоджених через його нестачу, тканин. Для більшого розуміння біологічних ефектів, викликаних дефіцитом, чи навпаки гіпервітамінозом А, важливим є розуміння процесів, які лежать в основі, тобто шляхів метаболізму цього вітаміну в організмі.

1.3. Метаболізм вітаміну А в організмі

Вітамін А поступає в організм з двох основних джерел [24]. Перше джерело — преформований вітамін А (ретинол), що міститься в продуктах

тваринного походження, таких як печінка, яйця та молочні продукти. Друге — каротиноїди провітаміну А (в основному бета-каротин), що містяться в рослинних джерелах, таких як морква, шпинат, і солодка картопля.

Після потрапляння до організму продуктів багатих на вітамін А або біологічно активних добавок з його складом, вони проходять складні процеси метаболічного устоювання поживних речовин. Ці процеси включають в себе декілька етапів: всмоктування, транспортування, зберігання та використання [24].

Оскільки більшість ретиноїдів потрапляють до організму саме з їжею, тобто оральним шляхом, то цей спосіб потрапляння до кишечника та засвоєння вітаміну описано детально [24]. Метаболітичні шляхи засвоєння тваринного вітаміну А та рослинного відрізняються значною мірою. Ретинілові ефіри, які містяться в продуктах тваринного походження, засвоюються майже повністю, тоді як поглинання рослинних каротиноїдів значно меншою мірою [49, 58].

Ретинілові ефіри піддаються метаболізму тригліцеридліпази або фосфоліпази В просвіті шлунково-кишкового тракту, перш ніж потрапити в ентероцити, де вони перетворюються на ретинол. Всмоктування тваринного вітаміну А сприяє утворенню міцел, яке посилюється при вживанні його з жирною їжею [58]. Як тільки ретинол потрапляє в ентероцит, він приєднується до клітинного ретинол-зв'язуючого білка (CRBP), який відіграє вирішальну роль у транспортуванні ретинолу в клітину. Було ідентифіковано та описано два різновиди або ізоформи цього конкретного білка. Ці ізоформи відомі як CRBPI та CRBPII. Було виявлено, що остання з цих двох ізоформ, CRBPII, в основному присутня у клітинах, розташованих у кишкової ділянці тіла. Це специфічне розташування ізоформи CRBPII наголошує на її критичну важливість у полегшенні процесу абсорбції [59].

В дослідженні Бореля та інших було показано, що у процесі абсорбції приймають участь транспортери класу В1 (SCARB1) та кластер білків

диференціювання 36 (CD36 або SCARB3), не дивлячись на це пасивна дифузія досі вважається одним із засобів засвоєння деяких каротиноїдів [60].

Клітини кишечника метаболізують лише частину каротиноїдів, приблизно третину, у активні форми, а решта всмоктується без будь-яких змін [24]. Значення β -каротину як життєво важливого джерела вітаміну А для людини підкреслюється ретельним регулюванням його метаболізму за допомогою механізмів зворотного зв'язку [61, 62]. У випадку надмірної кількості каротин зберігається в жирових резервах.

Після обробки ентероцитами ретинол перетворюється на ефіри ретинілу, і потім транспортується в лімфатичну систему за участі хіломікронів [49]. Вони не накопичуються в тканинах печінки потрапивши в цей комплекс, у той час як частина складних ефірів знову розщеплюються до ретинолу, інші переносяться разом з ліпопротеїнами низької і дуже низької щільності для подальшого транспортування, далі в різних клітинах вони можуть бути метаболізовані в активні форми вітаміну А [24].

Далі хіломікрони, переміщуються по кровотоку, щоб досягти тканин-мішеней, переважно печінки, яка є основним органом зберігання вітаміну А в організмі [63]. У печінці зберігання відбувається у вигляді ретинілових ефірів у спеціалізованих клітинах, які називаються зірчастими клітинами [24]. В подальшому відбувається частковий гідроліз ретинілових ефірів до ретинолу, і в такому вигляді зв'язування з ретинол-зв'язуючим білком (RBP) для подальшого виведення з печінки та транспорту по кровотоку [49]. В кровотоці, новоутворений комплекс зв'язується з білком транстиретином (TTR) [64]. Транспортери плазмалеми необхідні для розпізнавання комплексу ретинол-RBP та його поглинання клітинами-мішенями [65, 66].

Отже, організм здатен запасати вітамін А з подальшим його використанням за потреби, важливу роль в механізмах метаболізму вітаміну А відіграє ретинол-зв'язуючий білок, який виступає транспортером цього

вітаміну до тканин-мішеней або органів запасання. Таким чином, організм здатен деякий час підтримувати нормальний рівень вітаміну А, синтезуючи його з запасів, і відповідно підтримуючи стабільне функціонування систем. З іншого боку, надлишкове накопичення цього вітаміну, через неможливість його виведення, призведе до токсичності і ушкодження тканин.

1.4. Механізм накопичення вітаміну А в організмі, роль ретинол-зв'язуючого білка

Основним запасуючим вітамін А органом слугує печінка. Крім неї здатні зберігати ретинілові ефіри й інші органи, наприклад жирова тканина. Здатність до накопичування відіграє вирішальну роль для органів з високою потребою у цьому вітаміні. Так як в разі дефіциту потрібні рівні вітаміну підтримуватимуться протягом деякого часу заздалегідь накопиченим запасом. З органів зберігання у разі необхідності ретиноїди викидаються у кровоток [24].

Ретинол-зв'язуючі білки (RBP) — це сімейство білків з різними функціями. Вони є білками-транспортерами, які зв'язують ретинол. RBP синтезується в печінці, при цьому секреція залежить від концентрації ретинолу. RBP відіграє ключову роль у поглинання ретиноїдів з їжею, а також у метаболізмі ретиноїдів в ентероцитах і їх дії в кишечнику [67].

Всмоктування харчового вітаміну А відбувається у тонкому кишечнику, де він включається в хіломікрони, що є частинками ліпопротеїнів, які транспортують харчові ліпіди з кишечника в інші частини тіла. Потрапляючи в кровотік, вітамін А зв'язується з ретинол-зв'язуючим білком (RBP), білком-носієм, транстиретином, синтезованим печінкою, який зв'язується з вітаміном А і транспортує його до тканин-мішеней [68, 69].

RBP зв'язується з вітаміном А і утворює стабільний комплекс, який транспортується кровотоком до тканин-мішеней. Потім комплекс поглинається клітинами за допомогою рецептор-опосередкованого ендоцитозу, при якому вітамін А вивільняється та використовується клітиною при необхідності.

Ретинілові ефіри, що зберігаються в печінці, також можуть піддаватися гідролізу з вивільненням ретинолу, який потім зв'язується з RBP і транспортується. Цей механізм дозволяє організму підтримувати постійний запас вітаміну А.

Накопичення більшої частини транспортованих ретиноїдів відбувається в зірчастих клітинах печінки, де вітамін зберігається у своїх неактивних формах та за потреби вивільняється і переноситься за допомогою ретинол-зв'язуючого білка до необхідних тканин.

1.5. Характеристика клітин Іто та форма депонування вітаміну А

Клітини Іто є життєво важливим компонентом печінки та відіграють важливу роль у розвитку фіброзу печінки [38]. Клітини Іто, також відомі як зірчасті клітини печінки або печінкові перисинусоїдальні клітини, є типом унікальних клітин печінки, розташованих у просторі Диссе між гепатоцитами та синусоїдальними ендотеліальними клітинами. Ці клітини містять велику кількість вітаміну А і є основним місцем зберігання вітаміну в організмі [38]. Вони виконують різноманітні функції, зокрема забезпечують підтримку імунітету, регулюють кровоток і підтримують рівень жирів у печінці. Ключові характеристики клітин Іто:

1. Містять високу концентрацію ліпідних крапель, у яких зберігається вітамін А [38].

2. Мають здатність трансформуватися в міофібробласти, які продукують білки позаклітинного матриксу під час відновлення та ремоделювання тканин [39, 40, 70]. Клітини Іто відомі своєю роллю у фіброзі печінки [38]. Під час пошкодження зірчасті клітини стають фіброгенними міофібробластами [70]. При активації вони продукують білки позаклітинного матриксу, які сприяють розвитку фіброзу [39, 40, 70, 71].

3. Локалізуються переважно в перисинусоїдальному просторі печінки, хоча їх можна виявити і в інших органах, таких як підшлункова залоза та легені [38].

Коли вітамін А споживається з їжею або синтезується зі з'єднань-попередників, він всмоктується у тонкому кишечнику та транспортується до печінки кровотоком. У печінці вітамін А перетворюється на складні ефіри ретинілу і зберігається в зірчастих клітинах печінки [38].

Клітини Іто чутливі до цитокінів та факторів росту, які регулюють їх активацію, проліферацію та фіброгенну активність [38]. Відкладення вітаміну А в зірчастих клітинах регулюється кількома факторами, включаючи прийом їжі, гормональні сигнали та метаболічні потреби. При високому споживанні вітаміну А печінка збільшує свою накопичувальну здатність, виробляючи більше зірчастих клітин та збільшуючи розмір та кількість ліпідних крапель у цих клітинах. І навпаки, при низькому споживанні вітаміну А печінка знижує свою ємність за рахунок зменшення кількості зірчастих клітин та мобілізації накопиченого вітаміну А для використання іншими тканинами [24].

На відкладення вітаміну А у зірчастих клітинах також впливають гормональні сигнали, особливо ті, які включають інсулін та глюкагон. Інсулін сприяє перетворенню ретинолу в ретинілові ефіри та стимулює відкладення вітаміну А у зірчастих клітинах, тоді як глюкагон інгібує цей процес та сприяє мобілізації депонованого вітаміну А для використання іншими тканинами.

Зірчасті клітини печінки можуть перебувати у стані спокою та в активному стані.

У *спокійному стані* зірчасті клітини печінки є неактивними. Вони забезпечують резервуар для зберігання вітамінів та інших поживних речовин, окрім цього вони можуть перетворювати глюкозу на глікоген для зберігання. У цьому стані зірчасті клітини також виробляють глюкозу та жирні кислоти, необхідні для енергетичних потреб печінки.

Активний стан клітин Іто, тобто їх активація, зумовлена факторами середовища, які негативно діють на організм, викликаючи запалення органів. До них можна віднести інфекційні агенти та токсичні сполуки, які прямо чи опосередковано б'ють по печінці. В цьому стані зірчасті клітини стимулюють продукцію колагену, що обумовлено в тому числі транспортуванням та дією вітаміну А у зонах ураження. Крім того клітини Іто виділяють в середовище протизапальні білки, які забезпечують відновлення тканини печінки, а також стимулюють ангіогенез для забезпечення достатнього кровотоку до пошкоджених ділянок печінки та інших органів. При цьому зірчасті клітини можуть продукувати надмірну кількість жирів, що може призвести до розвитку жирової дистрофії печінки [71].

Надмірні дози вітаміну А можуть мати вплив на перехід зірчастих клітин печінки в активний стан [71]. Один зі способів, яким вітамін А може впливати на функціонування зірчастих клітин, полягає в активації рецепторів ретиноїдів в клітинах печінки. Надмірні дози вітаміну А можуть призвести до накопичення ретиноїдів в зірчастих клітинах печінки та активації рецепторів ретиноїдів. Це може сприяти зміні різних функцій гепатоцитів та зірчастих клітин, таких як збільшення синтезу колагену та зменшення синтезу металопротеїнів, що може привести до розвитку фіброзу печінки. Крім того, надмірні дози вітаміну А можуть сприяти виникненню оксидативного стресу в печінці та збільшенню вироблення цитокінів, що може призвести до запалення

та пошкодження тканин [72]. Автори Hwang та інші [71] вважають, що активація ліпогенезу в гепатоцитах за допомогою ретинолу сприяє розвитку стеатозу печінки та погіршує стан фіброзу. Станом на сьогоднішній день, потрібні додаткові дослідження, щоб розширити знання про роль ретинолу в активації зірчастих клітин та розвитку фіброзу печінки.

Таким чином, перебуваючи в активному стані зірчасті клітини можуть як сприяти відновленню печінки, так і навпаки сприяти розвитку тяжких ушкоджень. Надмірні дози вітаміну А, в результаті прояву токсичності, можуть впливати на функціонування зірчастих клітин печінки та їх перехід в активний стан, відповідно сприяючи розвитку різних патологічних станів. Враховуючи всі наведені вище аргументи, подальші дослідження в даній сфері дозволять розширити знання та є дуже актуальними, так як можуть відкрити нові можливості в лікуванні хвороб печінки.

1.6. Пошкодження печінки та вміст вітаміну А при фіброзі

Печінка є основним місцем зберігання вітаміну А, і вона необхідна для підтримки адекватного рівня цього вітаміну в організмі.

Фіброз печінки виникає як результат стійкої реакції загоєння ран на тривале пошкодження печінки [73]. Ця проблема може бути викликана різними факторами, такими як, наприклад, хронічна інфекція вірусами гепатиту С або В, отруєння токсинами, неалкогольний стеатогепатит та аутоімунні захворювання, такі як первинний біліарний цироз, первинний склерозуючий холангіт, аутоімунний гепатит [74].

Фіброз є патологічним станом, що характеризується накопиченням білків позаклітинного матриксу, таких як колаген, у печінці [75, 76]. Цей процес призводить до заміни здорових тканин печінки на сполучну тканину та порушення функції печінки, що зрештою призводить до цирозу печінки та

інших серйозних порушень функції органу [40]. Ключову роль в цих процесах відіграють зірчасті клітини печінки, які переходять в стан міофібробластів і виступають основними продуцентами білків позаклітинного матриксу [74].

У контексті метаболізму вітаміну А фіброз може сильно впливати на накопичення і розподіл цього вітаміну в печінці.

Вважають, що фіброз є оборотнім станом [77-79]. Якщо вдалося визначити причину фіброзу печінки та виключити її вплив, то можна уповільнити процес захворювання та досягти регресу фіброзу [74]. Можливо, прийом вітаміну А може посприяти поверненню печінки до стану нормального функціонування [80]. Але дані щодо впливу додаткових доз вітаміну А на фібротичну печінку суперечливі.

Дослідження показали, що рівні вітаміну А знижено у людей з фіброзом печінки, що, ймовірно, пов'язане з порушенням транспортних білків вітаміну А та накопиченням білків позаклітинного матриксу у тканині печінки. Клітини Іто втрачають накопичений вітамін А. На пізніх стадіях фіброзу печінки накопичення колагенової рубцевої тканини може призвести до втрати функціональної тканини печінки, що ще більше посилить дефіцит вітаміну А [3, 81, 82].

В той же час існують дослідження, в яких наголошується на тому, що надмірна доза ретиноїдів викликає пошкодження тканин печінки в результаті токсичності, але слід зауважити, що стан гіпервітамінозу А не є поширеним [83, 84].

Враховуючі все вище сказане, за умови фіброзу та нестачі вітаміну А, додаткове введення цього вітаміну може бути ефективним рішенням в лікуванні. Але дослідження дії вітаміну А достатньо суперечливі. З одного боку, певні дози можуть посприяти лікуванню, з іншого боку, потрібно бути дуже обережними враховуючи те, що надмірна доза може погіршити стан печінки, а менша не надати потрібного впливу.

1.7. Дія вітаміну А на фібротичну печінку

Вітамін А може бути корисним для лікування фіброзу печінки, оскільки він має протизапальні та антиоксидантні властивості та може підтримувати нормальну функцію печінки [85].

Вітамін А відіграє вирішальну роль у розвитку та прогресуванні фіброзу печінки. Дефіцит вітаміну А часто зустрічається у людей з фіброзом печінки та пов'язаний з підвищеним ризиком активації зірчастих клітин печінки та відкладення колагену. Було показано, що добавки з вітаміном А покращують функцію печінки та зменшують фіброз у моделях на тваринах та у дослідженнях на людях. Дослідження показали, що вітамін А може впливати на активацію генів, що забезпечують регулювання клітинного циклу та стимулюють апоптоз, що допомагає зменшити кількість сполучної тканини, що утворюється в печінці.

У статті Seki та інших згадується роль вітаміну А у фіброзі печінки. Автори стверджують, що вітамін А є важливим регулятором процесів ремоделювання матриці екстрацелюлярного простору та процесів диференціації фібробластів у печінці. Зокрема, автори зазначають, що вітамін А може зменшувати активацію фібробластів та вироблення колагену, що сприяє запобіганню розвитку фіброзу печінки. Крім того, вітамін А може стимулювати процеси регенерації печінки та зменшувати запалення у печінці [40].

Існують рекомендації щодо прийому пацієнтами з алкоголічною хворобою добавок вітаміну А. Це пов'язано з тим, що при алкогольному ураженні печінки, фіброзі, спостерігається дефіцит вітаміну А. Натомість, потрібно враховувати взаємозв'язок синергетичної гепатотоксичності алкоголю та вітаміну А для пацієнтів із основним ураженням печінки [28, 86].

В той же час є дослідження, які показують, що навіть терапевтичні дози цього вітаміну, за умови тривалого прийому, спричиняють ураження тканин печінки [87-91]; окрім цього, є данні про те, що вітамін А може тільки посприяти розвитку фіброзу печінки [28, 91, 92]. Споживання великих доз призводить до гіпертрофії та проліферації клітин, накопичення позаклітинного жиру, гіпертензії [27, 39, 40, 70, 71]. Було доведено, що існує тісний взаємозв'язок між добовою дозою споживання вітаміну А та його ефективністю [84]. Також є дані, що ефективність залежить не лише від дози, а й від функціонального стану в якому перебуває печінка [85].

Висновки до розділу 1

Роль та біологічні ефекти вітаміну А для здоров'я людини важко переоцінити. Важливим є забезпечення організму достатньою кількістю цього вітаміну, для підтримання нормального функціонування усіх систем організму.

У тварин є різні способи синтезу вітаміну А в організмі. Перетворення каротиноїдів на ретинол, перетворення складних ефірів ретинолу на ретинол, перетворення ретинолу на ретинову кислоту є основними механізмами синтезу вітаміну А. Вирішальну роль у транспорті вітаміну А до тканин-мішеней, та відповідно в його накопиченні в організмі, відіграє ретинол-зв'язуючий білок (RBP). Розуміння механізмів синтезу, накопичення і відкладання вітаміну А у тварин має вирішальне значення для підтримки оптимального здоров'я та розробки дієтичних втручань для запобігання дефіциту або токсичності вітаміну А.

Важливо відзначити, що великі дози вітаміну А ведуть до прояву його токсичності. Надмірне споживання вітаміну А може сприяти фіброзу печінки. Високі дози вітаміну А сприяють накопиченню позаклітинних білків матриксу і підвищують ризик фіброзу печінки на тваринних моделях.

З іншого боку є дослідження, у яких наголошується на тому, що у людей з фіброзом печінки часто спостерігається дефіцит вітаміну А. І відмічається, що вітамін А може забезпечувати відновлення функції печінки при фіброзі.

В цілому, вітамін А є багатообіцяючим терапевтичним варіантом для лікування фіброзу печінки, але необхідні подальші дослідження для визначення оптимальних дозувань і клінічної ефективності.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема експерименту

У дослідженні, як модельний об'єкт, були використані самці щурів лінії Wistar. Всі досліджувані тварин перебували у стандартних умовах віварію: світловий та температурний режими, вільний доступ до комплексної їжі та води. Усі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до вимог Комітету з біоетики ХНУ імені В. Н. Каразіна та «Загальних принципів експериментів на тваринах», прийнятих Національним конгресом з біоетики (м. Київ, Україна, 2004) на підставі положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях» (Страсбург, Франція, 1986) та відповідно до Закону України «Про жорстоке поводження з тваринами» (2006).

У експерименті використовувалися молоді (3-місячні) щури лінії Вістар, з масою тіла на початок експерименту 180–240 г. Усього було відібрано 9 тварин, які було поділено на три групи:

I — інтактні тварини (3 шт): не отримували ніякого експериментального впливу;

II — контрольні тварини з купрум-індукованим фіброзом печінки (3 шт): отримували три внутрішньочеревні дози сірчаноокислої міді з інтервалом 48 годин в дозі 1 мг купрум (II) сульфату на 100 г маси тіла тварини згідно з [93] (або 0,23 мг купрум сульфату на 1 г маси печінки), через 21 день тварин декапітували.

III — експериментальні тварини з введенням вітаміну А на фоні купрум-індукованого фіброзу печінки: отримували три внутрішньочеревні дози сірчаноокислої міді з інтервалом 48 годин в дозі 1 мг купрум (II) сульфату на 100 г маси тіла тварини згідно з [93] (або 0,23 мг купрум сульфату на 1 г

маси печінки), через 24 години після останнього введення сірчаноокислої міді тварини отримували per os масляний розчин вітаміну А в дозі 300 МО на 100 г маси тіла згідно з [80, 85] щоденно впродовж 21 дня.

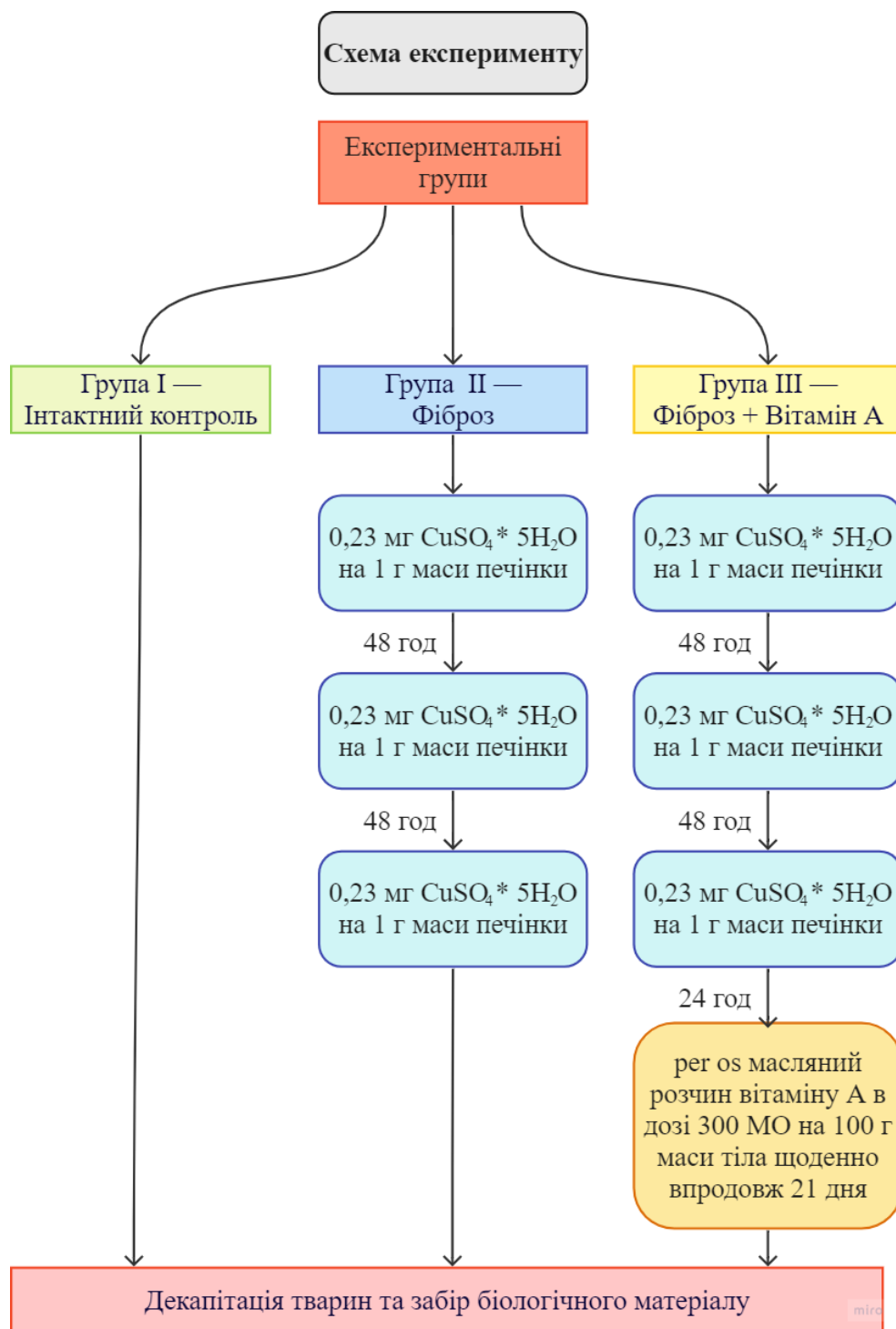


Рис. 1. Схема, яка демонструє маніпуляції, які були проведені з експериментальними групами тварин: I — група інтактних тварин (n = 3); II —

група тварин ($n = 3$) — отримували три дози купрум (II) сульфату з інтервалом 48 годин в дозі 1 мг купрум (II) сульфату на 100 г маси тіла тварини; III — група тварин ($n = 3$) — отримували сульфат міді тричі як група II, з інтервалом 48 годин, а через 24 год після останнього введення сірчаної міді — отримували ін'єкції вітаміну А (300 МО/100 г маси тіла) щоденно протягом 21 дня.

На 21 день введення вітаміну А усі тварини виводилися з експериментальної частини, декапітувалися для отримання біологічного матеріалу і подальшого виміру досліджуваних показників: гематологічні показники (абсолютний вміст лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів, моноцитів в крові); вміст вітаміну А в печінці; активність γ -глутаміламінотрансферази, аланінамінотрансферази і лужної фосфатази в сироватці крові.

2.2. Забір біологічного матеріалу

Тварини декапітувалися під ефірним наркозом. Перші краплини крові відбирали в пробірки з ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для проведення загального аналізу крові. Кров збиралася в пластикові пробірки для подальшого центрифугування і отримання сироватки крові (центрифугування протягом 20 хвилин 1500 g), отримана сироватка переносилась у стерильні епіндорфи. Після розтину грудної клітини було оцінено наявність сполучної тканини та ступінь розвитку спайок між частинами печінки та жирової тканини; для цього були використані умовні одиниці. Далі виділялась печінка для подальшого визначення вмісту вітаміну А.

2.3. Аналітичні методи

2.3.1. Визначення вмісту вітаміну А в печінці. Для визначення вмісту вітаміну А в зразках печінки була використана методика [94], яка заснована на комплексоутворенні вітаміну з ефіратом трифториду бору та визначенні швидкості розпаду цього комплексу. Для цього, зразки печінки були піддані екстракції, після чого були додані розчин ефірату трифториду бору та розчин метанолу.

2.3.2. Активність γ -глутаміламінотрансферази (ГГТ) в сироватці. Для визначення активності γ -глутаміламінотрансферази (ГГТ) використовують метод [95], який полягає в каталізі γ -глутаміламінотрансферазою переходу глутамільної групи l- γ -глутамілкарбокси-4-нітроаніліду до гліцилгліцину з утворенням 5-аміно-2-нітробензоату. Кількість 5-аміно-2-нітробензоату, яка утворюється, прямо пропорційна активності GGT, і вимірюється кінетично за довжиною хвилі 405 нм на спектрофотометрі STAT-FAX 1908.

2.3.3. Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) в сироватці. Для визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) в сироватці крові використовують метод описаний в статі [96]. Аланінамінотрансфераза (АЛТ) — це фермент, який сприяє перенесенню аміногрупи від l-аланіну до α -кетоглутарату, з чого виникає піруват та l-глутамат. Швидкість зниження поглинання прямо пропорційна активності АЛТ. Активність АЛТ вимірювали на спектрофотометрі STAT-FAX 1908. Зазвичай рівень АЛТ у сироватці дуже низький. Однак при пошкодженні клітин печінки рівень АЛТ у крові може значно підвищуватися. Це відбувається тому, що АЛТ, який зазвичай знаходиться всередині клітин печінки, вивільняється в кровотік через пошкодження клітин. Таким чином, рівень АЛТ у крові може бути індикатором ушкодження клітин печінки.

2.3.4. Активність лужної фосфатази (ЛФ). Метод визначення активності лужної фосфатази заснований на використанні лужного буфера та фосфатного субстрату, який гідролізується лужною фосфатазою, утворюючи продукт, який можна виміряти фотометрично. Принцип полягає в реакції гідролізу органічного фосфату в присутності лужної фосфатази, при цьому утворюються неорганічний фосфат та алкалі, що підвищує рН розчину. Підвищення рН, у свою чергу, ініціює хімічну реакцію між фенолом і натрієвим нітритом, утворюючи помітний жовтий продукт, який можна виміряти при довжині хвилі 405 нм. Кількість жовтого продукту, утвореного при реакції пропорційно кількості лужної фосфатази в біологічному зразку.

2.3.5. Аналіз крові. Дослідження гематологічних показників — абсолютний вміст лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів, моноцитів в крові — проводились на автоматичному гематологічному ветеринарному аналізаторі **Mindray BC-2800 Vet**. Він вимірює гематологічні показники за допомогою аналізу розсіяного світла. Аналізатор реєструє кількість та розподіл розсіяного світла крізь зразок, що дозволяє виміряти гематологічні показники.

Абсолютний вміст лейкоцитів (WBC) — це кількість білих кров'яних клітин у одиниці об'єму крові, вимірюваної в одиницях на літр (10^9 / л). Абсолютний вміст лімфоцитів (Lymph) — це кількість лімфоцитів, які містяться в одиниці об'єму крові (10^9 / л). Абсолютний вміст гранулоцитів в крові (Gran #) — це кількість гранулоцитів, що містяться в одиниці об'єму крові, виражена у відповідних одиницях (10^9 / л). Абсолютний вміст моноцитів в крові (Mon #) — це кількість моноцитів у одиниці об'єму крові, вимірюється в одиницях на літр (10^9 / л). Вимірювання показників абсолютного вмісту лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів та моноцитів в крові може допомогти в оцінці ступеня запалення та імунної відповіді організму при Си-індукованому фіброзі печінки. Враховуючи ці показники разом з іншими

клінічними та біохімічними даними, можна отримати більш повну картину стану печінки та фіброзу.

2.3.6. Стан печінки. В роботі Божков та ін. [80] зі впливу вітаміну А, було показано як печінка виглядає у нормі та її стан після індукції Си-індукованого фіброзу; в ній робили професійну оцінку стану печінки декапітових тварин, подібна оцінка була проведена і в нашій роботі (рис 2).



Рис. 2. Фото нормальної та фібротичної печінки [80]: *нормальна* анатомічна структура печінки передбачає гладку поверхню без видимих виростів або виступів; внутрішня тканина печінки також має рівномірну структуру і складається з клітин гепатоцитів, які утворюють печінкові лопатки; *фібротична структура* — зі спайками, в ній спостерігається значна кількість сполучної тканини, яка замінює здорову тканину, що призводить до виникнення виступів та нерівностей на поверхні та зменшення кількості гепатоцитів.

2.4. Обладнання

2.4.1. STAT-FAX 1908 — це напівавтоматичний аналізатор, який використовується для вимірювання концентрації різних компонентів у біологічних зразках, таких як кров, моча, сироватка та плазма. STAT-FAX 1908 використовує методику фотометрії для вимірювання концентрації аналізованих компонентів. Аналізатор оснащений вбудованим світлодіодним джерелом світла і фотометричною камерою, які забезпечують швидке і точне вимірювання оптичної щільності аналізованого зразка. Аналізатор був використаний для визначення рівня активності ферментів, таких як лужна фосфатаза (ЛФ), γ -глутаміламінотрансфераза (ГГТ) та аланінамінотрансфераза (АЛТ).

2.4.2. Фотоелектричний калориметр ФЕК – 56м — використовують для вимірювання вмісту вітаміну А в печінці. Принцип вимірювання полягає в тому, що зразок печінки змішують з ефіратом трифториду бору, що сприяє утворенню комплексу вітаміну А з трифторидом бору. Потім зразок поміщають в ФЕК-56м, який відправляє пучок світла на зразок. Частинка світла поглинається зразком, а інша частинка проходить через зразок і потрапляє на фотодетектор. Колірний фільтр на фотодетекторі дозволяє розділити світло на різні довжини хвиль, визначити довжину хвилі, яку поглинув зразок і порівняти це значення з калібрувальною кривою. Калібрувальна крива залежить від концентрації стандартного розчину вітаміну А, який також пройшов через процедуру комплексоутворення з трифторидом бору. В результаті вимірювання в ФЕК-56м отримують абсорбційний спектр для зразка і порівнюють його з калібрувальною кривою, щоб визначити концентрацію вітаміну А в печінці. Цей метод є досить точним і чутливим для вимірювання вмісту вітаміну А в печінці.

2.4.3. Mindray BC-2800 Vet. Принцип вимірювання гематологічних показників на Mindray BC-2800 Vet базується на технології гідродинамічного фокусування та лазерного розсіювання світла. Кров, зібрану в пробірку,

спочатку піддають передобробкою — розбавляють спеціальним розчинником та перемішують. Потім, за допомогою насосу, кров поступово надходить в проточну камеру аналізатора, де вона проходить через лазерний промінь. Під час проходження через лазерний промінь кров розсіює світло. Аналізатор реєструє кількість та розподіл розсіяного світла, що дозволяє виміряти показники крові.

2.5. Статистичні методи

Інформація представлена у вигляді середніх значень та стандартної помилки ($\bar{x} \pm SE$) для кожної групи. Аналіз даних і їх візуалізацію проводили за допомогою Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation., США). Відмінності між контрольною та експериментальною групами вважалися достовірними при $P < 0,05$. Для відхилення H_0 використовували аналіз дисперсії (ANOVA).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Фібротичні зміни, наявність сполучної тканини

В результаті проведеного дослідження було експериментальним шляхом доведено, що у тварин з індукованим фіброзом печінки в результаті послідовних багаторазових введень сульфату міді, розвивалася спайкова хвороба порівняно з інтактними тваринами (рис. 3А&Б). Так, в цій групі тварин під час розтину навколо печінки у 66,7% були наявні сполучно-тканинні утворення (рис. 2), у той час як у 33,3% тварин вони були відсутні. Аналогічна ситуація спостерігалась у групі тварин з індукованим фіброзом, яким протягом 21 дня вводили *per os* вітамін А (рис. 3В).



Рис. 3. Діаграми, які демонструють наявність спайок навколо та між частинами печінки у відсотках до загальної кількості тварин у групі ($n = 3$) на 21 добу: А — у інтактних контрольних тварин (група І); Б — у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група ІІ); В — у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі ІІ (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група ІІІ); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

Отже, введення мідного купоросу ініціює розвиток сполучнотканинних утворень навколо печінки та між її частинами. У свою чергу введення вітаміну А піддослідним з індукованим фіброзом не пригнічує розвиток спайок, а можливо навпаки ще більше сприяє їх утворенню. Можливо утворення сполучної тканини є захисною реакцією організму, яка допомагає йому пристосуватися до впливу токсинів. Реакція на купрум-індукований фіброз полягає в активації активних фібробластів, зірчастих клітин, які починають виробляти колаген і інші компоненти сполучної тканини [71, 75, 76]. Це призводить до утворення зв'язуючого матеріалу навколо ураженої печінки, що сприяє її захисту від подальшого поширення фіброзу та відновленню її функцій. Утворення сполучної тканини є спробою організму відгукнутися на негативний вплив купруму та запобігти подальшому пошкодженню печінки.

Фіброз печінки може впливати на процеси депонування, збереження та використання вітаміну А в печінці, а отже це може призводити до зниження вмісту вітаміну А в печінці у разі фіброзу.

3.2. Концентрація вітаміну А в печінці

Визначення вмісту вітаміну А в печінці показало, що у групи тварин з індукованим фіброзом печінки (група II) хоч і спостерігалось зниження концентрації вітаміну А в печінці порівняно з контрольною групою тварин (рис. 4, група I&II), але ці відмінності були не достовірними і робити однозначні висновки не має можливості. В той же час у групи тварин, яким після індукції фіброзу додатково вводили вітамін А *per os* щоденно протягом 21 дня (група III), спостерігалось значне (в 5,7 разів) підвищення концентрації цього вітаміну в печінці в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 4, група III).

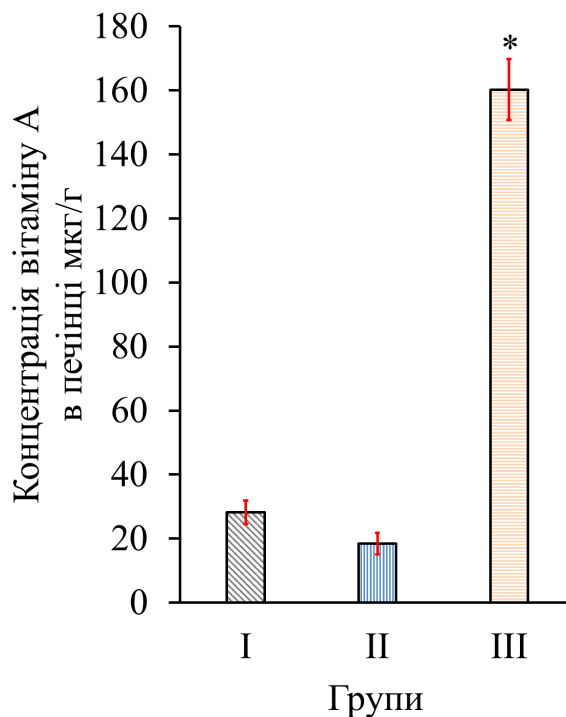


Рис. 4. Концентрації вітаміну А в печінці мкг/г на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); * — відзначені достовірні відмінності ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем (ANOVA); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

Отже, за отриманими результатами, можна дійти висновку, що введення сульфатну міді супроводжується зниженням вмісту вітаміну А в печінці, а щоденне введення додаткових доз вітаміну А піддослідним з Cu-індукованим фіброзом, супроводжується значним підвищенням концентрації цього вітаміну в печінці у порівнянні з групою інтактних тварин. Один з можливих механізмів в наслідок якого відбувається зниження вмісту вітаміну А полягає у зміні функції клітин, відповідальних за транспорт, зберігання та метаболізм вітаміну А в організмі. В свою чергу це може бути спричинене негативним впливом

іонів купруму на функціонування гепатоцитів, відбувається порушення їх здатності до зберігання вітаміну А та його конвертації до активної форми.

Крім того, іони купруму можуть сприяти активації фібробластів, які виробляють сполучну тканину. Зміни в структурі печінки, пов'язані з фіброзом, можуть перешкоджати нормальному транспорту та метаболізму вітаміну А. Також, внаслідок запалення, що супроводжує фіброз, може відбуватися активація оксидативного стресу, який також негативно впливає на вміст і обмін вітаміну А.

Підвищення рівня вітаміну А в печінці спостерігається в наслідок того, що печінка є основним місцем його зберігання [63]. І це може свідчити про ініціацію процесів відновлення клітин печінки, в наслідок чого відновлюються й процеси депонування й зберігання вітаміну.

Для того, щоб отримати більш розгорнуту інформацію про ступінь пошкодження печінки та роль вітаміну А в прогресуванні фіброзу або навпаки у відновленні функціонування печінки, була проведена оцінка функціональної активності печінки.

3.3. Функціональна активність печінки

Для оцінки функціональної активності печінки використовувалися такі біохімічні показники печінки як активність аланінамінотрансферази (АЛТ), γ -глутаміламінотрансферази (ГГТ) та лужної фосфатази (ЛФ) в сироватці крові.

Відмінності в активності АЛТ у тварин з фіброзом печенкі на фоні інтактного рівня виявлено не було (рис. 5, I&II), у той час як у тварин, котрі на фоні фіброза отримували упродовж 21 дня вітамін А у дозі 300 МО / 100 г маси тіла (група III) спостерігалось підвищення активності цього ферменту, але казати про достовірні відмінності на даному етапі не має можливості

(потужності експерименту не вистачає і потрібні подальші досліді) (рис. 5, III).

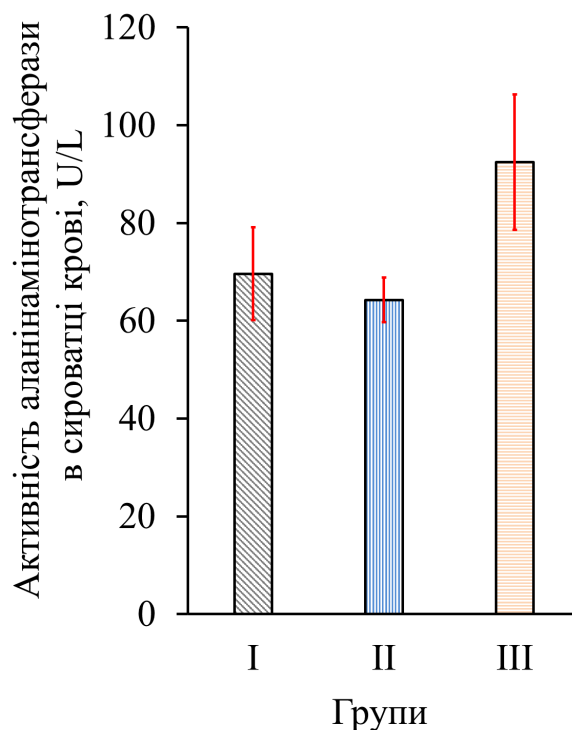


Рис. 5. Активність аланінамінотрансфери у сироватці крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг / 100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

Підвищення активності АЛТ у тварин, які отримували *per os* вітамін А на фоні Си-індукованого фіброзу може свідчити про можливий патологічний процес, пов'язаний з печінкою. Зазвичай АЛТ присутня у великій кількості в клітинах печінки і незначною мірою у інших тканинах організму. Підвищення рівня АЛТ в сироватці крові може свідчити про пошкодження або запалення

печінки, оскільки при цих станах клітини печінки пошкоджуються, а АЛТ виділяється у кров.

Відомо, що зниження лужної фосфатази (ЛФ) зустрічається рідше, ніж її підвищення [97]. Було виявлено, що як і у випадку з активністю АЛТ активність ЛФ у тварин з фіброзом печенки не відрізнялася від інтактного рівня (рис. 6, I&II), у той час як у тварин, котрі на фоні Cu-індукованого фіброзу отримували упродовж 21 дня вітамін А у дозі 300 МО / 100 г маси тіла (група III) спостерігалось підвищення активності цього ферменту (рис. 6, III).

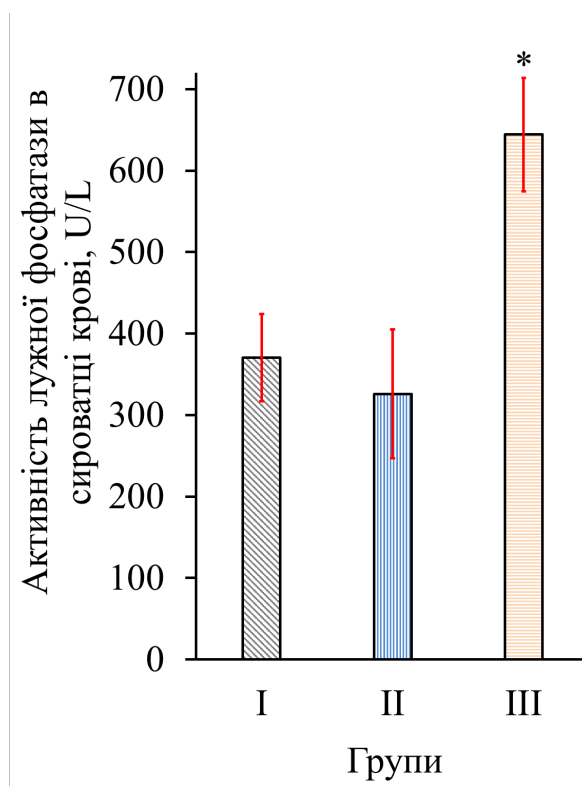


Рис. 6. Активність лужної фосфатази у сироватці крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); * — відзначені достовірні відмінності ($P < 0,05$)

порівняно з інтактним рівнем (ANOVA); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

Підвищення активності лужної фосфатази (ЛФ) у тварин, яким вводили вітамін А на фоні фіброзу, може свідчити про можливі зміни у функціонуванні печінки. У контексті фіброзу, підвищення активності ЛФ може бути ознакою збільшення функціонального навантаження на печінку або активності процесів регенерації. Введення додаткових доз вітаміну А може вплинути на ці процеси, і підвищення активності ЛФ може відображати відповідь організму на цю терапію.

Ще один фермент, активність якого була нами досліджена, це ГГТ (γ -глутаміламінотрансфераза), який широко використовується в клініці, переважно як діагностичний маркер захворювань печінки [98]. Було показано, що активність ГГТ як у тварин з фіброзом печінки, так і у тварин, котрі на фоні фіброза отримували упродовж 21 дня вітамін А у дозі 300 МО / 100 г маси тіла (група III), була підвищена на фоні інтактного рівня, але казати про достовірні відмінності на даному етапі не має можливості (потужності експерименту не вистачає і потрібні подальші дослідження) (рис. 7, I–III).

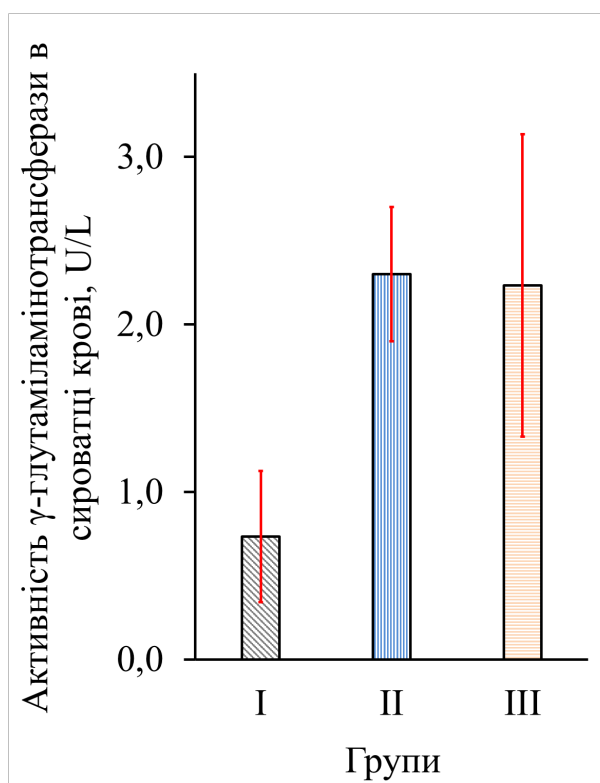


Рис. 7. Активність ГГТ (γ-глутаміламінотрансфери) у сироватці крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III).

Підвищена у обох дослідних груп на фоні інтактного рівня активність ГГТ свідчить про запальні процеси, які відбуваються в печінці в наслідок індукції фіброзу. Зазвичай, підвищена активність ГГТ спостерігається при ураженні печінки, так як цей фермент може виділятися у кров при пошкодженні печінкових клітин.

Отже, з отриманих даних можна зробити висновок про те, що підвищення вмісту вітаміну А в печінці корелювало з підвищенням активності

ЛФ. В той час як активність АЛТ та ГГТ у досліджуваних груп значуще не відрізнялась від контролю. Загалом підвищення функціональної активності печінки у тварин, які отримували терапевтичні дози вітаміну А на фоні індукованого фіброзу, може свідчити про позитивну відповідь організму на введення вітаміну А: зменшення запалення, поліпшення функціонального стану печінки та відновлення її регенеративних процесів.

3.4. Гематологічні показники

Кров є рухомою сполучною тканиною життєво необхідною для функціонування організму, у нашій роботі були досліджені гематологічні показники, а саме імунокомпетентні клітини (лейкоцити, лімфоцити, гранулоцити, моноцити) у дослідних груп тварин. Було виявлено, що суттєвих відмінностей вмісту лейкоцитів між усіма групами тварин не було (рис. 8), що може свідчити про те, що фіброз печінки так само як і терапевтичне введення вітаміну А на його фоні не викликають в організмі тварин ті системні зміни, які б мали вплив на рівень лейкоцитів в крові.

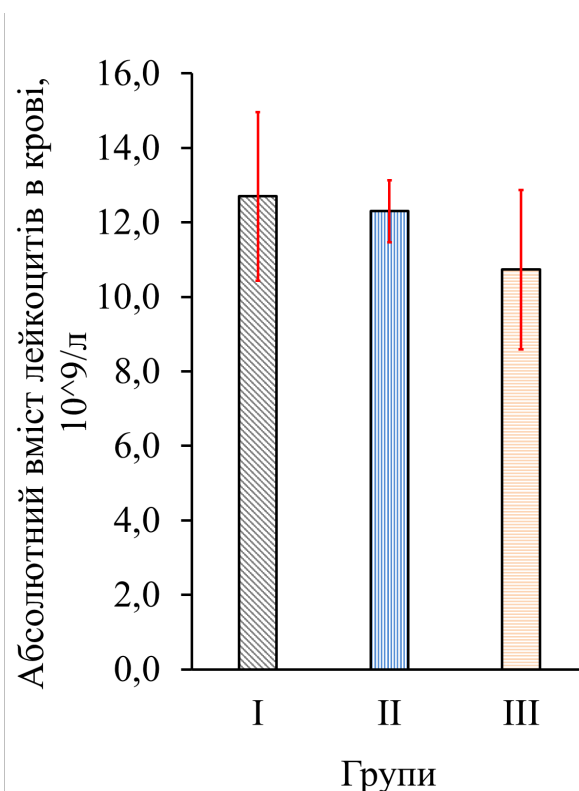


Рис. 8. Вміст лейкоцитів у крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

У результатах дослідження абсолютного вмісту лімфоцитів в крові усіх трьох груп тварин значущих відмінностей виявлено не було (рис. 9). Одним з можливих пояснень відсутності суттєвих відмінностей у вмісті лімфоцитів в крові експериментальних груп тварин в порівнянні з контрольною групою може бути те, що фіброз печінки не має прямого впливу на кількість лімфоцитів у крові.

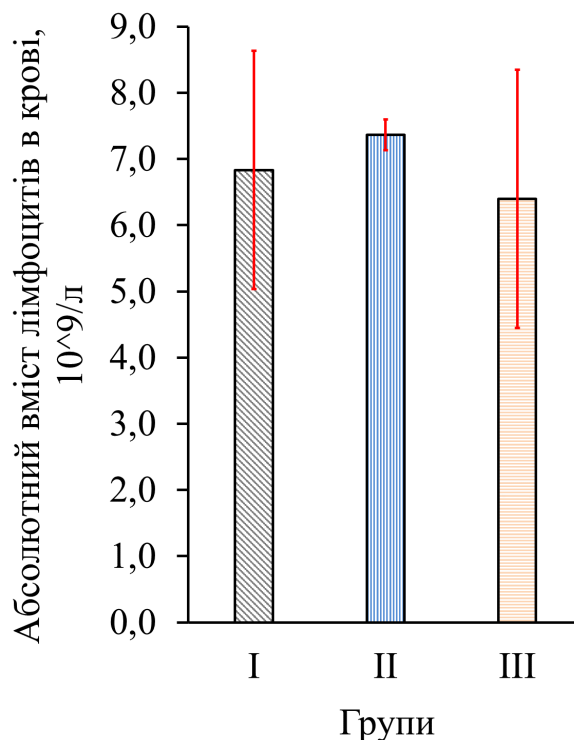


Рис. 9. Вміст лімфоцитів у крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

Достовірних відмінностей між рівнями вмісту моноцитів у піддослідних групах виявлено не було. Тим не менш, відзначається незначне зниження кількості моноцитів у групи з індукованим фіброзом в порівнянні з контролем (рис. 10, I&II), при цьому у тварин які на фоні фіброзу отримували упродовж 21 дня вітамін А у дозі 300 МО / 100 г маси тіла спостерігалось повернення рівня цього показника до рівня контролю (рис. 10, I&III).

Зниження кількості моноцитів може відображати зміни в запальних відповідях та імунній активності в контексті фіброзу, так як моноцити

відіграють важливу роль в цих процесах, в той час як повернення рівня цього показника до контрольного рівня після введення вітаміну А може свідчити про його певну коригуючу дію на цей показник, вказуючи на потенційний вплив вітаміну А на моноцитарну функцію та запальні процеси, пов'язані з фіброзом.

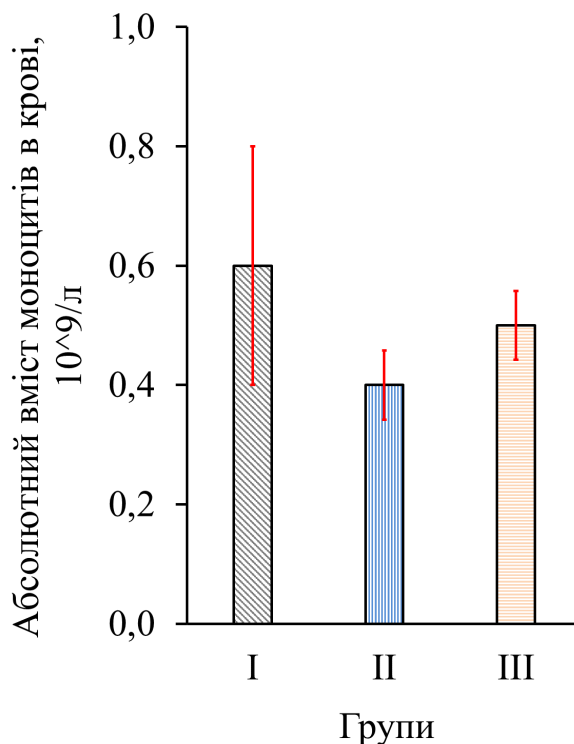


Рис. 10. Вміст моноцитів у крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

Як видно з рисунку 11, вміст гранулоцитів у крові всіх трьох груп тварин суттєво не відрізняється. При цьому незначне зменшення концентрації гранулоцитів все ж таки спостерігається як у фіброзних тварин (рис. 11. II) так і у групи тварин, які на фоні фіброзу отримували упродовж 21 дня вітамін А у

дозі 300 МО / 100 г маси тіла (рис. 11. III) в порівнянні з контрольними показниками (рис. 11. I). Зниження рівня гранулоцитів може свідчити про негативний вплив іонів купруму в вигляді пригнічення імунітету. Спираючись на те що достовірні відмінності між вмістом гранулоцитів у всіх трьох групах відсутні, немає можливості робити якісь висновки, потрібні подальші дослідження в цьому напрямку.

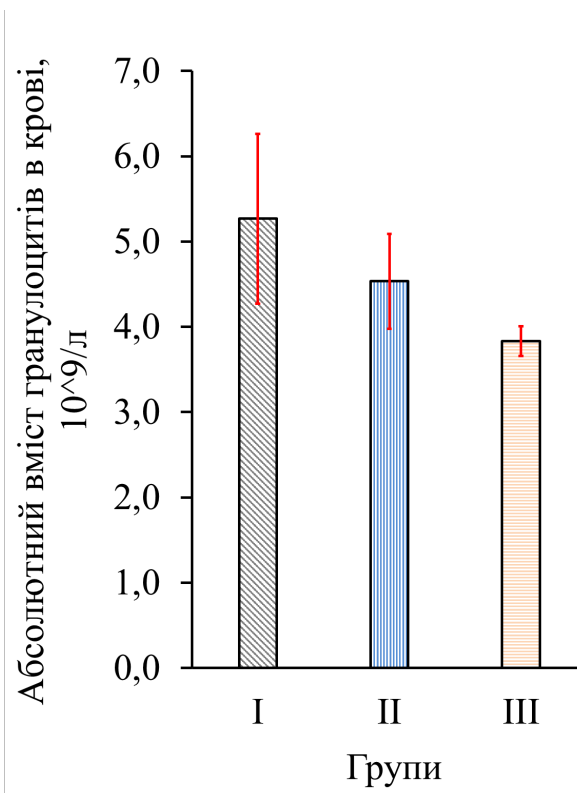


Рис. 11. Вміст гранулоцитів у крові на 21 добу у інтактних контрольних тварин (група I); у дослідних тварин, яким тричі вводили мідний купорос у дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом між введеннями 48 год (група II); і у тварин, які отримували сульфат міді тричі, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), і вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 години щоденно (група III); розподіл дослідних груп ($n = 3$ тварин на групу).

З отриманих результатів видно, що введення тваринам сульфату міді значною мірою не вплинуло на кількісні характеристики досліджуваних

клітин крові тварин, аналогічні результати спостерігалися і при введенні піддослідним вітаміну А за наявності у тварин індукованого фіброзу. Можна висунути припущення, що послідовне введення сульфату міді і вітаміну А не призвело до активації імунної відповіді. Можливо введення сульфату міді (1 мг/100 г маси тіла, тричі з інтервалом між введеннями 48 год) та вітаміну А на фоні фіброзу (300 МО/100 г маси тіла, кожен день, протягом 21 дня) в зазначених дозах не впливають напряду на імунокомпетентні клітини. Можна висунути припущення, що незначною мірою токсичний вплив іонів міді посприяв пригніченню імунної системи тварин, не на пряму, а викликавши системні зміни, які посприяли цьому, але для того, щоб зробити остаточні висновки недостатньо даних і потрібні подальші дослідження.

Вітамін А може бути ефективним рішенням у боротьбі з розвитковим фібротичних змін [80]. Оскільки, фіброз та його перехід в необоротній цироз печінки на сьогодні все ще представляють актуальну проблему в гепатології, яка потребує пошуку ефективних способів її вирішення.

Станом на сьогодні, дані щодо впливу вітаміну А на фібротичну печінку суперечливі. З одного боку, є дані про покращення стану печінки [40], з іншого є данні про негативний вплив і відповідно прискорення переходу фіброзу до необоротного стану [28]. Виходячи з цього, дослідження ролі вітаміну А в розвитку фіброзу або навпаки в ініціації відновних процесів є актуальним напрямком.

Результати проведеного дослідження показали, що введення вітаміну А тваринам з Си-індукованим фіброзом призводили до накопичення цього вітаміну в печінці та підвищення функціональної активності печінки, а саме значного підвищення активності ЛФ та незначного підвищення активності АЛТ. Підвищення функціональної активності може вказувати на позитивну

відповідь організму, ініціацію відновних процесів в тканинах печінки та покращення її функціонального стану.

В результаті дослідження експериментальним шляхом було доведено утворення рубцевої сполучної тканини замість нормальної, з анатомічної точки зору, тканини печінки у тварин з Cu-індукованим фіброзом. Окрім цього, у групи, якій після індукції фіброзу вводили вітамін А покращень та зменшення кількості сполучної тканини виявлено не було. Отримані результати можуть свідчити про адаптацію організму у відповідь на токсичний вплив іонів міді та іонів міді у поєднанні з вітаміном А [80].

Дослідження гематологічних показників не показало суттєвих розбіжностей з контрольною групою. Спостерігалися незначні зменшення вмісту гранулоцитів, лейкоцитів та моноцитів в крові. Загалом можна висунути припущення, що токсичний вплив іонів міді призвів до незначного пригнічення імунної відповіді на Cu-індукований стрес. У свою чергу введення вітаміну А не посприяло активації імунної відповіді.

ВИСНОВКИ

На основі отриманих експериментальним шляхом результатів можна зробити такі висновки:

1. Вітамін А сприяє росту навколо печінки спайок, утворених фіброзом; у вигляді утворення спайок, печінка адаптується; збільшення спайок не супроводжується пригніченням функціональної активності печінки.
2. Збільшення вмісту вітаміну А в печінці виявляє позитивний вплив на функції фіброзної печінки – функціональна активність печінки залежить від концентрації вітаміну А в ній.
3. Дослідження імунокомпетентних клітин крові не показало достовірних відмінностей між групами тварин і дає можливість висунути припущення, що наданий терапевтичний вплив на фіброзну печінку не має прямого впливу на імунокомпетентні клітини і не викликає імунної відповіді організму.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix / T. Barber et al. *Nutrients*. 2014. Vol. 6, no. 11. P. 4984–5017. URL: <https://doi.org/10.3390/nu6114984>
2. Role of Vitamin A in the Immune System / Z. Huang et al. *Journal of Clinical Medicine*. 2018. Vol. 7, no. 9. P. 258. URL: <https://doi.org/10.3390/jcm7090258>
3. Haaker M. W., Vaandrager A. B., Helms J. B. Retinoids in health and disease: A role for hepatic stellate cells in affecting retinoid levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020. Vol. 1865, no. 6. P. 158674. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158674>
4. Wiseman E. M., Bar-El Dadon S., Reifen R. The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. Vol. 57, no. 17. P. 3703–3714. URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1160362>
5. Palczewski K. Chemistry and Biology of Vision. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 287, no. 3. P. 1612–1619. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.r111.301150>
6. Stephensen C. B. Vitamin A, infection, and immune function. *Annual Review of Nutrition*. 2001. Vol. 21, no. 1. P. 167–192. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.167>
7. Sommer A., Davidson F. R. Assessment and Control of Vitamin A Deficiency: The Annecy Accords. *The Journal of Nutrition*. 2002. Vol. 132, no. 9. P. 2845S–2850S. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2845s>
8. VanBuren C. A., Everts H. B. Vitamin A in Skin and Hair: An Update. *Nutrients*. 2022. Vol. 14, no. 14. P. 2952. URL: <https://doi.org/10.3390/nu14142952>

9. Vitamin A deficiency is associated with body mass index and body adiposity in women with recommended intake of vitamin A / A. Cordeiro et al. *Nutrición Hospitalaria*. 2018. Vol. 35, no. 5. P. 1072. URL: <https://doi.org/10.20960/nh.1630>
10. Obesity Leads to Tissue, but not Serum Vitamin A Deficiency / S. E. Trasino et al. *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/srep15893>
11. Willett W. C. Micronutrients and cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1994. Vol. 59, no. 5. P. 1162S–1165S. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.5.1162s>
12. Sommer A. Vitamin A deficiency and its consequences: A field guide to detection and control. 3rd ed. Geneva : World Health Organization, 1995. 69 p.
13. Kundu S., Rai B., Shukla A. Prevalence and determinants of Vitamin A deficiency among children in India: Findings from a national cross-sectional survey. *Clinical Epidemiology and Global Health*. 2021. Vol. 11. P. 100768. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2021.100768>
14. Prevalence of anaemia, deficiencies of iron and vitamin A and their determinants in rural women and young children: a cross-sectional study in Kalalé district of northern Benin / H. Alaofè et al. *Public Health Nutrition*. 2017. Vol. 20, no. 7. P. 1203–1213. URL: <https://doi.org/10.1017/s1368980016003608>
15. Sommer A. Vitamin A, Infectious Disease, and Childhood Mortality: A 2 Solution?. *Journal of Infectious Diseases*. 1993. Vol. 167, no. 5. P. 1003–1007. URL: <https://doi.org/10.1093/infdis/167.5.1003>
16. Sommer A. Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview. *The Journal of Nutrition*. 2008. Vol. 138, no. 10. P. 1835–1839. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.1835>

17. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations / J. C. Sherwin et al. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012. Vol. 106, no. 4. P. 205–214. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.004>
18. Vitamin A Deficiency and the Lung / J. Timoneda et al. *Nutrients*. 2018. Vol. 10, no. 9. P. 1132. URL: <https://doi.org/10.3390/nu10091132>
19. Beijer M. R., Kraal G., den Haan J. M. M. Vitamin A and dendritic cell differentiation. *Immunology*. 2014. Vol. 142, no. 1. P. 39–45. URL: <https://doi.org/10.1111/imm.12228>
20. Clagett-Dame M., Knutson D. Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutrients*. 2011. Vol. 3, no. 4. P. 385–428. URL: <https://doi.org/10.3390/nu3040385>
21. Aguayo V. M., Baker S. K. Vitamin A Deficiency and Child Survival in Sub-Saharan Africa: A Reappraisal of Challenges and Opportunities. *Food and Nutrition Bulletin*. 2005. Vol. 26, no. 4. P. 348–355. URL: <https://doi.org/10.1177/156482650502600404>
22. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries / R. E. Black et al. *The Lancet*. 2013. Vol. 382, no. 9890. P. 427–451. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60937-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60937-x)
23. Wali N., Agho K., Renzaho A. M. N. Past drivers of and priorities for child undernutrition in South Asia: a mixed methods systematic review protocol. *Systematic Reviews*. 2019. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13643-019-1112-7>
24. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity / A. Carazo et al. *Nutrients*. 2021. Vol. 13, no. 5. P. 1703. URL: <https://doi.org/10.3390/nu13051703>

25. Penniston K. L., Tanumihardjo S. A. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006. Vol. 83, no. 2. P. 191–201. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.191>
26. Binkley N., Krueger D. Hypervitaminosis A and Bone. *Nutrition Reviews*. 2009. Vol. 58, no. 5. P. 138–144. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2000.tb01848.x>
27. Maddux G. W., Foltz F. M., Nelson S. R. Effect of Vitamin A Intoxication on Intracranial Pressure and Brain Water in Rats. *The Journal of Nutrition*. 1974. Vol. 104, no. 4. P. 478–482. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/104.4.478>
28. Vitamin A toxicity: When one a day doesn't keep the doctor away / R. Cheruvattath et al. *Liver Transplantation*. 2006. Vol. 12, no. 12. P. 1888–1891. URL: <https://doi.org/10.1002/lt.21007>
29. Bangham A., Dingle J., Lucy J. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 9. Penetration of lipid monolayers by compounds in the vitamin A series. *Biochemical Journal*. 1964. Vol. 90, no. 1. P. 133–140. URL: <https://doi.org/10.1042/bj0900133>
30. Pseudotumor Cerebri Syndrome with Resolution After Discontinuing High Vitamin A Containing Dietary Supplement: Case Report and Review / J. T. Chisholm et al. *Neuro-Ophthalmology*. 2017. Vol. 42, no. 3. P. 169–175. URL: <https://doi.org/10.1080/01658107.2017.1367931>
31. Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing / A. Karpouzios et al. *Journal of Osteoporosis*. 2017. Vol. 2017. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/4218472>
32. Baineni R., Gulati R., Delhi C. K. Vitamin A toxicity presenting as bone pain. *Archives of Disease in Childhood*. 2016. Vol. 102, no. 6. P. 556–558. URL: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310631>

- 33.Li Y., Wongsiriroj N., Blaner W. S. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2014. Vol. 3, no. 3. P. 126–139. URL: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04>
- 34.Evaluation of vitamin A toxicity / J. N. Hathcock et al. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1990. Vol. 52, no. 2. P. 183–202. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/52.2.183>
- 35.Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage / R. Blomhoff et al. *Physiological Reviews*. 1991. Vol. 71, no. 4. P. 951–990. URL: <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.4.951>
- 36.Biesalski H. K. Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology*. 1989. Vol. 57, no. 2. P. 117–161. URL: [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(89\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0300-483x(89)90161-3)
- 37.Geerts A. History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Seminars in Liver Disease*. 2001. Vol. 21, no. 03. P. 311–336. URL: <https://doi.org/10.1055/s-2001-17550>
- 38.Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses / F. Winau et al. *Immunity*. 2007. Vol. 26, no. 1. P. 117–129. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.011>
- 39.Experimental models of liver fibrosis / S. Crespo Yanguas et al. *Archives of Toxicology*. 2015. Vol. 90, no. 5. P. 1025–1048. URL: <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1543-4>
- 40.Seki E., Brenner D. A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2015. Vol. 22, no. 7. P. 512–518. URL: <https://doi.org/10.1002/jhbp.245>
- 41.Burri B. J., Chang J., Neidlinger T. R. Comparison of bioavailability of the vitamin A-forming carotinoids (beta-cryptoxanthin. beta-carotene and alpha-carotene). *The FASEB Journal*. 2009. Vol. 23, S1. URL: https://doi.org/10.1096/fasebj.23.1_supplement.34.2

42. Peluffo G., Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, no. 2. P. 291–302. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.024>
43. Moore T. Vitamin A and carotene. *Biochemical Journal*. 1930. Vol. 24, no. 3. P. 692–702. URL: <https://doi.org/10.1042/bj0240692> (date of access: 26.04.2023).
44. von Lintig J., Vogt K. Vitamin A Formation in Animals: Molecular Identification and Functional Characterization of Carotene Cleaving Enzymes. *The Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 134, no. 1. P. 251S–256S. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.251s>
45. Olson J. A., Hayaishi O. The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1965. Vol. 54, no. 5. P. 1364–1370. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.54.5.1364>
46. Goodman D. S., Huang H. S. Biosynthesis of Vitamin A with Rat Intestinal Enzymes. *Science*. 1965. Vol. 149, no. 3686. P. 879–880. URL: <https://doi.org/10.1126/science.149.3686.879>
47. Blaner W. S. Vitamin A and provitamin A carotenoids. *Present Knowledge in Nutrition*. 2020. P. 73–91. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00005-6>
48. Molecular aspects of β , β -carotene-9', 10'-oxygenase 2 in carotenoid metabolism and diseases / L. Wu та ін. *Experimental Biology and Medicine*. 2016. T. 241, № 17. C. 1879–1887. URL: <https://doi.org/10.1177/1535370216657900>
49. D'Ambrosio D. N., Clugston R. D., Blaner W. S. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*. 2011. Vol. 3, no. 1. P. 63–103. URL: <https://doi.org/10.3390/nu3010063>

50. Provitamin a (alpha-carotene, beta-carotene and beta-cryptoxanthin) and ascorbic acid content of japanese and american persimmons / A. Homnava et al. *Journal of Food Quality*. 1990. Vol. 13, no. 2. P. 85–95. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1990.tb00009.x>
51. Burri B. J. Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014. Vol. 95, no. 9. P. 1786–1794. URL: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6942>
52. Sahu B., Maeda A. Retinol Dehydrogenases Regulate Vitamin A Metabolism for Visual Function. *Nutrients*. 2016. Vol. 8, no. 11. P. 746. URL: <https://doi.org/10.3390/nu8110746>
53. Lidén M., Eriksson U. Understanding Retinol Metabolism: Structure and Function of Retinol Dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, no. 19. P. 13001–13004. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.r500027200>
54. Vu A. A., Kushram P., Bose S. Effects of Vitamin A (Retinol) Release from Calcium Phosphate Matrices and Porous 3D Printed Scaffolds on Bone Cell Proliferation and Maturation. *ACS Applied Bio Materials*. 2022. Vol. 5, no. 3. P. 1120–1129. URL: <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01181>
55. Gürbüz M., Aktaş Ş. Understanding the role of vitamin A and its precursors in the immune system. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2021.10.002>
56. Wolf G. The Discovery of the Visual Function of Vitamin A. *The Journal of Nutrition*. 2001. Vol. 131, no. 6. P. 1647–1650. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/131.6.1647>
57. Polcz M. E., Barbul A. The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutrition in Clinical Practice*. 2019. Vol. 34, no. 5. P. 695–700. URL: <https://doi.org/10.1002/ncp.10376>

58. Harrison E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012. Vol. 1821, no. 1. P. 70–77. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.002>
59. Kanai M., Raz A., Goodman D. S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *Journal of Clinical Investigation*. 1968. Vol. 47, no. 9. P. 2025–2044. URL: <https://doi.org/10.1172/jci105889>
60. CD36 and SR-BI Are Involved in Cellular Uptake of Provitamin A Carotenoids by Caco-2 and HEK Cells, and Some of Their Genetic Variants Are Associated with Plasma Concentrations of These Micronutrients in Humans / P. Borel et al. *The Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 143, no. 4. P. 448–456. URL: <https://doi.org/10.3945/jn.112.172734>
61. Genetics and Diet Regulate Vitamin A Production via the Homeobox Transcription Factor ISX / G. P. Lobo et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 13. P. 9017–9027. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.444240>
62. ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β,β -carotene absorption and vitamin A production / G. P. Lobo et al. *The FASEB Journal*. 2010. T. 24, № 6. C. 1656–1666. URL: <https://doi.org/10.1096/fj.09-150995>
63. Harrison E. H. MECHANISMS OF DIGESTION AND ABSORPTION OF DIETARY VITAMIN A. *Annual Review of Nutrition*. 2005. Vol. 25, no. 1. P. 87–103. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092614>
64. Vieira M., Saraiva M. J. Transthyretin: a multifaceted protein. *BioMolecular Concepts*. 2014. Vol. 5, no. 1. P. 45–54. URL: <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0038>
65. Liver Retinol Transporter and Receptor for Serum Retinol-binding Protein (RBP4) / P. Alapatt et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 288, no. 2. P. 1250–1265. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.369132>

66. Cross Talk between Signaling and Vitamin A Transport by the Retinol-Binding Protein Receptor STRA6 / D. C. Berry et al. *Molecular and Cellular Biology*. 2012. Vol. 32, no. 15. P. 3164–3175. URL: <https://doi.org/10.1128/mcb.00505-12>
67. Retinol-binding protein 2 (RBP2): biology and pathobiology / W. S. Blaner et al. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2020. Vol. 55, no. 2. P. 197–218. URL: <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1768207>
68. Association of urinary RBP4 with insulin resistance, inflammation, and microalbuminuria / S. E. Park et al. *European Journal of Endocrinology*. 2014. Vol. 171, no. 4. P. 443–449. URL: <https://doi.org/10.1530/eje-14-0247>
69. Human plasma retinol-binding protein (RBP4) is also a fatty acid-binding protein / M. Perduca et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018. Vol. 1863, no. 4. P. 458–466. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.01.010>
70. Lee Y. A., Wallace M. C., Friedman S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*. 2015. Vol. 64, no. 5. P. 830–841. URL: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306842>
71. Retinol from hepatic stellate cells via STRA6 induces lipogenesis on hepatocytes during fibrosis / I. Hwang et al. *Cell & Bioscience*. 2021. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00509-w>
72. Lipotoxicity in the liver / V. Zámbo et al. *World Journal of Hepatology*. 2013. Vol. 5, no. 10. P. 550. URL: <https://doi.org/10.4254/wjh.v5.i10.550>
73. Friedman S. L. Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. 2003. Vol. 38. P. 38–53. URL: [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00429-4)
74. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer / D. Dhar et al. *Experimental Biology and Medicine*. 2020. Vol. 245, no. 2. P. 96–108. URL: <https://doi.org/10.1177/1535370219898141>

75. Hernandez-Gea V., Friedman S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2011. Vol. 6, no. 1. P. 425–456. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>
76. Bataller R., Brenner D. A. Liver fibrosis. Journal of Clinical Investigation. 2005. Vol. 115, no. 2. P. 209–218. URL: <https://doi.org/10.1172/jci24282>
77. Pinzani M., Rosselli M., Zuckermann M. Liver cirrhosis. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2011. Vol. 25, no. 2. P. 281–290. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.009>
78. Ramachandran P., Iredale J. P. Reversibility of liver fibrosis. Annals of Hepatology. 2009. Vol. 8, no. 4. P. 283–291. URL: [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31740-5](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31740-5)
79. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process / D. Povero et al. Histology and histopathology. 2010. Vol. 25. P. 1075–1091. URL: <https://hdl.handle.net/2318/78220>.
80. Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense system / A. I. Bozhkov et al. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006>
81. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis / A. Saeed et al. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2017. Vol. 1862, no. 5. P. 496–512. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.007>
82. Oral vitamin-A-coupled valsartan nanomedicine: High hepatic stellate cell receptors accessibility and prolonged enterohepatic residence / N. S. El-Mezayen et al. Journal of Controlled Release. 2018. Vol. 283. P. 32–44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.021>
83. Regeneration of peripheral nerves by transplanted sphere of human mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells / E. J. Lee et al.

- Biomaterials. 2012. Vol. 33, no. 29. P. 7039–7046. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.047>
84. Hypervitaminosis A-induced liver fibrosis: stellate cell activation and daily dose consumption / M. C. Nollevaux et al. *Liver International*. 2006. Vol. 26, no. 2. P. 182–186. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01207.x>
 85. Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver / A. Bozhkov et al. *Clinical Nutrition Open Science*. 2022. Vol. 41. P. 82–97. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.12.003>
 86. β -Carotene beadlets potentiate hepatotoxicity of alcohol / M. A. Leo та ін. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997. T. 66, № 6. C. 1461–1469. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/66.6.1461>
 87. Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration: Estimate of dose-related toxicity in 41 cases / A. Geubel et al. *Gastroenterology*. 1991. Vol. 100, no. 6. P. 1701–1709. URL: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90672-8](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90672-8)
 88. Ortega-Alonso A., Andrade R. J. Chronic liver injury induced by drugs and toxins. *Journal of Digestive Diseases*. 2018. Vol. 19, no. 9. P. 514–521. URL: <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12612>
 89. Chalasani N., Amacher D. Drug-Induced Hepatic Steatosis. *Seminars in Liver Disease*. 2014. Vol. 34, no. 02. P. 205–214. URL: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1375960>
 90. Fatty liver and drugs: the two sides of the same coin / L. Miele et al. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017. Vol. 21, no. 1. P. 86–94. URL: <https://hdl.handle.net/10807/104801>.
 91. Liver Cirrhosis From Chronic Hypervitaminosis A Resulting in Liver Transplantation: A Case Report / P. García-Muñoz et al. *Transplantation*

- Proceedings. 2019. Vol. 51, no. 1. P. 90–91. URL: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.03.141>
92. Meta-analysis: antioxidant supplements for liver diseases - the Cochrane Hepato-Biliary Group / G. Bjelakovic et al. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2010. Vol. 32, no. 3. P. 356–367. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04371.x>
93. Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis / A. I. Bozhkov et al. *Advances in Gerontology*. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 41–50. URL: <https://doi.org/10.1134/s2079057017010040>
94. Критерії та методи контролю метаболізму в організмі тварин та птахів / І. А. Іонов та ін. Харків : Ін-т тваринництва НААН, 2011. 378 с.
95. Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue / ed. by B. Stanley, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2nd ed. Villanova, Pa : National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1991. 214 p.
96. Young D. S. Effects of disease on clinical laboratory tests. 4th ed. Washington, DC : AACC Press, 2001.
97. Fernandez, N. J., Kidney B. A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Veterinary Clinical Pathology*. 2007. Vol. 36, no. 3. P. 223–233. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2007.tb00216.x>
98. Koenig G., Seneff S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. *Disease Markers*. 2015. Vol. 2015. P. 1–18. URL: <https://doi.org/10.1155/2015/818570>