

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

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**РОЛЬ ВІТАМІНУ А У ФОРМУВАННІ ІМУННОГО СТАТУСУ
ТВАРИН ІЗ ФІБРОЗОМ**

Допущена до захисту
«__»_____ 2025 р.

Кваліфікаційна робота
бакалавра кафедри
Патрічі Олени Василівни

Завідувач кафедри _____

Оцінка «_____»

Науковий керівник:
к.б.н., доцент Ковальова М. К.

Голова ЕК _____

«__»_____ 2025 р.

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Роль вітаміну А у формуванні імунного статусу тварин із фіброзом».

Робота включає: 55 сторінок, 7 рисунків, 67 джерел.

Метою роботи було дослідження впливу вітаміну А на фагоцитарну активність нейтрофілів при експериментальному моделюванні фіброзу печінки.

Фіброз печінки є важливою проблемою сучасності, оскільки незважаючи на обширну кількість досліджень на цю тему, ефективних методів лікування даної хвороби існує недостатньо.

В рамках роботи досліджено взаємозв'язок між вітаміном А та клітинною ланкою імунної системи на тлі Cu- та CCl₄-індукованого фіброзу печінки. Показано, що формування мідь-індукованого фіброзу печінки супроводжувалося збільшенням інтенсивності та ефективності фагоцитозу. Прийом вітаміну А не впливав на показники активності клітинної ланки імунної системи на тлі лише мідь-індукованого фіброзу. При введенні вітаміну А тваринам, які отримували 2 рази трикратно розчин CuSO₄ та один раз розчин CCl₄, спостерігали збільшення кількості нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі. При цьому активність фагоцитозу та бактерицидна активність нейтрофілів залишалась на контрольному рівні.

Результати роботи показують взаємозв'язок між активністю нейтрофілів та розвитком фіброгенного процесу, натомість реакція імунної системи організму на введення вітаміну А в умовах індукованого фіброзу потребує подальших досліджень.

Роботу виконано на базі Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

Ключові слова: фіброз, печінка, ретинол, вітамін А, нейтрофіли.

ABSTRACT

Qualification work on the topic: "The role of vitamin A in the formation of the immune status of animals with fibrosis."

The work includes: 55 pages, 7 figures, 67 sources.

The aim of the work was to study the effect of vitamin A on the phagocytic activity of neutrophils in experimental modeling of liver fibrosis.

Liver fibrosis is an important problem of our time, because despite the extensive amount of research on this topic, there are not enough effective methods of treating this disease.

The work investigated the relationship between vitamin A and the cellular component of the immune system in the context of Cu- and CCl₄-induced liver fibrosis. It was shown that the formation of copper-induced liver fibrosis was accompanied by an increase in the intensity and efficiency of phagocytosis. Vitamin A administration did not affect the activity of the cellular component of the immune system against the background of copper-induced fibrosis alone. When vitamin A was administered to animals that received 2 times three times a CuSO₄ solution and once a CCl₄ solution, an increase in the number of neutrophils participating in phagocytosis was observed. At the same time, the phagocytosis activity and bactericidal activity of neutrophils remained at the control level.

The results of the work show a relationship between neutrophil activity and the development of the fibrogenic process, however, the response of the body's immune system to the administration of vitamin A in conditions of induced fibrosis requires further research.

The work was carried out at the Research Institute of Biology of the V.N. Karazin Kharkiv National University.

Keywords: fibrosis, liver, retinol, vitamin A, neutrophils.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Історія та морфологічна характеристика фіброзу печінки.....	9
1.2. Молекулярні особливості формування фіброзу печінки.....	12
1.3. Причини виникнення та стадії розвитку фіброзу печінки.....	13
1.4. Вплив вітамінів на функціонування печінки, зокрема вітаміну А ..	16
1.5. Роль імунної системи у патогенезі фіброзу печінки.....	18
1.6. Роль жиророзчинних вітамінів, зокрема вітаміну А, в регуляції імунної відповіді.....	22
1.7. Сучасні підходи до терапії фіброзу печінки.....	24
1.8. Роль вітаміну А у терапії фіброзу печінки.....	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	29
2.1. Схема експерименту.....	29
2.2. Гістологія печінки	32
2.3. Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові (кисень-незалежний фагоцитоз).....	34
2.4. Статистична обробка даних	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	37
3.1. Дослідження впливу вітаміну А на показники імунної системи в контрольній групі тварин.....	37
3.2. Дослідження показників активності фагоцитозу у тварин із мідь-індукованим фіброзом печінки (1 цикл) та при введення вітаміну А	38
3.3. Дослідження показників активності фагоцитозу у тварин із мідь-індукованим фіброзом печінки (2 цикли) та при введення вітаміну А	41

3.4. Дослідження показників активності фагоцитозу у тварин із Cu- та CCl ₄ -індукованим фіброзом печінки та при введення вітаміну А.....	43
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ALT - аланінамінотрансфераза
- CTL - цитотоксичні Т-лімфоцити
- FIB-4 - діагностичний індекс, що використовується для оцінки ступеня фіброзу печінки
- GFAP - гліальний фібрилярний кислотоутворюючий протеїн
- ILC - вроджені лімфоїдні клітини
- MAPK - мітогенактивована протеїнкіназа
- MMP - матриксна металопротеїназа
- PAMPs - патоген-асоційовані молекулярні патерни
- PDGF - тромбоцитарний фактор росту
- RAR - рецептор ретиноевої кислоти
- RBP - ретинол-зв'язуючий білок
- RXR - рецептор ретиноїду X
- SMAD - mothers Against decapentaplegic homolog
- SOCS-1 - супресор цитокінової сигналізації-1
- TGF- β 1- трансформуючий фактор росту бета-1
- TIMP - тканинні інгібітори металопротеїназ
- АФК - активні форми кисню
- ДК - дендритні клітини
- ET-1 - ендотеліальний фактор 1
- ЕЦМ - екстрацелюлярний матрикс
- ЗКП - зірчасті клітини печінки
- ІБН - індекс бактерицидності нейтрофілів
- КС - клітини Купфера
- КФЧ - коефіцієнт завершеності фагоцитозу
- НАЖХП - неалкогольна жирова хвороба печінки
- ФІ - фагоцитарний індекс
- ФЧ - фагоцитарне число

ВСТУП

Фіброз печінки це результат хронічного ураження печінки, який формується при багаторазовому загоєнні ран з утворенням рубців. В багатьох країнах до фіброзу печінки можуть призвести різні фактори, до яких належать зловживання алкоголем, хронічна інфекція вірусом гепатиту та неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) та ін. [1]

Для даного захворювання характерне виділення надмірної кількості позаклітинного матриксу, в першу чергу фібрилярного колагену. Результати багатьох досліджень показують, що основним джерелом позаклітинного матриксу при фіброзному процесі являються міофібробласти [2]. Відомо, що міофібробласти формуються з різних клітинних популяцій, а головним чином з зірчастих клітин печінки (ЗКП).

Фіброз печінки може прогресувати до більш важких стадій (цироз), на яких процес ураження може стати необоротним та призвести до смертельних наслідків. Хвороби печінки спричиняють близько 2 мільйонів смертей на рік, половина з яких спричинені ускладненнями цирозу [3].

Деякі дослідження показують, що прийом вітамінів, а зокрема вітаміну А, на тлі ранніх стадій фіброзу печінки може впливати на фізіологічні, гематологічні та гістологічні характеристики організму, що залишає великі надії у пошуку нових методів лікування фіброзу печінки [4].

Відомо також, що імунні клітини також є важливими учасниками фіброзного процесу. У відповідь на пошкодження деякі клітини імунної системи активізуються, що призводить до виділення як про- так і антифібротичних факторів, що стає ґрунтом для нових досліджень в даній сфері [5].

Подальші дослідження молекулярних механізмів фіброзу печінки необхідні не тільки для розуміння протікання запального процесу, але і для визначення ефективних діагностичних та терапевтичних методів.

Метою роботи було дослідження впливу вітаміну А на фагоцитарну активність нейтрофілів при експериментальному моделюванні фіброзу печінки.

Новизна даної роботи полягає у вивченні функціональної активності клітинної ланки імунної системи організму при розвитку фіброзу печінки та при введенні вітаміну А на тлі індукованого фіброзу печінки розчином сульфата міді CuSO_4 та CCl_4 .

Актуальність даної роботи полягає у пошуку методів корегування розвитку фіброзу печінки на початкових стадіях з метою запобігання розвитку хронічних форм захворювання.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні задачі:

1. Провести моделювання фіброзу печінки у щурів шляхом введення CuSO_4 та CCl_4 за різними схемами та визначити показники фагоцитарної активності нейтрофілів крові на тлі формування фіброзу печінки.
2. Здійснити введення вітаміну А на тлі експериментального фіброзу печінки та оцінити зміни фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові у щурів після застосування вітаміну А.
3. Провести порівняльний аналіз фагоцитарної активності нейтрофілів у тварин контрольної групи, при моделюванні фіброзу та після введення вітаміну А.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Історія та морфологічна характеристика фіброзу печінки

Вивчення процесів фіброгенезу почалося понад 2000 років тому, коли Еразістрат припустив, що причиною водянки (асцити) може стати зерниста індурація печінки. В подальшому цікавість вчених та медиків до проблеми ущільнення печінки значно зростає, що послугувало проведенню низки наукових досліджень в цій сфері.

Деякі вчені, такі як Р. Лаеннек, Р. Карсвел, Й. Мюллер, Р. Вірхов, В. Легг зробили вагомий внесок в дослідження процесу фіброзу печінки.

У 1819 році Рене Лаеннек (R.T. Laënnec) вперше охарактеризував цироз як самостійне захворювання та ввів відповідний термін [6]. Згодом, у 1838 році, Річард Карсвелл (R. Carswell) виявив, що фіброз є типовою ознакою цирозу печінки (ЦП) [7]. У 1843 році Йоганн Мюллер (J. Müller) звернув увагу на зв'язок між хронічним запаленням і гіпертрофією міжчасточкової сполучної тканини [8]. Через п'ятнадцять років, у 1858 році, Рудольф Вірхов (R. Virchow) довів, що проліферація сполучної тканини пов'язана з клітинними процесами. Нарешті, у 1872 році Вільям Легг (W. Legg) встановив, що некроз гепатоцитів є початковим етапом репаративного механізму, який стимулює накопичення екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ).

Визначення й номенклатуру ФП було введено в 1978 році групою патологів, на чолі Р.Р. Anthony і К.Г. Ishak. Вони описали фіброз як “наявність надмірної кількості колагену у зв'язку з новоутворенням волокон”. Сучасне визначення фіброзу також включає в себе біосинтез ЕЦМ як основний патогенетичний шлях, що веде до колапсу паренхіми печінки [9].

Фіброз формується як активний біосинтетичний процес, особливістю якого є посилена продукція матриксу, що здійснюється порталними та перибіліарними фібробластами, а також, переважно, міофібробластами, локалізованими в субендотеліальному просторі Діссе.

Для фіброзу печінки є характерними збільшення (до 10 разів) збільшенням кількості екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), до складу якого входять декілька типів колагену, структурні глікопротеїди, сульфатовані протеоглікани і гіалуронат, та зміни її будови; відкладення матриксу переважно в перивенулярній зоні 3 ацинусів у субендотеліальному просторі Діссе, наслідком чого може стати формування неповноцінної субендотеліальної базальної ембрани і утворення бар'єру між гепатоцитами й печінковими синусоїдами; зміна ультраструктури колагенів, глікопротеїнів та протеогліканів у поєднанні з молекулами ЕЦМ [10].

У 1971 р. К. Вейк (K. Wake) з'ясував, що відкриті у 1952 р. Т. Іто (T. Ito) жирозберігальні клітини (перецити, що розташовані в субендотеліальному просторі Діссе й оточують шар синусоїдальних ендотеліоцитів, насправді є ідентичними до зірчастих клітин, відкритих Купфером [11]. В подальшому, у 1996 р., для цих клітин був запропонований та затверджений термін *hepatic stellate cells* (зірчасті клітини печінки (ЗКП)), роль яких є дуже важливою у розвитку фіброзу.

Зірчасті клітини печінки є періцитами печінки з дендритами. ЗКП складають 15% всіх клітин печінки і 1,4% її об'єму [10]. У стані спокою ЗКП відповідають за зберігання вітаміну А у печінці; у вакуолях цих клітин містяться тригліцериди з метаболітами вітаміну А (ретиноїдами) у розчиненому вигляді, що складає майже 85% вітаміну А печінки [12].

Зірчасті клітини печінки відіграють важливу роль у формуванні міофібробластів, скоротливих, α -гладком'язових актин-позитивних клітин, які мають велике значення в патофізіологічних процесах. Трансформування ЗКП у міофібробласти відбувається шляхом активації зірчастих клітин внаслідок дії токсичних та імунологічних агентів. Як відповідь на пошкодження, синусоїдні ендотеліальні клітини виробляють фібрoneктин, TGF- β 1 і PDGF, які сприяють активації ЗКП [13]. В результаті активації ЗКП експресується α -гладком'язовий актин, гелсолін та десмін, посилюється секреція матриксних компонентів, окрім того відбувається

зниження гліального фібрилярного кислотоутворюючого протеїну (GFAP) та втрата великої кількості ретиноїдів і жиркових крапель. Процес перетворення ЗКП у міофібробласти вважається центральним у розвитку фіброзу, так як міофібробласти, що були трансформовані з зірчатих клітин, та демонструють здатність до синтезу матриксу та експресії і секреції багатьох про- і протизапальних цитокінів і факторів росту [10, 12, 14].

Важливим аспектом є те, що в спокійному стані ЗКП в печінці є основним депо вітаміну А, але в процесі трансформації в міофібробласти, перші втрачають ретинол. Вивчення даного факту дає можливість для подальших досліджень в сфері лікування фіброзу печінки.

Деякі інші клітини також відіграють важливу роль у процесі фіброгенезу. Так, наприклад, портальні міофібробласти можуть проліферуватися навколо проток печінки і накопичувати колаген. Також було показано, що такі клітини можуть бути диференційовані в специфічні клітини-маркери і відповідати на апоптичні стимули. [14]

Фіброцити, що походять із гемопоетичних стовбурових клітин також беруть участь у розвитку фіброзу печінки, тому що також мають здатність до диференціації у міофібробласти [13].

Варто зауважити роль макрофагів у процесі фіброгенезу. Показано, що у паталогічних умовах макрофаги реагують на інфекції та пошкодження тканини та активуються в макрофаги M1 (як реакція на IFN- γ та TNF- α) та M2 (як реакція на IL-4, IL-10, IL-13 та TGF- β) [15]. Поляризовані макрофаги M1 виробляють велику кількість прозапальних та цитотоксичних компонентів, включаючи цитокіни, що сприяє розвитку хвороби і посиленню запального процесу [16].

Ключовим аспектом розвитку фіброзу є роль зірчастих клітин печінки (ЗКП), які у спокійному стані зберігають вітамін А, але при активації перетворюються в міофібробласти. Ці клітини здатні синтезувати компоненти матриксу, а також секретувати про- і протизапальні цитокіни, що сприяють прогресуванню фіброзу. Крім того, портальні міофібробласти

також відіграють важливу роль у процесі фіброгенезу, що включає проліферацію навколо проток печінки та накопичення колагену. Таким чином, зміни в структурі і функціях клітин, зокрема зірчастих клітин, є центральним механізмом розвитку фіброзу печінки.

1.2. Молекулярні особливості формування фіброзу печінки

Серед численних молекулярних факторів та генів факторів транскрипції, що характерні для фібротичного процесу, найбільша увага приділяється рецепторам TGF- β 1 та TGF- β , матриксній металопротеїназі (MMP)-2, тканинним інгібіторам металопротеїназ (TIMP) 1 та 2 та α -актину гладких м'язів, а також вивченню колагену типу 1 [17].

У процесі фіброгенезу важливу роль відіграє трансформуючий ростовий фактор бета (TGF- β), який є цитокіном, що секретується ЗКП, клітинами Купфера й виділяється гепатоцитами та тромбоцитами. TGF- β сприяє підвищенню експресії генів матриксу, водночас зменшуючи вироблення матриксних металопротеаз і збільшуючи синтез їх тканинних інгібіторів. При застосуванні антагоністів TGF- β можна досягти тривалого антифібротичного ефекту, тому що в такому випадку значно гальмується активація ЗКП [10, 12].

Білки SMAD активно досліджуються як основні внутрішньоклітинні ефектори TGF- β 1. У випадку фіброзу печінки SMAD3 та SMAD4 мають профібротичні властивості, а SMAD2 та SMAD7 – захисні. Відсутність SMAD3 знижує рівень колагену I типу та перешкоджає епітеліально-міофібробластному переходу, в той час як порушення SMAD2 стимулює синтез колагену I типу. SMAD4 сприяє розвитку фіброзу, активуючи промотори, які відповідають на SMAD3, тоді як SMAD7 чинить інгібуючий вплив на фіброгенез, індукований SMAD3. Докази також вказують на участь різних мікроРНК у процесі фіброзу печінки, зокрема ті, що частково регулюють сигнальний шлях TGF- β /SMAD [18].

До процесу фіброгенезу також долучаються тромбоцитарні фактори росту (PDGF) — PDGF-B і PDGF-D, ендотеліальний фактор 1 (ET-1), різні фактори росту фібробластів, фактор некрозу пухлини (ФНП- α), а також адипоцитокіни (лептин, адипонектин) та інші. Коли PDGF розпізнає свої рецептори, відбувається ініціація Ras-мітогенактивованого протеїнкіназного шляху (Ras-mitogen-activated protein kinase pathway), підвищення рівня кальцію в клітині та, як наслідок, активація протеїнкінази C. Передача сигналу тромбоцитарного фактора росту безпосереднім чином впливає на клітинну проліферацію [10, 12]. Швидка активація рецептора β -PDGF, формування скоротливого та фіброгенного фенотипів, а також модулювання сигналізації факторів росту є ключовими характеристиками на ранніх етапах активації зірчастих клітин печінки (ЗКП) [17].

Окрім того, існують інші медіатори, дія яких помітна під час розвитку фіброзу. До них відносяться мітоген-активована протеїнкіназа (MAPK), лептин та різні інтегрини [18].

Підсумовуючи, можна побачити безліч молекулярно-клітинних механізмів, які приймають участь у фіброзному процесі. Основними молекулярними факторами фіброзу залишаються TGF- β та PDGF, які безпосереднім чином впливають на активацію зірчастих клітин та їх трансформацію у міофібробласти.

1.3. Причини виникнення та стадії розвитку фіброзу печінки

Існує безліч причин виникнення фібротичного процесу в печінці, серед яких хронічні запалення, такі як неалкогольний стеатогепатит та атоїмунний гепатит; вірусні та бактеріальні інфекції (гепатит В і С); неалкогольна жирова хвороба печінки; вплив токсичних речовин (надмірне споживання алкоголю) та інше [19, 20, 21].

Окрім печінки, фіброз може виникати також у легенях, нирках, серці та шкірі [22]. При розгляданні фібротичного процесу в печінці можна виділити два типи хвороби: алкогольний та неалкогольний фіброз.

Алкогольний фіброз виникає внаслідок ураження печінки токсичними речовинами при постійному потраплянні алкоголю в організм, натомість неалкогольний фіброз виникає внаслідок хронічного ураження, визваного здебільшого вірусними або бактеріальними інфекціями, аутоімунними захворюваннями, а також механічного впливу (травм).

Хронічне пошкодження є причиною початку такого фундаментального біологічного процесу як репарація. Репарація є необхідною для усунення дефектів тканин та органів шляхом заміщення загиблих або пошкоджених клітин. При нормальному проходженні процесу репарації регенерація тканин проходить без залишку слідів паталогічного процесу, так як пошкоджені або загиблі клітини заміщуються клітинами такого ж типу. При гострому хронічному ураженні тканин, може наступити фаза фіброплазії, на якій замість паренхіматозної тканини утворюється сполучна з подальшим утворенням рубця. Цей процес і називається фіброгенезом.

Наявність персистуючого агента (збудника) є необхідною для розвитку фібротичного процесу незалежно від місця його локалізації або етіологічного походження. Персистуючий агент підтримує постійну активацію ЗКП, продукцію цитокінів, факторів росту, протеолітичних ферментів та ангіогенних факторів [10].

Фібротичний процес можна розділити на декілька стадій, серед яких першою являється ініціація. Пошкодження тканин викликає імунну відповідь та активує процес репарації.

При нормальному проходженні процесу відповіді на пошкодження ендотеліальні та епітеліальні клітини починають виробляти медіатори запалення, які провокують тимчасову активність ЕЦМ, а також цитокіни, хемокіни та фактори росту. Активність компонентів ЕЦМ призводить до дегрануляції тромбоцитів, що, в свою чергу, несе за собою підвищення проникненості судин. Виділення клітинами епітелію/ендотелію цитокінів, факторів росту та хемокінів стимулює активність макрофагів та нейтрофілів,

які прибирають залишки пошкодженої клітини чи тканини. В цей час відбувається активація Т-клітин, що виділяють профіброгенні цитокіни (TGF- β та інтерлейкін-13) [23]. Останні стимулюють трансформацію фібробластів в α -SMA-секретуючі міофібробласти. Активовані міофібробласти підсилюють процес репарації, сприяють елюмінації пошкодженої тканини, відкладенню колагену, відновленню кровеносних судин та утворенню нормальної епітеліальної тканини.

Коли запалення відбувається повторно та стає хронічним настає стадія фіброплазії. Вона характеризується заміщенням паренхіматозної тканини сполучною з подальшим утворенням рубця. Повторне пошкодження призводить до подольшої активності міофібробластів, аккумуляція компонентів ЕЦМ (колаген, гіалуронова кислота, фібрoneктин, протеоглікани) стає надмірною, внаслідок чого відбувається дисбаланс між продукцією колагену та його розпадом [24]. Утворення рубця при такому процесі стає результатом надмірної кількості колагену. Для кінцевої стадії розвитку фіброзу характерне множинне утворення рубців і вузлів, що перешкоджає роботі органа та може призвести до органної недостатності, а також смерті.

Стадування фіброзу прогнозується за шкалою від F0 до F4 [25]:

F0 - відсутність фіброзу;

F1 - легкий фіброз;

F2 - помірний фіброз;

F3 - важкий фіброз;

F4 - цироз печінки.

Дослідження, проведені на мишах з фіброзом печінки, показали, що деякі гени також залучені в процес фіброгенезу. Так, гени Bcl-xL, Fas, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-13 та SOCS-1 сприяють формуванню запальної (фібротичної) відповіді на пошкодження, а також визначають фіброгенетичні реакції.

1.4. Вплив вітамінів на функціонування печінки, зокрема вітаміну А

Дослідження показують, що захворювання печінки, такі як гепатит, фіброз, цироз, неалкогольна жирова хвороба печінки, часто супроводжуються втратою органом вітамінів D, E та, впершу чергу, вітаміну А.

Печінка зберігає від 60 до 95% вітаміну А в організмі здорової людини, окрім того ретинол зберігається також в жировій тканині, кишечнику, очах та підшлунковій залозі [26].

В загальному, термін «вітамін А» використовується для різних незамінних жиророзчинних сполук, таких як транс-ретиноева кислота (atRA), 9-цис-ретиноева кислота (9cRA) і 9-цис-13,14 дигідроретиноева кислота (9cDHRA). Ці сполуки мають біологічну активність ретинолу та грають важливу роль метаболічній системі організму, а також впливають на зір, зріст та імунітет [26]. До форм вітаміну А відносять ретинол (транспортна форма), ретиналь (має прямий вплив на зір), ретиноїдну кислоту (впливає на регуляцію генів) та ретинілові ефіри (форма для збереження).

Печінка відіграє ключову роль у процесі метаболізму вітаміну А, який також слід описати.

β -каротин, який є попередником вітаміну А, та ретинілові ефіри потрапляють в організм з їжею. У кишечнику в присутності жовчних солей та гідролаз ретинол вививільняється з ретинілових ефірів та всмоктується в ентероцити. Вподальшому стимулюється секреція ретинолу в кровообіг, звідки він потрапляє до тканин і клітин, які потребують ретинол, або до зірчастих клітин, що є основним депо вітаміну А в організмі. За потребою, ЗКП вивільняють ретинол, який зв'язується з retinol-binding protein (RBP) та в такому комплексі транспортується до місця призначення [26].

У нормі вітамін А зберігають зірчаті клітини печінки у формі великих цитоплазматичних ліпідних крапель [26, 27], але при активації ЗКП

цитокінами та факторами росту перші втрачають велику кількість ретинолу. Втрата вітаміну А є результатом трансформації ЗКП у міофібробласти, які грають основну роль у процесі фіброгенезу. Вивчення взаємоз'язку між процесом фіброгенезу та втратою клітинами ретиноїдів настановлює на висновок, що до фіброгенної активації ЗКП може призвести порушення сигналів ретиноїдної кислоти через рецептор ретиноєвої кислоти (RAR) і рецептор ретиноїду X (RXR) [27].

В результаті проведених досліджень та порівняльного аналізу був виявлений сильний зв'язок між високим показником FIB-4 (діагностичним індексом, що використовується для оцінки ступеня фіброзу печінки) та дефіцитом ретинолу. Було також показано, що у осіб, маючих високий ризик хронічних захворювань печінки, рівень вітаміну А часто буває низьким [27].

Дослідження з вивчення впливу ретинолу при лікуванні хвороб печінки, зокрема фіброзу та цирозу, часто показують неоднозначні результати. З одного боку, вчені припускають, що прийом вітаміну А може значно пригальмувати розвиток фіброзу печінки на початкових стадіях, з іншого - дослідження також показують, що в деяких випадках споживання ретинолу може прискорити розвиток хвороби від фіброзу до стадії цирозу, яка є необоротною. Існують припущення, що вплив прийому вітаміну А з метою лікування печінкових захворювань варіюється в залежності від дози, а також стадії захворювання [28, 3].

Відомо, що вітамін А є не єдиним вітаміном, рівень якого знижується в процесі розвитку фіброзу. Фіброгенні процеси також супроводжуються втратою організмом вітамінів С та Е, що можна пояснити взаємодією між вітамінами. Вітамін С сприяє відновленню окисленої форми вітаміну Е, в цей час активність вітаміну Е залежить від дії вітаміну А, наявності селену і сірковмісних амінокислот [3].

Дефіцит вітаміну D також спостерігається при хронічних захворюваннях печінки [29, 30], особливо при фіброзі печінки. Окрім того, дослідження показують антифібротичну дію вітаміну D, що може

допомогти при лікуванні захворювання. Цей стероїдний гормон відіграє важливу роль у гомеостазі кісток та кальцію, але окрім того демонструє значний біологічний вплив на регулювання клітинної проліферації, диференціації та імуномодуляції. Експериментальні дослідження показали, що вітамін D може пригнічувати розвиток фіброзу печінки, шляхом інгібування активності профіброзного TGF- β , тим самим запобігаючи активації ЗКП [29].

При розвитку фіброзу спостерігається втрата великої кількості вітамінів, а саме втрата ретинолу та вітамінів C, D та E. Фіброгенетичний процес в печінці супроводжується втратою великої кількості вітаміну A зірчастими клітинами печінки, що відбувається в результаті трансдиференції останніх в міофібробласти. А отже, використання вітаміну A при лікуванні фіброзу дає великі сподівання щодо розв'язання цієї проблеми.

1.5. Роль імунної системи у патогенезі фіброзу печінки

Розуміння ролі імунної системи у патогенезі фіброзу є важливим, оскільки імунні клітини відіграють одну з головних ролей в цьому складному процесі. Як реакція на патологію, імунною системою організму залучається безліч молекулярних механізмів, які прямим чином впливають на перебіг фіброзу.

Існуючі на сьогодні дані щодо ролі імунних клітин у фіброзі дозволяють припустити важливість макрофагів та нейтрофілів у перебігу даного захворювання [31].

Макрофаги, що є безпосередніми учасниками фіброгенного процесу, представляють собою клітини вродженого імунітету, які відіграють безліч функцій у різних фізіологічних процесах включаючи метаболізм; ремодулювання кісток; регенерації тканин тощо [32]. Як вже було зазначено в інших розділах, у відповідь на цитокіни та інші фактори запалення макрофаги мають здатність поляризуватися в типи M1 та M2. В контексті

фіброзу макрофаги типу M1 мають здатність посилювати запальний процес, шляхом синтезу та вивільнення великої кількості прозапальних цитокінів та хемокінів, які посилюють активність міофібробластів [33]. У цей час проведені дослідження на мишах з нирковим [34] та легеневим [35] фіброзами показують, що макрофаги типу M2 сприяють полегшенню фіброзу, що демонструє їх активну протизапальну дію. Показано, що клітини Купфера (КС), які є головними макрофагами, що підтримують гомеостаз печінки, в процесі фіброгенезу синтезують TGF- β та PDGF, які безпосереднім чином впливають на активацію ЗКП [36].

Нейтрофіли є основними ефекторними клітинами системи вродженого імунітету, які здійснюють ключову роль у неспецифічному захисті організму через механізми фагоцитозу та знищення патогенних мікроорганізмів. Проте, при хронічних або надмірно виражених запальних станах можливе функціональне виснаження нейтрофілів, що супроводжується зниженням їх бактерицидної здатності, ослабленням імунного захисту і сприяє хронізації процесу та розвитку супутніх інфекцій.

За нормальних фізіологічних умов нейтрофіли підтримують помірний рівень бактерицидної активності, який забезпечує безперервний нагляд і контроль за потенційними мікробними загрозами без провокування надмірної запальної відповіді. Бактерицидна функція нейтрофілів реалізується комплексом механізмів: внутрішньоклітинним фагоцитозом, дегрануляцією лізосомальних ферментів та продукцією активних форм кисню (АФК) під час так званого оксидативного вибуху. Крім того, значну роль відіграють позаклітинні нейтрофільні пастки (NETs), які сприяють утриманню та ліквідації патогенів поза межами клітини [37]. При запальних процесах підвищується бактерицидна активність нейтрофілів, що пояснюється активацією клітин прозапальними цитокінами (наприклад, IL-1 β , TNF- α , IL-6), посиленням експресії рецепторів до патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMPs) та збільшенням оксидативного метаболізму. Профібротична роль нейтрофілів також була показана у

дослідженнях на мишах з фіброзом легень. В ході експерименту було виявлено, що при виснаженні нейтрофілів фіброз був значно послаблений, що підштовхує до висновку про важливу роль нейтрофілів в запальному процесі [38].

Одним із ключових механізмів неспецифічного імунного захисту є фагоцитоз, що забезпечує розпізнавання, поглинання та внутрішньоклітинну деградацію мікроорганізмів. Важливою характеристикою ефективності цього процесу є ступінь завершеності фагоцитозу, яка відображає здатність нейтрофілів не лише захопити патоген, а й повністю його деградувати завдяки внутрішньоклітинним ферментативним системам, включно з мієлопероксидазою, лізоцимом та протеазами. Фагоцитарна активність нейтрофілів визначається кількісними параметрами, які відображають їх здатність не лише до поглинання мікроорганізмів, а й до ефективного їх знешкодження, що є критерієм оцінки функціонального стану імунної системи.

У нормальних умовах фагоцитоз нейтрофілів є високоефективним і стабільним, з формуванням фаголізосом, де відбувається остаточне знешкодження патогенів. Водночас, за умов патології, таких як хронічні запальні процеси, імунодефіцити або інтоксикації, ступінь завершеності фагоцитозу може знижуватись через порушення ферментативної активності, дефекти в злитті фагосом з лізосомами або виснаження функціонального резерву нейтрофілів.

Таким чином, фагоцитарна активність та бактерицидність нейтрофілів є динамічними показниками, які відображають функціональний стан вродженого імунітету і мають важливе значення як у нормі, так і при різних патологічних станах.

Натомість НК-клітини показують антифібротичні властивості, особливо в контексті фіброзу печінки. Результати проведених досліджень на мишах з фіброзом печінки, індукованим CCl₄, свідчать про те, що НК-клітини можуть регулювати ЗКП. В процесі запалення перші проявляють

здатність до знищення активованих ЗКП, які грають центральну роль в процесі фіброзу печінки [39].

Існує невелика кількість досліджень з огляду функції дендритних клітин (ДК) у фіброзі печінки. Однак, можна зазначити, що під час запального процесу ДК здатні регулювати різні імунні клітини, такі як НК-клітини, ЗКП, CD8 + Т-клітини, що свідчить про важливість ДК при перебігу фіброзного процесу [40].

Простежена також функція вроджених лімфоїдних клітин (ILC) в контексті даної патології. Було продеманстровано, що кількість клітин ILC2 збільшується паралельно із загостренням фіброзу печінки. Такі результати наштовхують на висновок про сприяння ILC2 розвитку фіброзу [41].

При неалкогольній жировій хворобі печінки активується велика кількість Т-клітин. До цих клітин належать натуральні Т-кілери (NKT), $\gamma\delta$ Т-клітини, CD8 + цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL), регуляторні Т-клітини (Treg) та Т-хелпери [42]. Регуляторні Т-клітини (Treg) мають властивість збільшувати свою кількість у фібропроліферативних ділянках, що порушує баланс між тканинними інгібіторами металопротеїнази (TIMP) та матриксною металопротеїназою (MMP), а також впливає на експресію клітин Купфера (КС) [43]. Дані фактори впливають на посилення фіброзу, однак роль Treg у цьому процесі все ще залишається недостатньо визначеною. Проведені дослідження на мишах з фіброзом, індукованим CCl₄, показали, що Т-кілери (NKT) сприяють посиленню фіброгенного процесу в печінці зарахунок виділення цитокінів Th2 [44].

Натомість $\gamma\delta$ Т-клітини проявляють антифіброгенні властивості. Показано, що печінові $\gamma\delta$ Т-клітини виявляють цитотоксичність [45] до активованих ЗКП сприяють їх апоптозу [46].

Т-фолікулярні хелперні (Tfh) клітини у свою чергу впливають на функціонування В-клітин. Численні дослідження показують профібротичну роль В-клітин. Було показано, що виснаження В-клітин сприяє полегшенню

фібротичного процесу, що дає потенціал на визначення нових мішеней для боротьби з фіброзом [47].

Імунні клітини мають важливі функції в регулюванні фіброзу. Активовані клітини виділяють велику кількість цитокінів, про- та антифібротичних факторів, використовуючі різні молекулярні механізми, вони безпосередньо впливають на процес фіброгенезу, що показує різні можливості в визначенні нових молекулярних мішеней з метою лікування фіброзу.

1.6. Роль жиророзчинних вітамінів, зокрема вітаміну А, в регуляції імунної відповіді

Вітамін А (ретинол) є життєво необхідним мікронутрієнтом, який виконує ключову роль у підтримці цілісності епітеліальних бар'єрів, розвитку імунної системи та регуляції імунних відповідей. Його активний метаболіт, ретиноєва кислота (RA), діє як сигнальна молекула, що взаємодіє з ядерними рецепторами ретиноєвої кислоти (RAR) та ретиноїд X-рецепторами (RXR), регулюючи експресію генів, пов'язаних з імунною функцією [48].

RA модулює функціональну активність макрофагів, впливаючи на їхню поляризацію, фагоцитарну здатність та продукцію цитокінів. Зокрема, RA сприяє переходу макрофагів до альтернативно активованого фенотипу (M2), який асоціюється з протизапальними відповідями та репарацією тканин [49].

Крім того, RA підвищує фагоцитарну активність макрофагів та їх здатність до окисного вибуху, що є критичним для знищення патогенів [50]. У стані дефіциту вітаміну А спостерігається зниження цих функцій, що призводить до підвищеної сприйнятливості до інфекцій.

Дослідження [51] показує, що RA також впливає на функціональність нейтрофілів, зокрема покращуючи їх здатність до адгезії та міграції, що важливо для швидкої реакції на інфекцію.

Ретиноєва кислота відіграє важливу роль у диференціації та функціонуванні дендритних клітин (ДК). Зокрема, вона може сприяти експресії дендритними клітинами CD103 у кишечнику, які мають здатність індукувати імунну толерантність шляхом стимуляції регуляторних Т-клітин [52].

В одному з досліджень [53] було проаналізовано роль ретиноєвої кислоти (RA) у підтриманні фенотипічної стабільності Т-хелперів 1 типу (Th1), які традиційно вважаються однією з найбільш стабільних популяцій CD4⁺ Т-клітин. Показано, що RA через зв'язування з ядерним рецептором RAR α сприяє збереженню експресії специфічних для Th1 лінії транскрипційних програм, а також репресії генів, асоційованих із Th17-диференціюванням.

Сигнальний шлях RA-RAR α є важливим для обмеження транскрипційної пластичності Th1-клітин та їхнього перетворення на Th17-ефектори, що, у свою чергу, попереджує розвиток патологічних Th17-опосередкованих імунних відповідей *in vivo*. Отримані дані вказують на RA-RAR α як регулятор транскрипційної стабільності Th1-клітин і розкривають додаткові механізми контролю над диференціюванням Th17-клітин. Така регуляція є критичною для підтримки імунного гомеостазу та запобігання автоімунним реакціям [53].

Ретиноєва кислота також впливає на функціональність В-лімфоцитів, зокрема на їхню здатність до продукції імуноглобулінів. RA діє як специфічний фактор перемикання IgA в В-клітинах. Це відбувається через активацію рецепторів ретиноєвої кислоти (RAR) у В-клітинах, що призводить до підвищення експресії генів, відповідальних за синтез IgA. Таким чином, під впливом ретиноєвої кислоти збільшується кількість В-клітин, що продукують IgA. Це важливо для мукозального імунітету, особливо в шлунково-кишковому тракті [54]. Дефіцит вітаміну А асоціюється зі зниженням рівнів IgA, що може призводити до підвищеної сприйнятливості до мукозальних інфекцій.

1.7. Сучасні підходи до терапії фіброзу печінки

Найбільш ефективним підходом при лікуванні фібозу печінки є усунення джерела пошкодженої печінки (усунення захворювань, що призвели до фіброзу) [55]. Це може бути противірусна терапія при гепатиті В і С, повна відмова від алкоголю при хронічній алкогольній хворобі печінки, система терапевтичних заходів направлена на лікування неалкогольної жирової хвороби печінки і т.д. Але варто зауважити, що такий підхід до лікування фібозу можливий не завжди.

Існує декілька точок терапевтичного втручання, які можна виділити: усунення подразника або причини хвороби; придушення запалення печінки; втручання в активацію зірчастих клітин; сприяння руйнуванню позаклітинного матриксу [55].

Медикаментозні методи лікування часто представляють собою групи препаратів направлених на усунення причини фіброзу. Як і згадувалось вище, це може включати в себе противірусні препарати при гепатиті, препарати для зниження рівня жиру в печінці, тощо.

Важливу роль при лікуванні фібротичного процесу грають антиоксиданти. Антиоксидантні препарати можуть використовуватися з метою зменшення окислювально-відновлювального пошкодження, так як мають властивості сприяти деградації ЕЦМ, заважати активації ЗКП, зменшувати виробництво ЕЦМ, нейтралізувати скорочувальну відповідь ЗКП та стимулювати апоптоз ЗКП [56]. Однак варто зауважити, що вплив антиоксидантів на фіброз печінки потребує більше клінічних випробувань [12].

Наразі вчені приділяють велику увагу вивченню сигнальних шляхів та молекулярних мішеней з метою отримання можливості впливу на них та призначення розвитку фіброзу.

Великий інтерес представляє вивчення впливу на TGF- β 1/SMAD сигнальний шлях. Як вже відомо TGF- β 1 грає велику роль при розвитку

фіброзу, а білки SMAD є важливими внутрішньоклітинними ефекторами TGF- β 1, які мають як профіброзні функції (наприклад, SMAD3 і SMAD4), так і захисні функції (наприклад, SMAD2 і SMAD7) [57]. Посилення сигнального процесу сигнального шляху TGF- β 1/SMAD напряду пов'язане з більш активним розвитком фібротичних реакцій, що відбувається через вплив TGF- β 1 на активацію ЗКП, а отже, інгібування сигнального шляху TGF- β 1/Smad відіграє вирішальну роль у інгібуванні активації та проліферації ЗКП та полегшенні фіброзу печінки [58].

Однією з антифіброзних сполук є пірфенідон (PFD) (5-метил-1-феніл-2 (1H)-піридон), ефект якого включає в себе не тільки зниження регуляції TGF- β 1, а також інгібування PDGF, проліферації зірчастих клітин печінки, зниження рівнів TNF- α та IFN- α [55, 58]. Потенційно препарат PFD є кандидатом для лікування фіброзу. Результати проведених досліджень показали, що лікарський засіб PFD, фторофенідон, полегшив фіброз печінки та пошкодження печінки, спричинені свинячою сироваткою у щурів, за рахунок зниження активації ЗКП, індукованої TGF- β 1, та інгібування TGF- β 1/ Smad та MAPK сигнальних шляхів [59].

Однак інгібування активності TGF- β 1 також має свої мінуси, оскільки TGF- β 1 впливає на проліферацію, диференціацію та виживання таких клітин як Т-лімфоцити, В-лімфоцити, дендритні клітини та макрофаги. Отже, блокування TGF- β 1 може стати шкідливим для нормальної регуляції гомеостазу печінки [58].

Існують також препарати направлені на пригнічення фактору росту PDGF- β . Дія такої сполуки, як іматиніб направлена на блокування кінази рецептора PDGF- β , що стає потенційним методом для послаблення фіброгенного процесу [56].

Підходи, засновані на націленні на вже активовані міофібробласти включають в себе методи доставки siRNA, таких як ліпосомальні композиції, які накопичуються в печінці через свій розмір, форму та поверхневий заряд.

Такі ліпосомні комплекси мають здатність доставляти необхідний вантаж до різних типів клітин печінки, зокрема міофібробластів [60].

Моделі з використанням лізілоксидази 2 (LOXL2) показують, що LOXL2 має здатність стабілізувати ECM, а на більш запущених стадіях зменшувати оборотність фіброзу [61, 62].

Окрім того для лікування фіброзу та інших захворювань печінки можуть бути застосовані стероїди, релаксин], урсодезоксихолева кислота та ендоканабіноїди [55, 56]. Використання останніх може давати несприятливі побічні ефекти нейропсихіатричного характеру.

Підсумовуючи, наразі проводиться низка досліджень спрямованих на винаходження антифіброзних препаратів, більшість з яких направлена на вплив на молекулярні механізми, пов'язаних з фіброзом. Однак, більшість із запропонованих методів мають серйозні побічні ефекти для організму та потребують подальших клінічних досліджень.

1.8. Роль вітаміну А у терапії фіброзу печінки

Ретинол відіграє ключову роль у регуляції клітинної диференціації, імунної відповіді та метаболізму, що робить його перспективним агентом у терапії фіброзу печінки, оскільки роль вітаміну А тісно пов'язана з зірчастими клітинами печінки (ЗКП), які в свою чергу є основними учасниками фіброгенезу.

Сучасні дослідження демонструють ефективність використання вітаміну А як транспортного носія для таргетної доставки терапевтичних агентів до ЗКП. Показано, що застосування ліпосом, модифікованих вітаміном А, для доставки siRNA проти білка HSP47 призводить до значного зменшення фіброзу та регенерації ушкодженої печінкової тканини [63].

Дослідження з використанням хомогенної терапії також показують, що використання біосумісних міцел, декорованих вітаміном А, для

доставки хемогенів до активованих ЗКП, що показало перспективні результати у лікуванні печінкового фіброзу [63].

Одне з досліджень показало, що ретиноева кислота сприяє індукції сенесценції активованих ЗКП, знижуючи рівень фіброгенезу та підтримуючи потенційну регенерацію тканини [64].

Дослідження на щурах з фіброзом печінки також дають неоднозначні результати. З одного боку було показано, що при введенні щурам вітаміну А, рівень вітаміну Е знижувався на 40% порівняно з вихідним рівнем. З іншого боку Введення вітаміну А тваринам із фіброзом печінки сприяло нормалізації вмісту холестерину, відновленням темпів росту тварин та активність аланінамінотрансфераза (ALT) (фермент, рівень в крові якого прийнято сприймати, як маркер ушкодження печінки) [3].

В результаті іншого експерименту результати показали, що прийом вітаміну А щурами з фіброзом супроводжувався усуненням гальмування маси тварин, зростанням кількості двоядерних гепатоцитів, а також збільшенням товщини гліссонової капсули [28].

Однак важливо враховувати потенційні ризики, пов'язані з надмірним споживанням вітаміну А. Гіпервітаміноз А може призвести до гепатотоксичності та сприяти розвитку фіброзу. Тому при застосуванні вітаміну А в терапевтичних цілях має бути вибудований індивідуальний підхід до пацієнта, розрахована індивідуальна доза та врахована стадія захворювання [65].

Використання вітаміну А при лікуванні фіброзу потребує подальших клінічних досліджень, оскільки результати проведених експериментів в цій галузі все ще залишають багато запитань з приводу безпеки та ефективності даного методу.

Таким чином, фіброз печінки – це патологія, яка важко піддається лікуванню, а на пізніх стадіях стає незворотною патологією. Існуючі методи терапії не забезпечують високої ефективності. Особливу роль відіграє вітамін А, який регулює обмін речовин і функції клітин Іто, що беруть

участь у розвитку фіброзу. Тому подальше дослідження цих процесів є надзвичайно важливим.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Схема експерименту

Експериментальне дослідження було проведено на лабораторних щурах-самцях лінії Вістар, розподілених на експериментальні групи по 3–5 тварин у кожній. Досліди на лабораторних тваринах проводилися відповідно до дозволу біоетичного комітету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна та згідно з нормами, викладеними в «Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург 18 березня 1986 р).

Метою дослідження було вивчення впливу вітаміну А на фагоцитарну активність нейтрофілів при експериментальному моделюванні фіброзу печінки.

Щурів було розподілено на п'ять основних експериментальних груп:

Група № 1 (контрольна) — інтактні тварини;

Група № 2 — інтактні тварини, яким вводили тільки вітамін А;

Група № 3 — експериментальні тварини з індукованим фіброзом (початкова стадія), шляхом введенням розчину CuSO_4 (1 цикл). В цій групі тварини були поділені на підгрупи:

- *3a* — мідь-індукований фіброз без введення вітаміну А (контрольна підгрупа);
- *3b* — мідь-індукований фіброз із подальшим введенням вітаміну А.

Група № 4 — експериментальні тварини із введенням розчину CuSO_4 (2 цикли) з метою моделювання більш важкої стадії фіброзу.

Тварин було поділено на підгрупи:

- *4a* — мідь-індукований фіброз печінки без вітаміну А (контрольна підгрупа);
- *4b* — мідь-індукований фіброз печінки та введення вітаміну А.

Група № 5 — експериментальні тварини із індукованим фіброзом печінки шляхом введення комбінації розчинів CuSO_4 і CCl_4 . Тварини було поділено на підгрупи:

- *5a* — CuSO_4 - і CCl_4 . – індукований фіброз (контрольна підгрупа);
- *5b* — CuSO_4 - і CCl_4 . – індукований фіброз із введенням вітаміну А.

Експериментальна схема (рис 2.1.) передбачала наступні способи введення фіброзогенних агентів.

Перший цикл моделювання фіброзу тривав 5 діб. Щурам груп № 4 та №5 вводили CuSO_4 у вигляді водного розчину в дозі 1 мг/100 г маси тіла, з інтервалом в один день. Робочий розчин містив CuSO_4 , розчинений у фізіологічному розчині (0,25 мл/100 г маси тіла). Через 3 доби після завершення першого циклу щурам з групи № 5 вводили CCl_4 внутрішньочеревно у вигляді 40% розчину в оливковій олії (3,0 мл CCl_4 на 4,5 мл олії) для посилення фіброзу.

Другий цикл введення розчину сульфату міді починався через 3 доби і тривав аналогічно до першого: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ вводили групам № 3, № 4 та № 5 у дозі 1,5 мг/100 г маси тіла, також трикратно через кожні 48 годин.

Після завершення другого циклу (через 1 добу) тварини з груп № 2, № 3b, № 4b та № 5b отримували ретинолу ацетат у дозі 300 МО/100 г маси тіла перорально щоденно протягом 4 днів.

Групи №1, № 3a, № 4a та № 5a замість ретинолу ацетату отримували оливкову олію в еквівалентному об'ємі як розчинник. Усі групи, що не отримували ін'єкцій розчинів сульфату міді, отримували фізіологічний розчин, а ті, що не отримували ін'єкцій тетрахлорметану - оливкову олію. Дані маніпуляції дозволили стандартизувати умови експерименту.

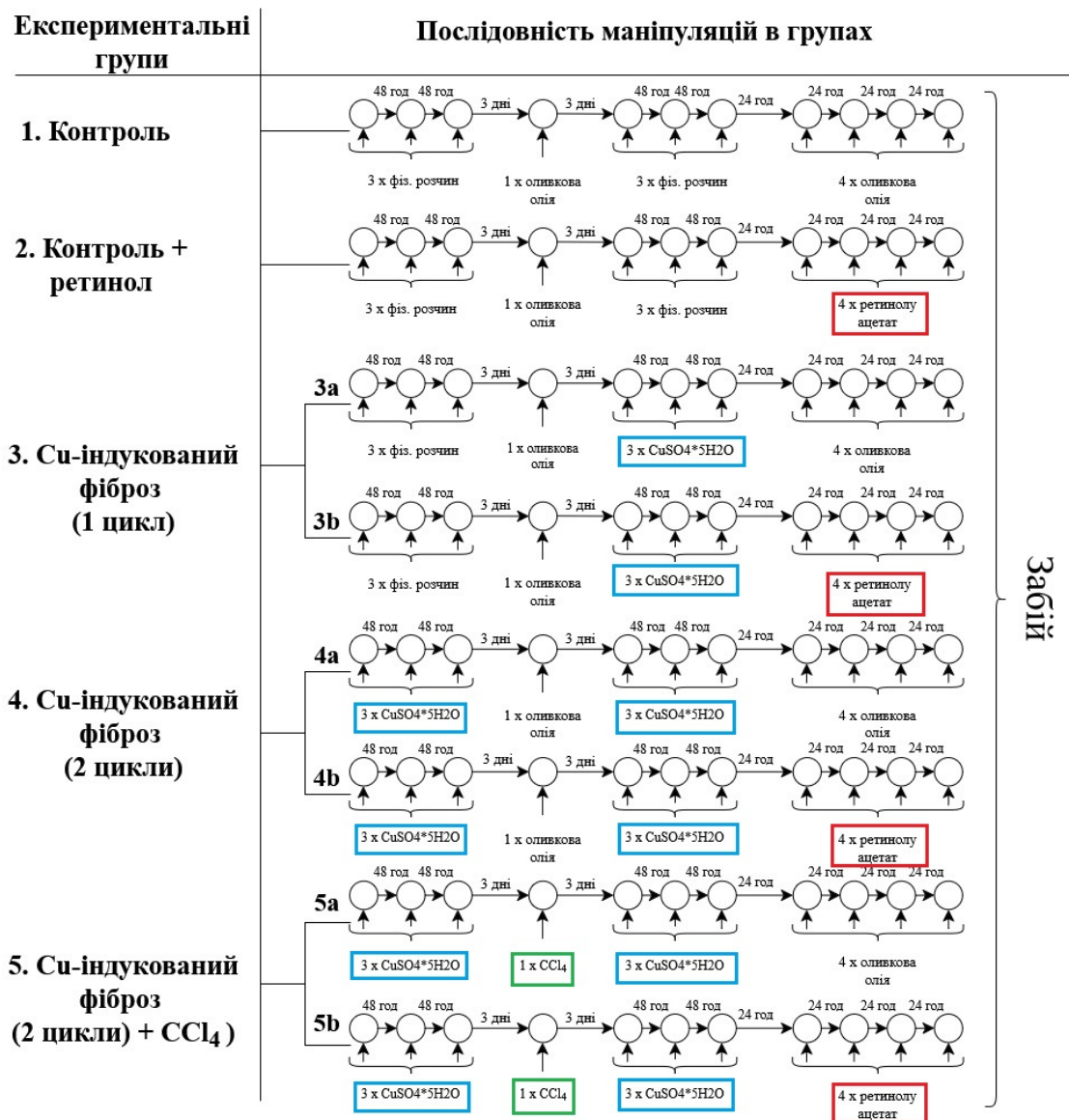


Рис. 2.1 На схемі показано послідовність введення розчинів сірчаноокислої міді експериментальним тваринам з метою індукції мідь-індукованого фіброзу печінки (групи №3, 4, 5; на рис. позначено синім кольором) та розчину CCl_4 (група №5; на рис. позначено зеленим кольором); схема введення вітаміну А експериментальним тваринам (групи №2, 3b, 4b, 5b; на рис. позначено червоним кольором) та контрольна група тварин (група №1), яка отримувала фізіологічний розчин замість сірчаноокислої міді, олівову олію замість вітаміну А.

Після завершення дослідження проводився забій тварин з метою забору органів та біоматеріалу для морфологічного та імунологічного аналізу.

2.2. Гістологія печінки

У межах даного дослідження безпосереднє отримання гістологічних препаратів печінки матеріалу печінки не проводили. Проте наукове обґрунтування та підтвердження достовірності моделі мідь-індукованого фіброзу печінки було здійснено шляхом аналізу результатів попередніх досліджень, зокрема публікації [66], в якій використовувалася подібна експериментальна модель.

У зазначеній роботі токсичне ураження печінки у лабораторних щурів індукували за допомогою впливу сульфату міді (CuSO_4). Такий підхід є широко визнаним у науковій спільноті як ефективний спосіб моделювання хронічного токсичного фіброзу печінки. У процесі дослідження автори проводили макроскопічне та гістологічне дослідження тканини печінки з подальшим отриманням мікрофотографій гістологічних зрізів.

Отримані гістологічні зображення (рис. 2.2) чітко демонстрували морфологічні зміни, характерні для фіброзу (рис. 2.2 А): автоліз гепатоцитів, порушення балкової структури печінкової паренхіми, проліферацію сполучної тканини, зміну форми печінки, потовщення капсули Гліссона, та інші ознаки запального процесу .

Таким чином, дані макро- та мікроскопічного аналізу, представлені у дослідженні Божкова А.І. з співавт. [66], підтверджують ефективність моделі індукції токсичного фіброзу печінки за допомогою CuSO_4 . Одержані гістологічні фото є доказом морфологічної перебудови печінки у відповідь на хронічне токсичне навантаження, що підтверджує наукову обґрунтованість обраної моделі у нашому дослідженні, попри відсутність власної фотодокументації.

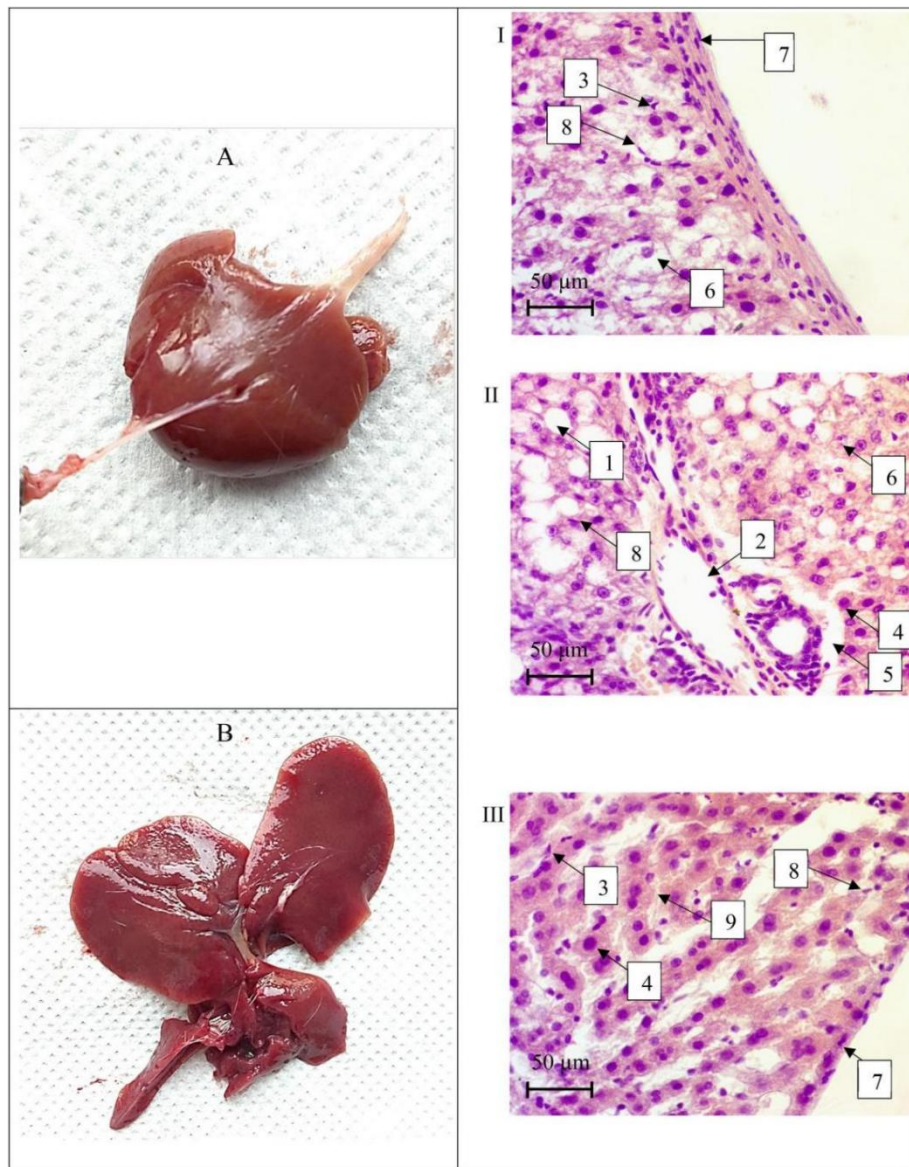


Рис. 2.2 Утворення сполучної тканини навколо лопастей печінки, зміна форми часток печінки та їх зрощення зі сполучною тканиною після інтоксикації сульфатом міді (А), вигляд печінки контрольної групи тварин (В). Гістологічний препарат печінки щурів: модель печінки тварин з фіброзом (І, ІІ); печінка інтактних тварин (ІІІ): 1 — дисконплексація печінкових балок, 2 — кровоносна судина, 3 — Іто-клітини, 4 — лімфоцити, 5 — множинні розриви тканин, 6 — аутоліз гепатоцитів, 7 — капсула печінки, 8 — ендотеліоцити, 9 — простір Диссе; (гематоксилін-еозинове забарвлення, мікроскоп Carl Zeiss, камера SIGETA M3CVOS 14000, збільшення x400) [66, стор. 83].

2.3. Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові (кисень-незалежний фагоцитоз)

Одним із ключових показників стану системи вродженого імунітету є фагоцитарна активність нейтрофілів — основних клітин, відповідальних за первинну відповідь організму на патогенні мікроорганізми. З метою оцінки впливу вітаміну А на функціональний стан імунної системи щурів із експериментальним фіброзом було проведено визначення кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів периферичної крові.

Метод базується на дослідженні реакції фагоцитуючих клітин з умовним антигеном — дріжджовими клітинами *Saccharomyces cerevisiae*. Цей підхід дозволяє дослідити як кількісні, так і якісні аспекти фагоцитозу, зокрема здатність нейтрофілів до поглинання мікроорганізмів, швидкість фагоцитування, завершеність внутрішньоклітинного перетравлення та бактерицидну активність [67].

Після завершення експериментального періоду у тварин здійснювали забір периферичної крові. Отриману кров стабілізували додаванням гепарину в концентрації 50 мкл/мл. Кров відбирали у стерильних умовах, із дотриманням вимог біоетики та техніки безпеки.

Для моделювання фагоцитозу використовували живі культури *Saccharomyces cerevisiae*, які попередньо промивали ізотонічним розчином натрію хлориду (NaCl 0,9%) для усунення залишків середовища культивування. Проводили двоступеневу інкубацію: I етап — інкубація протягом 30 хвилин при температурі 37 °C; II етап — інкубація протягом 120 хвилин при тих самих умовах.

До 0,2 мл гепаринізованої крові додавали 0,2 мл суспензії дріжджів (0,1 г сухих дріжджів на 10 мл фізіологічного розчину), після чого здійснювали інкубацію у лунках стандартного 96-лункового планшета в термостаті.

Після завершення кожного з етапів інкубації виготовляли мазки на предметних скельцях. Краплю кров'яно-дріжджової суміші наносили на

скло й одразу виготовляли тонкий мазок шляхом класичного розтягування під кутом.

Мазки висушували при кімнатній температурі, після чого фіксували у метиловому або етиловому спирті протягом 10 хвилин. Забарвлення здійснювали за допомогою фарби Романовського–Гімзи — класичного цитологічного методу. Тривалість фарбування становила 45–50 хвилин.

Для мікроскопії застосовували оптичний мікроскоп з імерсійною системою при збільшенні $\times 1000$. У кожному препараті підраховували щонайменше 100 нейтрофілів.

Оцінювали наступні показники фагоцитарної активності:

- Фагоцитарний індекс (ФІ) — кількість нейтрофілів, що вступили у фагоцитоз, у % від загальної кількості.

- Фагоцитарне число (ФЧ) — середня кількість дріжджових клітин, поглинутих одним нейтрофілом.

- Коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ): $\text{КФЧ} = \text{ФЧ}_{30} / \text{ФЧ}_{120}$.

- Індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН): $\text{ІБН} = (\text{Ч}_у / \text{Ч}_п) \times 100$.

Показники ФІ, ФЧ, КФЧ та ІБН обчислювали для кожної тварини, після чого визначали середні значення по кожній групі. Усі дані оформлювали у вигляді таблиць для подальшої статистичної обробки.

2.4. Статистична обробка даних

Для оцінки фагоцитарної активності нейтрофілів та інших показників імунного статусу тварин була проведена статистична обробка отриманих експериментальних даних. Аналізу підлягали такі показники: фагоцитарний індекс (ФІ), фагоцитарне число (ФЧ), коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ) та індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН). Кожен із цих параметрів обчислювався індивідуально для кожної тварини, після чого результати узагальнювали у межах відповідних експериментальних груп.

У кожній групі налічувалося від 3 до 5 тварин, що забезпечило необхідну статистичну базу для первинної обробки результатів. Для забезпечення точності розрахунків усі вимірювання проводили з трьома аналітичними повтореннями, на основі яких визначали середні арифметичні значення (M) та стандартні помилки середнього значення ($\pm SE$).

Статистичний аналіз здійснювався із застосуванням програмного забезпечення Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., США), яке використовувалося як для математичних обчислень, так і для побудови діаграм та графіків, що ілюструють експериментальні результати.

Для визначення статистично значущих відмінностей між групами застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA), а також U-критерій Манна–Вітні для порівняння двох незалежних вибірок у разі відсутності нормального розподілу даних. Вірогідність відмінностей вважалася статистично значущою при $P < 0,05$.

Порівняння між контрольною та експериментальними групами проводили окремо для кожного з досліджуваних показників. Отримані результати оформлювали у вигляді таблиць, а також графічно представляли за допомогою гістограм і діаграм, що дозволяло наочно відобразити динаміку та ступінь змін імунологічних параметрів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження впливу вітаміну А на показники імунної системи в контрольній групі тварин

На першому етапі роботи оцінювали показники клітинної ланки імунітету у контрольній групі тварин (група №1) та у тварин, яким вводили вітамін А (група №2). Результати порівняння групи № 1 (К) та групи № 2 (К+ретинол) показано на рис. 3.1.

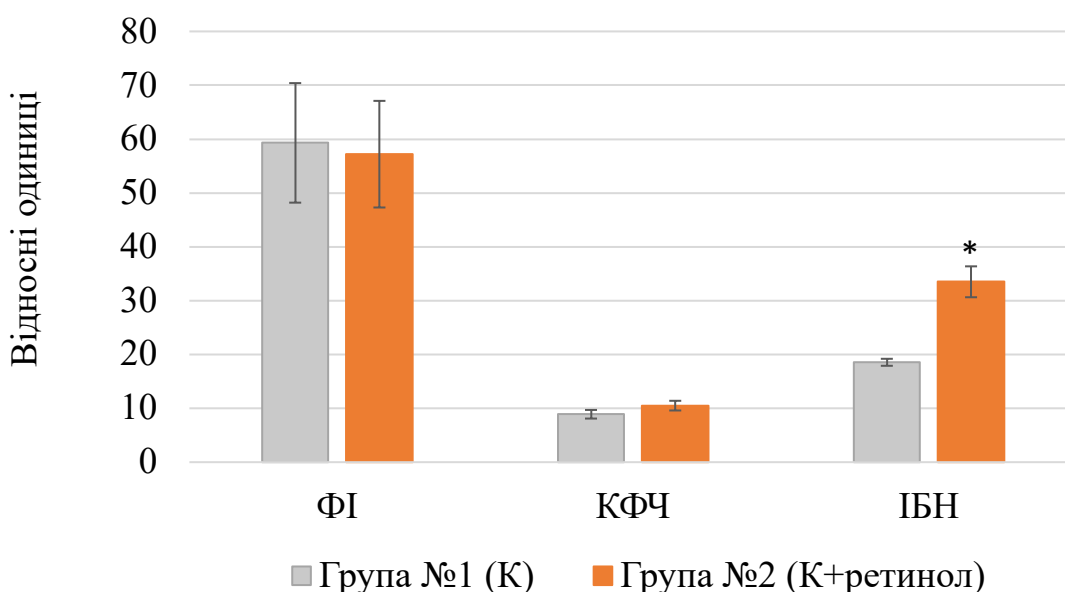


Рис. 3.1. Фагоцитарний індекс (ФІ), коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ), індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) у контрольній групі тварин (група №1) та у тварин, яким вводили вітамін А (група №2)

* – $P < 0.05$ у порівнянні із контрольною групою (U test)

Дані, отримані при аналізі фагоцитарного індексу (ФІ), показують, що ФІ в групі № 1 становить $59,3 \pm 11,1\%$; в групі № 2 - $57,2 \pm 9,9\%$. Тобто, відсоток фагоцитів, які прийняли участь у фагоцитозі однаковий в контрольній групі тварин та у тварин, яким вводили вітамін А. Відповідно, вітамін А не впливає на фагоцитарний індекс нейтрофілів в організмі, який не уражений фіброзом печінки.

Аналіз коефіцієнтів фагоцитарного числа (КФЧ) між першими двома групами також не відрізняється. КФЧ в групі № 1 складає $0,89 \pm 0,08$; в групі № 2 - $1,05 \pm 0,09$. Такі результати можуть свідчити відсутність вплив вітаміну А на перебіг і завершеність фагоцитозу нейтрофілів для моделі здорового організму.

Натомість на рис. 3.1 бачимо, що індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) в групі № 2 у 1,8 разів вищий за той самий параметр в групі № 1, а саме ІБН в першій групі складає $18,55 \pm 0,65\%$ в той час, як в другій групі - $33,50 \pm 2,87\%$. Тобто, введення вітаміну А експериментальним тваринам приводить до збільшення бактерицидного індексу нейтрофілів (ІБН) у порівнянні з контрольною групою, що відображає збільшення здатності нейтрофілів не тільки поглинати, а й перетравлювати мікроорганізми. Варто зауважити, що в жодній з перших двох груп щури не були уражені фіброзом печінки.

За результатами порівняння характеристик активності нейтрофілів у щурів груп № 1 (контрольна група, яка замість вітаміну А отримувала оливкову олію в якості альтернативи і еквівалентному об'ємі) та № 2 (група щурів, які не мали фіброзу печінки, але отримували вітамін А) показали значну відмінність лише в індексі бактерицидної активності нейтрофілів (ІБН). Натомість фагоцитарний індекс (ФІ) та коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) виявилися подібними у обох груп. Таким чином, можна припустити, що в організмі без фіброзу печінки вітамін А впливає на ІБН, при цьому не впливає на ФІ та КФЧ нейтрофілів.

3.2. Дослідження показників активності фагоцитозу у тварин із мідь-індукованим фіброзом печінки (1 цикл) та при введення вітаміну А

На наступному етапі оцінювали показники клітинної ланки імунітету (фагоцитарний індекс, індекс завершеності фагоцитозу, індекс бактерицидності нейтрофілів) у тварин з мідь-індукованим фіброзом та при

введенні цим тваринам вітаміну А (третя експериментальна група). Третя група була розділена на дві підгрупи: № 3а та 3б. Щурам підгрупи №3а вводили трикратно CuSO_4 (1 цикл) для індукування перших стадій фіброзу, при цьому ретинолу вони не отримували. Щурам підгрупи № 3б так само вводили трикратно CuSO_4 протягом 1 циклу експерименту, але при цьому тварини отримували вітамін А в якості експериментальної терапії. Отримані показники були порівняні з контрольною групою тварин (група №1).

Результати експерименту представлено на рис. 3.2.

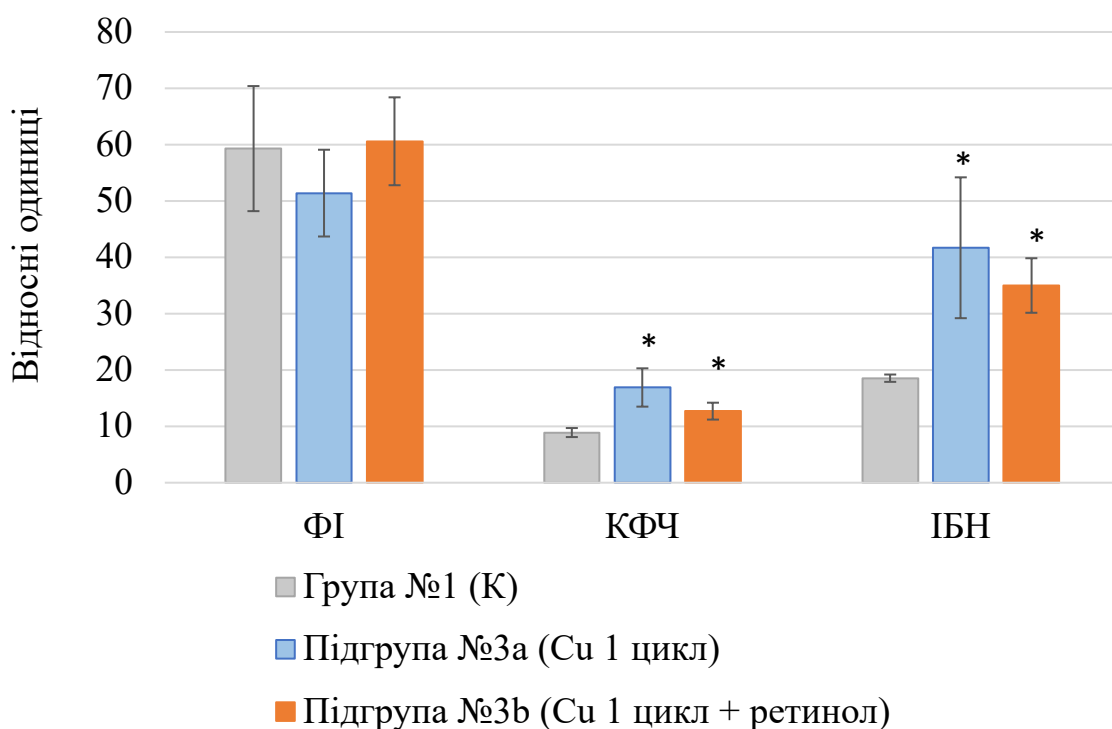


Рис. 3.2 Фагоцитарний індекс (ФІ), коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ), індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) у контрольній групі тварин (група № 1), тварин, яким вводили трикратно розчин CuSO_4 (група № 3а) та у тварин, яким вводили вітамін А на тлі формування фіброзу (група № 3б)

* – $P < 0.05$ у порівнянні із контрольною групою (U test)

На рис. 3.2 видно, що фагоцитарний індекс нейтрофілів (ФІ) у всіх груп тварини не відрізнявся і складав у групі № 1 $59,3 \pm 11,1\%$; в групі № 3а

- $51,4 \pm 7,7\%$; в групі № 3b - $60,6 \pm 7,8\%$ відповідно. Таким чином, введення тваринам розчину сульфату міді не приводило до зміни кількості активних клітин-нейтрофілів серед загальної популяції. Так саме, введення вітаміну А не приводило до зміни активності нейтрофілів у порівнянні з контрольною групою.

Але функціональна активність нейтрофілів (середня кількість мікроорганізмів, поглинутих одним нейтрофілом) збільшувалась при формування фіброзу печінки у експериментальних тварин. Коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) в групі № 1 складає $0,89 \pm 0,08$; а в групі № 3a - $1,69 \pm 0,34$; що в 1,8 разів більше, ніж у контролі. Тобто, інтенсивність фагоцитозу збільшувалась. При введення вітаміну А на тлі формування фіброзу інтенсивність фагоцитозу була збільшеною у порівнянні з контролем, але не відрізнялась від показників у групі з мідь-індукованим фіброзом. Так, КФЧ в групі № 3b складав $1,27 \pm 0,15$. Такі результати показують, що індекс завершеності фагоцитозу зростає на перших стадіях розвитку фіброзу, при прийомі вітаміну А також спостерігається його збільшення у порівнянні з контролем, але менше, ніж у групі тварин з фіброзом і без введення вітаміну А.

Подібні зміни спостерігаються і з індексом бактерицидності нейтрофілів (ІБН). Так, ІБН в групі № 1 складає $18,55 \pm 0,65\%$; в групі № 3a - $41,70 \pm 12,50\%$; в групі № 3b – $35,00 \pm 4,84\%$. Показано, що бактерицидна активність нейтрофілів помітно зростає вже на перших стадіях фіброзу – у 2,2 раза у порівнянні з контролем, а при введенні в організм ретинолу – у 1,9 разів у порівнянні з контролем.

Таким, чином, формування мідь-індуковано фіброзу супроводжувалось збільшенням інтенсивності фагоцитозу та збільшенням його ефективності, тобто збільшенням бактерицидної функції нейтрофілів, що є доказом прояву запальних процесів в організмі.

Введення вітаміну А на тлі формування фіброзу печінки супроводжувалось також збільшення фагоцитарної активності нейтрофілів

та збільшенням їхньої бактерицидності у порівнянні з контролем, але в меншому ступені, ніж у тварин з мідь-індукованим фіброзом. Це може свідчити про взаємозв'язок між ретинолом та клітинним імунітетом.

3.3. Дослідження показників активності фагоцитозу у тварин із мідь-індукованим фіброзом печінки (2 цикли) та при введення вітаміну А

В наступних експериментах індукували формування фіброзу печінки подвійним введенням розчину сульфату міді експериментальним тваринам (подвійне трикратне введення з певним інтервалом, див. рис. 2.1). Після цього тваринам вводили вітамін А та порівнювали показники клітинної ланки імунітету у контрольній групі тварин (група № 1) та у тварин з мідь-індукованим фіброзом (група № 4).

Група № 4 була розділена на дві підгрупи: № 4а та № 4б. Обидві підгрупи отримували подвійне триразове введення розчину CuSO_4 , що повинно мало приводити до формування більш важкого ступіня фіброзу, ніж у тварин підгруп № 3а та №3б. Тварини групи №4б перорально отримували ретинол для тестування його впливу на активність клітинного імунітету.

Результати експерименту представлені на рис. 3.3.

Аналізуючи фагоцитарний індекс (ФІ) можна зазначити, що ФІ в групі № 1 складав $59,3 \pm 11,1\%$; в групі № 4а - $77,6 \pm 5,775$; в групі №4б - $75,1 \pm 8,15\%$, що свідчить про тенденцію до збільшення фагоцитарної активності в груп № 4а та № 4б в порівнянні з групою № 1. Але достотвірних змін визначено не було. Отже, можна припустити, що фагоцитарна активність нейтрофілів, ймовірно, може підвищуватися при збільшенні введення токсиканта в організм тварини. Введення вітаміну А не змінює даний показник. Для перевірки цього припущення необхідні додаткові дослідження.

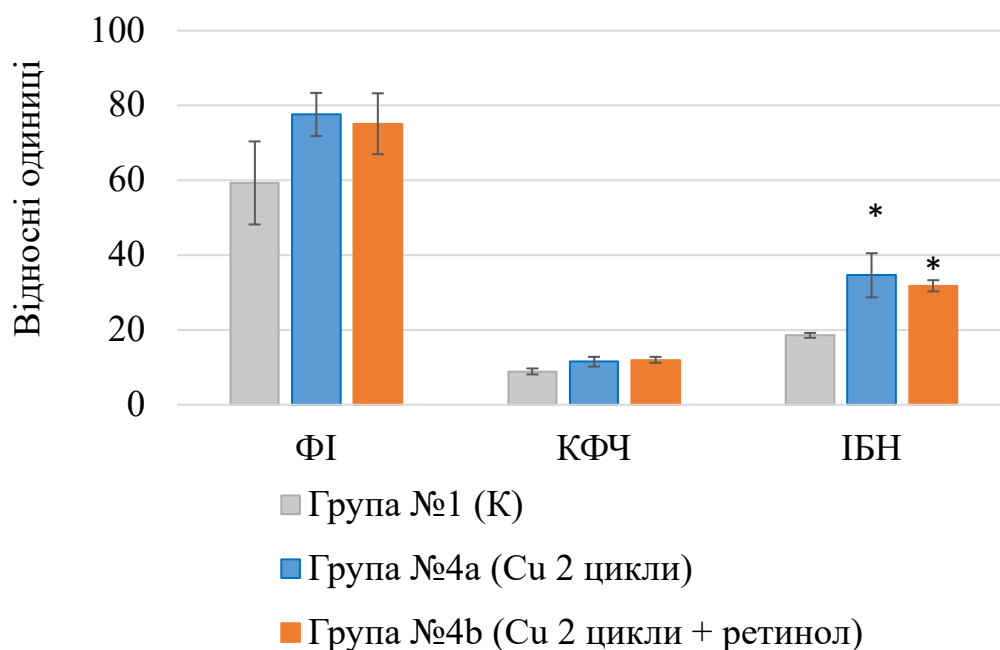


Рис. 3.3. Фагоцитарний індекс (ФІ), коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ), індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) у контрольній групі тварин (група № 1); тварин, які отримували 2 рази трикратно розчин CuSO_4 (група № 4а) та у тварин, яким вводили вітамін А на тлі формування фіброзу (група № 4b)

* – $P < 0.05$ у порівнянні із контрольною групою (U test)

Коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) в групі № 1 складав $0,89 \pm 0,08$; в групі № 4а – $1,15 \pm 0,13$; в групі № 4b – $1,20 \pm 0,08$. На рис. 3.3 показано, що подвійне введення розчину сульфату міді не впливало на інтенсивність фагоцитозу у порівнянні з контрольною групою. Окрім того, показано, що ретинол також не впливає на індекс завершеності фагоцитозу в умовах активного фібротичного процесу.

Результати бактерицидної активності нейтрофілів показують, що ІБН в групі № 1 складав $18,55 \pm 0,65\%$; в групі № 4а – $34,60 \pm 5,9\%$; в групі № 4b – $31,80 \pm 1,5\%$. Слід зауважити, що при більш складному фіброзному ураженні печінки щурів індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) в 1,87 разів підвищується у порівнянні з контролем, в цей час прийом вітаміну А не викликав значних змін даного параметру, але був у 1,7 разів вище ніж в

контрольній групі. Це може свідчити, про відсутність впливу, або невеликий вплив вітаміну А на бактерицидну активність нейтрофілів при значному фіброзі печінки.

Таким чином, при подвійному введення розчину сульфату міді ретинол не впливає на активність клітинного імунітету, або цей вплив не є значним.

3.4. Дослідження показників активності фагоцитозу у тварин із Cu- та CCl₄- індукованим фіброзом печінки та при введення вітаміну А

На наступному етапі індукували формування фіброзу печінки подвійним введенням розчину сульфату міді та додатково вводили розчин CCl₄ експериментальним тваринам між циклами введення сульфату міді для посилення фіброзу та викликання більш важких його стадій (див. рис. 2.1). Після цього тваринам вводили вітамін А та порівнювали показники клітинної ланки імунітету у контрольній групі тварин (№ 1) та у тварин Cu- та CCl₄- індукованим фіброзом (група № 5). Як і інші експериментальні групи, група № 5 була розділена на дві підгрупи: № 5a та № 5b, серед яких лише група № 5b отримувала ретинол.

Після визначення показників клітинної ланки імунітету, отримані данні були представлені на рис. 3.4.

Фагоцитарний індекс (ФІ) в групі № 1 складав $59,3 \pm 11,1\%$; в групі № 5a - $57,6 \pm 13,1\%$; в групі № 5b - $71,4 \pm 10,9\%$, тобто індукування фіброзу не змінювало відсоток нейтрофілів, які приймають участь в фагоцитозі. Натомість, введення вітаміну А приводило до збільшення активних клітин. Тобто, можна припустити, що вітамін А впливає на фагоцитарну активність нейтрофілів на тлі важкого фіброзного ураження печінки.

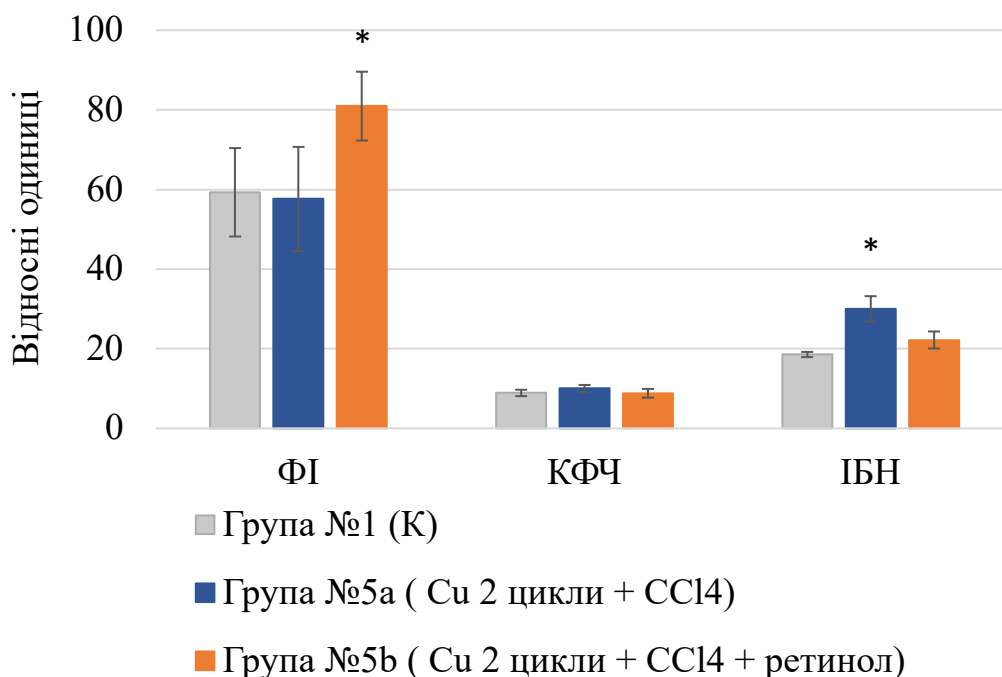


Рис. 3.4. Фагоцитарний індекс (ФІ), коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ), індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) у контрольній групі тварин (група № 1), тварин, які отримували 2 рази трикратно розчин CuSO_4 та CCl_4 (група № 5а) та у тварин, яким вводили вітамін А на тлі формування фіброзу (група № 5b)

* – $P < 0.05$ у порівнянні із контрольною групою (U test)

Коефіцієнт фагоцитарного числа (КФЧ) в групі № 1 складав $0,89 \pm 0,08$; в групі № 5а – $1,0 \pm 0,09$; в групі № 5b – $0,88 \pm 0,11$, що свідчить про відсутність зміни інтенсивності фагоцитозу після подвійного введення CuSO_4 та CCl_4 , як моделювання важкої форми фіброзу печінки, в порівнянні із контрольною групою (модель здорового організму). Слід зауважити, що вітамін А також не впливає на індекс завершеності фагоцитозу на тлі більш важкої стадії фіброзу печінки.

Порівнянні індексу бактерицидної активності нейтрофілів показує, що ІБН в групі № 1 складав $18,55 \pm 0,65\%$; в групі № 5а – $30,00 \pm 3,20\%$; в групі № 5b – $22,2 \pm 2,14\%$. Тобто, введення тваринам розчинів CuSO_4 та CCl_4 приводило до збільшення бактерицидної функції нейтрофілів у 1,6 разів у порівнянні із контрольною групою. Але при введенні вітаміну А на тлі

розвитку фіброзу печінки відбувалося відновлення індекса бактерицидності нейтрофілів до контрольних значень. Це може відбуватися внаслідок збільшення відсотка нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі. Тобто, введення ретинолу в умовах моделювання важкої форми фіброзу впливає на активність і бактерицидну функцію нейтрофілів.

За результатами проведених експериментів можна заключити, що введення розчинів CuSO_4 та CCl_4 за різними схемами приводять до змін показників клітинного імунітету (рис. 3.5). Так, коефіцієнт фагоцитарного числа не змінювався при розвитку фіброзу печінки у порівнянні з контрольною групою. Тобто, не змінювалася відсоткова кількість нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі.

Інтенсивність фагоцитозу збільшувалась при розвитку мідь-індукованого фіброзу, але при введенні CCl_4 інтенсивність фагоцитозу зменшувалась і вирівнювалася до контрольного рівня.

Бактерицидна функція нейтрофілів також збільшувалась при розвитку мідь-індукованого фіброзу, а при введенні CCl_4 була на рівні контролю.

Тобто, формування мідь-індукованого фіброзу печінки супроводжувалося зміною активності фагоцитозу, його активацією. При моделюванні фіброзу введенням CuSO_4 та CCl_4 відбувалося збільшення кількості нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі, але завершеність фагоцитозу та бактерицидна активність нейтрофілів залишалась на контрольному рівні.

Прийом вітаміну А на тлі мідь-індукованого фіброзу не впливав на активність фагоцитозу. При введенні вітаміну А на тлі моделювання фіброзу введенням CuSO_4 та CCl_4 відбувалося збільшення кількості нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі та до зменшення активності фагоцитозу та бактерицидної активності нейтрофілів до контрольного рівня.

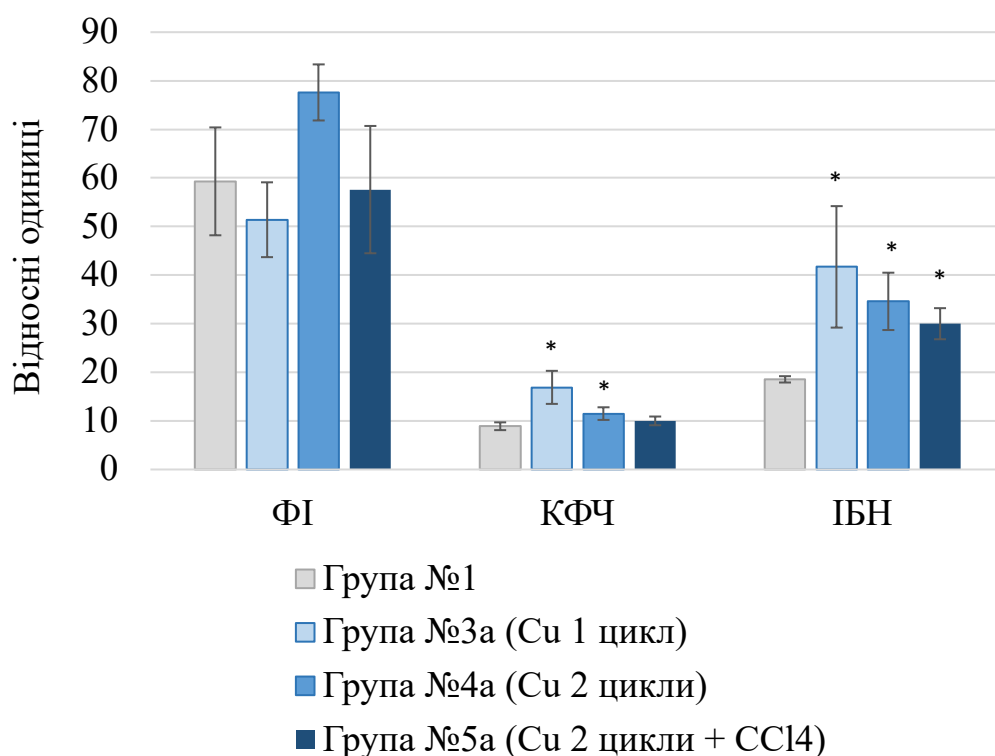


Рис. 3.5. Фагоцитарний індекс (ФІ), коефіцієнт завершеності фагоцитозу (КФЧ), індекс бактерицидності нейтрофілів (ІБН) у контрольній групі тварин (група № 1); тварин, які отримували протягом 1 циклу трикратно розчин CuSO_4 (група № 3а), протягом двох циклів трикратно розчин CuSO_4 (група № 4а) та протягом двох циклів трикратно розчин CuSO_4 та 1 раз - CCl_4 (група № 5а).

* – $P < 0.05$ у порівнянні із контрольною групою (U test)

Отримані результати показують важливість проведення подальших досліджень та пошуків взаємозв'язків клітинного імунітету та ретинолу в умовах розвитку фіброзу печінки з метою пошуку методів регуляції розвитку даної патології.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволили дослідити відповідь клітинної ланки імунної системи на формування фіброзу печінки тварин та вплив вітаміну А (ретинолу) на її показники.

1. Формування мідь-індукованого фіброзу печінки супроводжувалося збільшенням інтенсивності та ефективності фагоцитозу.

2. Виявлено, що використання вітаміну А приводило до збільшення кількості нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі лише у тварин, яким вводили 2 рази трикратно розчин CuSO_4 та один раз розчин CCl_4 . При цьому активність фагоцитозу та бактерицидна активність нейтрофілів залишалась на контрольному рівні.

3. Прийом вітаміну А не впливав на показники активності клітинної ланки імунної системи на тлі лише мідь-індукованого фіброзу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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>
2. Iwaisako K., Brenner D. A., Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012. Vol. 27. P. 65–68. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07002.x>
3. 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>
4. The effect of retinol acetate on liver fibrosis depends on the temporal features of the development of pathology / A. I. Bozhkov et al. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2023. P. 101338. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2023.101338>
5. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease – novel insights into cellular communication circuits / M. Peiseler et al. *Journal of hepatology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.012>
6. Braillon A. Laennec's cirrhosis. *The lancet*. 2019. Vol. 393, no. 10167. P. 131–132. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32523-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32523-6)
7. Wells R. G. Liver fibrosis: our evolving understanding. *Clinical liver disease*. 2024. Vol. 23, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1097/cld.0000000000000243>
8. Steven I. Hajdu A note from history: microscopic contributions of pioneer pathologists. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2011. Vol. 41, № 2
9. P. P. Anthony, K. G. Ishak, N. C. Nayak, H. E. Poulsen, P. J. Scheuer, L. H. Sobin The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and

classification. *Bulletin of the World Health Organization*. 1977. Vol. 55, №4. P. 521-540.

10. Колеснікова О. В. Погляд на фіброз печінки у світлі розуміння сучасних механізмів його розвитку. *Гастроентерологія*. 2019. Т. 53, № 2. С. 67-73.

11. N. Kawada The hepatic perisinusoidal stellate cell. *Histology and histopathology*. 1997. Vol. 12, №4. P. 1069-1080.

12. Aydin M. M., Akcali K. C. Liver fibrosis. *The turkish journal of gastroenterology*. 2018. Vol. 29, no. 1. P. 14–21. URL: <https://doi.org/10.5152/tjg.2018.17330>

13. Elpek G. Ö. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: an update. *World journal of gastroenterology*. 2014. Vol. 20, no. 23. P. 7260. URL: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7260>

14. Seki E., Schwabe R. F. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*. 2015. Vol. 61, no. 3. P. 1066–1079. URL: <https://doi.org/10.1002/hep.27332>

15. Yao Y., Xu X.-H., Jin L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Frontiers in immunology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>

16. The role of macrophages in liver fibrosis: new therapeutic opportunities / E. Binatti et al. *International journal of molecular sciences*. 2022. Vol. 23, no. 12. P. 6649. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms23126649>

17. Friedman S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008. Vol. 134, no. 6. P. 1655–1669. URL: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>

18. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis / F. Xu та ін. *Journal of histochemistry & cytochemistry*. 2016. Т. 64, № 3. С. 157–167. URL: <https://doi.org/10.1369/0022155415627681>

19. Effects of metabolic syndrome on fibrosis in chronic viral hepatitis / H. Yoon et al. *Gut and liver*. 2013. Vol. 7, no. 4. P. 469–474. URL: <https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.4.469>
20. Haga Y. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatic cirrhosis: comparison with viral hepatitis-associated steatosis. *World journal of gastroenterology*. 2015. Vol. 21, no. 46. P. 12989. URL: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i46.12989>
21. NAFLD is associated with less severe liver fibrosis in chronic hepatitis B: a multi-center, retrospective study / R. Yao et al. *Annals of hepatology*. 2023. P. 101155. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2023.101155>
22. Fibrosis in chronic kidney disease: pathogenesis and consequences / S. Panizo et al. *International journal of molecular sciences*. 2021. Vol. 22, no. 1. P. 408. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22010408>
23. IL-13 signaling in liver fibrogenesis / Y. Liu et al. *Frontiers in immunology*. 2012. Vol. 3. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00116>
24. Klingberg F., Hinz B., White E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The journal of pathology*. 2012. Vol. 229, no. 2. P. 298–309. URL: <https://doi.org/10.1002/path.4104>
25. Liver fibrosis staging through a stepwise analysis of non-invasive markers (FibroSteps) in patients with chronic hepatitis C infection / S. S. El-Kamary et al. *Liver international*. 2013. Vol. 33, no. 7. P. 982–990. URL: <https://doi.org/10.1111/liv.12139>
26. Disturbed vitamin A metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) / A. Saeed et al. *Nutrients*. 2017. Vol. 10, no. 1. P. 29. URL: <https://doi.org/10.3390/nu10010029>
27. Song J., Jiang Z. G. Low vitamin A levels are associated with liver-related mortality: a nationally representative cohort study. *Hepatology communications*. 2023. Vol. 7, no. 5. URL: <https://doi.org/10.1097/hc9.000000000000124>

28. Bozhkov A., Bilovetska S. Vitamin A accelerates the process of liver regeneration in the initial stages of Cu - induced fibrosis. *ScienceRise: biological science*. 2023. № 3(36). С. 34–39. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2023.288227>
29. 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>
30. Vitamin D in chronic liver disease / C. S. Stokes et al. *Liver international*. 2013. Vol. 33, no. 3. P. 338–352. URL: <https://doi.org/10.1111/liv.12106>
31. The roles of immune cells in the pathogenesis of fibrosis / E. Huang et al. *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21, no. 15. P. 5203. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21155203>
32. Gordon S., Martinez-Pomares L. Physiological roles of macrophages. *Pflügers archiv - european journal of physiology*. 2017. Vol. 469, no. 3-4. P. 365–374. URL: <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1945-7>
33. Braga T. T., Agudelo J. S. H., Camara N. O. S. Macrophages during the fibrotic process: m2 as friend and foe. *Frontiers in immunology*. 2015. Vol. 6. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00602>
34. Macrophages regulate renal fibrosis through modulating tgfb β superfamily signaling / B. Shen та ін. *Inflammation*. 2014. T. 37, № 6. С. 2076–2084. URL: <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9941-y>
35. Ly6ChiMonocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis / M. A. Gibbons et al. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011. Vol. 184, no. 5. P. 569–581. URL: <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1719oc>
36. CXCL6-EGFR-induced Kupffer cells secrete TGF- β 1 promoting hepatic stellate cell activation via the SMAD2/BRD4/C-MYC/EZH2 pathway in liver fibrosis / X. Cai та ін. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2018. T. 22, № 10. С. 5050–5061. URL: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13787>

37. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2020. Vol. 108, no. 1. P. 377–396. URL: <https://doi.org/10.1002/jlb.4mir0220-574rr>
38. Role of IL-17A and neutrophils in fibrosis in experimental hypersensitivity pneumonitis / S. A. Hasan et al. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2013. Vol. 131, no. 6. P. 1663–1673.e5. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.015>
39. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in nkg2d-dependent and tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand–dependent manners / S. Radaeva et al. *Gastroenterology*. 2006. Vol. 130, no. 2. P. 435–452. URL: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.10.055>
40. Rahman A. H., Aloman C. Dendritic cells and liver fibrosis. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular basis of disease*. 2013. Vol. 1832, no. 7. P. 998–1004. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.01.005>
41. Group 2 innate lymphoid cells exhibit progressively higher levels of activation during worsening of liver fibrosis / V. Gonzalez-Polo et al. *Annals of hepatology*. 2019. Vol. 18, no. 2. P. 366–372. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2018.12.001>
42. Zhang M., Zhang S. T cells in fibrosis and fibrotic diseases. *Frontiers in immunology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01142>
43. Persistence of cirrhosis is maintained by intrahepatic regulatory T cells that inhibit fibrosis resolution by regulating the balance of tissue inhibitors of metalloproteinases and matrix metalloproteinases / X. Zhang et al. *Translational research*. 2016. Vol. 169. P. 67–79.e2. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.10.008>
44. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: Involvement of natural killer T cells / Z. Jin et al. *Hepatology*. 2010. Vol. 53, no. 1. P. 219–229. URL: <https://doi.org/10.1002/hep.23983>

45. $\Gamma\delta$ T cells suppress liver fibrosis via strong cytolysis and enhanced NK cell-mediated cytotoxicity against hepatic stellate cells / M. Liu та ін. *Frontiers in immunology*. 2019. T. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00477>

46. Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of $\gamma\delta$ T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis / L. Hammerich та ін. *Hepatology*. 2013. T. 59, № 2. С. 630–642. URL: <https://doi.org/10.1002/hep.26697>

47. B-cell depletion attenuates serological biomarkers of fibrosis and myofibroblast activation in IgG4-related disease / E. Della-Torre et al. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014. Vol. 74, no. 12. P. 2236–2243. URL: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205799>

48. The role of retinoic acid in tolerance and immunity / J. A. Hall et al. *Immunity*. 2011. Vol. 35, no. 1. P. 13–22. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.002>

49. All-Trans retinoic acid promotes M2 macrophage polarization in vitro by activating the p38mapk/stat6 signaling pathway / Y.-n. Zhu et al. *Immunological investigations*. 2023. P. 1–21. URL: <https://doi.org/10.1080/08820139.2023.2173077>

50. Gombart A. F., Pierre A., Maggini S. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*. 2020. Vol. 12, no. 1. P. 236. URL: <https://doi.org/10.3390/nu12010236>

51. Neutrophils are immune cells preferentially targeted by retinoic acid in elderly subjects / R. Minet-Quinard et al. *Immunity & Ageing*. 2010. Vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/1742-4933-7-10>

52. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells / G. Bakdash et al. *Mucosal immunology*. 2014. Vol. 8, no. 2. P. 265–278. URL: <https://doi.org/10.1038/mi.2014.64>

53. Retinoic acid is essential for th1 cell lineage stability and prevents transition to a th17 cell program / C. C. Brown et al. *Immunity*. 2015. Vol. 42, no. 3. P. 499–511. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.003>

54. Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF- β 1 to enhance the overall IgA response / G.-Y. Seo та ін. *Journal of leukocyte biology*. 2013. T. 94, № 2. С. 325–335. URL: <https://doi.org/10.1189/jlb.0313128>

55. Altamirano-Barrera A., Barranco-Fragoso B., Méndez-Sánchez N. Management strategies for liver fibrosis. *Annals of hepatology*. 2017. Vol. 16, no. 1. P. 48–56.

56. Ahmad R., Ahmad A. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. *Saudi journal of gastroenterology*. 2012. Vol. 18, no. 3. P. 155. URL: <https://doi.org/10.4103/1319-3767.96445>

57. Zhang C.-Y., Liu S., Yang M. Treatment of liver fibrosis: past, current, and future. *World journal of hepatology*. 2023. Vol. 15, no. 6. P. 755–774. URL: <https://doi.org/10.4254/wjh.v15.i6.755>

58. Liver fibrosis: therapeutic targets and advances in drug therapy / Z. Tan et al. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730176>

59. Fluorofenidone affects hepatic stellate cell activation in hepatic fibrosis by targeting the TGF- β 1/Smad and MAPK signaling pathways / Y. Peng та ін. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019. URL: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7548>

60. Schuppan D., Kim Y. O. Evolving therapies for liver fibrosis. *Journal of clinical investigation*. 2013. Vol. 123, no. 5. P. 1887–1901. URL: <https://doi.org/10.1172/jci66028>

61. Hepatic fibrosis: concept to treatment / C. Trautwein et al. *Journal of hepatology*. 2015. Vol. 62, no. 1. P. S15–S24. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.039>

62. Allosteric inhibition of lysyl oxidase–like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment / V. Barry-Hamilton et al. *Nature medicine*. 2010. Vol. 16, no. 9. P. 1009–1017. URL: <https://doi.org/10.1038/nm.2208>

63. Vitamin A-decorated biocompatible micelles for chemogene therapy of liver fibrosis / J.-B. Qiao et al. *Journal of controlled release*. 2018. Vol. 283. P. 113–125. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.032>

64. The effects of TGF- β -induced activation and starvation of vitamin A and palmitic acid on human stem cell-derived hepatic stellate cells / I. Wilhelmssen et al. *Stem cell research & therapy*. 2024. T. 15, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03852-8>

65. Chen G., Weiskirchen S., Weiskirchen R. Vitamin A: too good to be bad?. *Frontiers in pharmacology*. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1186336>

66. Chlorogenic acid from sunflower meal regulates the number of immunocompetent cells in animals with toxic liver fibrosis / A. A. Bozhkov et al. *Clinical nutrition open science*. 2024. Vol. 58. P. 78-94. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2023.12.007>

67. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes / M. I. Muniz-Junqueira et al. *Clinical diagnostic laboratory immunology*. 2003. Vol. 10, no. 6. P. 1096–1102. URL: <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.1096-1102.2003>