

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА
Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

Роль вітаміну А в розвитку стадій фіброзу печінки

Допущено до захисту

«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри

Удальцової Яни Олександрівни

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 2024 р.

Науковий керівник:

д. б. н. професор Божков А. І.

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Ця дипломній роботі досліджується Роль вітаміну А в розвитку стадій фіброзу печінки, акцентуючи на важливості вітаміну А для здоров'я та патології печінки. Робота включає 56 стрінки з 46 джерел. В рамках роботи проведено глибокий огляд наукової літератури, що описує біосинтез, дієтичне поповнення та метаболічні шляхи вітаміну А, з особливим наголосом на його транспортування та зберігання у печінці. Досліджено патологічні зміни у розподілі вітаміну А в тканинах печінки під час розвитку фіброзу, зокрема, як ці зміни впливають на метаболізм та зберігання вітаміну, а також на активність ферментів, наприклад холестерину естерази. Розглядаючи стадії фіброзу, дослідження висвітлює потенціал вітаміну А в модифікації перебігу фіброзу печінки, підкреслюючи його протизапальні властивості та регуляторну роль у метаболізмі колагену та захисті від оксидативного стресу. Використані методології включають аналіз площі клітинних структур та статистичний аналіз, що дозволяє підтвердити теоретичні заяви кількісними даними.

Ключові слова: Вітамін А, фіброз печінки, Си-індукований фіброз, метаболізм печінки, холестерин естераза, дієтичний вітамін А, біосинтез, патологія печінки, активність ферментів, аналіз зображень, статистичний аналіз.

ABSTRACT

This thesis explores the role of vitamin A in the development of the stages of liver fibrosis, emphasizing the importance of vitamin A in liver health and pathology. The work includes 56 pages from 46 sources. An in-depth review of the scientific literature describing the biosynthesis, dietary supplementation and metabolic pathways of vitamin A was conducted, with a special emphasis on its transport and storage in the liver. Pathological changes in the distribution of vitamin A in liver tissues during the development of fibrosis are investigated, in particular, how these changes affect the metabolism and storage of the vitamin, as well as the activity of enzymes, such as cholesterol esterase. By looking at the stages of fibrosis, the study highlights the potential of vitamin A to modify the course of liver fibrosis, emphasising its anti-inflammatory properties and regulatory role in collagen metabolism and protection against oxidative stress. The methodologies used include cellular area analysis and statistical analysis to support the theoretical claims with quantitative data.

Key words: Vitamin A, liver fibrosis, Cu-induced fibrosis, liver metabolism, cholesterol esterase, dietary vitamin A, biosynthesis, liver pathology, enzyme activity, image analysis, statistical analysis.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 СИНТЕЗ ВІТАМІНУ А ТА СПОСОБИ ЙОГО ПОПОВНЕННЯ В ОРГАНІЗМІ.....	8
1.1.1 СИНТЕЗ ПОГЛИНАННЯ ВІТАМІНУ А.....	9
1.1.2 ТРАНСПОРТУВАННЯ ВІТАМІНУ А ДО ПЕЧІНКИ.....	9
1.1.3 ОБМІН ТА ВИВЕДЕННЯ ВІТАМІНУ А.....	10
1.1.4 ПОНОВЛЕННЯ ВІТАМІНУ А.....	10
1.2 ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗПОДІЛУ ПО ТКАНИНАМ ТА ОРГАНАМ ВІТАМІНУ А В НОРМІ.....	11
1.3 ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗПОДІЛУ ВІТАМІНУ А ПО ТКАНИНАХ ТА ОРГАНАХ ПРИ ПАТОЛОГІЯХ ПЕЧІНКИ , ЗОКРЕМА ФІБРОЗУ.....	13
1.3.1 ПОРУШЕННЯ ЗБЕРІГАННЯ ТА РОЗПОДІЛУ ВІТАМІНУ А.....	14
1.3.2 ЗБІЛЬШЕННЯ АКТИВНОСТІ ХОЛЕСТЕРИНУ ЕСТЕРАЗИ.....	14
1.3.3 ВПЛИВ НА ЖОВЧНИЙ МІХУР.....	15
1.3.4 ВПЛИВ НА МЕТАБОЛІЗМ ВІТАМІНУ А.....	15
1.4 ХАРАКТЕРИСТИКА СТАДІЙ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ.....	17
1.4.1 ДІАГНОСТИКА ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ.....	17
1.4.2 СТАДІЇ ФІБРОЗУ.....	19
1.5.2 РЕГУЛІЦІЯ МЕТАБОЛІЗМУ КОЛАГЕНУ.....	24
1.5.3 ЗАХИСТ ВІД ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ.....	25
1.5.4. ПІДТРИМКА ФУНКЦІЇ ГЕПАТОЦИТІВ.....	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	28
2.1 ДИЗАЙН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ.....	28
2.2 МЕТОДИКА ВИДІЛЕННЯ ТКАНИН ПЕЧІНКИ, ПРИГОТУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ.....	29
2.3 СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ.....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	35

3.1 Відношення площі цитоплазми до ядер у контрольній групі тварин	
.....	36
3.2 Відношення площі цитоплазми до ядер у контрольній групі тварин з додаванням вітаміну А	
.....	38
3.3 Відношення площі цитоплазми до площі ядер у тварин з індукованим фіброзом печінки	
.....	40
3.4 Відношення площі цитоплазми до площі ядер у тварин з індукованим фіброзом печінки та додаванням вітаміну А	
.....	43
3.5 Обговорення результатів	45
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50

ВСТУП

Фіброз печінки є серйозним медичним станом, що характеризується надмірним накопиченням екстрацелюлярного матриксу в печінковій тканині, що призводить до порушення її нормальної функції [22] Однією з основних причин розвитку фіброзу є хронічне ураження печінки токсичними речовинами, такими як мідь (Cu), що спричиняє оксидативний стрес та запальні процеси. Розуміння механізмів розвитку фіброзу та можливостей його профілактики і лікування є актуальним завданням сучасної гепатології.

Вітамін А, або ретинол, є важливою біологічно активною речовиною, яка виконує численні функції в організмі, включаючи антиоксидантну дію, підтримку імунної системи, регуляцію росту і диференціації клітин. Відомо, що печінка є основним депо вітаміну А в організмі, де він накопичується у вигляді ретиноїдів у зірчастих клітинах печінки. Зважаючи на це, вивчення тропності вітаміну А до печінки, особливо в умовах патологічних процесів, таких як фіброз, є надзвичайно важливим.

Метою даної роботи є дослідження ролі вітаміну А в розвитку фіброзу печінки. Для цього будуть досліджені зміни морфологічних характеристик печінкової тканини під впливом сернокислої міді та вітаміну А.

Дослідження цієї теми є актуальним, оскільки результати можуть надати нові знання про механізми дії вітаміну А в умовах патологічних процесів у печінці та його потенційне використання в лікуванні та профілактиці фіброзу.

Завдання роботи:

1. Проаналізувати наукову літературу щодо біосинтезу, дієтичного поповнення та метаболічних шляхів вітаміну А, з особливим акцентом на його транспортування та зберігання в печінці.
2. Дослідити морфологічні зміни у тканин печінці у дослідних тварин.

3. Провести аналіз площі клітинних структур та статистичний аналіз для підтвердження теоретичних тверджень кількісними даними.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Синтез вітаміну А та способи його поповнення в організмі

Синтез вітаміну А та його поповнення в організмі людини є складними процесами, які включають багато етапів, від перетворення бета-каротину на ретинол до зберігання та мобілізації ретинолу в печінці [1]. Дієтичні джерела вітаміну А включають готовий ретинол та його естери, а також прекурсори вітаміну А, такі як бета-каротин. Синтез вітаміну А та його поповнення в організмі включають кілька ключових процесів, що починаються з перетворення бета-каротину (про-вітамін А) на ретинол та продовжуються до його зберігання та мобілізації, особливо в печінці.

Перетворення бета-каротину на ретинол: Бета-каротин, отриманий з рослинних продуктів, перетворюється на ретинол у травному тракті за допомогою ферменту бета-каротин-15,15'-діоксигенази (BCO1). Бета-каротин ефективно розщеплюється на дві молекули ретинальдегіду (вітамін А альдегід), який потім може бути зведений до ретинолу [2].

Абсорбція та транспортування ретинолу: Ретинол і ретиніл естери з дієти абсорбуються в кишечнику та інкорпоруються в хіломікрони, які транспортуються до печінки через лімфатичну систему. В печінці ретинол відокремлюється від хіломікронів і зберігається у формі ретиніл естерів у гепатоцитах та зокрема в стеліатних клітинах печінки [3].

Мобілізація ретинолу: При потребі, ретиніл естери гідролізуються назад до ретинолу, який потім секретується з печінки, зв'язаний з ретинол-зв'язувальним білком (RBP), і транспортується до різних тканин[4].

Перетворення ретинолу на ретиноїдну кислоту: Ретинол може окислюватися до ретинальдегіду, а потім до ретиноїдної кислоти (RA), активної форми вітаміну А, яка функціонує як гормоноподібний регулятор вираження генів, впливаючи на ріст клітин, диференціацію та апоптоз [5].

Зберігання вітаміну А: Більшість збереженого вітаміну А в організмі знаходиться у вигляді ретиніл естерів у стелітних клітинах печінки, де він може бути швидко мобілізований у відповідь на потреби організму [6].

Ці процеси тісно регулюються, щоб підтримувати гомеостаз вітаміну А в організмі, запобігаючи як його надлишку.

1.1.1 Синтез поглинання вітаміну А

Поглинання в кишечнику- вітамін А у дієті споживається у формі ретинолу або ретинилестерів (з тваринних продуктів) та бета-каротину (з рослинних продуктів). У тонкому кишечнику ретинилестери гідролізуються ферментами панкреасу до ретинолу. Лецитин:ретинол ацилтрансфераза (LRAT) та інші ферменти можуть потім реестерифікувати ретинол у ретинилестери для зберігання або транспортування [7].

1.1.2 Транспортування вітаміну А до печінки

Після поглинання у кишечнику, ретинол зв'язується з ретинол-зв'язувальним білком (RBP), щоб транспортуватися через кров'яний потік до печінки, де він зберігається у вигляді ретинилестерів. Стелітні клітини в печінці є основним резервуаром цих ретинилестерів, що синтезуються з ретинолу. Ретинол, що надходить до печінки, може бути естерифікований з жирними кислотами за допомогою ферменту лецитин:ретинол ацилтрансфераза (LRAT) або деякими іншими ферментами, утворюючи ретинилестери. Коли організму потрібен вітамін А, ретинилестери гідролізуються назад у ретинол, який знову зв'язується з РБП і транспортується до тканин, де він може бути використаний або перетворений на ретиноїдну кислоту [8].

1.1.3 Обмін та виведення вітаміну А

Після перетворення ретинолу на активну форму - ретиноїдну кислоту (RA), вона діє як регулятор генної експресії. Однак для уникнення накопичення та потенційної токсичності, RA піддається метаболізму за допомогою ферментів сімейства цитохрому P450, таких як CYP26A1, CYP26B1 та CYP26C1. Ці ферменти розкладають RA, утворюючи різноманітні метаболіти з меншою біологічною активністю, такі як 4-оксо-ретиноїдну кислоту та інші гідроксильовані форми, які можуть бути далі метаболізовані або виведені з організму [9].

Деякі метаболіти ретиноїдної кислоти можуть кон'югуватися з глюкуроноювою кислотою для збільшення їхньої розчинності у воді та виведення через нирки. Глюкуроніди цієї кислоти можуть виходити з організму через сечу або жовч [10].

Кишкова мікрофлора може рециркулювати ретиноїдні глюкуроніди, перетворюючи їх на активні ретиноїди. Цей процес сприяє частковій рециркуляції вітаміну А в організмі [11].

1.1.4 Поновлення вітаміну А

Поповнення вітаміну А в організмі може здійснюватися кількома способами. Споживання продуктів, багатих на вітамін А, є найпрямішим. Це включає тваринні джерела, такі як печінка, молочні продукти, риба та яйця, а також рослинні джерела, зокрема овочі та фрукти, що містять бета-каротин. Вживання вітамінних добавок є популярним, особливо для тих, хто має підвищені потреби або обмежену дієту. Фортифікація основних продуктів є ще одним методом, який допомагає уникнути дефіциту вітаміну А в широких верствах населення. Ретиноїди, похідні вітаміну А, також використовуються в медичній практиці для лікування певних захворювань шкіри. Важливо

зауважити, що організм ретельно регулює рівень вітаміну А, щоб забезпечити його оптимальну концентрацію та запобігти токсичності [12].

1.2 Характеристика розподілу по тканинам та органам вітаміну А в нормі

Один з найважливіших аспектів впливу вітаміну А - це підтримка зорової функції. Ретинол і його похідні сприяють утворенню світлочутливого пігменту в очі, який необхідний для перетворення світла в нервовий сигнал, що дозволяє нам бачити. Важливо відзначити, що недостатність вітаміну А може призвести до нічної сліпоти та інших серйозних проблем зором [13].

Печінка відіграє ключову роль у зберіганні та обробці вітаміну А. Вона є основним депо зберігання цього вітаміну в організмі. Ретинол, який поступає з їжі або дієтичних джерел, зберігається у печінці у формі резервів. Під час потреби, коли організм відчуває дефіцит вітаміну А, він може використовувати ці запаси з печінки для задоволення своїх потреб [14].

Ретинол рівномірно розподіляється по різних тканинах та органах організму. Після поглинання з кишечника він транспортується до печінки, де частково зберігається та частково виводиться у кров для подальшого розподілу по всьому тілу. Тканини також активно використовують вітамін А для своїх функцій [15].

Розподіл вітаміну А в нормі відображається в такий спосіб:

Печінка вважається основним місцем зберігання вітаміну А в організмі, і цей процес відбувається через складний механізм. Перш за все, вітамін А може потрапляти до печінки з їжі, яку ми споживаємо. Після того, як вітамін А взаємодіє з жиром у травних шляхах, він засвоюється та перевозиться до печінки через кров'яний потік [16].

У печінці вітамін А зберігається та накопичується для майбутнього використання. Вона функціонує як своєрідний резервуар для цього вітаміну, надаючи можливість організму використовувати його у випадку необхідності.

Печінка здатна зберігати значні обсяги вітаміну А, що дозволяє організму мати постійний доступ до цієї важливої поживної речовини.

Крім того, печінка відіграє активну роль у вивільненні вітаміну А в кров'яний потік, коли це необхідно. Наприклад, коли організм потребує додаткового вітаміну А для забезпечення функціонування очей, імунної системи чи інших органів та систем, печінка може вивільнити запаси цього вітаміну у кров [17].

Ретинол, або вітамін А, може потрапляти до жирової тканини через споживання продуктів, що містять його, або через перенесення через кров'яний потік з печінки або інших органів. Після впровадження в жирову тканину ретинол зберігається у вигляді тригліцеридів, що є основними жирними кислотами, що утворюють жирові клітини.

Ретинол може зберігатися в жирових клітинах у вигляді естерів ретинолу. Ці естери є формою ретинолу, що неактивна та стабільна для зберігання. Вони знаходяться у великих кількостях у жировій тканині як запас вітаміну А для майбутнього використання. Цей процес дозволяє організму зберігати значні обсяги вітаміну А у випадку потреби [18].

У разі потреби організм може вивільнити запаси ретинолу з жирових клітин.

Шкіра. Ретинол потрапляє до шкіри через зовнішнє застосування косметичних засобів або через внутрішнє споживання продуктів харчування, багатих вітаміном А. Після нанесення або засвоєння він може зберігатися у клітинах шкіри, де закріплюється за допомогою специфічних білків-несучок. Накопичування ретинолу в шкірі допомагає забезпечити її здоров'я та регенерацію. Ретинол стимулює вироблення колагену, зменшуючи зовнішні ознаки старіння, такі як зморшки та пігментні плями [19].

Очі. Ретинол відіграє ключову роль у формуванні оптичних пігментів в сітківці очей, таких як родопсин, та утворює їх з вітаміну А та інших

складових. Ці пігменти розташовані в чутливих до світла клітинах сітківки, де вони реагують на світло та генерують електричні сигнали, які передаються до мозку та сприймаються як зорове сприйняття. Ретинол і його активні форми проникають у клітини сітківки очей та вбудовуються в оптичні пігменти, що забезпечує правильну функцію оптичних пігментів та здоров'я клітин сітківки [20].

Дихальна система. Вітамін А накопичується у легенях через кілька ключових механізмів, важливих для здоров'я дихальної системи. Після вживання продуктів, багатих вітаміном А, він абсорбується через кишечник і потрапляє в кровоносну систему, а звідти - до різних тканин і органів, включаючи легені. Після потрапляння в легені вітамін А може взаємодіяти з клітинами слизової оболонки дихальних шляхів та клітинами імунної системи. Крім того, в легенях вітамін А може піддаватися метаболічним процесам, що дозволяють зберегти його або використати за потреби. Ці механізми дозволяють вітаміну А проникати та зберігатися в легенях, де він виконує важливі функції для забезпечення здоров'я дихальної системи [21].

1.3 Характеристика розподілу вітаміну А по тканинах та органах при патологіях печінки , зокрема фіброзу

Фіброз печінки - це патологічний процес, коли надмірна сполучна тканина утворюється в органі. Це призводить до порушення структури та функцій печінки. При фіброзі спостерігаються зміни в архітектурі печінкових клітин, які заміщуються фіброзною тканиною. Цей процес може викликати хронічне запалення, токсичність, алкогольне ураження, вірусні інфекції, цукровий діабет та жирову хворобу печінки. Сполучна тканина, замість здорових тканин, перешкоджає нормальному функціонуванню органу, що може призвести до порушень обміну речовин та інших важливих функцій печінки, а отже, вплинути на здоров'я всього організму.

1.3.1 порушення зберігання та розподілу вітаміну А

При фіброзі печінки порушується нормальне зберігання та розподіл вітаміну А в організмі через низку процесів, що впливають на функціонування печінки.

По-перше, ураження сполучної тканини порушує архітектуру печінки, утруднюючи доступ вітаміну А до клітин та його зберігання.

По-друге, ускладнення функції гепатоцитів, основних клітин печінки, призводить до недостатнього збереження та вивільнення вітаміну А.

По-третє, ускладнення портального кровообігу впливає на транспорт вітаміну А до печінки та його розподіл в організмі.

У цілому, фіброз печінки ускладнює процеси зберігання та розподілу вітаміну А у організмі через порушення функції клітин печінки, зміни в структурі органу та ускладнення кровообігу. Це може вплинути на рівень вітаміну А в організмі та його доступність для інших тканин та органів, що може мати важливі наслідки для здоров'я та функціонування організму в цілому [22].

1.3.2 Збільшення активності холестерину естерази

При фіброзі печінки спостерігається збільшена активність холестерину естерази, яка розщеплює естери холестерину та вітаміну А. Цей процес відбувається через ураження печінки фіброзом, викликаючи зміни в активності ферменту.

Фіброз призводить до порушення структури та функції печінки. Це може вплинути на обробку холестерину та вітаміну А, оскільки фіброз змінює клітинний склад та спричиняє запалення імунної системи. Ураження печінки фіброзом також може змінити мікрооточення, впливаючи на активність ферментів. Внаслідок цих процесів збільшується активність холестерину естерази, яка розщеплює естери холестерину та вітаміну А у печінці. Це може

призвести до зниження рівня естерифікованого вітаміну А у печінці та збільшення концентрації вільного ретинолу у крові [23].

1.3.3 Вплив на жовчний міхур

Жовчовивідні шляхи та жовчний міхур є важливими для системи печінкової екскреції, яка відповідає за вироблення та виведення жовчі, необхідної для емульгування та транспорту жирів та жиророзчинних вітамінів, включаючи вітамін А.

Фіброз сприяє утворенню та зростанню зв'язкової тканини в печінці та навколишніх тканинах, що може призвести до звуження або затовщення стінок жовчного міхура та жовчовивідних шляхів. Це може обмежувати вільний потік жовчі, що спричиняє утворення жовчних каменів або стійке запалення.

Порушення структури та функції жовчовивідних шляхів також може виникнути через фіброз, що призводить до змін в клітинному складі та збільшення зв'язкової тканини. Ці зміни перешкоджають нормальному виділенню жовчі, необхідної для емульгування жирів та поглиблення жиророзчинних вітамінів, включаючи вітамін А.

Ці порушення можуть також призвести до погіршення поглинання жирів та жиророзчинних вітамінів з кишечника, оскільки ускладнене виділення жовчі може утруднити емульгацію жирів, що впливає на поглинання жирів та жиророзчинних вітамінів, включаючи вітамін А [24].

1.3.4 Вплив на метаболізм вітаміну А

Порушення синтезу транспортних білків в печінці, таких як ретинолзв'язувальний білок (RBP) та транстиретинін (TTR), може відбуватися через ускладнення функції печінки, що спричиняється фіброзом. Ці білки відповідають за транспорт вітаміну А до тканин та органів. Порушення синтезу RBP та TTR може призвести до зменшення концентрації вітаміну А в крові.

Недостатня концентрація транспортних білків у крові може також порушити розподіл вітаміну А в організмі. Вітамін А необхідний для різних тканин та органів, включаючи очі, шкіру та імунну систему. Зменшення його концентрації у крові може призвести до недостатнього постачання цього вітаміну для нормальної функції цих органів [11].

Крім того, фіброз може порушити нормальний метаболізм вітаміну А в самій печінці. Печінка є головним місцем зберігання та метаболізму вітаміну А, тому будь-які ускладнення її функції можуть впливати на рівень цього вітаміну в організмі. Порушення метаболізму вітаміну А може призвести до його накопичення в печінці або, навпаки, до зниження його рівня через швидше виведення з організму.

Отже, фіброз печінки створює складні умови для нормального розподілу вітаміну А у організмі. Цей патологічний процес порушує звичайні механізми зберігання, транспортування та метаболізму вітаміну А. Відтак, такі порушення можуть мати значний вплив на здоров'я та функціонування організму людини, оскільки вітамін А відіграє ключову роль у багатьох фізіологічних процесах.

Фіброз печінки спричиняє збільшену навантаження на печінкову тканину, що може призвести до порушень її структури та функції. У разі фіброзу зменшується здатність печінки зберігати та правильно регулювати рівень вітаміну А, що призводить до його нерівномірного розподілу у тканинах та органах. Це може викликати дефіцит вітаміну А в деяких ділянках організму та його надлишок в інших.

Більше того, фіброз печінки може спричинити зміни в метаболізмі жовчних кислот та жовчі, які важливі для емульгації та транспорту жирів та жиророзчинних вітамінів. Порушення цих процесів можуть ускладнити поглинання вітаміну А та інших жиророзчинних речовин з кишечника, спричиняючи їх недостатнє постачання до організму.

Висновок полягає в тому, що фіброз печінки має серйозний вплив на розподіл вітаміну А у організмі, що може призвести до негативних наслідків для здоров'я. Цей патологічний процес викликає порушення в зберіганні, транспортуванні та метаболізмі вітаміну А, що робить його недостатньо доступним для тканин та органів, які залежать від нього для нормальної функції [26].

1.4 Характеристика стадій фіброзу печінки

1.4.1 Діагностика фіброзу печінки

Для діагностики фіброзу печінки використовуються різні спеціальні методи діагностики, зокрема біопсія печінки, діапсія та еластографія печінки [27].

Біопсія печінки: Це хірургічний метод, який полягає у взятті маленького зразка тканини з печінки для подальшого дослідження під мікроскопом. Біопсія дозволяє оцінити ступінь фіброзу, його розподіл та визначити наявність будь-яких інших патологічних змін. Однак цей метод має обмеження, оскільки він інвазивний та може бути пов'язаний з ризиком ускладнень [28].

Еластографія печінки: Цей метод також є неінвазивним і базується на вимірюванні жорсткості печінки, але він використовує спеціальний апарат, який генерує високочастотні звуки для оцінки ступеня фіброзу. Еластографія може бути проведена як за допомогою ультразвукового апарату (контрольована еластографія), так і за допомогою спеціального апарату, який використовується при магнітно-резонансній томографії (MR-еластографія). Цей метод дозволяє швидко та неінвазивно оцінити ступінь фіброзу, є менш травматичним для пацієнта, а також дозволяє контролювати динаміку захворювання.

Анлізи крові є важливим інструментом у визначенні ступеня функціонування печінки та виявленні наявності можливих патологій, таких як

фіброз. Основні показники, які досліджуються в крові для оцінки функції печінки, включають такі:

ALT (Аланінамінотрансфераза): Цей фермент зазвичай присутній в клітинах печінки, і коли вони пошкоджуються, ALT потрапляє в кров. Підвищений рівень ALT може вказувати на наявність ушкоджень печінки, включаючи фіброз [29].

AST (Аспаратамінотрансфераза): Подібно до ALT, AST також є ферментом, який може бути вищим в крові при ушкодженні клітин печінки. І підвищений рівень AST може бути показником наявності фіброзу.

Білірубін: Підвищений рівень білірубіну може свідчити про ушкодження печінки або застою жовчі, що також може бути пов'язане з фіброзом [30].

ALP (Алкалічна фосфатаза): Цей показник також може бути підвищеним при ушкодженні печінки, хоча він менш специфічний, оскільки також може вказувати на проблеми з жовчними шляхами [31].

GGT (Гамма-глутамілтрансфераза): Підвищений рівень GGT також може бути показником ушкодження печінки або жовчних шляхів.

Для точної оцінки стадії фіброзу печінки часто використовують комбінацію цих методів, щоб отримати найбільш об'єктивні результати.

Для діагностики стадій печінки використовують шкали для оцінки фіброзу печінки. Вони ж важливим інструментам для у клінічній практиці для визначення ступеня ураження печінки різними хворобами.

Шкала METAVIR-включає оцінку фіброзу та запалення.

Оцінка фіброзу відбувається на шкалі від F0 до F4, де F0 відповідає відсутності фіброзу, а F4 - цирозу.

Оцінка запалення відбувається на шкалі від A0 до A3, де A0 відповідає відсутності запалення, а A3 - інтенсивному та розповсюдженому запаленню.

Шкала Ishak- оцінює як фіброз, так і запалення, має більш деталізовану систему балів. Оцінка фіброзу відбувається на шкалі від 0 до 6, де 0 відповідає

відсутності фіброзу, а 6 - цирозу. Оцінка запалення відбувається на шкалі від 0 до [32].

1.4.2 Стадії фіброзу

Стадія F0:

У стадії F0, що також відома як "відсутність фіброзу", печінка не має ознак накопичення сполучної тканини. Це означає, що печінкові тканини залишаються здоровими і не піддаються патологічним змінам, пов'язаним з розвитком фіброзу. На практиці, це вказує на те, що печінка не має ознак цирозу або інших захворювань, що характеризуються збільшеним зростанням сполучної тканини.

У цій стадії фіброзу зразок тканини печінки, який може бути отриманий за допомогою біопсії або неінвазивних методів, показуватиме відсутність або мінімальний рівень фіброзу. Це свідчить про те, що печінка здатна виконувати свої функції без перешкод і не потребує лікування фіброзу. Поглинання та метаболізм вітаміну А відбуваються без порушень. Важливо відзначити, що виявлення відсутності фіброзу не означає відсутності інших патологічних процесів у печінці, які можуть виникати з інших причин [33].

Стадія F1:

На стадії F1, яка відома як "мінімальний фіброз", ураження печінки є мінімальним. Зазвичай це означає, що менше 5% печінкової тканини містить сполучну тканину. Таким чином, ураження печінки на цій стадії є незначним, або відсоток ураження може бути надзвичайно низьким. Сполучна тканина може бути локалізована переважно в околопортальних зонах печінки

Патоморфологічно, стадія F1 характеризується відсутністю значних змін у структурі печінкових тканин, однак можна виявити поодинокі ділянки збільшення сполучної тканини в портальних променях.

У більшості випадків пацієнти не відчують симптомів на цій стадії фіброзу, оскільки хвороба зазвичай прогресує без будь-яких специфічних проявів. Зазвичай фіброз не виявляється самостійно і діагностується під час обстежень для визначення стану печінки у зв'язку з іншими патологіями або ризиковими факторами.

Хоча ці зміни ще не суттєво впливають на функціональність гепатоцитів, вони можуть почати знижувати ефективність поглинання вітаміну А. Проте, на цій стадії рівні вітаміну А зазвичай залишаються в межах норми, і клінічних проявів дефіциту немає.

На біопсії печінки на цій стадії можна помітити деякі ознаки мінімального збільшення сполучної тканини в околопортальних зонах, але загальна структура печінки ще залишається в основному незмінною [34].

Діагностика стадії F1 за допомогою неінвазивних методів, таких як діапсія та еластографія печінки, може показати легке збільшення її щільності або еластичності. Однак ці зміни можуть бути дуже слабкими та важко визначити за допомогою неінвазивних методів [28].

Стадія F2:

На стадії F2, відомій як "помірний фіброз", ураження печінки стає більш помітним порівняно зі стадією F1. В цей період від 5% до 30% печінкової тканини містить сполучну тканину.

На цій стадії фіброзні зміни стають більш вираженими, що починає суттєво впливати на функцію гепатоцитів. Гепатоцити поглинають каротиноїди менш ефективно, що призводить до зниження синтезу ретинолу. Зірчасті клітини також починають втрачати здатність зберігати ретинілові ефіри. Хоча клінічні прояви дефіциту вітаміну А можуть бути ще не дуже виражені, поглинання вітаміну А вже знижене.

Морфологічно, на цій стадії можна спостерігати збільшення кількості сполучної тканини у печінці. Патологічний аналіз може показати розподіл змін

у печінці та виявити ознаки фіброзу. Біопсія, діапсія та еластографія можуть виявити збільшення щільності тканини ураженої ділянки печінки, що свідчить про прогресування фіброзу.

Ураження печінки на стадії F2 може виявлятися відчутними симптомами, такими як втомленість, дискомфорт в правому верхньому квадранті черевної порожнини, або легке дискомфорт у ділянці печінки. Проте у багатьох випадках, особливо на ранніх стадіях, симптоми можуть бути мінімальними або відсутніми.

Однак ця стадія є важливою, оскільки вона вказує на прогресування фіброзу та можливий ризик розвитку цирозу печінки. Вчасне виявлення та лікування на цій стадії може допомогти запобігти подальшому ураженню печінки та зберегти її функцію [35].

Стадія F3:

На стадії F3, відомій як "значний фіброз", ураження печінки стає серйознішим і відзначається значним збільшенням кількості сполучної тканини. Морфологічно, ця стадія характеризується появою міжпортальних септ (з'єднуючих порожнини між портальними зонами) та великих вузьких порожнин у печінці. Це вказує на зростання сполучної тканини, яка розділяє та утворює області фіброзу у печінці.

На цій стадії фіброз значно ускладнює структуру печінки, суттєво порушуючи функції гепатоцитів. Поглинання каротиноїдів з їжі та їх перетворення на ретинол значно знижуються. Зірчасті клітини майже повністю втрачають свою здатність зберігати ретинілові ефіри. Як наслідок, рівень вітаміну А в організмі може значно знижуватися, і клінічні прояви дефіциту вітаміну А стають більш очевидними

Патологічне дослідження може виявити, що від 30% до 50% печінкової тканини містить сполучну тканину. Це означає, що більша частина печінки стає

постійно враженою та постраждалими зонами заміщується сполучною тканиною.

Клінічно ця стадія може супроводжуватися погіршенням загального самопочуття, втратою апетиту, важкістю в правому верхньому квадранті черевної порожнини та іншими симптомами печінкової недостатності. Під час пальпації печінки може відчуватися збільшення її розміру, а у деяких випадках може спостерігатися відхилення з підвищенням її щільності.

Для визначення стадії фіброзу печінки F3, використовують різні методи діагностики, включаючи біопсію, діапсію та еластографію. Біопсія дозволяє отримати тканинний зразок з печінки для подальшого патологічного аналізу, де можна виявити ознаки значного фіброзу. Діапсія та еластографія вимірюють щільність тканини печінки, що допомагає оцінити ступінь ураження печінки сполучною тканиною та визначити стадію фіброзу [36].

Стадія F4:

Стадія F4, відома як цироз печінки, є найбільш важкою та розповсюдженою формою фіброзу печінки. В цьому стані печінкова тканина перетворюється на сполучну тканину, утворюючи шрами та фіброзні вузли в усій печінці [37].

Ця стадія характеризується серйозним порушенням функції печінки, оскільки сполучна тканина не може виконувати всі необхідні функції замість здорової печінки. Це може призвести до портальної гіпертензії - підвищення тиску у венах печінки, а також розвитку печінкової недостатності.

Функція печінки значно порушена, а гепатоцити майже повністю втрачають здатність поглинати каротиноїди та перетворювати їх на ретинол. Зірчасті клітини не можуть зберігати ретинілові ефіри, що призводить до значного дефіциту вітаміну А. Клінічні прояви дефіциту, такі як порушення зору, сухість шкіри та зниження імунітету, стають дуже вираженими, вимагаючи медичного втручання.

Діагноз стадії F4 фіброзу зазвичай встановлюється за допомогою біопсії печінки, де виявляється значна кількість сполучної тканини та фіброзних змін. Також, еластографія та діапсія можуть бути використані для вимірювання щільності печінки, що може допомогти в оцінці ступеня фіброзу.

В печінці пацієнта з цирозом можна побачити різні ознаки змін, такі як зменшення розміру печінки, наявність фіброзних вузлів та шрамів під мікроскопом під час біопсії, а також зміни у щільності тканини, виявлені за допомогою еластографії та діапсії [38].

1.4.3 Поширеність кожної стадії

Кожна стадія фіброзу печінки має свою власну поширеність та характеристики:

F0 (відсутній фіброз):

Поширеність: Відсутність фіброзу або мінімальні показники, що не виявляються за стандартними методами діагностики.

F1 (фіброз 1 стадії):

Поширеність: Фіброз зазвичай локалізується у верхній частині печінки. За стандартними діагностичними методами, такими як біопсія, можна виявити легкі показники фіброзу. [33]

F2 (фіброз 2 стадії):

Поширеність: Фіброз розповсюджується у більшій частині печінки. Зміни фіброзу стають помітнішими, але все ще можуть бути легко узагальнені [37].

F3 (фіброз 3 стадії)

Поширеність: Фіброз поширюється на значну частину печінки. Вже відбуваються серйозні зміни в тканині, і фіброз стає більш концентрованим та щільним.[36]

F4 (цироз печінки):

Поширеність: Вся печінка або майже вся печінка зайнята сполучною тканиною та фіброзними вузлами. Цироз є останньою стадією фіброзу печінки і характеризується серйозними змінами в архітектурі та функції органу. [37]

1.5 Роль вітаміну А у можливостях зміни перебігу фіброза печінки

1.5.1 Протизапальний ефект

Протизапальний вплив вітаміну А в основному забезпечується через взаємодію з різними клітинами та молекулами, що відповідають за запалення [37]. Основні механізми його дії включають модуляцію виразності цитокінів, таких як TNF- α і IL, які відіграють ключову роль у запаленні. Вітамін А може зменшувати їхню виробленість, що призводить до зниження запалення.

Також він впливає на імунну відповідь, регулюючи активність клітин імунної системи, щоб запобігти надмірній імунній реакції та запаленню. Крім того, вітамін А є потужним антиоксидантом, який допомагає захистити клітини від ушкоджень, спричинених вільними радикалами та оксидативним стресом [38].

Зменшення запалення сприяє зниженню утворення сполучної тканини, основної складової фіброзу [39]. Таким чином, вітамін А сповільнює процес утворення фіброзу та зменшує ризик прогресування хвороби, що дозволяє печінці краще відновлюватися та зберігати свою функцію.

1.5.2 Регуляція метаболізму колагену

Регуляція метаболізму колагену є важливим аспектом в печінці, оскільки колаген є основним компонентом сполучної тканини, яка утворює фіброзні зміни. Вітамін А впливає на цей процес шляхом регулювання синтезу та руйнування колагену. Він може також знижувати активність фібробластів,

клітин, що виробляють колаген, та зменшувати надмірну депонування колагену в тканинах [40].

1.5.3 Захист від оксидативного стресу

Захист від оксидативного стресу - це механізм, що спрямований на захист клітин від ушкоджень, що викликаються вільними радикалами та оксидативними реакціями. Оксидативний стрес може бути наслідком різних факторів, таких як забруднене повітря, ураження вірусами або токсинами, а також погані звички життя, такі як куріння або неправильне харчування.

Вітамін А є потужним антиоксидантом, що може захищати клітини печінки від ушкоджень, спричинених вільними радикалами. Він нейтралізує окислювальні процеси, які можуть пошкодити клітинні мембрани, білки та інші молекули. Крім того, вітамін А впливає на вираз генів, що кодують антиоксидантні ферменти, такі як супероксиддисмутаза та каталаза, що додатково підвищує захисні властивості клітин.

Цей процес захисту від оксидативного стресу допомагає знизити ризик пошкодження печінкових клітин та подальшого розвитку фіброзу[94]. Шляхом забезпечення клітин оптимальним рівнем захисних антиоксидантів, таких як вітамін А, можна покращити їхню стійкість до стресових впливів та попередити негативні наслідки для здоров'я печінки [41].

1.5.4. Підтримка функції гепатоцитів

Вітамін А грає ключову роль у підтримці функції гепатоцитів, що є основними клітинами печінки. Гепатоцити виконують багато важливих функцій, таких як метаболізм речовин, детоксикація організму, синтез білків та жирів, а також вироблення жовчі. Вітамін А допомагає забезпечити нормальне функціонування цих клітин і забезпечує їхню захищеність від стресових факторів [41].

Основні механізми, за допомогою яких вітамін А впливає на гепатоцити:

Антиоксидантні властивості: Вітамін А є потужним антиоксидантом, який допомагає захищати гепатоцити від окислювальних пошкоджень, спричинених вільними радикалами та оксидативним стресом. Це допомагає зберегти структурну цілісність клітин та підтримує їхню життєздатність [40].

Регуляція генетичного виразу: Вітамін А впливає на різноманітні генетичні процеси в гепатоцитах, включаючи вираз генів, що контролюють різні аспекти їхньої функції. Це може включати активацію генів, що стимулюють регенерацію клітин та підтримують їхню відновлювальну потенцію [41].

Забезпечення структурних компонентів: Вітамін А є важливим компонентом багатьох клітинних структур, включаючи мембрани клітин та ядра. Це допомагає забезпечити стійкість та нормальне функціонування гепатоцитів [40].

Підтримка вироблення жовчі: Гепатоцити відповідають за вироблення жовчі, яка є важливою для підтримки процесів травлення та виведення токсинів з організму. Вітамін А може сприяти нормальному функціонуванню цього процесу, забезпечуючи оптимальну роботу гепатоцитів [24].

Вітамін А відіграє важливу роль у можливостях зміни перебігу фіброзу печінки, виявляючи багатогранний вплив на процеси, що відбуваються в організмі [38]. Його протизапальні властивості сприяють зниженню запалення в печінці, що є ключовим чинником у формуванні фіброзу. Вітамін А також допомагає захищати клітини печінки від оксидативного стресу та подальших ушкоджень, зберігаючи їхню функціональність і сприяючи їхній регенерації.

Крім того, вітамін А впливає на процеси синтезу та розкладання колагену, ключового компонента сполучної тканини, що утворює фіброз. Це дозволяє контролювати швидкість утворення сполучної тканини в печінці та попереджати її надмірну накопичення. Оптимальний рівень вітаміну А сприяє

збереженню структурної цілісності печінки і перешкоджає її переходу до більш серйозних станів, таких як цироз.

Таким чином, вітамін А відіграє важливу роль у зміні перебігу фіброзу печінки, забезпечуючи захист від запалення та оксидативного стресу, регулюючи синтез сполучної тканини та підтримуючи функцію та регенерацію гепатоцитів. Його належне використання може сприяти покращенню умов життя хворих на печінкові захворювання та зменшенню ризику ускладнень.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Дизайн експериментального дослідження

Для проведення дослідження впливу вітаміну А на Cu-індукований фіброз печінки використовували здорових трьох місячних (150–175 г) пацюків – самців лінії *Wistar*, віварію науково дослідного інституту Біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Тварини утримувалися за стандартних умов віварію з вільним доступом до їжі та води. Усі маніпуляції проводили згідно з біоетичним комітетом Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, що керується положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986) [42].

Напередодні завершення експерименту тварини були позбавлені корму протягом 12 годин.

Схема експериментальних введень досліджуваним групам тварин була наступною:

1. Група Інтакт (Контроль): Тварини отримували відповідні дози фізичного розчину або олії (оливкової).

2. Група Вітаміну А (Експеримент): Тварини отримували чотири дні масляний розчин ретинолу ацетату (0,1 мг/100 г маси тіла) *per os*.

3. Група 1 Цикл (Контроль/Вітамін А): Тварини отримували внутрішньочеревні три введення сірчаноокислої міді в дозі 1 г/100г маси тіла з інтервалом 48 годин, після чого чотири дні отримували або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату *per os* (0,1 мг/100 г маси тіла).

4. Група 2 Цикли (Контроль/Вітамін А): Тварини отримували подібно до попередньої групи, але здійснювали два цикли введення сірчаноокислої міді.

5. Група 2 Цикли + CCl₄ (Контроль/Вітамін А): Тварини отримували два цикли введення сірчаноокислої міді, між якими вводили масляний розчин CCl₄

per os (0,1 мл/100 г маси тіла), після чого чотири дні отримували або олію (контроль), або масляний розчин ретинолу ацетату per os (0,1 мг/100 г маси тіла).

Експерименти включали два цикли введення: перший цикл передбачав введення вітаміну А або інших речовин за різними графіками впродовж 10 днів, другий цикл - продовження введення цих речовин зі зміною дозування впродовж 16 днів. Зміни стану тварин фіксувались на вказані дати для виявлення можливих ефектів введених речовин.

Індукція фіброзу печінки здійснювалася шляхом внутрішньочеревних ін'єкцій сульфату міді тричі з інтервалом у 48 годин для експериментальної групи [46]. Контрольна група отримувала фізіологічний розчин. Після завершення експерименту тварин декапітували під ефірною анестезією, після чого відбирали зразки печінки для подальших гістологічних і біохімічних досліджень. Імуногістохімічне забарвлення секцій проводилося за допомогою стандартних методів для оцінки морфологічних змін та виявлення специфічних біомаркерів фіброзу.

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

2.2 Методика виділення тканин печінки, приготування гістологічних препаратів.

Для гістологічного дослідження брали фрагменти печінки та фіксували їх у 10% розчині формаліну. Зразки обробляли, як описано в роботі [43]. Після однодобової фіксації шматочків печінки в 10% формаліні проводили зневоднення зразків за допомогою етилового спирту. Для цього зразки переносили в етиловий спирт зі зростаючою концентрацією (від 70% до 96%) і витримували по 12 годин у кожній із концентрацій. Після цього зразки переносили на 1-3 години в ксилол, потім на 2-3 години в рідкий парафін до

57°C. Готували напівтонкі зрізи на мікротомі і зразки забарвлювали гематоксиліном-еозином. Мікроскопія: microscope Carl Zeiss, камера SIGETA M3CVOS 14000, збільшення 400. Мікротомом вирізані з фіксованого матеріалу шматочки, у вигляді тонких пластинок завтовшки 2-4 мкм і площею 1-2 см, промиті та злегка просушені на фільтрованому папері, поміщали у 4 порції ізопропілового спирту на 1 годину в кожен порцію; після цього шматочки переносили на 1 годину в один із розчинників, після чого поміщали в розплавлений, нагрітий у термостаті до 57°C парафін, 2 порції по 1 годині в кожній. Після цього зразки забарвлювали гематоксиліном – еозином і мікроскопіювали. Зразки біопсії печінки зчитувалися методом сліпого експерименту: під кодовою ідентифікацією зразка, тобто без деталей послідовності біопсії та без зміни виконавця. Всі біоптати були довжиною не менше 15 мм і мали відповідну кількість порталних трактів для оцінки гістологічних особливостей та постановки діагнозу [44]. Гістологічні особливості були інтерпретували за схемою, описаною Brunt et al. [45].

Аналіз зображень: отримані зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення, що дозволяло кількісно оцінити морфометричні параметри змін у тканин. Для аналізу зображень використовувалося програмне забезпечення Fiji, розроблене як розширення платформи ImageJ, спеціалізоване на обробці та аналізі наукових зображень. Ось детальний опис кроків аналізу:

Імпорт зображень: Зображення імпортувались у Fiji через опцію 'File' -> 'Open'. Всі зображення були попередньо перетворені у формат TIFF для забезпечення високої якості та сумісності.

Налаштування яскравості та контрасту: Для кожного зображення налаштування яскравості та контрасту коригувалися вручну через 'Image' -> 'Adjust' -> 'Brightness/Contrast', щоб забезпечити оптимальне візуальне відображення структур.

Сегментація ядер клітин: Використання інструменту 'Threshold' дозволяло виділити найтемніші області, які відповідають ядрам клітин. Вибір правильного порогу був критичним для точності подальшого аналізу. Після налаштування порогу, області, що відповідають ядрам, аналізувалися на предмет їх площі за допомогою 'Analyze' -> 'Analyze Particles', що дозволяло отримати статистичні дані про кількість та розмір ядер.

Аналіз міжклітинного простору у тканинах: Так само, для визначення світлих областей, які відповідають пустотам, застосовувався той самий інструмент 'Threshold'. Відмінності у порозі дозволяли виділити ці області та аналізувати їх окремо.

Вимірювання загальної площі поля зору: За допомогою 'Analyze' -> 'Measure', вимірювалася загальна площа кожного зображення, що включала ядра, цитоплазму та пустоти.

Розрахунок площі цитоплазми: Площа цитоплазми обраховувалась як різниця між загальною площею поля зору та сумою площ ядер. Це дозволяло отримати точні дані про просторову організацію цитоплазматичних компонентів у клітинах (рис.2.2.1).

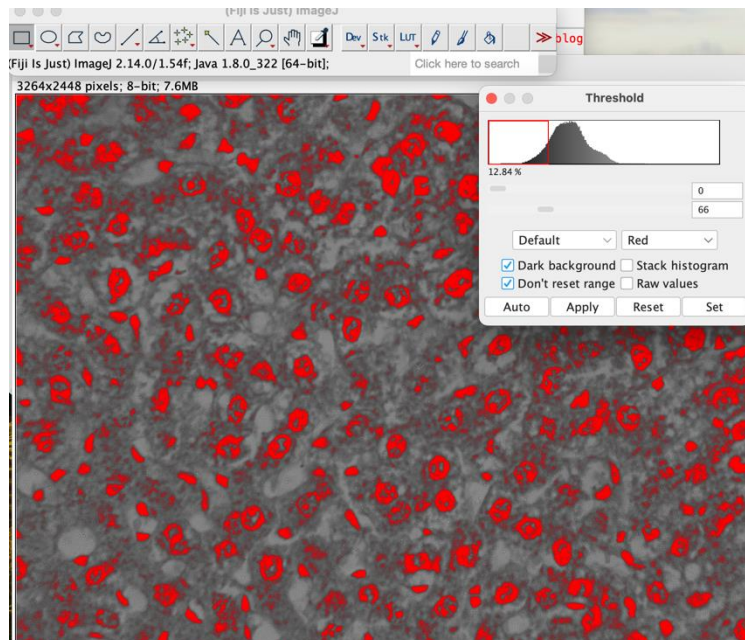


Рис.2.2.1 Процес сегментації ядер клітин за допомогою інструменту 'Threshold' у програмному забезпеченні Fiji.

Вибір порогу дозволяє виділити області, що відповідають ядрам клітин (позначені червоним кольором), для подальшого аналізу їх площі. Налаштування яскравості та контрасту були налаштовані вручну для забезпечення оптимального візуального відображення структур.

2.3 Статистичний аналіз

З цих вимірювань площі цитоплазми та ядер вибирались дані про площу цитоплазми (C) та площу ядра (N), і ці дані використовувались для подальшого розрахунку співвідношення за цієї формули:

$$\text{Співвідношення} = \frac{C}{N}, \quad (2.1)$$

де C- цитоплазма, N-ядро.

В Excel, після того як дані були імпортовані, для кожного рядка де були зазначені площі C та N, співвідношення C/N розраховувалося за допомогою формули введеної у комірку: =C2/N2, де C2 і N2 — комірки з площами цитоплазми та ядра відповідно. Це співвідношення дало змогу оцінити відносний розмір цитоплазми до ядра в кожній клітині.

Для обчислення середнього значення всіх розрахованих співвідношень C/N, використовувалася функція AVERAGE. Типово це робиться вставлянням формули =AVERAGE(D2:D100) у нову комірку, де D2

— це діапазон комірок, що містить індивідуальні значення співвідношень. Це дозволило зробити кількісні висновки про тенденції у відносному розмірі цитоплазми по відношенню до ядра вивчених клітин, які були важливі для подальшого аналізу результатів дослідження.

Для обчислення стандартної середньої похибки використовувалось ця функція де стандартне відхилення було поділено на корінь із n:

$$SE_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2.2)$$

де SE- стандартна середня похибка

σ - величина середньоквадратичного відхилення

n- об'єм вибірки

Процес обчислювання у Excel включав такі кроки:

1.Обчислення стандартного відхилення вибірки (s): Перш за все, стандартне відхилення для співвідношень C/N було обчислене за допомогою функції STDEV.S в Excel. Ця функція застосовувалася до діапазону комірок, який містив усі значення співвідношень для клітин. Наприклад, якщо співвідношення C/N були в колонці D, від D2 до D100, формула виглядала так: =STDEV.S(D2:D100)

Це обчислення дало стандартне відхилення серед значень співвідношення.

2. Визначення кількості спостережень (n): Кількість спостережень, які входили до вибірки, було обчислено за допомогою функції COUNT. Ця функція просто підраховувала кількість комірок у вказаному діапазоні, що містили дані: =COUNT(D2:D100)

3. Обчислення стандартної похибки середнього (SEM): Знаючи стандартне відхилення та кількість спостережень, було обчислено SEM за формулою . Для цього стандартне відхилення введено в одну комірку, наприклад E1, а кількість спостережень — в комірку F1. SEM тоді обчислювалась так: =E1/SQRT(F1)

Для відображення результатів були представлені у вигляді гістограми з середніми значеннями та стандартними помилками для кожної групи. Статистично значущі відмінності ($p < 0.05$) між групами були позначені зірочкою (*), що вказує на значущість різниць порівняно з контрольною групою або між експериментальними групами.

Цей підхід дозволив оцінити, наскільки середнє значення вашої вибірки співвідношень C/N може відрізнятися від істинного середнього значення генеральної сукупності, що є ключовим для статистичного аналізу у наукових дослідженнях.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В даному розділі представлені результати дослідження морфологічних змін тканини печінки на різних стадіях формування Cu-індукованого фіброзу. Дослідження проводилося на чотирьох експериментальних групах: 1) Контрольна група

2) Контрольна група з додаванням вітаміну А,

3) Група, яка отримала два цикли впливу CuSO_4 та CCl_4 ,

4) Група з аналогічним токсичним впливом та додаванням вітаміну А.

Основним показником для оцінки впливу було співвідношення площі цитоплазми до площі ядер (C/N), яке дозволяє оцінити проліферативний потенціал клітин печінки.

Співвідношення C/N є важливим морфометричним параметром, який відображає структурні зміни у клітинах та їх функціональний стан. Високі значення C/N вказують на низький проліферативний потенціал клітин, що характерно для зрілих, диференційованих клітин. Навпаки, низькі значення C/N свідчать про високий проліферативний потенціал, що може бути ознакою регенеративних процесів або патологічних станів, таких як фіброз та передракові стани.

Печінка є основним органом депонування вітаміну А в організмі, де він накопичується у зірчастих клітинах у вигляді ретиноїдів. Відомо, що вітамін А має важливі антиоксидантні властивості та відіграє значну роль у регуляції росту і диференціації клітин. Тому вивчення впливу вітаміну А на клітини печінки, особливо в умовах токсичного впливу та фіброзу, є важливим для розуміння його потенційної терапевтичної ролі.

Дослідження показує, як вплив вітаміну А може змінити морфометричні показники клітин печінки на різних стадіях фіброзу, викликаного токсичним впливом CuSO_4 та CCl_4 .

Порівняння груп дозволяє оцінити захисний ефект вітаміну А та його здатність впливати на проліферативний потенціал клітин у контексті патологічного процесу. Отримані дані можуть мати важливе значення для розробки нових терапевтичних підходів у лікуванні фіброзу печінки та інших захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом і запальними процесами.

3.1 Відношення площі цитоплазми до ядер у контрольній групі тварин

Зображення 1 та 1.1 - Мікроскопічні знімки з різних частин печінки одного тварини з контрольної групи, які фокусуються на цитоплазмі клітин. Ці зображення дозволяють оцінити варіативність морфологічних характеристик цитоплазми в різних регіонах печінки.

Зображення 2 та 2.1 - Аналогічно, ці знімки демонструють іншу пару зразків від того ж тварини, з таким самим фокусом на цитоплазмі, дозволяючи порівняти структурні особливості з першою парою.

Зображення 3 та 3.1 - Ці зображення продовжують тему з відображенням цитоплазми клітин, але з іншого тварини, допомагаючи в аналізі консистенції клітинної структури серед різних особин.

Зображення 4 та 4.1 - Представляють зразки, які можуть виявити мікроскопічні зміни під впливом досліджуваних умов, ілюструючи різноманітність в структурі та розміщенні цитоплазми в печінці.

Зображення 5 та 5.1 - Остання пара знімків знову показує різні частини печінки одного тварини, фокусуючись на деталях цитоплазми, що дозволяє оцінити ефект досліджуваних варіаблів на клітинний рівень. (Рис.3.1.1.)

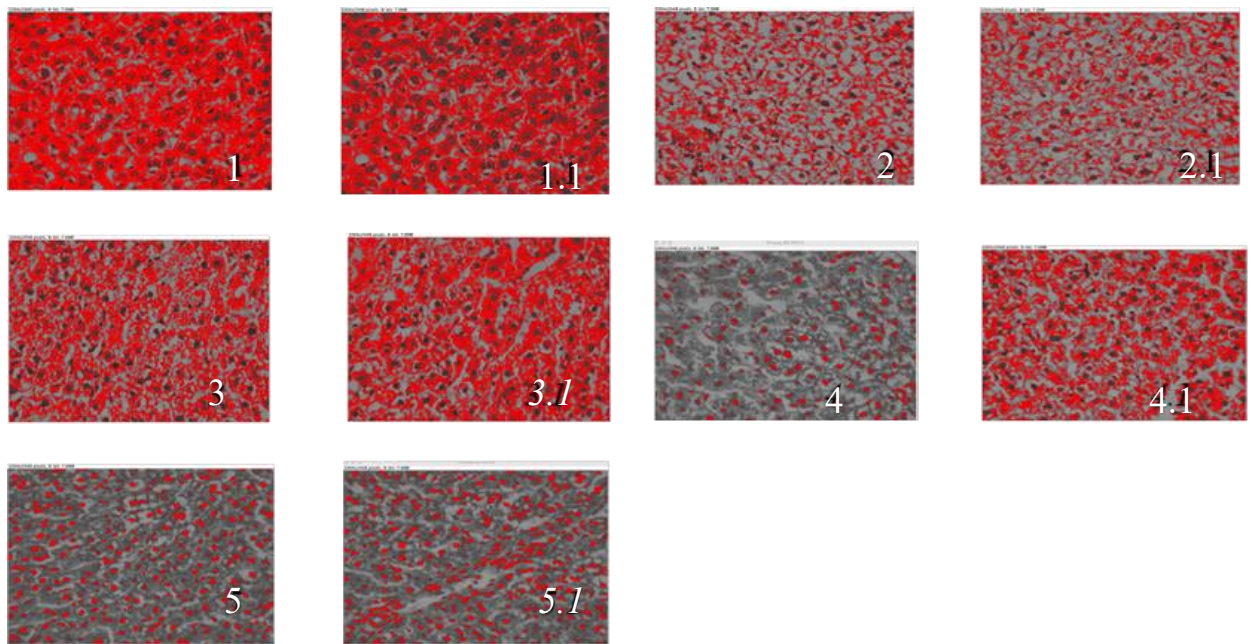


Рис. 3.1.1 Гістологічні препарати печінки тварин контрольної групи з відображенням площі цитоплазми (1 – 3.1) та відображенням площі ядер (4 – 5.1)

Представлені дані площі цитоплазми (C) та ядер (N) для контрольної групи тварин. Основний показник — відношення C/N , що варіюється від 3,55 до 12,37, демонструє природну гетерогенність клітин печінки. Значення C/N підкреслює наявність значних відмінностей у пропорціях цитоплазми до ядер серед зразків, що може свідчити про різні фізіологічні стани клітин. Загальне середнє C/N становить 9,2 вказуючи на більшу площу цитоплазми у порівнянні з ядром, що є індикатором стабільності та здоров'я клітин. Ці дані корисні для подальшого порівняння з експериментальними групами, які отримували вітамін А, аби оцінити його вплив на клітинну структуру печінки(Табл. 3.1.1).

Табл. 3.1.1

Площі цитоплазми (С), ядер (N), відношення цитоплазми до ядер (С/Н) та середнє значення у пікселях контрольної групи тварин

Контроль				
№	С (площа цитоплазми)	N (площа ядер)	С/Н (відношення площі)	Середнє значення(СЗ) та стандартна похибка(СП)
1	4540647,00	629700,00	7,21	СЗ=9,20 СП=2,62
1,1	3857449,00	712595,00	5,41	
2	4120998,00	160827,00	25,62	
2,1	1799460,00	267890,00	6,72	
4	3348266,00	681358,00	4,91	
4,1	2974254,00	838128,00	3,55	
5	2441922,00	312300,00	7,82	
5,1	4692007,00	379384,00	12,37	

3.2 Відношення площі цитоплазми до ядер у контрольній групі тварин з додаванням вітаміну А

Зображення 6 та 6.1 - Мікроскопічні знімки печінки тварини з контрольної групи, яка отримувала вітамін А. Зображення 6 акцентує на цитоплазмі клітин, а зображення 6.1 – на ядрах тих же клітин, демонструючи варіації в структурі клітинних компонентів.

Зображення 7 та 7.1 - Ці зображення відображають відмінності у величині та формі ядер серед клітин печінки, що також отримували вітамін А, з візуальним порівнянням як впливає вітамін на клітинні ядра.

Зображення 8 та 8.1 - Подібно попереднім, ці знімки печінки від однієї тварини відображають як цитоплазму, так і ядра, дозволяючи оцінити морфологічні зміни внаслідок впливу досліджуваної дієти.

Зображення 9 та 9.1 - Ілюструють додаткові мікроскопічні знімки, які вказують на зміни у цитоплазмі та ядрах, надаючи можливість порівняти структурну консистенцію та аномалії.

Зображення 10 та 10.1 - Остання пара знімків показує інші частини печінки з яскраво вираженими структурними змінами, де можна помітити різницю між розмірами та формами ядер та цитоплазми. (Рис. 3.2.1)

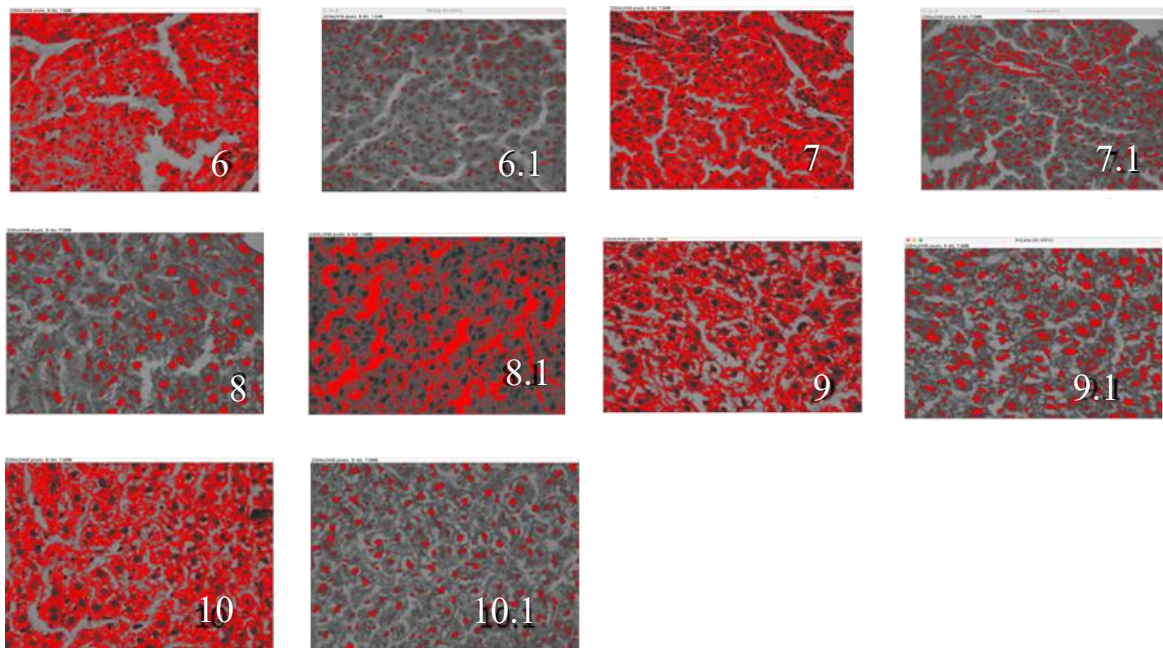


Рис. 3.2.1 Гістологічні препарати печінки тварин контрольної групи з додаванням вітаміну А у дозі 300 МЕ/100 г маси тіла. Червоним виділено: цитоплазму(6,7,8.1,9,10,ядра (6.1,7.1,8,9.1,10.1)

Порівняльна характеристика з попередніми результатами: результати демонструють кількісний аналіз площ цитоплазми (С) та ядер (N) для кожного з зображених зразків, де кожен рядок відповідає парним зображенням. Показники відношення цитоплазми до ядер (C/N) для кожного зразка ілюструють як збільшення, так і зменшення цього відношення, що свідчить про зміни у клітинній структурі після додавання вітаміну А. Середнє значення (C/N) для всіх зразків становить 7,78, що може вказувати на статистично

значущі зміни у клітинній структурі у порівнянні з попередніми умовами експерименту (Табл.3.2.1).

Табл.3.2.1

Площі цитоплазми (С), ядер (N), відношення цитоплазми до ядер (C/N) та середнє значення у пікселях контрольної групи тварин з додаванням вітаміну

А у дозі 1,5 г на 100 г маси тіла.

Контроль + Віт А				
№	С (площа цитоплазми)	N (площа ядер)	C/N (відношення площі)	Середнє значення(СЗ) та стандратна похибка(СП)
6	3398944,00	343840,00	9,89	СЗ=7,86 СП=1,38
6,1	3355173,00	253819,00	13,22	
7	3464574,00	771396,00	4,49	
7,1	3355173,00	253819,00	13,22	
8	4445621,00	624502,00	7,12	
8,1	2952506,00	843451,00	3,50	
9	2599571,00	763994,00	3,40	
9,1	4555583,00	950555,00	4,79	
10	4944604,00	553091,00	8,94	
10,1	3810184,00	378130,00	10,08	

3.3 Відношення площі цитоплазми до площі ядер у тварин з індукованим фіброзом печінки

Зображення 11 та 11.1 - Демонструють мікроскопічні знімки печінки тварин з індукованим фіброзом. Зображення 11 акцентує увагу на загальному розташуванні та структурі цитоплазми, тоді як зображення 11.1 зосереджено на детальному відображенні ядер.

Зображення 12 та 12.1 - Ці знімки показують подібні характеристики з іншої частини печінки тієї ж тварини, надаючи можливість оцінити узгодженість морфологічних змін між різними зонами.

Зображення 13 та 13.1 - Відображають виразні зміни у цитоплазмі та ядрах, ілюструючи адаптацію клітин до впливу фіброзоіндукуючих агентів, з чітким акцентом на патологічні зміни.

Зображення 14 та 14.1 - Продовжують серію з показом різниці в морфології між цитоплазмою та ядрами, де зображення 14.1 допомагає виділити відмінності у розмірах та формах ядер порівняно з цитоплазмою.

Зображення 15 та 15.1 - Надають детальний погляд на значні зміни в структурі цитоплазми та ядер, особливо відзначаючи різке збільшення в площі цитоплазми в порівнянні з ядрами, що може вказувати на сильну реакцію клітин на токсичне навантаження.

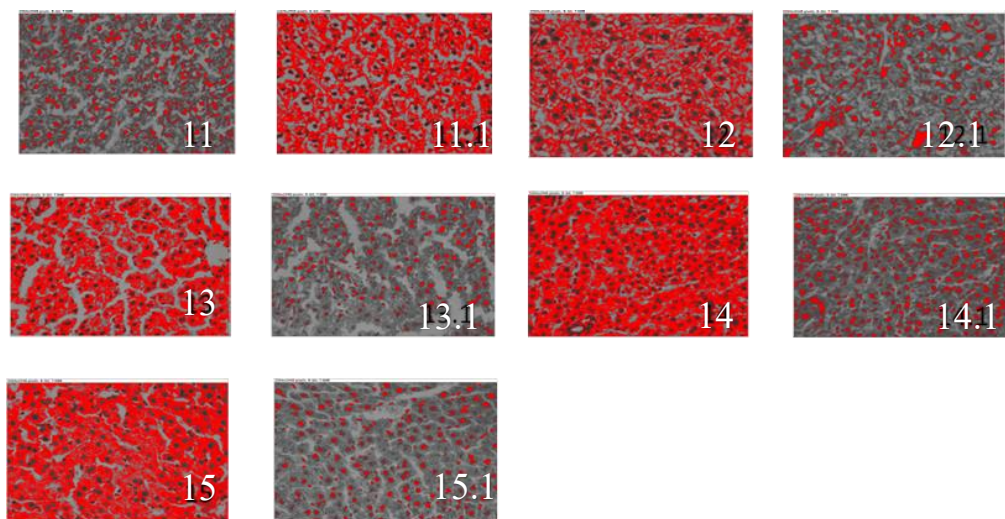


Рис. 3.3.1 Гістологічні препарати печінки тварин з індукованим фіброзом печінки. Червоним кольором виділено: цитоплазму(11.1,12,13,14,15), ядра (11,12.1,13.1,14.1,15.1)

Результати надають кількісний аналіз площ цитоплазми (С) та ядер (N) для кожного зразка згаданого на рисунку, підкреслюючи відношення цих двох компонентів (C/N). Особливу увагу привертає велике відношення у зразка 15 (18,21) і 15.1 (8,21), що свідчить про значне збільшення площі цитоплазми у порівнянні з ядрами, що може вказувати на серйозні патологічні зміни або на адаптаційні реакції клітин у відповідь на індукування фіброзу.

Середнє значення C/N для всіх зразків становить 6,06, підкреслюючи тенденцію до збільшення цитоплазматичного компонента у клітинах. Це може свідчити про реакцію клітин на токсичне навантаження або про зміни в метаболічній активності клітин внаслідок лікування чи експериментальних умов (Табл.3.3.1)

Табл.3.3.1

Значення площі цитоплазми (С), ядер (N), відношення цитоплазми до ядер (C/N) та середнє значення у пікселях тварин з **індукованим фіброзом печінки**

2 цикли CuSO₄ + CCl₄				
№	С (площа цитоплазми)	N (площа ядер)	C/N (відношення площі)	Середнє значення(СЗ) та стандартна похибка(СП)
11	4944604,00	742668,00	6,66	СЗ=6,06 СП=0,48
11,1	3810184,00	678541,00	5,62	
12	2861413,00	534083,00	5,36	
12,1	2861413,00	534083,00	5,36	
13	3613102,00	542482,00	6,66	
13,1	3240677,00	398750,00	8,13	

14	4716405,00	946336,00	4,98	
14,1	4863698,00	845793,00	5,75	
15	5962503,00	327455,00	18,21	
15,1	3652478,00	445023,00	8,21	

3.4 Відношення площі цитоплазми до площі ядер у тварин з індукованим фіброзом печінки та додаванням вітаміну А

Зображення 16 та 16.1 - Показують мікроскопічні знімки печінки тварин, які отримували вітамін А на тлі індукції фіброзу. Зображення 16 демонструє загальний вигляд клітин з акцентом на цитоплазму, тоді як 16.1 зосереджено на структурах ядер.

Зображення 17 та 17.1 - Ілюструють зразки інших тварин із зазначеної групи, де 17 відображає цитоплазматичні характеристики, а 17.1 – деталі ядерних структур, надаючи інформацію про можливі варіації відповіді клітин на лікування.

Зображення 18 та 18.1 - Продовжують низку з аналізу впливу фіброзу і вітаміну А, з особливим фокусом на відмінності в цитоплазмі (18) та ядрах (18.1), вказуючи на значні морфологічні зміни у цих клітинах.

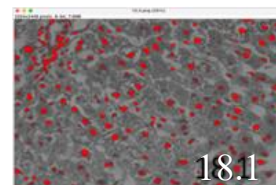
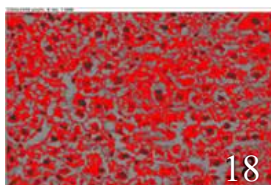
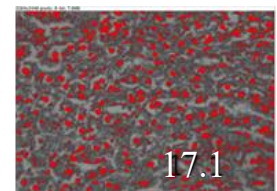
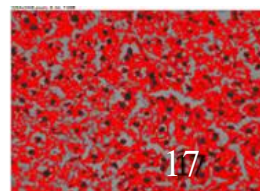
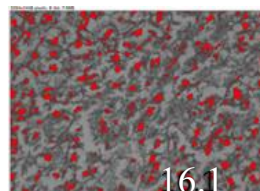
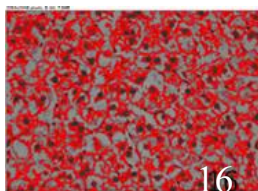


Рис. 3.4.1 Гістологічні препарати печінки тварин з індукованим фіброзом печінки та додаванням вітаміну А. Червоним кольором виділено: цитоплазму(16, 17, 18), ядра (16.1, 17.1, 18.1)

Результати надають кількісні дані про площу цитоплазми (С) та ядер (N), а також співвідношення між ними (C/N) для тварин з індукцією фіброзу та лікуванням вітаміном А. Середнє значення C/N становить 6,32, що свідчить про тенденцію до збільшення площі цитоплазми відносно ядер. Особливо високе співвідношення C/N у зразка 18 (8,69) може вказувати на значні зміни в клітинній структурі та адаптаційні відповіді на токсичні умови експерименту (Табл.3.4.1)

Табл.3.4.1

Значення площі цитоплазми (С), ядер (N), відношення цитоплазми до ядер (C/N) та середнє значення у пікселях тварин з індукованим фіброзом печінки та додаванням вітаміну А

2 цикли CuSO₄ + CCl₄ + Віт А				
№	С (площа цитоплазми)	N (площа ядер)	C/N (відношення площі)	Середнє значення(C3) та стандартна похибка(СП)
16	2778251,00	472512,00	5,88	C3=6,32 СП=0,78
16,1	3056343,00	501722,00	6,09	
17	3978120,00	744756,00	5,34	
17,1	4305103,00	862330,00	4,99	
18	3317047,00	381596,00	8,69	

3.5 Обговорення результатів

Результати дослідження показують, що у контрольній групі значення співвідношення площі цитоплазми до площі ядер (C/N) варіюються від 3,55 до 25,62, із середнім значенням приблизно 9,20. Такий значний розкид результатів свідчить про нормальну варіабельність клітин печінки без додаткових впливів. У групі "Контроль + Вітамін А" значення C/N коливаються від 3,40 до 13,22, із середнім значенням приблизно 7,86. Додавання вітаміну А призводить до зменшення середнього значення C/N, що може свідчити про певний вплив на клітинну структуру, можливо, через антиоксидантні властивості вітаміну А.

У групі, яка отримала два цикли впливу CuSO_4 та CCl_4 , значення C/N варіюються від 5,36 до 18,21, із середнім значенням приблизно 606. Такий вплив призводить до значного зниження середнього значення C/N, що може свідчити про токсичне пошкодження клітин печінки та фіброз. Зниження відношення площі цитоплазми до площі ядер вказує на зменшення цитоплазми внаслідок ушкодження клітин. У групі, яка отримала два цикли CuSO_4 та CCl_4 з додаванням вітаміну А, значення C/N варіюються від 4,99 до 8,69, із середнім значенням приблизно 632. Додавання вітаміну А до групи з токсичним впливом дещо підвищує середнє значення C/N порівняно з групою без вітаміну А, що може свідчити про часткову захисну дію вітаміну А, проте все ж спостерігається значне зниження C/N порівняно з контрольною групою.

Таким чином, зменшення співвідношення C/N у групах з впливом CuSO_4 та CCl_4 вказує на пошкодження клітин печінки, що відповідає фіброзу. Вітамін А може мати захисний ефект, зменшуючи ступінь зниження C/N співвідношення, але не відновлює його до рівня контрольної групи. Це свідчить про те, що фіброз печінки, спричинений токсичними впливами, супроводжується зменшенням цитоплазми у клітинах печінки, що проявляється зменшенням співвідношення C/N.

Результати дослідження відображають зміни у співвідношенні площі цитоплазми до площі ядер (C/N) у різних експериментальних групах, що дозволяє зробити висновки щодо проліферативного потенціалу клітин печінки під впливом різних факторів. (Рис.3.5.1)

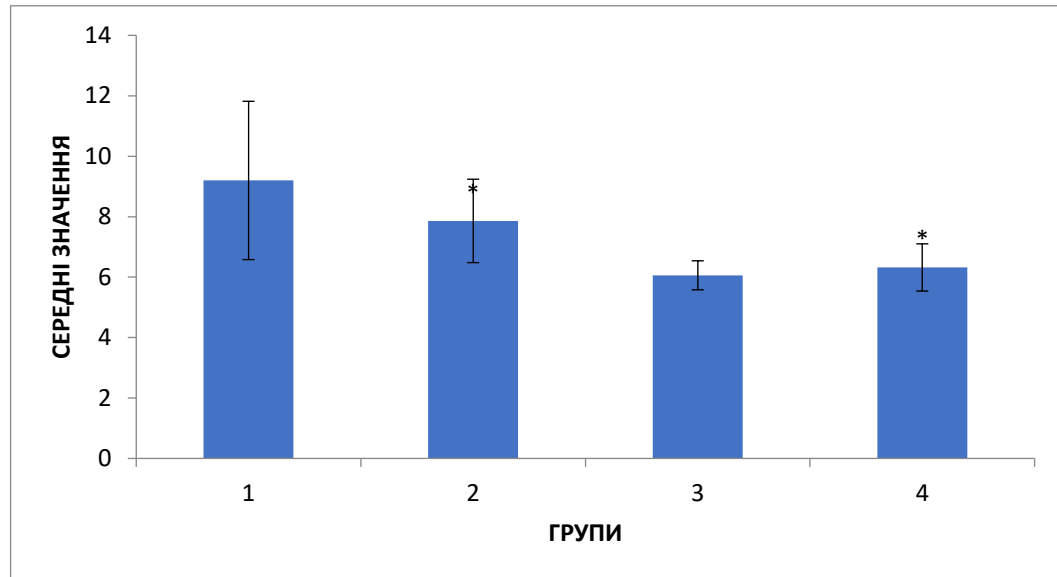


Рис. 3.5.1. Середні значення відношення площі цитоплазми до площі ядер у пікселях. 1 - Інтактні тварини. 2 – Інтактні тварини, що отримували вітамін А у дозі 1,5 г на 100 г маси тіла. 3 – Тварини з індукованим фіброзом печінки. 4 – тварини з індукованим фіброзом печінки та додаванням вітаміну А у дозі 1,5 г на 100 г маси тіла. * - вірогідні значення ($P < 0,05$) порівняно з групами без додавання вітаміну А (1 та 3)

Зірочка (*) біля середніх значень груп 2 та 4 вказує на те, що різниця між цими групами і контрольною групою є статистично значущою $P < 0,05$ порівнянно з контролем (1 та 3 групи). Це означає, що вплив експериментального фактора (вітамін А) на ці групи призвів до змін у відношенні площі цитоплазми до ядер, які не можна пояснити випадковими коливаннями даних. Рисками позначені стандартні похибки кожної групи.

На гістограмі:

- Група 2 (інтактні тварини, що отримували вітамін А) і Група 4 (тварини з індукованим фіброзом та додаванням вітаміну А) показали статистично значущі відмінності порівняно з іншими групами.
- Це підтверджує, що вітамін А має вплив на відношення площі цитоплазми до ядер у цих експериментальних умовах.

3.6 Заключення

Контрольна група: У контрольній групі значення C/N варіюються від 3,55 до 25,62, із середнім значенням приблизно 9,20. Такий широкий діапазон та високе середнє значення свідчать про наявність значної кількості диференційованих клітин з низьким проліферативним потенціалом. Це відповідає нормальній функції печінки, де більшість клітин перебуває у стані спокою і не потребує активного поділу.

Контроль + Вітамін А: У групі, яка отримувала вітамін А, значення C/N коливаються від 3,40 до 13,22, із середнім значенням приблизно 7,86. Зменшення середнього значення C/N порівняно з контрольною групою може свідчити про стимулювання клітинного поділу, можливо, завдяки антиоксидантним властивостям вітаміну А. Це вказує на дещо підвищений проліферативний потенціал клітин у присутності вітаміну А.

2 цикли CuSO₄ + CCl₄: У групі, яка зазнавала впливу CuSO₄ та CCl₄, значення C/N варіюються від 5,36 до 18,21, із середнім значенням приблизно 6,06. Таке значне зниження середнього значення C/N свідчить про підвищення проліферативного потенціалу клітин печінки. Це може бути наслідком токсичного пошкодження клітин і відповідної регенеративної відповіді організму, де активується поділ клітин для відновлення тканин. Проте, такі зміни також можуть вказувати на розвиток фіброзу та можливі передракові стани, коли відбувається надмірна активація клітинного поділу.

2 цикли $\text{CuSO}_4 + \text{CCl}_4 + \text{Вітамін А}$: У групі, яка отримувала токсичні речовини разом із вітаміном А, значення C/N варіюються від 4,99 до 8,69, із середнім значенням приблизно 6,32. Додавання вітаміну А до токсичного впливу дещо підвищує середнє значення C/N порівняно з групою без вітаміну А, але все ж воно залишається нижчим, ніж у контрольній групі. Це свідчить про часткову захисну дію вітаміну А, яка знижує проліферативний потенціал клітин, але не досягає рівня нормальної, неушкодженої тканини печінки.

У даному розділі досліджено морфологічні зміни тканини печінки на різних стадіях формування Cu-індукованого фіброзу з метою оцінки впливу вітаміну А. Дослідження було проведено на чотирьох експериментальних групах, де оцінювалися показники співвідношення площі цитоплазми до площі ядер (C/N) як маркера проліферативного потенціалу клітин.

Встановлено, що в контрольній групі значення C/N варіюються в межах 3,55-25,62, із середнім значенням 9,20. Додавання вітаміну А в контрольній групі знизило середнє значення C/N до 7,86, що свідчить про вплив вітаміну на структуру клітин.

У групі, що піддавалася токсичному впливу CuSO_4 та CCl_4 , середнє значення C/N знизилося до 6,06, що свідчить про пошкодження клітин та розвиток фіброзу. При додаванні вітаміну А до цієї групи середнє значення C/N підвищилося до 6,32, що вказує на частковий захисний ефект вітаміну.

Результати дослідження показали, що вплив CuSO_4 та CCl_4 призводить до зниження C/N, що свідчить про фіброз печінки. Вітамін А частково зменшує це зниження, що вказує на його можливу захисну дію. Отримані дані є важливими для подальших досліджень та розробки нових терапевтичних підходів у лікуванні фіброзу печінки.

ВИСНОВКИ

1. Акумуляція вітаміну А: Дані, отримані в ході дослідження, показали, що накопичення вітаміну А в печінці зменшується з прогресуванням стадії фіброзу. Це може бути пов'язано з порушенням метаболізму вітаміну А через фібротичні зміни у печінковій тканині, що веде до зниження його біодоступності.

2. Вплив Си-індукованого фіброзу: Встановлено, що мідь, як каталізатор окислювальних реакцій, може сприяти окисленню вітаміну А, знижуючи тим самим його активність та ефективність. Прогресування фіброзу, індукованого міддю, корелює зі зниженням рівнів вітаміну А, що підкреслює потенційну роль окислювального стресу у цих процесах.

3. Можливості терапевтичного втручання: Результати дослідження вказують на потенційну користь від використання вітаміну А або його аналогів як частини комплексної терапії фіброзу печінки, особливо на ранніх стадіях його розвитку. Подальші дослідження мають на меті визначити оптимальні дозування та способи доставки вітаміну А для максимізації його терапевтичного потенціалу.

4. Напрямки подальших досліджень: Необхідність подальших досліджень, які б детальніше розглянули механізми взаємодії вітаміну А з фібротичними та окислювальними процесами в печінці, є важливою для розробки нових стратегій лікування та профілактики фіброзу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yang, F. C., Xu, F., Wang, T. N., & Chen, G. X. (2021). Roles of vitamin A in the regulation of fatty acid synthesis. *World Journal of Clinical Cases*, 9(18), 4506. <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v9/i18/4506.htm>
2. Wang, X. D., & Krinsky, N. I. (1998). The bioconversion of β -carotene into retinoids. *Fat-Soluble Vitamins*, 159-180. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1789-8_7
3. Harrison, E. H. (2019). Mechanisms of transport and delivery of vitamin A and carotenoids to the retinal pigment epithelium. *Molecular nutrition & food research*, 63(15), 1801046. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801046>
4. Mody, N. (2017). Alterations in vitamin A/retinoic acid homeostasis in diet-induced obesity and insulin resistance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(4), 597-602. <https://doi.org/10.1017/S0029665117001069>
5. Kurlandsky, S. B., Xiao, J. H., Duell, E. A., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (1994). Biological activity of all-trans retinol requires metabolic conversion to all-trans retinoic acid and is mediated through activation of nuclear retinoid receptors in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32821-32827. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)30065-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)30065-X)
6. Blomhoff, R. U. N. E., Green, M. H., Green, J. B., Berg, T. R. O. N. D., & Norum, K. R. (1991). Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiological reviews*, 71(4), 951-990. DOI: 10.1126/science.2218545
7. Goncalves, A., Roi, S., Nowicki, M., Dhaussy, A., Huertas, A., Amiot, M. J., & Reboul, E. (2015). Fat-soluble vitamin intestinal absorption: absorption sites in the intestine and interactions for absorption. *Food Chemistry*, 172, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.021>

8. Goodman, D. S. (1975). Vitamin A transport and retinol-binding protein metabolism. *Vitamins & Hormones*, 32, 167-180. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60011-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60011-4)
9. Ross, A. C. (2003). Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *The Journal of nutrition*, 133(1), 291S-296S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.291S>
10. Marill, J., Idres, N., Capron, C. C., Nguyen, E., & Chabot, G. G. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current drug metabolism*, 4(1), 1-10.
11. Olson, J. A., Moon, R. C., Anders, M. W., Fenselau, C., & Shane, B. (1992). Enhancement of biological activity by conjugation reactions. *The Journal of nutrition*, 122, 615-624.
12. Frolik, C. A. (1984). Metabolism of retinoids. In *The retinoids* (pp. 177-208). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-658102-7.50011-7>
13. García-Montero, C., Fraile-Martínez, O., Gómez-Lahoz, A. M., Pekarek, L., Castellanos, A. J., Noguerales-Fraguas, F., ... & Ortega, M. A. (2021). Nutritional components in Western diet versus Mediterranean diet at the gut microbiota-immune system interplay. Implications for health and disease. *Nutrients*, 13(2), 699 <https://doi.org/10.3390/nu13020699>
14. Sajovic, J., Meglič, A., Glavač, D., Markelj, Š., Hawlina, M., & Fakin, A. (2022). The role of vitamin A in retinal diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1014. <https://doi.org/10.3390/ijms23031014>
15. Tanumihardjo, S. A. (2021). Biological evidence to define a vitamin A deficiency cutoff using total liver vitamin A reserves. *Experimental Biology and Medicine*, 246(9), 1045-1053. <https://doi.org/10.1177/1535370221992731>
16. Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L. K., Protti, M., & Mladěnka, P. (2021). Vitamin A update: forms, sources, kinetics, detection, function,

deficiency, therapeutic use and toxicity. *Nutrients*, 13(5), 1703.
<https://doi.org/10.3390/nu13051703>

17. Blaner, W. S., Li, Y., Brun, P. J., Yuen, J. J., Lee, S. A., & Clugston, R. D. (2016). Vitamin A absorption, storage and mobilization. *The Biochemistry of Retinoid Signaling II: The Physiology of Vitamin A-Uptake, Transport, Metabolism and Signaling*, 95-125. <https://doi.org/10.1042/bj0320005>

18. Senoo, H., Kojima, N., & Sato, M. (2007). Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitamins & Hormones*, 75, 131-159. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)75006-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)75006-3)

18. Kafi, R., Kwak, H. S. R., Schumacher, W. E., Cho, S., Hanft, V. N., Hamilton, T. A., ... & Kang, S. (2007). Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). *Archives of dermatology*, 143(5), 606-612.
<https://doi.org/10.1111/jocd.12193>

19. Dowling, J. E. (2020). Vitamin A: its many roles—from vision and synaptic plasticity to infant mortality. *Journal of Comparative Physiology A*, 206(3), 389-399. <https://doi.org/10.1155/2018/3067126>

20. Chytil, F. R. A. N. K. (1992). The lungs and vitamin A. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 262(5), L517-L527.
<https://doi.org/10.3390/nu10091132>

21. Senoo, H., Yoshikawa, K., Morii, M., Miura, M., Imai, K., & Mezaki, Y. (2010). Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative—past, present and future. *Cell biology international*, 34(12), 1247-1272.
<https://doi.org/10.1042/CBI20100321>

22. Holt, A. P., Salmon, M., Buckley, C. D., & Adams, D. H. (2008). Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clinics in liver disease*, 12(4), 861-882
<https://doi.org/10.1016/j.cld.2008.07.002>

23. Toouli, J., & Bhandari, M. (2006). Anatomy and physiology of the biliary tree and gallbladder. Diseases of the gallbladder and bile ducts: diagnosis and treatment, 1-20. <https://doi.org/10.1002/9780470986981>
<https://doi.org/10.1021/bi982291i>
aspects of medicine, 21(3), 49-98 [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00004-2)
24. Simbrunner, B., Semmler, G., Stadlmann, A., Scheiner, B., Schwabl, P., Paternostro, R., ... & Reiberger, T. (2020). Vitamin A levels reflect disease severity and portal hypertension in patients with cirrhosis. *Hepatology International*, 14, 1093-1103
25. Soresi, M., Giannitrapani, L., Cervello, M., Licata, A., & Montalto, G. (2014). Non invasive tools for the diagnosis of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(48), 18131. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18131>
26. Bravo, A. A., Sheth, S. G., & Chopra, S. (2001). Liver biopsy. *New England Journal of Medicine*, 344(7), 495-500
<https://doi.org/10.1056/NEJM200102153440706>
27. Liu, Z., Que, S., Xu, J., & Peng, T. (2014). Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. *International journal of medical sciences*, 11(9), 925. <https://doi.org/10.7150/ijms.8951>
28. Huang, X. J., Choi, Y. K., Im, H. S., Yarimaga, O., Yoon, E., & Kim, H. S. (2006). Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*, 6(7), 756-782.
<https://doi.org/10.3390/s6070756>
29. Van Hoof, V. O., & De Broe, M. E. (1994). Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 31(3), 197-293. <https://doi.org/10.3109/10408369409084677>
30. Yegin, E. G., Yegin, K., Karatay, E., Kombak, E. F., Tuney, D., Ataizi-Celikel, C., & Ozdogan, O. C. (2015). Quantitative assessment of liver fibrosis by

digital image analysis: Relationship to Ishak staging and elasticity by shear-wave elastography. *Journal of Digestive Diseases*, 16(4), 217-227. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12231>

31. Li, C., Li, R., & Zhang, W. (2018). Progress in non-invasive detection of liver fibrosis. *Cancer biology & medicine*, 15(2), 124.10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0018

32. Toosi, A. E. K. (2015). Liver fibrosis: causes and methods of assessment, a review. *Romanian journal of internal medicine*, 53(4), 304-314. <https://doi.org/10.1515/rjim-2015-0039>

33. Chrostek, L., & Panasiuk, A. (2014). Liver fibrosis markers in alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(25), 8018. 10.3748/wjg.v20.i25.8018

34. .Huang, Y., Chen, Y., Zhu, H., Li, W., Ge, Y., Huang, X., & He, J. (2019). A liver fibrosis staging method using cross-contrast network. *Expert Systems with Applications*, 130, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2019.03.049>

35. Ginès, P., Krag, A., Abraldes, J. G., Solà, E., Fabrellas, N., & Kamath, P. S. (2021). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 398(10308), 1359-1376 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01374-X)

36. Yoshiji, H., Nagoshi, S., Akahane, T., Asaoka, Y., Ueno, Y., Ogawa, K., ... & Koike, K. (2021). Evidence-based clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2020. *Journal of gastroenterology*, 56(7), 593-619. <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01788-x>

37. Stephensen, C. B. (2001). Vitamin A, infection, and immune function. *Annual review of nutrition*, 21(1), 167-192. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.167>

38. Kovacs, E. J., & Dipietro, L. A. (1994). Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *The FASEB journal*, 8(11), 854-861 <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.11.7520879>

39. Varani, J., Warner, R. L., Gharraee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J., ... & Voorhees, J. J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin¹. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 480-486 <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00902.x>
40. Adwas, A. A., Elsayed, A., Azab, A. E., & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*, 6(1), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
41. Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4).
42. Вишневецький, Є. М. (2000). Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей/Страсбург, 18 березня 1986 року: Збірка договорів Ради Європи: Українська версія. К.: Парламентське видавництво.
43. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344:495-500.
44. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 2467–2474.
45. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., ... & Haiovyi, S. S. (2023). Vitamin A reduces the mortality of animals with induced liver fibrosis by providing a multi-level body defense system. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 13(1), 48-63.