

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Біловецька Світлана Геннадіївна

УДК 576.5:57.021:57.044:577.35

ДИСЕРТАЦІЯ
**«ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ВІТАМІНУ А НА СТРУКТУРНО-
ФУНКЦІОНАЛЬНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ПЕЧІНКИ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ
ОРГАНІЗМУ СІРЧАНОКИСЛОЮ МІДІОУ»**

Спеціальність 091 – «Біологія»
(Галузь знань 09 – Біологія)

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ С.Г.Біловецька

Науковий керівник: Божков Анатолій Іванович, доктор біологічних наук, професор

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Біловецька С.Г. Дослідження ролі вітаміну А на структурно-функціональну організацію печінки при інтоксикації організму сірчаноокислою міддю. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія» (Природничі науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2023.

Дисертацію присвячено дослідженню впливу вітаміну А на функціональну активність печінки на початкових стадіях Си-індукованого фіброзу.

З цією метою досліджували такі показники: вимірювали біохімічні печінкові ферменти АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛФ, внаслідок чого визначали наявність такої патології як фіброз печінки. Наряду з цим досліджували електропровідність біологічних рідин (сироватки крові) та тканин печінки (цільної та гомогенізованої), визначення зазначених параметрів об'єктів дослідження використовували біофізичні, біохімічні, цитологічні та гістологічні методи досліджень. Для встановлення взаємозв'язку електропровідності з функціональною активністю печінки та можливості використання електропровідності в якості діагностичного методу функціональної активності печінки.

Печінка виконує метаболічну, регуляторну та детоксикаційну функції. В умовах захворювань, надмірного токсичного навантаження та стресових факторів, печінка піддається різноманітним структурно-функціональним змінам. Фіброз печінки багато років вважали необоротним процесом, останнім часом з'явилися роботи, які показують можливість оборотності цього процесу, але ефективність та ступінь цього процесу дуже різна та фактори впливу на цей процес досі мало досліджені.

Саме тому дослідження механізмів оборотності, яка пов'язана з особливостями фіброгенезу печінки та ідентифікація факторів, включених в його процес та деградацію, є вкрай важливими питаннями.

Формування фіброзу може розглядатися як одна із форм адаптації організму, яка проявляється на рівні печінки. Отже, необхідні всебічні дослідження механізмів формування адаптивних реакцій печінки, в тому числі і фіброзу на дії різноманітних токсичних чинників середовища, і розробка способів їх усунення.

Як відомо, понад 80% вітаміну А накопичується в печінці, особливо в зірчастих клітинах. Деякі дослідники вважають, що вітамін А може сприяти відновленню функції печінки при фіброзі. Під час розвитку фіброзу та цирозу печінкові зірчасті клітини активуються та змінюють свій фенотип на міофібробластоподібний, втрачаючи вітамін А, після чого активовані зірчасті клітини починають розмножуватися та скорочуватися, що сприяє відкладанню позаклітинного матриксу та розвитку фіброзу.

Разом із цим показано, що при фіброзі знижується рівень вітаміну А в зірчастих клітинах. Залишається нез'ясованим як саме змінюється функціональна активність печінки при піддержанні рівню вітаміну А на рівні контролю, зокрема введенням екзогенного вітаміну А.

Вплив вітаміну А на розвиток організму варіюється залежно від віку, концентрацій, наявності патологій і має велике значення для регуляції фізіологічного процесу в організмі. Ця залежність обумовлена необхідністю відповідності між функціями вітаміну А та розвитком організму, особливо в періоди зародження і раннього дитинства.

Саме тому дослідження впливу вітаміну А на структурно-функціональну організацію печінки з фіброзом є актуальним дослідженням.

Метою роботи було дослідження можливої ролі вітаміну А у запобіганні розвитку фіброзу печінки на ранніх етапах формування Си-індукованого фіброзу печінки.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано завдання дослідження:

1. Дослідити вплив вітаміну А на деякі фізіологічні та морфологічні характеристики у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки.
2. Дослідити вплив вітаміну А на деякі біохімічні показники у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки, а саме визначення впливу вітаміну А на активність аланнінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), глутаміламінотрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ).
3. Дослідити взаємозв'язок електропровідності печінки з її структурою при розвитку фіброзу, а також під впливом гепатотропних препаратів.

У даному дослідженні вивчалася можливість відновлення функцій печінки через зміщення балансу в її функціонуванні. Для досягнення цієї мети на ранніх стадіях розвитку Си-індукованого фіброзу печінки тваринам був введений вітамін А в 300 МО/100 г. Ці самі тварини продовжували перебувати під впливом індуктора фіброгенезу, після чого була вивчена динаміка їх маси тіла, що є комплексним показником функціонального стану організму, функціональні показники печінки, дослідження зв'язку електропровідності печінки зі структурною організацією тканини на фоні розвитку фіброзу та впливу ряду гепатотропних сполук. Крім того, проводились морфологічні дослідження печінки, здатність печінки до регенерації оцінювалася за кількістю двоядерних гепатоцитів.

Дослідження динаміки маси тіла тварин показали, що введення вітаміну А тваринам із фіброзом на початкових етапах його розвитку забезпечувало нормалізацію функцій печінки та відповідно відновлення росту маси тіла тварин.

Було зафіксовано, що після триразових послідовних ін'єкції сірчаної кислоти міді з інтервалом 48 годин між введеннями, експериментальні тварини по-різному переносили такий вплив. Так, в групі, що складалася з 34 тварин, протягом 21 дня загинуло 41% тварин.

Виявлено, що подальше введення вітаміну А тваринам після інтоксикації мідним купоросом призводило до суттєвого зниження смертності. Ті тварини, які

вижили, показували збільшення кількості сполучної тканини навколо печінки. Крім того, в них спостерігався приріст маси тіла, який перевищував результати контрольної групи. Ці результати дозволяють припускати, що розростання сполучної тканини, також відома як «спайкова» хвороба, є проявом адаптивної реакції організму.

Було показано, що Cu-індукований фіброз печінки викликав достовірне збільшення вмісту сполучної тканини в печінці в 1,6 разів, а прийом гепатотропних речовин тваринами з фіброзом викликав незначне зменшення вмісту сполучної тканини в печінці до рівня, близького до інтактної групи.

Було виявлено, що кількість двоядерних гепатоцитів у печінці з фіброзом, незалежно від стадій його розвитку, була зменшена порівняно з контролем. У тварин, яким вводили вітамін А між двома циклами інтоксикації, то кількість двоядерних гепатоцитів була збільшена більш ніж у 2 рази порівняно з тваринами, які не отримували вітамін А, та з фіброзом на початкових стадіях його розвитку та була достовірно вищою порівняно з контрольною групою.

В результаті дослідження гістологічних змін печінки було виявлено, що після двох циклів інтоксикації сірчаною кислотою міддю мали місце більш виражені структурні зміни в печінці порівняно з одним циклом інтоксикації, що корелювало із зростанням з'єднувально-тканинних утворень. У тому разі, якщо між двома циклами інтоксикації тваринам тричі вводили вітамін А, то спостерігали потовщення капсули Гліссона, кількість зірчастих клітин була збільшена, печінкові балки зберігали свою структуру.

В дослідженні структури тканини використовували вимірювання електропровідності, оскільки структура тканини є складною, включає в себе міжклітинні взаємодії, і важливою задачею є розуміння, наскільки великим є вплив структури тканини на електропровідність. Результати вимірювання електропровідності цільної тканини печінки показали, що Cu-індукований фіброз призводив до таких структурно-функціональних змін, які вплинули на зміну

електропровідності тканини печінки. Водночас можливі зміни структурно-функціональної організації печінки після введення гепатопротекторних субстанцій не демонстрували достовірних змін порівняно з фіброзом. Вимірювання електропровідності гомогенізованої печінки також продемонструвало відмінність фібротичної тканини від інтактної і показало відмінності у впливі гепатотропних сполук. Це свідчить про те, що вже на ранніх стадіях розвитку фіброзу відбуваються зміни на різних рівнях структурної організації: як на рівні міжклітинних взаємодій у цільній тканині, так і на взаємодіях, які залишаються непошкодженими при гомогенізації, що відображається на електропровідності.

Результати дослідження електропровідності цільної і гомогенізованої тканин печінки та сироватки крові показали, що метод імпедансної спектроскопії є чутливим до змін структури та складу тканини. і має перспективи застосування в медичній діагностиці.

Було показано, що введення вітаміну А тваринам на початкових стадіях розвитку Си-індукованого фіброзу призводило до відновлення активності АЛТ до значень близьких до значень контрольних тварин. Введення вітаміну А на початкових стадіях розвитку фіброзу печінки нормалізувало активність АСТ. Активність ГГТ у сироватці крові зберігалася на рівні контролю в усіх досліджених групах тварин. Активність ЛФ після Си-індукованого фіброзу достовірно знижувалася, а після введення ретинолу активність ЛФ відновлювалася до контрольного рівня.

Було показано, що за Си-індукованого фіброзу спостерігається значне зменшення вмісту вітаміну А в печінці, а триразове введення вітаміну А в дозі 300 МО/100 г маси супроводжувалося відновленням його вмісту в тварин із фіброзом до рівня контролю.

При підтримці концентрації вітаміну А в організмі на початковій стадії розвитку Си-індукованого фіброзу печінки можливо забезпечити оборотність цього процесу.

Ключові слова: Cu-індукований фіброз печінки, гістологія печінки, електропровідність біологічних систем, темпоральні характеристики фіброзу, вітамін А, мікс-фактор, хлорогенова кислота, активність АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛФ.

ABSTRACT

Bilovetska S. G. Study of the role of vitamin A in the structural and functional organisation of the liver under the copper sulfate intoxication. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Philosophy in the speciality 091 – «Biology» (Natural Sciences). – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2023.

This dissertation is devoted to the study of the effect of vitamin A on the functional activity of the liver in the initial stages of Cu-induced fibrosis.

To this purpose, the following indicators were studied: biochemical liver enzymes ALT, AST, GGT, and ALP were measured, which resulted in the determination of the presence of such pathology as liver fibrosis. In addition, the electrical conductivity of biological fluids (blood serum) and liver tissue (whole and homogenized) was studied; biophysical, biochemical, cytological and histological methods were used to determine these parameters of the study objects. To establish the relationship between electrical conductivity and liver functional activity and the possibility of using electrical conductivity as a diagnostic method for liver functional activity.

The liver performs metabolic, regulatory and detoxification functions. Under conditions of disease, excessive toxic load and stress factors, the liver undergoes various structural and functional changes. For many years, liver fibrosis was considered an irreversible process, and recently there have been studies showing the possibility of reversibility of this process, but the effectiveness and degree of this process is very different and the factors influencing this process are still poorly understood. That is why

the study of the mechanisms of reversibility associated with the peculiarities of liver fibrogenesis and the identification of factors involved in its process and degradation are extremely important issues.

The formation of fibrosis can be considered as one of the forms of adaptation of the body, which manifests itself at the level of the liver. Therefore, comprehensive studies of the mechanisms of liver adaptive reactions, including fibrosis, to various environmental toxic factors and the development of ways to eliminate them are needed.

It is known that more than 80% of vitamin A accumulates in the liver, especially in stellate cells. Some researchers believe that vitamin A can help restore liver function in fibrosis. During the development of fibrosis and cirrhosis, hepatic stellate cells are activated and change their phenotype to myofibroblast-like, losing vitamin A, after which activated stellate cells begin to proliferate and shrink, which contributes to the deposition of extracellular matrix and the development of fibrosis.

At the same time, it has been shown that fibrosis decreases the level of vitamin A in stellate cells. It remains unclear how exactly the functional activity of the liver changes when the level of vitamin A is maintained at the control level, in particular by the administration of exogenous vitamin A.

The effect of vitamin A on the development of the body varies depending on age, concentrations, and the presence of pathologies and is of great importance for the regulation of physiological processes in the body. This dependence is due to the need to match the functions of vitamin A with the development of the body, especially in the periods of embryo and early childhood.

That is why the study of the effect of vitamin A on the structural and functional organization of the liver with fibrosis is a relevant research.

The aim of the study was to investigate the possible role of vitamin A in preventing the development of liver fibrosis in the early stages of Cu-induced liver fibrosis.

To achieve this goal, the following research objectives were formulated:

1. To study the effect of vitamin A on several physiological and morphological characteristics in animals with Cu-induced liver fibrosis.
2. To investigate the effect of vitamin A on several biochemical parameters in animals with Cu-induced liver fibrosis, namely to determine the effect of vitamin A on the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamyl aminotransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP).
3. To investigate the interrelation between liver electrical conductivity and its structure in the development of fibrosis, as well as under the influence of hepatotropic drugs.

This study investigated the possibility of restoring liver function by shifting the balance in its functioning. To achieve this goal, at the early stages of Cu-induced liver fibrosis, animals were administered vitamin A at 300 IU/100 g. The same animals continued to be exposed to the inducer of fibrogenesis, after which the dynamics of their body weight, which is a complex indicator of the functional state of the body, liver function, the study of the relationship between liver electrical conductivity and structural organization of the tissue against the background of fibrosis and the effect of a number of hepatotropic compounds were studied. In addition, morphological studies of the liver were performed, and the ability of the liver to regenerate was assessed by the number of binuclear hepatocytes.

Studies of the dynamics of animal body weight showed that the administration of vitamin A to animals with fibrosis at the initial stages of its development ensured the normalization of liver function and, accordingly, the restoration of animal body weight growth.

It was observed that after three consecutive injections of copper sulphate with an interval of 48 hours between injections, the experimental animals had different effects. Thus, in a group of 34 animals, 41% of the animals died within 21 days.

Thus, it was found that further administration of vitamin A to animals after copper sulphate intoxication led to a significant reduction in mortality. Those animals that

survived showed an increase in the amount of connective tissue around the liver. In addition, they showed an increase in body weight that exceeded the results of the control group. These results suggest that connective tissue overgrowth, also known as “adhesive” disease, is a manifestation of the body's adaptive response.

It has been shown that Cu-induced liver fibrosis caused a significant increase in the content of connective tissue in the liver by 1.6 times, and the administration of hepatotropic substances to animals with fibrosis caused a slight decrease in the content of connective tissue in the liver to a level close to the intact group.

It was found that the number of binuclear hepatocytes in the liver with fibrosis, regardless of the stages of its development, was reduced compared to the control. In animals that were administered vitamin A between two cycles of intoxication, the number of binuclear hepatocytes was increased more than 2-fold compared to animals that did not receive vitamin A and to animals with fibrosis at the initial stages of its development and was significantly higher than in the control group.

As a result of the study of histological changes in the liver, it was found that after two cycles of copper sulfate intoxication, there were more pronounced structural changes in the liver compared to one cycle of intoxication, which correlated with the growth of connective tissue formations. If the animals were injected with vitamin A three times between two cycles of intoxication, the thickening of the Glisson's capsule was observed, the number of stellate cells was increased, and the liver beams retained their structure.

Electrical conductivity measurements were used in the study of tissue structure because tissue structure is complex, involving intercellular interactions, and it is important to understand how much tissue structure affects electrical conductivity. The results of the electrical conductivity measurements of whole liver tissue showed that Cu-induced fibrosis led to structural and functional changes that affected the electrical conductivity of liver tissue. At the same time, possible changes in the structural and functional organisation of the liver after the administration of hepatoprotective substances did not show significant changes compared to fibrosis. Measurements of the electrical

conductivity of homogenised liver also demonstrated the difference between fibrotic and intact tissue and showed differences in the effect of hepatotropic compounds. This suggests that even at the early stages of fibrosis development, changes occur at different levels of structural organisation: both at the level of intercellular interactions in the whole tissue and at interactions that remain undamaged during homogenisation, which is reflected in the electrical conductivity.

The results of the study of the electrical conductivity of whole and homogenised liver tissue and blood serum showed that the impedance spectroscopy method is sensitive to changes in tissue structure and composition and has prospects for use in medical diagnostics.

It has been shown that vitamin A administration to animals at the initial stages of Cu-induced fibrosis led to the restoration of ALT activity to values close to those of control animals. Vitamin A administration at the initial stages of liver fibrosis development normalised AST activity. The activity of GGT in the blood serum remained at the control level in all studied groups of animals. The activity of ALP after Cu-induced fibrosis was significantly reduced, and after retinol administration, ALP activity was restored to the control level.

It has been shown that a significant decrease in the content of vitamin A in the liver is observed in Cu-induced fibrosis, and three times administration of vitamin A at a dose of 300 IU/100 g of body weight was accompanied by the restoration of its content in animals with fibrosis to the control level.

If the concentration of vitamin A in the body is maintained at the initial stage of development of Cu-induced liver fibrosis, it is possible to ensure the reversibility of this process.

Keywords: Cu-induced liver fibrosis, liver histology, electrical conductivity of biological systems, temporal characteristics of fibrosis, vitamin A, mix factor, chlorogenic acid, ALT, AST, GGT, ALP activity.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації.

Наукові праці в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus

1. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., & Haiovyi, S. S. (2023). Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. In Journal of Clinical and Experimental Hepatology (Vol. 13, Issue 1, pp. 48–63). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006> (Scopus, Q3). *(Особистий внесок здобувача: участь у розробці та обґрунтуванні моделі експерименту, участь в експериментальній роботі з лабораторними тваринами, проведення гістологічних досліджень тканини печінки, участь у обговоренні отриманих результатів)*

Наукові праці в наукових фахових виданнях України

2. Bozhkov, A., & Bilovetska, S. (2023). Vitamin A accelerates the process of liver regeneration in the initial stages of Cu - induced fibrosis. In ScienceRise: Biological Science (Issue 3(36), pp. 34–39). Private Company Technology Center. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2023.288227>. *(Особистий внесок здобувача: літературний огляд, участь у розробці та обґрунтуванні моделі експерименту, виконання експериментальної роботи з лабораторними тваринами, проведення гістологічних досліджень тканини печінки, участь у обговоренні отриманих результатів)*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації

3. Bilovetska, S., & Kozheshkurt, V. (2023). Electrical conductivity of liver tissue as an indicator of structural and functional organization of liver tissue. In Grail of Science (Issue 31, pp. 151–156). European Scientific Platform (Publications). <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.15.09.2023.25> . I Correspondence International Scientific and Practical Conference Open Science Nowadays: Main Mission, Trends And Instruments, Path And Its Development Held On September 15th, 2023 By NGO European Scientific Platform (Vinnytsia, Ukraine) LLC International Centre Corporative Management (Vienna, Austria). *(Особистий внесок здобувача: розробка моделі експерименту, проведення гістологічних досліджень тканини печінки, математична обробка результатів вимірювання електропровідності, статистична обробка результатів, участь у обговоренні результатів, оформлення тексту тез, доповідь на конференції)*
4. Bilovetska S., Kozheshkurt V. (2023). Influence of structural organization of liver tissue on electrical conductivity as a possible indicator of its characteristics (pp.78-81) <https://doi.org/10.36074/scientia-08.09.2023>. Sectoral research XXI: characteristics and features: collection of scientific papers «SCIENTIA» with Proceedings of the VI International Scientific and Theoretical Conference, September 8, 2023. Chicago, USA: European Scientific Platform. *(Особистий внесок здобувача: розробка моделі експерименту, виконання експериментальної роботи з підготовки досліджуваних зразків, проведення первинних вимірювань для визначення електропровідності, участь у обговоренні результатів, оформлення тексту тез, доповідь на конференції)*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ ТА ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ ТА ВІТАМІНУ А НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ПЕЧІНКИ (літературний огляд)	23
1.1 Структурно- функціональна організація печінки	23
1.2 Особливості ембріогенезу, анатомії та гістології печінки	25
1.3 Роль ретиноїдів в структурно- функціональній активності печінки ...	31
1.3.1 Метаболізм та механізми перетворення та накопичення вітаміну А в організмі	34
1.4 Патогенетичні механізми фіброзу печінки	39
Висновки до розділу 1	48
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	50
2.1. Характеристика об'єкта досліджень	50
2.2 Експериментальна схема підготовки тварин до дослідження	52
2.3 Методика фізіологічної та морфологічної оцінки з Си-індукованим фіброзом печінки	55
2.3.1 Методика визначення маси тіла, органів та міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки	55
2.3.2 Методика виділення тканин печінки, приготування гістологічних препаратів та підрахунок двоядерних гепатоцитів	57
2.4 Вимірювання біохімічних показників у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки	58
2.4.1 Методика визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспаратамінотрансферази (АСТ), глутаміламінотрансферази (ГГТ), лужної фосфатази	58

	14
2.4.2	Методика визначення вмісту вітаміну А в печінці..... 60
2.5	Вимірювання електропровідності тканин печінки та сироватки крові. 62
2.5.1	Контроль температури при вимірюванні електропровідності..... 63
2.5.2	Електропровідність тканин печінки..... 64
2.5.3	Вимірювання електропровідності рідких середовищ: гомогенізованої печінки та сироватки крові 65
2.6	Статистичний аналіз даних..... 66
	Висновки до розділу 2..... 66
РОЗДІЛ 3	РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ..... 67
3.1	Дослідження впливу вітаміну А на деякі фізіологічні та морфологічні характеристики у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки..... 67
3.1.1.	Вміст іонів міді та вітаміну А в печінці тварин із Cu-індукованим фіброзом. 67
3.1.2	Динаміка росту тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки..... 70
3.1.3	Вплив вітаміну А на відносну масу печінки у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки 73
3.1.4	Вплив вітаміну А на формування міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки 76
3.1.5	Вплив вітаміну А на кількість двоядерних гепатоцитів при Cu-індукованому фіброзі печінки 82
3.1.6	Вплив вітаміну А на структуру печінкової тканини при Cu-індукованому фіброзі..... 85
3.2	Дослідження впливу вітаміну А на деякі біохімічні показники у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки 92
3.2.1	Визначення впливу вітаміну А на активність аланінамінотрансферази (АЛТ) у тварин із Cu-індукованим фіброзом 94

3.2.2	Визначення впливу вітаміну А на активність аспартатамінотрансферази (АСТ) у тварин із Си-індукованим фіброзом.	97
3.2.3	Визначення впливу вітаміну А на активність глутаміламінотрансферази (ГГТ) у тварин із Си-індукованим фіброзом..	99
3.2.4	Визначення впливу вітаміну А на активність лужної фосфатази (ЛФ) у тварин із Си-індукованим фіброзом	102
3.3	Дослідження електропровідності тканин печінки з Си-індукованим фіброзом та впливу біологічно активних сполук на цей показник	106
3.3.1	Дослідження електропровідності тканин печінки	106
3.3.2	Дослідження впливу капсули Глісона на електропровідність тканин печінки	111
3.3.3	Дослідження електропровідності тканин печінки в моделі Си-індукованого фіброзу, та дії гепатотропних біологічно активних сполук	115
3.3.4	Дослідження електропровідності гомогенізованої печінки в моделі Си-індукованого фіброзу, та дії гепатотропних біологічно активних сполук	119
3.3.5	Дослідження електропровідності сироватки крові	122
	Висновки до розділу 3.....	127
	ВИСНОВКИ	130
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	131
	ДОДАТОК 1	161
	СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- CGA (ХГК) – хлорогенова кислота
CTGF – фактор росту сполучної тканини
ECM – позаклітинного матриксу
HB-EGF – фактор росту епідермального гепарину
HSC – печінкові зірчасті клітини
IU (МО) – міжнародна одиниця
LSEC – синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки
MDH – малатдегідрогеназа
NADH – нікотинамідаденіндинуклеотид
NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
RBP – ретинол-зв'язуючий білок
TGF – трансформуючий фактор росту
АЛТ – аланінамінотрансфераза
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АФК – активні форми кисню
АХП – алкогольна хвороба печінки
ГГТ – глутаміламінотрансфераз
ГП – глутатіонпероксидаза
ГПЛ – гідропероксида ліпідів
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
ЛДГ – лактатдегідрогеназа
ЛФ – лужна фосфатаза
МФ – мікс-фактор
ФЕК – фотоелектроколориметр

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Печінка виконує багато функцій, найважливішими з яких є гомеостатична, метаболічна, бар'єрна, та депонуюча, зокрема, детоксикаційна. У печінці синтезуються багато речовин і чинників білкової природи, що регулюють здатність крові згортатися, також важлива роль печінки в підтримці складу ліпідів, обміні біологічно активних речовин – гормонів та вітамінів, зокрема, вітаміну А. У зв'язку з цим часто є порушення її метаболізму і формування різноманітних патологій [1]. З погляду функціональних характеристик патології це особливі метаболічні стани, які формуються у відповідь на хронічні дії негативних факторів середовища. Дослідження таких «крайніх» функціональних станів становлять інтерес не лише з позицій їх усунення (лікування), а й з позицій механізмів формування та підтримання таких станів [2]. Особливий інтерес представляють механізми оборотності хронічних патологій, оскільки це має важливе значення у вирішенні боротьби з віковими патологіями [3]. Такою експериментальною моделлю у вирішенні питання «оборотності-необоротності» метаболічних процесів може бути фіброз печінки. Вирішення проблеми оборотності є актуальною не вирішеною проблемою біології, яка має важливий медичний аспект. Як відомо, фіброз печінки характеризується стадійністю розвитку і його останньою стадією є формування цирозу печінки – небезпечний необоротний стан.

Існують різні підходи та препарати для оборотності фіброзу, але вони всі не дуже ефективні, на сьогоднішній день є дані про доведену ефективність розторопші та її компонентів [4]. Перспективним напрямком є використання вітамінів, зокрема вітаміну А. Вітамін А залежно від дози може: виявляти антиоксидантні властивості; змінювати структуру лізосомальних мембран і таким чином активувати протеолітичні ферменти; змінювати швидкість проліферації і навіть спрямованість диференціювання клітин. Особливий інтерес представляє дія вітаміну А на

функціональну активність печінки (передусім за фіброзу), тому що 50-80% цього вітаміну локалізується в печінці, а 90-95% від цієї кількості утримується в зірчастих клітинах, які відіграють важливу, а можливо й провідну роль у розвитку фіброзу [5]. Є дані про те, що при фіброзі вміст ретинолу в печінці зменшується і при цьому він сприяє виробленню тригліцеридів у гепатоцитах [6].

Водночас є дуже суперечливі дані: у низці робіт [7] показано, що вітамін А може прискорити розвиток фіброзу до цирозу, а в інших роботах [8] показано, навпаки, що вітамін А гальмує розвиток фіброзу. У зв'язку з цим ми досліджували залежність дії вітаміну А від стадій фіброзу, дози вітаміну та інших факторів. Це особливо важливо тому, що відомо, що при фіброзі кількість ендogenous вітаміну А зменшується [6]. Можна припустити, що спрямованість дії вітаміну А, як і інших біологічних субстанцій залежить від дози та стадій розвитку фіброзу печінки. Перевірка цього може допомогти пояснити суперечливість наявних даних та намітити підходи для вирішення проблеми оборотності сформованих метаболічних станів.

Мета дослідження: Дослідити можливу роль вітаміну А у запобіганні розвитку фіброзу печінки на ранніх етапах формування Си-індукованого фіброзу печінки.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано завдання дослідження:

1. Дослідити вплив вітаміну А на деякі фізіологічні та морфологічні характеристики у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки, а саме:
 - 1) Визначити вміст іонів міді та вітаміну А в печінці тварин з Си-індукованим фіброзом печінки;
 - 2) Дослідити динаміку росту маси тіла, відносної маси органів і формування міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин з Си-індукованим фіброзом печінки;
 - 3) Дослідити вплив вітаміну А на кількість двоядерних гепатоцитів на моделі Си-індукованому фіброзі печінки;

- 4) Дослідити особливості структури тканини печінки тварин з Су-індукованим фіброзом печінки.
2. Дослідити вплив вітаміну А на деякі біохімічні показники у тварин із Су-індукованим фіброзом печінки, а саме визначення впливу вітаміну А на активність аланнінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), глутаміламінотрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ).
 3. Дослідити взаємозв'язок електропровідності печінки з її структурою при розвитку фіброзу, а також під впливом гепатотропних препаратів, а саме:
 - 1) Дослідження електропровідності тканин печінки;
 - 2) Дослідження впливу капсули Гліссона на електропровідність тканин печінки;
 - 3) Дослідження електропровідності тканин печінки в моделі Су-індукованого фіброзу печінки, та дії гепатотропних біологічно активних речовин;
 - 4) Дослідження гомогенізованої печінки в моделі Су-індукованого фіброзу печінки, та дії гепатотропних біологічно активних речовин;
 - 5) Дослідження електропровідності сироватки крові.

У межах мети дослідження визначені наступні завдання:

Об'єкт дослідження – морфофункціональні параметри препаратів печінки щурів, активність печінкових ферментів (АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛФ), електрофізичні параметри тканин печінки і сироватки крові як інтегральний показник їх стану на різних стадіях Су-індукованого фіброзу та під дією гепатотропних речовин.

Предмет дослідження – вплив вітаміну А на початкових стадіях Су-індукованого фіброзу на морфо-функціональні, біохімічні, біофізичні параметри печінки тварин.

Методи дослідження: Експерименти проводили на статевозрілих 3-х місячних самцях щурів лінії Вістар (Wistar). Всі процедури з тваринами виконувалися з дотриманням біоетичних правил і з урахуванням циркадних ритмів формування

біологічних відповідей. У кожній групі було по 5 тварин та незалежних повторених тричі досліджень. Всього було 6 експериментальних груп: 1 – інтактні тварини (контроль), 2 – тварини, що отримували одну серію введень сірчаноокислої мідді, 3 – тварини, що отримували дві серії введень сірчаноокислої мідді та в проміжках між ними, впродовж 24 годин після першої серії вводили per os фізіологічний розчин, 4 – тварини, що отримували дві серії введень сірчаноокислої мідді та в проміжках між ними, впродовж 24 годин після першої серії вводили per os розчин вітаміну А (300 МО/100 г маси тіла), 5 – тварини, що отримували дві серії введень сірчаноокислої мідді та в проміжках між ними, впродовж 24 годин після першої серії вводили per os розчин хлорогенової кислоти (0,02г/100 г маси тіла), 6 – тварини, що отримували дві серії введень сірчаноокислої мідді та в проміжках між ними, впродовж 24 годин після першої серії вводили per os розчин мікс-фактору (0,05мл/100 г маси тіла). Через 24 години після останнього ведення тварини виводилися з експерименту шляхом декапітації.

Отриманий біологічний матеріал підлягав дослідженням печінки та її гомогенату, а також сироватки крові на основі методів: анатомічного та гістологічного та цитологічного дослідження, біохімічного аналізу, вимірювання спектрів електропровідності.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше показано, що триразове введення тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки на ранніх етапах формування цієї патології вітаміну А в дозі 300 МО/100 г маси тіла забезпечувало усунення розвитку фіброзу печінки навіть на тлі дії фактору індукції фіброзу, що триває. Показано, що за такої схеми введення тваринам вітаміну А його вміст у печінці відповідає його кількості у нормальній печінці. Вперше показано, що в печінці функціонує система гомеостазу вітаміну А і це проявляється в тому, на фоні щоденних введень вітаміну А вміст цього вітаміну після досягнення свого максимуму (230 мкг/г) його кількість зменшується навіть при введеннях, що продовжуються. Вперше виявлено:

1. При збільшенні вмісту іонів міді в печінці та збільшенням дози вітаміну А, накопичення вітаміну А відбувалося до певної межі, після чого знижувалося.

2. Встановлено, що динаміка маси тіла корелює з фібротизуванням тканин печінки – маса зменшується при фіброзі печінки.

3. Показано, що статистично достовірних результатів у порівнянні відносних мас печінки між експериментальними групами немає.

4. Встановлено, що рівень спайковою хвороби та вмісту сухої сполучної тканини в печінці залежать від рівню фіброзу печінки.

5. Показано, що рівень двоядерних гепатоцитів у групі з додаванням вітаміну А вище, ніж у контрольної групи.

6. Встановлено, що як на початкових стадіях фіброзу має місце збільшення товщини капсули Гліссона та імунокомпетентних клітин в ній, так і при дії вітаміну А, проте запальні процеси проходять менш інтенсивно.

7. Виявлено, що активність АЛТ, АСТ, ЛФ зменшувалося при збільшенні фіброзу, та збільшується при введенні вітаміну А, а активність ГГТ має протилежний характер відповіді.

8. Показано, що електропровідність відображає фібротичні зміни в печінці вже на ранніх стадіях розвитку фіброзу на рівні структурної організації тканини.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 1 від 26 «вересня» 2023 р.).

Особистий внесок здобувача. У дисертації використані наукові статті [9,10], інші статті та матеріали тез доповідей на конференціях [11,12] дисертанта.

Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертації, виконано експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку даних, написано та оформлено розділи дисертації. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д. б. н., проф. Божковим А.І.

Апробація результатів дослідження: семінари кафедри молекулярної біології та біотехнології, а також участь в конференціях:

- 1) I Correspondence International Scientific and Practical Conference Open Science Nowadays: Main Mission, Trends And Instruments, Path And Its Development Held On September 15th, 2023 By NGO European Scientific Platform (Vinnytsia, Ukraine) LLC;
- 2) VI International Scientific and Theoretical Conference, September 8, 2023. Chicago, USA: European Scientific Platform.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 1 додатку. Обсяг загального тексту дисертації складає 162 сторінки, з них основного тексту 115 сторінок. Робота містить 32 рисунків (з них займають окрему сторінку 5 рисунків) та 1 таблицю. Список використаних джерел містить 258 найменувань.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи використовуються у навчальному процесі кафедри молекулярної біології та біотехнології.

РОЗДІЛ 1

МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ ТА ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ ТА ВІТАМІНУ А НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ПЕЧІНКИ (літературний огляд)

1.1 Структурно- функціональна організація печінки

Печінка є однією з ключових органів в організмі, яка виконує: метаболічну, регуляторну, детоксикаційну і ряд інших функцій. Вона відіграє важливу роль в умовах захворювань, надмірного токсичного навантаження та стресових факторів. Серед усіх патологій, що стосуються печінки, алкогольні захворювання займають провідне місце у плані летальних наслідків. Широкий діапазон захворювань печінки, від стеатозу до гепатоцелюлярного раку, пов'язаний із надмірним вживанням алкоголю [13,14].

Розвиток фіброзу печінки – оборотний процес, але в найважчих випадках єдиний варіант усунення цієї патології – це пересадка печінки. Саме тому дослідження механізмів фіброгенезу печінки та ідентифікація всіх факторів, включених в його процес та деградацію, є вкрай важливими [15].

Структурно печінка має паренхіму, розділену на функціональні одиниці – печінкові часточки, які вкриті капсулою Гліссона. Печінкові часточки, розміром 1-2 мм, містять гепатоцити, організовані у печінкові балки, розділені синусоїдами з ендотелієм. Кожна з часточок перетинається централобулярною веною. Гепатоцити відходять від централобулярної вени до периферії печінкової часточки. Портальна тріада та сполучна тканина зазвичай розташовані під кутами до часточки [16,17].

Печінка містить різні печінкові фіброгенні клітини (це клітини, які утворюють фіброзний матрикс та грають важливу роль у процесі загоєння ран та регенерації тканин в організмі), включаючи зірчасті клітини, портальні

фібробласти, фібробласти капсули Гліссона, клітини гладеньких м'язів судин, а також клітини, що оточують централобулярні вени [16].

На даний час виділяють п'ять основних етіологічних факторів патології печінки: вірусні ураження, аутоімунні патології, новоутворення різного генезу, алкоголь та метаболічні порушення, які можуть бути індуковані різноманітними біологічними (мікроорганізмами, вірусами), фізичними (температура, вологість, випромінювання і т.д.) та хімічними (токсичні речовини, важкі метали, лікарські речовини, харчові добавки та консерванти, радіоактивні речовини) факторами [18].

Метаболічні захворювання становлять великий клінічний інтерес. зокрема, метаболічні порушення у печінці можуть бути зумовлені надзвичайно широким спектром генетичних та середовищних факторів та їх комбінацією. Проте в даний час задовільно описані лише деякі з них. Порушення обміну заліза в організмі призводить до розвитку гемохроматозу, а порушення обміну міді призводить до хвороби Вільсона [19].

Патологічні зміни в печінці відбуваються значно частіше, ніж вони фіксуються, і часто виявляються на стадії хронізації процесу. Це пояснюється кількома фундаментальними властивостями печінки як центральної ланки метаболічної регуляції організму. По-перше, функціональні зміни в печінці відбуваються під впливом надзвичайно широкого спектра фізичних, хімічних і біологічних чинників [20]. У цьому контексті в печінці як у «дзеркалі» відображаються й перетворюються не лише екзогенні, а й ендогенні фактори, що й проявляється у формі запальних реакцій та формуванні адаптивної функціональної відповіді [21]. По-друге, в процесі еволюції печінка є «координуючим» та «виконавчим» елементом метаболічної системи організму, тобто забезпечує життєво важливі функції. Процеси підтримання та відновлення функціональної активності печінки здійснюються шляхом поліплоїдизації гепатоцитів, їх гіпертрофією, і регенерацією клітинних елементів печінки, тобто вона володіє широким арсеналом адаптивних механізмів [22]. Ці особливості забезпечують

виражену варіабельність функціональної активності печінки, і це «маскує» прояв патологічних процесів. По-третє, функціональні зміни печінки не викликають больових відчуттів, аж до формування фінальної стадії цього гепатопатологічного процесу [23]. У зв'язку з цими особливостями необхідні всебічні дослідження механізмів формування адаптивних реакцій печінки на дії різноманітних токсичних чинників середовища і розробка способів їх регуляції, що може дозволити виробити способи усунення патологічних станів.

1.2 Особливості ембріогенезу, анатомії та гістології печінки

Печінка формується з ембріонального зачатка, так званого печінкового дивертикула, який з'являється у ембріона людини між третім і четвертим тижнем вагітності (коли ембріон має розмір близько 4 мм). Цей дивертикул виникає з вентрального ентодермального шару дистальної частини передньої кишки (майбутньої дванадцятипалої кишки) [24]. З мезенхімальної тканини, що знаходиться у поперечній перегородці, подальше формується печінка. [1]. Утворюючи примітивні тяжі гепатоцитів (або гепатобластів), подібні до мікроколоній, оточують мезенхімальні простори [25], При їхньому зростанні в напрямку поперечної перегородки, вони пронизуються мережею капілярів, що походять від жовткових вен, створюючи так звані примітивні печінкові синусоїди. Між ендотеліальними клітинами та гепатобластами розташовуються мезенхімальні клітини, які створюють сполучну тканину печінки разом із капсулою органу [26].

Функція утворення крові в печінці активізується на початку 6-го тижня розвитку ембріона та продовжується до 12-го тижня. Протягом цього періоду печінка виступає основним місцем кровотворення до завершення третього триместру внутрішньоутробного розвитку [1,26,27], який повільно зникає після народження [25].

Каудальний сегмент зачаткової структури печінки трансформується у жовчний міхур разом з його ніжкою, що також називається кістковою протокою [27]. Внутрішньопечінкові жовчні протоки розвиваються із тканинних пластин гепатобластів, які виникають в області мезенхіми, що межує з гілками ворітної вени. Ці пластини стають основою для формування протокових структур, які на початку представляють собою двошарові циліндричні утворення. Подальший еволюційний розвиток цих структур призведе до формування внутрішньопечінкової системи жовчних протоків. Цей процес починається навколо печінкових воріт [26].

Вроджені порушення, такі як синдром Каролі, вроджений фіброз печінки, аутосомно-рецесивний та аутосомно-домінантний полікістоз нирок, а також комплекс фон Мейенбурга, вважаються наслідком аномалій у розвитку протокової пластинки [28].

Починаючи з 12-го тижня вагітності, починається процес утворення жовчі, проте видалення її в кишечник відбувається лише з 16-го тижня внутрішньоутробного розвитку [26]. Це може відбуватися навіть на низькому рівні перед народженням через відсутність харчування через кишечник. Саме це пояснює відсутність виявів ураження печінки при атрезії жовчовивідних шляхів при народженні, але наслідковий розвиток цих уражень може спостерігатися у наступні тижні [29].

Печінка знаходиться у правому підребер'ї та епігастральній ділянці, часто досягаючи лівого підребер'я, і є майже повністю захищеною грудною кліткою. Це найбільший внутрішній орган у людини. У порівнянні з розміром загального тіла, розмір печінки в плоді є більшим, ніж у дорослої людини, становлячи близько одну вісімнадцяту в першому випадку та одну тридцять шосту від загальної маси тіла в останньому.

Печінку у людини можна поділити на дві великі частини (праву та ліву) та дві менші центральні частини (квадратну та хвостату). Її зовнішні поверхні можна

розподілити на верхню, нижню та задню. Верхня поверхня лежить під діафрагмою. Діафрагма розділяє печінку від ребер та реберних хрящів з боків та спини, а також відокремлює легені з плеврою та серце з перикардом зверху. Передню межу печінки чітко виділяє реберна дуга на її передній стороні [30].

Porta hepatis представляє собою точку входу печінкової артерії (зліва) та ворітної вени (позаду та між артерією та протокою) і місце виходу загальної печінкової протоки (справа). В цьому регіоні також можна знайти нерви та лімфатичні судини. Декілька зв'язок допомагають підтримувати печінку на місці та обмежувати її бічні рухи. Орган з'єднаний з діафрагмою та передньою стінкою черевної порожнини п'ятьма зв'язками. [31].

У 1954 році Раппапорт Фрідеріх вніс пропозицію щодо поняття печінкового ацинусу, який має форму трикутника з порталною венулою на вершині та порталними трактами в основі.

Згідно з моделлю Раппапорта, ацинус розділяється на три зони: зона 1, яка знаходиться недалеко від порталної венули та має достатнє насичення киснем; середня зона (зона 2); і зона 3, розташована біля печінкової венули [32].

Паренхіма печінки в основному складається з гепатоцитів, що утворюють тривимірний губчастий малюнок. Гепатоцити мають виразну багатокутну форму з діаметром приблизно 25 мкм. Клітинна мембрана може бути розглянута з трьох різних аспектів: базолатеральна сторона, спрямована до синусоїдального просвіту; каналцевий аспект, який визначає каналцевий простір; і латеральний аспект, що розмежовує дві інші сторони. Ядро розташоване в центрі, і більшість гепатоцитів мають моноядерну структуру, хоча двоядерні гепатоцити також є досить поширеними. Цитоплазма багата та еозинофільна, і накопичення глікогену може бути виділене при періодичному фарбуванні за допомогою кислоти Шиффа.

Перипортальний. У дітей і підлітків гепатоцити мають фізіологічно вакуолізовані ядра. Перші тижні життя відрізняються великою кількістю заліза та

накопиченням міді, але ці показники зменшуються і поступово зникають протягом віку від 3 до 6 місяців [26].

Жовчні каналці розташовані між сусідніми гепатоцитами, і їх важко виділити за допомогою стандартних гістологічних фарбувань гематоксилином та еозином. Клітини Купфера опираються на внутрішню поверхню синусоїдів і є частиною ретикулоендотеліальної системи [26].

Простір між ендотеліальними клітинами та гепатоцитами відомий як *простір Діссе*, що містить зірчасті клітини печінки, відомі як клітини Іто. Вони накопичують ретиноїди, можуть контракувати, впливаючи на синусоїдальний діаметр, та можуть виробляти позаклітинний матрикс, який грає роль у фіброгенезі під час активації клітин Іто. Використання методу срібла висвітлює ретикулін, що становить каркас печінки, в основному складаючись з колагену III типу [26].

Капсула Гліссона, що складається зі сполучної тканини, оминає ворітну вену, печінкову артерію та жовчну протоку у портальній тріаді, а також присутня на поверхні печінки (рис. 1.1). Її головною функцією є забезпечення цілісності печінки. Товщина цієї капсули різна в залежності від виду, наприклад, вона може варіювати від 30 до 90 мікрметрів у людини, 5 мікрметрів у щурі та 93 мікрметрів для печінки великої рогатої худоби. Товщина капсули Гліссона може бути нерівномірною, і з розвитком захворювань печінки, таких як фіброз або цироз, може відбуватися її збільшення (Рис. 1.1) [33].

В здоровій печінці людини поверхня містить багаточисельні капсульні фібробласти, при цьому жовчні протоки знаходяться під мезотелієм. У відмінності від людини, у гризунів жовчні протоки відсутні під поверхнею печінки, і сама поверхня складається лише з одного шару капсульних фібробластів [17,34].

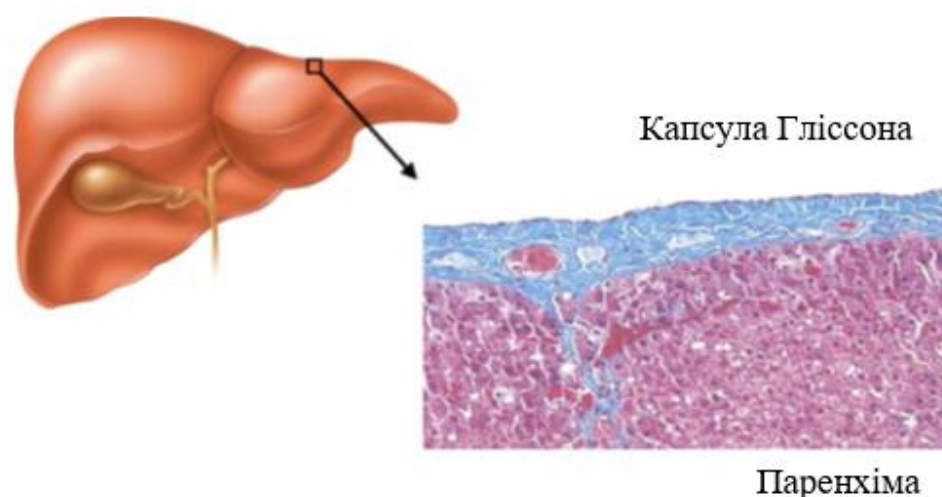


Рис. 1.1 Загальна анатомія печінки людини та капсула Гліссона на її поверхні [35]

Зірчасті клітини печінки, або клітини Іто, отримали свою назву на честь Тосіо Іто, який розробив метод фарбування жиру для ідентифікації «жирозберігаючих клітин» печінки [36]. Вони можуть перебувати у спокійному стані, але при дії екзогенних або ендогенних токсичних факторів, ці клітини переходять в активний стан. В активному стані вони починають виробляти позаклітинний матрикс [37].

Клітини Іто, також відомі як перисинусоїдальні клітини або зірчасті клітини, складають приблизно 5-8% усіх клітин у здоровій печінці. Це спеціалізовані клітини, які вирізняються своїм перисинусоїдальним розташуванням та довгими відростками, що простягаються вздовж та навколо синусоїдів між пластинками гепатоцитів в просторі Діссе. Сполучність між зірчастими клітинами та синусоїдальними трубками є ключовою особливістю цих клітин. Вони відіграють важливу роль у регулюванні та накопиченні рівня колагену, зберіганні ліпідів, вітаміну А в печінці та у процесах відновлення та ремоделювання тканини під час запалення та травми, а також експресують білок десмін та розвитку фіброзу в печінці [16,34].

Під дією стресу чи травми (Рис. 1.2) печінкові зірчасті клітини активуються та змінюють свій фенотип на міофібробластоподібний, втрачаючи ліпідні краплі, що містять вітамін А. Активовані зірчасті клітини починають розмножуватися та скорочуватися, що сприяє відкладанню позаклітинного матриксу [38]. Цей процес відбувається при розвитку фіброзу та цирозу. Клітини починають виробляти білок альфа-актин гладких м'язів та матриксні металопротеази разом з їхніми інгібіторами.

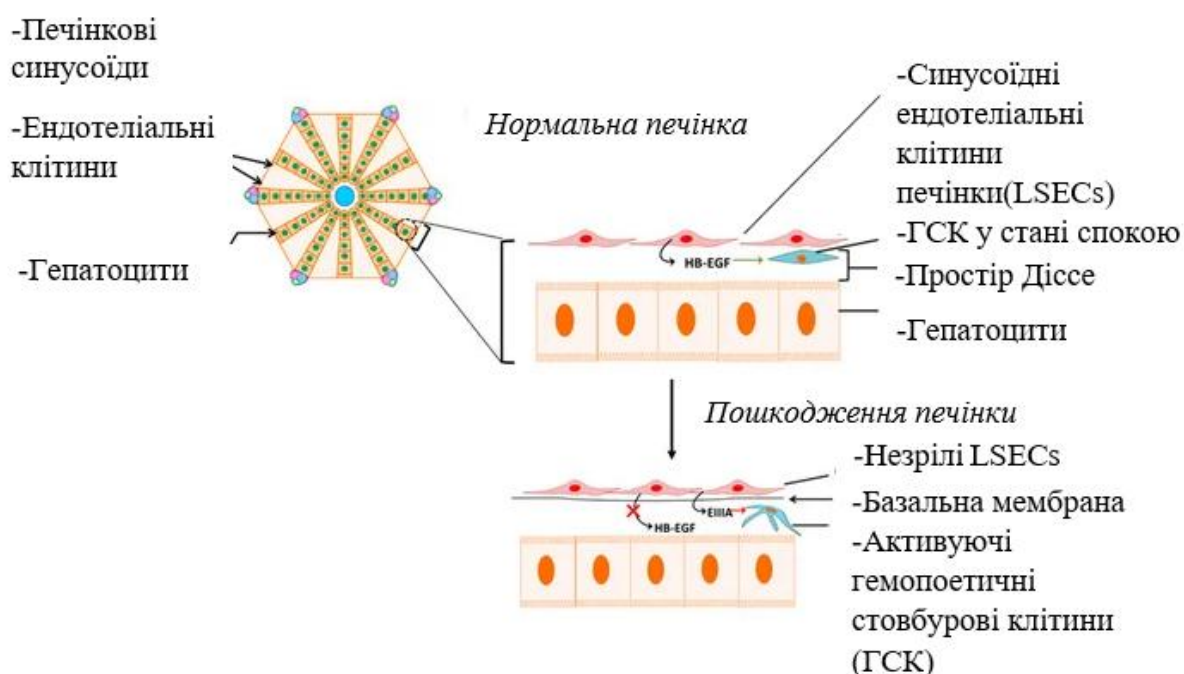


Рис. 1.2. Активація печінкових зірчастих клітин (HSC) відбувається шляхом взаємодії з незрілими синусоїдальними ендотеліальними клітинами печінки (LSEC). Збільшення вивільнення фактору росту епідермального гепарину (HB-EGF) знижується, в той час як ізоформне вивільнення фібронектину з незрілими LSEC у тканині мозку активує печінкові зірчасті клітини клітин [41].

Металопротеази відповідають за розкладання білків позаклітинної матриксу, а різні комбінації металопротеаз та їхніх інгібіторів призводять до пізніх стадій

ураження печінки, коли вони починають руйнувати нормальний матрикс печінки та зупиняється деградація фібрилярних колагенів, накопичених при фіброзі [16,39].

Разом із зірчастими клітинами, тромбоцити одні з перших, що включаються до місця пошкодження та беруть участь у загоєнні ран, обмежуючи крововтрату через утворення агрегатів на кінцях пошкоджених судин. Вони також перетворюють фібрин на фібриноген. Тромбоцити також служать атрактантом для фібробластів, запальних клітин і гладких м'язів судин [40].

Клітини Купфера відіграють важливу роль у формуванні алкогольного гепатиту. Постійне споживання алкоголю активує їх через наявність кишкових ендотоксинів, і вони перетворюються на джерела вільних радикалів (зокрема, високореактивних кисневих сполук), що сприяє запаленню печінки та активації печінкових зірчастих клітин [34,42].

1.3 Роль ретиноїдів в структурно- функціональній активності печінки

Вітамін А [43] представляє собою загальну категорію жиророзчинних ретиноїдних сполук, які мають важливе значення для нормального фізіологічного функціонування організму. Він сприяє регенерації тканин і поділу клітин, підтримує нормальну роботу імунної системи та слизових оболонок, відіграє роль у спеціалізації клітин, підтримує цілісність епітеліальних тканин, і є важливим для стабільності лізосом і синтезу глікопротеїнів. Особливо важливим є його внесок у функціонування сітчастої оболонки ока, де він формує фоторецепторний пігмент родопсин. Вітамін А також має антиоксидантний ефект, допомагає в протизапальних процесах та виявляє інші регуляторні властивості [44,45,46,47,48].

Ретиноїди – це група жиророзчинних сполук, які відрізняються від водорозчинних вітамінів тим, що їх не виводять з організму, і вони можуть накопичуватися, особливо в печінці та жировій тканині [49].

Вітамін А сприяє збільшенню мітотичної активності епітеліальних клітин та перешкоджає розвитку гіперкератозу завдяки стимуляції синтезу РНК та сульфатованих мукополісахаридів. Для всмоктування ретинолу в тонкому кишечнику важливу роль відіграють жовчні кислоти. Після проходження через кишечник, вітамін А накопичується в печінці, де близько 90% його зберігається в зірчастих клітинах печінки [37,50,51].

Вперше явище утворення вітаміну А в організмі тварин було пояснено Муром у 1930 році [52]. Він описав перетворення β -каротину на вітамін А в тонкому кишечнику, зробивши перші наукові докази того, що ці каротиноїди є прямими попередниками вітаміну А в тваринах, який перетворюється на ретинол. В організмі тварин вітамін А синтезується з провітамінів А, зокрема під час розкладу рослинного β -каротину [53]. Оскільки тварини не здатні до синтезу ретиноїдів *de novo*, основними джерелами цих сполук є каротиноїди (С40), які мають рослинне походження [54].

У 1965 році дослідники Джеймс Аллен Олсен і Девітт Гудмен продемонстрували у безклітинних екстрактах, одержаних із тонкої кишки щурів, що β -каротин ферментативно розкладається в центральній частині 15,15' вуглецевого подвійного зв'язку, утворюючи дві молекули альдегіду вітаміну А (ретинолю) [55,56]. Отриманий ретиналь швидко відновлюється до ретинолу за допомогою ферменту ретинолдегідрогенази [57,58].

Організм людини може метаболізувати природні форми вітаміну А та провітаміну А в біологічно активні форми (ретинол, ретиналь, ретиноева кислота), які взаємодіють з різними молекулярними мішенями, включаючи ядерні рецептори, родопсин в сітківці та деякі ферменти згідно з останніми дослідженнями [49].

Завдяки багатофункціональності вітаміну А, його дефіцит може призвести до різноманітних змін: порушення зору та адаптації очей до темряви (ксерофтальмія), порушень функцій залоз та слизових оболонок, проблем з нігтями та волоссям, а також порушень росту та розвитку, патологій статевої системи, ожиріння,

збільшення ризику розвитку злоякісних новоутворень, пригнічення імунної системи та збільшення ризику захворювання на інфекційні хвороби [44,45].

Вплив вітаміну А на розвиток організму варіюється залежно від віку і має велике значення. Ця залежність обумовлена необхідністю відповідності між функціями вітаміну А та розвитком організму, особливо в періоди зародження і раннього дитинства. Дослідження [59,60,61] показують, що дефіцит вітаміну А в дітей має серйозніші наслідки, ніж у дорослих. Він може призводити до затримки росту та розвитку, значного погіршення імунітету, дистрофії скелетних м'язів, порушень функцій легенів [62,63,64]. Недостатня кількість вітаміну А може спричиняти різноманітні вроджені вади плода [65]. Проблеми, пов'язані з недостатнім вмістом вітаміну А є особливо поширеними в ряді країн і становлять важливу медико-біологічну проблему [62,63,66,67,68,69].

Проте, великі дози вітаміну А можуть призвести до проявів токсичності [70], яка може бути гострою або хронічною [49] 85 і називається гіпервітамінозом. Симптоми гіпервітамінозу включають: сильний головний біль, втрату апетиту, нудоту, блювання [49,71], втрату кісткової маси [72], ідіопатичний внутрішньочерепний тиск [73], облісіння, еритему, десквамацію, міалгію [74]. Процес гіпервітамінозу А опосередковується ретинолієвим ефіром, який порушує міжклітинні сигнали і призводить до руйнування клітинних мембран [75]. Гостра токсичність може призвести до підвищення внутрішньочерепного тиску [73], кортикального гіперостозу кісток і артралгій [76,77,78].

Існують дані про те, що в організмі людини немає механізмів для пригнічення всмоктування або виведення надлишку вітаміну А [74], тому високі дози можуть призвести до надмірного накопичення цієї сполуки в печінці та меншій мірі в периферичних тканинах [79]. Це може спричинити серйозні ушкодження печінки та хронічну інтоксикацію всього організму [80]. Понад 80% вітаміну А зберігається в печінці, особливо в зірчастих клітинах [50,51].

Деякі дослідники вважають, що вітамін А може сприяти відновленню функції печінки при фіброзі [81] 101. Однак існують дані, що додаткове введення вітаміну А може призвести до прискореного переходу фіброзу до цирозу [74].

Наряду з гепатотропними властивостями вітаміну А такі властивості може проявляти хлорогенова кислота (складний ефір кавової (3,4-діоксикоричної) та одного зі стереоізомерів хінної кислоти) [82], яка маючи поліфункціональну дію, здатна брати участь і у відновленні систем кровотворення після інтоксикації організму іонами міді, а її ефективність може залежати від способу введення в організм [83]. Дію ХГК кислоти можна зумовити її антиоксидантними властивостями. У зв'язку з цим представляє інтерес порівняти її дію на регенеративні властивості печінки, оскільки існує нестача літературних даних.

1.3.1 Метаболізм та механізми перетворення та накопичення вітаміну А в організмі

Вплив вітаміну А на розвиток організму має віковий характер і залежить від джерел, з яких цей вітамін надходить до організму [49]. Існують два основних джерела вітаміну А:

- 1) Перше джерело – це преформований вітамін А (ретинол), який міститься у продуктах тваринного походження. Наприклад: печінка, яйця та молочні продукти.
- 2) Друге джерело – це каротиноїди, які є провітамінами А, переважно бета-каротин, що містяться у рослинних продуктах, таких як морква, шпинат та картопля.

Після того як продукти, багаті вітаміном А або біологічно активні добавки з ним, надходять в організм, вони проходять декілька етапів обробки: всмоктування, транспортування, зберігання та використання [49]. Ретинілові ефіри, які містяться

в продуктах тваринного походження, практично повністю всмоктується, у той час як поглинання рослинних каротиноїдів менш ефективно [84,85].

Ретинілові ефіри піддаються метаболізму тригліцеридліпазою або фосфоліпазою В в просвіті шлунково-кишкового тракту перед тим, як потрапити в ентероцити, де вони перетворюються на ретинол. Всмоктування тваринного вітаміну А полегшується утворенням міцел, особливо при одночасному вживанні його з жирними продуктами [84]. Коли ретинол потрапляє в ентероцити, він співвідноситься з клітинним ретинол-зв'язуючим білком (CRBP), який забезпечує його транспортування в клітину. Існують дві ізоформи цього білка – CRBPI та CRBPII, з яких остання, CRBPII, в основному присутня у кишкових клітинах, підкреслюючи її важливість у процесі абсорбції [86].

Наукові дослідження, проведені Борелем, підтверджують роль транспортерів класу В1 (SCARB1) та білків диференціювання 36 (CD36 або SCARB3) у процесі абсорбції, хоча пасивна дифузія також залишається важливим механізмом всмоктування деяких каротиноїдів [87]. Інференція клітин кишечника обробляє лише частину каротиноїдів, приблизно одну третину, до активних форм, тоді як решта поглинається без змін [49].

Важливість β -каротину як важливого джерела вітаміну А для людини підкреслюється контролем його метаболізму за допомогою механізмів зворотного зв'язку [88,89]. При надлишковому надходженні каротинів в організм, вони зберігаються в жирових запасах.

Після обробки ентероцитами ретинол перетворюється на ретинілові ефіри, які потім транспортуються в лімфатичну систему за допомогою хіломікронів [84]. Ці ефіри не накопичуються в тканинах печінки, якщо вони потрапляють у цей комплекс. Складні ефіри можуть бути розщеплені до ретинолу, а інші переносяться разом з ліпопротеїнами низької і дуже низької щільності для подальшого транспортування до різних клітин, де вони можуть бути метаболізовані в активні форми вітаміну А [49].

Після цього хіломікрони рухаються кровотоком, щоб доставити вітамін А до тканин-мішеней, переважно печінки, яка слугує головним органом зберігання вітаміну А в організмі [90]. У печінці вітамін А зберігається у вигляді ретинілових ефірів, зокрема в зірчастих клітинах [49]. Після цього частковий гідроліз ретинілових ефірів до ретинолу відбувається, і ретинол зв'язується з ретинол-зв'язуючим білком (RBP) для його виведення з печінки та транспортування через кровотік [84]. У кровотоці новоутворений комплекс зв'язується з білком транстретином (TTR) [91]. Транспортери плазмалеми відіграють важливу роль у розпізнаванні комплексу ретинол-RBP та його засвоєнні клітинами-мішенями [92,93].

Отже, організм здатен запасати вітамін А та використовувати його за необхідності. Роль ретинол-зв'язуючого білка в метаболізмі вітаміну А є важливою, оскільки він забезпечує транспорт вітаміну до тканин-мішеней або органів зберігання. Це дозволяє організму підтримувати нормальний рівень вітаміну А, синтезуючи його з запасів та забезпечуючи стабільне функціонування систем. Однак надлишкове накопичення вітаміну може призвести до токсичності і ушкодження тканин [7].

В організмі тварин існують кілька можливих механізмів синтезу вітаміну А [84]. Серед них виділяють ацетиленовий та альдегідний шляхи, а також побічні механізми, які включають перетворення різних форм вітаміну А на інші.

Один із *ацетиленових шляхів* включає перетворення бета-каротину на ретинол. Бета-каротин, який є провітаміном А, може перетворюватися на ретинол в організмі. Цей процес відбувається в слизовій оболонці кишечника та печінці. Бета-каротин всмоктується з тонкого кишечника та транспортується до печінки, де під дією ферменту бета-каротин^{15,15'}-діоксигенази він розщеплюється на дві молекули ретиналю. Подальше відновлення ретиналя до ретинолу відбувається за допомогою ферменту ретинальредуктази. Після цього ретинол транспортується

ретинол-зв'язуючим білком (RBP) до тканин-мішеней, таких як очі, шкіра та слизова оболонка [54,84].

Також до ацетиленового шляху належить перетворення інших каротиноїдів на ретинол. Каротиноїди, такі як альфа-каротин, гамма-каротин та криптоксантин, можуть також перетворюватися на ретинол в організмі. Цей процес відбувається подібно до перетворення бета-каротину на ретинол, але ефективність цього перетворення нижча [54,94,95].

Щодо *альдегідного шляху*, він включає перетворення різних форм вітаміну А на інші форми. Наприклад, ретинол може перетворюватися на ретиналь та навпаки. Також ретинол може бути перетворений на ретинову кислоту або відновлений до ретинолу. Окислення ретинолу в ретиналь відбувається у сітківці ока під час зору за допомогою ферменту ретинолдегідрогенази. Ретиналь може бути також інтермедіатом у перетворенні каротиноїдів на ретинол. Ретиналь може знову перетворюватися на ретинол за допомогою ретинальредуктази або окислюватися до ретиноєвої кислоти ферментом ретинальдегідрогенази. Ретиноєва кислота є активною формою вітаміну А, яка впливає на експресію генів та клітинну диференціацію [96,97].

Ще одним механізмом синтезу є *перетворення складних ретинілових ефірів на ретинол*. Ретинілові ефіри є формами вітаміну А, які зберігаються в печінці та інших тканинах. Вони гідролізуються за участю ферменту гідролази ретинілових ефірів, утворюючи ретинол. Після цього ретинол транспортується ретинол-зв'язуючим білком (RBP) до тканин-мішеней.

Таким чином, розуміння механізмів синтезу вітаміну А в організмі тварин має велике значення для дослідження його біологічних ефектів. Дефіцит вітаміну А і пов'язані з ним біологічні наслідки можуть прямо залежати від шляхів синтезу цього вітаміну в організмі. Оскільки людина отримує ретиноїди з їжею і подальше перетворення їх на вітамін А відбувається в організмі, недостатня кількість ретиноїдів у харчуванні може призвести до дефіциту вітаміну. З іншого боку, через

жиророзчинність вітаміну А можливе накопичення його в організмі, і надмірне споживання може спричинити гіпервітаміноз А, який, так само як і дефіцит, може призвести до негативних наслідків для здоров'я. Проте в достатній кількості вітамін А є необхідним для нормальної функції численних систем організму.

Печінка виконує основну роль у зберіганні вітаміну А. Також інші органи, зокрема жирова тканина, можуть служити резервуарами для ретиноїдів. Здатність до накопичення вітаміну А виявляється особливо важливою для органів з високою його потребою. У разі дефіциту вітаміну органи можуть користуватись попередньо накопиченим запасом для підтримання необхідного рівня. При необхідності ретиноїди вивільнюються з органів-накопичувачів до крові [49].

Ретинол-зв'язуючі білки (RBP) складають сімейство білків з різними функціями. Вони діють як транспортери, які зв'язують ретинол. RBP синтезується в печінці, при цьому його секреція регулюється концентрацією ретинолу. RBP має ключове значення у транспортуванні ретиноїдів з їжею та їх метаболізмі в ентероцитах і кишечнику [98].

Поглинання харчового вітаміну А відбувається в тонкому кишечнику, де він включається до хіломікронів, що є частинками ліпопротеїнів, що переносять харчові ліпіди з кишечника до інших частин організму. Після потрапляння в кров, вітамін А зв'язується з RBP, білком-транспортером, який виробляється печінкою. Цей комплекс зв'язується з транстиретином, що дозволяє перенести вітамін А до тканин-мішеней [99,100].

RBP формує стійкий комплекс з вітаміном А, який транспортується кров'ю до органів-мішеней. Далі комплекс взаємодіє з рецепторами на поверхні клітин та піддається рецепторно-опосередкованому ендоцитозу, що дозволяє вітаміну А вивільнитися та використовуватися клітиною за необхідності.

Також ретинілові ефіри, які зберігаються в печінці, можуть піддаватися гідролізу, що вивільнює ретинол. Цей ретинол потім зв'язується з RBP і

транспортується до органів-мішеней. Цей механізм допомагає підтримувати стабільний рівень вітаміну А в організмі.

1.4 Патогенетичні механізми фіброзу печінки

Фіброз печінки – це патологічний стан, при якому здорова тканина печінки замінюється сполучною тканиною (колагеном), що призводить до порушення її функції. Розвиток фіброзу печінки може спостерігатися при різних захворюваннях цього органу, таких як гепатити, цироз (Рис. 1.3), алкогольна хвороба печінки та інші [101].

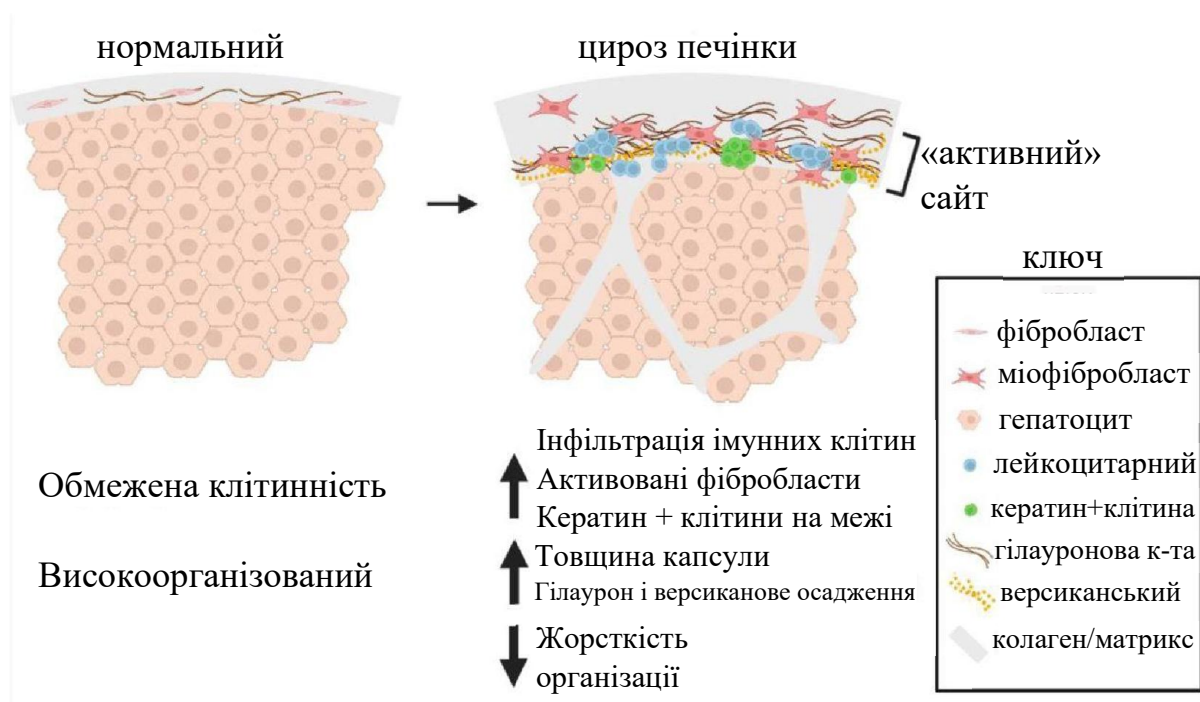


Рис. 1.3 Схематичне зображення позаклітинного матриксу та капсули Гліссона [102].

Фіброз починається з активації клітин Іто печінки (також відомих зірчасті клітини), які відіграють ключову роль у виробництві колагену в печінці. Активація

стелатних клітин може виникнути через різні впливи на печінку, такі як токсини, інфекції, запалення та інші стресові фактори. Під впливом цих факторів стелатні клітини розпочинають виробляти колаген, який відкладається в тканині печінки, замінюючи здорові клітини [103,104,105].

З плином часу кількість колагену в тканині печінки збільшується, що призводить до утворення рубців. Це може впливати на порушення її функції, оскільки сполучна тканина не може виконувати завдання, що впливають з нормальної роботи клітин печінки, таких як очищення крові, синтез білків та нейтралізація токсинів [106].

Цироз печінки призводить до таких ускладнень, як портальна гіпертензія, варикозне розширення вен стравоходу та прямої кишки [101,107,108].

Тривале споживання алкоголю завдає шкоди печінці може призвести до різних форм ураження, починаючи від алкогольного стеатозу до раку печінки. Алкоголь є головною причиною понад 50% випадків цирозу печінки по всьому світу, а алкогольна хвороба печінки (АХП) пов'язана з численними захворюваннями та смертністю, оскільки печінка стає основним об'єктом впливу алкоголю. Окрім алкоголю, у розвинених країнах фіброз печінки спричиняють інфекції вірусного гепатиту В і С, ожиріння та діабет, в менш розвинених країнах також впливають паразитарні інфекції, такі як шистосомоз [14,42].

Алкогольна хвороба печінки протікає через кілька етапів, і зазвичай розвивається наступним чином: алкогольний стеатоз (запалення печінки), алкогольний гепатит, фіброз та цироз печінки, що в кінцевому підсумку можуть вести до гепатоцелюлярного карциноми. Алкогольний гепатит є конкретною патологією, яка швидко переходить до цирозу печінки та печінкової недостатності. Слід підкреслити, що ці стадії можуть проявлятися одночасно у тієї ж особи (наприклад, алкогольний гепатит разом з фіброзом) [13,14].

Певні генетичні фактори можуть впливати на серйозність стеатозу, фіброзу та загальну схильність особи до розвитку серйозних форм алкогольної хвороби

печінки (АХП). Наявність специфічних генетичних поліморфізмів, таких як пататин-подібний домен фосфоліпази, кодуєчий білок 3 (ген PNPLA3), а також індукція гена 11 β -HSD1 та експресія мРНК44, може підвищити ризик та важкість розвитку АХП. Гени, що відповідають за метаболізм алкоголю, такі як алкогольдегідрогеназа, CYP2E1 та ацетальдегідрогеназа, також суттєво впливають на цей процес [109].

Фіброз печінки є реакцією організму на довготривалі ураження печінки та відіграє важливу роль у прогнозі хронічних хвороб цього органу. Цей процес полягає у збільшенні вмісту колагену та інших білків у позаклітинному матриксі печінки. Фіброз супроводжується регенерацією гепатоцитів, що є наслідком постійного запалення та пошкодження цих клітин. В першій стадії фіброз може бути реверсібельним, але ускладнення, які виникають, можуть бути серйозними та не завжди легко піддаються лікуванню. Якщо процес не контролюється, він може призвести до структурних відхилень в печінці, заміщення гепатоцитів та розвитку цирозу [110,111].

Процес формування фіброзу в печінці є динамічним і включає складні клітинні та молекулярні механізми. Ці механізми призводять до постійної активації процесів відновлення тканин, які стають активними після повторних ушкоджень печінки. Коли відбувається некроз клітин та пошкодження позаклітинної матриці, спостерігається процес репарації тканин. У цьому процесі відмерлі клітини замінюються здоровою тканиною, що здійснюється шляхом проліферації клітин, що вижили. В результаті утворюється грануляційна тканина та рубець. Із регенеративними можливостями печінки вона майже повністю відновлюється після гострого пошкодження. Проте у випадку хронічних захворювань цей процес може виявитися менш ефективним [33,40].

Початковим етапом процесу відновлення тканин є активізація запальних клітин, спрямована на запобігання можливим інфекційним агентам і видалення некротичних областей тканини. Зірчасті клітини печінки перерозподіляються до

пошкоджених ділянок і активуються, зазнаючи змін у їхньому фенотипі та збільшенні рухових, проліфераційних та скоротливих властивостей. Однак важливою подією при процесі формування фіброзу печінки є активування зірчастих клітин, яке супроводжується утворенням позаклітинної матриці. Ця матриця вирішальна для фіброгенезу, а в його розвитку беруть участь інші клітини, такі як порталні фібробласти та міофібробласти кісткового мозку [16,33].

Мезотеліальні клітини відіграють роль у формуванні мезотелію на поверхні печінки і мають характеристики, які перетинаються між епітеліальними та мезенхімальними клітинами. Однак при ушкодженні печінки мезотеліальні клітини можуть змінювати свій тип та перетворюватися на міофібробласти, особливо під час розвитку фіброзу. Зазвичай у нормальних умовах печінки міофібробласти майже не присутні, але за певних обставин вони можуть виникнути з капсульних фібробластів або зірчастих клітин печінки. Саме ці міофібробласти відповідають за синтез позаклітинного матриксу [40,42].

Після ушкодження тканин виникає запалення, яке з часом переходить у стан грануляційної тканини. Ця структура відіграє важливу роль у процесі відновлення пошкодженої тканини. Грануляційна тканина характеризується активною проліферацією фібробластів, створенням нових кровоносних судин (ангіогенезом) та відкладенням позаклітинного матриксу. Процес відновлення включає зміну фібробластів у міофібробласти, які володіють характеристиками гладенької мускулатури. Ці міофібробласти оточені особливою базальною мембраною та відіграють важливу роль у формуванні позаклітинного матриксу. Водночас, вони виробляють ферменти, які відповідають за розкладання матриксу, перебудову тканин та створення рубців [40].

У організмі людини печінка виконує ключову роль у метаболізмі алкоголю. Розвиток фіброзу, що відбувається під впливом алкогольної хвороби печінки (АХП), може мати різноманітні причини, включаючи накопичення ацетальдегіду, утворення активних форм кисню (АФК) і надмірне навантаження печінки

ендогенним ліпополісахаридом. Постійне та інтенсивне вживання алкоголю спричиняє підвищене утворення АФК та розлад обміну ліпідів у печінці, що призводить до пошкодження гепатоцитів. Крім того, при фіброзі, який викликаний алкоголем, спостерігається виразна імунна реакція з підвищеним виділенням цитокінів та хемокінів, що призводить до активації зірчастих клітин і, наслідок, розвитку фіброзу печінки. Оглядові механізми розвитку печінкового фіброзу включають гибель гепатоцитів, запалення та активацію клітин Купфера [16,109].

Зазвичай етанол метаболізується гепатоцитами, що призводить до виникнення окислювального стресу та утворення ацетальдегіду. Це спричиняє ушкодження гепатоцитів і активує клітини Купфера, які сприяють активації зірчастих клітин печінки. Ацетальдегід та його похідні, зокрема малоновий діальдегід, направляються на зірчасті клітини, що призводить до збільшення синтезу колагену. При тривалому вживанні алкоголю спостерігається зайве розмноження кишкових бактерій та дисбаланс мікрофлори. Оскільки печінка відіграє важливу роль у системі імунітету, це призводить до збільшення рівня бактеріальних ендотоксинів в печінці, що поглиблює процес фіброзу. Цей ефект посилюється пригніченням функції природних клітин-кілерів через розвиток їхньої толерантності [16,112].

Процес обробки алкоголю в гепатоцитах включає його окислення спочатку до ацетальдегіду, а потім до ацетату. Цей метаболічний процес враховує присутність цитохрому P450 2E1 (CYP2E1), який функціонує при наявності кисню та NADPH. Цей фермент створює альтернативний шлях окислення алкоголю, що стає активнішим при тривалому вживанні. Це може призвести до надлишку відновних еквівалентів, особливо NADH, який може сповільнювати окиснення жирних кислот та циклу трикарбонових кислот, сприяючи формуванню жовчних каменів. Крім цього, активність цитохрому P-450 2E1 може призвести до пошкодження мітохондрій, активації процесу апоптозу та збільшення синтезу ліпідів [15,111].

Окислювальний обмін алкоголю спричиняє формування шкідливих сполук, таких як ацетальдегід та активні форми кисню (АФК). Ацетальдегід, відомий своєю надмірною токсичністю та канцерогенністю, взаємодіє з білками, викликаючи структурні та функціональні зміни в мітохондріях та мікротрубочках. При цьому він також сприяє створенню нових антигенів, які можуть викликати імунну реакцію організму [34,42].

Алкоголь, ацетальдегід та активні форми кисню мають вплив на процес фіброгенезу в печінці, зокрема, активують прямий механізм зірчастих клітин печінки. Ця активація призводить до їхньої морфологічної трансформації в міофібробласти. Міофібробласти розпочинають виробництво прозапальних цитокінів та компонентів позаклітинної матриці. Це додатково поглиблює процес розвитку фіброзу в печінці. Крім того, під впливом алкоголю пригнічуються антифіброгенні механізми, що зумовлює ще більш виражений фіброз печінки [40,106].

Цироз є остаточним етапом прогресування фіброзу, при якому порушується нормальна архітектура печінки. Суттєвою характеристикою є утворення регенеративних вузлів у паренхімі печінки, які розділяються фіброзними перегородками, та значна накопичена кількість фіброзної тканини в органі. Це може призвести до стиснення судин і викликати тромбоз середніх і великих ворітних вен, а також печінкових вен. Продовження розвитку цирозу веде до відмирання паренхіми, що призводить до повної втрати неперервних шарів гепатоцитів. Цироз як правило є необоротним станом, що формується протягом місяців або навіть років, тому вчасне лікування фіброзу є найкращим заходом для профілактики [16,33].

Термін «черевні спайки» або «інтраабдомінальні адгезії» означає стан, коли внутрішні органи черевної порожнини, такі як кишечник, матка, яєчники або селезінка, можуть зростатися разом або «прилипати» один до одного, або до стінок

черевної порожнини через повторювані запалення, травму, хірургічні втручання або інші фактори [40].

Це може спричинити біль, дискомфорт, порушення травлення, оскільки спаечні адгезії можуть обмежувати нормальний рух органів і їх функціонування. У деяких випадках, можуть призвести до ускладнень, таких як кишкова непрохідність [113].

Спайкова хвороба черевної порожнини проявляється широким спектром клінічної симптоматики. При цьому часто фігурують діагнози: неврастенічний синдром, спастичний коліт, гастродуоденіт, дисбактеріоз кишечника. При спайковій хворобі черевної порожнини порушення загального стану виражаються у вигляді астенії, значного схуднення, різних видів диспепсії, пов'язаної з частим больовим синдромом. У хворих розвиваються порушення феномену адаптації до навколишнього середовища [114].

Характер зрощень буває:

1. Площинні та плівчасті зрощення парієтальної очеревини та правої частки печінки

2. Зрощення великого сальника з брижею тонкої кишки та висхідним відділом ободової кишки

Отже, спайки очеревини – це патологічні зв'язки, які зазвичай утворюються між сальником, тонким і товстим кишечником, черевною стінкою та іншими внутрішньочеревними органами. Ці зв'язки можуть бути тонкою плівкою сполучної тканини, товстим фіброзним містком, що містить кровоносні судини та нервову тканину, або прямим зчепленням між поверхнями двох органів [115].

Залежно від етіології спайки очеревини поділяють на вроджені та набуті (післязапальні та післяопераційні) [116]. Також класифікують:

- спайки, що утворилися в операційних ділянках
- спайки, що утворилися *de novo* на неоперованих ділянках
- і спайки, що утворилися після лізису попередніх спайок.

У 1990 році Zuhlke та ін. запропонував класифікацію спайок на основі їх макроскопічного вигляду [117]. Наразі неможливо аналітично стандартизувати спайки. Поширеність спайок після серйозних абдомінальних процедур оцінюється в 63–97 % [114,118,119,120,121]. Лапароскопічні процедури порівняно з відкритою хірургією не продемонстрували значного зменшення загальної кількості післяопераційних спайок [122,123,124,125,126]. Спайки є основним джерелом захворюваності та є найчастішою причиною кишкової непрохідності [113,127], вторинного жіночого безпліддя та позаматкової вагітності [128,129]. Вони також можуть спричиняти хронічний біль у животі та тазовому відділі [130,131,132].

Патогенез утворення спайок включає важливі процеси, спричинені травмою:

I – інгібування систем деградації фібринолітичної та екстрацелюлярної матриці [133,134];

II – індукція запальної відповіді, що включає продукцію цитокінів і фактору росту- β (TGF- β 1), ключового регулятора фіброзу тканин [135,136,137];

III – індукція тканинної гіпоксії після переривання доставки крові до мезотеліальних клітин і субмезотеліальних фіброblastів, що призводить до посилення експресії індукованого гіпоксією фактора-1 α [138,139] і фактору росту ендотелію судин, відповідального за утворення колагену та ангиогенез [139].

Але жоден з методів не був визнаний оптимальним в уникненні формування спайок [140]. Сучасні стратегії профілактики розмаїті, починаючи від використання фізичних бар'єрів до введення фармакологічних агентів, рекомбінантних білків, антитіл і генної терапії, але жодна з них не дає постійно задовільних результатів. Окремі терапевтичні стратегії, як правило, мають низьку ефективність у запобіганні перитонеальних спайок через складну природу патогенезу цього явища. Велика кількість літератури на цю тему демонструє як складність проблеми, так і величезний обсяг ресурсів, вкладених у вивчення цього стану, до того часу, поки вона не буде досліджена більш глибоко.

Мікроскопічно очеревина складається з одного шару зчеплених плоских, полігональних клітин (поверхневих та мезотеліальних клітин), поверхня яких волога і формує блискучу сторону очеревини. Під ним знаходиться прошарок сполучної тканини, в якому можна виявити фібробласти, гістіоцити та лімфоцити, а також плазматичні клітини соскоподібного відростка.

Субсерозний шар, як шар ковзання або зміщення, складається з крові, лімфатичних судин, нервів та жирових клітин [114].

Зокрема в ділянці діафрагмальної очеревини є прорихи, через які може відбуватися обмін корпускулярними частинками.

На відміну від фазоподібного загоєння зовнішніх поверхонь тіла, рана загоєння вісцеральної та парієтальної очеревини відбувається наступним чином: великі серозні дефекти не покриваються ступінчасто, починаючи з краю рани, але покриваються швидко і синхронно по всій поверхні мезотеліальними клітинами.

Ці клітини походять із підлеглої сполучної тканини. Таким чином, він здатний усунути навіть більші дефекти за короткий проміжок часу. Підлегла тканина відстає від цієї поверхневої реституції, і після загоєння залишаються рубці [123].

Крім механічного пошкодження серозу, антитіла, некрози, залишки крові, бактерії та токсини, а також фізичні та хімічні агенти призводять до пошкодження тканин. Після пошкодження дуже чутливі мезотеліальні клітини, відбувається потік медіаторів, таких як серотонін, брадикінін, гістамін і простагландини, що призводить до збільшення проникності судин і призводить до екстравазації серозногнійної рідини в черевну порожнину. Через супутню екстравазацію фіброгену, фібрину розвивається через вплив вивільненої тканинної тромбокінази, та утворюють пухку тривимірну мережу. Це зрештою викликає адгезію прилеглих серозних поверхонь [120,121].

Під час нормального загоєння фібрин розщеплюється на продукти розпаду фібрину, шляхом запуску фібринолітичної системи. Плазміноген активується

ендогенними активаторами, а також цитокіназою мезотелію. Це є необхідною умовою для швидкого відновлення та загоєння без спайок [124].

Отже, центральною ланкою у патофізіології спайок є динамічний баланс між утворенням фібрину та фібринолізом. Експериментальні дослідження показали що спонтанна фібринолітична активність очеревини знижується травмою та ішемією [131].

В результаті фібринозні спайки не лізуються, а утворюється більш жорстка мережа фібрину, що є природним шляхом для проліферації фібробластів. Багаті ергастоплазмою фібробласти виробляють різні компоненти екстракліткового матриксу, включаючи колаген (білок, який утворює жорстку фіброзну структуру в екстракліткового матриксу і відіграє важливу роль у підтримці структури і пружності тканин) і тропоколаген (попередник колагену, бере участь у процесі синтезу колагену).

Висновки до розділу 1.

Печінка є ключовим органом метаболізму, він безпосередньо бере участь і регулює велику кількість як синтетичних процесів, так і процесів розпаду і детоксикації ендogenous і екзогенних сполук. При метаболічному «навантаженні» клітини печінки, і перш за все, гепатоцити, клітини Іто, клітини Купффера здатні змінити свої структурно-функціональні характеристики, які спрямовані на збереження гомеостатичних характеристик організму. Слідство таких змін, зокрема при дії етилового спирту, важких металів та інших токсичних сполук, має місце формування фіброзу печені. У тому випадку, якщо дія цих токсикогенних факторів продовжується тривалий час, фіброз може переходити в цироз і гепатоцелюлярні раки, які є необоротними небезпечними станами. У зв'язку з цим попередження фіброзу є важливою біомедичною проблемою гепатології. Показано, що розвиток фіброзу печені супроводжується зменшенням вмісту вітаміну А в клітинах печінки.

Чисельні дослідження дії вітаміну А на розвиток фіброзу печінки суперечливі. Вирішення питання про роль вітаміну А в розвитку фіброзу має велике теоретичне і практичне значення. Це принципово важливе питання може бути вирішено тільки на експериментальних біологічних моделях. Така модель була розроблена в нашій лабораторії [9].

Головне обмеження дослідження теми дисертації: Дослідження імовірних механізмів дії вітаміну А пов'язані з низкою методичних труднощів і насамперед дослідженням динаміки як метаболізму вітаміну А, так і метаболічних процесів у печінці в системі *in vivo*. В існуючих дослідженнях цієї проблеми проводять визначення показників у різні періоди розвитку фіброзу, після чого проводять часову реконструкцію можливих динамічних змін. Однак такий підхід завжди буде пов'язаний із низкою припущень, які важко перевірити експериментально. Дослідження на одній моделі електропровідності тканини та морфологічних і функціональних змін печінки в доступній нам літературі не зустрічалося. Це ускладнювало роботу, тому що потрібно було перевірити діапазон частот, відпрацювати низку методик зі зміною властивостей тканини.

Пояснення суперечливості наявних даних може дати змогу обґрунтувати й реалізувати на практиці лікування низки патологій печінки. Необхідно провести методичні поглиблені дослідження, які б дали змогу робити висновки щодо можливого взаємозв'язку організування клітин тканини та електропровідності. Оскільки на електропровідність впливає не тільки організація клітин, а й міжклітинні контакти та їхні особливості, які також пов'язані з фіброзом і можуть змінюватися під час розвитку фіброзу та зміни функціональних характеристик.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [9-12].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Характеристика об'єкта досліджень

У дослідженнях використовували здорових трьох місячних (80 – 130 г) щурів – самців лінії Wistar (Вістар), отриманих з віварію науково – дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна.

Тварин утримували за стандартних умов з температурою 20 ± 2 °С, відносній вологості 60% та з вільним доступом до їжі та води.

Усі маніпуляції проводили згідно із затвердженим протоколом №1 біоетичним комітетом Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна від 26 вересня 2023 року, що керується положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.) [141]. Розчин введених речовин перераховували на масу тіла (одноразова доза не перевищувала об'єм 1 мл на тварину).

Для оцінки фізико-хімічних та морфологічних характеристик організму щурів, в тому числі сироватки крові та тканин печінки визначали:

- анатомічні та гістологічні препарати печінки щурів;
- електропровідність сироватки крові, тканин та гомогенату печінки, виділених у експериментальних тварин, як інтегрального показника заряджених і рухомих в електричному полі іонів, малих молекул в клітині та їх діелектричних включень;
- біохімічні показники сироватки крові, як показники функціональної активності печінки (Аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатаміно-трансфераза

(АСТ), гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ), лужна фосфатаза) та кількісний вміст вітаміну А в гомогенаті печінки.

Для оцінки адаптивної відповіді на рівні клітин печінки у молодих тварин з метою індукування фіброзу печінки тваринам вводили сірчаноокислу мідь, що супроводжувалося інтоксикацією організму [1]. Вміст іонів міді визначали на атомно – адсорбційному спектрофотометрі С-115-М1 (Україна).

Хронічна інтоксикація в нашій експериментальній схемі реалізовувалася через триразове введення сірчаноокислої міді в дозі 1 мг/100г маси тіла з інтервалом 48 годин.

Тварин декапітували під ефірним наркозом. Перші краплі крові збирали в пробірки з ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для дослідження гематологічних показників (кількісно лейкоцити, лімфоцити, моноцити, гранулоцити, тромбоцити та еритроцити), які оцінювали на автоматичному аналізаторі Mindray BC-2800 Vet. (США) [142]. Решту крові збирали у стерильні пробірки та інкубували їх за 37°C 20 хв для подальшого центрифугування за 1500 g 20 хв. Супернатант переносили в чисті пробірки і використовували для визначення ферментів сироватки.

Після розтину черевної порожнини проводили анатомічні дослідження: оцінювали ступінь утворення сполучнотканинних спайок навколо лопастей печінки [143]:

1-3 бали – низький рівень спайкової хвороби;

4-5 бали – високий рівень спайкової хвороби, у разі повного об'єднання лопастей сполучною тканиною.

Після декапітації тварин відбирали зразки крові та печінки для подальших визначень у цих тварин активності АЛТ, АСТ, ГГТ, лужної фосфатази та вмісту вітаміну А, морфологічної оцінки характеристик тканин печінки, електропровідності сироватки крові, тканин та гомогенату печінки молодих тварин.

У зв'язку з цим у роботі перевіряли можливість зміщення рівноваги в печінці в бік регенерації. Для цього тваринам на початкових стадіях Cu-індукованого фіброзу печінки вводили вітамін А і ці самі тварини продовжували перебувати під впливом індуктора фіброгенезу (повторного циклу триразового введення сірчаноокислої міді), а потім визначали динаміку маси тіла, що є інтегральним показником функціонального стану організму, морфологічні характеристики печінки, а про здатність до регенерації печінки судили за кількістю двоядерних гепатоцитів.

2.2 Експериментальна схема підготовки тварин до дослідження

Для проведення дослідження впливу вітаміну А на Cu-індукований фіброз печінки, формування фіброзу було розподілено на дві стадії: гостру та хронічну. Внаслідок чого були розроблені дві схеми індукування фіброзу печінки в експериментальних групах тварин, виходячи з цього формувалася схема експерименту таким чином (Рис. 2.1, Рис. 2.2):

група I – інтактний контроль (тварини не отримували експериментальних впливів);

група II – гостра інтоксикація (1 цикл введень сірчаноокислої міді, внутрішньочеревні ін'єкції): в дозі 1 мг сірчаноокислої міді ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) із розрахунку на 100 г маси тіла тричі з інтервалом між введеннями 48 годин

група III – хронічна інтоксикація (2 цикли введень сірчаноокислої міді, внутрішньочеревні ін'єкції): тварини отримували в дозі 1 мг сірчаноокислої міді ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) із розрахунку на 100 г маси тіла тричі з інтервалом між введеннями 48 годин, через 24 години після введення сірчаноокислої міді отримували per os фізіологічний розчин в об'ємі, що відповідало обсягу хлорогенової кислоти, що вводиться, мікс-фактору і вітаміну А, а після цього повторний цикл введення сірчаноокислої міді (тричі $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ з інтервалом 48 годин);



Рис. 2.1 Схема експериментальних введень досліджуваним групам тварин, де: I – інтактна група тварин, які отримували фізіологічний розчин в об'ємі введень (мл), який відповідає об'єму введень масляному розчину вітаміну А або розчину хлорогенової кислоти, або мікс-фактору; II — експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді (три внутрішньочеревні введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); III — експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні фізіологічний розчин per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; IV — експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; V — експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні розчин хлорогенової кислоти (0.02 г/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; VI — експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні мікс-фактор (0.05 мл/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді.

група IV – через 24 години після першого циклу введення сірчаноокислої міді тварини отримували per os вітамін А в дозі 300 МО (0.10 мг ретинол ацетату на 100 г маси тіла), після чого тварини отримували другий цикл введення сірчаноокислої міді;

група V – через 24 години після першого введення сірчаноокислої міді тварини отримували per os хлорогенову кислоту (ХГК) в дозі 20 мг на 100 г маси тіла виділену зі шроту соняшника, після чого тварини отримували другий цикл введення сірчаноокислої міді;

група VI – через 24 години після першого циклу введення сірчаноокислої міді тварини отримували per os мікс-фактор в дозі 0,05мл на 100 г маси тіла, після чого тварини отримували другий цикл введення сірчаноокислої міді.

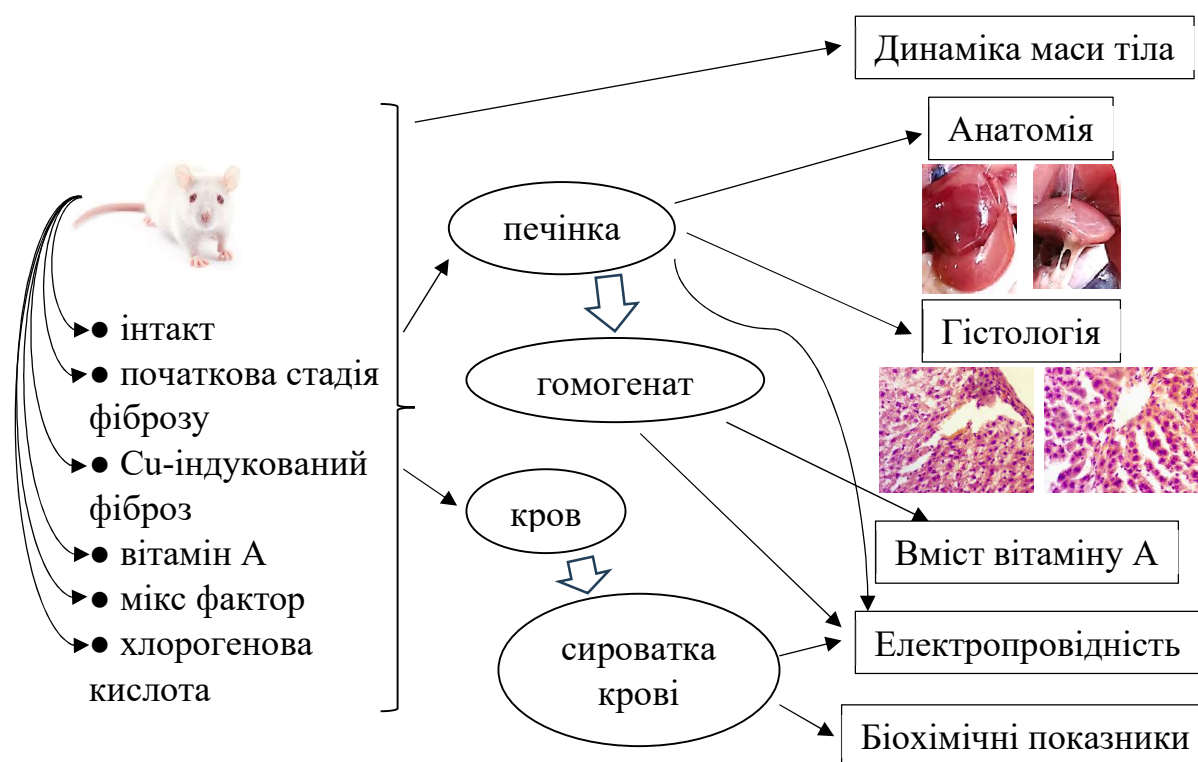


Рис. 2.2. Схема розподілення матеріалів та методів дослідження

За стандартною методикою режим годування для виключення фактору активації добових процесів метаболізму та як наслідок активації гепатоцитів за 12 годин до декапітації тварин, щури були позбавлені стандартного раціону годування.

У дослідженні використовували короткочасну водну екстракцію ХГК із соняшникового шроту, з подальшим хроматографічним очищенням ХГК на колонках із сефадексом G-50 (висота колонки 400 мм, діаметр 25 мм, швидкість елюції 0.9-1.2 мл за хвилину) та спектральним аналізом 200-400 нм (SHIMADZU UV-2600 spectrophotometer, Japan). Екстракцію ХГК проводили стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при перемішуванні 2 оберти/хв упродовж 2 хв.

В дослідженнях використовувалася суспензія мікс-фактора, що є харчовою добавкою, отриманою згідно ТУУ 10.8 -33206207 -002: 2018. Це натуральний комплекс, отриманий шляхом культивування грибів *Pleurotus ostreatus* у водній культурі з подальшим очищенням екзометаболітів грибів. Мікс-фактор нетоксичний, має імуномодулюючу та гепатотропну дію [144], усуває токсичну дію мідного купоросу [145].

2.3 Методика фізіологічної та морфологічної оцінки з Си-індукованим фіброзом печінки

2.3.1 Методика визначення маси тіла, органів та міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки

Динаміку росту маси тіла тварин проводили кожну 3 добу перед введенням сірчаноокислої міді та/або перед введенням ретинолу, хлорогенової кислоти або мікс-фактору для того, щоб розрахувати дозу введення препарату із розрахунку на 100 г маси тіла щура. Таким чином, в рамках експерименту формувалася таблиця залежності зміни маси тіла від факторів впливу, що вводилися, на тварин.

Під час розтину оцінювалися анатомічні показники такі як зовнішній вигляд, а саме: колір печінки, маса печінки, зрощення лопастей печінки між собою, наявність сполучнотканинних тяжів від печінки до черевної порожнини, до кишечника або до інших внутрішніх органів. Таким чином оцінювали ступінь спайкової хвороби та фіброзу печінки у тварин.

Фіброз оцінювали за стадіями (4-бальною шкалою):

Стадія 0 (F0) – фіброз відсутній, колір нормальний (світло-коричневий), зрощення лопастей печінки відсутні;

Стадія 1 (F1) – початкова стадія фіброзу, колір коричневий, лопасті починають зрощуватися;

Стадія 2 (F2) – фіброз, колір змінений до багрово-коричневого, лопасті печінки дещо зрощені;

Стадія 3 (F3) – передциротична стадія фіброзу колір темно-коричневий, зерниста структура печінки, всі лопасті печінки зрощені, краї округлі та щільні;

Стадія 4 (F4) – цироз печінки, печінка не має чіткої структури та форми.

Спайкову хворобу оцінювали за стадіями (5-бальною шкалою):

Стадія 0 – відсутність спайок;

Стадія 1 (1-3 бали) – печінка покривається сполучно-тканинним утворенням, має білястий колір;

Стадія 2 (4-5 балів) – сполучнотканинне утворення розростається по внутрішній порожнині між органами та має більш високу щільність з'єднання.

Масу печінки вимірювали на аналітичних вагах одразу після декапітації тварин та вилучення її з порожнини тіла. Надалі ця маса враховувалася при розрахунках відносної маси печінки (залежність маси печінки від маси тіла на момент декапітації).

Після того, як відбирався зразок печінки для подальших гістологічних досліджень, залишки печінки зважували повторно для того, щоб розраховувати

співвідношення сухого залишку сполучної тканини в печінці до маси печінки з якого його було отримано.

2.3.2 Методика виділення тканин печінки, приготування гістологічних препаратів та підрахунок двоядерних гепатоцитів

Для гістологічного дослідження брали фрагменти печінки та фіксували їх у 10% розчині формаліну. Зразки обробляли, як описано в роботі [146]. 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 200.

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 кожену 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 [147].

Гістологічні особливості були інтерпретували за схемою, описаною Brunt et al. [148].

Запалення оцінювалося за 4-бальною шкалою [143]:

Ступінь 0 - запалення відсутнє або незначне,

Ступінь 1 - легке,

Ступінь 2 - помірне,

Ступінь 3 - тяжке.

Для оцінки кількості двоядерних гепатоцитів використовувалися ті самі гістологічні препарати, що і для оцінки морфологічних змін печінки, отримані за методикою, описаною вище [146]. Підрахунок кількості двоядерних гепатоцитів проводився одночасно з морфологічною оцінкою препарату. Мікроскопія: microscope Carl Zeiss, камера SIGETA M3CVOS 14000, збільшення 400.

Для мінімізації статистичної похибки рахувалося по 100 клітин в трьох полях зору в кожному з трьох гістологічних препаратів печінки однієї тварини з однієї дослідної групи.

2.4 Вимірювання біохімічних показників у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки

2.4.1 Методика визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), глутаміламінотрансферази (ГГТ), лужної фосфатази

Оцінка пошкодження клітин печінки проводиться шляхом визначення сироваткової аспартатамінотрансферази (АСТ) та сироваткової аланінамінотрансферази (АЛТ).

АСТ виявляється в печінці, серцевому м'язі, скелетних м'язах, нирках, мозку, підшлунковій залозі, легнях, лейкоцитах та еритроцитах, тоді як АЛТ міститься

переважно в печінці. Ці ферменти зазвичай вивільняються в плазму з постійною швидкістю через запрограмовану загибель клітин гепатоцитів, але проникність гепатоцитів підвищується при пошкодженні клітинної мембрани печінки [149].

Таким чином, АЛТ є більш специфічним для печінкового некрозу порівняно з АСТ. АЛТ присутня тільки в цитоплазмі печінки, тоді як АСТ міститься як в цитоплазмі гепатоцитів (сAST), так і в мітохондріях (mAST), причому приблизно 80% загальної активності АСТ в печінці людини припадає на mAST [150].

Дослідження вмісту АЛТ (набір А7426-150), АСТ (набір А7461-150), ГГТ (набір G7471-150) та лужної фосфатази (набір А7416-150) проводились згідно з рекомендаціями виробника наборів (Global scientific, USA) для визначення відповідних ферментів сироватки крові при температурі 37 градусів, інкубації 60 секунд і часу визначення 60 секунд на біохімічному аналізаторі STAT-FAX 1908 (США). Активність виражали в умовних одиницях. Контроль якості перевіряли при кожному експерименті, використовуючи контрольну сироватку з набору (Global scientific, USA) з відомими нормальними (рівень 1) та підвищеними (рівень 2) рівнями АЛТ, АСТ, ГГТ та лужної фосфатази відповідно. Чутливість методів дослідження вмісту вище зазначених біохімічних показників була оцінена за допомогою 10-кратного повторення вимірювань фізіологічного розчину в якості контрольного зразка та контрольних сироваток з відомими концентраціями в якості дослідних зразків.

Метод заснований на роботі Кармена та ін. [151]. Метод ґрунтується на тому, що **аспартатамінотрансфераза (АСТ)** каталізує перенесення аміногрупи від L-аспартату до а-кетоглутарату з утворенням оксалацетату та L-глутамату. Оксалацетат піддається відновленню з одночасним окисленням NADH до NAD в індикаторній реакції, що каталізується малатдегідрогеназою (MDH). Результуюча швидкість зменшення поглинання при 340 нм прямо пропорційна активності АСТ. Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) додається для запобігання втручанню ендогенного

пірувату, який зазвичай присутній в сироватці крові. Вимірювання проводили при співвідношенні зразка сироватки крові до реагенту 1:11.

Активність **аланінамінотрансферази (АЛТ)** (ЕС 2.6.1.2) у сироватці крові визначали, як описано в [152] АЛТ каталізує перехід аміногрупи від L-аланіну до α -кетоглутарату, що призводить до утворення пірувату та L-глутамату. Результиуюча швидкість зниження абсорбції пропорційна активності АЛТ. Поглинання визначали при довжині хвилі 340 нм при співвідношенні зразка сироватки крові до реагенту 1:11.

Активність **лужної фосфатази** (ЕС 3.1.3.1) у сироватці крові визначали за методикою [153]. У реакції для визначення цього ферменту п-нітрофенілфосфат гідролізується до п-нітрофенолу та неорганічного фосфату. Рівень гідролізу п-НФП прямо пропорційний активності лужної фосфатази. Поглинання визначали при довжині хвилі 405 нм при співвідношенні зразка сироватки крові до реагенту 1:41.

Метод визначення активності **γ -глутаміламінотрансферази (ГГТ)** заснований на тому, що γ -глутаміламінотрансфераза (КФ 2.3.2. 2) каталізує перехід глутамінової групи L- γ -глутамілкарбокси-4-нітроаніліду до гліцилгліцину з утворенням 5-аміно-2-нітробензоату, кількість якого прямо пропорційна активності ГГТ і кінетично вимірюється при довжині хвилі 405 нм (STAT FAX 1908, США) [154]. Поглинання визначали при довжині хвилі 405 нм при співвідношенні зразка сироватки крові до реагенту 1:11.

2.4.2 Методика визначення вмісту вітаміну А в печінці

Вміст **вітаміну А в печінці** визначали за відомою методикою [155], яка базується на комплексоутворенні вітаміну з ефіратом трифториду бору та визначенні швидкості розпаду цього комплексу, яка прямо пропорційна концентрації вмісту вітаміну А в дослідному зразку.

Хід аналізу. Наважку печінки 0,1-0,5 г розтирають з безводним сульфатом натрію до однорідної маси у фарфоровій ступці. Додають 7-10 мл хлороформу, перемішуючи вміст, залишають для екстракції на 10-15 хвилин. Після цього вміст ступки фільтрують у мірну пробірку через паперовий фільтр, промивають ступку та вміст на фільтрі малими порціями хлороформу та об'єм у пробірці доводять до 15 мл.

Для аналізу відбирають 0,5-5,0 мл хлороформеного екстракту (загальний обсяг доводять до 5 мл хлороформом). По стінках пробірки нашаровують 1 мл кольорореагенту (ефірату трифториду бору) на екстракт, щоб він не перемішувався з екстрактом.

Через 30 секунд після початку збовтування проводять перше вимірювання оптичної щільності на СФ UV-2600 VIS SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU (Японія) на помаранчевому (7-му) світлофільтрі (довжина хвилі 610 нм) в кюветі проти повітря. Через 1 хвилину після першого виміру (тобто через 1,5 хвилини після початку збовтування) проводять другий вимір на тій же довжині хвилі. Обробляли дані в фірмовому програмному забезпеченні SHIMADZU – UVProbe Ver.2.61.

Визначають різницю між двома вимірами та розрахунок ведуть за формулою:

$$X = \frac{(E_1 - E_2) \times V}{V_1 \times m} \times 100, \quad (2.1)$$

де: X – кількість вітаміну А у зразку, мкг/г

E1 – величина першого виміру;

E2 – величина другого виміру;

V – загальний обсяг екстракту, мл (15);

V1 – обсяг екстракту, взятий на аналіз, мл;

100 – коефіцієнт перерахунку мкг;

m – наважка, г.

2.5 Вимірювання електропровідності тканин печінки та сироватки крові

В рамках роботи проводили вимірювання електропровідності зразків цільної тканини печінки та двох рідких середовищ: гомогенізованої тканини печінки та сироватки крові.

Електропровідність вимірювали за допомогою векторного аналізатора «Rohde & Schwarz» ZNB 40 та тефлонової вимірювальної комірки ємністю 400 мкл (Рис. 2.3, а).

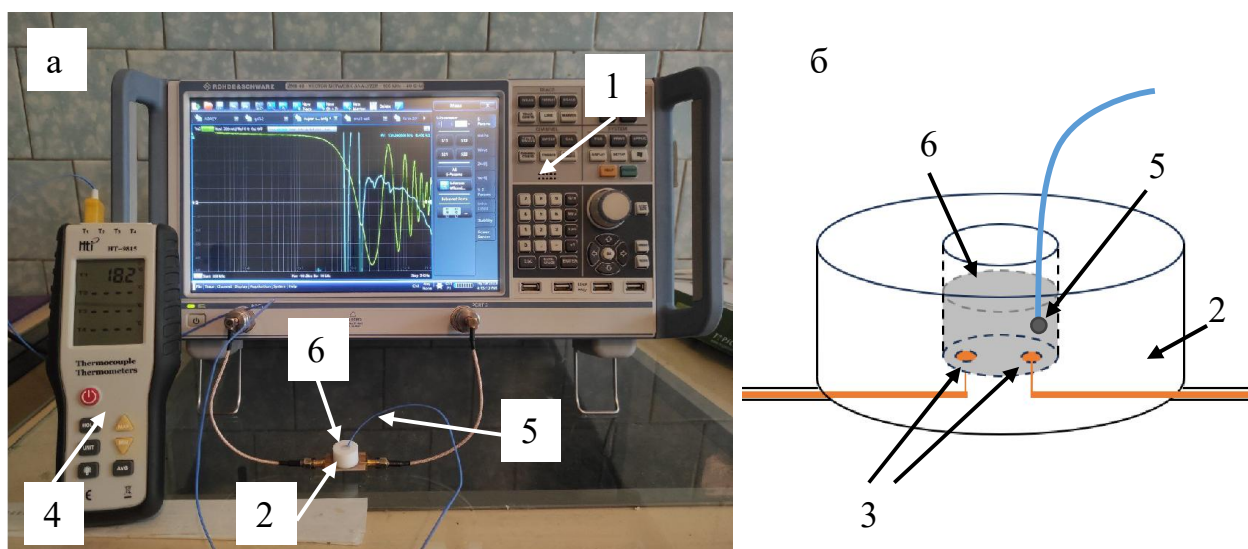


Рис. 2.3. Фотографія експериментальної установки для вимірювання електропровідності (а) та схематична будова вимірювальної комірки (б). 1 – векторний аналізатор, 2 – тефлонова вимірювальна комірка, 3 – електроди вимірювальної комірки, 4 – термометр, 5 – термопара, 6 – досліджуваний зразок.

«Rohde & Schwarz» ZNB 40 використовувався в наступному режимі роботи: через тефлонову комірку, під'єднану до портів векторного аналізатора, пропускається скануючий електромагнітний сигнал в діапазоні частот 100 кГц – 10 МГц та вимірюються коефіцієнти пропускання сигналу S_{21} . За

коефіцієнтами пропускання програмне забезпечення векторного аналізатора дозволяє автоматично розраховувати дійсну $Re(Z \leftarrow S_{21})$ та уявну $Im(Z \leftarrow S_{21})$ частини імпедансу Z вимірювальної комірки.

Електропровідність є зворотною величиною активного опору $1/R$. Активний опір R розраховували за дійсною та уявною частинами імпедансу за формулою, виведеною для еквівалентної електричної схеми вимірювальної комірки [156]:

$$R = Re(Z \leftarrow S_{21}) + \frac{Im(Z \leftarrow S_{21})^2}{Re(Z \leftarrow S_{21})}. \quad (2.2)$$

Електропровідність досліджуваного зразка є характеристикою матеріалу цього зразка, а також залежить від його геометричних параметрів, а у випадку рідин – геометричними параметрами комірки. Щоб виключити вплив геометричних параметрів, вимірювали питому електропровідність σ досліджуваного зразка:

$$\sigma = k \cdot \frac{1}{R} = \frac{k}{Re(Z \leftarrow S_{21}) + \frac{Im(Z \leftarrow S_{21})^2}{Re(Z \leftarrow S_{21})}}. \quad (2.3)$$

Коефіцієнт $k = 400 \text{ м}^{-1}$ враховує геометричні параметри вимірювальної комірки, підлягає одноразовому визначенню для спроектованої циліндричної комірки (Рис. 2.3, б) з використанням калібрувальних розчинів з відомою питомою електропровідністю та залишається незмінним в ході експерименту.

Розрахунок значень електропровідності σ на кожній частоті в досліджуваному діапазоні проводився за формулою (2.3) із масиву значень $Re(Z \leftarrow S_{21})$ та $Im(Z \leftarrow S_{21})$ за допомогою програми MS Excel.

2.5.1 Контроль температури при вимірюванні електропровідності

Електропровідність речовин, і зокрема біологічних зразків, залежить від температури [157]. Це може бути зумовлено впливом температури на низку процесів, що зумовлюють механізми електропровідності: на утворення іонів та їх рухливість, на утворення та розпад надмолекулярних комплексів, що містять у своєму складі некомпенсований електричний заряд, та інші.

Оскільки в роботі не ставилася мета дослідити залежність електрофізичних властивостей досліджуваних зразків від температури, необхідно усунути можливий вплив температури, проводячи вимірювання при фіксованій температурі.

Вимірювання температури досліджуваних зразків проводилося за допомогою цифрового контактного термометра Hti HT-9815з датчиком температури на термопарі типу К (хромель-алюмель) (Рис. 2.3, а). Температуру досліджуваних зразків перед вимірюванням електропровідності доводили до кімнатної, яка дорівнювала близько 21 °С та в рамках одного експерименту підтримувалася постійною з точністю до 0,2 °С. Температуру зразків вимірювали безпосередньо перед вимірюванням електропровідності, але не одночасно, оскільки присутність термопари як провідника в безпосередньому контакті із вмістом вимірювальної комірки впливає на його електропровідність.

2.5.2 Електропровідність тканин печінки

Електроди вимірювальної комірки розташовані на її дні (Рис 2.4), що передбачає роботу зі зразками тканини, оскільки облегшує щільний контакт електроду з досліджуваним зразком та усуває вплив його деформацій, порівняно з розташуванням електродів на бічних стінках комірки.

Для вимірювання електропровідності тканини печінки відбирали вирізані за допомогою пробійника циліндричні зразки тканини діаметром 8 мм, що відповідає внутрішньому діаметру комірки (Рис. 2.4). Вимірювання кожного зразка тканини проводилося по 4 рази, з вилученням зразка із комірки та її промивкою дистильованою водою після кожного вимірювання. В результатах представлені середні значення та стандартна помилка.

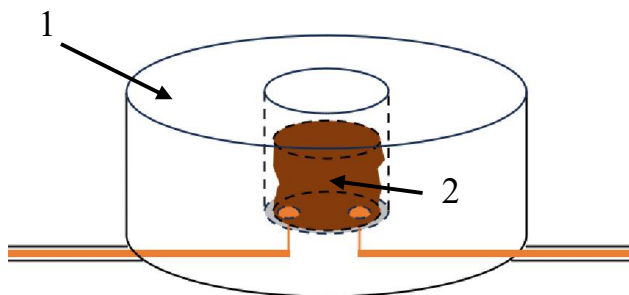


Рис. 2.4. Схематична будова вимірювальної комірки (1) та поміщеного в неї для вимірювань зразка тканини печінки (2).

2.5.3 Вимірювання електропровідності рідких середовищ: гомогенізованої печінки та сироватки крові

При вимірюванні електропровідності рідких середовищ зразки приймають форму вимірювальної комірки та проблеми контакту досліджуваного зразка з електродами не виникає. Для вимірювань в вимірювальну комірку поміщали фіксовану кількість рідини (400 мкл), вимірювання кожного зразка проводилося одноразово, оскільки різниця багаторазово виміряних значень для однорідних рідких зразків не перевищує 1 %.

Для дослідження електропровідності тканин печінки з порушеною структурою отримували гомогенізовану печінку в двох формах. Зразки тканини печінки пропускали через прес та гомогенізатор, частину отриманої гомогенізованої таким способом тканини відбирали для вимірювання електропровідності. Решту гомогенізованої тканини розводили в розчині NaCl з концентрацією 0,9 % в пропорції 1 г гомогенату на 4 мл розчину NaCl з наступним вимірюванням електропровідності.

Для дослідження електропровідності сироватки крові сироватку виділяли з цільної крові за стандартною процедурою.

2.6 Статистичний аналіз даних

Отримані дані були аналізовані статистично за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA та непараметричного критерію Манна-Уїтні при ненормальному розподілі при невеликій (менше 30) кількості тварин в експериментальній групі. Використовувалося програмне забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Визначали середні значення та стандартні помилки вимірюваних величин. Значущі відмінності між контрольною та експериментальною групами були визнані при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Висновки до розділу 2

У дослідженні використовували адекватні морфологічні, фізіологічні, гістологічні, біохімічні та біофізичні методи дослідження. Такий набір методів дав змогу отримати об'єктивні та достовірні результати.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [9-12].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження впливу вітаміну А на деякі фізіологічні та морфологічні характеристики у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки

3.1.1. Вміст іонів міді та вітаміну А в печінці тварин із Cu-індукованим фіброзом.

В якості основної моделі дослідження використовувалася модель Cu-індукованого фіброзу печінки, робота з якою супроводжувалася контролем вмісту іонів Cu^{2+} в печінці, яка виступає органом-мішенню. Результати вимірювань показали, що печінка інтактних контрольних тварин містила невелику кількість іонів міді, які були рівномірно розподілені між мітохондріями та мембранами ендоплазматичного ретикулума (Табл. 3.1, група I). Після триразового введення сульфату міді з інтервалом 48 год між ін'єкціями вміст іонів міді в тканині печінки збільшувався більш ніж у 150 разів (Табл. 3.1, група II).

Таблиця 3.1

Формування фіброзу печінки, смертність тварин, вміст іонів міді в печінці.

* позначено достовірні значення порівняно з інтактним рівнем.

Групи	Формування фіброзу (%)	Смертність (%)	Вміст Cu^{2+} в печінці (мкг/г сухої р-ни)
I (Контроль)	0	0	0,048
II (Фіброз)	75	41	8,04 *
III (Фіброз + Віт А)	91	6	-
IV (Віт А)	0	0	-

При цьому характер розподілу міді в клітинних компартментах змінився. Так, у фракції мітохондрій накопичувалося значно більше іонів міді, ніж у фракції ендоплазматичного ретикулума (Табл. 3.1, група II).

На тлі збільшення кількості іонів міді в печінці вміст вітаміну А знизився в 4 рази в групі з Cu-індукованим фіброзом (Рис. 3.1 а, крива II). Надалі, через 7 днів, вміст вітаміну А збільшився порівняно з рівнем 4-ї доби та залишався нижчим за контрольний рівень, а на 14-ту добу його вміст не відрізнявся від контролю (Рис. 3.1 а, крива II).

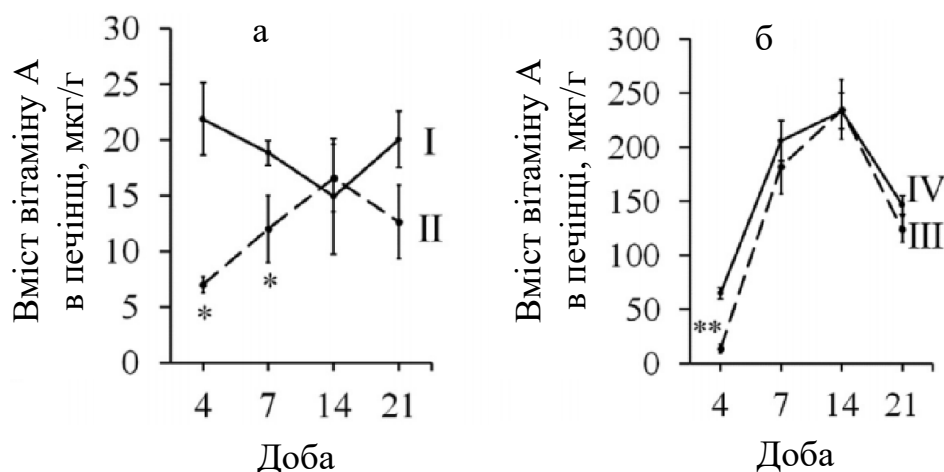


Рис. 3.1. Вміст вітаміну А в тканині печінки (а. б) у інтактних контрольних тварин- (I); у дослідних тварин, яким тричі вводили сульфат міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 год між ін'єкціями- (II); у тварин, яким тричі вводили сульфат міді (1 мг/100 г маси тіла), а через 24 год - вітамін А щодня протягом 21 дня в дозі 300 МО/100 г маси тіла- (III); інтактні тварини, яким вводили вітамін А щодня в дозі 300 МО/100 г маси тіла- (IV); вміст вітаміну А визначали через 4, 7, 14 та 21 добу після останнього введення міді; СЕ показано * Достовірні значення ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем (ANOVA); ** Відзначено значущість ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем з вітаміном А (ANOVA)

Однак на 21-й день після введення мідного купоросу вміст вітаміну А знову став нижчим від контрольних значень на 37% (Рис. 3.1 а, крива II), при цьому відмінності між контролем та експериментом були незначними (Рис. 3.1 а, крива II).

Вміст вітаміну А в печінці 3-місячних контрольних тварин становив 16-18 мкг/г тканини і зберігався на цьому рівні впродовж 21 дня спостереження (Рис. 3.1 а, крива I).

В рамках дослідження впливу введення вітаміну А на характеристики тварин експериментальних груп, досліджували змінення вмісту вітаміну А в печінці при його введеннях (рис. 3.1 б) згідно з описаною методикою. Щоденне введення вітаміну А інтактним тваринам супроводжувалося лінійним збільшенням його вмісту в печінці до 7 діб, після чого швидкість депонування вітаміну сповільнювалася з 7-ї до 14-ї доби, і надалі його вміст у печінці знижувався на тлі щоденних введень вітаміну А (Рис. 3.1 б, крива IV). Після цього, незважаючи на тривале надходження вітаміну А в організм, його вміст у печінці знижувався (рис. 3.1 б, крива IV).

У разі коли вітамін А вводили в тій самій дозі та за тією самою схемою тваринам із Cu-індукованим фіброзом печінки, то його вміст на 4-ту добу від початку введення був удвічі нижчим порівняно з тваринами, які одержували вітамін А (Рис. 3.1 б, крива III).

Однак якщо в групі контрольних тварин вміст вітаміну А на 7-й день щоденних введень збільшився в 10 разів від вихідного рівня, то у тварин із фіброзом за цей період він збільшився в 15 разів від вихідного рівня.

При цьому абсолютні значення в контрольній і дослідній групах не відрізнялися одне від одного (Рис. 3.1 б). Відмінностей між досліджуваними групами через 14 і 21 добу експерименту не виявлено.

Отже, збільшення вмісту іонів міді в печінці супроводжувалося зниженням вмісту вітаміну А. Причому щоденне введення вітаміну А тваринам із Cu-індукованим фіброзом супроводжувалося відставанням у швидкості накопичення

вітаміну А в печінці порівняно з контрольними тваринами в перші 4 доби, а надалі за рахунок вищою відносною швидкістю накопичення вітаміну А в печінці з фіброзом, при цьому абсолютний його вміст не відрізнявся від групи інтактних контрольних тварин, які отримували вітамін А.

З літературних даних відомо, що існує проблема не тільки дефіциту вітаміну А в організмі, а наряду із цим, і проблема надмірного накопичення ретинолу в організмі, що призводить до хронічної інтоксикації всього організму. В наших дослідженнях результати показують, що в не залежності від кількості введень вітаміну А немає місця гіпервітамінозу. Можна припустити, що спрямованість та ефект дії ретинолу залежить від темпоральних характеристик метаболічних, клітинних та фізіологічних показників, які беруть участь у формуванні адаптивної відповіді організму (фіброзу), тобто від фізико-хімічних характеристик відповідного клітинного компартменту у момент впливу, що являє собою принцип темпоральної оптимальності. Ідея принципу ТОП обґрунтована в статті [7].

Отримані результати дозволяють припустити, що зменшення кількості вітаміну А в печінці при фіброзі печінки може відігравати важливу роль у подальшому розвитку фіброзу. У зв'язку з цим на моделі Си-індукованого фіброзу досліджували роль вітаміну А на розвиток фіброзу. Для цього тваринам з фіброзом печінки отримували таку кількість цього вітаміну, яка забезпечувала його підтримання на рівні, близькому до рівня інтактних тварин.

3.1.2 Динаміка росту тварин із Си-індукованим фіброзом печінки

Як відомо, характеристика зміни маси тіла тварин (динаміка росту) є інтегральним показником функціонального стану організму, яка відображає спрямованість та інтенсивність метаболізму. Очікується, що формування хронічних патологій, зокрема й фіброзу печінки, може супроводжуватися зміною динаміки росту маси тіла у молодих тварин, що інтенсивно зростають.

Маса тіла в інтактній групі тварин за час експерименту (20 днів) збільшилася на 20-25 % від вихідної (Рис. 3.2, крива 1), що відповідає прийнятому стандарту для щурів.

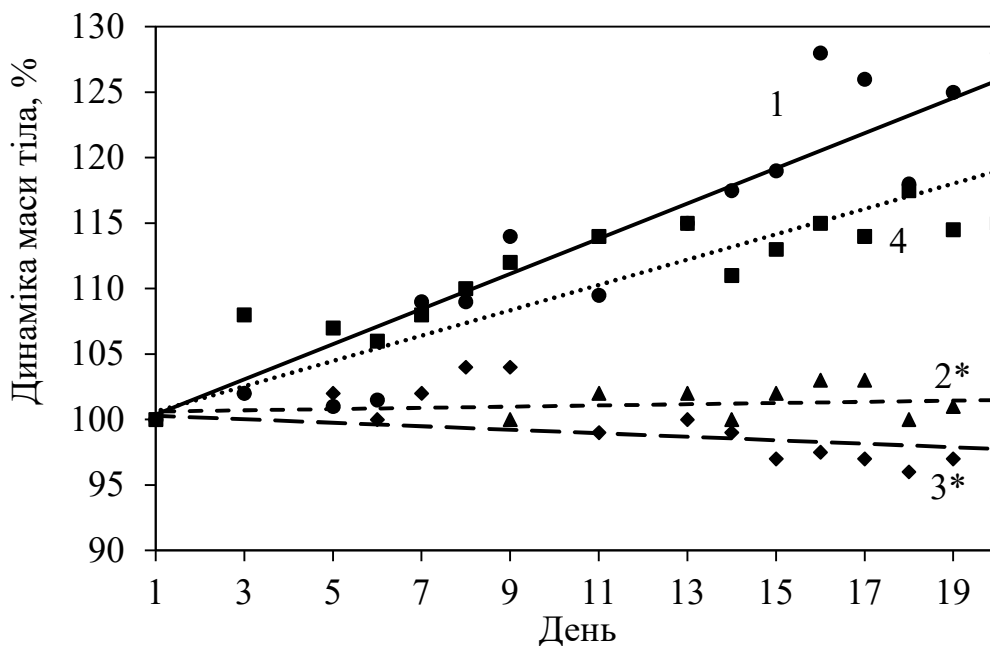


Рис. 3.2. Динаміка маси тіла: 1 (●, —) – контрольної групи тварин, 2 (▲, - - -) – тварин із фіброзом печінки на початкових стадіях його розвитку, 3 (◆, — — —) – тварин із вираженим розвитком фіброзу, що оцінювали за ростом сполучнотканинних утворень навколо печінки, 4 (■,) – тварин, що отримували вітамін А на початковій стадії розвитку фіброзу з подальшим впливом індуктора фіброзу. Представлено лінеаризовані дані, які побудовані за середнім значенням маси тіла із не менше 5 тварин в кожній експериментальній групі. * – відмічені варіанти, для яких $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

У тому разі, якщо в експериментальних тварин було індуковано фіброз печінки, шляхом багаторазових послідовних введень їм сірчаноокислої міді, то зростання їхньої маси тіла припинялося (Рис. 3.2, крива 2), тобто їхня маса тіла була

на 15-20 % меншою порівняно з контролем. Така затримка росту свідчить про пригнічення загального метаболізму тварин із фіброзом печінки.

Якщо дія сірчаноокислої міді тривала впродовж 13 днів, то такі тварини втрачали масу тіла від вихідної більш як 5% і в цей час вони відставали за масою тіла від контрольної групи тварин не менш як на 20-25% (Рис. 3.2, крива 3).

У тому разі, якщо тварини отримували вітамін А після першого циклу інтоксикації, тобто на початкових стадіях розвитку фіброзу, то другий цикл інтоксикації не пригнічував швидкість росту таких тварин, навпаки, вони перевершували за швидкістю росту тварин із фіброзом печінки та незначно відставали від контрольних тварин за швидкістю росту (Рис. 3.2, крива 4).

Отже, введення тваринам вітаміну А в процесі розвитку фіброзу печінки, тобто між двома циклами інтоксикації сірчаноокислою міддю, нормалізувало інтенсивність росту таких тварин, і вони не відрізнялися за швидкістю росту від тварин контрольної групи та значно перевершували тварин за цим показником тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.

Отримані результати дають змогу припустити, що введення вітаміну А тваринам із фіброзом на початкових етапах його розвитку забезпечувало нормалізацію, щонайменше частково, функцій печінки, що зрештою і забезпечувало відновлення росту маси тіла тварин.

Втрата ваги може супроводжуватися вираженою анорексією [158], анорексія є лише частиною процесу виснаження, оскільки як у щурів, так і у людини втрата як м'язової, так і жирової тканини часто передує зменшенню споживання їжі. Втрата маси тіла може бути реакцією на відсутність стимулу ліполіза в ізольованих адипоцитах щурів [159] та у відсутності регуляції короткочасного метаболізму в гепатоцитах.

Така втрата маси тіла тваринами після інтоксикації сірчаноокислою міддю може бути пов'язана зменшенням вмісту адипонектину в них. (АПН) - це гормон, що виробляється адипоцитами і має низку біологічних функцій [160]. АПН

секретується у вигляді низько-, середньо- або високомолекулярних форм, які мають різну активність завдяки зв'язуванню з трьома рецепторами: рецептором адипонектину 1 (AdipoR1), рецептором адипонектину 2 (AdipoR2) та Tcadherin [161]. AdipoR1 знаходиться переважно в м'язах, а AdipoR2 переважно в печінці, тоді як T-кадгерин міститься в різних тканинах і типах клітин. Зв'язування APN з AdipoR1 та -R2 призводить до фосфорилування та активації аденозин монофосфат-активованої протеїнкінази (АМРК) для модуляції клітинного використання енергії в клітинах. AdipoR2 є основним рецептором, що опосередковує захисні реакції адипонектину (APN) під час фібротичного ураження печінки [162].

Нормальне збільшення маси тіла щурів, які отримували вітамін А на початковій стадії фіброзу та щури з інтактною групою, свідчить про переважну безпеку цієї речовини [163], така втрата маси тіла тваринами після інтоксикації сірчаною кислотою міддю може бути пов'язана зі зменшенням вмісту адипонектину в них.

Таким чином, підтримання вмісту вітаміну А в печінці у тварин на початкових стадіях фіброзу на рівні контрольних тварин запобігало подальшій втраті маси тіла, у яких розвивався Cu-індукований фіброз печінки.

3.1.3 Вплив вітаміну А на відносну масу печінки у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки

Маса печінки в групі тварин з 1 циклом введення сірчаної кислоти міді незначно збільшилася на 3,4% від інтактною групи (Рис. 3.3, стовпчик 2). У тому разі, якщо в експериментальних тварин було індуковано фіброз печінки, шляхом багаторазових послідовних введення їм сірчаної кислоти міді, то зростання їхньої маси печінки склало 14% від інтактною групи та 10% від групи тварин з 1 циклом введення (Рис. 3.3, стовпчик 3). Таке збільшення відносної маси печінки свідчить про пригнічення загального метаболізму тварин із фіброзом печінки.

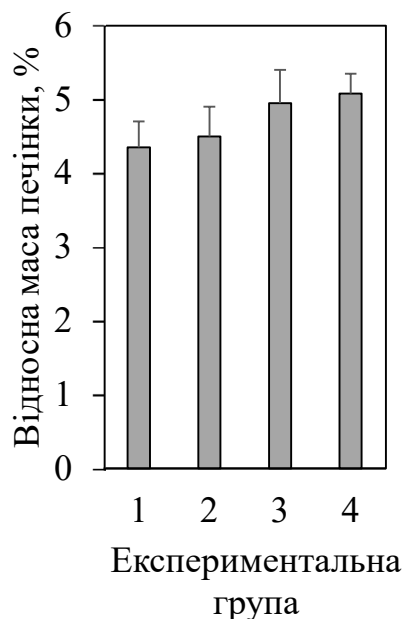


Рис. 3.3 Відносна маса печінки ($X \pm SE$) ($p=0,024$) у дослідних груп тварин: I — інтактні контрольні тварини ($n = 3$), які не отримували експериментальних впливів; II — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді (три внутрішньочеревні введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); III — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні фізіологічний розчин *per os*, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; IV — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) *per os*, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді.; * — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з інтактним рівнем, ** — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з 1 циклом введення сірчаноокислої міді (група II) (ANOVA Kruskal-Wallis H test).

У тому разі, якщо тварини отримували вітамін А (Рис. 3.3, стовпчик 4) після першого циклу інтоксикації, то другий цикл інтоксикації пришвидшував ріст маси печінки таких тварин у порівнянні з інтактною групою на 17% (без достовірної

відмінності), та у порівнянні із тваринами із фіброзом печінки на початковій стадії незначно збільшувався на 13%, а у порівнянні із групою тварин з багаторазовими введеннями сірчаноокислої міді незначно збільшувався тільки на 2,6% (Рис. 3.3).

Відносна маса печінки розраховувалася як відношення маси печінки до маси тіла [164].

Зростання маси тіла тварин із Cu-індукованим фіброзом було достовірно нижче, ніж у контрольній групі та групі дослідних тварин, які приймали вітамін А. При цьому, відносна маса печінки (маса печінки у співвідношенні до маси тіла) не мала значущих відмінностей між групами, лише у тварин з індукцією фіброзу були незначні відмінності від контрольної групи. Судячи із цих даних, можна сказати, що печінка збільшується пропорційно до збільшення маси тіла і фібротизування тканин печінки не впливає на її відносну масу [165,166]. Тобто, відсутність статистично достовірних у різних дослідних групах змін цього показника, який є відображенням як зміни маси печінки, так і показаної на Рис.3.1 динаміки маси тіла тварин, свідчить про відсутність ключової ролі цього фактору в дослідженому фіброгенезі і зміщує акцент на морфологічні зміни тканини.

Однак, в науковій літературі існують різні думки щодо можливої кореляції з ростом маси печінки. Одне дослідження виявило слабку кореляцію ($R^2 = 0,06$) [167], а інше виявило сильну кореляцію ($R^2 = 0,88$) [168], тоді як інші не виявили жодної значущої кореляції [169,170].

Таким чином, можна враховувати роль маси та розмірів печінки при оцінці можливого впливу структурних змін [168,170] на вразливість печінки і резистентність тканини [171], але в різних експериментальних групах фактор відносної маси печінки проявляється без суттєвих відмінностей і узгоджується із загальною тенденцією пригнічення росту маси тіла (або її відсутності).

Судячи з отриманих нами даними можна допустити, що результати вказують на незначну гіпертрофію печінки у тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки.

3.1.4 Вплив вітаміну А на формування міжтканинних сполучнотканинних утворень у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки

Як відомо, розвиток фіброзу печінки, що проявляється «заміною» гепатоцитів сполучною тканиною після дії на них гепатотоксичними факторами, пояснюється активацією передусім зірчастих клітин печінки, а в процесі фіброгенезу беруть участь портальні фібробласти та міофібробласти кісткового мозку. Через те, що, близько 90% вітаміну А локалізується в зірчастих клітинах печінки, а при фіброзі печінки вміст вітаміну А в печінці зменшується [6], то дослідження впливу вітаміну А на фіброгенез за Си-індукованого фіброзу є важливим етапом у дослідженні механізму розвитку й усуненні фіброзу.

Важливо відзначити, що після триразових послідовних ін'єкції сірчаноокислої міді з інтервалом 48 годин між введеннями, експериментальні тварини по-різному переносили такий вплив. Частина тварин гинула, а більша частина виживала. Так, в групі, що складалася з 34 тварин, протягом 21 дня загинуло 41% тварин, а живих залишилося 59% (Табл. 3.1).

Морфологія печінки в інтактній групі тварин відповідала прийнятій нормі за формою лопастей та їхнім кольором для всіх експериментальних тварин цієї групи (Рис. 3.4 а, г-1). У тому випадку, якщо експериментальні тварини піддавалися одному циклу інтоксикації, то у 60% тварин спостерігали розростання сполучної тканини навколо лопастей печінки та їхнє часткове «зрощення» за рахунок сполучної тканини, яке було оцінено в 1-3 бали (Рис. 3.4 б, г-2), а в 40% тварин цієї групи розростання сполучної тканини та зрощення лопастей було виражене сильніше і такі зміни оцінювали в 4-5 бали (Рис. 3.4 в, г-2).

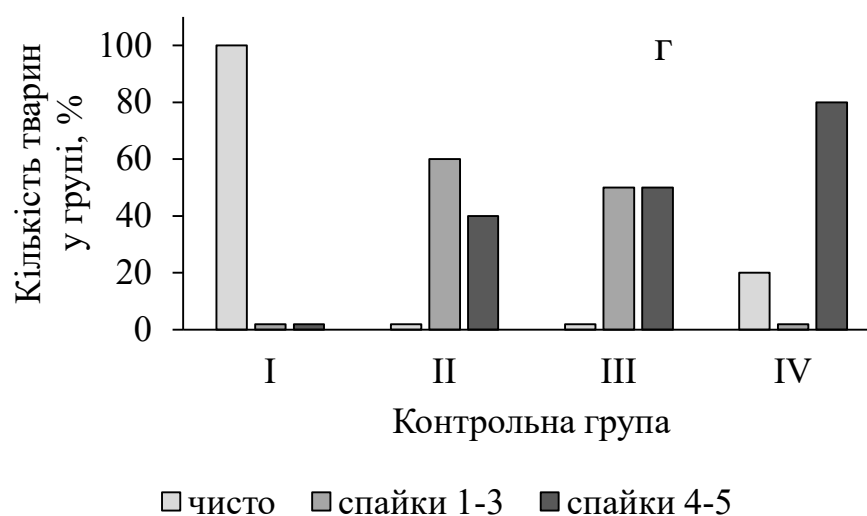
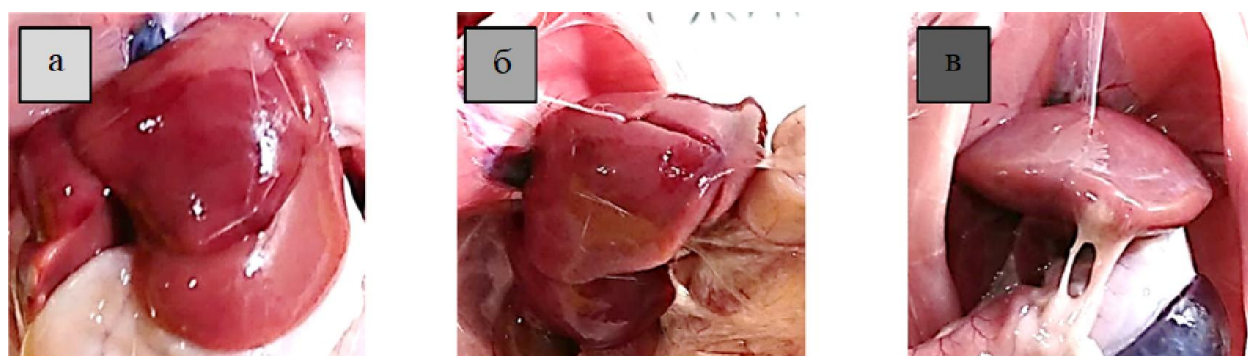


Рис. 3.4. Зовнішній вигляд печінки контрольних груп тварин (а), зовнішній вигляд печінки тварин, у яких присутні спайки, які оцінювалися в 1-3 бали (б) та печінки у якої наявність спайок оцінювалася в 4-5 бали (в); кількість тварин у відсотках (г), у яких у печінці не виявляли спайок, були присутні спайки в 1-3 бали і були присутні спайки в 4-5 балів, у досліджуваних груп тварин: 1 – інтактні контрольні тварини ($n = 3$), що не зазнавали експериментальних впливів; 2 – експериментальні тварини ($n = 5$), що зазнавали дії одного циклу введення сірчаної кислоти міді (три внутрішньочеревних введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); 3 – експериментальні тварини ($n = 5$), які піддавалися двом послідовним циклам введення сірчаної кислоти міді як і група 2; 4 - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаної кислоти міді як і група 2, три дні отримували масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) per os, а після чого 2-й цикл введення сірчаної кислоти міді.

У тому ж випадку, якщо тварини проходили два цикли інтоксикації, то кількість тварин із яскраво вираженим розростанням сполучної тканини навколо лопастей печінки збільшувалася на 10% порівняно з одним циклом інтоксикації, а розподіл за балами 1-3 і 4-5 відповідно становив по 50% (Рис. 3.4 г-3).

Якщо тваринам між двома циклами інтоксикації тричі вводили ретинол, то у 25% тварин сполучнотканинних утворень між лопастями печінки виявлено не було, тобто за анатомічними особливостями вони не відрізнялися від інтактних тварин, тоді як у 75% тварин, навпаки, ріст сполучної тканини навколо лопастей печінки був дуже вираженим та оціненим у 4-5 балів (Рис. 3.4 в, г-4); лопасті печінки в цих тварин формували єдиний «конгломерат», а варіанти з незначним формуванням сполучнотканинних утворень (1-3 бали) були відсутні (Рис. 3.4 г-4).

Багаторазові послідовні ін'єкції мідного купоросу призводили до збільшення кількості сполучної тканини навколо печінки, що характеризувалося як прояв «спайкової» хвороби. Зокрема, у 75% тварин, що вижили, у групі, яка отримувала мідний купорос (група II), спостерігався інтенсивний синтез сполучної тканини. Цей процес супроводжувався утворенням спайок між частками печінки та утворенням загальної капсули зі сполучної тканини навколо печінки. У деяких випадках аналогічні зміни були помічені і в селезінці. Однак у 25% тварин, які отримували мідний купорос, не спостерігалось утворення спайок навколо печінки, і анатомічно печінка не відрізнялася від контрольної групи (Табл. 3.1).

Відомо, що клітини Іто беруть активну участь в індукції фіброгенезу, і вітамін А відіграє важливу роль в активації цих клітин у печінці [103]. У рамках подальшого експерименту проводили щоденні введення вітаміну А в дозі 300 МО/100 г маси тіла щурам протягом 21 дня. Важливо зазначити, що всі 34 тварини цієї групи вижили (Табл. 3.1), і жодних анатомічних змін, включно з індукцією росту сполучної тканини в ділянці печінки, не спостерігалось.

Коли тваринам вводили вітамін А після трьох ін'єкцій сірчаноокислої міді, відсоток загиблих тварин становив не більш ніж 6% (Табл. 3.1), що в 6,8 разів менше, ніж у групі тварин, які отримували тільки сірчаноокислу мідь (Табл. 3.1).

Тим часом у групі тварин, які зазнали триразового введення сульфату міді та подальшого щоденного введення вітаміну А (група III), у 91% тварин, які вижили, спостерігали інтенсивне збільшення сполучної тканини, що перевищувало рівень, помічений у тварин, які одержували лише мідний купорос (Табл. 3.1).

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

Таким чином, повторне послідовне введення вітаміну А тваринам після інтоксикації мідним купоросом значно знижувало смертність, а ті тварини, які вижили, демонстрували збільшення кількості сполучної тканини навколо печінки. Крім того, у них спостерігався приріст маси тіла (Рис. 3.2), що перевершував показники контрольної групи. Таким чином, можна припустити, що розростання сполучної тканини, також відоме як «спайкова» хвороба, являє собою прояв адаптивної реакції організму.

Для дослідження змінень вмісту сполучної тканини в печінці та її ролі в різних варіантах розвитку фіброзу печінки, досліджували вплив інших, наряду з вітаміном А, гепатотропних сполук: мікс фактору та хлорогенової кислоти. Дослідження вмісту сполучної тканини (сухої частки) в печінці показало, що вміст сполучної тканини у тварин з фіброзом печінки (рис. 3.5, стовпчик 2) достовірно збільшився порівняно з тваринами інтактної групи (рис. 3.5, стовпчик 3) з 1,37 % до 2,19 %. У груп тварин, які отримували мікс фактор та хлорогенову кислоту (рис. 3.5,

стовпчики 3, 4), вміст сполучної тканини в печінці склав у середньому 1,77 % та 1,86 % відповідно, і знизився до рівня, який не показує достовірної відмінності від інтактної групи (за критерієм Манна - Уїтні, $p = 0,17$ та $p = 0,10$ відповідно). Показано, що Cu-індукований фіброз печінки викликав достовірне збільшення вмісту сполучної тканини в печінці в 1,6 разів, а прийом мікс фактора та хлорогенової кислоти тваринами з фіброзом викликав незначне (в 1,2 рази) зменшення вмісту сполучної тканини в печінці.

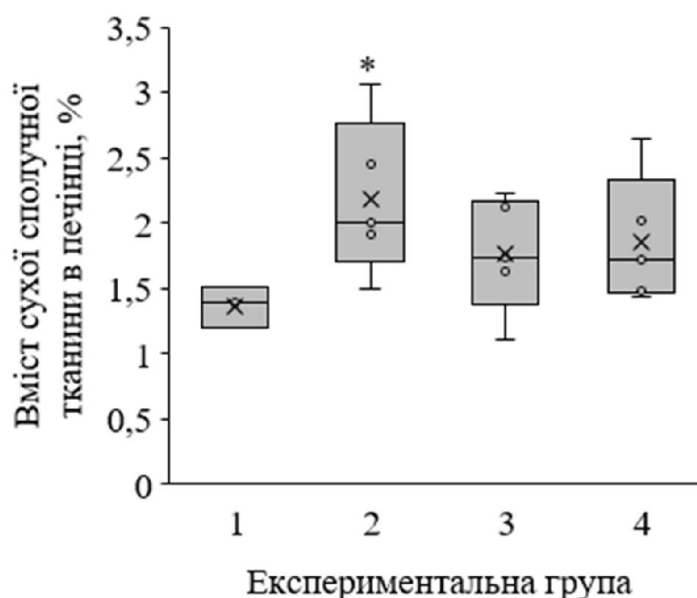


Рис. 3.5 Вміст сухої сполучної в печінці тварин контрольних груп: 1 — інтактні контрольні тварини, які не отримували експериментальних впливів ($n = 3$); 2 — експериментальні тварини з Cu-індукованим фіброзом печінки (три внутрішньочеревні введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла) ($n = 5$); 3 — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введень сірчаної кислоти міді як і група 2, потім три дні мікс-фактор (0,05 мл/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаної кислоти міді; 4 — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введень сірчаної кислоти міді як і група 2, потім три дні хлорогенову кислоту (0,02 г/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаної кислоти міді; * — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з інтактним рівнем.

Як відомо, у регуляції росту сполучної тканини бере участь і фактор росту сполучної тканини (CTGF) — це секреторний білок, який може діяти на багато типів клітин, регулюючи проліферацію, апоптоз, диференціацію, ангиогенез, міграцію, адгезію та вироблення позаклітинного матриксу (ECM). Експресія CTGF може бути транскрипційно активована шляхом трансформації фактор росту 1 (TGF-1) через елемент відповіді, розташований у промоторній ділянці гена CTGF [172].

CTGF діє як наступний ефектор TGF-1 для стимуляції фіброзних процесів, сприяючи проліферації фібробластів, їх міграції та продукції ECM [173].

У нормальній печінці CTGF експресується на низькому рівні в венозних ендотеліальних клітинах та артеріальних міоцитах [174]. Однак, значна індукція транскрипції CTGF була відзначена при фіброзі печінки, хронічних захворюваннях печінки та неалкогольних стеатогепатит [175,176]. Посилення регуляції CTGF також повідомлялося при експериментальних пошкодженнях печінки [177]. Імуногістохімія та експерименти з гібридизації *in situ* в цих моделях показують експресію CTGF в декількох типах печінкових клітин, включаючи зірчасті клітини і проліферуючі епітеліальні клітини [174].

Отримані результати дають змогу припустити, що індукція фіброгенезу сприяє виживанню тварин після пошкодження частини клітин печінки. Вітамін А активує зірчасті клітини і таким чином забезпечує виживання більшої частини тварин, якщо його вводили на початкових стадіях розвитку цього процесу. Не можна виключати й те, що на тлі утворення сполучної тканини в ушкодженій іонами міді печінці може посилюватися процес регенерації або гіпертрофії та поліплоїдизації гепатоцитів, що сприятиме збільшенню функціональної активності печінки при наявності фіброзу та виживанню таких тварин. Про посилення функціональної активності печінки можна судити за кількістю двоядерних гепатоцитів.

3.1.5 Вплив вітаміну А на кількість двоядерних гепатоцитів при Су-індукованому фіброзі печінки

В основі нормалізації функцій печінки під час фіброзу можуть лежати різні механізми, зокрема й регенерація або гіпертрофія клітин, а можливо, і те й інше. На користь цього побічно можуть свідчити незначне збільшення відносної маси печінки в групі тварин, які отримували вітамін А, на тлі розвитку фіброзу (Рис. 3.3) і збільшення кількості двоядерних гепатоцитів порівняно з фіброзом і навіть з контрольними тваринами (Рис. 3.6).

Так, кількість двоядерних гепатоцитів у печінці з фіброзом, незалежно від стадій його розвитку, була зменшена порівняно з контролем (Рис. 3.6). У той же час, якщо тваринам із фіброзом на початкових стадіях його розвитку вводили вітамін А, то кількість двоядерних гепатоцитів була збільшена більш ніж у 2 рази порівняно з тваринами, які не отримували вітамін А, та з фіброзом на початкових стадіях його розвитку. Важливо відзначити, що в групі тварин із фіброзом, які отримували вітамін А, кількість двоядерних гепатоцитів була достовірно вищою навіть порівняно з контрольною групою (Рис. 3.6).

Поліплоїдія в печінці, як правило вважається ознакою термінальної диференціації та старіння [178,179] і призводить як до прогресуючої втрати клітинної плюрипотентності, так і до помітного зниження здатності до реплікації [180].

Відомо, що поліплоїдизація печінки диференційовано регулюється при втраті печінкової маси печінки та її пошкодженнях [181].

В літературних даних є досліді, в яких показали зсув у бік зростання диплоїдних клітин під час гепатоканцерогенезу [182]. Збільшення кількості диплоїдних мононуклеарних гепатоцитів із зменшенням поліплоїдних гепатоцитів (у тому числі двоядерних) було зареєстровано при еуплоїдній гепатоцелюлярній карциномі (ГЦК) людини [182,183,184]. Диплоїдні клітини також часто

виявляються в переднеопластичних вузлах, що свідчить про ранній перехід до диплоїдної клітинної експансії під час гепатоканцерогенезу [185,186].

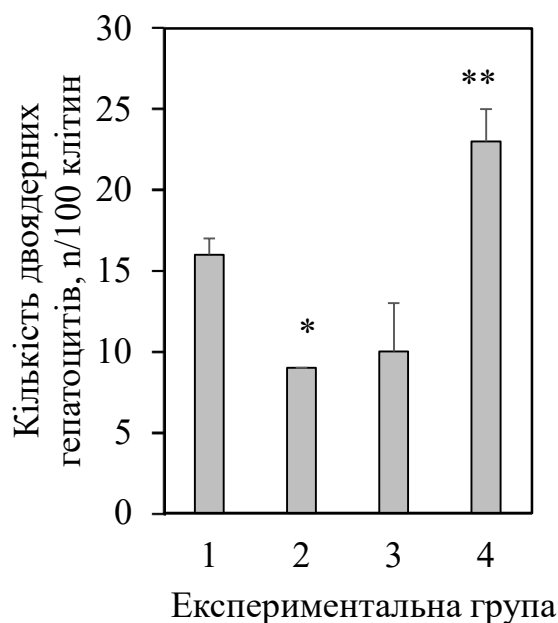


Рис. 3.6. Кількість двоядерних гепатоцитів (E) ($X \pm SE$) ($p=0,024$) у дослідних груп тварин: 1 — інтактні контрольні тварини ($n = 3$), які не отримували експериментальних впливів; 2 — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді (три внутрішньочеревні введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); 3 — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді як і група 2, потім три дні фізіологічний розчин per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; 4 — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді як і група 2, потім три дні масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді.; * — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з інтактним рівнем, ** — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з 1 циклом введення сірчаноокислої міді (група 2) (ANOVA Kruskal-Wallis H test).

Важливо відзначити, що плоїдність/ядерність гепатоцитів, як відомо, змінюється відповідно до віку в нормальній печінці [187]. Цей фактор ми виключили завдяки тому, що в наших експериментах було досліджено виключно 3-місячних статевозрілих щурів самців.

Механізми плоїдизації клітин печінки все ще залишаються значною мірою невідомими. Було припущено роль утворення бінуклеарних клітин як важливого етапу до плоїдизації клітин печінки [188].

Таким чином, наші результати можуть узгоджуватися зі стимуляцією реплікації ДНК бінуклеарних клітин у контексті хронічного запалення та фіброзу. Крім того, вони не виключають можливість прямого переходу від мононуклеарних $2n$ до мононуклеарних $4n$ клітин, на додаток до проміжних бінуклеарних клітин.

Можна припустити, що зменшення кількості мононуклеарних диплоїдних і поліплоїдних гепатоцитів, що спостерігається у експериментальних тварин, які отримували 1 та 2 цикли введення сірчаної кислоти міді. Це може відображати компенсаторну проліферацію гепатоцитів у відповідь на постійну втрату гепатоцитів, спричинену хронічним запаленням.

Загальноприйнято вважати, що тривале пошкодження печінки, на відміну від часткової гепатектомії, може сприяти проліферації мононуклеарних $2n$ -клітин, які потім стануть переважаючими в передпухлинній печінці [189].

Спостерігається при хімічно індукованому канцерогенезі печінки хронічне запалення печінки, яке сприяє підвищенню плоїдності гепатоцитів, незважаючи на тривалу плоїдизацію гепатоцитів та незважаючи на тривале ушкодження печінки. Цілком ймовірно, що підвищена плоїдизація може являти собою захисний механізм оскільки поліплоїдні гепатоцити демонструють просування до термінальної диференціації та ядерного старіння (апоптозу) [179,180,190].

Не можна виключати можливість генетичних змін в таких клітинах, які сприятимуть виникненню передракових клітинних клонів [190]. Це може свідчити про експансію невеликої частки мононуклеарних $2n$ клітин печінки, які можуть

становити передпухлинний клітинний резервуар. Відомо, що здатність гепатоцитів до клітинного поділу при індукції регенерації печінки порушується в моделях тяжких захворювань печінки [191]. Це може бути наслідком реплікативного старіння, спричиненого безперервною циклічністю гепатоцитів при хронічному ураженні печінки, зумовленому лізофосфатидилхолін-опосередкованою ліпотоксичністю [192], як у випадку із запальною цитотоксичністю [193]. Зокрема, про це свідчать укорочені теломери та підвищений вміст маркерів старіння в печінці з неалкогольною жировою хворобою печінки та цирозом печінки [194]. Крім того, окислювальний стрес може також запускати контрольну точку пошкодження ДНК для пригнічення проліферації та сприяння поліплоїдизації гепатоцитів [195].

Як відомо, функціональна активність печінки залежить від її структурної організації, тому на наступному етапі роботи досліджували вплив вітаміну А на структурні особливості печінки на ранніх етапах розвитку фіброзу..

3.1.6 Вплив вітаміну А на структуру печінкової тканини при Си-індукованому фіброзі

Дослідження механізмів формування та розвитку фіброзу печінки є основою при розробці способів запобігання та лікування хвороб печінки. Такі фундаментальні дослідження можуть бути проведені тільки на експериментальних тваринних моделях.

Як було показано (рис. 3.1) розвиток Си-індукованого фіброзу спостерігається значне зменшення вмісту вітаміну А в печінці, а триразове введення вітаміну А в дозі 300 МО/100 г маси супроводжувалося відновленням його вмісту в тварин із фіброзом до рівня контролю [7]. Можна припустити, що збереження балансу вітаміну А з іншими біологічно активними сполуками відновлює і баланс між регенеративними та деструктивними процесами, принаймні на початкових

етапах фіброзу печінки. Про те, що формування сполучної тканини навколо лопастей печінки за Си-індукованого фіброзу (Рис. 3.4), яке вже було детально описано [1], може не призводити до необоротних структурно-функціональних змін гепатоцитів і, як наслідок, забезпечувати посилення процесу регенерації печінки, вказують дані гістологічних досліджень.

Було виявлено, що в інтактній печінці має місце частковий, слабо виражений аутоліз гепатоцитів при збереженні структурної організації печінкових часточок, кровонаповнення в нормі (Рис. 3.7 а). Такі варіації структурних змін у печінці відображають її реакції на умови утримання тварин і досить велику кількість неврахованих чинників, які завжди мають місце.

Виявили, що на початкових стадіях розвитку фіброзу мало місце збільшення товщини капсули Гліссона, в яку були інкорпоровані імуннокомпетентні клітини (Рис. 3.7 б).

За літературними даними відомо, що зміни при фіброзі включається більша кількості клітин (фібробласти, судинні клітини, інфільтруючі імунні клітини та біліарні епітеліальні клітини) [102].

Капсула Гліссона, являє собою шар інтерстиціальної тканини, яку також можна класифікувати як вісцеральну фасцію [196,197,198]. Вона оточує печінку і є безперервною з інтерстиціальними просторами і матриксом, що оточують порталні тріади, ймовірно, відіграючи роль в обміні рідини, а також міграції клітин у гепатобіліарній системі [199,200].

Як відомо, капсула побудована таким чином, що допускає добові коливання розміру, зумовлені змінами розміру гепатоцитів після прийому їжі, а також циркадною регуляцією на 34% у мишей і 10-15% у людини [201]. Щоб забезпечити таку варіабельність розміру, нормальна капсула печінки тонка, добре іннервована і містить велику кількість еластичних волокон, як це характерно для вісцеральної фасції [202]. Ці характеристики створюють унікальну нішу, в якій за нормальних

фізіологічних умов співіснують різні популяції як макрофагів, так і фібробластів [203].

Як описано в [33], візуалізація поверхні фіброзної печінки щурів виявляє змінену організацію колагену, з більш щільною колагеновою мережею і втратою характерної хвилястості волокон. Ці зміни сильно залежать від тяжкості захворювання.

Отже, для прогнозування ступеня фіброзу печінки можна аналізувати наявність змінення, а саме потовщення капсули Гліссона як маркер фіброзу, що свідчить про зміни у капсульному матриксі.

Інші дослідження [34,203] на гризунах показали, що, окрім змін у матриксі, змінилася і популяція капсулярних клітин: мезотеліальні клітини та фібробласти мігрували в паренхіму печінки і сприяли утворенню популяції міофібробластів [34,204].

Капсула є активною ділянкою патології при фіброзі печінки гризунів, з мезотеліальними клітинами, фібробластами та макрофагами, вкрапленими в тонкий шар матриксу.

Після першого циклу інтоксикації сірчаною кислотою міддю, що відповідає початковій стадії фіброзу, має місце частковий аутоліз гепатоцитів (1), часто зустрічається дисконкомплексія печінкових балок (2). Судини кровонаповнені (3), проте простір Діссе зменшений (4), в яких часто зустрічаються клітини Іто (5). Фібробласти нечисленні, ендотеліоцити зустрічаються в помірних кількостях найчастіше біля кровоносних судин. Капсула Гліссона потовщена (Рис. 3.7 б). Ці невеликі структурні зміни в печінці порівняно з інтактним контролем супроводжувалися невеликими змінами активності специфічних ферментів печінки.

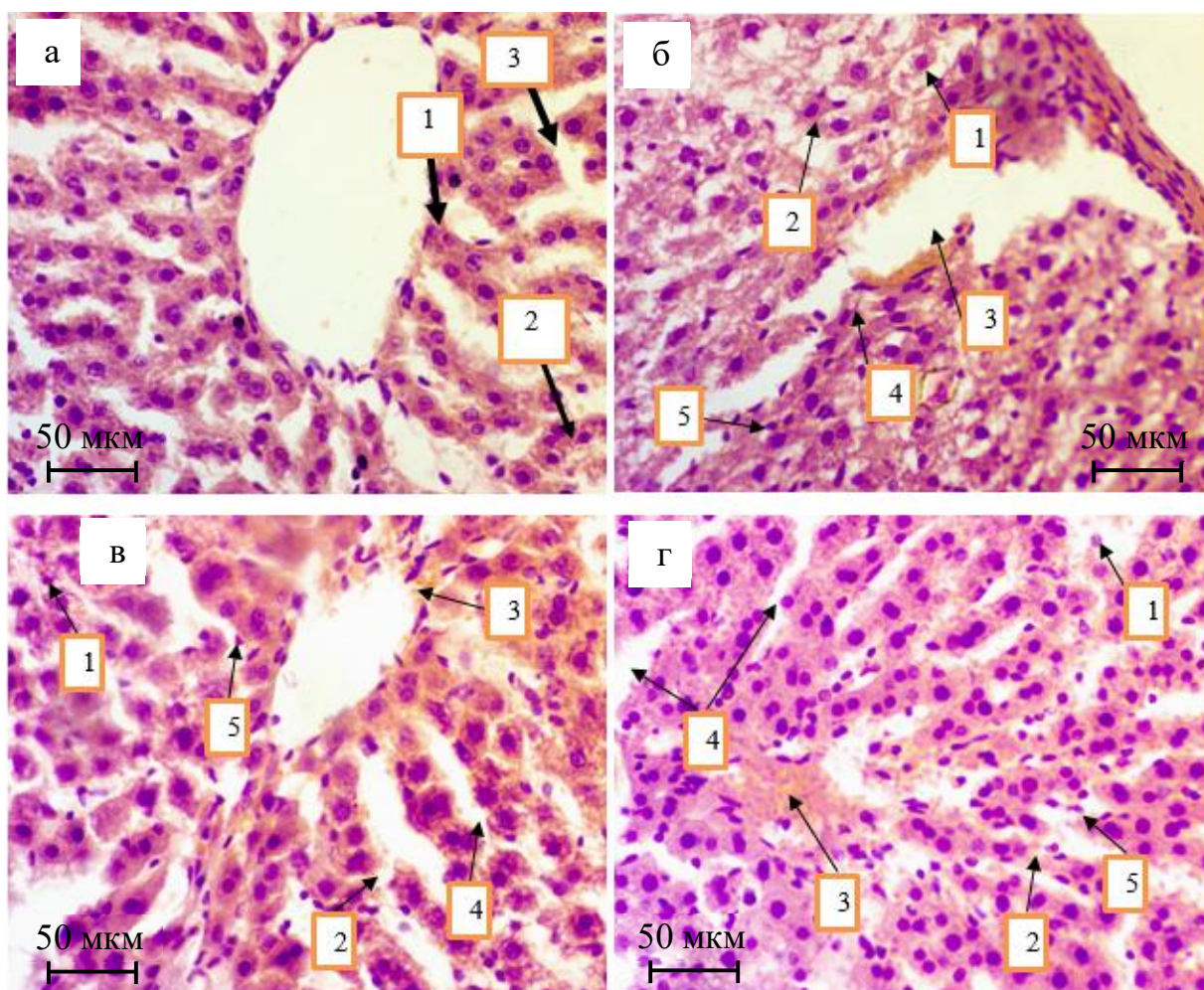


Рис. 3.7. Гістологічні препарати печінки тварин експериментальних груп: а – інтактний контроль, б – один цикл введення міді без вітаміну А, в – дворазове введення міді без вітаміну А, г – дворазове введення міді з вітаміном А.

Після другого циклу інтоксикації організму сірчаною міддю, що характеризується більш вираженим розвитком фіброзу печінки, мали місце дистрофічні зміни, міжклітинний простір, печінкові балки (2) частково зруйновані (Рис. 3.7 в). У таких тварин відсутнє кровонаповнення у венах і артеріях (3), у деяких випадках спостерігався крововилив у центральній вені. Порушена цілісність ендотелію. Присутні двоядерні гепатоцити, в печінці спостерігається помірна кількість лімфоцитів.

Печінка є найважливішим метаболічним органом організму, оскільки вона піддається впливу великої кількості антигенів в рамках своїх фізіологічних функцій. Наприклад, мікробно-асоційовані молекулярні патерни (MAMPs) і молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням (DAMPs), також відомі як аларміни, безперервно переносяться з кишечника до печінки через ворітну печінкову вену, а концентрація MAMPs у ворітній венозній крові, як повідомляється, у 100 разів більша, ніж у периферичній крові [205]. Таким чином, печінка відіграє вирішальну роль у виявленні та елімінації інфекцій, що передаються через кров. З іншого боку, непатогенні екзогенні молекули, що переносяться з кров'ю, також беруть участь у цьому процесі. Це вимагає від печінки "перемикатися" між толерантним станом і станом реагування, щоб запобігти неадекватній імунній відповіді [206].

Ця унікальна імунна функція печінки спирається на клітинне мікрооточення, яке включає велику популяцію природних кілерів (NK), природних Т-кілерів (NKT) та γ - δ Т-клітин. Співвідношення CD8⁺ (супресорних) Т-лімфоцитів до CD4⁺ (хелперних) Т-лімфоцитів значно вище в печінці, ніж у периферичній крові [206], в той час як В-лімфоцити складають лише 2% від загальної кількості лімфоцитів у печінці [207,208]. Крім того, багато резидентних лімфоцитів в печінці значно відрізняються за кількістю та функцією від циркулюючих лімфоцитів [209,210,211,212,213,214]. Як ГСК, так і гепатоцити беруть участь у розпізнаванні патогенів, презентації антигенів, продукції цитокінів і підтримці балансу між імунною толерантністю та імунною відповіддю [37,205,215].

Тому унікальне імунне середовище печінки, що включає як Т-лімфоцити, так і ГСК, забезпечує її унікальну імунну відповідь, яка бере участь у регуляції імунного гомеостазу і відіграє важливу роль у гомеостазу та відіграє важливу роль у фізіології та патології.

Фіброз печінки ініціюється вивільненням запальних цитокінів і сигналів пошкодження, також відомих як аларміни, пошкодженими гепатоцитами, що

призводить до утворення профібротичних активних форм кисню (АФК) та іншого клітинного вмісту [216,217]. Ці сигнали від пошкоджених гепатоцитів безпосередньо активують ГСК для фагоцитозу пошкоджених клітин [218,219]. Сигнали від пошкоджених клітин залучають та активують імунні клітини, які виділяють фіброгенні хемокіни та цитокіни, які в подальшому активують ГСК і призводять до секреції ЕСМ [220,221]. Активовані ГСК також можуть секретувати регуляторні фактори для фіброзу печінки та імунорегуляторні фактори [222,223,224,225]. Взаємодія між ГСК та імунними клітинами, переважно Т-клітинами, необхідна для підтримки хронічного запального середовища, яке забезпечує сигнали для виживання та стійкої активації ГСК [224,225,226,227,228].

Отже, після двох циклів інтоксикації сірчаною кислотою міддю мали місце більш виражені структурні зміни в печінці порівняно з одним циклом інтоксикації, що корелювало зі зростанням з'єднувально-тканинних утворень.

У тому разі, якщо між двома циклами інтоксикації тваринам тричі вводили вітамін А, то спостерігали потовщення капсули Гліссона, кількість зірчастих клітин була збільшена, печінкові балки зберігали свою структуру (Рис. 3.7 г). Кількість двоядерних гепатоцитів була збільшена як порівняно з контролем, так і порівняно з фіброзом (Рис. 3.6). Необхідно відзначити, що найбільш виражені морфологічні зміни в групі тварин, які одержували вітамін А на початкових стадіях розвитку фіброзу з подальшою дією на цих тварин гепатотоксичного чинника проявлялися у збільшенні товщини капсули Гліссона, в якій були інкорпоровані імунокомпетентні клітини, що може вказувати на прояв імунної відповіді у відповідь на ушкодження в печінці, і збільшенні двоядерних гепатоцитів, що свідчить про гіпертрофію або регенерацію печінки.

Після введення тваринам із Су-індукованим фіброзом мікс-фактора (Рис. 3.8 а) спостерігали множинні розриви. Печінкові часточки порушені. Судини кровонаповнені (8). Простір Діссе збільшений (3), клітини Іто зустрічаються досить часто (4). В окружності кровеносних судин проглядаються ендотеліоцити (5), у

невеликих кількостях лімфоцити (6) і фібробласти (7). Капсула Гліссона (9) залишається так само збільшеною (Рис. 3.8 а).

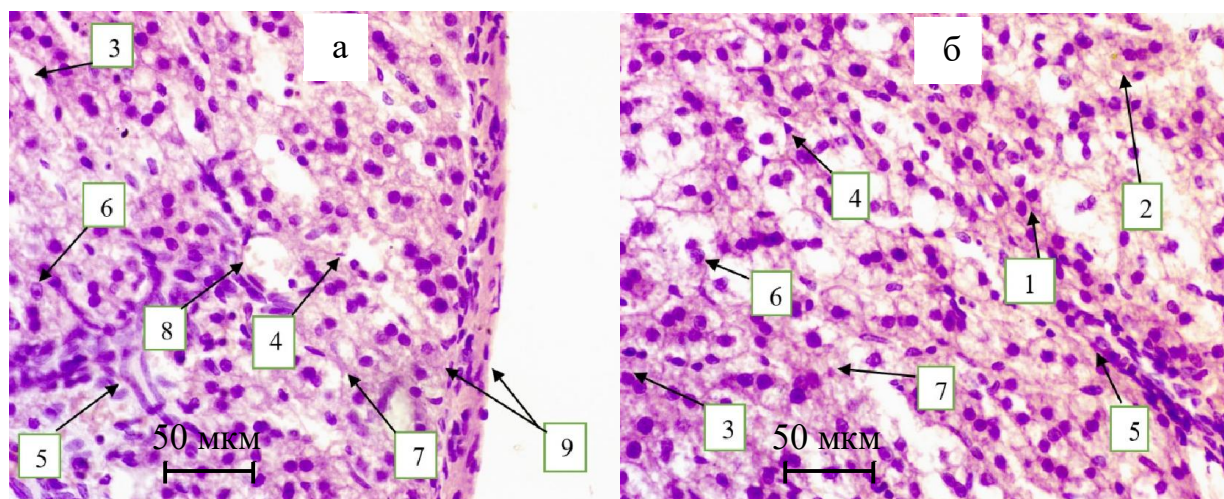


Рис. 3.8. Гістологічні препарати печінки, а – тварини з Cu-індукованим фіброзом, які отримували мікс-фактор, б – тварини з Cu-індукованим фіброзом, які отримували хлорогенову кислоту.

У тварин із Cu-індукованим фіброзом, які отримували ХГК, (Рис. 3.8 б) спостерігається яскраво виражена дисконкомплексція печінкової балки (1) і повний аутоліз гепатоцитів (2). Ядра приблизно однакової форми і розмірів, округлі. Центральна вена та артерія кровонаповнені (8), можна спостерігати помірну кількість лімфоцитів (6). Простір Діссе зменшений (3), клітини Іто (4) проглядаються найчастіше в ділянці печінкових часточок. На препараті виявляються численні фібробласти (7) і ендотеліоцити (5), найчастіше розташовуються біля судин. По всьому препарату спостерігаються множинні розриви. (Рис. 3.8 б)

Отже, на початкових стадіях розвитку фіброзу гістологічні зміни виражені незначно, найбільш вираженими є потовщення капсули Гліссона. На тлі введення ХГК спостерігається виражений аутоліз гепатоцитів.

На закінчення зазначимо, що введення вітаміну А тваринам із фіброзом печінки на початкових стадіях розвитку забезпечує збільшення процесів регенерації та зміщує рівноваги в бік відновлення функціональної активності органу, що забезпечує стійкість організму на подальшу негативну дію сірчаноокислої міді.

Незважаючи на інтенсивний пошук сучасних методів оцінки функціонального стану печінки, золотим стандартом у гепатологічній діагностиці, як і раніше, залишаються морфологічні дослідження. Однак встановлення діагнозу на ранніх або початкових етапах розвитку фіброзу, значущих змін структурно-функціональних характеристик, які можуть призвести надалі до фіброзу, є дуже складним, а найчастіше неможливим. Це пов'язано з тим, що цей функціонально важливий орган завжди зазнає впливу великого арсеналу ендо- та екзогенних чинників і їх поєднання, і навіть, здавалося б, за нормальних умов мають місце адаптивні структурно-функціональні перебудови тканини печінки [7].

У зв'язку з цим слід проводити комплексну оцінку структурно-функціонального стану печінки, тому на наступному етапі роботи визначали деякі функціональні характеристики печінки при фіброзі.

3.2 Дослідження впливу вітаміну А на деякі біохімічні показники у тварин з Су-індукованим фіброзом печінки

Частіше всього про зміни функціональної активності печінки судять за активністю аланінової амінотрансферази (АЛТ), g-глутаміламінотрансферази (ГГТ), аспаратамінотрансферази (АСТ) та лужної фосфатази [229]. З цією метою визначали активність цих ферментів у тварин на різних стадіях розвитку фіброзу печінки.

З літературних даних [230] у пацієнтів з виявленим значним фіброзом печінки вказує на необхідність негайного лікування. Основні моделі оцінки фіброзу печінки є біопсія печінки, FibroScan (еластографія) та вимірювання сироваткових

біомаркерів, причому останній метод частіше доступний у закладах первинної медичної допомоги, ніж інші.

Десятки сироваткових моделей фіброзу печінки були розроблені та валідовані в клінічній практиці, всі вони є неінвазивними та недорогими [231]. Однак деякі сироваткові моделі включають біомаркери, які не є рутинно доступними, такі як гаптоглобін у Fibrotest [232], та α 2-макроглобулін у Fibroscore [233], тому більшість лікарень не виконують їх. Крім того, ці моделі тягнуть за собою більші фінансові витрати. Крім того, більшість з них часто використовувалися для оцінки фіброзу печінки у пацієнтів з хронічним гепатитом С (ХГС). Оскільки хронічний гепатит С суттєво відрізняються за гістологічними змінами в печінці та механізмами, що запускають фіброз [234], тому вимірювання сироваткових ферментів печінки для дослідження фіброзу печінки є найбільш оптимальним.

Концентрації АЛТ і ГГТ у сироватці крові значно відрізняються між пацієнтами з F0-F1 (F0 - фіброз відсутній; F1 - легкий фіброз без фіброзних перегородок) та пацієнтами з фіброзом печінки F2-F3 (F2 - фіброз з кількома фіброзними перегородками фіброзних перегородок; F3 - численні перегородки без цирозу). З прогресуванням фіброзу, зниження здатності гепатоцитів синтезувати АЛТ призводить до зниження концентрації АЛТ в сироватці крові, тому сироватковий рівень АЛТ може слугувати непрямим показником фіброзу печінки. З іншого боку, сироваткова ГГТ може бути незалежним прогностичним маркером фіброзу печінки, оскільки на нього не впливають зміни АЛТ [235].

Введення ретинолу на початкових стадіях процесу розвитку Си-індукованого фіброзу печінки забезпечувало відновлення рівня функціональної активності цього органу, принаймні, судячи з досліджуваних показників ферментативної активності. При цьому дія ретинолу на функціональні показники печінки залежала від «ступеня» відхилення того чи іншого показника від гомеостатичної норми і темпоральних характеристик активності ферментів під час дії вітаміну А.

3.2.1 Визначення впливу вітаміну А на активність аланінамінотрасферази (АЛТ) у тварин із Cu-індукованим фіброзом

Активність АЛТ у сироватці крові після першого циклу інтоксикації була зниженою порівняно з контролем і залишалася на цьому ж рівні після другого циклу інтоксикації (Рис. 3.9-I-III).

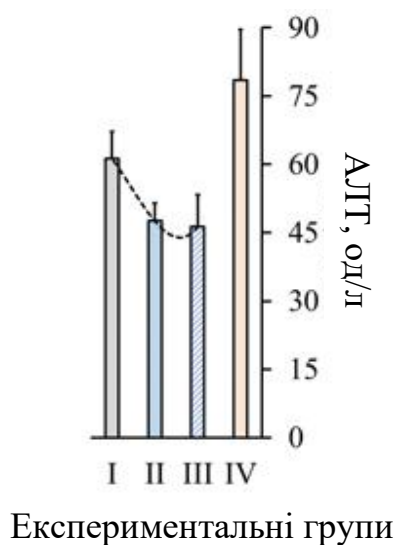


Рис. 3.9. Активність ферментів у сироватці крові аланінамінотрасферази (АЛТ), - у досліджуваних груп тварин: I — інтактні контрольні тварини ($n = 3$), які не отримували експериментальних впливів; II — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді (три внутрішньочеревні введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); III — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні фізіологічний розчин *per os*, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; IV — експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введень сірчаноокислої міді як і група II, потім три дні масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) *per os*, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді.; * — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з інтактним рівнем, ** — значущі значення ($P < 0.05$) порівняно з 1 циклом введення сірчаноокислої міді (група II) (ANOVA Kruskal-Wallis H test).

У тому разі, якщо після першого циклу інтоксикації тварини отримували 3 послідовних введення ретинолу, то активність АЛТ у сироватці крові збільшувалась навіть після повторного введення сірчанокислої міді і була близькою до контрольного рівня (Рис. 3.9-IV).

Встановлено, що через 7 днів після збільшення вмісту іонів міді в печінці активність АЛТ знизилася, що характерно для початкових стадій фіброзу, а на 21-й день спостережень вона підвищилася порівняно з контролем (Рис. 3.10, група II).

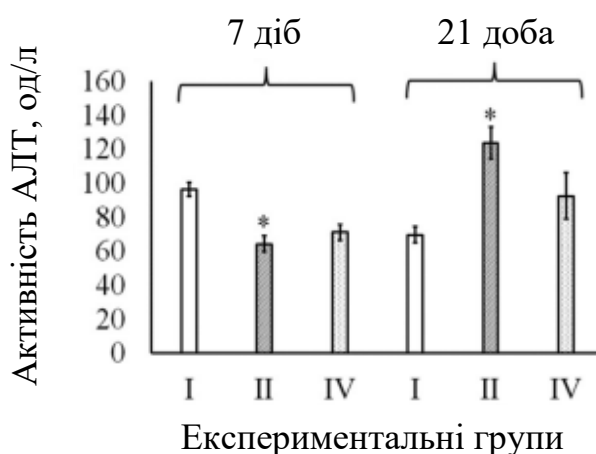


Рис. 3.10. Активність аланінамінотрансферази в сироватці крові на 7-му та 21-шу добу в інтактних контрольних тварин (I); у дослідних тварин, яким тричі вводили сульфат міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 год між ін'єкціями (II); та у тварин, яким тричі вводили сульфат міді, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), та вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 год (IV);
* - вірогідні величини ($P < 0.05$) порівняно з інтактним рівнем (r/ANOVA). Розподіл експериментальних груп ($n = 5$ тварин у групі)

Таким чином, незважаючи на наявність деяких структурних порушень у печінці та індукцію запального процесу, функціональна активність печінки була близькою до контрольних значень, що свідчить про початкові стадії фіброзу.

Коли тварини з фіброзом печінки отримували вітамін А щоденно протягом 7 днів, активність АЛТ не відрізнялася від контрольної, а на 21-й день вона знизилася на 26% порівняно з фіброзом і досягла контролю (Рис. 3.10, група IV).

У серії робіт щодо впливу відносно високих концентрацій іонів міді на розвиток Cu-індукованого фіброзу печінки було показано, що активність АЛТ у сироватці крові була зниженою порівняно з контролем [7], і це підтвердилося і в цій роботі. Цей факт може пояснювати здатність іонів міді інгібувати активність АЛТ у печінці та, можливо, у крові. На користь цього свідчить і те, що при Cu-індукованому фіброзі печінки мало місце незначне порушення плазматичних мембран гепатоцитів (Рис. 3.9).

У дослідників [236] незважаючи на нормальний рівень АЛТ, корелює з помірно вираженим запаленням печінки. Зі збільшенням стадії фіброзу частка пацієнтів зі значною запальною активністю помітно зростала у пацієнтів з АЛТ вдвічі. Незалежно від вікової категорії, частка пацієнтів з значним запаленням зростала зі збільшенням стадії фіброзу печінки. У пацієнтів з нормальним рівнем АЛТ багато пацієнтів з помірним фіброзом або цирозом печінки мали запалення печінки від помірного до важкого ступеня. Наприклад, за даними [237], значна активність запалення печінки була виявлена у 34% пацієнтів зі значним фіброзом печінки. В іншому дослідженні, в якому взяли участь 227 пацієнтів з вірусним гепатитом з нормальним або помірно підвищеним рівнем АЛТ, було виявлено, що стадія фіброзу печінки є найбільш значущим фактором ризику значного запалення [238]. В даний час неінвазивні тести, такі як еластографія, мають хорошу діагностичну точність для виключення значного фіброзу печінки у пацієнтів [239].

Отже, введення вітаміну А тваринам на початкових стадіях розвитку Си-індукованого фіброзу приводило до відновлення активності АЛТ до значень близьких до значень контрольних тварин.

3.2.2 Визначення впливу вітаміну А на активність аспаратамінотрансферази (АСТ) у тварин із Си-індукованим фіброзом.

Після першого циклу інтоксикації активність АСТ у сироватці крові залишалася незмінною порівняно з контролем і зменшувалася після другого циклу інтоксикації (Рис. 3.11-I-III), тобто мало місце невелике падіння активності цього ферменту в процесі двох послідовних циклів інтоксикацій.

Таке зниження активності цього ферменту в сироватці крові може пояснюватися інгібуванням активності, а можливо, і його синтезу на тлі інтоксикації організму іонами міді, що проявлялося після другої серії введення експериментальним тваринам сірчаноокислої міді. Необхідно зазначити, що після другого циклу інтоксикації тварини отримували дві летальні дози міді, тобто сумарно 6 мг/100 г маси (летальна доза для щурів 3 мг/100 г маси за одноразового введення).

Якщо тварини після першого циклу інтоксикації отримували ретинол, то активність АСТ відповідала активності контрольній групі тварин, тобто повторне введення тваринам сірчаноокислої міді на тлі дії ретинолу не пригнічувало її активності (Рис. 3.11-IV).

Отже, введення вітаміну А на початкових стадіях розвитку фіброзу печінки нормалізувало активність АСТ.

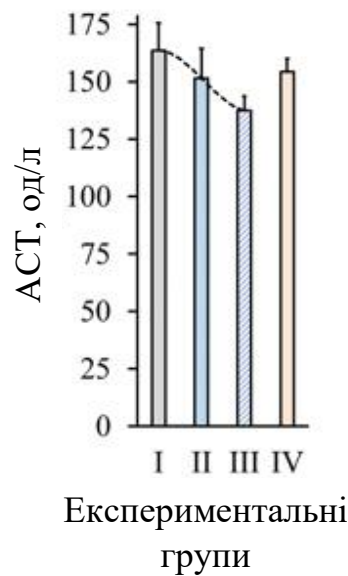


Рис. 3.11. Активність ферментів у сироватці крові: аспартатамінотрансферази (АСТ), - у досліджуваних груп тварин: I - інтактні контрольні тварини ($n = 3$), які не отримували експериментальних впливів; II - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді (три внутрішньочеревних введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); III - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді, як і група II, потім три дні фізіологічний розчин *per os*, з подальшим другим циклом введення сірчаноокислої міді; IV - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді, як і група II, потім три дні отримували масляний розчин ретинолу (0. 10 мг/100 г маси тіла) *per os*, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; $\bar{X} \pm SE$; * - відмічені значущість значень ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем, ** - відмічені значущість значень ($P < 0,05$) порівняно з 1 циклом введення сірчаноокислої міді (група II) (ANOVA Kruskal-Wallis H test).

Важливим аспектом, який слід враховувати, з літературних даних, є те, що рівень АЛТ може знижуватися з віком та наявністю фіброзу печінки, але з іншого боку, поширеність фіброзу вища в популяції старшого віку [240].

Необхідно зазначити, що в цьому дослідженні було виявлено, що в процесі розвитку фіброзу печінки мало місце не збільшення активності АЛТ (Рис. 3.9) та АСТ (Рис. 3.11) у сироватці крові, а навпаки - зменшення цих показників. Як відомо, уже понад 50 років рівень активності аланінамінотрансферази та інших трансфераз у сироватці крові використовують як показник гепатоцелюлярних ушкоджень. Однак нині накопичено досить велику кількість експериментальних даних, які вказують і на відсутність кореляції між ступенем ушкодження гепатоцитів і швидкістю вивільнення АЛТ та інших печінкових ферментів у кровотік. Це може пояснюватися різноманітними причинами: пригніченням синтезу АЛТ у печінці (період напіврозпаду цього ферменту (47 ± 10 год), зниженням активності ферменту в печінці з віком та іншими функціональними змінами, відсутністю цитолізу при пригніченні функції печінки та ін.).

3.2.3 Визначення впливу вітаміну А на активність глутаміламінотрансферази (ГГТ) у тварин із Су-індукованим фіброзом

Гамма-глутамілтранспептидаза, мембранний фермент, виявлений у протокових і каналцевих клітинах печінки, досліджується і використовується з 1960-х років. Позаклітинний метаболізм глутатіону, який є основною антиоксидантною молекулою в клітинах, контролюється ГГТ. Незалежно від причини, аномальні рівні ГГТ спостерігається у багатьох пацієнтів з ураженням печінки, що є чутливим тестом. Тим не менш, рівень ГГТ може підвищуватися при багатьох захворюваннях і станах (наприклад, при діабеті, панкреатиті, ожирінні, вживанні алкоголю або наркотиків), що знижує його специфічність. Наприклад, рівень ГГТ часто може бути високим у пацієнтів з неалкогольним стеатогепатитом (НАСГ) в асоціації з ожирінням та цукровим діабетом, але він не використовується для діагностики [241].

Відповідно, дані за останні десятиліття також показали помітне зростання поширеності неалкогольної жирової хвороби печінки з 15% у 2005 році до 25% у 2010 році [242]. Підвищений рівень ГГТ продемонстрував найсильніший зв'язок з наявністю метаболічного синдрому, в той час як підвищений рівень АЛТ був вищим в учасників з ожирінням. Це викликає інтерес, оскільки раніше було показано, що ГГТ пов'язаний зі збільшенням серцево-судинного ризику [243].

Активність ГГТ у сироватці крові зберігалася на рівні контролю в усіх досліджених групах тварин (Рис. 3.12). Необхідно зазначити, що вітамін А не чинив будь-якого впливу на показники, які залишалися в межах гомеостатичних значень.

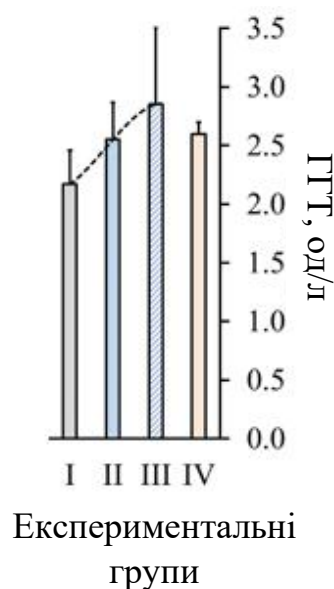


Рис. 3.12. Активність ферментів у сироватці крові глутаміламінотрансферази (ГГТ), - у досліджуваних груп тварин: I - інтактні контрольні тварини ($n = 3$), які не отримували експериментальних впливів; II - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаної кислоти міді (три внутрішньочеревних введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); III - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаної кислоти міді, як і група II, потім три дні фізіологічний розчин *per os*, з подальшим другим циклом введення сірчаної кислоти

міді; IV - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді, як і група II, потім три дні отримували масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) per os, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; $\bar{X} \pm SE$; * - відмічені значущість значень ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем, ** - відмічені значущість значень ($P < 0,05$) порівняно з 1 циклом введення сірчаноокислої міді (група II) (ANOVA Kruskal-Wallis H test).

Встановлено, що через 7 днів після збільшення вмісту іонів міді в печінці активність ГГТ підвищилася незначно на 7-й день, а на 21-й день залишалася на рівні контролю (Рис. 3.13, група II).

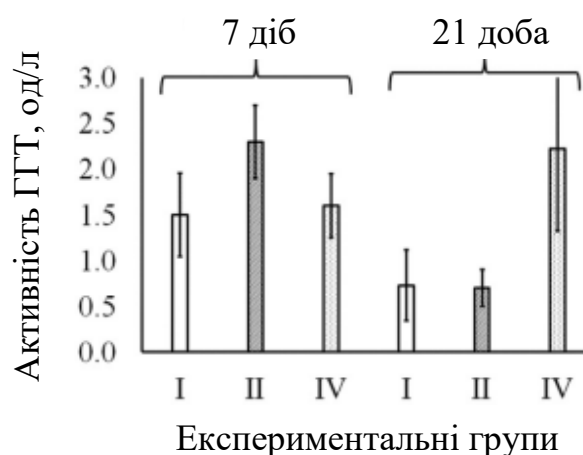


Рис. 3.13. Активність γ -глутаміламінотрансферази в сироватці крові на 7-му та 21-шу добу в інтактних контрольних тварин (I); у дослідних тварин, яким тричі вводили сульфат міді в дозі 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом 48 год між ін'єкціями (II); та у тварин, яким тричі вводили сульфат міді, як у групі II (1 мг/100 г маси тіла), та вітамін А (300 МО/100 г маси тіла) через 24 год (IV); * - вірогідні величини ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем (t/ANOVA). Розподіл експериментальних груп ($n = 5$ тварин у групі).

Активність ГГТ після введення вітаміну А тваринам із фіброзом відповідала інтактному контролю на 7-й день після початку експерименту. Таким чином, її активність після введення вітаміну А знизилася на 31% порівняно з за фіброзу і не відрізнялася від інтактного контролю (Рис. 3.13, група IV).

У дослідженні [244], було виявлено, що вік та рівень ГГТ достовірно асоціюються зі ступенем фіброзу. Однак було зазначено, що ці неінвазивні маркери не можуть замінити біопсію [245]. В іншому дослідженні [246] не було виявлено зв'язку у пацієнтів з хронічним гепатитом С між показниками АЛТ, АСТ і ГГТ. Ще в одному дослідженні [247] показано, що АЛТ, АСТ і ГГТ були найкращими маркерами оцінки рівня фіброзу.

3.2.4 Визначення впливу вітаміну А на активність лужної фосфатази (ЛФ) у тварин із Си-індукованим фіброзом

Біомаркери холестазу, а саме лужна фосфатаза (ЛФ) сироватки крові, широко використовуються як інструменти прогнозування при холестатичних захворюваннях печінки [248].

Активність ЛФ зменшувалася після першого циклу введення сірчаноокислої міді, і після другого циклу вона залишалася на тому самому рівні (Рис. 3.14-II,III). У тому разі, якщо тварини після першого циклу інтоксикації отримували ретинол, то активність ЛФ відновлювалася до контрольного рівня, а повторні введення сірчаноокислої міді не впливали на активність цього ферменту в сироватці крові (Рис. 3.14-IV).

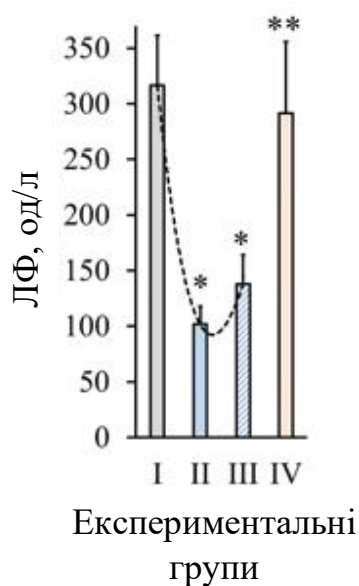


Рис. 3.14. Активність ферментів у сироватці крові лужної фосфатази (ЛФ) (С), - у досліджуваних груп тварин: I - інтактні контрольні тварини ($n = 3$), які не отримували експериментальних впливів; II - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді (три внутрішньочеревних введення кожні 48 годин у дозі 1 мг/100 г маси тіла); III - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді, як і група II, потім три дні фізіологічний розчин *per os*, з подальшим другим циклом введення сірчаноокислої міді; IV - експериментальні тварини ($n = 5$), які отримували 1 цикл введення сірчаноокислої міді, як і група II, потім три дні отримували масляний розчин ретинолу (0.10 мг/100 г маси тіла) *per os*, а після цього 2-й цикл введення сірчаноокислої міді; $\bar{X} \pm SE$; * - відмічені значущість значень ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем, ** - відмічені значущість значень ($P < 0,05$) порівняно з 1 циклом введення сірчаноокислої міді (група II) (ANOVA Kruskal-Wallis H test).

Активність ЛФ була знижена порівняно з інтактним контролем на 47%, а через 21 добу, як і активність ЛФ підвищувалася на 42% відносно контролю через 7 діб від початку індукції фіброзу печінки (Рис. 3.15).

Ці дані свідчать про те, що збільшення вмісту іонів міді в печінці призводить до розвитку холестазу, який є на початкових етапах розвитку фіброзу.

Якщо експериментальним тваринам з фіброзом печінки щодня протягом 7 днів вводили вітамін А, то активність лужної фосфатази зростає на 39% порівняно з інтактним контролем і на 162% порівняно з фіброзом тварин, які не отримували вітамін А (Рис. 3.15). На 21-шу добу експерименту активність лужної фосфатази в сироватці крові була підвищеною порівняно з інтактним контролем і не відрізнялася від такої у тварин з фіброзом печінки, які не отримували вітамін А (Рис. 3.15).

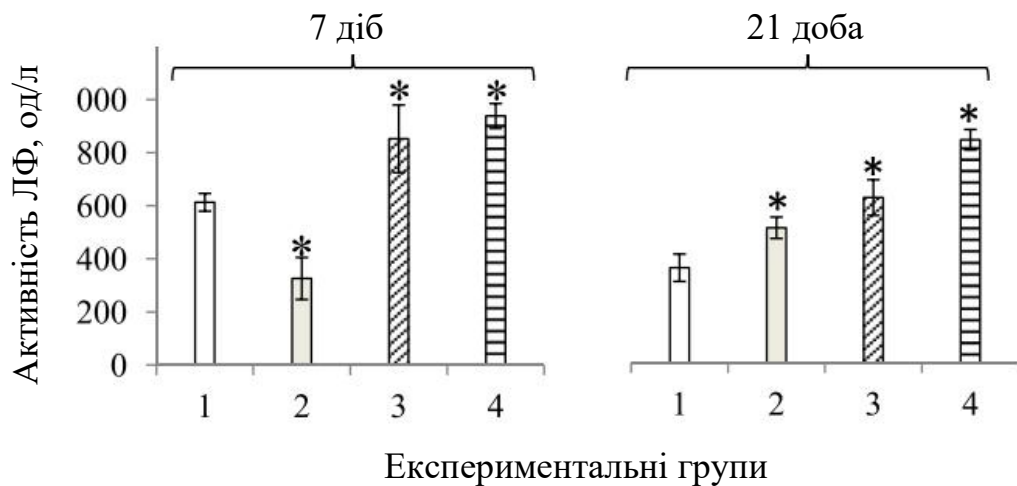


Рис. 3.15. Активність лужної фосфатази [Од/л] у сироватці крові на 7-му та 21-шу добу ($\bar{x} \pm SE$) у тварин інтактного контролю (1, $n=3$), у тварин з індукованим фіброзом печінки (2, $n=5$), у тварин з фіброзом печінки та щоденним введенням вітаміну А *per os* у дозі 300 МО/100 г маси тіла (або 90,00 мг/100 г маси тіла) (3, $n=5$), та в інтактних тварин з щоденним введенням вітаміну А (4, $n=5$); *відзначено достовірні значення ($P < 0,05$) порівняно з інтактним рівнем RANOVA до (7 днів) після (21 день)

Необхідно звернути увагу на той факт, що введення вітаміну А здоровим (інтактним) тваринам супроводжувалося більш вираженим підвищенням активності лужної фосфатази в сироватці крові порівняно з дією вітаміну А у тварин з фіброзом печінки, причому це проявлялося як через 7, так і через 21 добу експерименту (Рис. 3.15).

Деякі дослідження [249] пояснюють підвищення рівня ферменту лужної фосфатази у сироватці крові збільшенням плинності мембран печінкових клітин, що призводить до вивільнення ферментів у кровообіг.

Отже, введення вітаміну А тваринам із фіброзом печінки супроводжується активності ЛФ, але воно було менш вираженим, ніж після введення вітаміну А інтактним тваринам. тваринам з інтактною печінкою.

Отже, вплив вітаміну А на активність досліджуваних ферментів був різним у здорових тварин і тварин з фіброзом печінки.

Неінвазивні печінкові біохімічні дослідження (АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛФ) є маркером печінки, і всі вони можуть бути застосовані для прогнозування фіброзу печінки [250].

Незважаючи на інтенсивний пошук сучасних методів оцінки функціонального стану печінки, найширше застосування у гепатологічній діагностиці, як і раніше, мають морфологічні дослідження. Однак встановлення діагнозу на ранніх або початкових етапах розвитку фіброзу, значущих змін структурно-функціональних характеристик, які можуть призвести надалі до фіброзу, є дуже складним, а найчастіше неможливим. Це пов'язано з тим, що цей функціонально важливий орган завжди зазнає впливу великого арсеналу ендо- та екзогенних чинників і їх поєднання, і навіть, здавалося б, за нормальних умов мають місце адаптивні структурно-функціональні перебудови тканини печінки [7].

У зв'язку з цим, розробка додаткових методів оцінки структурно-функціональних станів тканини печінки є актуальним біомедичним завданням. При вирішенні цього завдання виходили з того, що метод оцінки має бути швидким і

давати змогу оцінювати інтегративний структурно-функціональний стан тканини печінки. Таким методом може слугувати метод електропровідності.

3.3 Дослідження електропровідності тканин печінки з Си-індукованим фіброзом та впливу біологічно активних сполук на цей показник

3.3.1 Дослідження електропровідності тканин печінки

Вимірювання електропровідності фрагменту печінки показало, що зі збільшенням частоти електропровідність збільшувалась (Рис. 3.16 а): на частотах 100 кГц, 1 МГц і 10 МГц значення електропровідності дорівнюють 0,11 См / м, 0,23 См / м та 0,34 См / м відповідно, тобто в 2 і в 3 рази відносно значення на найнижчій частоті вимірювань.

Згідно з доступними даними про механізми протікання електричного струму в біологічних середовищах [252], електропровідність має зростати зі зростанням частоти, як і спостерігається в експерименті (Рис. 3.16 а). Це зумовлено тим, що електропровідність біологічної тканини як складного багатокомпонентного середовища зумовлена наявністю іонів, заряджених і незаряджених макромолекул, діелектричних включень, клітинних мембран, міжклітинних взаємодій та іншими факторами. За механізмами протікання струму, які вони зумовлюють, їх можна умовно розділити на дві групи, які проявляють різний характер змінень при зміненні частоти: активна та реактивна складова електричного імпедансу.

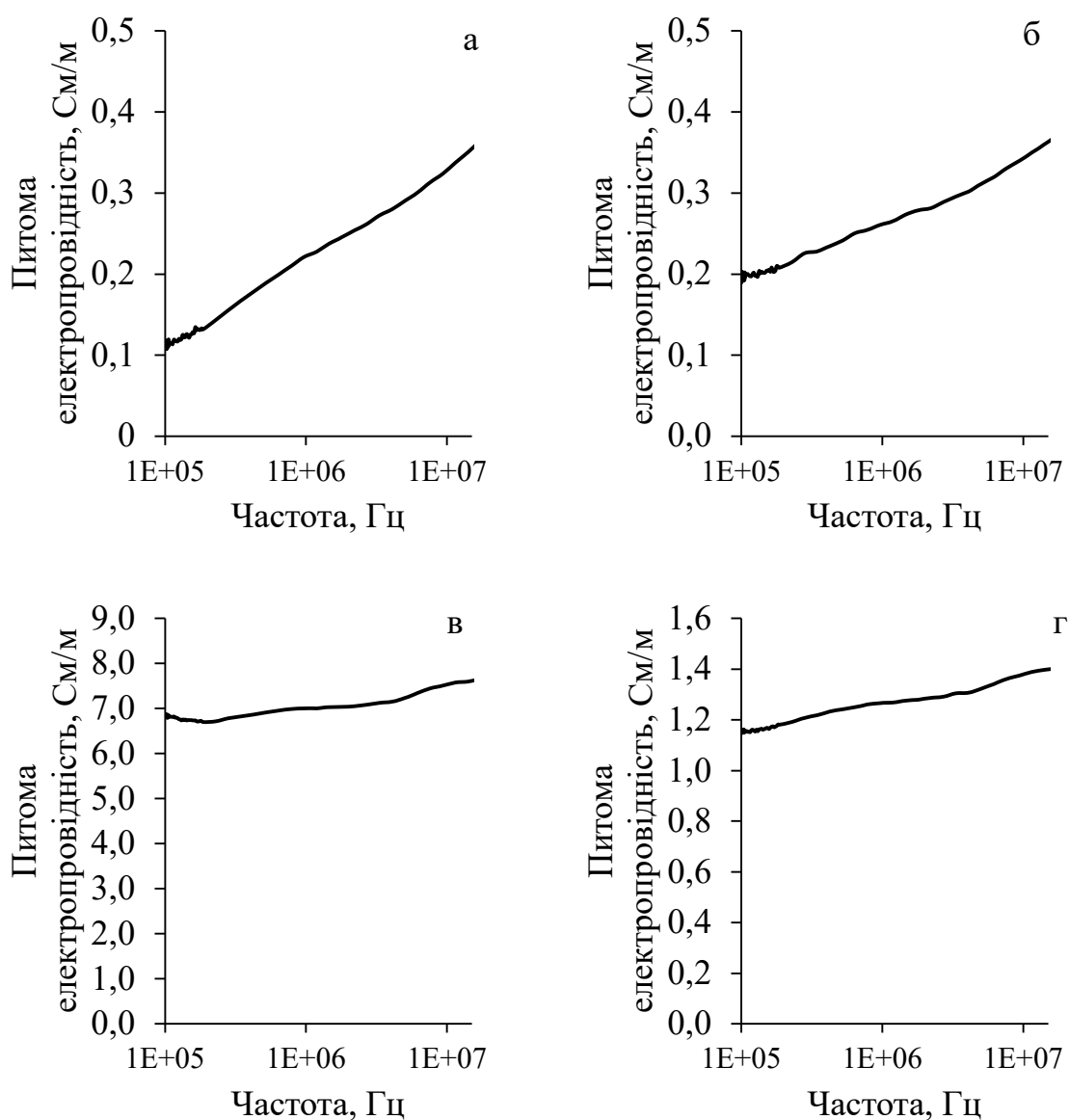


Рис. 3.16. Частотна залежність електропровідності в діапазоні частот 100кГц (1E+05 Гц) – 10МГц (1E+07Гц): а – фрагменту тканини печінки, б – гомогенізованої печінки, в – фізіологічного розчину, г – гомогенізованої печінки в фізіологічному розчині. Подано типові криві із серії вимірювань.

Активна складова, яка мало залежить від частоти, зумовлена рухом носіїв заряду в електричному полі, цей механізм забезпечує протікання постійного електричного струму в тканинах з електропровідними властивостями.

Реактивна складова має ємнісну природу, яка проявляється при протіканні змінного електричного струму в діелектриках. Електропровідність в діелектриках на мікроскопічному рівні полягає в зміщенні електричних зарядів унаслідок поляризації (тобто виникненні індукованого дипольного моменту) або повороту полярних молекул вздовж зовнішнього електричного поля. За появи зовнішнього електричного поля в діелектрику спостерігається рух заряду при його зміщенні, який є короткочасним, тому постійний струм не протікає через діелектрик. У разі змінного електричного поля заряди зміщуються і переорієнтуються щоразу під час зміни напрямку зовнішнього поля, таким чином створюючи змінний електричний струм, а його протікання кількісно характеризується реактивною (ємнісною) складовою імпедансу. Величина реактивного опору X_C елемента з ємністю C зменшується з частотою f :

$$X_C = \frac{1}{2\pi f C}, \quad (3.1)$$

що еквівалентно збільшенню електропровідності.

Таким чином збільшення електропровідності свідчить про наявність в тканині печінки діелектричної складової, до якої належать клітинні мембрани та надклітинні структури. Для перевірки ролі структури тканини в електропровідності досліджували гомогенізовану печінку (Рис. 3.16 б, г).

На Рис. 3.16 б показано електропровідність тканини печінки, пропущеної через прес і гомогенізатор, без додавання додаткових складових. Показано, що на початку діапазону (частота 100 кГц) електропровідність склала 0,20 См/м, а в кінці діапазону (частота 10 МГц) – 0,35 См/м (Рис. 3.16 б). Тобто, порівняно з електропровідністю цільної тканини (Рис. 3.16 а) електропровідність в низькочастотній області збільшилася в 1,8 разів, а в високочастотній не змінилася порівняно з електропровідністю тканини і збільшилася в 1,75 разів порівняно з електропровідністю гомогенізованої печінки в низькочастотній області.

Зростання електропровідності в низькочастотній області (Рис. 3.16 а, б) свідчить про збільшення активної складової електропровідності, яка визначається

переносом заряду іонами та іншими зарядженими частинками. Зменшення кута нахилу графіка (Рис. 3.16 а, б) свідчить про зміни у співвідношенні діелектричної та іонної складових. Склад гомогенату, виготовленого за вказаною методикою, не відрізняється від складу тканини, тобто кількісний вміст речовин, розчинів іонів, діелектриків залишається незмінним, проте змінюється структура. Гомогенат містить фрагменти тканини, окремі клітини, зокрема зруйновані, фрагменти мембран.

Такий характер частотної залежності відповідає моделі, в якій постійна складова електричного струму, зумовлена рухом іонів та низькомолекулярних компонентів, протікає в міжклітинному середовищі. Носії заряду, які містяться в цитоплазмі, не беруть участь в цьому механізмі переносу заряду, оскільки вони відокремлені клітинною мембраною, яка має діелектричні властивості. В одній із загальноприйнятих моделей електропровідних властивостей біологічної речовини (Рис. 3.17 а) [253] опір R_1 еквівалентний іонному механізму провідності міжклітинної речовини, опір R_2 еквівалентний іонному механізму провідності внутрішньоклітинної речовини, а ємність C відповідає розподіленій ємності діелектричних структур.

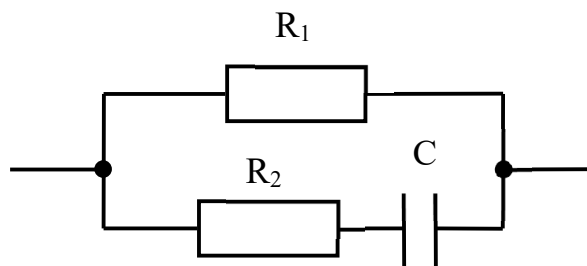


Рис. 3.17. Еквівалентна електрична схема імпедансу біологічної тканини.

При гомогенізації печінки при руйнуванні частини мембран частина іонів із цитоплазми вивільняється, тобто у вказаній моделі збільшується їх вклад в електропровідність елемента R_1 і зменшується – в R_2 . Це відповідає характеру зміни

частотної залежності, який спостерігали (Рис. 3.16 а, б), і не протирічить припущенню про вплив структури тканини на електропровідність.

Структура тканини є складною, включає в себе міжклітинні взаємодії, що наряду з впливом складу тканин, також багатокомпонентного, ускладнює дослідження механізмів формування електропровідності біологічних середовищ. Важливою задачею є розуміння, наскільки великим є вплив структури тканини.

Міжклітинні зв'язки, а саме міжклітинні адгезійні з'єднання, десмосоми, щільові контакти та ряд інших, здебільшого являють собою білкові утворення, які не беруть участі в переносі заряду. Однак вони можуть вступати у складні взаємодії з компонентами міжклітинного середовища, зв'язувати вільні носії заряду і таким чином опосередковано впливати на електропровідність.

На наступному етапі вимірювали електропровідність гомогенату печінки (Рис. 3.16 г), розведеного у фізіологічному розчині в співвідношенні 1 г гомогенізованої тканини на 4 мл фізіологічного розчину. Окремо електропровідність фізіологічного розчину представлено на Рис. 3.19 в, вона у всьому дослідженому діапазоні частот складає від 6,7 до 7,6 См / м. Вимірювання електропровідності гомогенату, виготовленого на фізіологічному розчині показало величину 1,15 См / м в низькочастотній області та 1,39 См / м у високочастотній, зростання складо 21 %, що значно менше, ніж аналогічне зростання електропровідності цільної тканини печінки, 200 % (Рис. 3.16 а) та гомогенізованої печінки, 75 % (Рис. 3.16 б). Це може бути пояснено зменшеним внеском діелектричної складової в електропровідність суспензії на тлі високого вмісту іонів фізіологічного розчину.

Порівняння електропровідності гомогенізованої печінки (Рис. 3.16 б), фізіологічного розчину (Рис. 3.16 в) та гомогенату на фізіологічному розчині (Рис. 3.16 г) показало, що додавання до гомогенізованої печінки фізіологічного розчину, з високою (в 30 разів більшою) електропровідністю, у кількості 400 % збільшило електропровідність гомогенізованої печінки лише в 5,75 разів,

непропорційно до збільшення вмісту іонів. І відносно фізіологічного розчину, додавання до нього гомогенізованої печінки у кількості 20 % від суміші зменшує електропровідність фізіологічного розчину у 5,5-5,8 разів. Це може бути пояснено тим, що компоненти та структури гомогенізованої печінки взаємодіють з іонами, зв'язують їх, зменшують їх рухливість, що викликає зниження електропровідності. Спостережений ефект свідчить про наявність складних взаємодій у біологічній тканині, які представляють інтерес для подальших досліджень.

3.3.2 Дослідження впливу капсули Глісона на електропровідність тканин печінки

Одним із утворень, що визначає структуру тканини печінки, на макрорівні є сполучнотканинна капсула Глісона. При розгляді її як об'єкта електрофізичних вимірювань, вона являє собою неоднорідність, яка присутня на поверхні органу і відсутня на поверхні зрізу.

Вимірювали електропровідність (Рис. 3.18 а) циліндричного фрагмента печінки щура, бічна поверхня якого є зрізом, а верхня та нижня містять капсулу Глісона. Вимірювання проводили 4 рази для кожного фрагмента печінки, розташовуючи фрагмент у вимірювальній комірці заново перед кожним вимірюванням, на Рис. 3.18 кожна крива відповідає одному вимірюванню, сімейство кривих на кожному графіку відповідає серії вимірювань одного зразка. Показано, що результати вимірювання одного й того самого фрагмента печінки відрізняються, розкид становив 28,2 % (Рис. 3.18 а).

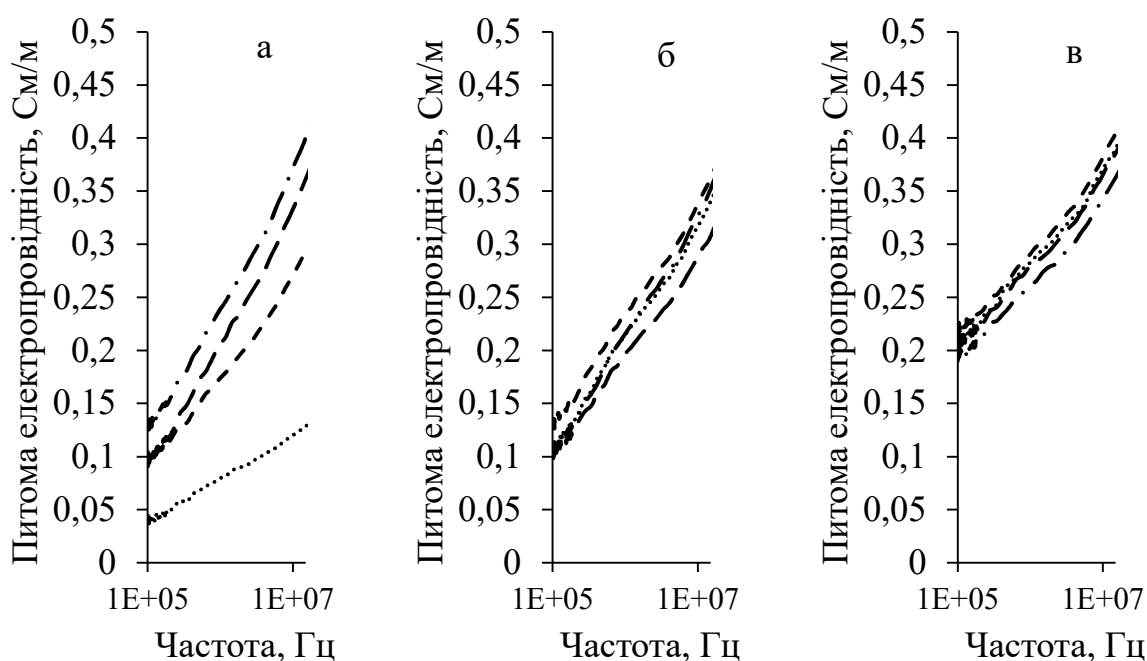


Рис. 3.18. Спектри електропровідності в діапазоні частот 100 кГц ($1E+05$ Гц) - 10 МГц ($1E+07$ Гц): а – фрагмента тканини печінки з невидаленою капсулою Гліссона (4 незалежні вимірювання одного фрагмента), б – фрагмента тканини печінки з видаленою капсулою Гліссона (4 незалежні вимірювання одного фрагмента), в – гомогенізованої (зі зруйнованою структурою) тканини печінки (4 незалежні вимірювання одного фрагмента).

При вимірюванні аналогічного фрагмента печінки тієї самої тварини з видаленою капсулою Гліссона, розкид значень електропровідності зменшився до 9,8 % (Рис. 3.18 б) і залишився в тому самому діапазоні, що й більша частина спектрів на Рис. 3.18 а.

Можна зробити висновок, що капсула Гліссона впливає на значення електропровідності, і принципово можлива розробка методу визначення параметрів капсули Гліссона за електропровідністю. Результат вимірювань залежав від розташування зразка в комірці, а видалення капсули зменшило вплив

неоднорідності, це свідчить про неоднорідність капсули, що ускладнює її дослідження.

На наступному етапі вимірювали електропровідність гомогенізованої печінки – тканина, пропущена через прес і гомогенізатор (Рис. 3.18 в). При цьому в зразку були присутні цілі клітини, компоненти зруйнованих клітин і фрагменти тканини. Відтворюваність результатів збільшилася, результати повторних вимірювань одного зразка відрізнялися на менш ніж 5,5 %, оскільки середовище стало більш однорідним і з порушеною структурою, що вказує на взаємозв'язок структури тканини з електропровідністю. Електропровідність на низьких частотах збільшилася в 2,1 рази порівняно з цілісним фрагментом без капсули Гліссона, що може бути інтерпретовано як порушення структури тканини і вивільнення внутрішньоклітинного провідного середовища, але мало змінилася на високих частотах, що може бути інтерпретовано як кількісно незмінний вміст діелектричних включень.

Для демонстрації ролі іонів у формуванні електропровідності тканини печінки фрагмент печінки з капсулою Гліссона занурювали в розчин NaCl з концентрацією 0,9 % на 30 хвилин, що дало змогу наситити тканину додатковими іонами. Електропровідність розчину представлена на Рис. 3.19 б, вона на порядок вища за електропровідність тканини печінки (Рис. 3.19 а).

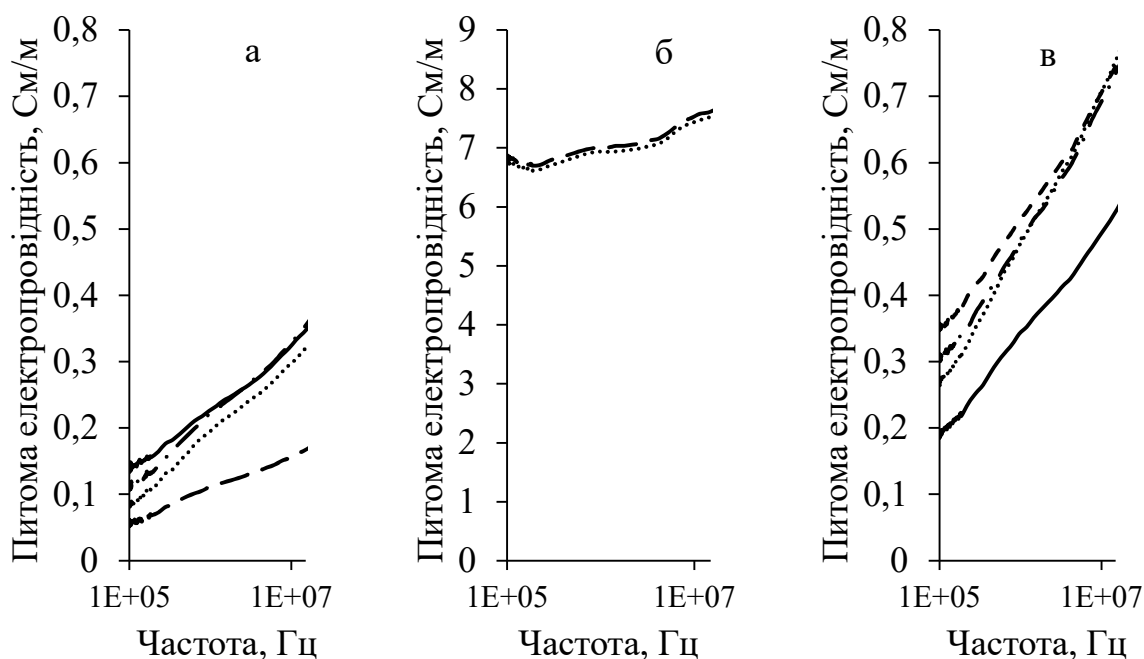


Рис. 3.19. Спектри електропровідності в діапазоні частот 100 кГц ($1E+05$ Гц)-10 МГц ($1E+07$ Гц): а – фрагмента тканини печінки з не видаленою капсулою (4 незалежні вимірювання одного фрагмента), б – розчину NaCl, в – фрагмента печінки, аналогічного а, поміщеного в розчин NaCl (4 незалежні вимірювання одного фрагмента).

Спектри електропровідності фрагмента печінки з підвищеним вмістом іонів представлені на Рис. 3.19 в. Електропровідність збільшилася в середньому на 158 %, що підтверджує вплив іонів. Розкид між значеннями для різних ділянок тканини зберігся (вплив неоднорідностей капсули Гліссона в залежності від області контакту зразка з електродами), що не показало відмінностей між капсулою Гліссона і паренхімою печінки у взаємодії складових структури тканини з іонами.

Результати показали, що капсула Гліссона печінки, з одного боку, через відмінності в її компонентах погіршує відтворюваність вимірювань при багаторазовому вимірюванні електропровідності фрагмента тканини печінки, і з іншого боку, є окремим джерелом діагностичної інформації. З урахуванням цього,

капсулу Глісона треба враховувати в моделі тканини печінки при дослідженні її електропровідності, або виключати її вплив шляхом видалення, якщо об'єктом досліджень є паренхіма печінки. Додатково механічне порушення структури печінки супроводжувалося збільшенням електропровідності, що вказує на взаємозв'язок структури печінки з електропровідністю. Таким чином, метод імпедансометрії може бути використано при дослідженні структурної організації біологічних тканин.

3.3.3 Дослідження електропровідності тканин печінки в моделі Си-індукованого фіброзу, та дії гепатотропних біологічно активних сполук

Вимірювання електропровідності фрагментів печінки представляє інтерес с точки зору як характеристики клітин, зокрема клітинних мембран і їх цілісності, так і переносу заряду в міжклітинній речовині та міжклітинних взаємодій, які визначають структуру тканини.

Тканина печінки складається з відносно простих, з точки зору електрофізичних властивостей, компонентів. Оскільки тканина печінки містить у своєму складі 70-85% гепатоцитів, тобто має високу целлюлярність, її електропровідність на низьких частотах відносно низька і у інтактної групи на частоті 100 кГц становить в середньому 0,1 См/м (Рис. 3.20 а). В роботі [254] автори порівнювали значення електропровідності тканини печінки щурів зі значеннями для печінки людини *ex vivo* в нормі в роботі [255] та отримали для печінки щурів значення на 30% менші, ніж для печінки людини. В роботі [255] на частоті 100 кГц електропровідність тканини печінки людини склала $0,179 \pm 0,041$ См/м і так само збільшувалася зі збільшенням частоти, що дозволяє вважати наші результати такими, що відповідають значенням, отриманим іншими авторами.

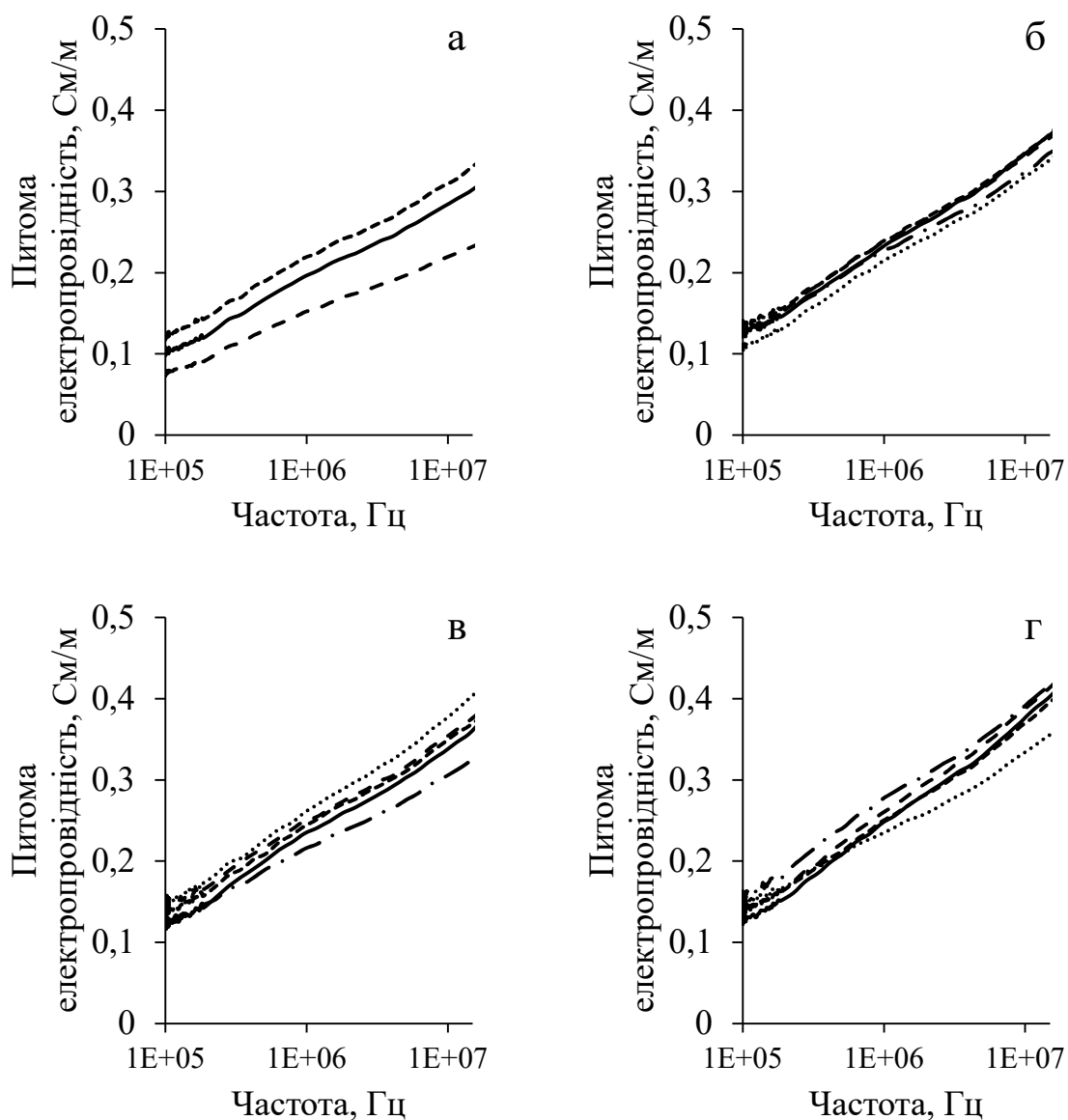


Рис. 3.20. Індивідуальні спектри електропровідності в діапазоні частот 100 кГц (1E+05Гц) – 10 МГц (1E+07Гц) (одна крива на графіку відповідає спектру для однієї тварини) тканин печінки тварин експериментальних груп: а – інтактний контроль, б – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, в – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували мікс-фактор, г – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували хлорогенову кислоту.

На більш високих частотах спостерігали збільшення електропровідності тканини печінки до 0,25 – 0,40 См/м у різних контрольних груп (Рис. 3.20), що свідчить про задіяні додаткові механізми протікання електричного струму: поляризація діелектриків, здебільшого в клітинних мембранах, та іонами перенос заряду у внутрішньоклітинному середовищі. В такій інтерпретації форма графіку залежності електропровідності від частоти може містити інформацію про розподіл електролітичної та діелектричної складової з точки зору фізики, або розподіл та характеристики міжклітинної речовини, внутрішньоклітинної речовини, клітинних мембран та типів клітин, з точки зору біофізики та фізіології. При цьому порівняння контрольних груп між собою проводилося за електропровідністю на низьких частотах (Рис. 3.21 б).

Вимірювання електропровідності тканини печінки показало, що у групі з Си-індукованим фіброзом електропровідність тканини печінки достовірно збільшувалася порівняно з інтактною групою на частоті 100 кГц (Рис. 3.21 б). У тому разі, якщо тваринам із фіброзом вводили мікс-фактор, який має гепатотропну дію [256], то електропровідність залишалася достовірно вищою за інтактний контроль, але незначно вищою порівняно з групою Си-індукованого фіброзу (Рис. 3.21 б).

Аналогічно після введення хлорогенової кислоти, яка теж має гепатотропну дію [257,258], електропровідність тканини була достовірно вищою за інтактний контроль, але не відрізнялася від варіанту із введенням мікс-фактору (Рис. 3.21 б).

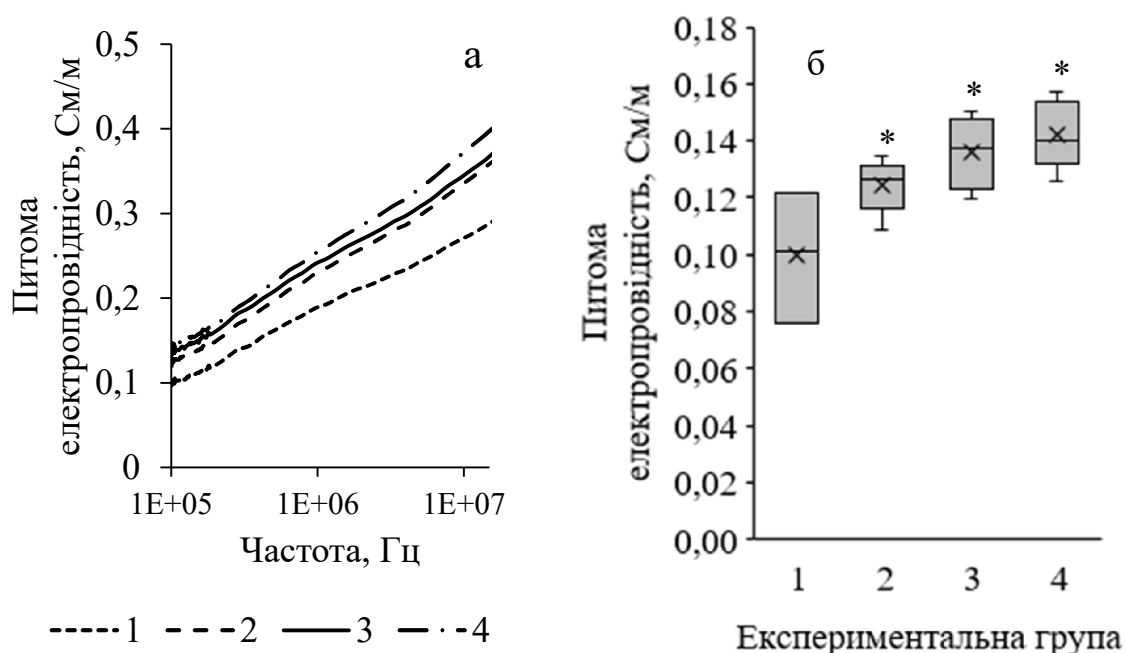


Рис. 3.21. Спектри електропровідності тканин печінки, усереднені для експериментальних груп, в діапазоні частот 100 кГц (1E+05 Гц) – 10 МГц (1E+07 Гц) (а) та електропровідність на частоті 100 кГц у представленні середнє \pm стандартна помилка (б). Експериментальні групи: 1 – інтактний контроль, 2 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, 3 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували мікс-фактор, 4 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували хлорогенову кислоту. * позначено варіанти, для яких $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, можливі зміни структурно-функціональної організації печінки після введення гепатопротекторних субстанцій не демонстрували достовірних змін порівняно з фіброзом. Водночас Си-індукований фіброз призводив до таких структурно-функціональних змін, які вплинули на зміну електропровідності тканини печінки. Отримані результати підтвердили висновок про структурно-функціональні зміни печінки на ранніх стадіях розвитку фіброзу.

3.3.4 Дослідження електропровідності гомогенізованої печінки в моделі Си-індукованого фіброзу, та дії гепатотропних біологічно активних сполук

У наступній серії експериментів визначали зміну електропровідності у зразках печінки з частково порушеною структурою (гомогенату) з метою виключення ролі міжклітинних контактів та капсули Гліссона у досліджуваних зразків печінки.

Було виявлено, що електропровідність гомогенізованої тканини печінки (Рис. 3.22) була значно вищою за електропровідність цільної тканини (Рис. 3.20). Це можна пояснити тим, що гомогенат тканини печінки за методикою, що використана в роботі, є суспензією клітинних включень і фрагментів тканини в фізіологічному розчині, який є середовищем з високим вмістом іонів як носіїв заряду, що визначає основний механізм протікання електричного струму.

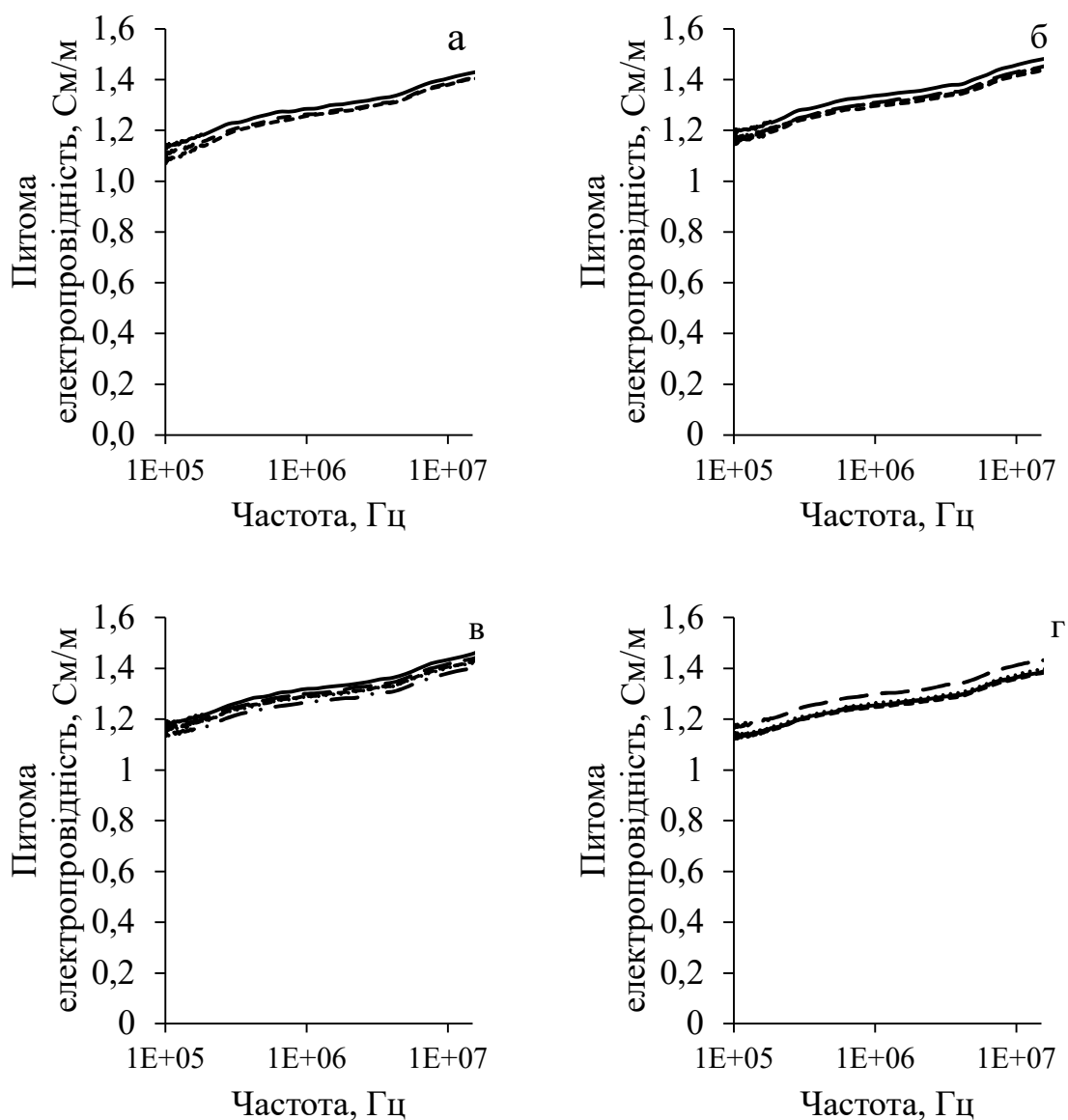


Рис. 3.22. Індивідуальні спектри електропровідності в діапазоні частот 100 кГц (1E+05Гц)- 10 МГц (1E+07Гц) (одна крива на графіку відповідає спектру для однієї тварині) гомогенізованої печінки тварин експериментальних груп: а – інтактний контроль, б – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, в – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували мікс-фактор, г – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували хлорогенову кислоту.

Невисокий, порівняно з цільною тканиною печінки, вміст клітин у гомогенаті печінки зумовлює менш виражену частотну залежність електропровідності, на частотах 100 кГц та 10 МГц відмінність значень електропровідності гомогенату складає в середньому 22 % (Рис. 3.23 а) при відмінності значень електропровідності тканини 175 % (Рис. 3.21 а). Така відмінність може бути пояснена меншим вмістом діелектричних включень у гомогенаті та порушеною структурою тканини. Таким чином на значення електропровідності гомогенату печінки та їх варіативність більший вплив чинить хімічний склад тканини, ніж її структурна організація.

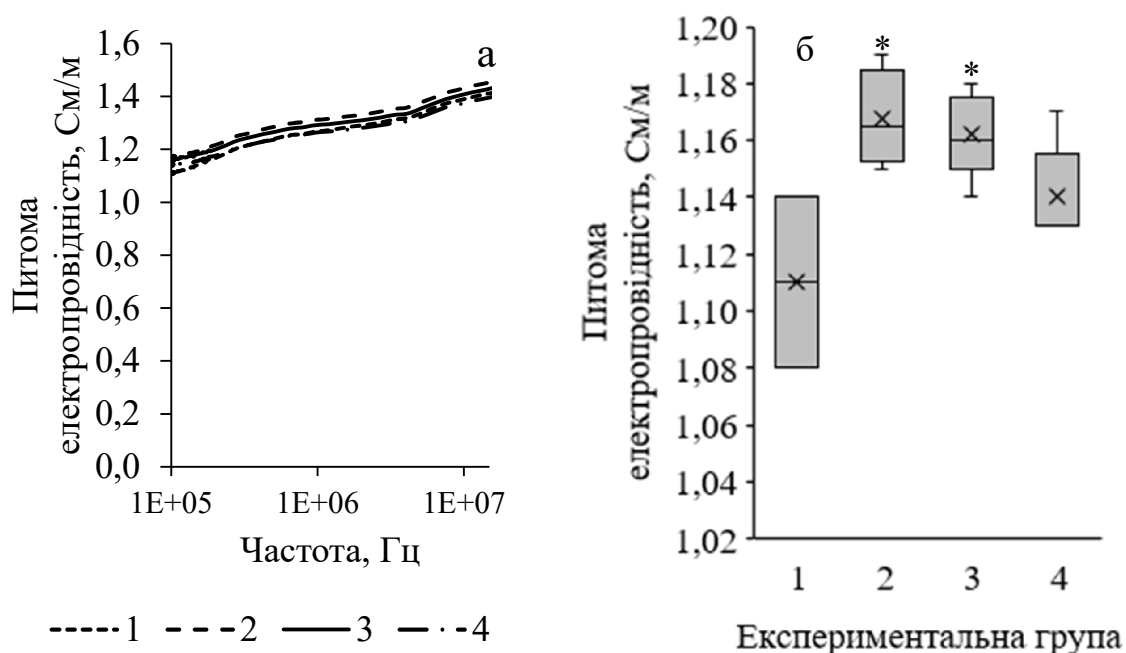


Рис. 3.23. Спектри електропровідності гомогенізованої печінки, усереднені для експериментальних груп, в діапазоні частот 100 кГц (1E+05) – 10 МГц (1E+07) (а) та електропровідність на частоті 100 кГц у представленні середнє \pm стандартна помилка (б). Експериментальні групи: 1 – інтактний контроль, 2 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, 3 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували мікс-фактор, 4 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували хлорогенову кислоту. * позначено варіанти, для яких $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Було виявлено, що електропровідність гомогенізованої тканини печінки тварин із групи з фіброзом печінки була достовірно вищою за електропровідність гомогенізованої тканини інтактних тварин (Рис. 3.23 б). Приймання тваринами з фіброзом мікс-фактора не вплинуло на електропровідність гомогенату тканини порівняно з фіброзом (Рис. 3.23 б). Водночас приймання тваринами з фіброзом хлорогенової кислоти призвело до значного зниження (до рівня, що не показав достовірних відмінностей від інтактного контролю) електропровідності гомогенізованої печінки.

Враховуючи те, що гомогенізація тканини печінки призводить до пошкодження структури тканини, що, як було показано вище, відображається на її електропровідності, можна зробити висновок, що вже на ранніх стадіях розвитку фіброзу відбуваються зміни на різних рівнях структурної організації: як на рівні міжклітинних взаємодій у цільній тканині, так і на взаємодіях, які залишаються непошкодженими при гомогенізації, що відображається на електропровідності. Окрім цього, показано різний вплив гепатотропних біологічно активних сполук на електропровідність цільної тканини (для мікс-фактору та хлорогенової кислоти залишалася достовірно вищою порівняно з інтактною групою) та електропровідність гомогенату (прийом хлорогенової кислоти зменшував електропровідність гомогенату до інтактного рівня), що може свідчити про різні механізми впливу гепатотропних речовин та відкриває перспективи подальшого дослідження цих механізмів.

3.3.5 Дослідження електропровідності сироватки крові

Як відомо, зміна функціональних характеристик печінки, як і інших органів, може супроводжуватися зміною також складу сироватки крові. За наявності кореляцій між структурно-функціональними характеристиками печінки, що мали

місце при фіброзі, можна використовувати характеристики електропровідності сироватки крові в якості діагностичного показника на фіброз печінки. У зв'язку з цим, визначали показники електропровідності в сироватці досліджуваних груп тварин.

Сироватка крові є складним багатокомпонентним середовищем, електропровідність якого здебільшого визначається іонним складом та вмістом білків і ліпідів. Завдяки високому вмісту іонів електропровідність сироватки крові (Рис. 3.24) є наближеною до електропровідності гомогенату печінки (Рис. 3.22), основу якого складає також іонний розчин.

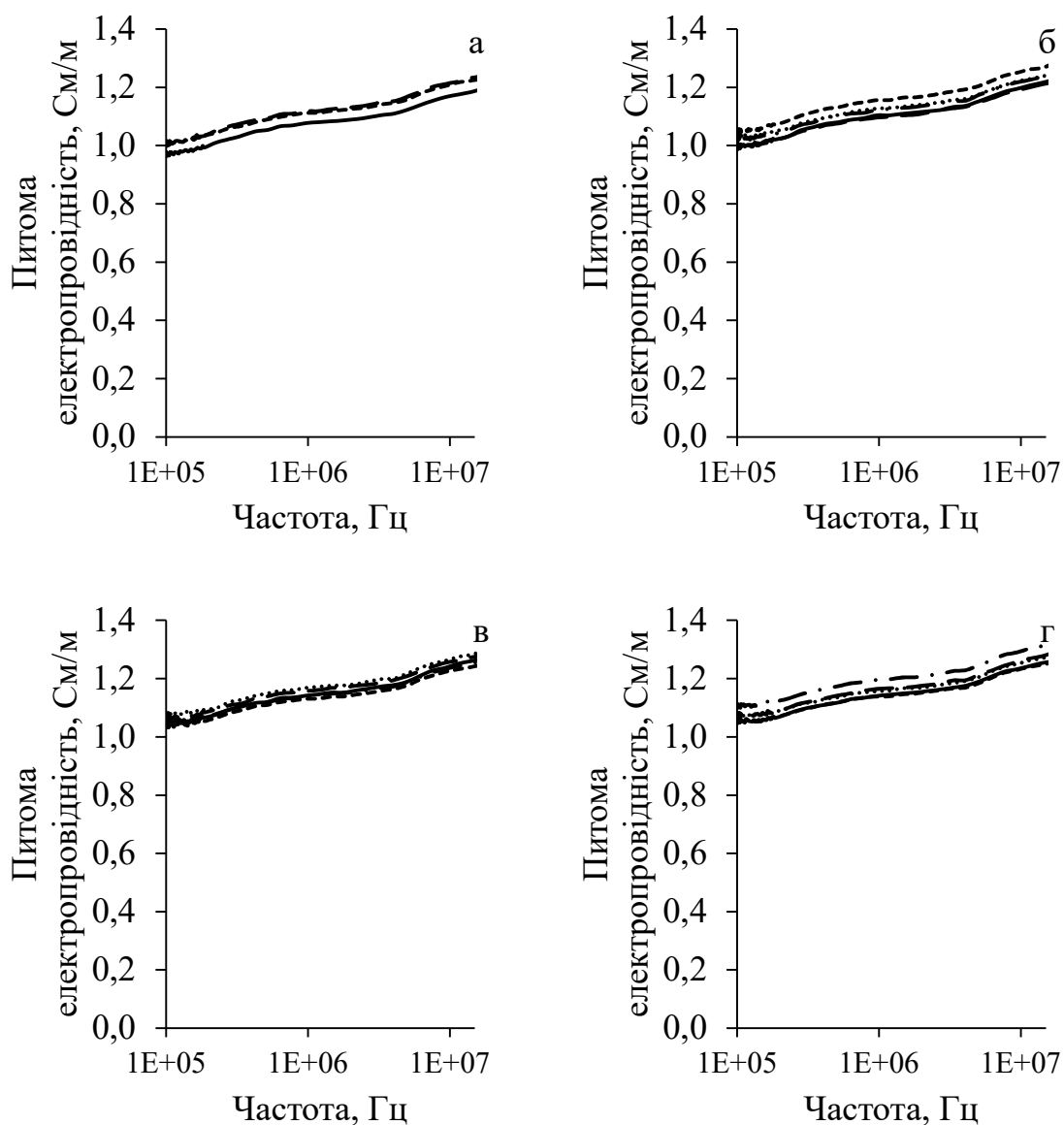


Рис. 3.24. Індивідуальні спектри електропровідності в діапазоні частот 100 кГц (1E+05) – 10 МГц (1E+07) (одна крива на графіку відповідає спектру для однієї тварини) сироватки крові тварин експериментальних груп: а – інтактний контроль, б – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, в – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували мікс-фактор, г – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували хлорогенову кислоту.

Було виявлено, що електропровідність сироватки крові тварин із групи з Си-індукованим фіброзом печінки, не показала достовірних відмінностей порівняно з електропровідністю сироватки крові інтактних тварин (Рис. 3.25 б). Це вказує на те, що фіброз печінки принаймні на початкових стадіях його розвитку не супроводжувався будь-якими значними змінами іонного складу сироватки крові.

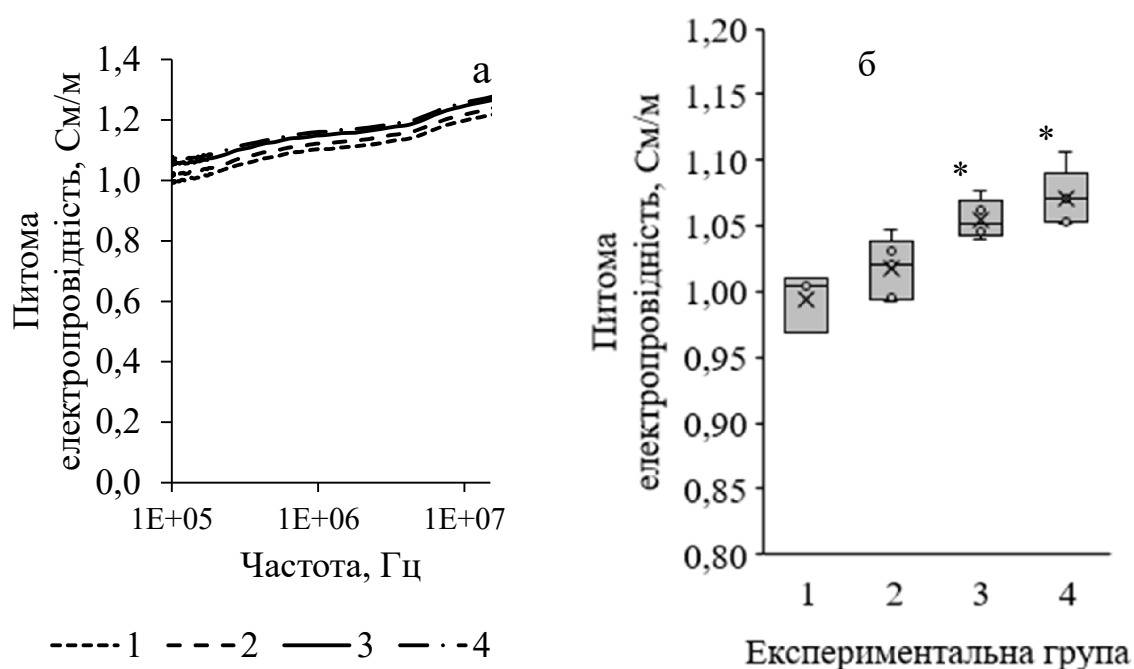


Рис. 3.25. Спектри електропровідності сироватки крові, усереднені для експериментальних груп, в діапазоні частот 100 кГц (1E+05) – 10 МГц (1E+07) (а) та електропровідність на частоті 100 кГц у представленні середнє \pm стандартна помилка (б). Експериментальні групи: 1 – інтактний контроль, 2 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, 3 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували мікс-фактор, 4 – тварини з Си-індукованим фіброзом печінки, що отримували хлорогенову кислоту. * позначено варіанти, для яких $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Приймання тваринами з фіброзом печінки біологічно активних гепатотропних субстанцій – мікс-фактора та хлорогенової кислоти – призвело до достовірного

збільшення електропровідності сироватки крові порівняно з інтактною групою (Рис. 3.25 б). Отримані результати свідчать про те, що між зміною електропровідності тканини печінки та електропровідністю сироватки крові відсутній прямий взаємозв'язок, і досліджувані біологічні субстанції можуть впливати на функціональні характеристики печінки, «використовуючи» різні механізми.

Результати дослідження електропровідності цільної і гомогенізованої тканин печінки та сироватки крові показали, що метод імпедансної спектроскопії є чутливим до змін структури та складу тканини. Окремий інтерес представляє можливість виявляти ці зміни вже на ранніх стадіях розвитку фіброзу, більш пізні стадії розвитку патології, такі як цироз печінки, в роботі не досліджувалися.

При дослідженні капсули Глісона було виявлено високу варіативність результатів в залежності від досліджуваної ділянки, тобто метод чутливий не лише до змін, типових для розвитку фіброзу печінки, а і до індивідуальної варіативності морфологічних та фізіологічних характеристик печінки окремих тварин та, у випадку капсули Глісона, відмінностей на різних ділянках тканини. Це відкриває перспективи застосування методу імпедансної спектроскопії для подальшого дослідження капсули Глісона, зокрема її неоднорідності.

Разом з тим, дослідження решти зразків біологічної тканини (цільна тканина печінки з видаленою капсулою Глісона, гомогенізована печінка, сироватка крові) продемонструвало меншу індивідуальну варіативність та дозволило показати кореляції між експериментальними групами, у яких відбуваються зміни в морфології тканини. Додатково показано вплив гепатотропних сполук на електропровідність, він був різним для цільної та гомогенізованої тканини печінки (на рівні цільної тканини зберігалася тенденція підвищення електропровідності при фіброзі печінки, на рівні гомогенату електропровідність зменшувалася порівняно з фіброзом, а на сироватку крові наявність фіброзу печінки не вплинула і вплинув

прийом гепатотропних сполук), що може містити додаткову інформацію для інтерпретації механізмів дії цих сполук.

Таким чином, окрім самого факту наявності зв'язку електропровідності біологічних проб з розглянутими фізіологічними процесами та морфологічними характеристиками, можливість інтерпретації спектрів електропровідності через конкретні показники (вміст іонів у міжклітинній та внутрішньоклітинній речовині та їх рухливість, вміст діелектричних включень, наявність міжклітинних білкових структур) показує перспективи застосування спектрів електропровідності біологічних проб в медицині як в діагностиці патологій печінки, так і при контролі під час їх терапії.

Висновки до розділу 3

Вітамін А сприяв нормалізації функції печінки на фоні розвитку фіброзу на початкових стадіях. Механізм нормалізації може бути забезпечений за рахунок часткового посилення процесу регенерації печінки, про що свідчить збільшення кількості двоядерних гепатоцитів, та незначного збільшення відносної маси печінки, активації імунної відповіді про що свідчить інкорпоровані імунокомпетентні клітини у збільшеній капсули Гліссона. Важливу роль у збереженні функціональної активності печінки на початкових стадіях розвитку фіброзу може відігравати індукція з'єднувальної тканини, яка збільшується у тварин з фіброзом, яким вводили вітамін А.

Хронічно-токсикогенна дія іонів міді на організм на рівні гомеостазу супроводжувалася формуванням хронічного стану. Необхідно зазначити, що формування хронічної патології проявлялося не у всіх експериментальних тварин, хоча й у більшій частині. Однак в експериментальній групі були присутні тварини, у яких фібротичні утворення були слабо вираженими або майже не виявлялися,

тобто мала місце виражена "групова" варіабельність на дію одного й того самого токсикогенного чинника, що було показано на цій експериментальній моделі.

Такі відмінності у відповіді організму, однієї й тієї самої статі та віку, на один і той самий екзогенний чинник, може пояснюватися тим, що в момент впливу ці тварини різнилися щонайменше за темпоральними характеристиками метаболічних показників та особливостями метаболічної пам'яті, яка «сформувалася» в результаті індивідуальних відмінностей попереднього «адаптивного досвіду», адже на характеристики метаболічної пам'яті впливають генетичні, епігенетичні та метаболічні характеристики організму [9].

Чим більше вихідних структурно-функціональних відмінностей у метаболічних патернах між індивідуумами, тим різноманітнішими будуть відповідні реакції на той самий чинний фактор, оскільки інтегральна відповідь організму формується як комбінація з різних складових елементів.

Збільшення вмісту вітаміну А в печінці на тлі високого вмісту іонів міді супроводжувалося відновленням активності АЛТ до рівня контрольних значень, що може свідчити про відновлення функціональної активності печінки з фіброзом.

Отже, нормалізація вмісту вітаміну А в печінці на початкових стадіях розвитку фіброзу "скасовувала" подальшу негативну дію сірчанокиислої міді на організм. Нормалізація функції печінки, ймовірно, здійснювалася і за рахунок збільшення процесів регенерації печінки, про що може свідчити збільшення двоядерних гепатоцитів, порівняно з нормою, і це особливо виражено порівняно з фіброзом (Рис. 3.6). При цьому, у 75% тварин мало місце збільшення сполучнотканинних утворень, а у 25% - вони не виявлялися та/або, ймовірно, зазнавали руйнування навіть після другого циклу інтоксикації сірчанокиислою міддю (Рис. 3.4).

Ці результати дають змогу стверджувати, що підтримання концентрації ретинолу в печінці на рівні контрольних значень, на початкових стадіях розвитку фіброзу печінки, може запобігти подальшому розвитку цього багатостадійного

патологічного процесу навіть на тлі подальших дій токсикогенного фактора. Водночас за реакціями тварин на дію вітаміну А принаймні щодо сполучнотканинних утворень їх можна розділити щонайменше на дві групи.

Результати дають змогу припустити, що вітамін А може як посилювати фіброгенні функції зірчастих клітин, поряд із дією продуктів окисного стресу, так, можливо, й активувати синтез металопротеїназ, а баланс між цими двома протилежно спрямованими процесами біогенезу сполучної тканини визначатиме посилення розвитку фіброзу або, навпаки, гідроліз сполучно-тканинних утворень та перехід хронічної патології до нового гомеостатичного стану, що спостерігається в частини тварин та може бути інтерпретовано в рамці.

Спрямованість дії вітаміну А на ті чи інші метаболічні системи залежить не тільки від темпоральних характеристик метаболічних процесів, що беруть участь у формуванні адаптивної відповіді, а й від його концентрації в біологічних тканинах.

Необхідно зазначити, що вітамін А відіграє визначальну роль у біогенезі фібротичних утворень печінки. Однак, спрямованість його дії залежить не тільки від його концентрації в зірчастих клітинах, а й від стадії розвитку процесу, які характеризуються темпоральними особливостями системи в момент його дії. У тому разі, якщо будуть розроблені оцінки функціональних станів і зокрема, темпоральних особливостей елементів метаболічної системи, що формує фібротичні процеси, то вітамін А може бути дієвим інструментом в усуненні цієї патології. Подальші розробки таких стратегій можуть бути досить перспективними не тільки у розв'язанні проблеми лікування фіброзу, а й розробки концепції формування адаптивної відповіді на дії різноманітних біологічно активних сполук і ксенобіотиків.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [9-12].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено важливе наукове завдання: досліджена роль вітаміну А на структурно-функціональну організацію печінки при інтоксикації організму сірчаною кислотою.

Встановлено взаємозв'язок між структурно-функціональними особливостями печінки, біохімічними показниками та електропровідністю, як біофізичної характеристики біологічних тканин і середовищ на прикладі Си-індукованого фіброзу, активності печінкових ферментів та утворення сполучнотканинних утворень в залежності від впливу гепатотропними речовинами та наявності фіброзу печінки і кількісним складом двоядерних гепатоцитів.

1. Введення вітаміну А тваринам із Си-індукованим фіброзом печінки на ранніх етапах розвитку, яке забезпечувало його відновлення до вихідного рівня в печінці, забезпечувало нормалізацію динаміки росту таких тварин.

2. Вітамін А на ранніх етапах розвитку Си-індукованого фіброзу збільшував утворення сполучно-тканинного матриксу навколо печінки, що супроводжувалося значним зменшенням смертності експериментальних тварин з 41% до 6%.

3. Введення вітаміну А тваринам із Си-індукованим фіброзом печінки на ранніх етапах його розвитку супроводжувалося збільшенням кількості двоядерних гепатоцитів більш ніж у 2 рази (порівняно з тваринами з фіброзом, що не отримували вітамін А), і це корелювало з відновленням функціональної активності печінки судячи з активності ферментів печінки.

4. Встановлено, на початкових стадіях розвитку фіброзу печінки має місце збільшення товщини капсули Гліссона, що корелювало зі зміною електропровідності тканини печінки. Показано, що електропровідність відображає фібротичні зміни в печінці вже на ранніх стадіях розвитку фіброзу на рівні структурної організації тканини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Crawford JM, Burt AD. Chapter 1 Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. In: Portmann B, Ferrell L, Burt A, editors. MacSween's pathology of the liver. 6th ed. Edinburg: Churchill Livingstone Elsevier; 2012. pp. 1–77.
2. Gu, X., & Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert reviews in molecular medicine*, 14, e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
3. Sun, M., & Kisseleva, T. (2015). Reversibility of liver fibrosis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 39, S60-S63. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.015>
4. Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A. I., Padalko, V. I., & Flora, S. J. S. (2011). Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(4), 607-614.
5. Senoo, H., Mezaki, Y., & Fujiwara, M. (2017). The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). *Anatomical science international*, 92, 387-455. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0395-9>
6. Hwang, I., Lee, E. J., Park, H., Moon, D., & Kim, H. S. (2021). Retinol from hepatic stellate cells via STRA6 induces lipogenesis on hepatocytes during fibrosis. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00509-w>
7. Bozhkov, A., Ionov, I., Kurhuzova, N., Novikova, A., Katerynych, O., & Akzhyhitov, R. (2022). Vitamin A intake forms resistance to hypervitaminosis A and affects the functional activity of the liver. *Clinical Nutrition Open Science*, 41, 82-97. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.12.003>
8. Koop, A. H., Mousa, O. Y., Pham, L. E., Corral-Hurtado, J. E., Pungpapong, S., & Keaveny, A. P. (2018). An argument for vitamin D, A, and zinc monitoring in

cirrhosis. *Annals of hepatology*, 17(6), 920-932.

<https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7192>

9. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., & Haiovyi, S. S. (2023). Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. In *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 48–63). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006>.
10. Bozhkov, A., & Bilovetska, S. (2023). Vitamin A accelerates the process of liver regeneration in the initial stages of Cu - induced fibrosis. In *ScienceRise: Biological Science* (Issue 3(36), pp. 34–39). Private Company Technology Center. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2023.288227>.
11. Bilovetska, S., & Kozheshkurt, V. (2023). Electrical conductivity of liver tissue as an indicator of structural and functional organization of liver tissue. In *Grail of Science* (Issue 31, pp. 151–156). European Scientific Platform (Publications). <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.15.09.2023.25>. I Correspondence International Scientific and Practical Conference Open Science Nowadays: Main Mission, Trends And Instruments, Path And Its Development Held On September 15th, 2023 By NGO European Scientific Platform (Vinnytsia, Ukraine) LLC International Centre Corporative Management (Vienna, Austria).
12. Bilovetska S., Kozheshkurt V. (2023). Influence of structural organization of liver tissue on electrical conductivity as a possible indicator of its characteristics (pp.78-81) <https://doi.org/10.36074/scientia-08.09.2023>. Sectoral research XXI: characteristics and features: collection of scientific papers «SCIENTIA» with Proceedings of the VI International Scientific and Theoretical Conference, September 8, 2023. Chicago, USA: European Scientific Platform.

13. Louvet A., Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2015. Vol. 12(4), P. 231-242
14. O'shea R.S., Dasarathy S., McCullough A.J., Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases, & Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010. Vol. 51(1), P. 307-328
15. Lucey M.R., Mathurin P., Morgan T.R. Alcoholic hepatitis. *New England Journal of Medicine*. 2009. Vol. 360(26), P. 2758-2769
16. Guyot C., Lepreux S., Combe C., Doudnikoff E., Bioulac-Sage P., Balabaud C., Desmoulière A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo) fibroblastic cell subpopulations involved. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006. Vol. 38(2), P. 135-151
17. Roan E. The effect of Glisson's capsule on the superficial elasticity measurements of the liver. *Journal of biomechanical engineering*. 2010. Vol. 132(10)
18. Zhang Ch, Yuan W, He P, Lei J, Wang Ch. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol* 2016; 22(48):10512 - 22
19. Haiboniuk I, Dats-Opoka M, Makukh H, Boyko Y, Kiselyk I. Genetic diagnostics and clinical features of Wilson's disease in children. *Eurecf Life Sci* 2020; 2:3 - 9
20. Gruppuso, P. A., & Sanders, J. A. (2016). Regulation of liver development: implications for liver biology across the lifespan. *Journal of molecular endocrinology*, 56(3), R115. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0313>
21. Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2018). Mechanisms of inflammatory liver injury and drug-induced hepatotoxicity. *Current pharmacology reports*, 4, 346-357. <https://doi.org/10.1007/s40495-018-0147-0>
22. Fausto, N. (2004). Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*, 39(6), 1477-1487. <https://doi.org/10.1002/hep.20214>

23. Iwakiri, Y., Shah, V., & Rockey, D. C. (2014). Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis—Current status and future directions. *Journal of hepatology*, 61(4), 912-924. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.047>
24. Reid IS. Biliary tract abnormalities associated with duodenal atresia. *Arch Dis Child*. 1973 Dec;48(12):952–7
25. Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev*. 2000 Mar 15;92(1):83–8
26. Suriawinata AA, Thung SN. Chapter 28: Liver. In: Mills SE, Editor. *Histology for pathologists*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012. pp. 733–816
27. Moore KL, Persaud TVN. Chapter 12: The digestive system. In: Moore KL, Persaud TVN, editors. *The development of the human: clinically orientated embryology*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. pp. 272–302
28. Roskams T, Desmet V. Embryology of extra- and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Jun;291(6):628–35
29. Makin E, Quaglia A, Kvist N, Petersen BL, Portmann B, Davenport M. Congenital biliary atresia: liver injury begins at birth. *J Pediatr Surg*. 2009 March;44(3):630–3
30. El-Shabrawi MH, El-Karaksy HM, Okahsa SH, Kamal NM, ElBatran G, Badr KA. Outpatient blind percutaneous liver biopsy in infants and children: is it safe? *Saudi J Gastroenterol*. 2012 Jan– Feb;18(1): 26–33
31. Couinaud C. *Le foie: études anatomiques et chirurgicales*. Paris: Masson et Cie; 1957
32. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec*. 1954 May;119(1):11–33
33. Xu S., et al. Quantification of liver fibrosis via second harmonic imaging of the Glisson's capsule from liver surface. *Journal of biophotonics*. 2016. Vol. 9(4), P. 351-363

34. Balog S., Li Y., Ogawa T., Miki T., Saito T., French S.W., Asahina K. Development of capsular fibrosis beneath the liver surface in humans and mice. *Hepatology*. 2020. Vol. 71(1), P. 291-305
35. Myers M.B., Cherry G. Effect of methyl cyanoacrylate on the hepatic capsule. *The American Journal of Surgery*. 1967. Vol. 113(5), P. 642-645
36. Geerts A. History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Seminars in Liver Disease*. 2001. Vol. 21, no. 03. P. 311–336. URL: <https://doi.org/10.1055/s-2001-17550>
37. Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses / F. Winau et al. *Immunity*. 2007. Vol. 26, no. 1. P. 117–129. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.011>
38. 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>
39. Crespo Yanguas S., et al. Experimental models of liver fibrosis. *Archives of toxicology*. 2016. Vol. 90, P. 1025-1048
40. Calvaruso V., Maimone S., Gatt A., Tuddenham E., Thursz M., Pinzani M., Burroughs A.K. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease. *Gut*. 2008. Vol. 57(12), P. 1722-1727
41. Rajapaksha, I. G., Gunarathne, L. S., Angus, P. W., & Herath, C. B. (2021). Update on New Aspects of the Renin-Angiotensin System in Hepatic Fibrosis and Portal Hypertension: Implications for Novel Therapeutic Options. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 10, Issue 4, p. 702). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jcm10040702>.
42. Seitz H.K., et al. Alcoholic liver disease. *Nature reviews Disease primers*. 2018. Vol. 4.1, 16
43. Burri B. J., Chang J., Neidlinger T. R. Comparison of bioavailability of the vitamin A-forming carotenoids (beta-cryptoxanthin, beta-carotene and alpha-carotene). *The*

- FASEB Journal. 2009. Vol. 23, S1. URL: https://doi.org/10.1096/fasebj.23.1_supplement.34.2
- 44.. Role of Vitamin A in the Immune System / Z. Huang et al. *Journal of Clinical Medicine*. 2018. Vol. 7, no. 9. P. 258. URL: <https://doi.org/10.3390/jcm7090258>
- 45.. Haaker M. W., Vaandrager A. B., Helms J. B. Retinoids in health and disease: A role for hepatic stellate cells in affecting retinoid levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020. Vol. 1865, no. 6. P. 158674. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158674>
- 46.. Wiseman E. M., Bar-El Dadon S., Reifen R. The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. Vol. 57, no. 17. P. 3703–3714. URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1160362>
- 47.. Palczewski K. Chemistry and Biology of Vision. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 287, no. 3. P. 1612–1619. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.r111.301150>
- 48.. Stephensen C. B. Vitamin A, infection, and immune function. *Annual Review of Nutrition*. 2001. Vol. 21, no. 1. P. 167–192. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.167>
- 49.. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity / A. Carazo et al. *Nutrients*. 2021. Vol. 13, no. 5. P. 1703. URL: <https://doi.org/10.3390/nu13051703>
- 50.. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage / R. Blomhoff et al. *Physiological Reviews*. 1991. Vol. 71, no. 4. P. 951–990. URL: <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.4.951>
- 51.. Biesalski H. K. Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology*. 1989. Vol. 57, no. 2. P. 117–161. URL: [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(89\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0300-483x(89)90161-3)
- 52.. Moore T. Vitamin A and carotene. *Biochemical Journal*. 1930. Vol. 24, no. 3. P. 692–702. URL: <https://doi.org/10.1042/bj0240692> (date of access: 26.04.2023).

53. Schaub, P., Wüst, F., Koschmieder, J., Yu, Q., Virk, P., Tohme, J., & Beyer, P. (2017). Nonenzymatic β -carotene degradation in provitamin A-biofortified crop plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6588-6598.
54. von Lintig J., Vogt K. Vitamin A Formation in Animals: Molecular Identification and Functional Characterization of Carotene Cleaving Enzymes. *The Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 134, no. 1. P. 251S-256S. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.251s>
55. Olson J. A., Hayaishi O. The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1965. Vol. 54, no. 5. P. 1364-1370. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.54.5.1364>
56. Goodman D. S., Huang H. S. Biosynthesis of Vitamin A with Rat Intestinal Enzymes. *Science*. 1965. Vol. 149, no. 3686. P. 879-880. URL: <https://doi.org/10.1126/science.149.3686.879>
57. Blaner W. S. Vitamin A and provitamin A carotenoids. *Present Knowledge in Nutrition*. 2020. P. 73-91. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00005-6>
58. Molecular aspects of β , β -carotene-9', 10'-oxygenase 2 in carotenoid metabolism and diseases / L. Wu та ін. *Experimental Biology and Medicine*. 2016. T. 241, № 17. C. 1879-1887. URL: <https://doi.org/10.1177/1535370216657900>
59. Sommer A. Vitamin A deficiency and its consequences: A field guide to detection and control. 3rd ed. Geneva : World Health Organization, 1995. 69 p.
60. Kundu S., Rai B., Shukla A. Prevalence and determinants of Vitamin A deficiency among children in India: Findings from a national cross-sectional survey. *Clinical Epidemiology and Global Health*. 2021. Vol. 11. P. 100768. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2021.100768>
61. Prevalence of anaemia, deficiencies of iron and vitamin A and their determinants in rural women and young children: a cross-sectional study in Kalalé district of

- northern Benin / H. Alaofè et al. *Public Health Nutrition*. 2017. Vol. 20, no. 7. P. 1203–1213. URL: <https://doi.org/10.1017/s1368980016003608>
- 62..Sommer A. Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview. *The Journal of Nutrition*. 2008. Vol. 138, no. 10. P. 1835–1839. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.1835>
- 63..Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations / J. C. Sherwin et al. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012. Vol. 106, no. 4. P. 205–214. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.004>
- 64..Vitamin A Deficiency and the Lung / J. Timoneda et al. *Nutrients*. 2018. Vol. 10, no. 9. P. 1132. URL: <https://doi.org/10.3390/nu10091132>
- 65..Clagett-Dame M., Knutson D. Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutrients*. 2011. Vol. 3, no. 4. P. 385–428. URL: <https://doi.org/10.3390/nu3040385>
- 66..Sommer A. Vitamin A, Infectious Disease, and Childhood Mortality: A 2 Solution?. *Journal of Infectious Diseases*. 1993. Vol. 167, no. 5. P. 1003–1007. URL: <https://doi.org/10.1093/infdis/167.5.1003>
- 67..Aguayo V. M., Baker S. K. Vitamin A Deficiency and Child Survival in Sub-Saharan Africa: A Reappraisal of Challenges and Opportunities. *Food and Nutrition Bulletin*. 2005. Vol. 26, no. 4. P. 348–355. URL: <https://doi.org/10.1177/156482650502600404>
- 68..Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries / R. E. Black et al. *The Lancet*. 2013. Vol. 382, no. 9890. P. 427–451. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60937-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60937-x)
- 69..Wali N., Agho K., Renzaho A. M. N. Past drivers of and priorities for child undernutrition in South Asia: a mixed methods systematic review protocol. *Systematic Reviews*. 2019. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13643-019-1112-7>

- 70..Peluffo G., Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, no. 2. P. 291–302. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.024>
- 71..Penniston K. L., Tanumihardjo S. A. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006. Vol. 83, no. 2. P. 191–201. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.191>
- 72..Binkley N., Krueger D. Hypervitaminosis A and Bone. *Nutrition Reviews*. 2009. Vol. 58, no. 5. P. 138–144. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2000.tb01848.x>
- 73..Maddux G. W., Foltz F. M., Nelson S. R. Effect of Vitamin A Intoxication on Intracranial Pressure and Brain Water in Rats. *The Journal of Nutrition*. 1974. Vol. 104, no. 4. P. 478–482. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/104.4.478>
- 74..Vitamin A toxicity: When one a day doesn't keep the doctor away / R. Cheruvattath et al. *Liver Transplantation*. 2006. Vol. 12, no. 12. P. 1888–1891. URL: <https://doi.org/10.1002/lt.21007>
- 75..Bangham A., Dingle J., Lucy J. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 9. Penetration of lipid monolayers by compounds in the vitamin A series. *Biochemical Journal*. 1964. Vol. 90, no. 1. P. 133–140. URL: <https://doi.org/10.1042/bj0900133>
- 76..Pseudotumor Cerebri Syndrome with Resolution After Discontinuing High Vitamin A Containing Dietary Supplement: Case Report and Review / J. T. Chisholm et al. *Neuro-Ophthalmology*. 2017. Vol. 42, no. 3. P. 169–175. URL: <https://doi.org/10.1080/01658107.2017.1367931>
- 77..Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing / A. Karpouzou et al. *Journal of Osteoporosis*. 2017. Vol. 2017. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/4218472>

- 78..Baineni R., Gulati R., Delhi C. K. Vitamin A toxicity presenting as bone pain. *Archives of Disease in Childhood*. 2016. Vol. 102, no. 6. P. 556–558. URL: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310631>
- 79..Li Y., Wongsiriroj N., Blaner W. S. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2014. Vol. 3, no. 3. P. 126–139. URL: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04>
- 80..Evaluation of vitamin A toxicity / J. N. Hathcock et al. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1990. Vol. 52, no. 2. P. 183–202. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/52.2.183>
- 81.Seki E., Brenner D. A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2015. Vol. 22, no. 7. P. 512–518. URL: <https://doi.org/10.1002/jhbp.245>
- 82.Miao, M., & Xiang, L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Advances in pharmacology*, 87, 71-88.
- 83.Lu, H., Tian, Z., Cui, Y., Liu, Z., & Ma, X. (2020). Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(6), 3130-3158.
- 84.D'Ambrosio D. N., Clugston R. D., Blaner W. S. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*. 2011. Vol. 3, no. 1. P. 63–103. URL: <https://doi.org/10.3390/nu3010063>
- 85.Harrison E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012. Vol. 1821, no. 1. P. 70–77. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.002>
- 86.Kanai M., Raz A., Goodman D. S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *Journal of Clinical Investigation*. 1968. Vol. 47, no. 9. P. 2025–2044. URL: <https://doi.org/10.1172/jci105889>

87. CD36 and SR-BI Are Involved in Cellular Uptake of Provitamin A Carotenoids by Caco-2 and HEK Cells, and Some of Their Genetic Variants Are Associated with Plasma Concentrations of These Micronutrients in Humans / P. Borel et al. *The Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 143, no. 4. P. 448–456. URL: <https://doi.org/10.3945/jn.112.172734>
88. Genetics and Diet Regulate Vitamin A Production via the Homeobox Transcription Factor ISX / G. P. Lobo et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 13. P. 9017–9027. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.444240>
89. ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β,β -carotene absorption and vitamin A production / G. P. Lobo та ін. *The FASEB Journal*. 2010. T. 24, № 6. C. 1656–1666. URL: <https://doi.org/10.1096/fj.09-150995>
90. Harrison E. H. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annual Review of Nutrition*. 2005. Vol. 25, no. 1. P. 87–103. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092614>
91. Vieira M., Saraiva M. J. Transthyretin: a multifaceted protein. *BioMolecular Concepts*. 2014. Vol. 5, no. 1. P. 45–54. URL: <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0038>
92. Liver Retinol Transporter and Receptor for Serum Retinol-binding Protein (RBP4) / P. Alapatt et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 288, no. 2. P. 1250–1265. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.369132>
93. Cross Talk between Signaling and Vitamin A Transport by the Retinol-Binding Protein Receptor STRA6 / D. C. Berry et al. *Molecular and Cellular Biology*. 2012. Vol. 32, no. 15. P. 3164–3175. URL: <https://doi.org/10.1128/mcb.00505-12>
94. Provitamin A (alpha-carotene, beta-carotene and beta-cryptoxanthin) and ascorbic acid content of japanese and american persimmons / A. Homnava et al. *Journal of Food Quality*. 1990. Vol. 13, no. 2. P. 85–95. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1990.tb00009.x>

95. Burri B. J. Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014. Vol. 95, no. 9. P. 1786–1794. URL: <https://doi.org/10.1002/jsfa.694>
96. Sahu B., Maeda A. Retinol Dehydrogenases Regulate Vitamin A Metabolism for Visual Function. *Nutrients*. 2016. Vol. 8, no. 11. P. 746. URL: <https://doi.org/10.3390/nu8110746>
97. Lidén M., Eriksson U. Understanding Retinol Metabolism: Structure and Function of Retinol Dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, no. 19. P. 13001–13004. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.r500027200>
98. Retinol-binding protein 2 (RBP2): biology and pathobiology / W. S. Blaner et al. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2020. Vol. 55, no. 2. P. 197–218. URL: <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1768207>
99. Association of urinary RBP4 with insulin resistance, inflammation, and microalbuminuria / S. E. Park et al. *European Journal of Endocrinology*. 2014. Vol. 171, no. 4. P. 443–449. URL: <https://doi.org/10.1530/eje-14-0247>
100. Human plasma retinol-binding protein (RBP4) is also a fatty acid-binding protein / M. Perduca et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018. Vol. 1863, no. 4. P. 458–466. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.01.010>
101. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system: an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 2003;144:2179–2183.
102. Llewellyn, J., Fede, C., Loneker, A. E., Friday, C. S., Hast, M. W., Theise, N. D., Furth, E. E., Guido, M., Stecco, C., & Wells, R. G. (2023). Glisson's capsule matrix structure and function is altered in patients with cirrhosis irrespective of aetiology. In *JHEP Reports* (Vol. 5, Issue 9, p. 100760). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023>

103. Bataller R, Gines P, Nicolas JM, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000;118:1149–1156.
104. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112:1383–1394.
105. Moreno-Alvarez P, Sosa-Garrocho M, Briones-Orta MA, et al. Angiotensin II increases mRNA levels of all TGF-beta isoforms in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *Cell Biol Int*. 2010;34:969–978.
106. Tox U, Steffen HM. Impact of inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system on liver fibrosis and portal hypertension. *Curr Med Chem*. 2006;13:3649–3661.
107. Albornoz L, Motta A, Alvarez D, et al. Nitric oxide synthase activity in the splanchnic vasculature of patients with cirrhosis: relationship with hemodynamic disturbances. *J Hepatol*. 2001;35:452–456.
108. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005;353:2254–2261.
109. Bataller R., Gao B. Liver fibrosis in alcoholic liver disease. In *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers. 2015. Vol. 35 (2), P. 146-156
110. Im G.Y. Emerging Biomarkers in Alcohol-associated Hepatitis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2022. Vol. 13(1), P. 103-115
111. Bubnov R.V., Drahulian M.V., Buchek P.V., Gulko T.P. High regenerative capacity of the liver and irreversible injury of male reproductive system in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis rat model. *EPMA Journal*. 2018. Vol. 9, P. 59-75
112. Wu S., Wang X., Xing W., Li F., Liang M., Li K., He Y., Wang J. An update on animal models of liver fibrosis. *Frontiers in medicine*. 2023. Vol. 10, 1160053

113. Dijkstra FR, Nieuwenhuijzen M, Reijnen MM, van Goor H: Recent clinical developments in pathophysiology, epidemiology, diagnosis and treatment of intra-abdominal adhesions. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 2000, 232: 52-59
114. Liakakos T, Thomakos N, Fine PM, Derveniz C, Young RL: Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management. *Dig Surg.* 2001, 18: 260-273. 10.1159/000050149
115. Sulaiman H, Gabella G, Davis MSc C, Mutsaers SE, Boulos P, Laurent GJ, Herrick SE: Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Ann Surg.* 2001, 234: 256-261. 10.1097/00000658-200108000-00016
116. Ellis H: The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *Eur J Surg Suppl.* 1997, 577: 5-9
117. Zühlke HV, Lorenz EM, Straub EM, Savvas V: Pathophysiology and classification of adhesions. *Langenbecks Arch Chir Verh Dtsch Ges Chir.* 1990, Suppl 2: 1009-1016
118. Parker MC, Wilson MS, van Goor H, Moran BJ, Jeekel J, Duron JJ, Menzies D, Wexner SD, Ellis H: Adhesions and colorectal surgery - call for action. *Colorectal Dis.* 2007, 9 (Suppl 2): 66-72
119. Cheong YC, Laird SM, Li TC, Shelton JB, Ledger WL, Cooke ID: Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum Reprod Update.* 2001, 7: 556-566. 10.1093/humupd/7.6.556
120. Kössi J, Salminen P, Rantala A, Laato M: Population-based study of the surgical workload and economic impact of bowel obstruction caused by postoperative adhesions. *Br J Surg.* 2003, 90: 1441-1444. 10.1002/bjs.4272
121. Menzies D, Ellis H: Intestinal obstruction from adhesions—how big is the problem?. *Ann R Coll Surg Engl.* 1990, 72: 60-63
122. Gutt CN, Oniu T, Schemmer P, Mehrabi A, Büchler MW: Fewer adhesions induced by laparoscopic surgery?. *Surg Endosc.* 2004, 18: 898-906. 10.1007/s00464-003-9233-3

123. Krähenbühl L, Schäfer M, Kuzinkovas V, Renzulli P, Baer HU, Büchler MW: Experimental study of adhesion formation in open and laparoscopic fundoplication. *Br J Surg.* 1998, 85: 826-830. 10.1046/j.1365-2168.1998.00718.x
124. Garrard CL, Clements RH, Nanney L, Davidson JM, Richards WO: Adhesion formation is reduced after laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 1999, 13: 10-13. 10.1007/s004649900887
125. Polymeneas G, Theodosopoulos T, Stamatiadis A, Kourias E: A comparative study of postoperative adhesion formation after laparoscopic vs open cholecystectomy. *Surg Endosc.* 2001, 15: 41-43. 10.1007/s004640000269
126. Molinaro F, Kaselas C, Lacreuse I, Moog R, Becmeur F: Postoperative intestinal obstruction after laparoscopic versus open surgery in the pediatric population: A 15-year review. *Eur J Pediatr Surg.* 2009, 19: 160-162. 10.1055/s-0029-1202858
127. Al-Jaroudi D, Tulandi T: Adhesion prevention in gynecologic surgery. *Obstet Gynecol Surv.* 2004, 59: 360-367. 10.1097/00006254-200405000-00024
128. Alpay Z, Saed GM, Diamond MP: Female infertility and free radicals: potential role in adhesions and endometriosis. *J Soc Gynecol Investig.* 2006, 13: 390-398. 10.1016/j.jsg.2006.05.002
129. Trimpos-Kemper TC, Trimpos JB, van Hall EV: Adhesion formation after tubal surgery: results of the eighth-day laparoscopy in 188 patients. *Fertil Steril.* 1985, 43: 395-400
130. Ellis H, Moran BJ, Thompson JN, Parker MC, Wilson MS, Menzies D, McGuire A, Lower AM, Hawthorn RJ, O'Brien F, Buchan S, Crowe AM: Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet.* 1999, 353: 1476-1480. 10.1016/S0140-6736(98)09337-4
131. Kresch AJ, Seifer DB, Sachs LB, Barrese I: Laparoscopy in 100 women with chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol.* 1984, 64: 672-674

132. Sutton C, MacDonald R: Laser laparoscopic adhesiolysis. *J Gynecol Surg.* 1990, 6: 155-159. 10.1089/gyn.1990.6.155
133. Holmdahl L, Eriksson E, Eriksson BI, Risberg B: Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma. *Surgery.* 1998, 123: 539-544. 10.1067/msy.1998.86984
134. Ivarsson ML, Bergström M, Eriksson E, Risberg B, Holmdahl L: Tissue markers as predictors of postoperative adhesions. *Br J Surg.* 1998, 85: 1549-1554. 10.1046/j.1365-2168.1998.00859.x
135. Holmdahl L, Kotseos K, Bergström M, Falk P, Ivarsson ML, Chegini N: Overproduction of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrinolytic impairment. *Surgery.* 2001, 129: 626-632. 10.1067/msy.2001.113039
136. Chegini N, Kotseos K, Zhao Y, Bennett B, McLean FW, Diamond MP, Holmdahl L, Burns J: Differential expression of TGF-beta1 and TGF-beta3 in serosal tissues of human intraperitoneal organs and peritoneal adhesions. *Hum Reprod.* 2001, 16: 1291-1300. 10.1093/humrep/16.6.1291
137. Cheong YC, Shelton JB, Laird SM, Li TC, Ledger WL, Cooke ID: Peritoneal fluid concentrations of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta in women with pelvic adhesions. *Fertil Steril.* 2003, 79: 1168-1175. 10.1016/S0015-0282(03)00079-7
138. Molinas CR, Campo R, Elkelani OA, Binda MM, Carmeliet P, Koninckx PR: Role of hypoxia inducible factors 1alpha and 2alpha in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum-enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in transgenic mice. *Fertil Steril.* 2003, 80 (Suppl 2): 795-802
139. Brochhausen C, Schmitt VH, Planck CN, Rajab TK, Hollemann D, Tapprich C: Current strategies and future perspectives for Intraperitoneal adhesion prevention. *J Gastrointest Surg.* 2012, Epub ahead of print

140. Segura T, Schmokel H, Hubbell JA: RNA interference targeting hypoxia inducible factor 1alpha reduces post-operative adhesions in rats. *J Surg Res.* 2007, 141: 162-170. [10.1016/j.jss.2006.07.045](https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.045)
141. Pacifici, R. E., & Davies, K. J. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37(1-3), 166–180. <https://doi.org/10.1159/000213257>
142. Lukkala, J. (2012). HemoCue WBC® ja Mindray™ BC-2800-analysaattoreiden leukosyytien tasovertailu, leukosyytien säilyvyys EDTA-antikoagulantissa sekä päivystystutkimuskartoitus
143. Bakkum, E. A., Trimbos, J. B., & Trimbos-Kemper, T. C. (1996). Postsurgical adhesion formation and prevention – recent developments with regard to the consecutive stages in adhesion formation. In *Reproductive Medicine Review* (Vol. 5, Issue 1, pp. 37–49). Cambridge University Press (CUP). <https://doi.org/10.1017/s0962279900001228>
144. Bozhkov, A. I.; Linkevych, O. S.; Ivanov, E. G.; Klimova, O. M.; AlBegai, M. A. Y. et al. Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis. *International Journal of Current Research* 2016, 8, 44129-44137
145. Bozhkov, A. I.; Nikitchenko, Y. V.; Lebid, K. M.; Ivanov, E. G.; Kurguzova, N. I. et al. Low molecular weight components from various sources eliminate oxidative stress and restore physiological characteristic of animals at early stages of cu-induced liver fibrosis development. *Transl Biomed* 2017, 8, 2. <http://dx.doi.org/10.2167/2172-0479.1000107>
146. Pechkurenko, A., & Kulikov, I. (1998). Спосіб висушування та вбудовування гістологічного матеріалу в парафін і фарбування зрізів за допомогою ізопропілового спирту. В *Selected Issues Of Forensic Examination* (Pp. 69-70)

147. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344:495–500
148. 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.
149. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo JL, Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. USA: Mc Graw Hill, 2003;2.
150. Botros M, Sikaris KA. The De Ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev* 2013;34:117–30.
151. Karmen, A., Wróblewski, F., & LaDue, J. S. (1955). Transaminase activity in human blood. *The Journal of clinical investigation*, 34(1), 126-133. <https://doi.org/10.1172/jci103055>
152. Young DS. *Effects of disease on Clinical Lab. Tests*, 4th ed AACCC 2001
153. King, E. J., & Delory, G. E. (1938). Ascorbic acid and phosphatase activity. *Biochemical Journal*, 32(7), 1157. <https://doi.org/10.1042/bj0321157>
154. Rosalki, S. B., Rau, D., Lehmann, D., & Prentice, M. (1970). Determination of serum γ -glutamyl transpeptidase activity and its clinical applications. *Annals of Clinical Biochemistry*, 7(6), 143-147. <https://doi.org/10.1177/000456327000700601>
155. Vahl HA, Klooster ATh. Effects of excessive vitamin A levels in broiler rations [Internet]. Vol. 57, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Wiley; 1987. p. 204–18. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0396.1987.tb00031.x>
156. Антоненко, Є. О., Кожешкурт, В. О., Штода, Д. О., & Катрич, В. О. (2020). Амплітудно-фазовий детектор для систем діелектричної спектроскопії. *Радіофізика та електроніка*, 25(3), 68-77.
157. Kozheshkurt, V., Ivanov, I., Antonenko, Y., Katrich, V., Bozhkov, A., & Gromovoy, T. (2021). Devising an express method for estimating the quality of

- colostrum and its components based on electrical conductivity. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1(11), 109.
158. Garrattini, S., Bizzt, A., Donelli, M.G., Guaitani, A., Samanin, R. and Spreadfico, F. (1980) Anorexia and cancer in animals and men. *Cancer Treat. Rev.*, 7, 115-140.
159. Gäbele, E., Froh, M., Arteel, G. E., Uesugi, T., Hellerbrand, C., Schölmerich, J., ... & Rippe, R. A. (2009). TNF α is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(3), 348-353.
160. L. Hebbard, B. Ranscht, Multifaceted roles of adiponectin in cancer, *Best Pract. Res.Clin. Endocrinol. Metab.* 28 (2014) 59–69.
161. S. Obeid, L. Hebbard, Role of adiponectin and its receptors in cancer, *Cancer Biol Med* 9 (2012) 213–220
162. Alzahrani, B., Iseli, T., Ramezani-Moghadam, M., Ho, V., Wankell, M., Sun, E. J., ... & Hebbard, L. W. (2018). The role of AdipoR1 and AdipoR2 in liver fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(3), 700-708.
163. Kadir, F. A., Kassim, N. M., Abdulla, M. A., & Yehye, W. A. (2013). Hepatoprotective Role of Ethanolic Extract of Vitex negundo in Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Male Rats. In *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2013, pp. 1–9). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2013/739850>
164. Yuan, L. P., Chen, F. H., Ling, L., Dou, P. F., Bo, H., Zhong, M. M., & Xia, L. J. (2008). Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L.(TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 539-546.
165. Simon, G., Heckmann, V., Tóth, D., Pauka, D., Petrus, K., & Molnár, T. F. (2020). The effect of hepatic steatosis and fibrosis on liver weight and dimensions.

- In *Legal Medicine* (Vol. 47, p. 101781). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101781>
166. Bolognesi, M., Sacerdoti, D., Mescoli, C., Bombonato, G., Cillo, U., Merenda, R., ... & Gatta, A. (2007). Different hemodynamic patterns of alcoholic and viral endstage cirrhosis: analysis of explanted liver weight, degree of fibrosis and splanchnic Doppler parameters. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 42(2), 256-262.
167. D.K. Molina, V.J. DiMaio, Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 33 (4) (2002) 368–372, <https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e31823d29ad>.
168. G.L. de la Grandmaison, I. Clairand, M. Durigon, Organ weight in 684 adult autopsies: new tables for a Caucasoid population, *Forensic Sci. Int.* 119 (2) (2001) 149–154, [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(00\)00401-1](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(00)00401-1).
169. S. Gholamzadeh, M. Zarenezhad, M. Montazeri, M. Zareikordshooli, G. Sadeghi, A. Malekpour, et al., Statistical Analysis of Organ Morphometric Parameters and Weights in South Iranian Adult Autopsies, *Medicine. (Baltimore)* 96 (21) (2017) e6447, , <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006447>
170. L. Mubbunu, K. Bowa, V. Petrenko, M. Silitongo, Correlation of Internal Organ Weights with Body Weight and Body Height in Normal Adult Zambians: A Case Study of Ndola Teaching Hospital, *Anat. Res. Int.* 18 (2018), <https://doi.org/10.1155/2018/4687538>
171. G. Simon, V.S. Poór, V. Heckmann, Z. Kozma, T.F. Molnár, The effect of steatosis and fibrosis on blunt force vulnerability of the liver, *Int. J. Legal. Med.* 134 (3) (2020) 1067–1072, <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02245-4>
172. Asahina K, Zhou B, Pu WT, Tsukamoto H: Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology* 2011, 53:983e995 9. Winters NI, Thomason

- RT, Bader DM: Identification of a novel developmental mechanism in the generation of mesothelia. *Development* 2012, 139:2926e2934
173. Rinkevich Y, Mori T, Sahoo D, Xu PX, Bermingham JR Jr, Weissman IL: Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nat Cell Biol* 2012, 14:1251e1260
174. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, Ye T, Thannickal VJ, Antony VB: Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J* 2014, 28:1122e1131
175. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G: Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 2012, 180:1340e1355
176. Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, López-Cabrera M: Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18:2004e2013
177. Devuyst O, Margetts PJ, Topley N: The pathophysiology of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21:1077e1085
178. Brodsky WY, Uryvaeva IV. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int Rev Cytol* 1977;50:275–332.
179. Sigal SH, Gupta S, Gebhard DF, et al. Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver. *Differentiation* 1995;59:35–42.
180. Gorla GR, Malhi H, Gupta S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J Cell Sci* 2001;114:2943–51.
181. Schmucker DL. Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. *J Electron Microsc Tech* 1990;14:106–25.

182. Saeter G, Lee CZ, Schwarze PE, et al. Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:1480–5
183. Oriyama T, Yamanaka N, Fujimoto J, et al. Progression of hepatocellular carcinoma as reflected by nuclear DNA ploidy and cellular differentiation. *J Hepatol* 1998;28:142–9.
184. Melchiorri C, Bolondi L, Chieco P, et al. Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound-guided liver biopsies. *Cancer* 1994;74:1713–19.
185. Saeter G, Schwarze E, Seglen O. Shift from polyploidizing to nonpolyploidizing growth in carcinogen-treated rat liver. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:950–8
186. Hosoi M, Nakanuma Y. Cytophotometric DNA analysis of adenomatous hyperplasia in cirrhotic livers. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991;418:401–4.
187. Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, et al. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993;64:387–93
188. Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, et al. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:19095–101
189. Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 1999;276:G1260–72.
190. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 2000;10:161–71.
191. Vetelainen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg*. 2007;245(1):44–50

192. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipopoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res.* 2008;49(1):84–97.
193. Karidis NP, Delladetsima I, Theocharis S. Hepatocyte Turnover in Chronic HCV-Induced Liver Injury and Cirrhosis. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:654105.; 8.Oh IS, Park SH. Immune-mediated Liver Injury in Hepatitis B Virus Infection. *Immune Netw.* 2015;15(4):191–8.
194. Aravinthan A, Gentric G Scarpini C, Tachtatzis P, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Harvey R, et al. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;58(3):549–56.
195. Gentric G, Maillet V, Paradis V, Couton D, L'Hermitte A, Panasyuk G, et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2015;125(3):981–92.
196. Stecco, C., Sfriso, M. M., Porzionato, A., Rambaldo, A., Albertin, G., Macchi, V., & De Caro, R. (2017). Microscopic anatomy of the visceral fasciae. *Journal of anatomy*, 231(1), 121-128
197. Terminology, F. C. O. A. (1998). *Terminologia Anatomica: International Anatomical Terminology*
198. Benias, P. C., Wells, R. G., Sackey-Aboagye, B., Klavan, H., Reidy, J., Buonocore, D., ... & Theise, N. D. (2018). Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.
199. Hayashi, S., Murakami, G., Ohtsuka, A., Itoh, M., Nakano, T., & Fukuzawa, Y. (2008). Connective tissue configuration in the human liver hilar region with special reference to the liver capsule and vascular sheath. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 15, 640-647
200. Wang, J., & Kubes, P. (2016). A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. *Cell*, 165(3), 668-678.

201. Wagner, B. A., Venkataraman, S., & Buettner, G. R. (2011). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 700-712.
202. Acharya, P., Chouhan, K., Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2021). Cellular mechanisms of liver fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 671640. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.671640>
203. Guilliams, M., Bonnardel, J., Haest, B., Vanderborght, B., Wagner, C., Remmerie, A., ... & Scott, C. L. (2022). Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell*, 185(2), 379-396.
204. Li, Y., Wang, J., & Asahina, K. (2013). Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial–mesenchymal transition in liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2324-2329.
205. Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:232–236
206. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013;14:996–1006
207. Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 2012;12:201–213.
208. Robinson MW, Harmon C, O’Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol* 2016;13:267–276
209. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, et al. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 1998;28:84–90.
210. Hata K, Zhang XR, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL. Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;56:401–419.
211. Norris S, Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, et al. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and

- natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogeneous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol* 1999;60:20–31.
212. Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999;163:2314–2321.
213. Ohteki T, Abo T, Seki S, Kobata T, Yagita H, Okumura K, et al. Predominant appearance of gamma/delta T lymphocytes in the liver of mice after birth. *Eur J Immunol* 1991;21:1733–1740.
214. Abo T, Watanabe H, Iiai T, Kimura M, Ohtsuka K, Sato K, et al. Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and other organs. *Int Rev Immunol* 1994;11:61–102
215. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003;38:919–929.
216. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003;83:655–663.
217. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273–278.
218. Jiang JX, Mikami K, Venugopal S, Li Y, Török NJ. Apoptotic body engulfment by hepatic stellate cells promotes their survival by the JAK/STAT and Akt/NF-kappaB-dependent pathways. *J Hepatol* 2009;51:139–148.
219. Muhanna N, Doron S, Wald O, Horani A, Eid A, Pappo O, et al. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: a novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology* 2008;48:963–977.

220. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 2014;147:765–783.e4.
221. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:361–367
222. Li, Y., Kim, B.-G., Qian, S., Letterio, J. J., Fung, J. J., Lu, L., & Lin, F. (2015). Hepatic Stellate Cells Inhibit T Cells through Active TGF- β 1 from a Cell Surface-Bound Latent TGF- β 1/GARP Complex. In *The Journal of Immunology* (Vol. 195, Issue 6, pp. 2648–2656). The American Association of Immunologists. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500139>
223. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125–172.
224. Corbett L, Mann J, Mann DA. Non-canonical Wnt predominates in activated rat hepatic stellate cells, influencing HSC survival and paracrine stimulation of Kupffer cells. *PLoS One* 2015;10:e0142794.
225. Jiang ZJ, Shen QH, Chen HY, Yang Z, Shuai MQ, Zheng S. Galectin-1 restores immune tolerance to liver transplantation through activation of hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;48:863–879.
226. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001;21:417–426.
227. Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology* 2015;61:1066–1079.
228. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* 2017;127:55–64.
229. Sanyal, D., Mukherjee, P., Raychaudhuri, M., Ghosh, S., Mukherjee, S., & Chowdhury, S. (2015). Profile of liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease

- in patients with impaired glucose tolerance and newly detected untreated type 2 diabetes. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 19(5), 597
230. Zeng, X., Xu, C., He, D., Li, M., Zhang, H., Wu, Q., ... & Wang, Y. (2015). Performance of several simple, noninvasive models for assessing significant liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Croatian Medical Journal*, 56(3), 272-279
231. Liu CH, Lin JW, Tsai FC, Yang PM, Lai MY, Chen JH, et al. Noninvasive tests for the prediction of significant hepatic fibrosis in hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferases. *Liver Int*. 2006;26:1087-94. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01355.x
232. Halfon P, Imbert-Bismut F, Messous D, Antoniotti G, Benchetrit D, Cart-Lamy P, et al. A prospective assessment of the inter-laboratory variability of biochemical markers of fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest) in patients with chronic liver disease. *Comp Hepatol*. 2002;1:3. doi:10.1186/1476-5926-1-3
233. Ashraf S, Ahmed SA, Ahmed J, Ali N. FibroScore for the noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2012;22:84-90. Medline:22313643
234. Lee IC, Chan CC, Huang YH, Huo TI, Chu CJ, Lai CR, et al. Comparative analysis of noninvasive models to predict early liver fibrosis in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:278-85. doi:10.1097/MCG.0b013e3181dd5357
235. Giannini E, Ceppa P, Botta F, Fasoli A, Romagnoli P, Cresta E, et al. Steatosis and bile duct damage in chronic hepatitis C: distribution and relationships in a group of Northern Italian patients. *Liver*. 1999;19:432-7. doi:10.1111/j.1478-3231.1999.tb00074.x
236. Terrault NA, Lok AS, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic

- hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 2018;67:1560-1599
237. Sonneveld MJ, Brouwer WP, Chan HY, Piratvisuth T, Jia JD, Zeuzem S, et al. Optimisation of the use of APRI and FIB- 4 to rule out cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: re-sults from the SONIC- B study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4:538- 544
238. Cheong JY, Kim DJ, Hwang SG, Yang JM, Kim YB, Park YN, et al. Serum markers for necroinflammatory activity in patients with chronic viral hepatitis and normal or mildly elevated amino-transferase levels. *Liver Int* 2011;31:1352- 1358
239. European Association for Study of Liver. EASL- ALEH Clinical Practice Guidelines: non- invasive tests for evaluation of liver dis-ease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015;63:237- 264.
240. Huber, Y., Schulz, A., Schmidtman, I., Beutel, M., Pfeiffer, N., Münzel, T., ... & Schattenberg, J. M. (2022). Prevalence and Risk Factors of Advanced Liver Fibrosis in a Population-Based Study in G ermany. *Hepatology communications*, 6(6), 1457-1466.
241. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 263-355
242. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease— meta- analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73- 84
243. Haring R, Wallaschofski H, Nauck M, Dörr M, Baumeister SE, Völzke H. Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma- glutamyl trans-peptidase levels. *Hepatology* 2009;50:1403- 1411. <https://doi.org/10.1002/hep.23135>

244. Eminler, A. T., Irak, K., Ayyildiz, T., Keskin, M., Kiyici, M., Gurel, S., ... & Nak, S. G. (2014). The relation between liver histopathology and GGT levels in viral hepatitis: more important in hepatitis B. *Turk J Gastroenterol*, 25(4), 411-415
245. Vardar R, Vardar E, Demiri S, et al. There any non-invasive marker replace the needle liver biopsy predictive for liver fibrosis, in patients with chronic hepatitis? *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1459-65.
246. Ersöz G, Karasu Z, Akarca US, Yüce G, İlter T, Batur Y. Does blood biochemistry reflect liver histology in chronic viral hepatitis? *Turkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol* 1998;9(2):80-4
247. Abdo AA. Laboratory predictors of advanced fibrosis in Saudi patients with chronic hepatitis B and C. *Saudi J Gastroenterol* 2006; 12: 135-8.
248. Papadia, F.S.; Marinari, G.M.; Camerini, G.; Murelli, F.; Carlini, F.; Stabilini, C.; Scopinaro, N. Liver damage in severely obese patients: A clinical-biochemical-morphologic study on 1000 liver biopsies. *Obes. Surg.* 2004, 14, 952–958
249. Opoku AR, Ndlovu IM, Terblanche SE, Hutchings AH: vivo hepatoprotective effects of *Rhoicissus tridentata* subsp. *cuneifolia*, a traditional Zulu medicinal plant, against CCl₄-induced acute liver injury in rats. *South African J Botany.* 2007, 73: 372-377. 10.1016/j.sajb.2007.02.193
250. Gowri Shankar GNL, Manavalan R, Venkappayya D, Raj CD: Hepatoprotective and antioxidant effects of *Commiphora berryi* (Arn) Engl bark extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008, 46: 3182-3185. 10.1016/j.fct.2008.07.010.
251. Kim MN, Lee JH, Chon YE, Ha Y and Hwang SG: Fibrosis-4, aspartate transaminase-to-platelet ratio index, and gamma-glutamyl transpeptidase-to-platelet ratio for risk assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients: Comparison with liver biopsy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 32: 433-439, 2020.

252. Kuang, W., & Nelson, S. O. (1998). Low-frequency dielectric properties of biological tissues: a review with some new insights. *Transactions of the ASAE*, 41(1), 173-184.
253. Dean, D. A., Ramanathan, T., Machado, D., & Sundararajan, R. (2008). Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues. *Journal of electrostatics*, 66(3-4), 165-177.
254. Kim, J. W., Kim, H. B., Hur, Y. H., Choi, B. K., Katoch, N., Park, J. A., ... & Woo, E. J. (2021). MR-Based Electrical Conductivity Imaging of Liver Fibrosis in an Experimental Rat Model. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 53(2), 554-563
255. Haemmerich, D., Schutt, D. J., Wright, A. S., Webster, J. G., & Mahvi, D. M. (2009). Electrical conductivity measurement of excised human metastatic liver tumours before and after thermal ablation. *Physiological measurement*, 30(5), 459
256. Bozhkov, A. I., Nikitchenko, Y. V., Klimova, E. M., Linkevych, O. S., Lebid, K. M., Al-Bahadli, A. M. M., & Alsardia, M. M. A. (2016). Young and old animals use various strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis. *Advances in Gerontology*, 29(4), 555-566.
257. Chen, Z., Yang, Y., Mi, S., Fan, Q., Sun, X., Deng, B., ... & Ruan, Z. (2019). Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats. *Journal of Functional Foods*, 62, 103540.
258. Ali, F. T., Hassan, N. S., & Abdrabou, R. R. (2016). Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(4), 1147-1153.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації.

Наукові праці в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus

1. Bozhkov, A. I., Novikova, A. V., Klimova, E. M., Ionov, I. A., Akzhyhitov, R. A., Kurhuzova, N. I., Bilovetska, S. G., Moskalov, V. B., & Haiovyi, S. S. (2023). Vitamin A Reduces the Mortality of Animals with Induced Liver Fibrosis by Providing a Multi-level Body Defense System. In Journal of Clinical and Experimental Hepatology (Vol. 13, Issue 1, pp. 48–63). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.09.006> (Scopus, Q3). *(Особистий внесок здобувача: участь у розробці та обґрунтуванні моделі експерименту, участь в експериментальній роботі з лабораторними тваринами, проведення гістологічних досліджень тканини печінки, участь у обговоренні отриманих результатів)*

Наукові праці в наукових фахових виданнях України

2. Bozhkov, A., & Bilovetska, S. (2023). Vitamin A accelerates the process of liver regeneration in the initial stages of Cu - induced fibrosis. In ScienceRise: Biological Science (Issue 3(36), pp. 34–39). Private Company Technology Center. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2023.288227>. *(Особистий внесок здобувача: літературний огляд, участь у розробці та обґрунтуванні моделі експерименту, виконання експериментальної роботи з лабораторними тваринами, проведення гістологічних досліджень тканини печінки, участь у обговоренні отриманих результатів)*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації

3. Bilovetska, S., & Kozheshkurt, V. (2023). Electrical conductivity of liver tissue as an indicator of structural and functional organization of liver tissue. In Grail of Science (Issue 31, pp. 151–156). European Scientific Platform (Publications). <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.15.09.2023.25> . I Correspondence International Scientific and Practical Conference Open Science Nowadays: Main Mission, Trends And Instruments, Path And Its Development Held On September 15th, 2023 By NGO European Scientific Platform (Vinnytsia, Ukraine) LLC International Centre Corporative Management (Vienna, Austria). *(Особистий внесок здобувача: розробка моделі експерименту, проведення гістологічних досліджень тканини печінки, математична обробка результатів вимірювання електропровідності, статистична обробка результатів, участь у обговоренні результатів, оформлення тексту тез, доповідь на конференції)*
4. Bilovetska S., Kozheshkurt V. (2023). Influence of structural organization of liver tissue on electrical conductivity as a possible indicator of its characteristics (pp.78-81) <https://doi.org/10.36074/scientia-08.09.2023>. Sectoral research XXI: characteristics and features: collection of scientific papers «SCIENTIA» with Proceedings of the VI International Scientific and Theoretical Conference, September 8, 2023. Chicago, USA: European Scientific Platform. *(Особистий внесок здобувача: розробка моделі експерименту, виконання експериментальної роботи з підготовки досліджуваних зразків, проведення первинних вимірювань для визначення електропровідності, участь у обговоренні результатів, оформлення тексту тез, доповідь на конференції)*
Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 13:27:08 16.11.2023

Назва файлу з підписом: Дисертація_Біловецька_С_Г_14.11.2023.pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 2.8 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Дисертація_Біловецька_С_Г_14.11.2023.pdf

Розмір файлу без підпису: 2.8 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Біловецька Світлана Геннадіївна

П.І.Б.: Біловецька Світлана Геннадіївна

Країна: Україна

РНОКПП: 3508207147

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 13:27:05 16.11.2023

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF97040000000FA90A0013AB5401

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAAdES)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований