АНОТАЦІЯ

Біловецька С.Г. Дослідження ролі вітаміну А на структурно-функціональну організацію печінки при інтоксикації організму сірчанокислою 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 Cu-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 необоротнім 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 печінці 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 формуваннях Cu-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 Cu-індукованим фіброзом печінки.

2. Дослідити вплив вітаміну А на деякі біохімічні показники у тварин із Cu-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 Cu-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 організацію 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 сірчанокислої 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 сірчанокислою 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 структури.

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 змінень 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 Cu-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 Cu-індукованого фіброзу достовірно знижувалася, а після введення ретинолу активність ЛФ відновлювалася до контрольного рівня.

Було показано, що за Cu-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 Cu-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.