иммунопатологическая реакция, которая реализуется не только в повреждении клеток-мишеней, но и собственных тканей пародонта, в обязательном порядке нуждающаяся в иммунокоррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алмазов В. А., Шляхто Е. В., Красильникова Е. И. и др.* Нарушения иммунологических показателей у больных с синдромом инсулинорезистентности // Кардиология. — 2001. — № 8. — С. 59—64.
2. *Гросси Сара Г.* Воспалительные процессы в полости рта и сердечно-сосудистые заболевания // Клиническая стоматология. — 2006. — № 1. — С. 40—44.
3. *Земская Е. А.* Клинико-иммунологические показатели у больных после комплексного лечения пародонтита / Е. А. Земская, В. В. Хазанова, Т. В. Никитина // Стоматология. — 1980. — № 3. — С. 20—21.
4. *Старикова И. В.* Биохимические и иммунологические показатели крови у больных хроническим генерализованным пародонтитом на фоне метаболического синдрома / И. В. Старикова, А. Н. Попова, С. В. Крайнов, Е. М. Чаплиева // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 10. — С. 973—977.
5. *Старикова И. В.* Показатели местного иммунитета у больных хроническим пародонтитом на фоне метаболического синдрома [Электронное издание] / И. В. Старикова, Н. Н. Триголос, Н. Ф. Алешина, М. С. Патрушева, Н. В. Питерская // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 6. URL: http://www.science-educftion.ru/120-15554.
6. *Триголос Н. Н.* Эффективность медикаментозного комплекса Асепта у больных пародонтитом на фоне сахарного диабета типа 2 / Н. Н. Триголос, Л. И. Инина, Ю. В. Чалая, М. Г. Абрамова // Инновационные технологии в стоматологии: Всеросс. науч.-практ. конф. — Казань, 2014. — С. 264—269.
7. *Фирсова И. В.* Витамин Д и его роль в развитии стоматологических заболеваний (обзорная статья) / И. В. Фирсова, Е. А. Мокрова, Б. В. Заводовский, Ю. А. Македонова // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 6. URL: http://www.science-education.ru/120-15773.

Контактная информация

Питерская Наталия Валерьевна — к. м. н., ассистент кафедры терапевтической стоматологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: Piterskij.k@yandex.ru

УДК 611.36+616-002.17-092.4

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОМ ФИБРОЗЕ

И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, А. Я. Почепцов, В. Л. Загребин

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии,
Научно-исследовательский институт гигиены,
токсикологии и профпатологии ФМБА России, Волгоград

Фиброз печени индуцировали четыреххлористым углеродом и этанолом. Продемонстрированные изменения в иммуногистохимическом профиле печеночной ткани говорят о снижении активности матричных металлопротеиназ и увеличении числа активированных звездчатых клеток печени.

Ключевые слова: фиброз, печень, металлопротеиназы, звездчатые клетки.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF LIVER TISSUE IN EXPERIMENTAL CHEMICALLY-INDUCED FIBROSIS

I. A. Dvoryashina, Yu. I. Velikorodnaya, A. Ya. Pocheptsov, V. L. Zagrebin

We used alcohol and carbon tetrachloride to induce liver fibrosis. The changes observed in immunohistochemical profile of the liver tissue demonstrated a reduction in matrix metalloproteinase activity and an increase in the amount of activated hepatic stellate cells.

Key words: fibrosis, liver, metalloproteinase, hepatic stellate cells.

Фиброз печения является широко распространенным заболеванием. Среди основных причин фиброза печени выделяют хроническую интоксикацию, вирусные гепатиты и неалкогольный стеатогепатит [4].

Перечень химических веществ, вызывающих фиброз печени, достаточно велик и включает в себя как органические, так и неорганические соединения. Среди токсикантов, обладающих гепатотоксическим и фибротическим действием, находятся хлорированные углеводороды, спирты, альдегиды, гидразины, фураны, соли металлов. Данное заболевание сопровождается снижением всех основных функций органа, а при прогрессировании трансформируется в цирроз с дальнейшей малигнизацией.

В диагностике и оценке эффективности терапии при фиброзе печени используются методы исследования молекулярных механизмов образования внеклеточного матрикса, процессов его синтеза и деградации. Кроме того, все более пристальное внимание уделяется вопросу регенерации печеночной ткани после повреждения и путем стимуляции этого процесса [1].

В норме внеклеточный матрикс (ВКМ) в очень небольших количествах присутствует во внеклеточной среде печеночной ткани. Количество матрикса регулируется металлопротеиназами (ММР) большой группой ферментов цинк-зависимых эндопептидаз, способных расщеплять избыточный матрикс [2]. Основная биологическая функция ММР заключается в удалении компонентов внеклеточного матрикса.

В неизмененной ткани печени, в свою очередь, активность металлопротеиназ регулируется ингибиторами группы TIMPs (tissueinhibitorsofmatrixmetalloproteinases), среди которых наиболее активен TIMP-1, и в меньшей степени TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4. Нарушение равновесия в системе ММР—TIMPs в сторону снижения активности ММР и повышения активности TIMPs приводит к неконтролируемому отложению внеклеточного матрикса в ткани печени [3].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить изменение металлопротеиназной активности и число активированных звездчатых клеток печени.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Моделирование фиброза печени

Эксперимент проводили на беспородных белых крысах-самцах весом 220—270 г. Крыс содержали в клетках по 8 особей в каждой в помещениях с искусственным освещением (8.00—20.00 — свет, 20.00—8.00 — темнота) при 20—22 °С в условиях свободного доступа к воде и пище.

Животные были поделены на две группы: контроль и опыт.

При моделировании фиброза печени на белых крысах принималось во внимание наличие у них мощной репаративной системы, поэтому первостепенное значение придавалось стойкости фибротических изменений [4, 5]. В связи с этим нами была выбрана модель фиброза с хроническим введением четыреххлористого углерода (ЧХУ) на фоне постоянной алкоголизации. Эксперимент проводили по следующей схеме. За 7 дней до начала введения ЧХУ животным в качестве питья начинали давать 5%-й водный раствор этанола *adlibitum.* Раствор ЧХУ в растительном масле в соотношении 1 : 3 вводили внутрижелудочно через зонд дважды в неделю в дозе 0,1 мл/100 г массы тела в течение 8 недель. В течение всего периода индуцирования фиброза печени крысам в качестве питья давали 5%-й раствор этанола. По данным патогистологического исследования, у подопытных животных развивался выраженный фиброз печени с наличием порто-портальных и порто-центральных септ и образованием ложных долек (рис. 1). Степень фиброза печени по шкале METAVIR составляла 3 балла.

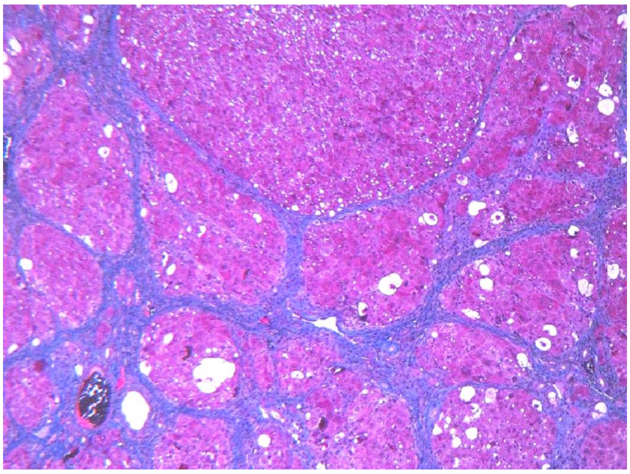

Рис. 1. Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Фиброзные порто-портальные и порто-центральные септы. Образование ложных долек. Баллонная дистрофия гепатоцитов. Окраска по Masson. Ув. × 60

2. Гистохимическое исследование

Материалом для гистохимического исследования служила ткань печени интактных и подопытных животных. Определение активности и локализацию белков из группы металлопротеиназ и их ингибиторов проводили на парафиновых срезах с использованием иммуногистохимических методов. В их основе лежит высокоспецифичная реакция антиген (исследуемые белки) — антитело (полученные в лабораторных условиях высокоочищенные препараты).

Реакция визуализируется с помощью включения в комплекс антиген-антитело третьего агента, несущего цветную метку. Эту метку наблюдают под световым микроскопом.

Было изучено содержание в ткани печени следующих веществ:

– металлопротеиназы (ММР) ММР-1, ММР-3, ММР-9;

– тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP) TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3;

– парафиновые срезы образцов тканей, подлежащих иммуногистохимическому исследованию толщиной 5—7 мкм, их монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизином («Menzel»);

– актин цитоплазмы гладкомышечных клеток (α-SMA) в качестве маркера актина ЗК.

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3%-й перекиси водорода. Постановку иммуногистохимической реакции проводили с помощью пероксидаз-полимерной системы визуализации по стандартному протоколу (RE7150-К «Novocastra»). Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100 °С в цитратном буфере с рН = 6,0 в течение 10 минут. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. В качестве негативного контроля служили препараты без инкубации в первичных антителах при полном соблюдении остальных этапов протокола. О специфическом связывании антител с исследуемыми антигенами ММР-1 и ММР-9 свидетельствовало мелкогранулярное дисперсное окрашивание цитоплазмы клеток (темно-коричневого цвета). Крупнозернистый продукт реакции был характерен для ММР-3, TIMP-1 и TIMP-3.

Все полученные препараты изучали на микроскопе Axiostarplus (CarlZeiss) и фотографировали цифровой камерой Canon 10X.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ было выявлено следующее:

– уровни экспрессии ММР-1 и ММР-3 соответствовали контрольным значениям. Гепатоциты с продуктом реакции ММР-3 в виде крупных гранул располагались преимущественно вдоль фиброзных септ (рис. 2);

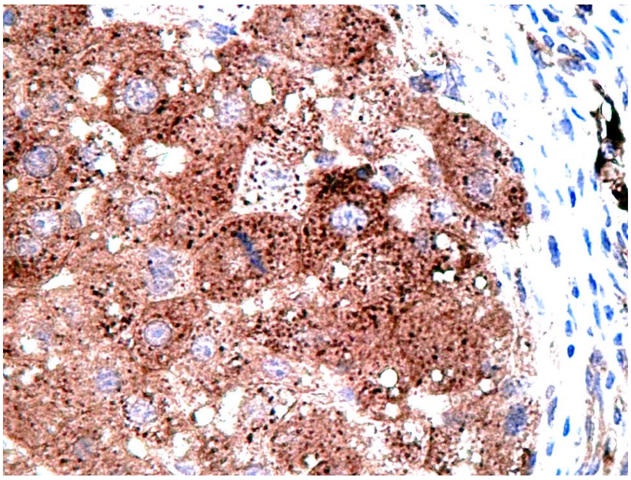

Рис. 2. Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Продукт иммуногистохимической реакции в виде крупных ранул в цитоплазме гепатоцитов, расположенных вдоль фиброзных тяжей. ПАП-метод, антитела к ММР-3. Докраска гематоксилином. Ув. × 340

– уровень активности ММР-9 превышал контрольные значение в среднем в 1,5—2,0 раза. Многочисленные иммунопозитивные клетки (некоторые из них, предположительно, тучные клетки) располагались вдоль фиброзных тяжей, а также были рассеяны по паренхиме органа (рис. 3).

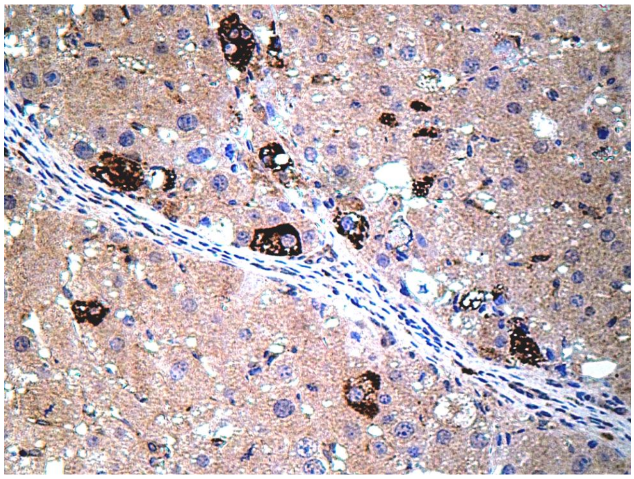

Рис. 3. Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Иммунопозитивные клетки с высокой экспрессией, расположенные вдоль фиброзных тяжей. ПАП-метод, антитела к ММР-9. Докраска гематоксилином. Ув. × 340

При иммуногистохимическом исследовании TIMP-1 и TIMP-3 было обнаружено следующее:

– фоновый уровень экспрессии как TIMP-1, так и TIMP-3 не изменялся в 60 % случаев, в 40 % случаев активность фермента возрастала в 1,5—2,0 раза. Выявлялись гепатоциты с сильно положительной реакцией преимущественно вдоль фиброзных септ (рис. 4 и 5), субкапсулярно (рис. 6), а также в местах образования ложных долек. Единичные клетки по морфологическим признакам определялись как тучные.

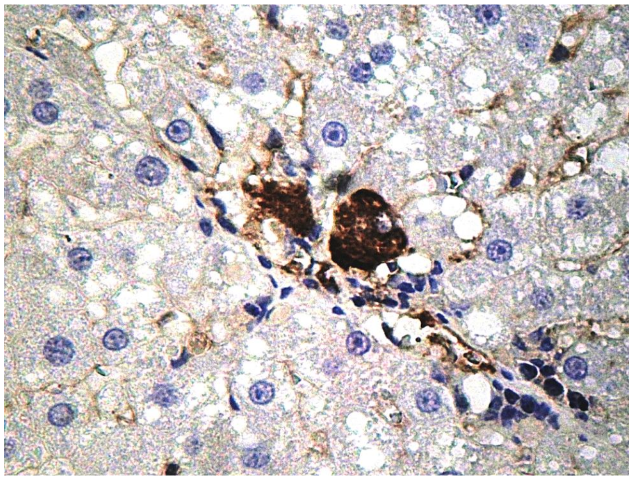

Рис. 4. Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Иммунопозитивная клетка, расположенная в месте образования фиброзного тяжа. ПАП-метод, антитела к TIMP-1. Докраска гематоксилином. Ув. × 340

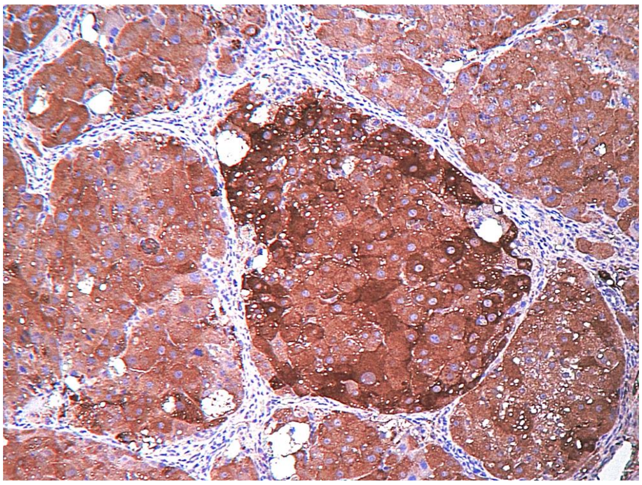

Рис. 5. Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Ложная печеночная долька с высоким уровнем экспрессии. ПАП-метод, антитела к TIMP-1. Докраска гематоксилином. Ув. × 8

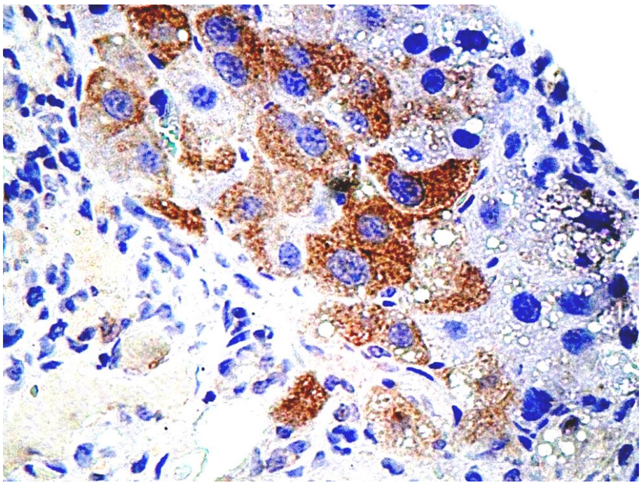

Рис. 6. Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. TIMP-3иммунопозитивныеклетки, расположенные под капсулой печени. ПАП-метод, антитела к TIMP-3. Докраска гематоксилином. Ув. × 340

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные иммуногистохимического исследования объясняют интенсивное отложение внеклеточного матрикса резким (в два раза) подъемом активности одной из металлопротеиназ — ММР-9, при слабой индукции — TIMP-1 и TIMP-3. Таким образом, в данном эксперименте процессы синтеза внеклеточного матрикса преобладали над процессами его деградации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вельков В. В.* Сывороточные биомаркеры фиброза печени: до свидания, биопсия. — М.: LomonosoffPrint, 2009. — 40 с.
2. *Friedman S. L.* Liverfibrosis — frombenchtobedside // J. Hepatol. — 2003. — Vol. 38, № 1. — P. 38—53.
3. *Issa R.* Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking / R. Issa, X. Zhou, C. M. Constandinou, et al. // Gastroenterology. — 2004. — Vol. 126. — P. 1795—1808.
4. *Neil C.* Henderson and John P. Iredale // Clinical Science. — 2007. — Vol. 112. — P. 265—280.

Контактная информация

Дворяшина Ирина Александровна — ассистент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: germionna@yandex.ru