

© Коллектив авторов, 2015  
УДК 57.089.615.616-092.9

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ СПОНТАННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФИБРОЗА

*И.А. Дворяшина<sup>2</sup>, Ю.И. Великородная<sup>1</sup>, А.Я. Почетцов<sup>1</sup>, В.Л. Загребин<sup>2</sup>*

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии»  
ФМБА России, г. Волгоград (1)  
Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград (2)

**Исследован процесс спонтанной регенерации печени после химически индуцированного экспериментального фиброза. Полученные данные об изменении активности различных металлопротеиназ печени, говорят о важной роли каждой из изученных металлопротеиназ на определенных этапах восстановления органа.**

**Ключевые слова:** регенерация, фиброз, печень, металлопротеиназы.

Одним из уникальных свойств печени является ее способность регулировать свой собственный размер и рост. Это свойство определяется основной ролью печени в метаболической регуляции и ее значением в жизни. Для реализации этих функций ткань печени отвечает на воздействие извне организма и на сигналы и метаболические команды, переданные посредством гормонов, цитокинов, факторов роста и нервной регуляции [3].

Общепризнанно, что первое научное описание процесса регенерации печени дали в 1931 г. G.M. Higgins и R.M. Anderson. С этого времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих о сложном механизме этого уникального феномена [1, 4].

В зрелой печени человека и других млекопитающих обнаружены четыре разновидности стволовых клеток печени – овальные клетки, малые гепатоциты, эпителиальные клетки печени и мезенхимоподобные клетки. Мезенхимоподобные клетки также были получены из зрелой печени человека. Подобно мезенхимальным стволовым клеткам (МСК), данные клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом. Наряду с мезенхимальными маркерами (виментин, альфа-актин гладкой

мышцы) и маркерами стволовых клеток (Thy-1, CD34), эти клетки экспрессируют гепатоцитарные маркеры (альбумин, СУР3А4, глутатионтрансферазу, СК18) и маркеры дуктальных клеток (СК19). Будучи пересажены в печень иммунодефицитных мышей, они образуют мезенхимоподобные функциональные островки человеческой печеночной ткани, вырабатывающие человеческий альбумин, преальбумин и альфа-фетопротеин.

Фиброз печени (ФП) является широко распространённым заболеванием. Среди основных причин фиброза печени выделяют хроническую интоксикацию, вирусные гепатиты и неалкогольный стеатогепатит. Многие годы фиброз печени рассматривался как пассивный и необратимый процесс, приводящий к деструкции печеночной паренхимы и замещению ее богатой коллагеном тканью. В 1970-е гг. впервые стали высказывать предположения, будто выраженный фиброз печени потенциально обратим. Открытие обратимости фиброза печени стало поворотным моментом в области изучения этого процесса и в настоящее время позволяет направить научные исследования на поиски адекватной антифибротической терапии, способной изменить прогноз хро-

нических заболеваний печени. Ключевое значение в изучении ФП приобрело открытие клеток Ито, или печеночных звездчатых клеток, также известных как пресинусоидальные и синтезирующие коллаген. В дальнейшем было установлено, что эти клетки могут активизироваться, приобретая способность к фиброгенезу при хронических заболеваниях печени. Существует два основных компонента, которые ответственны либо за процесс прогрессирования, либо за процесс фибринолиза в тканях печени. Это матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы. На сегодняшний день известно 28 типов металлопротеиназ – протеаз, которые ответственны за расщепление экстрацеллюлярного матрикса [2].

#### Материалы и методы

##### 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 (8.00-20.00ч. – свет, 20.00-8.00 ч. – темнота) при 20-22°C в условиях свободного доступа к воде и пище.

Животные были разделены 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% вод-

ный раствор этанола *ad libitum*. Раствор ЧХУ в растительном масле в соотношении 1:3 вводили внутривентрикулярно 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% раствор этанола. По данным патогистологического исследования у подопытных животных за 8 недель развивался выраженный фиброз печени с наличием портальных и портально-центральных септ и образованием ложных долек (рис. 1А). Степень фиброза печени по шкале METAVIR составляла 3 балла.

##### 2. Иммуногистохимический анализ ткани печени

В основе определения активности и локализации исследуемых белков 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.

При выполнении данного исследования было изучено содержание в ткани печени матриксных металлопротеиназ (ММП) ММП-1, ММП-3, ММП-9 в качестве маркеров активации процесса деградации внеклеточного матрикса (ВКМ).

Парафиновые срезы образцов тканей, подлежащих иммуногистохимическому исследованию толщиной 5 мкм монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизином (“Menzel”). Для определения экспрессии белков применяли следующие антитела (табл. 1).

Таблица 1

#### Основные характеристики антител, применявшихся в экспериментах

№ п/п	Наименование антител	Разведение	Время экспозиции	Фирма-производитель
1	ММП-1 кроличьи поликлональные	1:200	10 минут	Spring Bioscience
2	ММП-3 кроличьи поликлональные	1:50	20 минут	Spring Bioscience
3	ММП-9 кроличьи поликлональные	1:100	20 минут	Spring Bioscience

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3% перекиси водорода. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью пероксидазополимерной системы визуализации по стандартному протоколу RE 7150-K "Novocastra" – модифицированный peroxidase-antiperoxidase (PAP) – метод. Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100°C в миниавтоклаве Pascal в цитратном буфере с pH = 6,0 в течение 10 минут. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили препараты без инкубации в первичных антителах при полном соблюдении остальных этапов протокола. О специфическом связывании антител с исследуемыми антигенами ММР-1, ММР-9 и ММР-13 свидетельствовало мелкогранулярное дисперсное окрашивание цитоплазмы клеток (темно-коричневого цвета). Крупнозернистый продукт реакции был характерен для ММР-3, ТИМР-1 и ТИМР-3.

#### Результаты и их обсуждение

При изучении внеклеточного матрикса и компонентов соединительной ткани в паренхиме печени интактных животных было отмечено следующее. В очень небольших количествах элементы соединительной ткани обнаруживались только в области портальных трактов. Они были представлены отдельными тонкими короткими волокнами и фибробластами, не распространяющимися за пределы триад (рис. 1А). При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ у интактных животных были выявлены следующие характерные черты:

- высокий уровень активности ММР-1 (рис. 1Б) у большинства исследуемых животных контрольной группы. Продукт реакции распределялся гетерогенно по печеночным клеткам в виде

мелкодисперсного осадка;

- фоновая активность ММР-3, определяемая в клетках печени, была высокой. Продукт иммуногистохимической реакции локализовался диффузно в цитоплазме или по периферии гепатоцитов в виде крупных плотно упакованных гранул (рис. 1В);

- слабая фоновая активность в гепатоцитах ММР-9. Отмечались немногочисленные иммунопозитивные клетки печени, сконцентрированные в центральной части органа по ходу крупных сосудов. Также выявлялась положительная реакция в купферовских и звездчатых клетках (рис. 1Г).

Через 8 недель после начала эксперимента при микроскопическом исследовании в ткани печени подопытных животных наблюдали признаки фиброза печени. Имело место формирование порто-портальных и порто-центральных септ и начальные проявления формирования ложных долек. Печеночные клетки, особенно примыкающие к септам, имели признаки стеатоза и баллонной дистрофии. В половине случаев (у 4 из 8 крыс) процесс носил более выраженный характер. Дольковое строение ткани печени было полностью нарушено. Массивные порто-портальные и порто-центральные септы формировали ложные печеночные дольки. В септах наблюдали явления васкуляризации – образование новых сосудов, шунтирующих кровообращение в дольке. Среди гепатоцитов, находящихся в ложных дольках, отмечали баллонную дистрофию, стеатоз, некротические изменения, а также отдельные митозы. Обращала на себя внимание выраженная дисплазия гепатоцитов – полиморфизм клеток. Подобные изменения свидетельствовали о том, что в данном эксперименте имеет место дальнейшее прогрессирование фиброзного перерождения печени и начало формирования цирроза. По классификации METAVIR – III-IV стадии фиброза (рис. 2А).

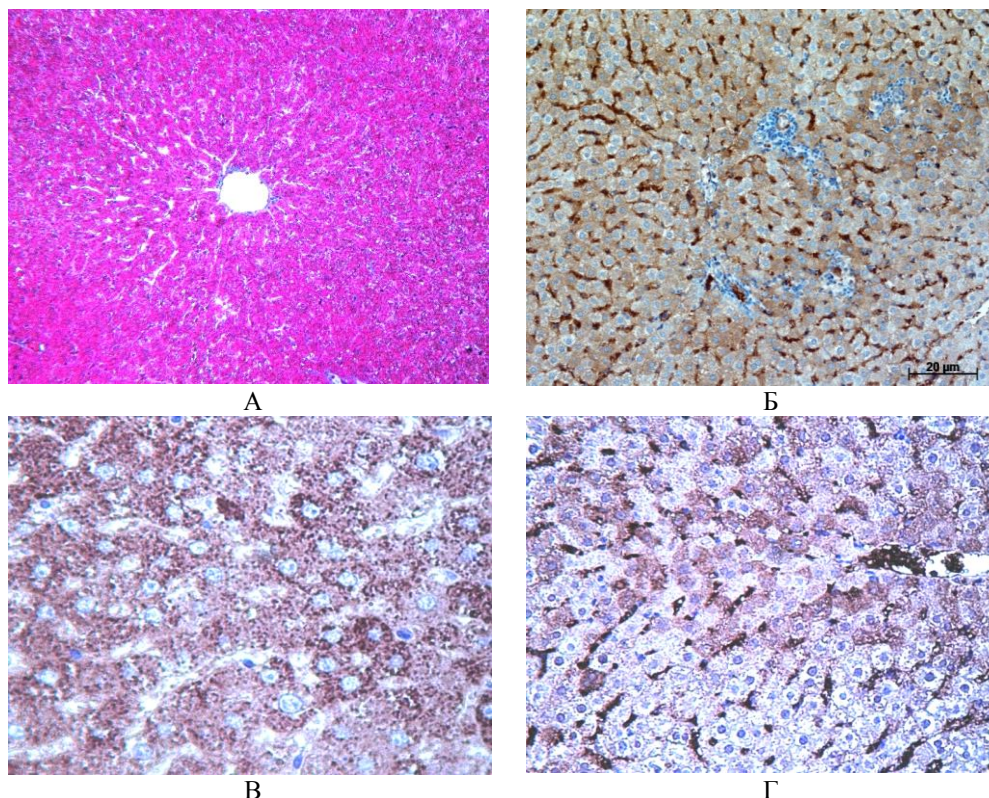


Рис. 1. Исследование ткани печени интактных животных.

А – Центральная вена печеночной дольки с вдающимися в нее синусоидами.

Окраска по Masson. Начальное увеличение  $\times 85$

Б – высокий уровень экспрессии ММР-1 в гепатоцитах интактных животных.

Выраженное гетерогенное распределение фермента по печеночным клеткам.

ПАП-метод, антитела к ММР-1. Докраска гематоксилином. Исходное увеличение  $\times 85$

В – Крупногранулярный продукт реакции в цитоплазме гепатоцитов распределен диффузно. В некоторых клетках – по периферии цитоплазмы (показано стрелкой). ПАП-метод, антитела к ММР-3.

Докраска гематоксилином. Исходное увеличение  $\times 340$

Г – Немногочисленные иммунопозитивные гепатоциты и положительная реакция в купферовских и звездчатых клетках. ПАП-метод, антитела к ММР-9.

Докраска гематоксилином. Исходное увеличение  $\times 85$

Через 4 недели после прекращения введения ЧХУ и этанола в течение 8 недель при макроскопическом исследовании отмечали глинистый цвет и неравномерное кровенаполнение органа. При изучении микропрепаратов в ткани печени подопытных животных сохранялись признаки фиброза. Наблюдали порто-портальные и порто-центральные септы, васкуляризацию септ, наличие ложных долек (рис. 2Б). Однако следует отметить, что попе-

речные размеры септ были, как правило, невелики, массивные септы наблюдали редко, признаки стеатоза гепатоцитов были минимальны. Часть септ вместо грубоволокнистой хорошо оформленной структуры имела неясные, как бы размытые контуры, что, по-видимому, свидетельствовало о начале процесса деградации ВМК в ткани печени. По классификации METAVIR изменения в ткани печени расценены как II-III стадии фиброза.



Через 8 недель после начала восстановительного периода при макроскопическом исследовании отмечали измененную окраску органа (глинистого цвета) и неравномерность кровенаполнения по типу «мускатной» печени. При микроскопическом исследовании в ткани печени экспериментальных животных наблюдали порто-портальные и порто-центральные фиброзные септы, васкуляризацию септ, наличие ложных долек, стеатоз гепатоцитов (рис. 2В). Таким образом, через 8 недель восстановительного периода в ткани печени экспериментальных животных по-прежнему наблюдали признаки фиброза печени, отнесенного по классификации METAVIR как II-III стадии.

Через 12 недель после начала восстановительного периода в ткани печени подопытных крыс макроскопическая картина печени отличий от контроля не имела. При изучении микропрепаратов наблюдали тонкие фиброзные порто-портальные септы (рис. 2Г). Хорошо просматривалась балочная структура печеночных долек. Порто-центральные септы и ложные дольки не наблюдались. По классификации METAVIR степень фиброза идентифицирована как I. Таким образом, по истечении 12 недель восстановительного периода не происходило полного восстановления в структуре ткани печени и слабо выраженные признаки фиброза сохранялись.

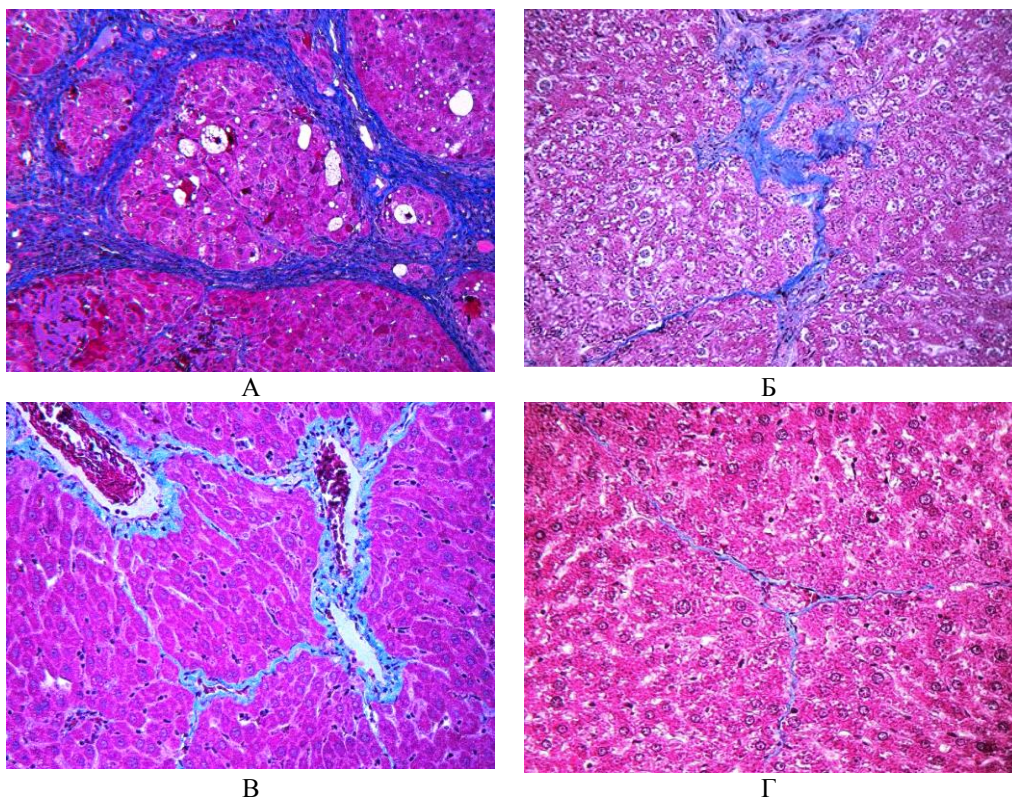


Рис. 2. Ткань печени крысы, окраска по Masson  
А – ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Исходное увеличение x120  
Б – Восстановительный период 4 недели после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение x120  
В – Восстановительный период 8 недель после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение x170  
Г – Восстановительный период 12 недель после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение x170

Через 8 недель после начала введения ЧХУ и 5% этанола по данным гистохимического исследования в ткани печени уровень экспрессии ММР-1 соответствовал контрольным значениям (рис. 3А). При исследовании металлопротеиназ через 4 недели после начала периода восстановления после 8 недель введения ЧХУ и 5% этанола было выявлено отсутствие изменения экспрессии ММР-1 по сравнению с контролем (рис. 3Б). Сохранялось гетерогенное распределения фермента по парен-

химе печени. По данным иммуногистохимического исследования в ткани печени через 8 недель после начала восстановительного периода фоновое повышение уровня экспрессии ММР-1 преимущественно в центральной части фиброзных септ в 50% исследуемых случаев (рис. 3В). При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ через 12 недель восстановительного периода изменений активности ММР-1 по сравнению с контрольными значениями обнаружено не было (рис. 3Г).

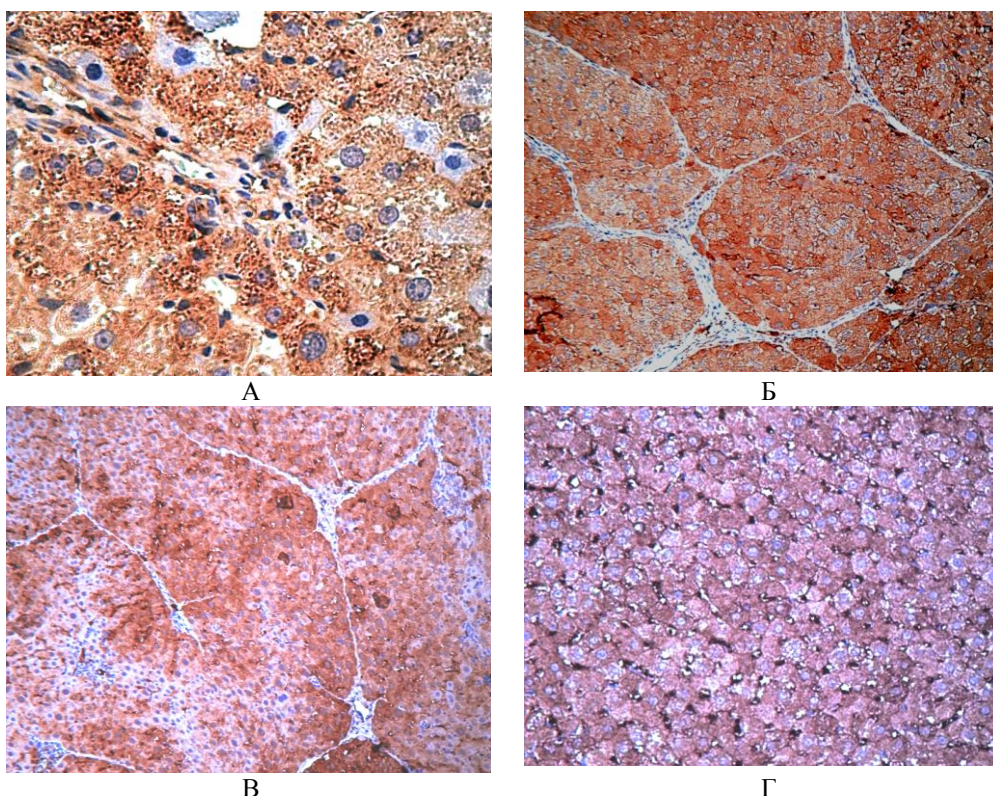


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование ткани печени ПАП-метод, антитела к ММР-1. Докраска гематоксилином

А – Ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента.

Исходное увеличение  $\times 340$

Б – Восстановительный период 4 недели после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 85$

В – Восстановительный период 8 недель после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Иммунопозитивные гепатоциты, расположенные центролобулярно.

Исходное увеличение  $\times 85$

Г – Восстановительный период 12 недель после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 85$



Через 8 недель после начала введения ЧХУ и 5% этанола по данным иммуногистохимического исследования уровень экспрессии ММР-3 соответствовал контрольным значениям. Гепатоциты с продуктом реакции ММР-3 в виде крупных гранул располагались преимущественно вдоль фиброзных септ (рис. 4А). При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ через 4 недели после начала периода восстановления уровень экспрессии ММР-3 проявлял тенденцию к снижению по сравнению с контрольными значениями (рис. 4Б). Через 8 недель после начала восстановительного периода при иммуногистохимическом ис-

следовании был выявлен продукт реакции антиген-антитело к ММР-3 в виде крупных гранул, он концентрировался в перисинусоидальных пространствах в отростках звездчатых клеток, расположенных вдоль печеночных балок. Отмечалось наличие положительной реакции в ядрах гепатоцитов (рис. 4В). При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ через 12 недель восстановительного периода уровень экспрессии ММР-3 незначительно превышал контрольные значения. Гепатоциты с многочисленными крупными гранулами коричневого цвета располагались преимущественно периваскулярно и вдоль фиброзных тяжей (рис. 4Г).

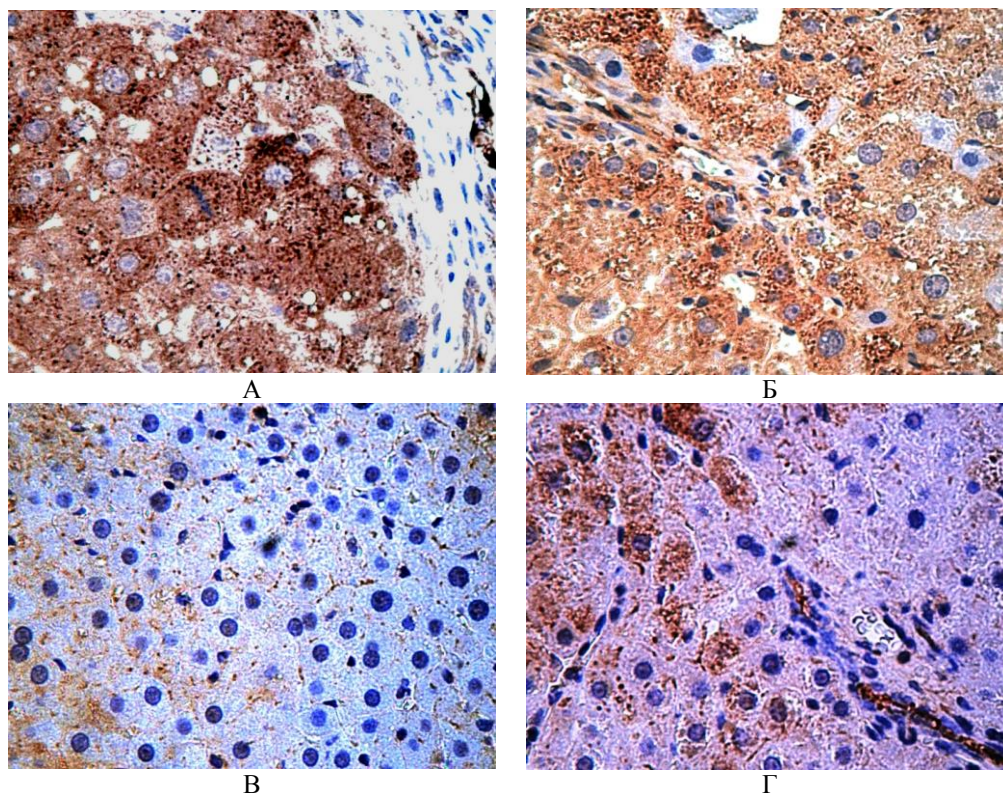


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование ткани печени ПАП-метод, антитела к ММР-3. Докраска гематоксилином

- А – ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутривенное введение ЧХУ и этанола. Продукт иммуногистохимической реакции в виде крупных гранул в цитоплазме гепатоцитов, расположенных вдоль фиброзных тяжей. Исходное увеличение  $\times 340$
- Б – Восстановительный период 4 недели после 8 недель внутривенного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 340$
- В – Восстановительный период 8 недель после 8 недель внутривенного введения ЧХУ и этанола. Перисинусоидальное расположение гранул ММР-3 и положительная реакция в ядрах гепатоцитов. Исходное увеличение  $\times 340$
- Г – Восстановительный период 12 недель после 8 недель внутривенного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 340$

Через 8 недель после начала введения ЧХУ и 5% этанола при иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназы 9 был выявлен уровень активности ММР-9, превышающий контрольные значения в среднем в 1,5-2 раза. Многочисленные иммунопозитивные клетки (некоторые из них, предположительно, тучные клетки) располагались вдоль фиброзных тяжей, а также были рассеяны по паренхиме органа (рис. 5А).

При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ через 4 недели после начала периода восстановления после 8 недель введения ЧХУ и 5% этанола был выявлен сниженный уровень экспрессии ММР-9 по сравнению с контрольными значениями. Продукт положительной иммуногистохимической реакции на ММР-9 определялся в немногочисленных гепатоцитах, расположенных периваскулярно (рис. 5Б).

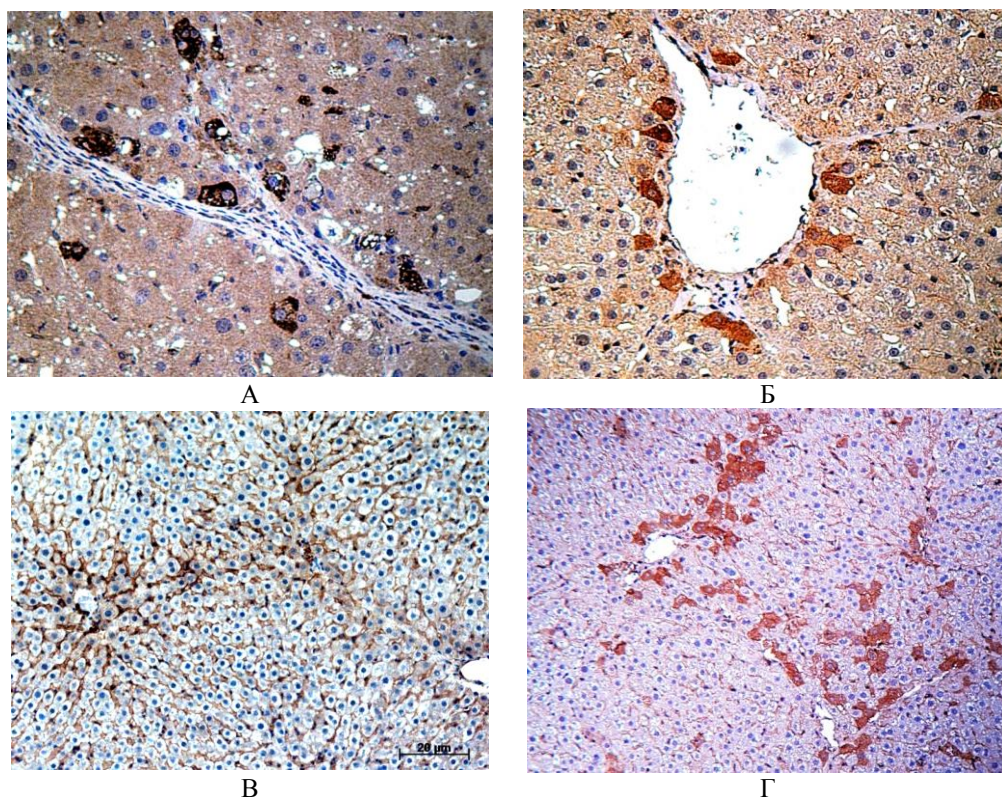


Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование ткани печени ПАП-метод, антитела к ММР-9. Докраска гематоксилином

- А – ткань печени крысы через 8 недель после начала эксперимента. Внутрижелудочное введение ЧХУ и этанола. Иммунопозитивные клетки с высокой экспрессией, расположенные вдоль фиброзных тяжей. Исходное увеличение  $\times 340$
- Б – Восстановительный период 4 недели после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 340$
- В – Восстановительный период 8 недель после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 85$
- Г – Восстановительный период 12 недель после 8 недель внутрижелудочного введения ЧХУ и этанола. Исходное увеличение  $\times 85$



По данным иммуногистохимического исследования содержания нейтральных липидов в ткани печени через 8 недель после начала восстановительного периода было обнаружено снижение активности ММР-9. Положительная реакция регистрировалась в виде мелкодисперсного осадка, рассеянного по цитоплазме печеночных клеток. Также отмечалось появление гепатоцитов с иммунопозитивными ядрами. (рис. 5В). При иммуногистохимическом исследовании металлопротеиназ через 12 недель восстановительного периода изменений активности ММР-9 по сравнению с контрольными значениями обнаружено не было (рис. 5Г).

#### Выводы

Данные иммуногистохимического исследования показали, что в первую фазу восстановления структуры печени решающую роль имеет активность металлопротеиназы – 9, которая резко возрастает непосредственно в момент фиброгенеза, а затем резко снижается. В период с 4 по 8 неделю восстановления печени

возрастает активность металлопротеиназы – 1. Далее с 8 по 12 неделю восстановления печени возрастает активность металлопротеиназы – 3. Таким образом в процессе спонтанной регенерации печени при фиброзе активно участвуют все три, исследованные нами металлопротеиназы, включаясь в этот процесс поочередно.

#### Литература

1. Гарбузенко Д.В. Механизмы регуляции регенерации печени / Д.В. Гарбузенко, Г.К. Попов // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. – Т. 11, №1. – С. 21-25.
2. Винницкая Е.В. Фиброз печени: возможности обратного развития / Е.В. Винницкая, Ю.М. Юнусова // Фарматека. – 2012. – №13. – С. 74-76.
3. Чикотеев С.П. Современные взгляды на регенерацию печени / С.П. Чикотеев, А.Н. Плеханов, Н.Г. Корнилов // Хирургия. – 2001. – № 6. – С. 59-62.
4. Higginsand G.M., Anderson R.M. // Arch. Patol. – 1931. – Vol. 12. – P. 186-202.

### IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF LIVER TISSUE IN SPONTANEOUS REGENERATION IN THE RECOVERY PERIOD AFTER EXPERIMENTAL FIBROSIS

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

**We investigated the process of spontaneous liver regeneration after chemically induced experimental fibrosis. The obtained data about activity of some liver metalloproteinases, shown important role of each metalloproteinases at different stages of liver recovery.**

**Keywords:** *regeneration, fibrosis, liver, metalloproteinases.*

Дворяшина И.А. – ассист. кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет.

E-mail: germissionna@yandex.ru

Великородная Ю.И. – научн. сотрудник лаборатории патоморфологии, ФГУП НИИ гигиены, токсикологии, профпатологии ФМБА России.

E-mail: Velikorodnaya@rihtop.ru

Почепцов Александр Яковлевич – зав. лабораторией патоморфологии, ФГУП НИИ гигиены, токсикологии, профпатологии ФМБА России.

E-mail: Pocheptsov@rihtop.ru

Загребин В.Л. – зав. кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет.

E-mail: vlzagrebin@volgmed.ru