

УДК 616.24-002.155:616.36-006.327-092.9
DOI: 10.36979/1694-500X-2024-24-5-158-162

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
МИОФИБРОБЛАСТОВ И КЛЕТОК КУПФЕРА ПЕЧЕНИ
ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ NO₂ ФИБРОЗЕ ЛЕГКИХ И ЕГО КОРРЕКЦИИ**

А.А. Бейсембаев, Д.Я. Хожиев, А.Н. Суванов

Аннотация. Увеличение количества пациентов с заболеваниями легких приводит к повышению числа больных с легочным фиброзом. Но фибротическим процессом поражаются и другие органы, в частности печень. Поставлена цель изучить активацию миофибробластов и клеток Купфера в печени с помощью антител SMA и CD68 в эксперименте. Исследование проведено на крысах-самцах линии Wistar, которым моделировали легочный фиброз с помощью NO₂ (90 сут) и проводили коррекцию легочного фиброза маслом косточек граната (0,1 мл 2 раза в сутки) в течении 30 дней. Результаты исследования в печени показали положительную реакцию на SMA в перисинусоидальных клетках (> 50 %), активированные клетки Ито, экспрессию CD68+ макрофагов (клеток Купфера) при легочном фиброзе. После применения масла косточек граната наблюдался спад активации SMA до 20 %, плотность CD68 уменьшилась.

Ключевые слова: легочной фиброз; печень; миофибробласты; клетки Купфера; иммуногистохимия; гранатовое масло.

**NO₂-ИНДУКЦИЯЛАНГАН ӨПКӨ ФИБРОЗУСУНДА БООРДУН
МИОФИБРОБЛАСТТАРЫН ЖАНА КУПФЕР КЛЕТКАЛАРЫН
ИММУНОГИСТОХИМИЯЛЫК ИЗИЛДӨӨ ЖАНА АНЫ КОРРЕКЦИЯЛОО**

А.А. Бейсембаев, Д.Я. Хожиев, А.Н. Суванов

Аннотация. Өпкө оорулары менен ооругандардын санынын өсүшү өпкө фиброзы менен ооругандардын санынын көбөйүшүнө алып келет. Бирок фиброздук процесс башка органдарга, атап айтканда боорго да таасир этет. Максаты экспериментте SMA жана CD68 антителолорунун жардамы менен боордогу миофибробласттардын жана Купфер клеткаларынын активдешүүсүн изилдөө болгон. Изилдөө эркек Wistar келемиштеринде жүргүзүлдү, анда LF NO₂ (90 күн) менен моделдештирилди жана LF 30 күн бою анар данынын майы (0,1 мл 2 жолу) менен коррекцияланды. Боордун натыйжалары SMA позитивдүүлүгүн perisinusoidal клеткаларда (> 50 %), активдештирилген Ito клеткаларында жана CD68+ макрофагында (Купфер клеткалары) өпкө фиброзунда көрсөттү. Анар уругу майын колдонгондон кийин, SMA активдешүүсүнүн 20 % га төмөндөшү байкалган, ал эми CD68 тыгыздыгы төмөндөгөн.

Негизги сөздөр: өпкө фиброзы; боор; миофибробласттар; Купфер клеткалары; иммуногистохимия; анар майы.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF LIVER MYOFIBROBLASTS
AND LIVER KUPFFER CELLS IN NO₂-INDUCED PULMONARY FIBRO-SIS**

A.A. Beisembaev, D.Ya. Khozhiev, A.N. Suvanov

Abstract. The increasing number of patients with lung diseases leads to an increase in the number of patients with pulmonary fibrosis (PF). But other organs, in particular the liver, are also affected by fibrotic process. The aim was to study the activation of myofibroblasts and Kupffer cells in the liver using SMA and CD68 antibodies in experiment. The study was performed on male Wistar rats, which were modeled LF by NO₂ (90 days) and corrected by pomegranate oil (0.1 ml 2 times a day) for 30 days. Liver results showed positive SMA in perisinusoidal cells (>50 %), activated Ito cells, CD68+ macrophages (Kupffer cells) expression in pulmonary fibrosis. After application of pomegranate seed oil there was a decrease in SMA activation to 20 %, CD68 density decreased.

Keywords: pulmonary fibrosis; liver; myofibroblasts; Kupffer cells; immunohistochemistry; pomegranate oil.

Актуальность. Проблема легочного фиброза (ЛФ) заключается в необратимости изменений легочной ткани, которая теряет свои дыхательные функции [1]. Методов лечения ЛФ до настоящего времени, кроме пересадки лёгких, нет [1–3], а количество пациентов с заболеваниями легких, которые приводят к легочным фиброзам, увеличивается, особенно после пандемии COVID-19 [4]. Установлено, что новая коронавирусная инфекция вызывает прямое поражение разных органов, в том числе печени [5–7]. В свою очередь, ухудшение дыхательной функции легких, приводит к гипоксии, которая является причиной ишемического повреждения печени [2, 6]. Эта многогранность поражения органов определяет актуальность структурно-клеточного изучения печени для понимания механизмов развития ее повреждений при легочном фиброзе.

Иммуногистохимия – это метод использования особых антител для окрашивания определенных молекулярных видов *in situ* [8]. Методика позволяет распознавать намного больше разновидностей клеток, чем можно было бы визуализировать с помощью классической гистологии, особенно в иммунной системе и среди рассеянных гормон-секретирующих клеток эндокринной системы, и имеет потенциал для улучшения диагностики, прогноза и терапевтических возможностей [7, 8]. CD68 – гликопротеин из семейства LAMP. В качестве маркера макрофагов используется гликопротеин на поверхности моноцитов и макрофагов. Антитела SMA (АГМА) к гладким мышцам относятся к гепатонеспецифическим. Они оказывают воздействие на компоненты цитоскелета (белкового каркаса, находящегося в цитоплазме живой клетки) – тропонин, виментин, тропомиозин и, прежде всего, на фибриллярный актин [9].

Цель исследования – определить активацию миофибробластов и клеток Купфера методом иммуногистохимии с помощью антител SMA и CD68.

Материал и методы исследования. Исследование проводилось с учетом биоэтических правил работы на экспериментальных животных. Объектом исследования служили крысы-самцы Wistar массой 180–200 г, разведения питомника лабораторных животных “Рапполово”

РАМН. Модель стадийного формирования ХОБЛ у крыс воспроизводили по методу, предложенному Л.Н. Даниловым с соавт. [1].

Забор материала для исследования проводили через 90 дней после начала эксперимента в группе “Эксперимент” (без лечения) и еще через 30 дней после начала применения масла косточек граната (0,1 мл 2 раза в сутки), группа “Лечение”. Для проведения морфологического анализа полученные ткани фиксировались 10%-ным забуференным формалином в течение 24 часов [8]. Рутинная проводка тканей проводилась на карусельном процессоре STP120, ThermoFisher, Германия. Для окрашивания срезов гематоксилин-эозином, серийные срезы – на стеклах, толщиной 3 мкм, подвергались депарафинизации, дегидратации. После этого этапа в растворе гематоксилина Эрлиха выдерживание происходит в течение 2–5 минут. Промывка срезов производится бидистиллированной водой. Контроль окраски осуществляли под микроскопом.

При окрашивании ядра на интенсивный красно-фиолетовый цвет результат считается удовлетворительным, если внутри ядра видны ядрышки и кусочки хроматина, то при этом цитоплазма не окрасилась. Срезы переносятся в дистиллированную воду на 3–5 минут после окраски гематоксилином и промывания водой. В растворе эозина срезы помещали на 0,5–2 минуты для окраски цитоплазмы клеток. Окраску считали успешной, если срез имел равномерный желтовато-розовый цвет, на фоне которого отчетливо визуализировались окрашенные в синий цвет ядра.

После окрашивания в растворе эозина срезы промывали в дистиллированной воде, обезвоживали спиртом, просветляли в ксилоле и заключали в консервирующую среду.

Окраску антигенами производили при помощи специализированной автоматизированной системы Ventana Benchmark XT, Roche, Швейцария, где серийные срезы были толщиной 3 мкм и подвергались депарафинизации, дегидратации, демаскировке. Исследование проводили с антителами SMA, CD68 и Ki-67. Подсчет был произведен в процентном соотношении для маркера Ki-67 (proliferative index).

Полученные данные обрабатывали с помощью SPSS Statistics 21, проверяли на нормальность

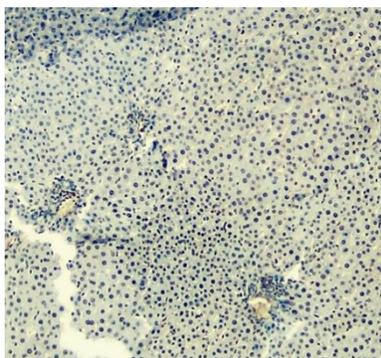


Рисунок 1 – Группа “Эксперимент”, печень.
Выраженная положительная реакция на SMA в перисинусоидальных клетках в количестве < 50 % клеток. ИГХ ок. SMA. Ув. 100



Рисунок 2 – Группа “Эксперимент”, печень.
Мышечная стенка центральной вены (стрелка) с положительной реакцией на SMA. ИГХ ок. SMA. Ув. 200

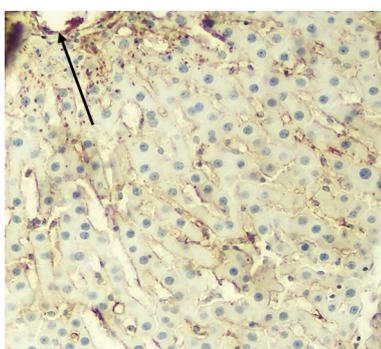


Рисунок 3 – Группа “Эксперимент”, печень.
Положительная экспрессия гладкомышечных клеток (стрелка) вокруг терминальных печеночных вен.
ИГХ ок. SMA. Ув. 400

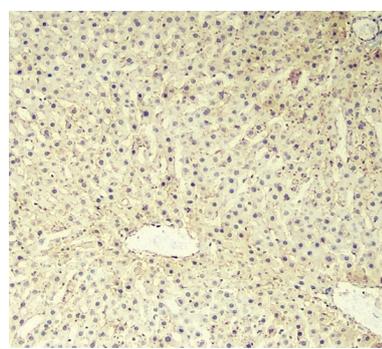


Рисунок 4 – Группа “Лечение”, печень.
Снижение пролиферации клеток Ито до 20 %.
ИГХ ок. SMA. Ув. 100

распределения с использованием критерия Колмогорова – Смирнова.

Результаты исследования и их обсуждение. В группе “Эксперимент” наблюдали следующую картину. Отмечалась выраженная положительная реакция на SMA в перисинусоидальных клетках в количестве > 50 % клеток. Фиброзные изменения наблюдались в портальных трактах, располагались в паренхиме печени. Так как антитела к гладкой мускулатуре (SMA) направлены против структур цитоскелета, то гистологическая картина напоминает таковую, как при хроническом гепатите и циррозах (рисунок 1).

В той же группе на гистопрепаратах отмечены активированные клетки Ито по иммунофенотипу, напоминающие миофибробласты и демон-

стрирующие повышенное содержание такого гена как α -SMA (рисунок 2). В фиброгенезе печени активированные звездчатые клетки Ито (перисинусоидальные клетки), играющие ключевую роль, они активируют пролиферацию фибробластов и формируют рубцовую ткань [10–12]. Их наличие и перикапиллярный фиброз, проявляющийся в виде интенсивной окраски перисинусоидальной соединительной ткани, прослойки межклеточного матрикса вокруг гепатоцитов (часто гибнущих), положительная экспрессия гладкомышечных клеток вокруг терминальных печеночных вен свидетельствует о повреждении печени (рисунок 3).

В группе животных, получивших лечение, на всех гистопрепаратах отмечалась неравномерное и умеренное положительное окрашивание

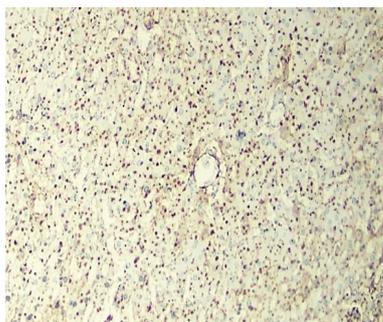


Рисунок 5 – Группа “Эксперимент”, печень. Отмечается выраженная пролиферация макрофагов и моноцитов, наряду с клетками Купфера с интенсивной окраской. ИГХ ок. CD68. Ув. 100

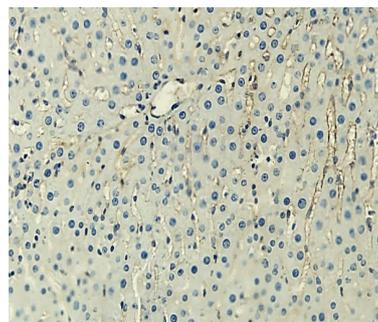


Рисунок 6 – Группа “Лечение”, печень. Очаговая положительность клеток Купфера в печеночных синусоидах. ИГХ ок. CD68. Ув. 100

перисинусоидальных клеток. В портальном тракте с помощью данного маркера выделили стенки желчных протоков и *tunica media* артериальных и венозных сосудов. Сравнительно с группой “Эксперимент”, где наблюдалось повышение пролиферативной активности перисинусоидальных клеток до 50 %, в группе “лечение” наблюдался спад активации до 20 % (рисунок 4).

Печень является одним из важнейших иммунологических органов, который очищает из антигенов портальную венозную кровь. Для выполнения этой задачи в печени содержится самая большая популяция тканевых макрофагов в организме, так называемые клетки Купфера. Они характеризуются экспрессией поверхностных маркеров, таких как CD68. При различных повреждениях отмечается активация как клеток Купфера, так и других макрофагов и моноцитов воспалительного генеза. В нашем исследовании было обнаружено, что в группе “Эксперимент”, наряду с признаками фиброзных изменений, отмечается интенсивная пролиферация CD68 (рисунок 5). При этом наблюдается окрашивание не только клеток Купфера, но и других медиаторов на поверхности паренхиматозного органа. В группе “Лечение” плотность CD68 заметно уменьшилась, окрашивая небольшую популяцию макрофагов (рисунок 6).

Выводы

В дебюте фиброгенеза появляется активация и повышенное продуцирование белка, финальная стадия – рубцевание печени, где

характерен апоптоз клеток Ито и резкое сокращение их количества. При отравлении двуокисью азота в печени появляется интенсивная пролиферация CD68. После терапии маслом косточек граната, CD68 заметно уменьшается и окрашивает небольшую популяцию макрофагов. Интересным оказалось наблюдение, что при фиброзной активации в пораженной печени в селезенке наблюдалась активность макрофагов. В группе “Эксперимент” отмечалась активность макрофагов как в области белой пульпы, так и в синусоидах. В группе “Лечение” активация снизилась в области белой пульпы и синусоидах [13]. Таким образом, необходимость дальнейших исследований фиброзных изменений внутренних органов на фоне ЛФ является необходимым для поиска методов профилактики и лечения данной патологии.

Поступила: 22.04.24; рецензирована: 07.05.24;
принята: 08.05.24.

Литература

1. Чистякова И.В. Лёгочный фиброз: факторы риска, патогенез и моделирование в эксперименте *in vivo* и *in vitro* / И.В. Чистякова, А.Б. Малашичева // Гены и клетки. 2023. Т. 18. (2). С. 109–121. URL: <https://doi.org/10.23868/gc321765>.
2. Udwardia Z.F., Koul P.A., Richeldi L. Post-COVID lung fibrosis: the tsunami that will follow the earthquake // Lung India. 2021. Vol. 38, Suppl. 1. P. S41–S47. DOI: 10.4103.

3. *Hikichi M., Mizumura K., Maruoka S., Gon Y.* Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke // *J Thorac Dis.* 2019. Vol. 11, Suppl 17. P. S2129–S2140. DOI: 10.21037/jtd.2019.10.43.
4. *Кузубова Н.А.* Легочный фиброз, ассоциированный с COVID-19 / Н.А. Кузубова, О.Н. Титова, Е.С. Лебедева, Е.В. Волчкова // *РМЖ. Медицинское обозрение.* 2021. 5 (7). С. 492–496. DOI: 10.32364/2587-6821-2021-5-7-492-496.
5. *Cho J.Y.* Management of liver diseases during the pandemic of coronavirus disease-19 / J.Y. Cho, S.S. Kim, Y.S. Lee, D.S. Song, J.H. Lee et al. // *Clin. Mol. Hepatol.* 2020; 26 (3): 243–250. URL: <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.011>.
6. *Ахмедов В.А.* Особенности состояния печени на фоне новой инфекции COVID-19 / В.А. Ахмедов, Г.Р. Бикбавова, Е.Ю. Хомутова // *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2021. Т. 16. № 3. С. 343–348.
7. *Yakhshiyevich K.D.* Changes in the morphofunctional properties of the thyroid gland and blood indicators during the hypoxic process / K.D. Yakhshiyevich, K. Muattar Sharipovna // *World Bulletin of Public Health.* 2022. Т. 9. С. 124–127.
8. *Артемьева А.С.* Иммуногистохимия: основы, методические подходы, группы маркеров: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования / А.С. Артемьева, А.А. Мурашкина, М.В. Рогачев. СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. 76 с.
9. *Великородная Ю.И.* Динамика изменений виментина и гладкомышечного актина при экспериментальном фиброзе печени химического генеза / Ю.И. Великородная, А.Я. Почепцов // *Вестник ВолгГМУ.* 2014. 3 (51). С. 55–58.
10. *Strikoudis A., Cieślak A., Loffredo L. et al.* Modeling of fibrotic lung disease using 3D organoids derived from human pluripotent stem cells // *Cell Rep.* 2019. Vol. 27. N 12. P. 3709–3723.e5. DOI: 10.1016
11. *Цыркунов В.М.* Клиническая цитология печени: звездчатые клетки ИТО / В.М. Цыркунов, В.П. Андреев, Р.И. Кравчук, И.А. Кондратович // *Журнал Гродненского ГМУ.* 2016. № 4. С. 90–99.
12. *Herzog E.L., Bucala R.* Fibrocytes in health and disease // *Exp Hematol.* 2010. Vol. 38. N 7. P. 548–556. DOI: 10.1016.
13. *Песин Я.М.* Роль вегетативной нервной системы в формировании нейроэндокринных и иммунных нарушений при стрессе и дистрессе / Я.М. Песин, В.Х. Габитов, А.А. Бейсембаев, Я.И. Потехина // *Медицинский академический журнал.* 2019. Т. 19 (S). С. 31–34. DOI 10.17816/MAJ191S131-34.