

С.В. Козлов
М.А. Корзаченко

Дніпровський державний
медичний університет,
Дніпро, Україна

Надійшла: 14.09.2022
Прийнята: 07.10.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.3.56-60>

УДК: 616.36-008.6-018-001-092.4-036.8:543.222

ПРОСТОРОВО-ЧАСОВИЙ РОЗПОДІЛ ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРІВ ТРАВМИ ПЕЧІ- НКИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ІМУНОГІС- ТОХІМІЧНОГО АНАЛІЗУ ПІСЛЯ ДІЇ ПОВІТРЯНОЇ УДАРНОЇ ХВИЛІ

Kozlov S.V.  ✉, Korzachenko M.A.  Spatial-temporal distribution of expression of liver injury markers according to the results of immunohistochemical analysis after exposure to an air shock wave.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The liver is one of the most vulnerable organs of the abdominal cavity after the blast wave. Diagnosis of closed liver injury, which is not accompanied by acute intra-abdominal blood loss, is not always effective. That's why, the search for liver damage markers after the blast wave action while preserving the integrity of the liver tissue at the time of damage, as well as at different times of the post-traumatic period, remains an urgent task. Considering this, the **Aim** of our study was to determine the spatio-temporal characteristics of the expression of liver damage markers after the experimental action of an air shock wave at different times of the post-traumatic period. **Materials** for the study was livers of 18 male rats, body mass 177.5 ± 15.8 g. All animals were randomly divided into two groups: 1 group consisted of control rats (halothane anesthesia with fixation) (n -6), 2 – experimental animals (halothane anesthesia with fixation, traumatic single action of an air shock wave with an excess pressure of 31.6 ± 4.8 (M \pm SD), which was generated in the shock tube device) (n -12). After the simulation of the air shock wave traumatic effect, an immunohistochemical analysis was performed using the eNOS marker on the 7th and 30th day by qualitative and quantitative assessment of its expression in the liver tissue. **Results.** Immunohistochemical analysis in the experimental group of animals showed that in the early post-traumatic period (7th days) after exposure to an air shock wave, eNOS expression prevails in the central and intermediate zones of the liver lobules. In the late post-traumatic period (30th days), eNOS expression is characteristic of the periportal zones of the liver lobules. **Conclusion.** The revealed spatio-temporal heterogeneity of eNOS expression in the post-traumatic period indicates the phasing of adaptive-reactive changes associated with a different threshold of liver lobule cells resistance to primary structural disturbances after an air shock wave exposure.

Key words: rat liver, air shock wave, immunohistochemical analysis, eNOS.

Citation:

Kozlov SV, Korzachenko MA. [Spatial-temporal distribution of expression of liver injury markers according to the results of immunohistochemical analysis after exposure to an air shock wave]. *Morphologia*. 2022;16(3):56-60. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.3.56-60>

 Kozlov S.V. 0000-0002-7619-4302

 Korzachenko M.A. 0000-0001-6797-8845

✉ tanatholog@i.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Діагностика травм печінки в низці випадків залишається проблемним етапом в медичній практиці приймально-діагностичних відділень, особливо, при великій кількості постраждалих [1]. Російсько-українська війна, яка супроводжується постійним використанням артилерії, мін, ракет, тощо призводить до великої кількості постраждалих як зі сторони військових, так і цивільного населення [2,3]. Одним із вражаючих факторів вибуху, який призводить до

ураження людей на значних дистанціях, є вибухова хвиля. При проходженні вибухової хвилі крізь тіло людини виникає спектр структурних змін в органах та тканинах, які не завжди можливо визначити за допомогою сучасних методів діагностики. Стандартом діагностики закритих травм печінки у світовій медичній практиці є проведення комп'ютерної томографії органів черевної порожнини [4]. Окрім інструментальних шляхів визначення ушкоджень печінки розробляються лабораторні критерії діагностики

порушень структури печінки, в якості додаткових тестів, а саме, підвищення рівня трансаміназ (АЛТ, АСТ), лактатдегідрогенази [5]. Але незважаючи на наявні клініко-інструментальні та лабораторні маркери ушкоджень печінки [6] залишаються невизначеними маркери ушкоджень печінки після дії вибухової хвилі при збереженні цілісності печінкової тканини в момент ураження, а також в різні терміни посттравматичного періоду.

Враховуючи це **метою** нашого дослідження було визначення просторово-часових особливостей експресії маркерів ушкодження печінки після експериментальної дії повітряної ударної хвилі в різні терміни посттравматичного періоду.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження стали печінки 18 щурів самців, вагою $177,5 \pm 15,8$ г. Всі тварини утримувались в віварії ДДМУ, при роботі з ними дотримувались вимог Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» та рекомендацій Європейської конвенції по захисту хребетних тварин [7]. Всіх тварин рандомним шляхом розділили на дві групи: 1 групу склали контрольні щури (галотановий наркоз з фіксацією) (n-6), 2 – експериментальні тварини (галотановий наркоз з фіксацією, травматична однократна дія повітряної ударної хвилі з надлишковим тиском $31,6 \pm 4,8$ (M \pm SD), яку було згенеровано в пристрої ударна труба) (n-12) [8].

Після виконаної посмертної лапаротомії, фрагмент печінки з правої долі фіксували у 10% розчині формаліну (pH 7,4) впродовж не менше 24 годин при кімнатній температурі. Потім зразки зневоднювали у висхідних концентраціях етанолу, очищували у ксилолі та просякали парафіном. Після цього, просякнутий парафіном шматочок печінки $1 \times 1 \times 1$ см заливали у парафінові блоки. З блоків отримували серійні зрізи товщиною не більше 4 мкм за допомогою мікротому Thermo HM 355S (Thermo Scientific, Німеччина). Зрізи кожного зразку тканини використовували для загального гістологічного забарвлення тканин за допомогою гематоксиліну та еозину. Перед фарбуванням, зрізи депарафінізували у ксилолі, регідратували у низхідних (100, 95, 70%) концентраціях етанолу та поміщали у рідину Буена (10% формалін у насиченому розчині пікринової кислоти) для додаткової фіксації з метою покращення ядерного забарвлення упродовж 1 години. Потім дегідратували у висхідних концентраціях алкоголю, просвітлювали у ксилолі та уміщували у заключне середовище під покривні скельця. Мікроскопія гістологічних зрізів проводилася за допомогою мікроскопу Axio Imager 2 (Zeiss, Німеччина) на збільшеннях $\times 200$ та $\times 400$.

У роботі шляхом імуногістохімічного дослідження досліджували експресію маркеру

anti-eNOS. Антитіло anti-eNOS – білок який синтезується в ендотеліоцитах. Приймаючи участь в продукції оксиду азоту, розслаблює гладенькі м'язи судин, індукує фактор росту ендотелію судин, активує тромбоцити та активно задіяний в альтеративно-регенеративних процесах.

Зрізи товщиною 3-5 мкм наносили на адгезивні предметні скельця Superfrost (Thermo, Німеччина), далі вони депарафінізувалися ксилолом. Активність ендогенної пероксидази блокувалася 3 % розчином перекису водню у 70 % метанолі на протязі 20 хвилин при кімнатній температурі. Потім зрізи промивали у трьох змінах натрій-фосфатного буферу (PBS) з наступним проведенням теплового антигенного демаскування (HIAR – heat induced antigene retrieval) шляхом нагрівання на водяній бані в цитратному буфері з pH=6.0 (на протязі 30 хвилин після досягнення температури 98° C) із симетричним розташуванням скельць у кюветі з додаванням 2 мл детергенту Triton-X100 (Sigma, Німеччина) на 200 мл цитратного буферу. Після промивання у трьох змінах PBS, скельця розташовували на планшеті з вологою підкладкою та інкубувалися з розчином блокуючої сироватки (нормальна козяча сироватка) у 1% BSA (бичачий сироватковий альбумін) на протязі 20 хвилин. У якості первинних використовувалися антитіла до anti-eNOS (мишаче моноклональне антитіло, клон M221, розведення 1:1000, Abscam, Великобританія). Проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологій камері при температурі 4° C упродовж ночі. В якості вторинних антитіл застосовували біотинільовані антикролячі імуноглобуліни (Novus Biologicals) та інкубували при кімнатній температурі протягом 30-40 хвилин. Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації Vectastain Elite ABC Kit (Biozol Diagnostica, Німеччина) протягом 30-40 хвилин при кімнатній температурі. Після цього проводили реакцію з хромогеном DAB (Thermo Scientific, Німеччина), оцінюючи якість взаємодії під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково фарбували гематоксиліном Джіла протягом 30 секунд.

Оцінка експресії використаних імуногістохімічних маркерів проводилася шляхом напівкількісного аналізу (таблиця 1).

Топологічно оцінку проводили в 3 зонах печінкових часточок, а саме, в центральній (I), перипортальній (II) та проміжній (III) ділянках часточок у відповідності до їх функціональних відмінностей [9].

Результати та їх обговорення

Аналіз гістологічних зрізів печінки у посттравматичному періоді після впливу повітряної ударної хвилі показав, що імуногістохімічна

реакція з eNOS була виявлена у всі терміни спостереження (7 та 30 доба експерименту).

Використовуючи запропоновану оціночну шкалу експресії в центральній (I), перипорталь-

ній (II) та проміжній (III) зонах печінкових часточок була розрахована вираженість експресії напівкількісним шляхом (таблиця 2).

Таблиця 1

Оціночна шкала експресії імуногістохімічних маркерів

Вираженість експресії маркеру	Символічне позначення експресії	Кількісне визначення експресії
Відсутність експресії, або незначна	0	0
Наявність експресії (помірна)	+	1
Значна вираженість експресії	++	2

Таблиця 2

Оцінка експресії eNOS

Зона печінкової часточки	Рівень експресії у щурів контрольної групи	Рівень експресії у щурів експериментальної групи, 7 доба	Рівень експресії у щурів експериментальної групи, 30 доба
I	0	++	+
II	0	+	++
III	0	++	+

Імуногістохімічний аналіз експресії eNOS показав, що на відміну від експериментальної тупої локальної травми печінки, за даними літератури [10], після впливу повітряної ударної хвилі на ранніх термінах (7 доба) ми спостерігали дифузний розподіл експресії, особливо виражений в центральних та проміжних зонах печінкових часточок (рис.1), але у віддаленому періоді (30 доба) експресія була більш сконцентрована в підкапсульних ділянках перипортальної зони печінкових часточок (рис.2,3).

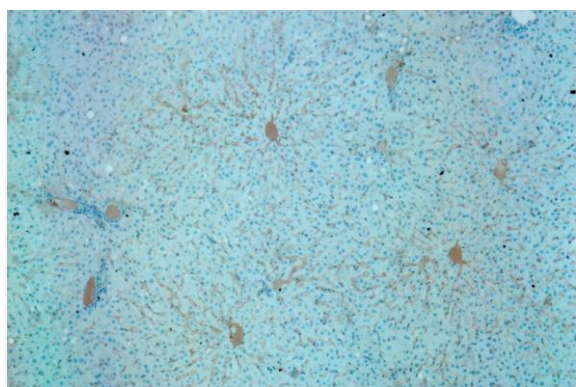


Рис.1. Виражена експресія eNOS в центролобулярних та проміжних зонах печінки. 7 доба. ×200.

Виявлена експресія ендотеліальної NO-синтетази свідчить про активацію антиоксидантного захисту в печінці щурів після впливу ударної повітряної хвилі. Причому активність eNOS має просторові та часові відмінності. Просторові відмінності пов'язані з неоднорідними фізичними властивостями тканини.

рідними фізичними властивостями тканини.

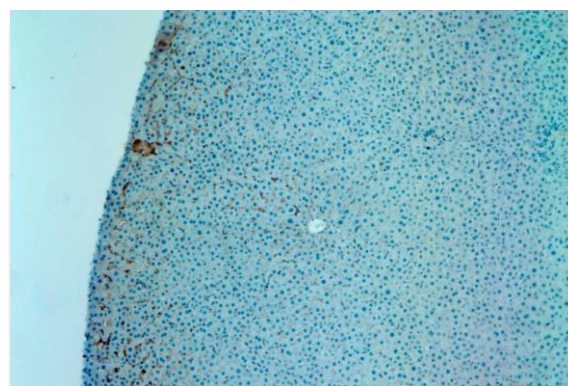


Рис.2. Підкапсульна помірна експресія eNOS, відмежована від неушкодженої тканини. Перипортальна зона. 30 доба. ×200.

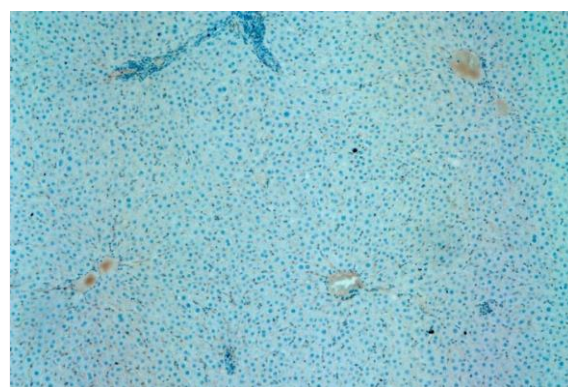


Рис.3. Інтрапаренхіматозна незначна експресія eNOS, навколо центральних вен за ходом синусоїдів. 30 доба. ×200.

Щільність печінки на протязі своєї товщі відмінна і залежить від наявності судин, протоків. Як відомо, повітряна ударна хвиля, формує первинні ушкодження на межі різних за щільністю ділянках, тобто, в нашому випадку, на межі печінкової балки та судини або жовчного протоку. Окрім того, ділянки, які повинні зазнавати найбільшого фізичного впливу властивостей ударної хвилі, це передня поверхня печінки на межі з черевної порожниною, тобто підкапсульна паренхіма. Аналіз отриманих імуногістохімічних досліджень з маркером eNOS наглядно підтвердив локалізацію найбільш виражених альтеративних змін.

Ендотеліальна NO-синтетаза в живому організмі відповідає за синтез оксиду азоту (NO). Відомо, що NO є однією з ключових хімічних сполук при альтерації. Окрім судинорозширюючого ефекту NO забезпечує високу антиоксиданту активність. Рівень активності ендотеліальної NO-синтетази може значно коливатися після дії різних факторів, що призводить до різного тлумачення та оцінки його впродовж посттравматичного періоду. В печінці eNOS знаходиться в ендотеліальних клітинах, гепатоцитах, клітинах Купфера. Оксид азоту зупиняє апоптичні процеси, захищає мітохондрії гепатоцитів від ушкодження при гострих запальних процесах, травматичних подіях. Зупинка кровотока або пошкодження стінки судин призводить до ішемічних наслідків в тканинах, що стимулює eNOS [11,12,13]. Проведене нами імуногістохімічне дослідження з маркером eNOS показало різний ступінь експресії його в тканині печінки в різні терміни дослідження. Імуногістохімічний аналіз в експериментальній групі тварин показав, що в ранньому посттравматичному періоді (7 доба) після впливу повітряної ударної хвилі експресія eNOS переваж-

ає в центральній та проміжній зонах печінкових часточок. В пізньому посттравматичному періоді (30 доба) експресія eNOS характерна для перипортальних зон печінкових часточок.

Висновок

Нетипова хронологія, у порівнянні з локальною травмою печінки, експресії eNOS в різні терміни посттравматичного періоду пов'язана з дифузним ушкодженням гемомікроциркуляторного русла печінки та різним ступенем реакції гепатоцитів до порушення їх кровопостачання. Збереження цілісності великих судин (центральных вен, міжчасточкових артерій та вен) може бути фактором відтермінування активності регенераторної відповіді на ушкодження. Виявлена просторова-часова неоднорідність експресії eNOS в посттравматичному періоді свідчить про етапність адаптаційно-реактивних змін пов'язану з різним порогом стійкості клітин печінкових часточок до первинних структурних порушень після впливу повітряної ударної хвилі.

Перспективи подальших досліджень

На наступному етапі роботи заплановано дослідити рівні експресії фактору транскрипції HIF1A, який експресується при зменшенні напруги кисню в тканинах, на етапах посттравматичного процесу.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Морфо-функціональний стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників» (номер державної реєстрації 0117U003181).

Літературні джерела References

1. Saviano A, Ojetti V, Zanza C, Franceschi F, Longhitano Y, Martuscelli E, Maiese A, Volonnino G, Bertozzi G, Ferrara M, La Russa R. Liver trauma: management in the emergency setting and medico-legal implications. *Diagnostics*. 2022;12(6):1456. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061456>
2. Kozlov SV, Tkachenko OV, Zrozhevskyi RS. [Forensic and medical characteristics of injuries caused by a contact explosion of a F-1 grenade]. *Sudovo-medychna ekspertyza*. 2016;(1):78-80. Ukrainian. DOI: <https://doi.org/10.24061/2707-8728.1.2016.16>.
3. Mamedov ShM, Tkachenko OV, Kozlov SV, Vydyshev KP, Kozlova YuV, Lysytsia O. [Pathomorphological aspects of explosive injury

- (comparative characteristics of injuries caused by OZM-72 and MON-50 anti-personnel fragmentation mines)]. *Sudovo-medychna ekspertyza*. 2017;(1):102-106. Ukrainian. DOI: <https://doi.org/10.24061/2707-8728.1.2017.25>
4. Coccolini F, Panel TWE, Coimbra R, Ordonez C, Kluger Y, Vega F, Moore EE, Biffl W, Peitzman A, Horer T. Liver trauma: WSES 2020 guidelines. *World J. Emerg. Surg.* 2020;15:1–15.
5. Shrestha A, Neupane HC, Tamrakar KK, Bhattarai A, Katwal G. Role of liver enzymes in patients with blunt abdominal trauma to diagnose liver injury. *International. J Emerg Med.* 2021;14(1):16-29. DOI: <https://doi.org/10.1186/S12245-021-00332-1>.
6. Shrestha A, Bhattarai A, Bhandari R. Blunt

abdomen trauma and biomarkers. Part of the Biomarkers in disease: methods, discoveries and applications. Springer, Cham. 2022;1:1-16. https://doi.org/10.1007/978-3-030-87302-8_5-1

7. Law of Ukraine. [On the protection of animals from cruelty]. Information of the Verkhovna Rada of Ukraine. 2006;27:230. Ukrainian. Electronic resource: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.

8. Kozlova YuV, Kosharnij AV, Korzachenko MA, Kytova IV. [Retrospective analysis and current state of experimental models of blast-induced trauma]. Ukrainyskiy zhurnal medytsyny, biolohii ta sportu. 2020;5(28):66-71. Ukrainian. DOI: <https://doi.org/10.26693/jmbs05.06.066>

9. Serov VV, Lapysh K, authors. Morfolo- gicheskaya diagnostica bolezney pecheni [Morphological diagnostics of liver diseases]. Moscow: Medytsyna; 1989. 336 p. Russian.

10. Cox JM, Kalns JE. Development and characterization of a rat model of nonpenetrating liver trauma. Comp Med. 2010;60(3):218-224.

11. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. Curr Med Chem. 2012;19(28):4850-4860. DOI: [10.2174/092986712803341520](https://doi.org/10.2174/092986712803341520).

12. Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P, Boersema M. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2018;175:71-102. DOI: https://doi.org/10.1007/112_2018_10.

13. Toshihiro W, Kurata S, Takuro S, Ichiro O, Yasuaki S, Ikeda T, Ureshino H, Ayuse T. Protective effect of nitric oxide on liver circulation from ischemia reperfusion injury. J Invest Surg. 2015;28(5):236-244. DOI: <https://doi.org/10.3109/08941939.2015.1024357>.

Козлов С.В., Корзаченко М.А. Просторово-часовий розподіл експресії маркерів травми печінки за результатами імуногістохімічного аналізу після дії повітряної ударної хвилі.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Печінка є одним із найбільш вразливих органів черевної порожнини після дії вибухової хвилі. Діагностика закритої травми печінки, яка не супроводжується гострою внутрішньочеревною крововтратою, не завжди є результативною. Тому пошук маркерів ушкодження печінки після дії вибухової хвилі при збереженні цілісності печінкової тканини в момент ураження, а також в різні терміни посттравматичного періоду залишається актуальним завданням. Враховуючи це, **метою** нашого дослідження було визначення просторово-часових особливостей експресії маркерів ушкодження печінки після експериментальної дії повітряної ударної хвилі в різні терміни посттравматичного періоду. **Матеріалом** для дослідження стали печінки 18 щурів самців, вагою 177,5±15,8 г. Всіх тварин рандомним шляхом розділили на дві групи: 1 групу склали контрольні щури (галотановий наркоз з фіксацією) (n-6), 2 – експериментальні тварини (галотановий наркоз з фіксацією, травматична однократна дія повітряної ударної хвилі з надлишковим тиском 31,6±4,8 (M±SD), яку було згенеровано в пристрої ударна труба) (n-12). Після відтворення травматичної дії повітряної ударної хвилі проводили імуногістохімічний аналіз з використанням маркеру eNOS на 7-му та 30-ту добу шляхом якісно-кількісної оцінки його експресії в тканині печінки. **Результати.** Імуногістохімічний аналіз в експериментальній групі тварин показав, що в ранньому посттравматичному періоді (7 доба) після впливу повітряної ударної хвилі експресія eNOS переважає в центральній та проміжній зонах печінкових часточок. В пізньому посттравматичному періоді (30 доба) експресія eNOS характерна для перипортальних зон печінкових часточок. **Висновок.** Виявлена просторова-часова неоднорідність експресії eNOS в посттравматичному періоді свідчить про етапність адаптаційно-реактивних змін пов'язану з різним порогом стійкості клітин печінкових часточок до первинних структурних порушень після впливу повітряної ударної хвилі.

Ключові слова: печінка щура, повітряна ударна хвиля, імуногістохімічний аналіз, eNOS.