

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ У 18-ДНЕВНЫХ КРЫСЯТ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА «СУВАР»

Любовь Петровна Романова, Игорь Иванович Малышев\*, Ольга Васильевна Воробьева

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

### Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-554

**Цель.** Морфометрическое и иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности гепатоцитов 18-дневных крысят после механической травмы печени.

**Методы.** После нанесения стальной иглой 18-дневным крысятам механической травмы печени в рацион опытных животных вводили биологически активное вещество «Сувар» в дозе 50 мг/кг (n=36). После забоя животных выполняли морфометрическое (подсчитывали митозы гепатоцитов на 7000 клеток) и иммуногистохимическое исследования печени. Для иммуногистохимического исследования было использовано два коммерческих моноклональных антитела фирмы «Santa Cruz»: (1) маркер пролиферативной активности Ki-67; (2) маркер апоптоза bcl-2. Иммуногистохимическое исследование проводили согласно стандартному протоколу. Контролем служили 36 оперированных крысят, которым биологически активное вещество не вводили в рацион.

**Результаты.** Число Ki-67-позитивных гепатоцитов в опыте на 3-и, 5-е, 7-е и 9-е сутки после операции было статистически значимо выше, чем в контроле. Это в целом соответствует и динамике изменения количества митозов гепатоцитов, где также наибольшее число митозов гепатоцитов отмечено на 3-и, 5-е, 7-е и 9-е сутки. И у опытных, и у контрольных крысят фиксировались лишь единичные клетки, меченые с помощью антител к bcl-2. Полученные результаты находятся в соответствии с мнением подавляющего большинства исследователей о том, что структура печени после повреждения восстанавливается преимущественно за счёт пролиферации гепатоцитов.

**Вывод.** С использованием морфометрического и иммуноморфологического методов показано, что биологически активное вещество «Сувар» оказывает стимулирующее действие на пролиферацию гепатоцитов, способствуя более раннему заживлению травмы печени по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** 18-дневные крысята, механическая травма печени, биологически активное вещество «Сувар», гепатоциты, пролиферация, иммуногистохимия.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC STUDY OF HEPATOCYTE PROLIFERATION IN 18-DAYS OLD INFANT RATS AFTER A MECHANICAL TRAUMA BEING ADMINISTERED «SUVAR» BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

L.P. Romanova, I.I. Malyshev, O.V. Vorob'eva

Chuvash State University named after I. N. Ulyanov, Cheboksary, Russia

**Aim.** Morphometric and immunohistochemical study of hepatocyte proliferative activity in 18-days-old infant rats after a mechanical trauma of the liver.

**Methods.** After an artificial mechanical injury of the liver with a steel needle in 18-days old infant rats, a biologically active substance «Suvar» in a dose of 50 mg/kg (n=36) was administered to animals. After animals were withdrawn from the experiment, a morphometric study (where the number of mitoses of hepatocytes for every 7000 cells were calculated) and immunohistochemistry of liver tissue were performed. For the immunohistochemistry, two commercially available monoclonal antibodies kits (manufactured by «Santa Cruz») were used: (1) proliferative activity marker Ki-67; (2) apoptosis marker bcl-2. Immunohistochemistry was performed according to standard protocol. Thirty-six operated infant rats, in whom the biologically active substance was not administered, were analyzed as the controls.

**Results.** The number of ki-67 positive hepatocytes in experimental animals on the 3rd, 5th, 7th and the 9th day after the operation was significantly higher compared to controls. This was in accordance with the changes of the number of mitoses in hepatocytes, where the greatest number of mitoses was also registered on 3rd, 5th, 7th and the 9th day. Both in experimental and in control infant rats, only single cells marked bcl-2 antibodies were found. The gained results support the opinion of the majority of the researchers that the liver regenerates mainly due to hepatocyte proliferation.

**Conclusion.** Morphometric study and immunohistochemistry confirmed that biologically active substance «Suvar» stimulates hepatocyte proliferation of hepatic cells, allowing better healing of liver injury compared to control animals.

**Keywords:** 18-days old infant rats, mechanical trauma of the liver, biologically active substance «Suvar», hepatocytes, proliferation, immunohistochemistry.

В ранее опубликованной работе было установлено, что у 18-дневных крысят восстановление печени после механического повреждения на фоне применения некоторых биологических веществ происходит с высокой пролиферативной активностью сохранившихся гепатоцитов [4]. В настоящее время нет сомнений, что иммунные

механизмы играют в организме важную роль и возникают раньше и клинических, и морфологических проявлений [2, 9]. В этой связи представляется целесообразным иммуноморфологическое исследование печени в ходе её восстановления после механической травмы в обычных условиях и при использовании биологически активных веществ.

Целью данной работы было иммуно-

Таблица 1

Число митозов в печени 18-дневных крысят в опыте и контроле в зависимости от времени, прошедшего после операции

Время, прошедшее после операции, сут	Количество митозов, ‰	
	Опыт	Контроль
1-е	0,9±0,4	—
3-и	3,5±0,7**	2,7±0,6
5-е	7,2±2,6*	4,5±1,4
7-е	6,1±2,6*	1,4±0,6
9-е	4,3±1,8*	0,8±0,4
15-е	1,6±0,3	—

Примечание: различия по сравнению с контролем — \*p <0,001; \*\*p <0,05.

морфологическое исследование пролиферативной активности клеток печени после механической травмы в условиях введения в рацион животных биологически активного вещества «Сувар».

Эксперимент поставлен на 36 крысках 18-дневного возраста с массой тела 21–24 г, которым через кожу стальной иглой осуществляли прокол печени. Сразу после операции и до конца эксперимента (то есть до 15-х суток включительно) в основной рацион добавляли биологически активное вещество «Сувар» в дозе 50 мг/кг. Контролем служили 36 крыс аналогичного возраста, которым после операции в пищевой режим «Сувар» не добавляли.

Животных выводили из эксперимента с помощью эфира в сроки от 1 до 20 сут после операции (для каждого срока наблюдения n=6).

Для подтверждения травмы печени, а также для изучения восстановительных и регенераторных процессов применяли гистологические методики. Печень после извлечения взвешивали на аналитических весах, вырезали из неё кусочек размерами 0,6×0,6 см, который фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина с последующей заливкой в парафин по стандартной методике. Полученные гистолопографические серийные срезы толщиной 4,6–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону и железным гематоксилином по Гейденгайну [5].

Пролиферативные процессы в печени оценивали, подсчитывая митозы гепатоцитов на 7000 ядер при увеличении 90×10.

Для иммуногистохимического исследования было использовано два коммерческих моноклональных антитела фирмы «Santa Cruz»: к маркеру пролиферативной

Таблица 2

Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии Ki-67 гепатоцитами в опыте и контроле в зависимости от сроков после операции (%)

Время, прошедшее после операции, сут	Количество окрашенных ядер	
	Опыт	Контроль
1-е	0,4±0,3	Единичные
3-и	2,3±0,6	1,8±0,6
5-е	5,3±1,4*	2,0±0,7
7-е	3,5±0,9*	0,6±0,4
9-е	1,5±0,4	Единичные
15-е	Единичные	—

Примечание: \*p <0,001.

активности Ki-67 и к регулятору апоптоза bcl-2. Срезы толщиной 3 мкм наносили на высокоадгезивные стёкла, обработанные L-polylysine, и высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Окраску проводили ручным и аппаратным способами с использованием иммуногистохимических контейнеров AUTOSTAINER-360 («THERMO», Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия) с применением систем визуализации En-vision («DAKO», Дания) и NovoLinc polimer («NovoCastr», Великобритания).

Контролем чувствительности и специфичности реакции служили неиммунизированные кролики и мышинные сыворотки, а также срезы контрольных тканей печени.

Результаты реакций оценивали, подсчитывая количество окрашенных ядер на 200 ядер гепатоцитов в шести полях зрения, вычисляли отношение окрашенных гепатоцитов к общему количеству гепатоцитов и выражали полученные результаты в процентах.

Статистическая обработка цифровых данных производилась по специальной программе «Статистика» с привлечением пакета программ Microsoft office (Word и Excel). Статистическую значимость определяли с помощью критерия Стьюдента [1].

Сразу после нанесения травмы в печени возникает дефект ткани, заполненный эритроцитами и погибшими гепатоцитами. В сохранившихся гепатоцитах, особенно около места травмы, отмечаются дистрофические изменения, которые прослеживаются до 3–5 сут. На 3-и и, особенно, на 5-е сутки вокруг места травмы появляется клеточная инфильтрация, представленная преимущественно лимфоцитами; в наибольшей степени

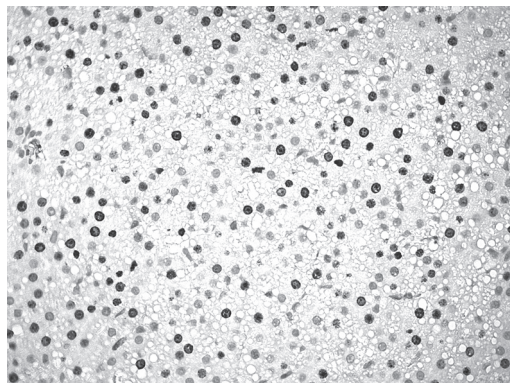


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание ядерного белка Ki-67 гепатоцитов. Опытное животное. 5-е сутки после операции. Увеличение  $\times 400$

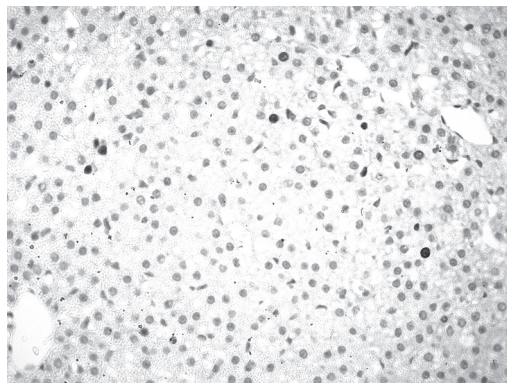


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание ядерного белка Ki-67 гепатоцитов. Контрольное животное. 5-е сутки после операции. Увеличение  $\times 400$

ни она выражена у контрольных крысят и в меньшей — у опытных.

По мере развития процесса среди клеток инфильтрата появляются фибробласты. У опытных крысят они визуализируются на 5-е сутки; на 9-е сутки на месте дефекта ткани печени фиксируется зрелая волокнистая соединительная ткань. У контрольных животных фибробласты появляются позднее — на 7-е сутки; развитие соединительной ткани происходит также позднее — на 11-е сутки.

Таким образом, выполненное исследование показывает, что применение биологически активного препарата «Сувар» приводит к более раннему развитию соединительной ткани на месте очага травмы.

В табл. 1 представлены результаты подсчёта митозов гепатоцитов в зависимости от времени, прошедшего после операции.

Таким образом, на 3-и, 5-е, 7-е и 9-е сутки после операции отмечено статистически значимое увеличение количества митозов у опытных крысят по сравнению с контролем.

Результаты подсчёта индекса пролиферации гепатоцитов (по метке Ki-67) в опыте и контроле (рис. 1 и 2) приведены в табл. 2.

Из табл. 2 можно видеть, что число Ki-67-позитивных гепатоцитов в опыте на 5-е и 7-е сутки после операции статистически значимо выше, чем в контроле.

И у опытных, и у контрольных крысят фиксируются лишь единичные клетки, позитивные на bcl-2. При этом принадлежность таких меченых ядер к ядрам гепатоцитов была сомнительной.

Результаты многочисленных исследований показывают, что печень человека и млекопитающих имеет высокий регене-

раторный потенциал. Однако полного восстановления печени после различного рода патологических процессов в постнатальном периоде не происходит.

По данным литературы [6, 10], с целью стимуляции регенерации печени в эксперименте и клинике использовали как хирургические (частичная гепатэктомия), так и терапевтические способы, заключающиеся во введении различных биологически активных веществ (лохеина, диприла, хлорофитума хохлатого и др.), обладающих способностью усиливать регенерационные процессы, в частности активировать пролиферацию гепатоцитов. Однако все применяемые для стимуляции пролиферации гепатоцитов методы или оказывают кратковременный эффект, или же вызывают осложнения. По этой причине до настоящего времени актуален поиск средств, обеспечивающих эффективное, стойкое и длительное стимулирование восстановительных процессов в печени, не вызывая в организме никаких осложнений.

В Чувашском государственном университете им. И.Н. Ульянова был создан биомикроэлементный препарат «Сувар». Он представляет собой смесь природных терпеноидов (монотерпеновые спирты, сесквитерпеновые углеводороды), смоляных кислот и микроэлементов (Cu, Fe, Mn, Zn, Co). Изначально он был рекомендован для применения в птицеводстве и животноводстве в качестве кормовой добавки. Однако его применение в ветеринарии показало, что препарат обладает разносторонним воздействием на многие органы и системы организма животных. Было доказано, что препарат «Сувар» стимулирует репродуктивную функцию, улучшает устойчивость родившегося потомства к болезням,

оказывает росто- и иммуностимулирующее действие, нормализует минеральный и белковый обмен, положительно влияет на гематологические и биохимические показатели крови [3, 7, 8].

## ВЫВОДЫ

1. Настоящая работа подтверждает полученные ранее данные о том, что препарат «Сувар», введённый в рацион крыс после механического повреждения печени, оказывает стимулирующее воздействие на пролиферацию гепатоцитов. Это приводит к заживлению механической травмы печени в существенно более ранние сроки по сравнению с контролем.

2. Также показано, что иммунные процессы в гепатоцитах протекают параллельно с динамикой изменения числа митозов гепатоцитов.

3. В целом полученные результаты находятся в соответствии с мнением подавляющего большинства исследователей о том, что структура печени восстанавливается преимущественно за счёт пролиферации гепатоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфология. — М.: Медицина, 1990. — 384 с. [Avtandilov G.G. *Meditsinskaya morfologiya*. (Medical morphology.) Moscow: Medicine. 1990; 384 p. (In Russ.)]
2. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. — М.: Медицина, 1985. — 192 с. [Babaeva A.G. *Regeneratsiya i sistema immunogeneza*. (Regeneration and the system of immunogenesis.) Moscow: Medicine. 1985; 192 p. (In Russ.)]
3. Лаврентьев А.Ю., Шерне В.С. Эффективность использования препарата «Сувар» в рационах молодняка свиней // Кормлен. сельскохозяйств. животных и кормопроизводство. — 2009. — №5. — С. 33–34. [Lavrent'ev A.Yu., Sherne V.S. Effectiveness of using «Suvar» additive in diet of young pigs. *Kormlenie sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh i kormoproizvodstvo*. 2009; 5: 33–34. (In Russ.)]

4. Малышев И.И., Романова Л.П. Механизм заживления механической травмы печени у крыс в условиях стимуляции регенерации биологически активными веществами // Вестн. ЧГУ им. И.Н. Ульянова. — 2010. — №3. — С. 126–130. [Malyshev I.I., Romanova L.P. Morphology of mechanical hepatic injuries healing of young rats in the condition of stimulation regeneration by biologically active substances. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*. 2010; 3: 126–130. (In Russ.)]
5. Меркулова Г.А. Курс патогистологической техники. — М.: Медицина, 1969. — 423 с. [Merkulova G.A. *Kurs patogistologicheskoy tekhniki*. (Techniques in pathology and histology.) Moscow: Medicine. 1969; 423 p. (In Russ.)]
6. Садовникова В.В., Садовникова И.В., Иванова Н.В. Морфологические изменения в печени крыс при токсическом медикаментозном гепатите и стимуляции репаративных процессов // Морфология. — 2001. — Т. 119, №3. — С. 63–65. [Sadovnikova V.V., Sadovnikova I.V., Ivanova N.V. Morphologic changes in rat liver at toxic drug-induced hepatitis and reparation stimulation. *Morfologiya*. 2001; 119 (3): 63–65. (In Russ.)]
7. Шуканов Р.А., Архипова М.Н., Шуканов А.А. Гематологический, биохимический и иммунологический профили организма хрячков в биогехимических условиях Чувашского Присурья // Аграрная наука. — 2009. — №6. — С. 30–32. [Shukanov R.A., Arkhipova M.N., Shukanov A.A. Gematological, biochemical and immunological characters of young boars in biogeochemical conditions of Chuvash Prisiurie. *Agrarnaya nauka*. 2009; 6: 30–32. (In Russ.)]
8. Шуканов Р.А., Григорьев А.О., Муллакаева М.О. Становление и развитие функциональных систем у продуктивных животных при использовании биогенных веществ в биогехимических условиях Приволжья и Юго-Востока Чувашии. — Чебоксары: Изд-во Чув. гос. пед. ун-та им. И.Я. Яковлева, 2008. — 176 с. [Shukanov R.A., Grigor'ev A.O., Mullakaeva M.O. *Stanovlenie i razvitie funktsional'nykh sistem u produktivnykh zhivotnykh pri ispol'zovanii biogenykh veshchestv v biogekhimicheskikh usloviyakh Privolzh'ya i Yugo-Vostoka Chuvashii*. (Foundation and development of functional systems in productive animals usin biogenic substances in biogeochemical conditions of Volga region and Southeast of Chuvash Republic.) Cheboksary: Publishing house of Chuvash State Pedagogic University named after I.A. Yakovlev. 2008; 176 p. (In Russ.)]
9. Hughes P., Bouiller P., Strasser A. Role of Bim and other Bs-2 family members in Autoimmune and degenerative diseases // *Carr. Dir. Autoimmun.* — 2006. — Vol. 9. — P. 74–94.
10. Michalopoulos G.K., De Frances M.C. Liver regeneration // *Science*. — 1997. — Vol. 276. — P. 60–65.