

DOI: 10.26693/jmbs08.01.086

УДК 616.36-001.31-074-091.8-097-092.9:577.112

Козлов С. В., Корзаченко М. А.

ОЦІНКА РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ HIF1A ТА ПАРЕНХІМАТОЗНО-СТРОМАЛЬНИХ ВІДНОШЕНЬ ПІСЛЯ ТРАВМАТИЧНОГО ВПЛИВУ ПОВІТРЯНОЇ УДАРНОЇ ХВИЛІ НА ПЕЧІНКУ

Дніпровський державний медичний університет,
Дніпро, Україна

Мета – дослідження, аналіз, оцінка рівня експресії HIF1A та паренхіматозно-стромальних відношень після травматичного впливу повітряної ударної хвилі на печінку.

Матеріал та методи. В представленому дослідженні були досліджені, проаналізовані та оцінені рівень експресії HIF1A та паренхіматозно-стромальні відношення після травматичного впливу повітряної ударної хвилі на печінку. Матеріалом для дослідження стали печінки 30 щурів самців, вагою $177,5 \pm 15,8$ г. Всіх тварин рандомним шляхом розділили на три групи: 1 групу склали інтактні щури (n-6), 2 – контрольні (галотановий наркоз з фіксацією) (n-12), 3 (n-12) – експериментальні тварини (галотановий наркоз з фіксацією, травматична однократна дія повітряної ударної хвилі з надлишковим тиском $31,6 \pm 4,8$, яку було згенеровано в розробленому авторами пристрої. З метою вивчення реактивних змін в печінці після впливу повітряної ударної хвилі застосовували імуногістохімічний метод з вивченням експресії маркера гіпоксії HIF1A та морфометричний аналіз паренхіматозно-стромальних відносин на 7 та 30 добу експерименту.

Результати та висновки. Після однократного впливу повітряної ударної хвилі на передню черевну стінку шляхом імуногістохімічного методу при дослідженні експресії HIF1A в печінці експериментальних щурів, як маркера ішемічного стану тканини, на 7-му та 30-ту доби посттравматичного періоду виявили хронологічні відмінності щодо наявності, вираженості, просторового розподілу відповіді клітин печінки на дифузну травму низької інтенсивності.

Морфометричний аналіз паренхіматозно-стромальних відношень печінки після однократного впливу повітряної ударної хвилі показав достовірне зменшення площі гепатоцитів на 8% та достовірне збільшення площі сполучної тканини майже в 2,4 рази на 30-ту добу посттравматичного періоду у порівнянні з контрольною групою тварин. Оцінка рівня експресії фактору транскрипції HIF1A в печінці на етапах посттравматичного періоду показала, що помірна експресія була характерна для підкапсульної ділянки печінки в ранньому

посттравматичному періоді. На 30-ту добу посттравматичного періоду накопичення маркера HIF1A в печінці експериментальної групи тварин не мало статистичної значущості у порівнянні з контрольною групою.

Ключові слова: печінка щура, травма, повітряна ударна хвиля, HIF1A, морфометричний аналіз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Виконана робота є складовою НДР «Морфофункціональний стан органів та тканин під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», номер держреєстрації 0120U105219, терміни виконання 01.2020-12.2024.

Вступ. Закрита травма печінки займає важливе місце в структурі травматичних причин смерті та захворюваності серед людей різних вікових груп [1, 2]. Обставинами травми, при яких ушкоджується печінка, можуть бути дорожньо-транспортні пригоди, падіння з висоти, удари в ділянку живота, струси тіла при мінно-вибухових травмах [2-7].

Складна будова печінкових часточок, а саме регіональні особливості кровозабезпечення клітин, є основою для формування неоднорідних за функцією гепатоцитів [8]. Основою для сегментації клітин печінкових часточок є активність та регуляція транскрипції різних печінкових генів в нормі та в умовах патології [9]. Існує думка, що клітини печінки мають різний поріг чутливості до рівня кисню. Так, доведено, що перипортальні ділянки печінкових часточок відносяться до нормоксичних, а периферичні (портальні) – до гіпоксичних. Це пов'язано, як було вже відмічене, з особливостями кровопостачання клітин печінкових часточок.

Руйнування структурних компонентів печінки після впливу травматичного фактору супроводжується розвитком ішемічно-гіпоксичних наслідків, зумовлених порушенням кровопостачання та крововідведення. Компенсаторно-адаптивні процеси, які виникають в ушкодженій тканині, направлені на ліквідацію чинників, які ушкоджують, збереження метаболічного гомеостазу, відновлення структурного континіума [10]. Одним із важливих тригерних факторів є надто чутливий до рівня кисню в

тканинах фактор транскрипції HIF1A, який в умовах гіпоксії накопичується в ядрі, де асоціюється з білком ARNT, і зв'язуючись зі специфічними послідовностями ДНК в генах приймає участь в стимуляції еритропоезу через підвищення рівня еритропоетину, в міграції та диференціації клітин, ангиогенезі, інших метаболічних внутрішньоклітинних процесах.

Відомо, що при моделюванні закритої тупої травми печінки було зафіксовано підвищення рівня HIF1A майже в 3 рази через добу після нанесення ушкодження [11].

В низці робіт простежено прямий зв'язок між рівнем експресії HIF1A та, зокрема, розвитком сполучної тканини в печінці [12]. HIF1A може активізуватися не тільки в умовах гіпоксії, але й від факторів росту, окислювального стресу, різних цитокінів, які вивільнюються при токсичних впливах на печінку, порушенні жовчовиділення. Роль фактору транскрипції HIF1A, зокрема при захворюваннях печінки представлена також в низці робіт [13].

Враховуючи неабияку увагу до ролі фактору HIF1A в травматичному процесі, а також відсутність в науковій літературі даних щодо експресії його після впливу ударної хвилі **метою** даної роботи було дослідження, аналіз, оцінка рівня експресії HIF1A та паренхіматозно-стромальних відношень після травматичного впливу повітряної ударної хвилі на печінку.

Матеріал та методи дослідження. Тварини утримувались в віварії ДДМУ, при роботі з ними дотримувались вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013), рекомендацій Європейської конвенції по захисту хребетних тварин (Страсбург, 2005), та Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» [14].

Всіх тварин (n=30) рандомним шляхом розділили на три групи: 1 групу склали інтактні щури (n=6), 2 – контрольні (галотановий наркоз з фіксацією) (n=12), 3 (n=12) – експериментальні тварини (галотановий наркоз з фіксацією, травматична однократна дія повітряної ударної хвилі з надлишковим тиском $31,6 \pm 4,8$, яку було згенеровано в розробленому авторами пристрої).

Матеріалом для дослідження були фрагменти печінки 30 щурів самців, вагою $177,5 \pm 15,8$ г. Печінку після евтаназії щурів (декапітація під галотановим наркозом) вилучали на сьому та 30 добу посттравматичного періоду шляхом посмертної лапаротомії. З діафрагмальної поверхні правої частки печінки вирізали шматочок розміром $1 \times 1 \times 0,5$ см з подальшим зануренням його до 10% розчину нейтрального формаліну (pH 7,4) з експозицією 24 години. Потім зразки зневоднювали у висхідних

концентраціях етанолу, очищували у ксилолі та просякали парафіном. Після цього, просякнутий парафіном фрагмент печінки 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 закрите середовище під покривні скельця. Мікроскопія гістологічних зрізів проводилася за допомогою мікроскопу Axio Imager 2 (Zeiss, Німеччина) на збільшеннях $\times 200$ та $\times 400$.

З метою вивчення реактивних змін в печінці після впливу повітряної ударної хвилі застосовували імуногістохімічний метод з вивченням експресії маркерів ушкодження, а саме, маркера гіпоксії HIF1A. Накопичення цього маркера є індикатором відповіді клітин печінки на ушкодження. HIF1A – фактор транскрипції, який експресується при зменшенні напруги кисню в тканинах. Активує понад 40 генів, а саме еритропоетин, перевізників глюкози, гліколітичні ферменти, фактор росту ендотелію судин та низку інших генів та білків, які приймають участь в адаптаційних метаболічних процесах внаслідок гіпоксії.

Зрізи товщиною не більше 4 мкм наносили на адгезивні предметні скельця Superfrost (Thermo, Німеччина), далі вони депарафінізувалися ксилолом. Активність ендогенної пероксидази блокувалася 3% розчином перекису водню у 70% метанолі протягом 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 (протягом 30 хвилин після досягнення температури 98°C) із симетричним розташуванням скелець 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) протягом 20 хвилин. У якості первинних використовувалися антитіла до HIF1A

(мишаче моноклональне антитіло, клон ESEE122, розведення 1:5000, Thermo Fisher Scientific, США).

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 проводилась шляхом напівкількісного аналізу (таблиця 1).

Таблиця 1 – Оціночна шкала експресії імуногістохімічних маркерів

Вираженість експресії маркера	Символічне позначення експресії	Кількісне визначення експресії
Відсутність експресії	0	0
Наявність експресії (незначна та помірна)	+	1
Значна вираженість експресії	++	2

З метою кількісної оцінки паренхіматозно-стромальних змін в печінці проводили морфометричне дослідження шляхом використання програми ImageJ [15, 16]. Після фотографування полів зору за допомогою камери мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam цифрові зображення зберігали в jpg-форматі, переносили в інтерфейс програми для обробки цифрових зображень ImageJ та визначали площу гепатоцитів, судинних компонентів, сполучної тканини.

Математично-статистичну обробку отриманих кількісних результатів проводили за допомогою програмного продукту STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний № AGAR909E415822FA), програми Excel (Microsoft Office, USA). Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента для рівня достовірності не менше 95%, ($p < 0,05$).

Результати дослідження. Дослідження експресії HIF1A в печінці експериментальних щурів, як маркера ішемічного стану тканини, після однократного впливу повітряної ударної хвилі на передню черевну стінку шляхом імуногістохімічного методу на 7-му та 30-ту доби посттравматичного

періоду виявили хронологічні відмінності щодо наявності, вираженості, просторового розподілу відповіді клітин печінки на дифузну травму низької інтенсивності.

В печінці експериментальних щурів на сьому добу посттравматичного періоду (ранній термін) було виявлено порушення місцевої гемодинаміки як в перипортальних, так і в центральних ділянках печінкових часточок у вигляді дрібновогнищевих крововиливів внаслідок розривів стінок гемомікроциркуляторного русла, нерівномірного кровонаповнення синусоїдів, що все разом створювали умови для ішемічно-гіпоксичного ураження чутливих до зниження тиску кисню клітин печінки.

Розлади кровообігу, які супроводжували посттравматичний період, призводили до ініціації запальних механізмів, які викликали ішемічне ушкодження клітин. Аналіз експресії HIF1A в печінці на сьому добу посттравматичного періоду показав, що, в першу чергу, були ушкоджені підкапсульні гепатоцити у зв'язку з тим, що найбільше отримують впливу тканини при проходженні ударної хвилі на межі різних середовищ, в даному випадку, на межі черевної порожнини та підкапсульної паренхіми печінки (рис. 1, 2). Це призводило до порушення місцевого кровотоку та підвищенню проникності судин.

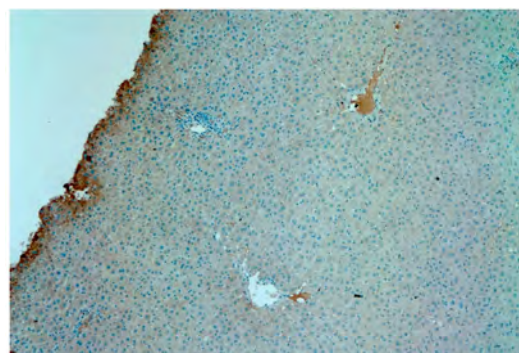


Рис. 1 – Помірна експресія HIF1A в печінці щура експериментальної групи. 7 доба. Зб. x200

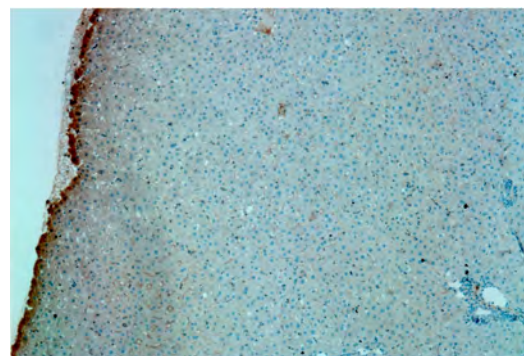


Рис. 2 – Помірна експресія HIF1A в печінці щура експериментальної групи. 7 доба. Зб. x200

Аналіз експресії HIF1A в печінці на тридцять добу посттравматичного періоду не дозволяє чітко визначитись з наявністю реакції в усіх досліджуваних збірках. У віддаленому періоді травми компенсаторно-адаптаційні механізми нівелювали первинні альтеративні зміни печінки (рис. 3, 4). Як вже було підтверджено, що тільки в умовах гіпоксії [17] активно відбувається експресія фактору транскрипції HIF1A в гепатоцитах та активація ангиогенезу.

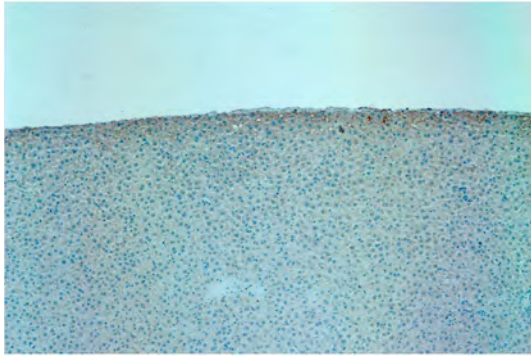


Рис. 3 – Незначна експресія HIF1A в підкапсульній ділянці печінки експериментального щура. 30 доба. Зб. x200

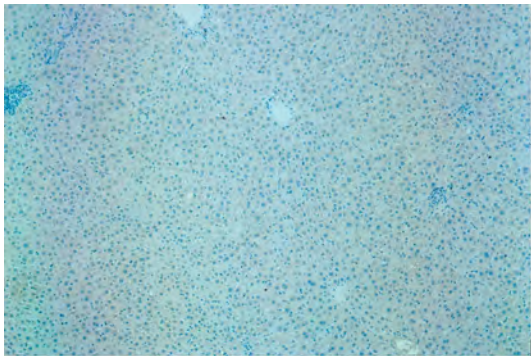


Рис. 4 – Відсутність експресії HIF1A в печінці експериментального щура. 30 доба. Зб. x200

Аналіз гістологічних зрізів печінки в різні терміни спостереження показав, що з часом експресія HIF1A мала неоднорідний характер, що пов'язано з тим, що стан гіпоксії розвивається неодноразомно в усіх клітинах після впливу повітряної ударної хвилі, а інтенсивне накопичення даного маркера йде в ядрах гепатоцитів, прилеглих до периферійних ділянок печінкових часточок, зокрема, які розташовані ближче до підкапсульних локацій. Підвищення експресії HIF1A в ранньому посттравматичному періоді у порівнянні з 30 добою свідчить про більш виражений гіпоксичний стан на більш ранніх стадіях ураження печінки.

Виявлені особливості експресії маркера гіпоксії HIF1A в печінці після впливу повітряної ударної хвилі показують, що найбільш інтенсивне

накопичення цього маркера відбувалося на 7-му добу посттравматичного періоду. Експресія даного маркера, яка максимально виражена на ранніх термінах, забезпечувала стійкість клітин печінки до гіпоксичного стану.

Морфометричний аналіз центральної та периферійної зон печінкових часточок показав, що у посттравматичному періоді на 30 добу спостереження відбуваються достовірні зміни щодо паренхіматозно-стромальних відношень в сторону зменшення площі печінкових пластинок, за рахунок зменшення площі, які займають гепатоцити, та підвищення стромальної складової, а саме, сполучної тканини, яка, окрім навколосудинної, парасинусоїдальної та капсульної локалізації, була, вогнищево, представлена в нетипових місцях паренхіми печінки. Суттєвих достовірних коливань в судинному компоненті печінкових часточок (міжчасточкові судини, синусоїдні капіляри, центральні вени) не було виявлено (таблиця 2). Не зважаючи на різницю середніх морфометричних показників на 7-му добу спостереження в контрольній та експериментальній групах тварин, достовірних відмінностей не встановлено.

Таблиця 2 – Морфометричний аналіз печінкових часточок на 7-му та 30-ту добу посттравматичного періоду

	Площа, яку займають клітинні та тканинні елементи		
	в контрольній групі, % (M±SD)	в експериментальній групі (7 доба), %, (M±SD)	в експериментальній групі (30 доба), %, (M±SD)
Гепатоцити	73,8±2,1	71,9±2,2	67,9±2,2*
Синусоїдні капіляри (СК)	8,6±1,2	9,2±1,2	8,9±0,9
Центральні вени (ЦВ)	3,9±0,8	4,3±0,8	4,6±0,8
Міжчасточкові печінкові вени (МПВ)	3,8±0,9	3,9±0,8	4,3±0,8
Міжчасточкові печінкові артерії (МПА)	3,2±0,7	3,5±0,7	3,3±0,5
Міжчасточкові жовчні протоки (МЖП)	3,3±0,8	3,1±0,7	2,9±0,4
Сполучна тканина (СТ)	3,4±0,8	4,1±0,8	8,1±0,8*

Примітка: * - відмінності достовірні при p<0.05 у порівнянні з групою контролю

Обговорення результатів дослідження. Досліджена експресія фактору транскрипції HIF1A в печінці після впливу повітряної ударної хвилі шляхом імуногістохімічного методу показала взаємозв'язок з наслідками, які відбуваються після травми (альтерація, запалення, регенерація), а також з термінами спостереження та розподілом в паренхімі печінці. Незважаючи на дифузну травму печінки, яка відбувається після низько інтенсивного впливу повітряної ударної хвилі, що було показано в попередніх дослідженнях гістопатологічних наслідків в печінці [18], фіксовано високій поріг стійкості клітин печінки до дії цього травматичного фактору, що з одного боку пов'язано з особливостями кровозабезпечення паренхіми, а з іншого, високими реактивно-адаптаційними характеристиками гепатоцитів, які зазнали впливу гіпоксично-ішемічних наслідків травми. Відсутність експресії HIF1A в печінці через місяць після впливу повітряної ударної хвилі є прямим свідченням відновлення функціонування спеціалізованих клітин печінки, незважаючи на первинні значні дифузні зміни на рівні мікроциркуляторного русла печінкових часточок. В дослідженнях неодноразово показано було високий регенераторний потенціал печінки, незважаючи на фактори впливу, токсичний, механічний, інше [19].

Обрання таких термінів дослідження показало відмінності в реакціях в ранньому та пізньому посттравматичному періодах, що є одним із ключових аспектів при лікувальній тактиці, зокрема неоперативному веденні пацієнтів з тупою закритою травмою черева.

Розглядаючи мікробудову печінки, найбільш уразливими місцями паренхіми можуть виступати портална доля, де розташовані міждолькові артерії, вени, жовчний проток та лімфатичні судини, синусоїдальні простори вислані ендотеліальними клітинами між тяжами гепатоцитів, в яких змішана кров зливається в центральну вену. Відомо, що печінка має значні резервні можливості, що обумовлено її чисельними функціями (кровотворна, дезінтоксикаційна, синтезуюча, секреція жовчі, тощо). Одним із компенсаторно-приспосувальних механізмів або реакцією на шкідливий вплив є швидкий розвиток фіброзу. Патоморфоз фіброзу печінки ретельно висвітлений при інтоксикаціях, патології серцево-судинної системи, резекціях [20]. В цьому дослідженні [20] розглянуті механізми регенерації печінки. Завдяки високому регенеративному потенціалу печінка здатна протистояти дії різноманітних чинників. Актуальним наразі є пошук патофізіологічних причин, які дезінтегрують фібротичні процеси в печінці. Але, відомостей в науковій літературі щодо впливу вибухової хвилі на динаміку розвитку фіброзу, немає [21].

Печінка за рахунок своєї щільності, умовної однорідності, в аспекті впливу вибухової хвилі, вважаємо, більше захищена на відміну від інших порожнистих та паренхіматозних органів черевної порожнини, про що є неодноразові клінічні підтвердження.

Дифузна травма мікросудинного русла печінки призводила до накопичення рідинної частки крові в інтерстиціальному просторі органу. Підтвердженням виходу рідинної частки крові є збільшення рівня гематокриту після впливу вибухової хвилі [22]. Набряк ендотеліоцитів, збільшення між ними просторів призводило до порушень трансмембранного транспорту, що в свою чергу супроводжувалося гемодинамічними порушеннями в печінкових синусоїдах, розвитку гіпоксії, коагулопатіям, активації прозапальних цитокінів. Агрегація тромбоцитів в мікросудинах призводить до формування локальних порушень кровотоку з розвитком фокальних геморагічних некрозів печінки. Гостра ендотеліальна дисфункція з внутрішньосудинною гіповолемією в поєднанні з агрегацією клітинних елементів судинного русла призводить до незворотніх паренхіматозних змін в печінці.

Таким чином, розуміння просторової реакції клітин печінки на зовнішні та внутрішні чинники дозволить оцінити адаптаційні можливості метаболізму гепатоцитів, які знаходяться в різних умовах кровопостачання, що розширить знання про патогенез посттравматичного періоду та запропонують нові лікувальні інструменти для їх корекції.

Висновки

1. Морфометричний аналіз паренхіматозно-стромальних відношень печінки після однократного впливу повітряної ударної хвилі показав достовірне зменшення площі гепатоцитів на 8% та достовірне збільшення площі сполучної тканини майже в 2,4 рази на 30-ту добу посттравматичного періоду у порівнянні з контрольною групою тварин.
2. Оцінка рівня експресії фактору транскрипції HIF1A в печінці на етапах посттравматичного періоду показала, що помірна експресія була характерна для підкапсульної ділянки печінки в ранньому посттравматичному періоді. На 30-ту добу посттравматичного періоду накопичення маркера HIF1A в печінці експериментальної групи тварин не мало статистичної значущості у порівнянні з контрольною групою.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати є підґрунтям для подальшого дослідження впливу повітряної ударної хвилі на органи та тканини. Використання імуногістохімічного методу для подальшого прогнозування наслідків дії цього травматичного фактору є перспективним.

References

1. Coccolini F, Coimbra R, Ordóñez C, Kluger Y, Vega F, Moore EE, et al. Liver trauma: WSES 2020 guidelines. *World J Emerg Surg.* 2020 Mar 30;15(1):24. PMID: 32228707. PMCID: PMC7106618. doi: 10.1186/s13017-020-00302-7
2. Hu W, Xu Z, Shen X, Gu Y, Dai Z, Chen J, et al. Accident-related hepatic trauma in a medical clinical center in eastern China: a cross-sectional study. *BMC Surg.* 2021 Jan 6;21(1):16. PMID: 33407367. PMCID: PMC7789588. doi: 10.1186/s12893-020-01043-9
3. Fodor M, Primavesi F, Morell-Hofert D, Kranebitter V, Palaver A, Braunwarth E, et al. Non-operative management of blunt hepatic and splenic injury: a time-trend and outcome analysis over a period of 17 years. *World J Emerg Surg.* 2019 Jun 17;14:29. PMID: 31236129. PMCID: PMC6580509. doi: 10.1186/s13017-019-0249-y
4. Brooks AJ, Price V, Simms M. FAST on operational military deployment. *Emerg Med J.* 2005 Apr;22(4):263-5. PMID: 15788825. PMCID: PMC1726750. doi: 10.1136/emj.2004.014308
5. Kaplan U, Hatoum OA, Chulsky A, Menzal H, Kopelman D. Two weeks delayed bleeding in blunt liver injury: case report and review of the literature. *World J Emerg Surg.* 2011 Apr 22;6:14. PMID: 21513531. PMCID: PMC3097148. doi: 10.1186/1749-7922-6-14
6. Slotta JE, Justinger C, Kollmar O, Kollmar C, Schäfer T, Schilling MK. Liver injury following blunt abdominal trauma: a new mechanism-driven classification. *Surg Today.* 2014 Feb;44(2):241-6. PMID: 23459788. PMCID: PMC3898124. doi: 10.1007/s00595-013-0515-7
7. Sulistio PA, Prijambodo P. Liver and kidney injury from abdominal trauma: Case report. *Int J Health Sci.* 2022;6(S9):1183-1194. doi: 10.53730/ijhs.v6nS9.12666
8. Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:395-410. PMID: 30936469. doi: 10.1038/s41575-019-0134-x
9. Cunningham RP, Porat-Shliom N. Liver Zonation - Revisiting Old Questions With New Technologies. *Front Physiol.* 2021;12:732929. PMID: 34566696. PMCID: PMC8458816. doi: 10.3389/fphys.2021.732929
10. Weber B, Lackner I, Haffner-Luntzer M, Palmer A, Pressmar J, Scharffetter-Kochanek K, et al. Modeling trauma in rats: similarities to humans and potential pitfalls to consider. *J Transl Med.* 2019 Sep 5;17(1):305. PMID: 31488164. PMCID: PMC6728963. doi: 10.1186/s12967-019-2052-7
11. Cox JM, Kalns JE. Development and characterization of a rat model of nonpenetrating liver trauma. *Comp Med.* 2010 Jun;60(3):218-24. PMID: 20579437. PMCID: PMC2890397
12. Roth KJ, Copple BL. Role of Hypoxia-Inducible Factors in the Development of Liver Fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015 Sep 25;1(6):589-597. PMID: 28210703. PMCID: PMC5301877. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.09.005
13. Chu Q, Gu X, Zheng Q, Zhu H. (2022). Regulatory mechanism of HIF-1 α and its role in liver diseases: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2022 Jan;10(2):109. PMID: 35282052. PMCID: PMC8848434. doi: 10.21037/atm-21-4222
14. Zakon Ukrainy. Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennya [On the protection of animals from cruel treatment Information]. Vidomosti Verkhovnoi Rady Ukrainy (VVR). 2006;27:230. [Ukrainian] Available from: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
15. Poslavska OV. Vyznachennya liniynykh rozmiriv ta ploshch okremykh morfolohichnykh ob'ektiv na mikrofotohrafyakh za dopomohoyu prohramy ImageJ [Determination of linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ]. *Morfolohiya.* 2016.;10(3):377-381. [Ukrainian]
16. Rasband WS. ImageJ U S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018
17. Kietzmann T. Liver zonation in health and disease: hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors as concert masters. *Int J Mol Sci.* 2019 May 11;20(9):2347. PMID: 31083568. PMCID: PMC6540308. doi: 10.3390/ijms20092347
18. Kozlov SV, Korzachenko MA. morfolohichnyy analiz patohistolohichnykh zmin pechinky pislya travmatychnoy diyi povitryanoy udarnoy khvyli [Morphological analysis of pathohistological changes in the liver after the traumatic effect of an air shock wave]. *Morphologia.* 2022;16(2):31-7. [Ukrainian]. doi: 10.26641/1997-9665.2022.2.31-37
19. Parlakgöl G, Arruda AP, Cagampan E, Pang S, Güney E, Lee Y, et al. High resolution 3D imaging of liver reveals a central role for subcellular architectural organization in metabolism. *Preprint bioRxiv* [Preprint]. 2020. doi: 10.1101/2020.11.18.387803
20. Sydorenko BV, Pivtorak KV, Monastyrskiy VM. Rezektsiya pechinky yak stymul yiyi reheneratsiyi pry khronichnykh zakhvoryuvannyakh [Liver resection as a stimulation of its regeneration in chronic diseases]. *Visnyk Vinnytskoho natsionalnoho medychnoho universytetu.* 2022;26(2):339-343. doi: 10.31393/reports-vnmedical-2022-26(2)-29

21. Wani I, Parray FQ, Sheikh T, Wani RA, Amin A, Gul I, et al. Spectrum of abdominal organ injury in a primary blast type. *World J Emerg Surg.* 2009 Dec 21;4:46. PMID: 20025766. PMCID: PMC2803452. doi: 10.1186/1749-7922-4-46
22. Zhang B, Wang A, Hu W, Zhang L, Xiong Y, Chen J, et al. Hemoconcentration caused by microvascular dysfunction after blast injuries to the chest and abdomen of rabbits. *J Trauma.* 2011 Sep;71(3):694-701. PMID: 21909001. doi: 10.1097/TA.0b013e318224595f

UDC 616.36-001.31-074-091.8-097-092.9:577.112

Evaluation of HIF1A Expression Level and Parenchymal-Stromal Relationships after Traumatic Air Shock Wave Exposure to the Liver

Kozlov S. V., Korzachenko M. A.

Abstract. *The purpose of the study was to investigate, analyze and evaluate the expression level of HIF1A and parenchymal-stromal relations after traumatic air shock wave exposure to the liver.*

Materials and methods. The material for the study was the liver of 30 male rats, weighing 177.5 ± 15.8 g. All animals were randomly divided into three groups: group 1 consisted of intact rats (n - 6), group 2 – control (halothane anesthesia with fixation) (n - 12), group 3 (n - 12) – experimental animals (halothane anesthesia with fixation, traumatic single action of an air shock wave with an excess pressure of 31.6 ± 4.8 , which was generated in the device developed by us). In order to study the reactive changes in the liver after exposure to an air shock wave, an immunohistochemical method was used to study the expression of the hypoxia marker HIF1A and a morphometric analysis of parenchymal-stromal relations on the 7th and 30th day of the experiment.

Results and discussion. The studied expression of the transcription factor HIF1A in the liver after exposure to an air shock wave by the immunohistochemical method showed a relationship with the consequences that occur after the injury (alteration, inflammation, regeneration), as well as with the observation period and distribution in the liver parenchyma. Despite the diffuse injury of the liver, which occurs after a low-intensity exposure to an air shock wave, we record a high threshold of resistance of liver cells to the action of this traumatic factor. The absence of HIF1A expression in the liver one month after exposure to an air shock wave is a direct indication of the restoration of the functioning of specialized liver cells, despite the initial significant diffuse changes at the level of the microcirculatory channel of the liver lobules. Research has repeatedly shown the high regenerative potential of the liver, despite the factors of influence, toxic, mechanical, and others.

Understanding the spatial response of liver cells to external and internal factors will allow us to assess the adaptive capabilities of the metabolism of hepatocytes that are in different conditions of blood supply, which will expand our knowledge about the pathogenesis of the post-traumatic period and offer new therapeutic tools for their correction.

Conclusion. Morphometric analysis of parenchymal-stromal relations of the liver after a single exposure to an air shock wave showed a significant decrease in the area of hepatocytes by 8% and a significant increase in the area of connective tissue by almost 2.4 times on the 30th day of the post-traumatic period in comparison with the control group of animals. Evaluation of the level of expression of the transcription factor HIF1A in the liver at the stages of the post-traumatic period showed that moderate expression was characteristic of the subcapsular area of the liver in the early post-traumatic period. On the 30th day of the post-traumatic period, the accumulation of the HIF1A marker in the liver of the experimental group of animals was not statistically significant compared to the control group.

Keywords: rat liver, injury, air shock wave, HIF1A, morphometric analysis.

ORCID and contributionship:

Sergii V. Kozlov : 0000-0002-7619-4302 ^F

Maksym A. Korzachenko : 0000-0001-6797-8845 ^{A,B,C,D,E}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Sergii V. Kozlov

Dnipro State Medical University,

Department of Pathology Anatomy, Forensic Medicine and Pathology Physiology

9, Vernadsky Str., Dnipro 49044, Ukraine

phone: +380974220636, e-mail: tanatholog@i.ua

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Received 23.11.2022

Accepted 14.01.2023

Recommended for publication by a meeting of the editorial board after review