

Ю. М. Степанов, Ю. А. Гайдар

Державна установа "Інститут гастроентерології НАМН України", 49074 Дніпропетровськ

ГІСТОПАТОЛОГІЯ СТЕАТОЗУ/СТЕАТОГЕПАТИТУ ПРИ ХРОНІЧНИХ ДИФУЗНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ПЕЧІНКИ

(Представлено акад. НАМН України Г. В. Дзяком)

Гістологічним та імуногістохімічним аналізом біопатів 83 хворих на хронічні дифузні захворювання печінки було встановлено, що розвиток стеатозу/стеатогепатиту спостерігається у 41,7 % хворих хронічним гепатитом С, у 40,0 % — хронічним гепатитом В, у 16,7 % — хронічним аутоімунним гепатитом та у 57,4 % хворих жовчокам'яною хворобою. Відмінною особливістю для перших двох груп була комбінація дрібнокрапельної жирової дистрофії з лімфо-плазмоцитарним запаленням та точковими некрозами, для третьої групи — відсутність стеатозу, а для четвертої — крупнокрапельна дрібно-вогнищева форма жирової дистрофії при відсутності запалення. Також було показано, що основним шляхом загибелі гепатоцитів при хронічних гепатитах С та В і при хронічному аутоімунному гепатиті є некроз, а для жовчокам'яної хвороби — розвиток апоптозу за участю як каспазного, так і ендонуклеаза-G позитивного шляхів ініціації.

Ключові слова: хронічні дифузні захворювання печінки, стеатоз, жовчокам'яна хвороба, хронічний гепатит С, хронічний гепатит В, хронічний аутоімунний гепатит.

До хронічних дифузійних захворювань печінки (ХДЗП) належить ряд хронічних гепатитів та цирозів різної етіології (вірусної, алкогольної, токсичної, аутоімунної природи, неалкогольна жирова хвороба печінки тощо). Інтерес гастроентерологів усього світу до цієї групи захворювань зумовлений зростаючим поширенням (особливо серед працездатного населення), часто важким перебігом, схильністю до прогресування, несприятливими близькими та віддаленими наслідками.

Жирова дистрофія, або стеатоз, що часто супроводжує фіброзування печінки при ХДЗП, може бути проявом як загального метаболічного синдрому, так і наслідком виключно інтрапечінкових порушень.

Метаболічний синдром належить до чинників ризику, що істотно підвищують схильність до розвитку атеросклерозу, діабету 2 типу і хронічних за-

хворювань нирок. До основних факторів розвитку метаболічного синдрому відносять абдомінальне ожиріння, атерогенну дисліпідемію, артеріальну гіпертензію, підвищення в плазмі крові концентрації глюкози, протромбічних й прозапальних факторів.

На даний час, згідно з критеріями Американської асоціації хвороб серця (АНА) і Національного інституту серця, легенів і крові (NHLBI), метаболічний синдром визначається за наявністю трьох або більше з таких критеріїв: абдомінальне ожиріння (окружність талії >102 см у чоловіків, та >88 см у жінок), підвищення рівня тригліцеридів (>150 мг/100 мл), зниження рівня ліпопротеїнів високої густини (<40 мг/100 мл у чоловіків, <50 мг/100 мл у жінок), гіпертензія (систоличний артеріальний тиск >130 мм рт. ст. або діастолічний артеріальний тиск >85 мм рт. ст.) і порушення концентрації глюкози у крові натще [7].

Ю. М. Степанов — директор інституту, д.м.н., професор

Ю. А. Гайдар — зав. лабораторією патоморфології, д.м.н. (yuriigaidar@mail.ru)

© Ю. М. Степанов, Ю. А. Гайдар, 2015.

Ще в 2006 році S. G. Hubscher у своєму огляді сформулював таку етіологічну класифікацію стеатозу печінки [2]:

- вроджений стеатоз внаслідок порушень метаболізму (хвороба Вільсона — Коновалова, абеталіпопротеїнемія, тирозинемія, гіпобеталіпопротеїнемія, ліподистрофія),
- алкогольний стеатоз,
- неалкогольний стеатоз
 - первинний (інсулінорезистентність, метаболічний синдром, ожиріність, діабет, гіперліпідемія),
 - вторинний (інші випадки), лікарські засоби (аміодарон, глюкокортикоїди, та ін.), хірургічні втручання (єюнолеальний анастомоз, біліопанкреатичне шунтування, обширна резекція тонкої кишки, гастропластика при морбідному ожирінні),
- вірусний стеатоз.

У розвитку стеатозу при ХДЗП безпосередньо в печінці беруть участь 4 основних механізми: підвищення доступності ліпогенних субстратів, збільшення частки ліпогенеза *de novo*, зниження швидкості окислення жирів і зменшення експорту жирів з гепатоцитів у кров [5].

Інсулінорезистентність, яка є характерною рисою ХДЗП [1], представляє собою біологічну основу, що забезпечує гепатоцити надлишком ліпогенних субстратів (таких, як глюкоза і жирні кислоти) та внаслідок гіперінсулінемії. Прискорений ліпогенез *de novo* відбувається, зокрема при вірусних гепатитах, в результаті порушення ланцюга РНК, який кодує первісний синтез і поглинання жирних кислот. У поєднанні з порушенням циклу холестеринсинтаз це викликає парадоксальний стан, при якому сам процес утворення холестерину активно каталізується, проте утворення кінцевого продукту не відбувається внаслідок витоку проміжного елемента — геранілпірофосфата, що є компонентом життєвого циклу вірусу гепатита С [3]. Зниження швидкості окислення жирних субстратів показано в дослідженні М. Окуда та співавт. [4]. На різних моделях експериментального гепатиту доведено, що швидкість окислення жирних субстратів знижується у щурів 3 різних гібридних ліній, а концентрація продуктів перекисного окислення ліпідів підвищується у двох із трьох систем *in vitro*. Порушення метаболізму і підвищення транспорту жирів у пацієнтів із ХДЗП проявляється у швидкості зміни загальної концентрації кетонових тіл натще — це корелює з розвитком інсулінорезистентності, що підтверджується при прямому дослідженні розподілу аполіпопротеїну V100 в печінці [9].

Доведено, що стеатоз має вплив на прискорення фіброгенезу, та є визнаним фактором ризику

передчасного атерогенезу через прямі і непрямі механізми впливу. Метою роботи було вивчити патоморфологічні особливості розвитку стеатозу при ХДЗП.

Обстежувані та методи. Обстежено 83 хворих на ХДЗП обох статей, які проходили лікування у відділенні захворювань печінки та підшлункової залози ДУ “Інститут гастроентерології НАМН України”. Із них 47 пацієнтів із жовчо-кам’яною хворобою (ЖКХ), 25 з хронічним гепатитом С, 5 з хронічним гепатитом В та 6 з хронічним аутоімунним гепатитом. Усім пацієнтам для підтвердження діагнозу виконувалось УЗД органів черевної порожнини, стандартні біохімічні, серологічні та вірусологічні дослідження.

У кожного пацієнта методом чрезшкірної пункційної трепан-біопсії печінки взято 3 зразки тканини із VII сегмента правої долі. Процедуру виконували під безперервним УЗ-контролем, під місцевою анестезією напівавтоматичною голкою *Colt Shot 16G*.

Для гістологічних досліджень біоптати фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і заливали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 3-5 мкм фарбували гематоксиліном і еозином та по Маллорі в модифікації Слінченко.

Ступінь активності гепатиту і стадію вираженості фіброзу оцінювали за шкалою *METAVIR*, стеатозу — за класифікацією, запропонованою R. J. Ploeg та співавт. [8], в якій легким вважався процес, що залучає менше 30 % всіх гепатоцитів, помірним — від 30 до 60 %, та тяжким — понад 60 % гепатоцитів.

Комп’ютерна морфометрія використовувалася як додатковий метод об’єктивізації морфологічного дослідження. Для цілей комп’ютерної морфометрії біоптати фотографували і здійснювали вимірювання за допомогою програми *ImageJ 1.45S* (розроблена в *National Institutes of Health*, США). Комп’ютерний індекс фіброзу розраховувався, як відношення площі колагену до загальної площі біоптата.

При багатокольорових імунофлюоресцентних дослідженнях використовували зрізи тканини печінки завтовшки 3 мкм на адгезивних (*Superfrost Plus*) предметних скельцях. Після депарафінування, демаскування антигенів та промивання у трис-буфері (рН 7,4) на кожний із зрізів наносили суміш первинних антитіл проти киспази-3, ендонуклеази-G та колагену. Інкубацію первинних антитіл проводили протягом 14 год у вологій камері при температурі 4 °С. Після трикратного промивання у трис-буфері на кожний зріз наносили суміш з анти-

мишачих та анти-кролячих антитіл (*Invitrogen*) у розведенні 1:50, що мічені флуоресцентною міткою *AlexaFluor 568* (червоний) і *AlexaFluor 488* (зелений), відповідно, а також *DAPI* (*Sigma*), що дає синє свічення і використовується для контрастування ядер у розведенні 1:400. Для виявлення клітин у стані апоптозу також використовували забарвлення за допомогою готового набору *TUNEL* (*Roche, Mannheim*, Німеччина). Інкубацію проводили протягом 30 хв у темному місці у вологій камері при температурі 24 °С. Зрізи промивали трис-буфером, підсушували, покривали середовищем *Fluormount* (*Electron Microscopy Sciences*, США) і покривним скельцем.

Аналіз при флуоресцентних дослідженнях проводили за допомогою мікроскопа *Olympus IX-81*, що обладнаний трьома флуоресцентними фільтрами та 10-мегапіксельною фотокамерою. Кожне з полів зору фотографували тричі при зміні кожного з флуоресцентних фільтрів. Накладання зображень і отримання фотографій з візуалізацією одночасно трьох міток проводили за допомогою програми "*Axio Vision Imagine Program (version 4.7.1)*". Цей фрагмент було виконано у *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences (Little Rock, Arkansas, США)*.

Матеріал для виготовлення напівтонких зрізів фіксували у 1,25 % розчині глютарового альдегіду протягом години, відмивали у фосфатному буфері Міллоніга (рН 7,2-7,4), після чого зневоднювали в спиртах висхідної концентрації та ацетоні. У подальшому матеріал заливали епон-аралдитною сумішшю для полімеризації при 60 °С. Гістологічні зрізи товщиною 1 мкм отримували за допомогою ультратома УМТП-7 з використанням скляних ножів та фарбували толуїдиновим синім. Дослідження напівтонких зрізів доповнювали інформаційну картину, отриману при вивченні парафінових зрізів.

Для статистичного аналізу числового матеріалу використовували дескриптивну статистику та кореляційний аналіз за Пірсоном (для даних, що виражені в інтервальній шкалі) та за Спірменом (для даних, що виражені не в інтервальних шкалах). Достовірність відмінностей між групами аналізували за допомогою тесту Вілкоксона — Манна — Уїтні та критерію χ^2 .

Результати та їх обговорення. Основним методом оцінки структурних змін печінки при ХДЗП є морфологічне дослідження біоптатів, що дозволяє характеризувати стан гепатоцитів і портальних трактів та ступінь проявів фіброзного й запального процесів.

При морфологічному дослідженні біоптатів печінки хворих на хронічний гепатит С білкова дистрофія різного ступеня вираженості, хоч і не була достовірним критерієм оцінки ступеня активності гепатиту, спостерігалася в більшості випадків (83,3 %) та втягувала від декількох клітин до обширних зливних полів. Прогресування процесу до розвитку балонної дистрофії відзначалося у 25,0 % хворих. Жирова дистрофія спостерігалася в 41,7 % випадків та найчастіше представляла собою осередки дрібнокрапельного стеатозу, що були розташовані всередині часточок і не зачіпали прикордонну пластинку. В 12,0 % випадків дрібнокрапельну дистрофію в третій зоні ацинуса доповнював також фокальний крупнокрапельний стеатоз (рис. 1). Дослідження напівтонких зрізів дозволило також відзначити неоднорідність складу ліпідних крапель, яка була найбільш помітною саме при крупнокрапельному стеатозі.

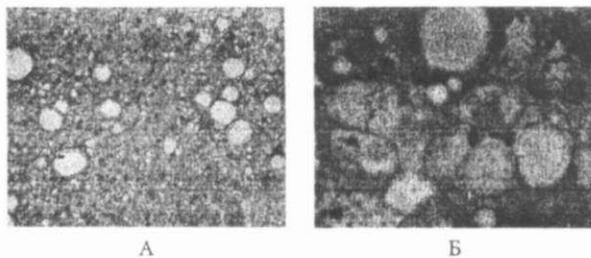


Рис 1. Розвиток структурних змін печінки при ХДЗП. А — ліпідні краплі різного розміру в цитоплазмі гепатоцитів ($\times 200$), Б — багатокомпонентний склад ліпідів в ліпідних краплях, що виявляється тільки на напівтонких зрізах (толуїдиновий синій, $\times 1000$).

В усіх хворих вищезгадані зміни розвивалися на фоні лімфо-плазмоцитарної інфільтрації портальних трактів різного ступеня вираженості, яка у 32,0 % хворих супроводжувалася інтралобулярною лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією. Наявність перипортальних або інтралобулярних фокальних некрозів спостерігалася також у 32,0 % випадків.

Фіброз печінки, що розвивався у хворих на гепатит С, варіював від незначного перипортального (32,0 %) до цирозу печінки (20,0 %). При цьому не було виявлено його достовірної залежності від наявності жирової дистрофії гепатоцитів або від активності гепатиту.

Усі випадки вірусного гепатиту В характеризувалися наявністю цитоплазматичної форми холестази на фоні незначної лімфо-плазмоцитарної інфільтрації. Наявність в 40,0 % біоптатів дрібнокрапельної розсіяної жирової дистрофії дозволила віднести ці випадки до тих, що мають ознаки стеатогепатиту, але значно менш вираженого, ніж

у попередній групі. Фібрування печінки в цих випадках також було менше вираженим, але невелика кількість вибірки не дозволила підтвердити статистичну достовірність розбіжностей.

Гістологічне дослідження біоптатів печінки хворих із ЖКХ показало, що в 31,9 % випадків ознак стеатозу/стеатогепатиту виявлено не було. В інших випадках спостерігалася дрібно- та середньокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів перивенулярної зони, яку лише у 10,6 % супроводжувала легка лімфо-плазмодитарна інфільтрація (рис. 2А).

Також, в цій зоні досить часто визначалося відкладення жовчного пігменту жовто-коричневого кольору по всій цитоплазмі гепатоцитів. Типовим був помірний перипортальний і перигепаточелюлярний фіброз та початкові ознаки капіляризації синусоїдів без помітного розширення портальних трактів (рис. 2Б). Слід зазначити, що утворення щільних фіброзних септ не було характерним для цієї групи, а цироз не визначався в жодному випадку.

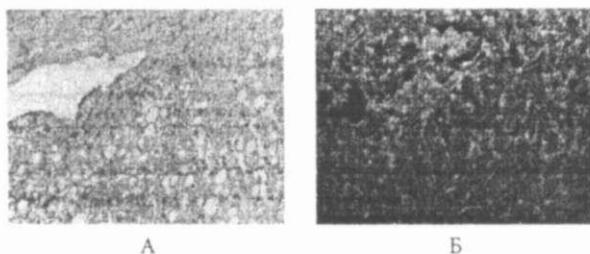


Рис. 2. Розвиток структурних змін печінки при ЖКХ. А — середньо- та крупнокрапельна розсіяна жирова дистрофія гепатоцитів навколо портального тракту (гематоксилін-еозин, $\times 100$), Б — незначне відкладення колагену та капіляризація синусоїдів (конфокальна комп'ютерна люмінесцентна мікроскопія, $\times 200$).

Особливістю цієї форми гепатитів було виникнення в перивенулярній зоні на фоні стеатозу рідких апоптотично-змінених гепатоцитів та апоптотичних тілець (рис. 3). Апоптоз гепатоцитів спостерігався також і в ділянці прикордонної пластинки портальних трактів, що в подальшому знайшло підтвердження при імуногістохімічному дослідженні методом TUNEL.

Відзначалося потовщення стінки центральної вени з підвищеним відкладенням колагену та поширення колагенових волокон у зоні, що оточує центральну вену, й далі, до перисинусоїдального простору.

При дослідженні розподілу проапоптотичних нуклеаз за допомогою конфокальної комп'ютерної люмінесцентної мікроскопії було встановлено, що в ядрах апоптотичних клітин зустрічається як каспаза-3 (рис. 4А), так і ендонуклеаза-*G* (рис. 4Б). Отже, в апоптозі гепатоцитів активну участь бе-

руть різні проапоптотичні ферменти, які забезпечують реалізацію як каспазного, так і некаспазного механізмів.

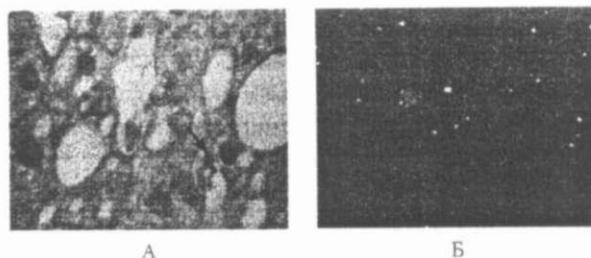


Рис. 3. Шляхи загибелі клітин при ЖКХ. А — апоптотичні тіลця поряд із жировою дистрофією гепатоцитів (стрілка, гематоксилін-еозин, $\times 400$), Б — клітини в стані апоптозу, розсіяні по всій площі біоптату (конфокальна комп'ютерна люмінесцентна мікроскопія, $\times 200$).

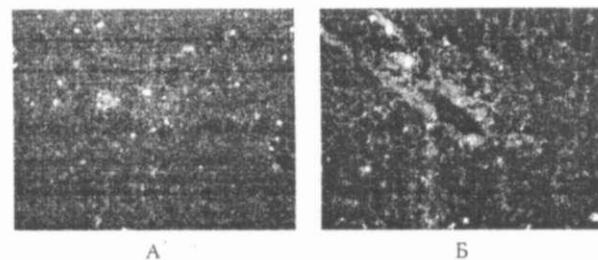


Рис. 4. Шляхи ініціації апоптозу гепатоцитів. А — клітини в стані апоптозу, які експресують каспазу-3 (конфокальна комп'ютерна люмінесцентна мікроскопія, $\times 100$), Б — клітини в стані апоптозу, які експресують ендонуклеаза-*G* (конфокальна комп'ютерна люмінесцентна мікроскопія, $\times 200$).

Система факторів, що беруть участь у прогресуванні стеатоза печінки до стеатогепатиту і фіброзу, є складною і ще не до кінця вивченою. Окислювальний стрес, який активує перекисне окислення ліпідів, що накопичені в гепатоцитах, безперечно відіграє ключову роль в цьому та тісно пов'язаний із розвитком мітохондріальної дисфункції. Неминучим наслідком зміни зовнішнього та внутрішнього середовища гепатоцитів є, зрештою, їх загибель шляхом некрозу або апоптозу. В нашому дослідженні при розвитку хронічного гепатиту С спостерігався досить високий відсоток жирової дистрофії (41,7 %), яка в усіх випадках супроводжувалася накопиченням клітин запалення, що свідчить про розвиток стеатогепатиту. При цьому частота апоптотичних змін значно варіювала, а статистичний аналіз показав наявність слабого зворотного зв'язку між середньою кількістю клітин у стані апоптозу та стадією фіброзу ($r = -0,322$, $P < 0,05$). Це не суперечить даним, отриманим

іншими дослідниками на клітинній культурі *in vitro* [1]. Треба зазначити, що частіше за все в цій групі зустрічалися перипортальні та інтралобулярні фокальні некрози гепатоцитів.

В групі хронічного гепатиту *B* спостерігалися зміни, схожі на вищеописані, але інтенсивність їх була менш вираженою. Виключення становив лише холестаза (цитоплазматична форма), який був, навпаки, більш вираженим та спостерігався в усіх хворих.

Для аутоімунного гепатиту були характерні щільний рівномірний перипортальний інфільтрат з великою кількістю плазматичних клітин та незначна еозинофілія. Також важливою ознакою було точкове некрозне ушкодження поодиноких клітин портальних трактів, ділянки навколо центральної вени та прикордонної пластинки, що, за даними літератури, є патогномонічним саме для цього захворювання [6]. Легка локальна жирова дистрофія спостерігалася лише в 16,7 % випадків.

На відміну від цього при розвитку ЖКХ також досить часто (57,5 %) відзначається жирова дистрофія, але здебільшого без ознак запалення або некрозу (рис. 5). Це можна пояснити тим, що стеатоз при ЖКХ є лише одним із інтрапечінкових проявів загального метаболічного синдрому.

Загибель же клітин відбувається в першу чергу шляхом апоптозу, без залучення клітин запалення. У цьому випадку перехід стеатозу в стеатогепатит відбувається значно рідше, а сам перебіг захворювання може бути менш тяжким. Це дає змогу припустити, що прогресування фіброзу печінки також відбувається більш повільно у відсутності некрозоподібних змін і запалення, які є одним із факторів активації стелатних клітин печінки.

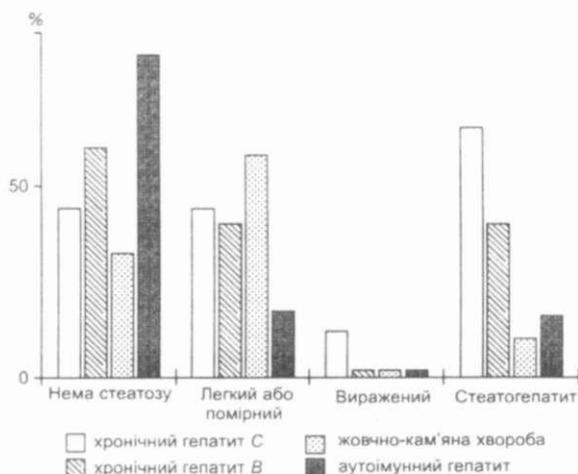


Рис. 5. Розподіл хворих з проявами стеатозу та стеатогепатиту в залежності від нозології ХДЗП.

В гепатоцитах методом *TUNEL* були виявлені клітини в стані апоптозу, наявність яких не залежала від присутності вакуолей, що містять ліпіди. Численні клітини, експресуючі прокаспазний апоптотичний фермент каспазу-3 та некаспазний проапоптотичний фермент ендонуклеазу-*G*, були присутні по всій площі біоптата.

Ці результати свідчать про те, що домінуючими шляхами загибелі клітин печінки, що супроводжує прогресування фіброзу та перехід стеатозу до стеатогепатиту, при хронічних вірусних гепатитах *C* або *B*, а також при аутоімунному гепатиті є некроз, тоді як для структурних змін печінки при жовчокам'яній хворобі більш типовим є розвиток апоптозу за каспазним та некаспазним шляхами.

Список використаної літератури

1. Cui W., Chen S. L., Hu K. Q. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells // *Am. J. Transl. Res.* — 2010. — 2, № 1. — P. 95-104.
2. Hubscher S. G. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease // *Histopathology.* — 2006. — 49, № 5. — P. 450-465.
3. Lambert J. E., Bain V. G., Ryan E. A. et al. Elevated lipogenesis and diminished cholesterol synthesis in patients with hepatitis C viral infection compared to healthy humans // *Hepatology.* — 2013. — 57, № 5. — P. 1697-1704.
4. Liquori G.E., Calamita G., Cascella D. et al. An innovative methodology for the automated morphometric and quantitative estimation of liver steatosis // *Histol. Histopathol.* — 2009. — 24, № 1. — P. 49-60.
5. Lonardo A., Adinolfi L. E., Loria P. Mechanisms of hepatitis C virus-induced fatty liver disease // *Hot Topics Viral Hep.* — 2009. — 5. — P. 23-28.
6. Makol A., Watt K. D., Chowdhary V. R. Autoimmune hepatitis: A review of current diagnosis and treatment // *Hepat. Res. Treat.* — 2011. — doi: 10.1155/2011/390916.
7. Paschos P., Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome // *Hippokratia.* — 2009. — 13, № 1. — P. 9-19.
8. Ploeg R. J., D'Alessandro A. M., Knechtle S. J. et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation: A multivariate analysis // *Transplantation.* — 1993. — 55, № 4. — P. 807-813.
9. Roe B., Kensicki E., Mohny R., Hall W. W. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes // *PLoS One.* — 2011. — 6. — doi: 10.1371/journal.pone.0023641.

Одержано 16.02.2015

ГИСТОПАТОЛОГИЯ СТЕАТОЗА/СТЕАТОГЕПАТИТА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ДИФФУЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Ю. М. Степанов, Ю. А. Гайдар

Государственное учреждение "Институт гастроэнтерологии НАМН Украины", 49074 Днепропетровск

Гистологическим и иммуногистохимическим анализом биоптатов 83 больных хроническими диффузными заболеваниями печени было установлено, что развитие стеатоза/стеатогепатита наблюдается у 41,7 % больных хроническим гепатитом С, у 40,0 % — хроническим гепатитом В, у 16,7% — хроническим аутоиммунным гепатитом и у 57,5 % больных желчнокаменной болезнью. Отличительной особенностью для первых двух групп была комбинация мелкокапельной жировой дистрофии с лимфо-плазмоцитарным воспалением и точечными некрозами, для третьей группы — отсутствие стеатоза, а для четвертой — крупнокапельная мелкоочаговая форма жировой дистрофии при отсутствии воспаления. Также было показано, что основным путем гибели гепатоцитов при хронических гепатитах С и В и при хроническом аутоиммунном гепатите является некроз, а при желчекаменной болезни — развитие апоптоза с участием как каспазного, так и эндонуклеаза-G положительного путей инициации.

HISTOPATHOLOGY OF STEATOSIS/STEATOHEPATITIS IN CHRONIC DIFFUSE LIVER DISEASES

Yu. M. Stepanov, Yu. A. Gaidar

State Institution "Institute of Gastroenterology NAMS Ukraine", 49074 Dnepropetrovsk

The results of histological and immunohistochemical analysis of biopsy specimens of 83 patients with chronic diffuse liver diseases (CDLD) revealed development of steatosis/steatohepatitis in 41.7 % of patients with chronic hepatitis C, in 40.0 % of patients with chronic hepatitis B, in 16.7 % of patients with chronic autoimmune hepatitis and in 57.5 % of patients with cholelithiasis. A distinctive feature of groups 1 and 2 was a combination of small drop steatosis with lymph plasmocytic inflammation and focal necrosis, for group 3 — absence of steatosis, while for group 4 — focal fatty degeneration in the absence of inflammation. A necrosis was shown to be the main route of death of hepatocytes in chronic hepatitis C or B and in chronic autoimmune hepatitis, whereas cholelithiasis was characterized by development of apoptosis involving both caspase and endonuclease G positive pathways of initiation.