

О. М. Гаврилюк

## Особенности дуктулярной реакции при алкогольном, неалкогольном стеатогепатите та вірусному гепатиті С за результатами імуногістохімічного дослідження

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**Ключові слова:** дуктулярна реакція, алкогольний стеатогепатит, неалкогольний стеатогепатит, вірусний гепатит С.

Вірусний гепатит С, алкогольний стеатогепатит і неалкогольний стеатогепатит належать до найпоширеніших захворювань печінки, які призводять до розвитку цирозу. З метою вивчення дуктулярної реакції з визначенням експресії імуногістохімічного маркера СК19 при алкогольному, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С проаналізували історії хвороби та матеріали автопсійного дослідження 45 розтинів померлих від цирозу печінки. Результати імуногістохімічного дослідження дуктулярної реакції (маркер СК19) при алкогольному, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С показали, що при вірусному гепатиті С дуктулярна реакція була більш вираженою і розміщувалась по периферії сполучнотканинних сегт. При алкогольному та неалкогольному стеатогепатиті новоутворені дуктули траплялись у меншій кількості і розміщувались дифузно. Зазначені відмінності свідчать про різну роль дуктулярної реакції у патогенезі захворювань, що досліджували.

### Особенности дуктулярной реакции при алкогольном, неалкогольном стеатогепатите и вирусном гепатите С по результатам иммуногистохимического исследования

Е. М. Гаврилюк

Вирусный гепатит С, алкогольный стеатогепатит и неалкогольный стеатогепатит принадлежат к наиболее распространенным заболеваниям печени, приводящим к развитию цирроза. С целью изучения дуктулярной реакции с определением экспрессии иммуногистохимического маркера СК19 при алкогольном, неалкогольном стеатогепатите и вирусном гепатите С проанализировали истории болезни и материалы аутопсийного исследования 45 вскрытий умерших с циррозом печени. Результаты иммуногистохимического исследования дуктулярной реакции (маркер СК19) при алкогольном, неалкогольном стеатогепатите и вирусном гепатите С показали, что при вирусном гепатите С дуктулярная реакция была более выраженной и размещалась по периферии соединительнотканых сегт. При алкогольном и неалкогольном стеатогепатите новообразованные дуктулы определялись в меньшем количестве и размещались диффузно. Названные отличия свидетельствуют о различной роли дуктулярной реакции в патогенезе исследуемых заболеваний.

**Ключевые слова:** дуктулярная реакция, алкогольный стеатогепатит, неалкогольный стеатогепатит, вирусный гепатит С.

**Патология.** – 2014. – №1 (30). – С. 41–44

### Ductular reaction in alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infection (immunohistochemical study)

О. М. Гаврилюк

**Aims.** To study ductular reaction associated with expression of immunohistochemical marker CK19 in alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infection.

**Methods and results.** In chronic steatohepatitis (alcoholic and nonalcoholic) diffuse spreading of the cells with “biliary phenotype” within the thickness of connective tissue septas is found, whereas in viral hepatitis C marginal localization between the parenchymal and connective tissue compartments is typical.

**Conclusion.** Quantitative and qualitative differences in morphologic signs of ductular reaction revealed in our examination confirm the variable role of new-formed ductules in the pathogenesis of different forms of chronic hepatitis.

**Key words:** ductular reaction, alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic fatty liver disease, hepatitis C.

**Pathologia.** 2014; №1 (30): 41–44

Вірусний гепатит С (ВГС), алкогольний стеатогепатит (АСГ) і неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) належать до найпоширеніших захворювань печінки, які призводять до розвитку цирозу [1–3]. Незважаючи на значну кількість робіт, що присвячені цим хворобам, залишається багато невіршених питань, зокрема щодо механізмів і проявів регенерації, котрі мають важливе значення при тканинній реорганізації [4].

Хронічне пошкодження призводить до активації механізмів фіброзу та репаративної регенерації, співвідношення між якими зумовлює подальший перебіг захворювань. Численні дослідження процесів регенерації у печінці виявили кілька джерел поповнення популяцій

паренхіматозних клітин: зрілі гепатоцити, які реагують першими, та резервні клітини-попередники, котрі активуються при значному пошкодженні або якщо гепатоцити не можуть проліферувати [5]. До морфологічних проявів цих процесів належать так звані «регенераторні вузли» й «дуктулярна реакція».

Оцінка морфологічних проявів репаративної регенерації є складною через необхідність використання великої панелі специфічних імуногістохімічних маркерів [4,6]. Дуктулярну реакцію, що показує один із напрямів цього процесу, можна досліджувати при застосуванні маркерів СК19 або СК7, але вивчають її переважно при холангіопатіях [7,8].

**Мета роботи**

Дослідження дуктулярної реакції з визначенням експресії імуногістохімічного маркера СК19 при алкогольному, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С.

**Матеріали і методи дослідження**

Проаналізували історії хвороби та матеріали автопсійного дослідження 45 розтинів померлих від цирозу печінки, що здійснені протягом 2008–2010 рр. у ЛОПАБ. На основі вивчення основних факторів ризику розвитку захворювань випадки поділили на три патогенетичні групи: алкогольний стеатогепатит, неалкогольний стеатогепатит і вірусний гепатит С. Підтвердження діагнозу алкогольного стеатогепатиту базувалось на даних анамнезу про тривале зловживання алкоголем (більше ніж 210 г на тиждень або 30 г на день) і морфологічних проявах алкогольної хвороби – кардіоміопатії, хронічному панкреатиті, алкогольній енцефалопатії та типових змінах у печінці. Вірусний генез вважали вірогідним, якщо були дані про позитивні маркери вірусного гепатиту С (RNA HCV) і морфологічні ознаки вірусного ураження (критерії METAVIR) [9]. Верифікація діагнозу неалкогольного стеатогепатиту включала виявлення проявів метаболічного синдрому та морфологічних змін печінки (критерії Brunt, 2010) [10].

Взяті на секції шматочки тканини печінки фіксували у 10% розчині формаліну та фарбували гематоксилін-еозином для рутинного патогістологічного опису. Гістологічні зрізи вивчали під світлооптичним мікроскопом «БИОЛАМ И» (ЛОМО, Росія), мікрофотографували на мікроскопі Leica DM 750/4 (Німеччина) з цифровою камерою LeicaDFC 420 (Німеччина) та програмним забезпеченням Leica Application Suit (Version 3.8).

Для імуногістохімічного дослідження клітини з «біліарним фенотипом» маркували, застосовуючи моноклональні антитіла Моа-Ну Cytokeratin 19, Clone RCK108 («DakoCytomation», Данія) з наступним використанням системи візуалізації EnVision (DakoCytomation). Експресії маркера оцінювали відповідно до рекомендацій інших дослідників [11]. Результат вважали позитивним, якщо більше ніж 20% клітин виявляли специфічне забарвлення.

Виразеність експресії СК19 визначали за допомогою морфометричного аналізу з обчисленням відносної площі СК19-позитивних клітин із біліарним фенотипом, забарвлених коричневим кольором. Для цього в кожному випадку дослідили 20 фотографій тканини печінки на малому збільшенні ( $\times 100$ ) для оцінювання загальної відносної площі, яку займають СК19+ клітини. Великі судини та жовчні протоки виключали з дослідження. Зображення аналізували за допомогою програми Image-ProPlus (Version 6.).

Статистично результати опрацьовували за допомогою пакета програм «STATISTICA FOR WINDOWS 6.0» (Statsoft, USA). Обчислювали середнє значення (M), стандартне квадратичне відхилення (s). Перед вибором методу порівняння параметричних показників

між групами перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро-Вілка. Для оцінювання відмінностей параметричних характеристик використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з використанням апостеріорного попарного порівняння груп із допомогою критерію найменшої значущої різниці (LSD test). Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез у досліджах приймали таким, що дорівнює 0,05.

**Результати та їх обговорення**

Порівняльна характеристика основних клінічних параметрів у трьох групах автопсійних випадків, що досліджували, наведена у таблиці 1.

Таблиця 1

**Клінічні та біохімічні дані про пацієнтів**

Параметр	Алкогольний стеатогепатит, (n=15)	Неалкогольний стеатогепатит, (n=15)	Вірусний гепатит С, (n=15)
Стать (Ч/Ж)	11/4	5/10	11/4
Вік		52–71 (60,6)	22–60 (43,6)
Загальний білірубін крові (мМ/л)	41,6–324,5 (138,7)	11,9–270,3 (125,9)	37,8–419,4 (141,7)
Аланинаміно-трансфераза (мМ/л)	0,3–24,2 (7,11)	0,43–22,5 (8,08)	0,2–20,3 (4,8)
Протромбінний індекс (%)	32–71 (51,2)	47–93 (72,4)	42–77 (59,3)
Ступінь фіброзу (METAVIR) (F2,3 – n)	F2 – 5 F3 – 10	F2 – 12 F3 – 3	F2 – 4 F3 – 11

*Примітки:* дані наведено у вигляді: максимальне та мінімальне значення (середнє арифметичне); Ч – чоловіки, Ж – жінки.

Морфометричний аналіз змін, що виявили протягом імуногістохімічного дослідження тканини печінки, показав: відносна площа, котру займають СК19+ клітини, була найбільшою у групі ВГС (табл. 2).

Таблиця 2

**Експресія маркера СК19 при алкогольному стеатогепатиті, неалкогольному стеатогепатиті, вірусному гепатиті С, (M $\pm$ s)**

	АСГ	НАСГ	ВГС	P
СК19 (% площа)	1,17 $\pm$ 0,25	1,99 $\pm$ 0,4	10,17 $\pm$ 0,23	P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-3</sub> <0,05 P <sub>2-3</sub> <0,05
Локалізація	Дифузна	Дифузна	Погранична	

*Примітки:* АСГ – алкогольний стеатогепатит, НАСГ – неалкогольний стеатогепатит, ВГС – вірусний гепатит С.

Відмінність від показника у групах НАСГ та АСГ була статистично значущою –  $p < 0,05$ . Різниця значень відносної площі, яку займали СК19+ клітини, у групах алкогольного та неалкогольного стеатогепатитів була незначущою –  $p > 0,05$ . Оцінювання переважної локалізації клітин із «біліарним фенотипом» відносно до паренхіматозного та стромального компартменту виявила, що при ВГС СК19+ клітини розміщувались на межі між септою та пограничною пластинкою гепатоцитів. При патогістологічному дослідженні популяція клітин із білі-

арним фенотипом була гетерогенною, частина дуктул не містила просвіту. При НАГ та АСГ спостерігали дифузне розміщення клітин із «біліарним фенотипом» у товщі сполучнотканинних септ. Більшість дуктул складались з однотипних кубічних клітин і містили просвіт.

Термін «дуктулярна реакція», котрий у 1957 р. запропонували Popper et al. [12], показує переважно фенотип клітинних елементів, а не їхнє походження. При патогістологічному дослідженні реактивні дуктули виявляються у вигляді анастомозуючих тяжів, що складаються із незрілих біліарних клітин, розміщених у товщі сполучнотканинних септ або на межі строми і паренхіми. Дані електронномікроскопічного та імуногістохімічного дослідження свідчать про незрілість і гетерогенність клітинної популяції новоутворених дуктул, що зумовлено різними механізмами дуктулярної реакції. Нині описано кілька варіантів патогенезу: проліферація передіснуючих дуктул, біліарної метаплазії гепатоцитів, диференціювання циркулюючих стовбурових клітин (імовірно, з кісткового мозку) або незрілих попередників, локалізованих у печінці [6]. Так, при гострому позапечінковому холестазі гіперплазія передіснуючих протоків призводить до формування дуктул зі сформованим просвітом і відносно однорідними кубічними епітеліальними клітинами. При хронічній обструкції жовчних протоків у результаті токсичного впливу жовчних кислот розвивається пристосувальна реакція у вигляді біліарної метаплазії гепатоцитів [7]. Один із можливих механізмів – диференціювання клітин новоутворених дуктул зі стовбурових клітин кісткового мозку [8] або з частково комітованих внутрішньопечінкових клітин-попередників, які розміщуються у каналах Герінга і термінальних дуктулах [9]. Такі клітини експресують маркери гепатоцитів і біліарного епітелію; за сучасною номенклатурою їх називають проміжними

гепато-біліарними клітинами [5]. Після активації вони проліферують і диференціюються у напрямку гепатоцитів та/або біліарних епітеліоцитів. Дуктулярну реакцію, що спостерігають при цьому, можна трактувати як прояв механізмів регенерації при хронічному ушкодженні.

Порівняння морфологічних проявів дуктулярної реакції при захворюваннях, котрі досліджували, показало кількісні та якісні відмінності щодо рівня експресії СК19 та локалізації змін. Виражена дуктулярна реакція на межі між паренхімою та стромою при гепатиті С показує процеси репаративної регенерації на місці «пограничного запалення», характерного для цього захворювання, які, ймовірно, є наслідком проліферації і диференціювання внутрішньопечінкових клітин-попередників. При хронічному стеатогепатиті (алкогольному та неалкогольному) новоутворені дуктули менш численні і розміщуються дифузно у товщі септ, що можна пояснити компенсаторно-приспосувальним механізмом – гіперплазією передіснуючих дуктул.

#### Висновки

1. При вірусному гепатиті С відзначають виражену дуктулярну реакцію на межі паренхіматозних і стромальних елементів (відносна площа СК19+клітин – 10,17±0,23%).

2. При алкогольному та неалкогольному стеатогепатиті виявили помірну кількість новоутворених дуктул (відносна площа СК19+клітин – 1,17±0,25% та 1,99±0,4% відповідно), що дифузно розміщені у товщі сполучнотканинних септ.

**Перспективи подальших досліджень.** Виявлені особливості дуктулярної реакції свідчать про різну роль новоутворених дуктул у патогенезі хронічного стеатогепатиту та вірусному гепатиті С, що потребує подальшого дослідження.

#### Список літератури

- Schuppan D. Liver cirrhosis / D. Schuppan, N.H. Afdhal // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371. – № 8. – P. 838–851.
- Williams R. Global challenges in liver disease / R. Williams // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 521–526.
- Характеристика и тенденции развития эпидемического процесса гепатита С в Украине / [А.Л. Гураль, В.Ф. Мариевский, Т.А. Сергеева та ін.] // *Профілактична медицина*. – 2011. – № 1. – С. 9–17.
- New concepts in liver regeneration / [R.J. Riehle, Y.Y. Dan, J.S. Campbell, N. Fausto] // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2011. – Vol. 26. – S.1. – P. 203–212.
- Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers / [T.A. Roskams, N.D. Theise, C. Balabaud et al.] // *Hepatology*. – 2004. – Vol. 39. – P. 1739–1745.
- The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration // [L. Zhang, N. Theise, M. Chua et al.]. – 2008. – Vol. 48. – № 5. – P. 1598–1607.
- Priester S. Involvement of cholangiocyte proliferation in biliary fibrosis / S. Priester, C. Wise, S.S. Glaser // *World J. Gastroenterol. Pathophysiol.* – 2010. – Vol. 1. – № 2. – P. 30–37.
- Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis / [S.S. Glaser, E. Gaudio, T. Miller et al.] // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 30. – P. 421–435.
- Bedossa P. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group / P. Bedossa, T. Poynard // *Hepatology*. – 1996. – № 24. – P. 289–293.
- Brunt E.M. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease / E.M. Brunt, D.G. Tiniakos // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 16. – Issue 42. – P. 5286–5296.
- Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic application*. – 3<sup>rd</sup> ed. / D. Dabbs. – N.Y. : Saunders Elsevier, 2010. – P. 1452.
- Popper H. Ductular reaction in the liver in hepatic injury / H. Popper, G. Kent, R. Stein // *J Mt Sinai Hosp.* – 1957. – Vol. 24. – P. 551–556.

#### References

- Schuppan, D. & Afdhal, N. H (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*, 371(8), 838–851. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9.
- Williams, R. (2006) Global challenges in liver disease. *Hepatology*, (44), 521–526. DOI: 10.1002/hep.21347.

3. Gural, A. L., Marievskij, V. F., Sergeeva, T. A. (2011). Charakteristika i tendencii razvitiya e`pidemicheskogo processa gepatita C v Ukraine [Characteristic and tendentions in the development of hepatitis C epidemic processes in Ukraine]. *Profilaktychna medytsyna*, (1), 9–17.
  4. Riehle, R. J., Dan, Y. Y., Campbell, J. S. & Fausto, N. (2011). New concepts in liver regeneration. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(1), 203–212.
  5. Roskams, T. A., Theise, N. D. & Balabaud, C (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, (39), 1739–1745. DOI: 10.1002/hep.20130.
  6. Zhang, L., Theise, N., Chua, M. & Reid, L.M. (2008). The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology*, 48(5), 1598–1607.
  7. Priester, S., Wise, C. & Glaser, S. S. (2010). Involvement of cholangiocyte proliferation in biliary fibrosis. *World J.Gastroenterol. Pathophysiol.*, 1(2), 30–37. doi: 10.4291/wjgp.v1.i2.30.
  8. Glaser, S. S., Gaudio, E. & Miller, T. (2009). Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev.Mol. Med.*, (30), 421–435.
  9. Bedossa, P. & Poynard, T. (1996). An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, (24), 289–293.
  10. Brunt, E. M. & Tiniakos, D. G. (2010). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 16(42), 5286–5296. doi: 10.3748/wjg.v16.i42.5286.
  11. Dabbs, D. (2010). *Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic application*. New-York: Saunders Elsevier.
  12. Popper, H., Kent, G. & Stein, R. (1957). Ductular reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp*, (24), 551–556.
- 

**Відомості про автора:**

Гаврилюк О.М., к. мед. н., доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, E-mail: elenalvua@yahoo.com.

---

Надійшла в редакцію 26.12.2013 р.