

В. А. Туманский, С. В. Фень

Особенности депонирования разновалентного железа (Fe²⁺ и Fe³⁺) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: жировая дистрофия печени, алкогольный стеатогепатит, неалкогольный стеатогепатит, двухвалентное (Fe²⁺) железо, трёхвалентное (Fe³⁺) железо, гепатоциты, макрофаги Купфера.

Описаны морфологические особенности депонирования разновалентных соединений железа (Fe²⁺, Fe³⁺) в ацинусах печени в трепанобиоптатах и секционном материале 35 больных, страдавших алкогольным стеатогепатитом (АСГ) разной (S1, S2, S3) степени, и в трепанобиоптатах печени 15 больных, страдавших умеренным S2 неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ). Гистохимическими методами изучены особенности накопления двухвалентного (Fe²⁺) и трёхвалентного (Fe³⁺) железа в ацинарных зонах печени. Установлено, что при АСГ депонирование Fe³⁺ в макрофагах и гепатоцитах печени преобладает над накоплением Fe²⁺, а внеклеточная локализация Fe³⁺ определяется преимущественно в зонах стеатонекроза печени. Интенсивность депонирования в печени Fe³⁺ и Fe²⁺ возрастает от G2 до G4 степени по мере увеличения тяжести АСГ от S1 до S3. У больных НАСГ умеренной степени в макрофагах и гепатоцитах печени определяется накопление Fe³⁺ и Fe²⁺ лёгкой G2 степени. Предполагается, что депонирование в клетках и внеклеточном матриксе печени Fe³⁺ и Fe²⁺ наиболее вероятно способствует прогрессированию АСГ.

Особливості депонування різновалентного заліза (Fe²⁺ та Fe³⁺) у печінці при алкогольному та неалкогольному стеатогепатиті

В. О. Туманський, С. В. Фень

Описані морфологічні особливості депонування різновалентних сполук заліза (Fe²⁺, Fe³⁺) в ацинусах печінки у трепанобиоптатах і секційному матеріалі 35 хворих на алкогольний стеатогепатит (АСГ) різного (S1, S2, S3) ступеня та в трепанобиоптатах печінки 15 хворих, які страждали на помірний S2 неалкогольний стеатогепатит (НАСГ). Гістохімічними методами вивчені особливості накоплення двовалентного (Fe²⁺) та тривалентного (Fe³⁺) заліза в ацинарних зонах печінки. Встановили, що при АСГ депонування Fe³⁺ у макрофагах і гепатоцитах печінки переважує над накопленням Fe²⁺, а позаклітинна локалізація Fe³⁺ виявляється переважно в зонах стеатонекрозу печінки. Інтенсивність депонування в печінці Fe³⁺ і Fe²⁺ зростає від G2 до G4 ступеня зі збільшенням від S1 до S3 тяжкості АСГ. У хворих на НАСГ помірного ступеня в макрофагах і гепатоцитах печінки виявляється накоплення Fe³⁺ і Fe²⁺ легкого G2 ступеня. Припускається, що депонування в клітинах і позаклітинному матриксі печінки Fe³⁺ та Fe²⁺ найбільш імовірно сприяє прогресуванню АСГ.

Ключові слова: жирова дистрофія печінки, алкогольний стеатогепатит, неалкогольний стеатогепатит, двовалентне (Fe²⁺) залізо, тривалентне (Fe³⁺) залізо, гепатоцити, макрофаги Купфера.

Патологія. – 2015. – №3 (35). – С. 41–48

Deposition features of heterovalent iron (Fe²⁺ and Fe³⁺) in the liver in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis

V. A. Tumanskiy, S. V. Fen'

Aim. The article describes morphological characteristics of the heterovalent iron compounds (ferric (Fe³⁺) iron, ferrous (Fe²⁺) iron) deposition in the acini of the liver.

Methods and results. Using histochemical methods, features of accumulation of ferrous (Fe²⁺) and ferric (Fe³⁺) iron in hepatic acinar zone were studied in the trephine biopsy and autopsy liver material of 35 patients suffering from alcoholic steatohepatitis (ASH) of different (S1, S2, S3) degree, and trephine liver biopsy of 15 patients suffering from moderate S2 non-alcoholic steatohepatitis (NASH). It was found that in the ASH Fe³⁺ deposition in liver macrophages and hepatocytes predominates over Fe²⁺ accumulation, and Fe³⁺ + extracellular localization is defined primarily in the areas of liver steatonecrosis. The intensity of Fe³⁺ + and Fe²⁺ + deposition in the liver increases from G2 to G4 degree with increasing of severity of ASH from S1 to S3. In patients with NASH of moderate degree, accumulation of Fe³⁺ + and Fe²⁺ + is determined in liver macrophages and hepatocytes in mild G2 degree.

Conclusions. It is assumed that the deposition of Fe³⁺ + and Fe²⁺ + in liver cells and extracellular matrix most likely contributes to the ASH development.

Key words: Fatty Liver, Alcoholic Steatohepatitis, Nonalcoholic Steatohepatitis, Ferrous (Fe²⁺) Iron, Ferric (Fe³⁺) Iron, Hepatocytes, Macrophages Kupffer.

Pathologia. 2015; №3 (35): 41–48

Железо, являющееся важнейшим эссенциальным микроэлементом, в свободном виде токсично, и основная его часть в организме человека находится в связанном состоянии в составе гемоглобина и миоглобина. Освобождающееся в процессе метаболизма железо захватывается тканевыми макрофагами и повторно включается в обменные процессы. В условиях нормального метаболизма около 25% железа организма

человека депонируется в печени, в которой оно содержится исключительно внутриклеточно в гепатоцитах и макрофагах Купфера [1,2,3]. В последние годы установлена важная роль в метаболизме железа гепсидина – 25-аминокислотного пептида, который синтезируется в печени [4] и является отрицательным гуморальным регулятором захвата железа в тонком кишечнике и его освобождения из макрофагов в тканях органов [5]. До-

казано, что избыток железа индуцирует синтез гепсидина гепатоцитами [6]. При нарушениях метаболизма избыток железа депонируется в печени, селезёнке, костном мозге и, усиливая образование свободных радикалов, ведёт к локальному повреждению тканей [7,8].

Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) нередко ассоциирован с нарушением гомеостаза железа и его накоплением в печени. У части больных на фоне инсулинорезистентности, алиментарных нарушений и жировой дистрофии гепатоцитов развивается синдром дисметаболической перегрузки железом (DIOS-syndrome), для которого характерен гемосидероз гепатоцитов, формирование в перисинусоидальных пространствах внеклеточных депозитов железа, а также повышение уровня ферритина в сыворотке крови [3,8,9]. Основная часть двухвалентного железа (Fe^{2+}) представлена в печени нетоксичным ферритином [10], при окислении которого образуется гемосидерин, содержащий трёхвалентное железо (Fe^{3+}). Гемосидерин, обладающий цитотоксичностью, депонируется в макрофагах Купфера, в гепатоцитах и в эпителии билиарных протоков [1,3].

Ранним гистологическим признаком НАСГ является жировая дистрофия гепатоцитов, начинающаяся, по мнению E. M. Brunt et al. [11], с портальной (3-й) зоны ацинусов печени, в которой повышен уровень кислорода и более активен метаболизм. Гепатоциты с жировой дистрофией содержат трёхвалентное (Fe^{3+}) железо, накоплению которого способствует интенсификация перекисления липидов, нарушение синтеза HFE-белка и мутация ДНК гепатоцитов в 6 хромосоме по аллелям HFE-C282Y и HFE-H63D [12,13,14]. Двухвалентное (Fe^{2+}) железо при НАСГ содержится в гепатоцитах и в макрофагах Купфера промежуточной (2-й) и центральной (1-й) зон ацинусов печени, в которых гепатоциты менее подвержены жировой дистрофии [11]. Доказано, что у больных хроническим стеатогепатитом разного генеза на ранних стадиях наблюдается депонирование железа в гепатоцитах, в меньшей степени – в макрофагах Купфера; в более поздних стадиях железо выявляется в макрофагах. Избыточное депонирование внутриклеточного железа считается важным модификатором прогрессирования стеатогепатита и является фактором риска развития фиброза и цирроза печени, а также гепатоцеллюлярной карциномы [7,10].

Одной из причин перекисления железа в гепатоцитах у больных алкогольным стеатогепатитом (АСГ) является длительное токсическое воздействие этанола [7]. Избыток ацетальдегида у больных АСГ снижает уровень гепсидина в печени, способствует нарушению метаболизма внутриклеточного железа и разрушению гепатоцитов [2,7,15,16]. В зонах стеатонекроза гепатоцитов освобождается и накапливается внеклеточное (ретикулярное) железо (Fe^{3+}), которое обладает цитотоксичностью, активирует макрофаги Купфера и перисинусоидальные звёздчатые клетки Ито, способствуя развитию фиброза печени [17].

Тем не менее до настоящего времени многие особенности депонирования разновалентных соединений железа в печени у больных алкогольным и неалкогольным стеатогепатитом пока детально не изучены и нуждаются в дальнейшей разработке [17].

Цель работы

Выявить морфологические особенности депонирования разновалентных соединений железа (Fe^{2+} , Fe^{3+}) в ацинусах печени у больных алкогольным и неалкогольным стеатогепатитом.

Материалы и методы исследования

Проведено микроскопическое и гистохимическое исследование трепанобиоптатов печени и секционного материала 35 больных в возрасте 49–56 лет, страдавших АСГ (15 трепанобиоптатов и 20 секционных наблюдений), а также трепанобиоптатов печени 15 больных в возрасте 58–72 лет, страдавших НАСГ. Диагноз АСГ устанавливали на основании патоморфологического исследования печени и данных истории болезни о злоупотреблении пациентами алкоголем. В диагностике НАСГ учитывались клинические данные об отсутствии злоупотребления алкоголем, наличии избыточного веса, сахарного диабета 2 типа.

Пункционно-биопсийный и аутопсийный материал печени фиксировали в 10% забуференном формалине. Наличие жировой дистрофии гепатоцитов определяли в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, а также в параллельных замороженных срезах аутопсийного материала печени, окрашенных суданом III.

Степень стеатоза печени определяли в микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, используя градацию E. M. Brunt, D. E. Kleiner (2005). Выделяли лёгкую (S1) степень стеатоза (наличие в стандартизованном поле зрения микроскопа от 5 до 33% гепатоцитов с преимущественно микро- или макровезикулярной жировой дистрофией), умеренную (S2) степень (наличие от 34 до 66% клеток с преимущественно макровезикулярной или смешанной жировой дистрофией), тяжёлую (S3) степень стеатоза (наличие в поле зрения более 66% гепатоцитов со смешанной жировой дистрофией) [18].

Наличие трёхвалентного железа (Fe^{3+}) выявляли методом Перлса, а наличие двухвалентного железа (Fe^{2+}) определяли параллельным окрашиванием серийных срезов печени гексацианоферратом (III) калия [19] и методом Хьюкилла-Путта с батифенантролином [20]. Микроскопически определяли распределение Fe^{3+} и Fe^{2+} в гепатоцитах и макрофагах, а также во внеклеточном матриксе печени. Для оценки содержания и степени внутриклеточного депонирования разновалентного железа подсчитывали процент железосодержащих гепатоцитов и макрофагов Купфера в 1-й (Z-1) перивенулярной зоне, во 2-й (Z-2) промежуточной и в 3-й (Z-3) перипортальной зоне ацинусов печени при увеличении $\times 400$ в 5 полях зрения микроскопа.

Степень накопления (депонирования) железа в клетках печени оценивали в процентах с использованием градации G. D. LeSage (1983) в модификации M. Torbenson (2009) [21], в соответствии с которой выделяли минимальную G1 степень депонирования (<5% железосодержащих клеток), лёгкую G2 степень (наличие 5–30% железосодержащих клеток), умеренную G3 степень (наличие от 31 до 60% железосодержащих клеток) и тяжёлую G4 степень накопления железа (наличие >60% железосодержащих клеток). Отсутствие железа в гепатоцитах и макрофагах соответствовало G0 степени.

Результаты гистохимических окрасок оценивали в микроскопе Аxioplan 2 (фирмы «Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$. Микрофотографии гистологических препаратов печени выполнялись с помощью цифровой фотокамеры Olympus (Япония).

При статистической обработке результатов исследований в программе «SPSS for Windows 17.0» рассчитывали среднее значение (M), стандартную ошибку репрезентативности среднего значения (m). Степень накопления разновалентного железа в печени оценивали, применяя t-критерий Стьюдента, а депонирование разновалентного железа в разных зонах ацинуса сравнивали с учётом H-критерия Краскела-Уоллиса. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведённое комплексное патоморфологическое исследование распределения разновалентного железа в печени умерших больных, страдавших АСГ, выявило следующие особенности. При тяжёлом (S3) микро-макроевезикулярном АСГ в 35% наблюдений выявлялось значительное, тяжёлой G4 степени, депонирование трёхвалентного железа (Fe^{3+}) в большинстве макрофагов Купфера 1, 2 и 3 зон ацинусов, в то время как наличие минимального количества двухвалентного (Fe^{2+}) железа определялось лишь в единичных макрофагах 1, 2 и 3 зон ацинусов печени. Во всех зонах ацинусов печени также определялось умеренное содержание трёхвалентного железа во внеклеточном матриксе печени, особенно ярко это проявлялось в аутопсийном материале (рис. 1).

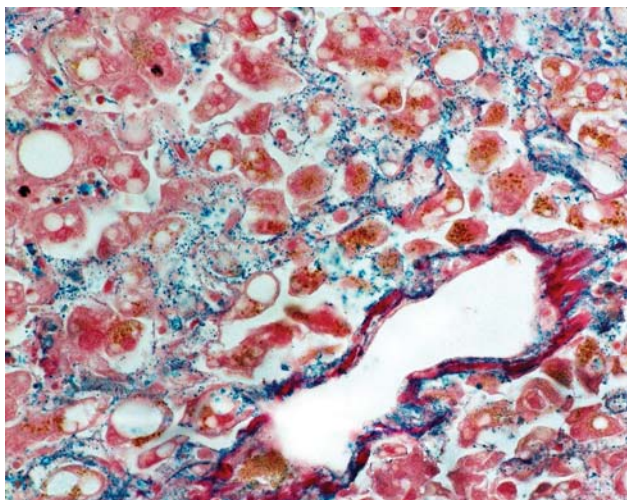


Рис. 1. Fe^{3+} в межклеточном матриксе перивенулярной зоны ацинуса в аутопсийном материале печени при АСГ. Окр. методом Перлса. Ув. $\times 600$.

По мнению Е. А. Pulixi (2010), выявление в аутопсийном материале значительного количества железа, с одной стороны, свидетельствует об интенсивной жировой дистрофии гепатоцитов, при которой железо переокисляется с изменением валентности Fe^{2+} на Fe^{3+} и подвергается фагоцитозу макрофагами, а с другой стороны – о процессах посмертного аутолиза клеток, при котором железо высвобождается в экстрацеллюлярное пространство [22,23].

При умеренном (S2) микро-макроевезикулярном АСГ в 30% случаев наблюдалось умеренное (G3) depo-

нирование трёхвалентного железа в гепатоцитах без жировой дистрофии и в макрофагах 1 и 2 зон ацинусов печени; в 20% случаев умеренное накопление Fe^{3+} определялось в аналогичных клетках только в 1 зоне ацинусов печени. Умеренное G3 накопление трёхвалентного железа выявлялось внеклеточно в очагах стеатонекроза гепатоцитов в 3 зоне ацинусов (в 30% случаев), а также во 2 и 3 зонах ацинусов печени (в 20% наблюдений). Выявленное нами в половине наблюдений АСГ накопление Fe^{3+} преимущественно в структурно сохранных гепатоцитах перивенулярных зон ацинусов печени, с учётом литературных данных [24], наиболее вероятно отражает активно протекающие в гепатоцитах этих зон процессы окисления двухвалентного железа в трёхвалентное и соединения двухвалентного железа с цитоплазматическими белками.

При умеренном (S2) АСГ в 20% случаев определялось умеренное (G3) депонирование двухвалентного железа в гепатоцитах 1 зоны ацинусов печени, а в 30% наблюдений выявлялось лёгкой (G2) степени накопление Fe^{2+} в гепатоцитах 2 зоны ацинусов печени. Процент гепатоцитов и макрофагов с депонированным трёхвалентным железом был достоверно большим, чем процент этих клеток с двухвалентным железом.

При тотальном (S1) микроэвезикулярном АСГ в 15% случаев депонирование трёхвалентного железа лёгкой (G2) степени отмечалось в гепатоцитах и макрофагах 2 и 3 зон ацинусов печени, а в 1 зоне ацинусов реакция Перлса была отрицательной. Двухвалентное железо лёгкой (G2) степени выявлялось в немногочисленных гепатоцитах перивенулярной 1-й зоны ацинуса с микроэвезикулярной жировой дистрофией (рис. 2).

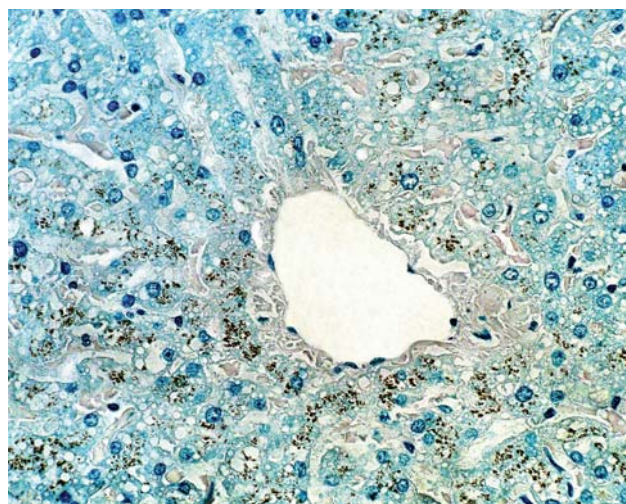


Рис. 2. Лёгкая (G2) степень накопления Fe^{2+} в перивенулярной зоне ацинуса при АСГ. Окр. методом Хьюкилла-Путта. Ув. $\times 600$.

При статистическом анализе установлено, что в печени умерших больных с тяжёлым (S3) микро-макроевезикулярным АСГ накопление Fe^{3+} в 1, 2 и 3 зонах ацинусов печени определялось в $29,57 \pm 0,90\%$ макрофагов, а накопление Fe^{2+} выявлялось в $1,43 \pm 0,72\%$ этих же клеток, т.е. депонирование трёхвалентного железа в макрофагах более чем в 20 раз превышало депонирование двухвалентного железа ($p = 0,001$) (табл. 1).

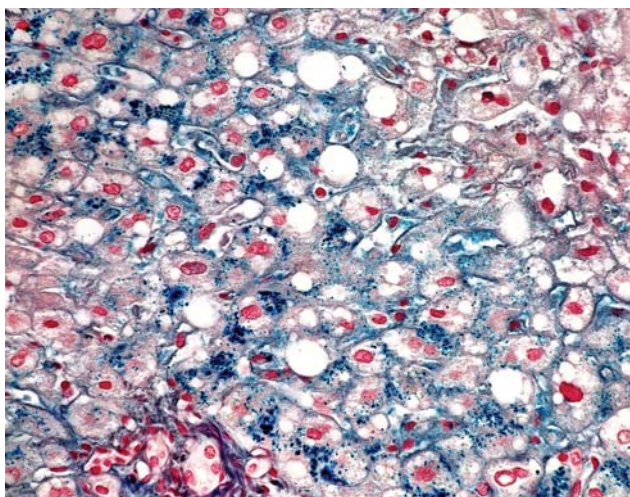


Рис. 3. Умеренная степень накопления внеклеточного Fe³⁺ в Z-2 и Z-3 зонах ацинуса при АСГ. Окр. методом Перлса. Ув. х600.

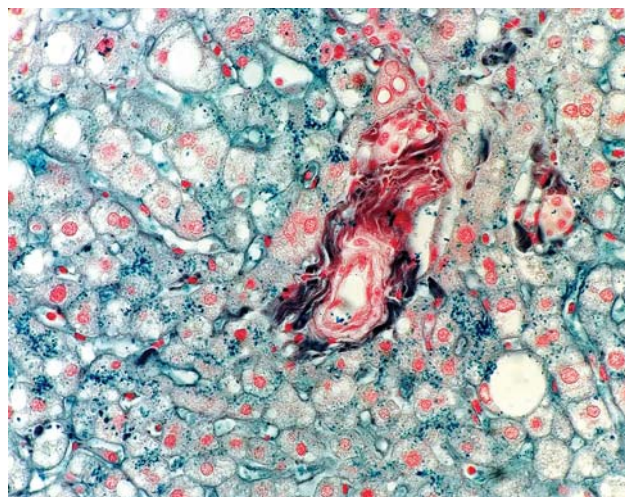


Рис. 6. Накопления Fe³⁺ лёгкой (G2) степени в гепатоцитах и во внеклеточном матриксе портальной зоны ацинуса при НАСГ. Окр. методом Перлса. Ув. х600.

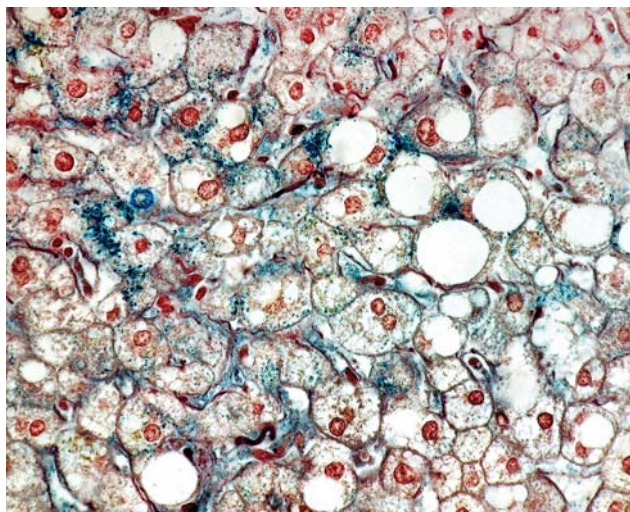


Рис. 4. Минимальная (G1) степень накопления Fe²⁺ в промежуточной зоне ацинуса при АСГ. Окр. гексацианоферратом (III) калия. Ув. х600.

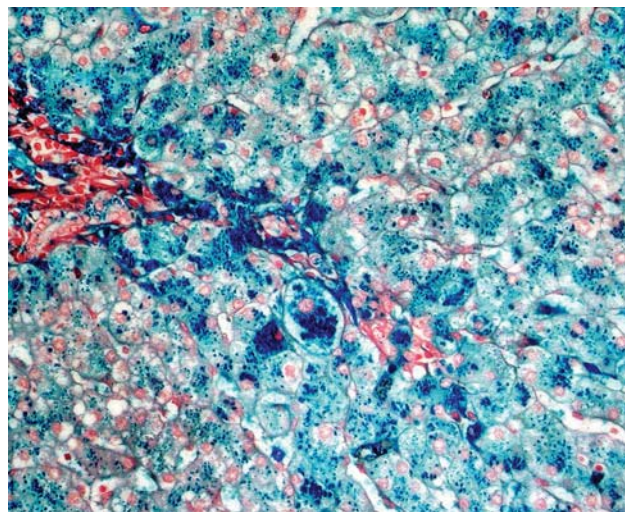


Рис. 7. Тяжёлая (G4) степень накопления Fe³⁺ в макрофагах и гепатоцитах портальной зоны ацинуса при рефрактерной анемии. Окр. методом Перлса. Ув. х600.

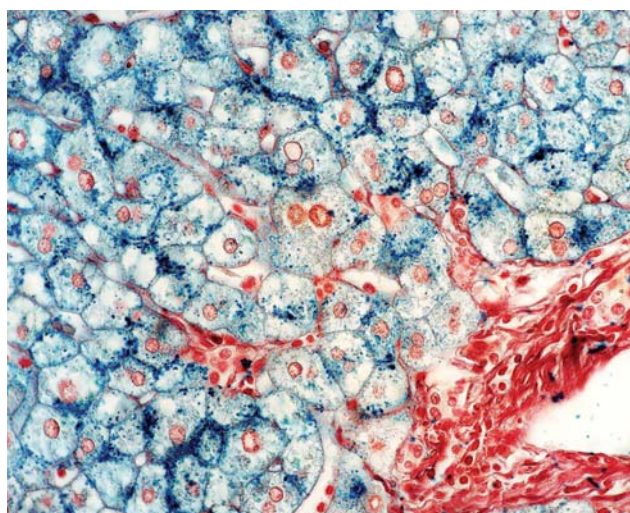


Рис. 5. Умеренная (G3) степень накопления в гепатоцитах и макрофагах Fe³⁺ в Z-2 и Z-3 зонах ацинуса при НАСГ. Окр. методом Перлса. Ув. х600.

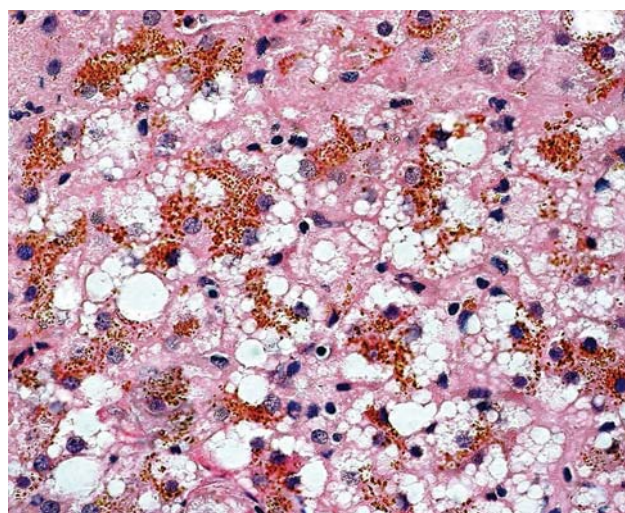


Рис. 8. Накопление липофусцина, имитирующего депонирование железа, в очагах стеатонекроза при микро-макроvesикулярном НАСГ. Окраска на Fe²⁺ и Fe³⁺ отрицательна. Ув. х600.

Таблица 1

Уровни депонирования двухвалентного (Fe2+) и трёхвалентного (Fe3+) железа в гепатоцитах и макрофагах печени (в %) при алкогольном стеатогепатите разной степени тяжести (аутопсийный материал)

Тяжёлый (S3) микро-макроvesикулярный АСГ		P	Локальный (S2) микро-макроvesикулярный АСГ		P	Тотальный (S1) микроvesикулярный АСГ		P
Fe3+	Fe2+		Fe3+	Fe2+		Fe3+	Fe2+	
29,57±0,90'	1,43±0,72'	0,001	6,27±1,51#	2,67±0,78#	0,038	6,33±0,67&	0,67±0,33&	0,002

Примечания: данные проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента; * – достоверная разница (p<0,05) между соотношением гепатоцитов и макрофагов, содержащих Fe3+ и Fe2+; # – достоверная разница (p<0,05) между соотношением гепатоцитов и макрофагов, содержащих Fe3+ и Fe2+; & – достоверная разница (p<0,05) между соотношением гепатоцитов и макрофагов, содержащих Fe3+ и Fe2+.

При умеренном (S2) микро-макроvesикулярном АСГ депонирование Fe3+ в 1 и 2 зонах ацинусов печени выявлялось в 6,27±1,51% гепатоцитов и макрофагов, а депонирование Fe2+ в этих зонах выявлялось в 2,67±0,78% гепатоцитов и макрофагов, т.е. накопление Fe3+ в этих клетках более чем в 2 раза превышало накопление двухвалентного железа (p=0,038) (табл. 1). При тотальном (S1) микроvesикулярном АСГ депонирование Fe3+ определялось в 6,33±0,67% гепатоцитов и макрофагов 2 и 3 зон ацинусов, а депонирование Fe2+ выявлялось в единичных гепатоцитах (0,67±0,33%) всех трёх зонах ацинусов (p=0,002). Таким образом, установлено, что при АСГ разной степени тяжести в гепатоцитах и макрофагах депонируется в 2–20 раз больше трёхвалентного железа, чем двухвалентного железа (табл. 1).

При сравнительном анализе депонирования разновалентного железа в разных зонах ацинусов печени в умерших больных АСГ были выявлены следующие достоверные отличия. Наибольший процент клеток, накапливающих трёхвалентное железо, находился в 1 (8,9±2,81) и во 2 (9,9±2,73) зонах ацинусов печени. В 3 зоне ацинусов трёхвалентное железо не накапливалось или обнаруживалось лишь в единичных (0,1±0,1) гепатоцитах и макрофагах (p=0,024). Наибольший процент гепатоцитов и макрофагов, депонировавших двухвалентное железо, определялся в 1 (4,0±1,79) и во 2 (4,0±1,33) зонах ацинусов печени, при этом в 3 зоне ацинусов печени клеток, накапливающих двухвалентное железо, не обнаружено (p=0,028) (табл. 2).

По своим свойствам двухвалентное железо менее токсично и более мобильно, за счёт валентности оно может легко создавать новые соединения и включаться в состав физиологических пигментов. Поэтому наличие в клетках двухвалентного железа свидетельствует о функциональной активности гепатоцитов [1,2].

В трепанобиоптатах печени у больных АСГ наблюдался

очаговый умеренный (S2) макроvesикулярный стеатоз с преимущественным поражением гепатоцитов 2 и 3 зон ацинусов печени. У всех больных в 1 зоне ацинусов печени выявлялось лёгкой (G2) степени накопление трёхвалентного железа в 1,83±0,37% гепатоцитов и макрофагов, а во 2 и 3 ацинарных зонах определялось умеренное внеклеточное накопление трёхвалентного железа (рис. 3). По данным литературы, 3-я портальная зона ацинусов печени наиболее уязвима для повреждений вследствие наиболее активно протекающих в гепатоцитах процессах оксигенации и негативного влияния продуктов распада ацетальдегида, ведущего к переокислению железа и к разрушению гепатоцитов, а также к высвобождению железа во внеклеточное пространство [11]. В трепанобиоптатах печени больных АСГ в 53,3% наблюдений определялось минимальной (G1) степени накопление двухвалентного железа в 2,6±0,46% гепатоцитов 1 и 2 зон ацинусов печени (рис. 4), а в 46,7% наблюдений определялось лёгкой (G2) степени накопление Fe2+ в гепатоцитах 1 зоны ацинусов печени. Количественный анализ показал, что при очаговом умеренном (S2) макроvesикулярном АСГ различия между лёгким (G2) накоплением в гепатоцитах трёхвалентного и двухвалентного железа статистически недостоверны.

При сравнительном анализе депонирования трёхвалентного и двухвалентного железа в ацинарных зонах трепанобиоптатов печени больных АСГ выяснилось, что наибольший процент гепатоцитов и макрофагов, накопивших трёхвалентное железо, содержался в 1 (4,8±0,33) и во 2 (4,7±0,35) зонах ацинусов печени. В 3 зоне ацинусов определялись единичные гепатоциты и макрофаги (0,1±0,1), депонировавшие Fe3+. Наибольший процент гепатоцитов и макрофагов, депонировавших двухвалентное железо, наблюдался в 1 (4,1±0,38) и во 2 (4,0±0,35) зонах ацинусов печени, в то время как в 3 ацинарной зоне, клетки с двухвалентным железом отсутствовали (p=0,001) (табл. 2).

Таблица 2

Накопление двухвалентного (Fe2+) и трёхвалентного (Fe3+) железа в 1 (Z-1), 2 (Z-2) и 3 (Z-3) ацинарных зонах печени (M±m) (материал аутопсий и трепанобиопсий печени)

	Fe3+			P	Fe2+			P
	Z-1	Z-2	Z-3		Z-1	Z-2	Z-3	
АСГ (а)	8,9±2,81'	9,9±2,73''	0,1±0,1'''	0,024	4,0±1,79 ^μ	4,0±1,33 ^{μμ}	0 ^{μμμ}	0,028
АСГ (тр.)	4,8±0,33#	4,7±0,35##	0,1±0,1###	0,001	4,1±0,38'	4,0±0,35''	0'''	0,001
НАСГ (тр.)	1,07±0,32&	1,05±0,34&&	2,6±0,62&&&	0,037	4,2±0,62@	4,2±0,62@@	1,0±0,37@@@	0,001

Примечания: (а) – аутопсийный материал; (тр.) – трепанобиопсии печени; данные проанализированы с помощью (H-критерия) Краскела-Уоллиса; – достоверная разница (p<0,05) распределения Fe3+ между Z-3''' и Z-1', Z-3''' и Z-2'', – достоверная разница (p<0,05) распределения Fe3+ между Z-3''' и Z-1'', Z-3''' и Z-2''#, – достоверная разница (p<0,05) распределения Fe3+ между Z-3&&& и Z-1&, Z-3&&& и Z-2&&, – достоверная разница (p<0,05) распределения Fe2+ между Z-3''' и Z-1', Z-3''' и Z-2'', – достоверная разница (p<0,05) распределения Fe2+ между Z-3@@@ и Z-1@, Z-3@@@ и Z-2@@.

Изучение накопления трёхвалентного и двухвалентного железа в трепанобиоптатах печени больных НАСГ выявило следующие особенности. При умеренном (S2) и локальном (в 3 портальной зоне ацинусов) макроvesикулярном НАСГ в 53,5% случаев накопление Fe³⁺ умеренной (G3) степени выявлялось в гепатоцитах и макрофагах Купфера 2 и 3 зон ацинусов печени (рис. 5); в 46,5% случаев обнаруживалась лёгкая (G2) степень накопления трёхвалентного железа в гепатоцитах и макрофагах 3 ацинарной зоны, а также лёгкая степень внеклеточного накопления трёхвалентного железа в портальной 3 зоне ацинусов печени (рис. 6). Накопление двухвалентного железа лёгкой (G2) степени выявлялось в реакции с гексацианоферратом (III) калия в гепатоцитах 1 и 2 ацинарных зон печени в 33,4% случаев. При параллельном проведении реакции Хьюкилла-Путта у этих больных выявлялась только минимальная (G1) степень накопления двухвалентного железа в гепатоцитах и макрофагах 1 зоны ацинусов в 46,6% случаев, а в 20% случаев реакция на двухвалентное железо в печени имела отрицательный результат. При обработке количественных данных статистически достоверных различий между депонированием трёхвалентного и двухвалентного железа в гепатоцитах и макрофагах печени у больных НАСГ не обнаружено.

Сравнительный анализ трепанобиоптатов печени больных НАСГ показал, что процент гепатоцитов и макрофагов с наличием трёхвалентного железа в 1 (1,07±0,32) и во 2 (1,05±0,34) ацинарных зонах был статистически достоверно меньшим, чем процент этих клеток с трёхвалентным железом в 3 зоне ацинусов печени (2,6±0,62). Процент гепатоцитов и макрофагов, накопивших Fe²⁺, был достоверно большим (p=0,001) в 1 (4,2±0,62) и во 2 (4,2±0,62) зонах ацинусов печени, в 3 ацинарной зоне двухвалентное железо определялось в единичных гепатоцитах (1,0±0,37) (табл. 2).

Таким образом, проведённые исследования показали, что депонирование в печени трёхвалентного и двухвалентного железа возрастает от G2 до G4 степени по мере увеличения от S1 до S3 тяжести АСГ. Результаты проведённых исследований дают основание предположить, что депонирование в печени Fe³⁺ и Fe²⁺ способствует прогрессированию АСГ. По данным P. Sorrentino (2010), избыточное накопление железа в гепатоцитах и в перисинусоидальных пространствах является триггерным механизмом для прогрессирования простого стеатоза в НАСГ, а прогрессирование НАСГ в цирроз печени диагностируется у 16–25% больных. Внеклеточная или

внутриклеточная локализация железа в гепатоцитах и макрофагах способствуют разным исходам заболевания, особенно неблагоприятно депонирование железа в перисинусоидальных пространствах, которое в 6,9–20% случаев может быть связано с развитием гепатоцеллюлярной карциномы [10].

Обнаружение у больных АСГ и НАСГ в микропрепаратах печени, окрашенных гематоксилином и эозином, коричневых гранул требует их идентификации гистохимическими методиками. В таких случаях проводится дифференциальная диагностика между накоплениями железа, меди и липофусцина. В частности, интенсивное депонирование железа в макрофагах и гепатоцитах наблюдается у больных рефрактерной анемией (рис. 7), гемолитической анемией, первичных и метастатических опухолях печени, а в очагах стеатонекроза печени обнаруживаются массивные скопления липофусцина (рис. 8), подтверждённые негативными реакциями на железо и медь.

Выводы

1. В печени умерших больных, страдавших тяжёлым S3 микро-макроvesикулярным алкогольным стеатогепатитом, во всех трёх ацинарных зонах печени наиболее значительное депонирование трёхвалентного железа тяжёлой G4 степени определялось в макрофагах, интенсивность которого более чем в 20 раз превышала депонирование в этих клетках двухвалентного железа.

2. При умеренном S2 микро-макроvesикулярном и тотальном S1 макроvesикулярном алкогольном стеатогепатите умеренное G3 степени накопление трёхвалентного железа выявлялось в гепатоцитах и макрофагах 1 и 2 зон ацинусов печени, а при умеренном S2 алкогольном стеатогепатите в этих зонах определялось накопление двухвалентного железа в гепатоцитах умеренной G3 степени (в 20% случаев) и лёгкой G2 степени (в 30% случаев).

3. У больных неалкогольным стеатогепатитом при умеренном S2 макроvesикулярном стеатозе в 53,5% случаев накопление трёхвалентного железа умеренной G3 степени выявлялось в гепатоцитах и макрофагах Купфера 2 и 3 зон ацинусов печени, а накопление двухвалентного железа лёгкой G2 степени преобладало в этих же клетках в 1 и 2 ацинарных зонах печени.

4. В трепанобиопсийном и аутопсийном материале больных алкогольным и неалкогольным стеатогепатитом внеклеточная локализация трёхвалентного железа определялась преимущественно в зонах стеатонекроза во 2 и 3 ацинарных зонах печени.

Список литературы

1. Kurz T. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling / T. Kurz, J.W. Eaton, U.T. Brunk // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2011. – Vol. 43. – №12. – P. 1686–1697.
2. Ganz T. Hcpidin and disorders of iron metabolism / T. Ganz, E. Nemeth // *Annu. Rev. Med.* – 2011. – Т. 62. – P. 347–360.
3. Особенности гемосидероза у больных диффузными заболеваниями печени / Л.С. Богуш, В.М. Бычков, Ю.И. Рогов и др. // *Рецепт.* – 2008. – №4. – С. 122–130.
4. Современные аспекты метаболизма железа и его регуляции / В.И. Филимонов, М.А. Тихоновская, Г.И. Бессараб и др. // *Запорожский медицинский журнал.* – 2012. – №4. – С. 54–59.
5. Гепсидин как регулятор гомеостаза железа / А.А. Левина, Т.В. Казюкова, Н.В. Цветаева и др. // *Педиатрия.* – 2008. – Т. 87. – №1. – С. 67–74.
6. A new mouse liver-specific protein homologous to human antibacterial peptid hepcidin is overexpressed during iron overload / C. Pigeon, G. Ilyin, B. Courselaud et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 7811–7819.
7. Deugnier Y. Section IV Disorders of Iron Homeostasis: Iron Overload and Related Conditions – The Pathology of Hepatic Iron Overload / Y. Deugnier, B. Turlin // *In Iron Physiology and Pathophysiology in Humans.* – Springer : New York; Dordrecht Heidelberg London, 2012. – P. 345–355.
8. Aigner E. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver / E. Aigner, G. Weiss, C. Datz // *World J Hepatology.* – 2015. – Т. 7. – №2. – P. 177–188.
9. A randomized trial of iron depletion in patients with nonal-

- coholic fatty liver disease and hyperferritinemia / L. Valenti, A.L. Fracanzani, P. Dongiovanni et al. // *World J Gastroenterol*. – 2014. – Т. 20. – №11. – P. 3002–3010.
10. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steatohepatitis / P. Sorrentino, S. D'Angelo, U. Ferbo et al. // *J Hepatol*. – 2010. – Т. 50. – №2. – P. 351–357.
 11. Tiniakos D.G. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis / D.G. Tiniakos, M.B. Vos, E.M. Brunt // *Annual Review of Pathology*. – 2010. – №5. – P. 145–171.
 12. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study / R.T. Acton, J.C. Barton, B.M. Snively et al. // *Ethnicity and Disease*. – 2006. – Vol. 16. – №4. – P. 815–821.
 13. Geography of HFE C282Y and H63D mutations / A.T. Merryweather-Clarke, J.J. Pointon, A.M. Jouanolle et al. // *J. Genetic Testing*. – 2000. – Vol. 4. – №2. – P. 183–98.
 14. Богуш Л.С. Роль C282Y и H63D мутаций HFE гена в формировании вторичной перегрузки железом / Л.С. Богуш, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко // *Медицинская панорама*. – 2009. – №7. – С. 52–55.
 15. Zhao N. Enns: Iron regulation by hepcidin / N. Zhao, A.S. Zhang, C.A. Enns // *J Clin Invest*. – 2013. – Vol. 123. – №6. – P. 2337–2343.
 16. Role of hepcidin in the regulation of iron metabolism in patients with chronic liver diseases / M. Penkova, M. Gulubova, J. Ananiev et al. // *Inter. J. of Business Humanities and Technology*. – 2012. – Vol. 2. – №7. – P. 89–94.
 17. Смирнов О.А. Клинико-морфологическая характеристика первичных и вторичных гиперсидерозов : автореф. дис. на соискание ученой степени д.мед.н : спец. 14.00.15 / О.А. Смирнов. – СПб., 2001. – 49 с.
 18. Desing and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease / D.E. Kleiner, E.M. Brunt, M. van Natta et al. // *J. Hepatology*. – 2005. – Vol. 41. – №6. – P. 1313–1321.
 19. Целуйко С.С. Предполагаемые механизмы гистохимического исследования кальция, железа, натрия, цинка и витаминов в организме : методические рекомендации / С.С. Целуйко, С.В. Зиновьев. – Благовещенск, 2013. – С. 14–15.
 20. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия : пер. с англ. / Р. Лилли. – М. : Мир, 1969. – С. 375–376.
 21. Torbenson M. Classification of iron grading / M. Torbenson // *Book Liver Pathology / F. Linda, K. Sanjay, E. David*. – USA, Pennsylvania, 2009. – 537 p.
 22. Pulixi E.A. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and alcoholic steatohepatitis in the pathogenesis of altered iron regulation in chronic hepatitis / E.A. Pulixi, P. Arosio // *Heamatologica*. – 2010. – Vol. 92. – №8. – P. 1037–1042.
 23. Кузнецова А.В. Показатели обмена железа при алкогольном стеатогепатите / А.В. Кузнецова, Е.В. Дуботолкина, Е.А. Лойфман // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2009. – Т. 19. – №5. – С. 92.
 24. Harrison-Findik D.D. Gender-related variations in iron metabolism and liver diseases / D.D. Harrison-Findik // *World J Hepatol*. – 2010. – Vol. 2. – №8. – P. 302–310.
- References**
1. Kurz, T., Eaton, J., & Brunk, U. (2011). The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(12), 1686–1697. doi: 10.1016/j.biocel.2011.08.016.
 2. Ganz, T., & Nemeth, E. (2011). Hepcidin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu. Rev. Med.*, 62, 347–360. doi: 10.1146/annurev-med-050109-142444.
 3. Bogush, L. S., Bychkov, V. M., Rogov, Ju. I., Kleckij, S. K., Omel'yanyuk, N. N., & Burceva, O. V. (2008). Osobennosti gemosideroza u bol'nykh diffuznymi zabolevaniyami pecheni [Features hemosiderosis in patients with diffuse liver diseases]. *Recept*, 4, 122–130. [in Ukrainian & Belarus].
 4. Filimonov, V. I., Tikhonovskaya, M. A., Bessarab, G. I., Sukhomlinova, I. E., Pirtya, G. V., Burega, I. Yu., & Tikhonovskij, A. V. (2012). Sovremennye aspekty metabolizma zheleza i ego regulyacii [Modern aspects of iron metabolism and its regulation]. *Zaproszhskij medicinskij zhurnal*, 4, 54–59. [in Ukrainian].
 5. Levina, A. A., Kazyukova, T. V., Cvetaeva, N. V., Sergeeva, A. I., Mamukova, Yu. I., Romanova, E. A., & Cybul'skaya, M. M. (2008). Gepsidin kak reguljator gomeostaza zheleza [Hepcidin as a regulator of iron homeostasis]. *Pediatriya*, 87(1), 67–74. [in Russian].
 6. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., & Loreal, O. (2001). A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7811–7819. doi: 10.1074/jbc.M008923200.
 7. Deugnier, Y., & Turlin, B. (2012). *Section IV Disorders of Iron Homeostasis: Iron Overload and Related Conditions - The Pathology of Hepatic Iron Overload. In Iron Physiology and Pathophysiology in Humans. Springer: New York, Dordrecht Heidelberg London*.
 8. Aigner, E., Weiss, G., & Datz, C. (2015). Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World J Hepatology*, 7(2), 177–188. doi: 10.4254/wjh.v7.i2.177.
 9. Valenti, L., Fracanzani, A. L., Dongiovanni, P., Rovida, S., Rametta, R., Fatta, E., et al. (2014). A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol*. 20(11), 3002–3010. doi: 10.3748/wjg.v20.i11.3002.
 10. Sorrentino, P., D'Angelo, S., Ferbo, U., Micheli, P., Bracigliano, A., & Vecchione, R. (2010). Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *Journal of Hepatology*, 50(2), 351–357. doi: 10.1016/j.jhep.2008.09.011.
 11. Tiniakos, D. G., Vos, M. B., & Brunt, E. M. (2010). Non-alcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annual Review of Pathology*, 5, 145–171. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102132.
 12. Acton, R. T., Barton, J. C., Snively, B. M., McLaren, C. E., Adams, P. C., & Harris E. L. (2006). Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS). *Study Ethnicity and Disease*, 16(4), 815–821.
 13. Merryweather-Clarke, A. T., Pointon, J. J., Jouanolle, A. M., Rochette, J., & Robson, K. J. (2000). Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *J. Genetic Testing*, 4(2), 183–198. doi: 10.1089/10906570050114902.
 14. Bogush, L. S., Sivickaya, L. N., & Danilenko, N. G. (2009). Rol' C282Y i H63D mutacij HFE gena v formirovanii vtorichnoj peregruzki zhelezom [The role of the C282Y and H63D mutations in HFE gene in the formation of secondary iron overload]. *Medicinskaya panorama*, 7, 52–55. [in Belarus].
 15. Zhao, N., Zhang, A. S., & Enns, C. A. (2013). Enns: Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest*. 123(6), 2337–2343. doi: 10.1172/JCI67225.
 16. Penkova, M., Gulubova, M., Ananiev, J., Ivanova, R., & Mateva, L. (2012). Role of hepcidin in the regulation of iron metabolism in patients with chronic liver diseases. *Inter. J. of Business Humanities and Technology*, 2(7), 89–94.
 17. Smirnov, O. A. (2001). *Kliniko-morfologicheskaya kharakteristika pervichnykh i vtorichnykh gipersiderozov* (Avtoref. dis... dokt. med. nauk) [Clinical and morphological characteristics of primary and secondary gipersiderozov. Dr. med. sci. diss.]. Saint Petersburg [in Russian].
 18. Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Natta, van M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatology*, 41(6), 1313–1321.
 19. Celujko, S. S., & Zinov'ev, S. V. (2013). *Predpolagaemye mekhanizmy gistokhimicheskogo issledovaniya kal'ciya, zheleza, natriya, cinka i vitaminov v organizme* [Proposed mechanisms histochemical studies of calcium, iron, sodium,

-
- zinc and vitamins in the body]. Blagoveshensk. [in Russian].
20. Lilli, R. (1969). *Patogistologicheskaya tehnika i prakticheskaya gistoimiya [Histopathological technique and practical histochemistry]*. Moscow: Mir. [in Russian].
21. Torbenson, M. (2009). Classification of iron grading. *Book Liver Pathology*, F. Linda, K. Sanjay, E. David (Ed.). Pennsylvania.
22. Pulixi, E. A., & Arosio, P. (2010). Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and alcoholic steatohepatitis in the pathogenesis of altered iron regulation in chronic hepatitis. *Heamatologica*, 92(8), 1037–1042.
23. Kuznecova, A. V., Dubotolkina, E. V., & Lojman, E. A. (2009). Pokazateli obmena zheleza pri alkogol'nom steatogepatite [Indicators iron metabolism in alcoholic steatohepatitis]. *Rossijskij zhurnal Gastroe'nterologii, Gepatologii, Koloproktologii*, 19(5), 92. [in Russian].
24. Harrison-Findik, D. D. (2010). Gender-related variations in iron metabolism and liver diseases. *World J Hepatol*, 2(8), 302–310. doi: 10.4254/wjh.v2.i8.302.
-

Сведения об авторах:

Туманский В. А., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, директор Института клинической патологии человека.

Фень С. В., аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: Alchimik1989@gmail.com.

Відомості про авторів:

Туманський В. О., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, директор Інституту клінічної патології людини.

Фень С. В., аспірант каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: Alchimik1989@gmail.com.

Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSci, Professor, Zaporizhzhia State Medical University, Head of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine.

Fen' S. V., postgraduate student, Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: Alchimik1989@gmail.com.

Надійшла в редакцію 17.11.2015 р.