

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ ПРИ ПЕРЕХОДЕ ФИБРОЗА В ЦИРРОЗ

1Лебедева Е.И. <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

1Щастный А.Т. <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

2Бабенко А.С. <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

¹Витебский государственный медицинский университет

²Белорусский государственный медицинский университет

Резюме. В настоящее время методы лечения заболеваний печени, при которых фиброз является ключевым патогенетическим звеном, до сих пор остаются актуальной проблемой гепатологии. Целью настоящей работы явилось изучение структурных изменений и фенотипического профиля клеток печени крыс Wistar при узловой перестройке паренхимы.

На основании полученных результатов можно установить точку перехода фиброза в цирроз как самостоятельный отдельный этап фиброгенеза и в рамках настоящих исследований это происходило на 11-й нед (F5), а сам процесс – с 9-й по 13-ю нед (F4/F5-F6). В этот период при разрастании фиброзной ткани и узловой перестройки паренхимы печени не отмечали прогрессирование дистрофических процессов и увеличение зон некроза и некробиоза гепатоцитов. На стадии F5 количество α -SMA⁺- и FAP⁺-клеток, как основных продуцентов патологической соединительной ткани, не изменилось. В период F5-F6 не наблюдали отличий по числу различных популяции макрофагов, экспрессирующих маркеры CD68, CD206, CX3CR1.

Ключевые слова: крысы, фиброз и цирроз печени, морфология, иммуногистохимия.

PATHOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE LIVER IN THE TRANSITION OF FIBROSIS TO CIRRHOSIS

1Lebedeva E.I. <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

1Shchastniy A.T. <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

2Babenka A.S. <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

¹Vitebsk State Medical University

²Belarussian State Medical University

Currently, the methods of treating liver diseases in which fibrosis is a key pathogenetic factor, still remain an urgent problem of hepatology. Aim

of this work is the study of structural changes and phenotypic profile of rat cells (Wistar line) with nodal parenchyma.

Based on the results obtained, it is possible to set the point of transition of fibrosis to cirrhosis as an independent separate stage of fibrogenesis and, as part of these studies, this happened on the 11th week (F5), and the process itself-from the 9th to the 13th week (F4/F5-F6). During this period, with the growth of fibrous tissue and nodal restructuring of the liver parenchyma, the progression of dystrophic processes and an increase in the zones of necrosis and necrobiosis of hepatocytes did not note. At the F5 stage, the number of α -SMA⁺-and FAP⁺-cells, as the main producers of pathological connective tissue, has not changed. During the F5-F6 period, there were no differences in the number of various populations of macrophages expressing markers of CD68, CD206, CX3CR1.

Keywords: rats, liver fibrosis and cirrhosis, morphology, immunogystochemistry.

FIBROZNING SIRROZGA O'TISH DAVRIDA JIGARNING PATOMORFOLOGIK XUSUSIYATLARI

1Lebedeva E.I. <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

1Shchastny A.T. <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

2Babenko A.S. <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

1Vitebsk davlat tibbiyot universiteti

2 Belarus davlat tibbiyot universiteti

Annotatsiya. Hozirgi vaqtda fibroz asosiy patogenetik bo'g'in bo'lgan jigar kasalliklarini davolash usullari gepatologiyaning dolzarb muammosi bo'lib qolmoqda. Ushbu ishning maqsadi parenximaning tugunli qayta tuzilishi paytida Wistar kalamushlarida jigar hujayralarining strukturaviy o'zgarishlarini va fenotipik profilini o'rganish edi.

Olingan natijalarga asoslanib, fibrozdan sirozga o'tish nuqtasini fibrogenezning mustaqil alohida bosqichi sifatida belgilash mumkin va bu tadqiqotlar doirasida bu 11-haftada (F5) sodir bo'lgan va jarayonning o'zi - 9-dan 13-haftagacha (F4/F5- F6). Ushbu davrda tolali to'qimalarning ko'payishi va jigar parenximasining nodulyar qayta tuzilishi bilan distrofik jarayonlarning rivojlanishi va gepatotsitlarning nekrozi va nekrobiozi joylarining ko'payishi qayd etilmadi. F5 bosqichida patologik biriktiruvchi to'qimalarning asosiy ishlab chiqaruvchilari sifatida α -SMA⁺- va FAP⁺-hujayralari soni o'zgarmadi. F5-F6 davrida CD68, CD206 va CX3CR1

belgilarini ifodalovchi makrofaglarning turli populyatsiyalari sonida farqlar kuzatilmadi.

Kalit so'zlar: kalamushlar, jigar fibrozi va sirrozi, morfologiya, immunogistokimyo.

Введение. Цирроз печени входит в группу 11-ти лидирующих болезней, приводящих к наиболее частой смерти людей во всем мире [1]. В настоящее время накоплено немало сведений о клеточно-молекулярных механизмах, приводящих к фиброзу и циррозу печени, и предложены потенциальные стратегии лечения данных патологических процессов. Однако, эффективная антифибротическая терапия не разработана [2]. Анализ научной литературы показал, что большинство авторов на существующих экспериментальных моделях животных изучают конкретные, далеко отстоящие друг от друга ключевые позиции – норма, фиброз и цирроз, либо фиброгенез не на всем протяжении времени. При этом значительная часть информации по разным причинам не фиксируется [3]. Мы предположили, что точка перехода фиброза печени в цирроз будет иметь исключительные патоморфологические особенности.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение структурных изменений и фенотипического профиля клеток печени крыс Wistar при узловатой перестройке паренхимы.

Материалы и методы. Дизайн исследования был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019). Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида (ТАА), который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 13 нед. Крысы контрольной группы получали воду без ТАА в аналогичном объеме. Животных рандомизировали на 3 группы (n=12 в каждой): 9 нед (1-я группа), 11 нед (2-я группа), 13 нед (3-я группа).

Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по Маллори. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах с применением поликлонального кроличьего антитела FAP (номер в каталоге E-AB-32870, 1:100), моноклонального мышинового антитела α -SMA (номер в

каталоге E-AB-22155, 1:1000), моноклонального мышинового антитела CD68 (E-AB-22013, 1:200), поликлонального кроличьего антитела CD206 (E-AB-70178, 1:500) и поликлонального кроличьего антитела CX3CR1 (E-AB-33382, 1:100) в соответствии с инструкцией производителя.

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard на базе микроскопа Olympus BX51. Количество α -SMA⁺-клеток, FAP⁺-клеток, CD68⁺-клеток, CD206⁺-клеток и CX3CR1⁺-клеток подсчитывали в трех полях зрения каждого гистологического среза при увеличении объектива 40 \times . Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы K.G. Ishak.

Статистический анализ. Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.), Microsoft Office Excel (Microsoft Corp.). Для каждой выборки определяли нормальность частотного распределения каждого признака по критерию Лиллиефорса. Данные представлены в виде средних арифметических (M) и их соответствующих доверительных интервалов (95%ДИ), медианы и значения 15-го и 85-го перцентилей (Me (15%; 85%)).

Результаты и их обсуждение. По истечении 9-ти нед эксперимента в области отдельных триад наблюдали ложные печеночные дольки, формирование которых отражает начало процесса трансформации фиброза печени в цирроз F4/F5. Одновременно выявили порталный, перипортальный, мостовидный и очаговый перипортальный фиброз. При дальнейшей интоксикации животных (11 нед) на гистологических препаратах отмечали диффузную перестройку паренхимы печени с формированием ложных печеночных долек F5 – неполный цирроз. К концу эксперимента (13 нед) установили тотальное поражение печени, характеризующее образование ложных печеночных долек различной формы и диаметра F6 – достоверный цирроз. Особый интерес представляет период перестройки паренхимы печени (с 9-й по 13-ю нед), который не сопровождался прогрессированием дистрофических процессов и увеличением зон некроза и некробиоза гепатоцитов. На всех сроках эксперимента в фиброзных септах и порталных зонах выявили выраженный венозный ангиогенез. Вместе с этим со стороны артериальной сосудистой системы выраженных изменений не отмечалось.

По данным исследователей разрастание фиброзной соединительной ткани при хронических заболеваниях печени обусловлено гетерогенной популяцией миофибробластов: звездчатые клетки печени, портальные фибробласты, циркулирующие фиброциты, гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга [4]. Мы исследовали две популяции миофибробластов, экспрессирующих маркеры активированных жиронакапливающих клеток (α -SMA) и портальных фибробластов (FAP). В печени контрольных крыс α -SMA⁺- и FAP⁺-клетки практически отсутствовали. Через 9 нед эксперимента выявили α -SMA⁺-клетки в количестве 20,861 (18,958;22,763) и FAP⁺-клетки – 14,694 (13,083;16,305). На стадии F5 количество данных популяций клеток не изменилось ($p=0,2073$ и $p=0,3775$ соответственно). При этом достоверный цирроз сопровождался ростом α -SMA⁺- и FAP⁺-клеток в 1,50 раза ($p=0,0000$) по сравнению с 9-й нед. На всех этапах эксперимента α -SMA⁺-клетки определяли в очагах некроза, синусоидных капиллярах и соединительнотканых септах. FAP⁺-клетки располагались в портальных зонах, фиброзных септах и реже в синусоидных капиллярах.

Клетки, экспрессирующие маркер CD68, являются резидентными звездчатыми макрофагами (клетки Купфера). Они обладают свойством пластичности, изменяя свой фенотип в ответ на сигналы микроокружения (M1-фенотип, классически активированные и M2-фенотип, альтернативно активированные) [5]. В рамках настоящей работы иммуногистохимическим методом выявлены три морфологически разные популяции макрофагов. В печени контрольных крыс CD68⁺-клетки крыловидной формы локализовались преимущественно в синусоидных капиллярах и их количество составило 8,861 (7,754;9,967). На стадии F4/F5 число CD68⁺-клеток в 2,0 раза ($p=0,0000$) превышало контрольный уровень, а на последующих сроках отличий не было ($p=0,2120$). Клетки, экспрессирующие маркеры CD206 (макрофаги активированные по альтернативному противовоспалительному M2-фенотипу) и CX3CR1 (макрофаги костномозгового происхождения) в печени контрольных крыс практически отсутствовали. По завершении 9-й нед в синусоидных капиллярах определили в виде цепочек CD206⁺-клетки округло-вытянутой формы в количестве 18,944 (16,153;21,735). В портальных зонах выявлялись CX3CR1⁺-клетки округлой формы и их число было равным 8,861 (7,432;10,290). На стадиях F5, F6 по количеству CD206⁺- и

CX3CR1⁺-клеток отличий не было (p=0,8735, p=0,6415, p=0,9983 соответственно).

Заключение. На основании полученных результатов можно установить точку перехода фиброза в цирроз как самостоятельный отдельный этап фиброгенеза и в рамках настоящих исследований это происходило на 11-й нед (F5), а сам процесс – с 9-й по 13-ю нед (F4/F5-F6). В этот период при разрастании фиброзной ткани и узловой перестройки паренхимы печени не отмечали прогрессирование дистрофических процессов и увеличение зон некроза и некробиоза гепатоцитов. На стадии F5 количество α -SMA⁺- и FAP⁺-клеток, как основных продуцентов патологической соединительной ткани, не изменилось. В период F5-F6 не наблюдали отличий по числу различных популяции макрофагов.

Предположительно, в печени срабатывают регенераторные и компенсаторно-приспособительные и/или иные процессы, которые сдерживают прогрессирование дистрофических процессов, увеличение зон некроза и некробиоза гепатоцитов, рост количества клеток, а также приток CX3CR1⁺-клеток из костного мозга. Ввиду вышесказанного результаты настоящих исследований имеют большой фундаментальный и клинический интерес так как расширяют представление о патоморфологических изменениях печени при переходе фиброза в цирроз.

Литература.

1. The burden of liver cirrhosis in mortality: Results from the global burden of disease study / F. Ye [et al.] // Front Public Health – 2022. – Vol. 10. – P. 909455. [https://doi: 10.3389/fpubh.2022.909455](https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.909455)
2. Friedman, S. L. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future / S. L. Friedman, M. Pinzani // Hepatology. – 2022. – Vol. 75, N 2. – P. 473–488. [https://doi: 10.1002/hep.32285](https://doi.org/10.1002/hep.32285)
3. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis / Y. Lin [et al.] // J. Hepatology. – 2022. – Vol. 76, N 3. – P. 660–675. [https://doi: 10.1002/hep.32299](https://doi.org/10.1002/hep.32299)
4. Carvedilol attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic sinusoidal capillarization in mice / Y. Wu [et al.] // Drug Des. Devel. Ther. – 2019. – Vol. 13. – P. 2667–2676. [https://doi: 10.2147/DDDT.S210797](https://doi.org/10.2147/DDDT.S210797)
5. Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease / C. Wang [et al.] // Front Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 803037. [https://doi: 10.3389/fimmu.2021.803037](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803037).