

**О.М.Гаврилюк**

Львівський національний  
медичний університет  
імені Данила Галицького

**Ключові слова:** ангіогенез, з алкогольний стеатогепатит, неалкогольний стеатогепатит, вірусний гепатит С.

Надійшла: 06.10.2013

Прийнята: 20.11.2013

УДК: 6161.36-003.826+616.36-002.17:616.13/.16-007.62]-091.8

## **ОСОБЛИВОСТІ АНГІОГЕНЕЗУ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМУ, НЕАЛКОГОЛЬНОМУ СТЕАТОГЕПАТИТІ ТА ВІРУСНОМУ ГЕПАТИТІ С ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ**

*Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Вивчення патоморфологічних та патогенетичних особливостей захворювань щитоподібної залози, печінки, серцево-судинної і репродуктивної систем та пухлин системи крові з метою вдосконалення їх морфологічної діагностики» (номер державної реєстрації 0108U001134).*

**Реферат.** Аналіз імуногістохімічних проявів ангіогенезу у 45 автопсійних випадках з алкогольним стеатогепатитом, неалкогольним стеатогепатитом та вірусним гепатитом С, що при вірусному ураженні CD34-позитивні клітини виявляються переважно у септальному компартменті, а при хронічному стеатогепатиті – у лобулярному, що відображає патогенетичні особливості цих захворювань та може використовуватись для їх диференційної діагностики на стадії циротичної трансформації.

**Morphologia.** – 2013. – Т. 7, № 4. – С. 18-22.

© О.М.Гаврилюк, 2013

✉ elenalvua@yahoo.com

**Gavrilyuk O.M. Angiogenesis in alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infection (immunohistochemical study).**

**ABSTRACT. Background.** Angiogenesis together with fibrogenesis and regeneration is an important mechanism of tissue reorganization in chronic liver diseases. Objective of the study is to examine morphologic signs of angiogenesis at the stage of cirrhotic transformation in alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infection. **Methods.** 45 autopsies with diagnosed alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and viral hepatitis C were enrolled in this study. Diagnosis of alcoholic steatohepatitis was based on the data of alcohol abuse and morphologic signs of alcoholic disease – cardiomyopathy, chronic pancreatitis, alcoholic encephalopathy and typical liver changes. Viral genesis was proved by serological study (RNA HCV) and morphologic signs of HCV (METAVIR criteria). Diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis was verified by the features of metabolic syndrome and hepatic changes (Brunt criteria). The measures of angiogenesis employed were CD34-positive cells, evaluated in the liver tissue. Marker quantification was performed by assessing the ratio of stained tissue to the total area of the liver section using image analysis. “STATISTICA FOR WINDOWS 6.0” was used to analyze the data. Differences between groups were analyzed using ANOVA analysis (LSD test).  $P < 0,05$  was considered significant. **Results.** General angiogenesis index was the highest in viral hepatitis and the lowest in nonalcoholic steatohepatitis ( $p < 0.05$ ). The same tendency was revealed for septal indexes: in viral hepatitis the meaning was three times higher than in steatohepatitis (difference between alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis was not statistically significant). The highest lobular angiogenesis index was revealed in nonalcoholic steatohepatitis and the lowest in viral hepatitis ( $p < 0.05$ ). **Conclusion.** In hepatitis C virus infection CD34-positive cells are seen mostly in the septal compartment and in chronic steatohepatitis (alcoholic and nonalcoholic) – in lobular one. Such findings are in accordance with pathogenetic mechanisms of the diseases and may be used for differentiation diagnosis at the stage of cirrhotic transformation.

**Key words:** angiogenesis, alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, hepatitis C virus infection.

### **Citation:**

Gavrilyuk O.M. [Angiogenesis in alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infection (immunohistochemical study)]. *Morphologia.* 2013;7(4):18-22. Ukrainian.

### **Вступ**

У сучасних розвинених країнах алкогольний стеатогепатит (АСГ), неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) та вірусний гепатит С (ВГС) відносяться до найчастіших причин розвитку цирозу печінки [1; 2; 3]. Однією з важливих ознак цирозу

тичної трансформації є реорганізація судинного русла. Так, відомий гепатолог Н.Рорер із співавт. (1957) вважав, що збереження терміну цироз, який етимологічно є беззмстовний, можна аргументувати саме особливостями порушення печінкового кровообігу [4]. При цьому складна

перебудова мікроциркуляторного русла є наслідком декількох процесів: неоангіогенезу, структурної реорганізації внаслідок прогресуючого фіброзу та шунтування крові.

Утворення нових елементів судинного русла при процесах загоєння добре відомі і описані у різних органах [5]. Оскільки в печінці синусоїдні ендотеліальні клітини мають значні відмінності від клітин, що виявляються у артеріолах, портальних та центральних венулах, як щодо структури, так і стосовно функції, механізми ангіогенезу в цьому органі характеризуються особливостями перебігу та морфологічних проявів. Зокрема, велику роль відіграють печінкові зірчасті клітини та клітини Купфера, які знаходячись в безпосередній близькості із синусоїдним ендотелієм, можуть регулювати утворення нових судин за допомогою механізмів, що відрізняються від схеми ангіогенезу у звичайних капілярах [6].

Більшість сучасних досліджень присвячена молекулярним механізмам ангіогенезу, які досліджуються при різних захворюваннях [7]. Морфологічні прояви цього процесу та, особливо, можливості їх використання для диференційної діагностики різних захворювань залишаються недостатньо вивченими. Частково це можна пояснити складністю механізмів ангіогенезу у печінці, приєднанням інших процесів (реорганізація внаслідок фіброзу та шунтування крові) та технічними питаннями, пов'язаними з необхідністю використання додаткових методів дослідження [8; 9].

**Метою** нашої роботи було вивчення морфологічних ознак ангіогенезу при алкогольному стеатогепатиті, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С на етапі циротичної трансформації, з використанням імуногістохімічного судинного маркера CD34.

#### **Матеріали та методи**

Було проаналізовано історії хвороби та матеріали автопсійного дослідження 45 розтинів померлих з АСГ, НАСГ та ВГС на стадії циротичної трансформації, проведених у 2008-2010 рр. у Львівському обласному патологоанатомічному бюро. Підтвердження діагнозу АСГ базувалося на даних анамнезу про тривале зловживання алкоголем (більше 210 грамів на тиждень або 30 грамів на день) та морфологічних проявах алкогольної хвороби – кардіоміопатії, хронічному панкреатиті, алкогольній енцефалопатії та типових змінах в печінці. Вірусний генез вважався достовірним при наявності даних про позитивні маркери вірусного гепатиту С (RNA HCV) та морфологічних ознак вірусного ураження (критерії METAVIR) [10]. Верифікація діагнозу НАСГ включала виявлення проявів метаболічного синдрому та типових морфологічних змін печінки (критерії Brunt, 2010) [11]. Дослідження було ухвалено Комісією з питань етики Львівського Національного медичного університету іме-

ні Данила Галицького.

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

Імуногістохімічне дослідження ендотеліальних клітин проводилось з використанням моноклональних антитіл Mo a-Hu CD34 Class II, Clone QBEnd 10 («DakoCytomation», Данія) з наступним використанням системи візуалізації EnVision (DakoCytomation). Оцінку експресії маркера проводили у відповідності з рекомендаціями інших дослідників [12]. Результат вважався позитивним, якщо більше 20% клітин виявляли специфічне забарвлення.

Вираженість експресії CD34 визначалась за допомогою морфометричного аналізу з обчисленням відносної площі CD34-позитивних клітин з біліарним фенотипом, забарвлених коричневим кольором. Для цього в кожному випадку було досліджено 20 фотографій тканини печінки на малому збільшенні ( $\times 100$ ) для оцінки загальної відносної площі, яку займають CD34+ клітини. Великі судини та жовчеві протоки виключались з дослідження. Аналіз зображення проводився за допомогою програми Image-ProPlus (Version 6.).

Статистична обробка отриманих результатів проводилася за допомогою пакету програм "STATISTICA FOR WINDOWS 6.0" (Statsoft, USA). Обчислювали середнє значення (M), стандартне квадратичне відхилення (s). Перед вибором методу порівняння параметричних показників між групами проводили перевірку на нормальність розподілу за критерієм Шапіро-Вілка. Для оцінки відмінностей параметричних характеристик використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з використанням апостеріорного парного порівняння груп з допомогою критерію найменшої значущої різниці (LSD test). Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез в дослідіх приймався рівним 0,05.

#### **Результати та їх обговорення**

Загальна характеристика досліджуваного автопсійного матеріалу наведена у таблиці 1.

Оскільки при циротичній трансформації реорганізація мікроциркуляторного русла всередині часточки та в сполучнотканинних ділянках забезпечується різними клітинними популяціями, експресія маркерів ангіогенезу оцінювалась окремо в лобулярному та септальному компартменті (лобулярний та септальний індекси ангіогенезу (IA), а також в препараті в цілому (загальний IA).

Таблиця 1

Клінічні та біохімічні дані про пацієнтів досліджуваних груп, максимальне та мінімальне значення, (середнє арифметичне)

Параметр	Алкогольний стеатогепатит (n=15)	Неалкогольний стеатогепатит (n=15)	Вірусний гепатит С (n=15)
Стать (чоловіки/жінки)	11/4	5/10	11/4
Вік	41-65 (55,7)	52-71 (60,6)	22-60 (43,6)
Загальний білірубін крові (мкМ/л)	41,6-324,5 (138,7)	11,9-270,3 (125,9)	37,8-419,4 (141,7)
Аланінамінотрансфераза (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

Результати морфометричного аналізу експресії судинного маркера CD34, показали, що загальний індекс ангіогенезу був найвищим при ВГС, а найнижчим – при НАСГ (табл. 2). Відмінності між трьома досліджуваними групами були значущими. Така ж тенденція виявлялась при аналізі септального ІА, але при цьому зна-

чення показника при ВГС було майже втричі більшою, ніж при стеатогепатиті. Відмінності між септальними ІА при АСГ та НАСГ не були статистично значущими. При порівнянні значень лобулярного ІА виявилось, що максимальний рівень виявлявся при НАСГ, а мінімальний – при ВГС.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика індексів ангіогенезу у хворих на неалкогольний стеатогепатит, алкогольний стеатогепатит та вірусний гепатит С

Індекс ангіогенезу	НАСГ	АСГ	ВГС	P
CD34 (% площа)				
Загальний	1,14±0,35	1,44±0,32	1,85±0,3	P <sub>1-2</sub> =0,019 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> =0,037
Септальний	3,06±0,4	3,48±0,35	13,03±0,32	P <sub>1-2</sub> <0,01 P <sub>1-3</sub> =0,005 P <sub>2-3</sub> =0,86
Лобулярний	1,91±0,096	0,95±0,096	0,71±0,066	P <sub>1-2</sub> <0,001 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> <0,001

Згідно сучасних поглядів при дії різних етіологічних чинників активуються різні механізми ангіогенезу [13; 14]. При ВГС загибель гепатоцитів зумовлена переважно «імунним цитолізом»: активовані лімфоцити проникають із портальних/септальних ділянок через пограничну пластинку у часточку, де індукують апоптоз печінкових клітин. В подальшому на місці пошкодження активується популяція портально-септальних фіброгенних клітин, які забезпечують фіброгенез та ангіогенез. За нашими даними при ВГС CD34-позитивні судини виявлялись на межі між септальним та паренхіматозним компартментами.

При стеатогепатиті токсична дія вільних жирних кислот (при НАСГ) та ацетальдегіду (при АСГ) призводить до апоптозу гепатоцитів у різних відділах часточок та активації печінкових зірчастих клітин, які в свою чергу зумовлюють перичелюлярний склероз, відомий як «капіляризація синусоїдів». Наші дані свідчать, що цей процес асоціюється з підвищеною експресією

CD34 у синусоїдних ендотеліальних клітинах, особливо по периферії часточки (паренхіматозний компартмент), що підтверджує їх участь у неоангіогенезі, артеріалізації синусоїдів та, можливо, інших механізмах реорганізації мікроциркуляторного русла.

Отже врахування особливостей експресії CD34 дозволяє диференціювати вірусне ураження печінки (гепатит С) та хронічний стеатогепатит (алкогольний та неалкогольний) на етапі циротичної трансформації, коли інші ознаки стають неспецифічними. Одержані результати можуть використовуватись в подальших дослідженнях пато- та морфогенезу процесів фіброзу та реорганізації мікроциркуляторного русла при хронічних захворюваннях печінки.

#### Висновки

1. При вірусному гепатиті С CD34-позитивні клітини виявляються переважно у септальному компартменті, а при хронічному стеатогепатиті – у лобулярному, що відображає патогенетичні

особливості цих захворювань.

2. Виявлені особливості експресії судинного маркера при вірусному гепатиті С, алкогольному та неалкогольному стеатогепатиті може використовуватись для диференційної діагностики цих захворювань на етапі циротичної трансформації.

#### Літературні джерела References

1. Schuppan D. Liver cirrhosis / D. Schuppan, N. H. Afdhal // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371, № 8. – P. 838-851.

Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(8):838-51.

2. Williams R. Global challenges in liver disease / R. Williams // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 521-526.

Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology*. 2006;44:521-6.

3. Характеристика и тенденции развития эпидемического процесса гепатита С в Украине / А. Л. Гураль, В. Ф. Мариевский, Т. А. Сергеева [и др.] // Профілактична медицина. – 2011. - № 1 – С. 9-17.

Hural AL, Marievskiy VF, Sergeeva TA. [Characteristic and tendency of hepatitis C epidemic process in Ukraine]. *Prophylactichna medicina*. 2011;1:9-17. Russian.

4. 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.

Popper H, Kent G, Stein R. Ductular reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp*. 1957;24:551-6.

5. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease / J. Medina, A. G. Arroyo, F. Sanchez-Madrid, R. Moreno-Otero // *Hepatology*. – 2004. – Vol. 39. – P. 1185-1195.

Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology*. 2004;39:1185-95.

6. McCuskey R. S. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants / R. S. McCuskey // *Anat. Rec.* – 2008. – Vol. 291. – P. 661-671.

McCuskey RS. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *The anatomical record*. 2008;291:661-71.

7. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration / J. A. Chen, M. Shi, J. Q. Li, C. N. Qian // *Hepatol. Int.* – 2010. – Vol. 4. – P. 537-547.

Chen JA, Shi M, Li JQ, Qian CN. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *Hepatol Int*. 2010;4:537-47.

8. Carlo I. D. CD34 expression in chronic and neoplastic liver diseases / I. D. Carlo, F. Fraggetta, R. Lombardo // *Panminerva med.* – 2002. – Vol. 44, №4. – P. 365-367.

**Перспективи подальших розробок.** Планується проведення додаткових імуногістохімічних маркерів при алкогольному стеатогепатиті, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С на етапі циротичної трансформації.

Carlo ID, Fraggetta F, Lombardo R. CD34 expression in chronic and neoplastic liver diseases. *Panminerva Med*. 2002;44(4):365-7.

9. Kukla M. Association between liver steatosis and angiogenesis in chronic hepatitis C / M. Kukla, A. Gabriel, D. Sabat // *Pol. J. Pathol.* – 2010. – Vol. 61, №3. – P. 154-160.

Kukla M, Gabriel A, Sabat D. Association between liver steatosis and angiogenesis in chronic hepatitis C. *Pol J Pathol*. 2010;61(3):154-60.

10. Bedossa P. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group / P. Bedossa, T. Poynard // *Hepatology*. – 1996. – Vol. 24. – P. 289-293.

Bedossa P, Poynard T. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24:289-93.

11. Brunt E. M. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease // E. M. Brunt, D. G. Tiniakos // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, № 42. – P. 5286-5296.

Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16(42):5286-96.

12. Dabbs D. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic application : [3rd ed.] / D. Dabbs. - NY : Saunders Elsevier, 2010. – 1452 p.

Dabbs D, author. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic application. 3rd ed. NY: Saunders Elsevier; 2010. 1452 p.

13. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases / C. Paternostro, E. David, E. Novo, M. Parola // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, № 21. – P. 281-288.

Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases *World J Gastroenterol*. 2010;16(21):281-8.

14. Mazzanti R. Liver angiogenesis as a risk factor for hepatocellular carcinoma development in hepatitis C virus cirrhotic patients / R. Mazzanti, L. Messerini, C. E. Comin // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, № 37. – P. 5009-5014.

Mazzanti R, Messerini L, Comin CE. Liver angiogenesis as a risk factor for hepatocellular carcinoma development in hepatitis C virus cirrhotic patients. *World J Gastroenterol*. 2007;13(37):5009-14.

**Гаврилюк Е.М. Особенности ангиогенеза при алкогольном, неалкогольном стеатогепатите и вирусном гепатите С по результатам иммуногистохимического исследования.**

**Реферат.** Анализ иммуногистохимических проявлений ангиогенеза в 45 аутопсийных случаях алкогольного стеатогепатита, неалкогольного стеатогепатита и вирусного гепатита С показал, что при вирусном поражении CD34-положительные клетки определяются преимущественно в септальном компартменте, а при хроническом стеатогепатите – в лобулярном, что отображает патогенетические особенности этих заболеваний и может использоваться для их дифференциальной диагностики на стадии цирротической трансформации.

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