

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.36-002+616.98

РЕЗИДЕНТНЫЕ МАКРОФАГИ ПЕЧЕНИ И АБСОЛЮТНОЕ ЧИСЛО ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

А.Г.Шевалдин

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова, Россия

RESIDENT LIVER MACROPHAGES AND CIRCULATING MONOCYTE COUNTS IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

A.G.Shevaldin

First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, Russia

© А.Г.Шевалдин, 2014 г.

Вероятность развития фиброза печени и примерные сроки его прогрессирования при хроническом гепатите С (ХГС) зависят от многих факторов. Исследования, посвященные взаимодействию клеток синусоидов печени редко упоминают резидентные макрофаги (клетки Купфера) в контексте хронических вирусных гепатитов. Помимо воспалительного процесса, Клетки Купфера могут инициировать фиброзирование в паренхиме печени посредством активации клеток Ито. В данной работе приводятся некоторые патоморфологические характеристики клеток Купфера и выявлена связь между их числом и абсолютным числом моноцитов периферической крови у больных с ХГС.

Ключевые слова: больные хроническим гепатитом С, клетки Купфера, фиброз печени, моноциты

The probability of liver cirrhosis and the time course of its progression in chronic viral hepatitis C (VHC) depend on many factors. Studies of liver sinusoidal cell interactions rarely address resident macrophages (Kupffer cells) in the chronic viral hepatitis context. Besides inflammation, processes initiated by Kupffer cells include liver parenchyma fibrosing caused by stellate cells activation. In the present study, certain pathomorphological features of Kupffer cells are recorded and a correlation between the number of the cells and the counts of monocytes in peripheral blood is found in chronic VHC patients.

Key words: chronic viral hepatitis C, Kupffer cells, liver fibrosis, monocytes.

Введение. Для больных, страдающих хроническим гепатитом С (ХГС), особо важно определение как вероятности, так и примерных сроков развития стадий фиброза печени и ее декомпенсации. Прогрессирование гепатита С не удается объяснить лишь свойствами вируса (генотипом, наличием квазивидов, вирусной нагрузкой), очевидно, что не меньшее, а, может быть, большее значение принадлежит в этом процессе факторам организма хозяина [1].

В последние годы все больше внимания уделяется клеткам синусоидов печени, принимающих непосредственное участие в фиброзировании. Фиброз и цирроз печени связывают с активацией клеток, приобретающих фенотип миофибробластов [2].

Известно, что клетки печени, обладающие фиброгенной активностью, гетерогенны [3]. Полагают, что наибольшее значение в инициации и развитии фиброза печени имеют клетки Купфера (резидентные макрофаги)

и клетки Ито (звездчатые клетки, жирозапасующие клетки, адипоциты). Для хронической инфекции характерны повторяющиеся процессы повреждения и репарации, что приводит к избыточному синтезу коллагена активированными клетками Ито. Клетки Купфера активизируются при повреждении печени рано, диффузно и интенсивно, что предшествует активации звездчатых клеток [4, 5]. Мнения исследователей о роли резидентных макрофагов в фиброзировании печени противоречивы. Некоторые ученые считают, что клетки Купфера не принимают прямого участия в фиброзировании печени [6], другие — что резидентные макрофаги напрямую стимулируют фиброгенез [7, 8]. Одни авторы считают, что при нарастании фиброза число клеток Купфера падает [9, 10], другие — что число резидентных макрофагов и фиброзирование нарастают пропорционально [4, 5]. Кроме того, известно, что помимо гепатоцитов, сами клетки Купфера также инфицируются вирусом гепатита С (HCV) [11]. Продукты активирован-

ных клеток Купфера под действием вирусных протеинов не только стимулируют клетки Ито, инициируя фиброгенез, но и могут повреждать ДНК гепатоцитов, что в свою очередь способствует онкогенезу [12, 13].

Повышенный интерес именно к макрофагам печени связан не только с их недостаточной изученностью, но и с очень широким спектром их биологических функций. Еще 30 лет назад даже циркулирующие макрофаги считались вспомогательными и второстепенными клетками (клетки-мусорщики), но благодаря работам Р.Альбрехта и Р.Хонга (1976) и их на редкость удачному образному выражению, макрофаги «доказали» свою безусловную респектабельность [14].

Используя термин тканевые макрофаги печени, следует особо подчеркнуть их неоднородность как по структуре, так и функциям, несмотря на то, что вся совокупность резидентных макрофагов печени тем не менее представляет собой часть единой системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) организма. В современной литературе также выделяют преимущественно фагоцитирующие или цитокин-продуцирующие клетки Купфера [15].

Клетки Купфера исследователи стали описывать очень давно. Современные источники касаются роли резидентных макрофагов в развитии таких патологических процессов как токсические гепатиты, алкогольная болезнь печени, нарушения пигментного обмена и т.д. По непонятным причинам, в исследованиях фиброгенеза, резидентные макрофаги упоминаются редко и интерес почти всецело сместился в сторону активных клеток Ито, основных производителей компонентов внеклеточного матрикса.

Выраженность активации клеток Купфера, основанная на экспрессии одного из нескольких макрофагальных маркеров, а именно CD68, свидетельствует о том, что они играют первоначальную (инициальную) роль, возможно в связи с секрецией цитокинов [4, 5]. Есть и другие мнения, утверждающие, что CD68 является маркером лишь фагоцитарной активности клеток Купфера [15]. Кроме того, на сегодня известно, что клетки Купфера и моноциты периферической крови при гепатите С становятся клетками-амплификаторами возбудителя и поддерживают не только вирусную нагрузку, но и отвечают за распространение вируса в различные органы и ткани [11].

Сказанное имеет исключительный теоретический интерес, однако в наши дни имеет место крайнее неудовлетворение практикующих врачей проблемами своевременного прогнозирования, хронизации, цирротизации, малигнизации, определения темпов развития и смены стадий ХГС, отсутствия ясных и четких представлений об уже апробированных и широко используемых показателях, характеризующих течение гепатита С, коррелирующих со степенью повреждения печени и направлении происходящих в ней процессов.

Целью настоящего исследования послужило выявление клиническо-патогенетической значимости резидентных макрофагов, а также параллели с абсолютным числом моноцитов периферической крови при хроническом вирусном гепатите С с разной выраженностью фиброза печени и различной предположительной длительностью HCV-инфекции.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись 70 пациентов с ХГС. У всех больных ХГС был верифицирован этиологически, клинико-биохимически и морфологически. У всех пациентов был положительный результат полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие РНК HCV в плазме крови.

Среди больных с вирусным гепатитом С преобладали в основном молодые (от 16 до 25 лет). Средний возраст больных составил $33,9 \pm 10,4$ лет (от 17 до 58 лет). Среди этой группы пациентов мужчин было 59%. В 90% случаев в анамнезе было употребление инъекционных наркотиков. Средний срок инфицирования был с относительной долей вероятности известен у более, чем $2/3$ обследованных и равнялся в среднем $9,8 \pm 7,7$ лет с колебаниями от 1 до 42 лет.

Все пациенты узнали о наличии у них HCV-инфекции случайно. Ни у одного больного симптоматика не явилась причиной обращения к врачу. У $2/3$ больных причины обследования в прошлом на HCV-инфекцию выяснить не удалось, однако среди них более 50% в анамнезе имели потребление инъекционных наркотиков. Каждый девятый пациент узнал о наличии у себя HCV-инфекции при обследовании перед плановой хирургией или переливанием крови. Каждого восьмого больного обследовали на вирусные гепатиты в связи с повышенной активностью АЛТ и выявляли гепатит С. Только 6% больных узнали о наличии у себя гепатита С случайно во время сдачи анализов крови в процессе трудоустройства и только двое обратились к врачу в связи с наличием у них половых партнеров с гепатитом С.

У 25 из 70 наблюдавшихся пациентов с ХГС выявляли клинические симптомы (тяжесть в правом подреберье и общую слабость), у 45 отмечали субклиническое течение. На основании комплекса клинико-лабораторных исследований среди 25 больных с симптомами диагностированы легкая и средней тяжести формы заболевания.

61 пациенту провели прижизненную чрескожную пункционную биопсию печени с последующим морфологическим исследованием биоптата и оценкой индекса гистологической активности (ИГА) и степени фиброза по Knodell [16]. Гистологическое описание биоптатов проводили совместно с к.м.н. В.Е.Каревым (патолого-анатомическое отделение Санкт-Петербургской Клинической инфекционной больницы им. С.П.Боткина).

Иммуногистохимическую окраску 60 биоптатов печени провели 30 пациентам с целью детекции и оценки

клеток Купфера и клеток Ито. Иммуногистохимические исследования на наличие CD68 и α SMA проводили 30 больным. Для иммунодетекции применяли моноклональные антитела [17]. Иммуногистохимическую окраску, описание и фотографирование микроскопических препаратов проводили под руководством заведующего кафедрой д.м.н. профессора Р.А.Насырова (кафедра патологической анатомии Санкт-Петербургской педиатрической государственной медицинской академии, лаборатория иммуногистохимии).

Использовали моноклональные мышиные антитела фирмы Novocastra Laboratories Ltd (Великобритания) с системой визуализации EnVision, DAKO (США), в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей.

30 препаратов от 30 пациентов окрасили для выявления экспрессии CD68, макрофагального маркера с целью детекции и подсчета клеток Купфера, 30 препаратов от 30 пациентов окрасили моноклональными антителами на α SMA (гладкомышечный альфа-актин) для выявления активных клеток Ито. Микроскопирование проводили с помощью микроскопа Olympus.

Проводили морфологическую оценку полученных препаратов с качественным и количественным анализом клеток Купфера, окрашенных антителом на CD68, а также клеток Ито с оценкой их пролиферации, по участкам специфически окрашенным антителом на α SMA. Клетки Купфера считали во всех полях зрения всех фрагментов срезов и выражали в среднем числе клеток в препарате при увеличении 8×40 с использованием специальной окулярной сетки для эффективности подсчета. При описании преимущественной локализации клеток Купфера и клеток Ито в препарате исходили из зональности микроскопической картины печени по ходу кровотока по направлению к центральной вене и выделяли перипортальную, среднюю и центрилобулярную зоны [18, 19]. Фотографирование препаратов проводили с помощью цифровой камеры под микроскопом Olympus. Помимо числа клеток Купфера, обращали внимание на их величину, относительный размер, форму, интенсивность иммуногистохимической окраски, преимущественную локализацию в препарате.

Как известно, морфологические изменения лежат в основе тех или иных клинических проявлений заболевания. В связи с этим для оценки значимости описанных выше данных и уточнения этиопатогенеза ХГС необходимо было провести сопоставление результатов иммуногистохимических исследований с другими параметрами, отражающими особенности течения ХГС. В качестве последних были рассмотрены: длительность заболевания, абсолютное число моноцитов периферической крови и выраженность фиброза печени.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью статистической программы SPSS 14.0

Ru для MS Windows XP с использованием непараметрических методов исследования с оценкой непараметрических критериев оценки различий по Манну-Уитни и установления корреляционной связи с определением критерия Спирмана — r_s . Различия сравниваемых параметров считали значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований. При иммуногистохимическом исследовании клетки Купфера выявляли по интенсивности экспрессии макрофагального маркера CD68, который окрашивал их в темно-коричневый цвет. При большем увеличении микроскопа было видно, что эти клетки находятся в стенке синусоидов печени. В цитоплазме клеток Купфера, в том числе и в их отростках, находили гранулы и глыбки темно-коричневого цвета различной величины и разной степени плотности. Интенсивность экспрессии маркера CD68 значительно варьировала у разных пациентов.

Иммуногистохимический метод позволил нам сосчитать клетки Купфера по наличию экспрессии маркера CD68 у 30 пациентов. Число клеток Купфера варьировало от 1,8 до 52,2 клеток в препарате со средним значением $19,6 \pm 2,4$ клеток.

Детальный анализ позволил разделить пациентов на две группы в зависимости от формы клеток Купфера. У 43% больных клетки Купфера были округлыми, у 57% — отростчатыми. У пациентов с преимущественно отростчатыми клетками Купфера экспрессия α SMA клетками Ито была более выраженной ($r_s = 0,39$, $p = 0,04$). Оказалось, что локализация резидентных макрофагов и клеток Ито были связаны статистически значимой связью ($r_s = 0,44$, $p = 0,02$).

Клетки Купфера были относительно мелкими (площадь соразмерная с 1–5 ядрами малых лимфоцитов) у 11 (т.е. у трети обследованных) больных, у 13 (почти у половины больных) — среднего размера (6–10 ядер малых лимфоцитов), у 6 (у каждого пятого обследованного) — крупными (больше 11 ядер малых лимфоцитов).

Выраженность экспрессии CD68 оценивали по интенсивности окраски клеток Купфера. У 53,3% больных резидентные макрофаги были слабоокрашенными (бледными), окраску умеренной выраженности наблюдали у 23,3% больных, интенсивно окрашенные клетки нашли у 23,3% больных. У 37% пациентов с ХГС клетки Купфера располагались преимущественно перипортально, у 63% — в отдалении от портальных триад.

Можно предположить, что отростчатые, более крупные и наиболее интенсивно экспрессирующие маркер CD68 клетки Купфера более активны и в продукции цитокинов, стимулирующих в том числе клетки Ито.

При морфологическом изучении 30 биоптатов, окрашенных гематоксилином и эозином, выявили, что чем меньшим было число клеток Купфера, тем равномернее была их пролиферация в препаратах ($r_s = -0,36$,

$p=0,05$). Размер клеток Купфера был тем крупнее, чем большим было их число ($r_s=0,42$, $p=0,02$) и интенсивнее экспрессия CD68 ($r_s=0,70$, $p<0,001$).

По данным морфологического исследования биоптатов печени 61 пациента у 11,5% больных фиброза не было, у 73,8 % был легкий фиброз F₁, у 8,2 % — тяжелый фиброз (F₃), у 6,5 % фиброз в стадии цирроза F₄. По мере увеличения выраженности фиброза отмечали снижение числа клеток Купфера ($r_s=-0,51$, $p=0,004$) (табл. 1).

В группе пациентов с низкой интенсивностью экспрессии CD68 ($n=16$) абсолютное число моноцитов было тем выше, чем больше было количество клеток Купфера и между этими показателями нашли прямую статистически значимую связь ($r_s=0,52$, $p=0,04$). Возможно, на стадии, когда клетки Купфера наиболее активны (по нарастанию интенсивности экспрессии CD68), связь между абсолютным числом моноцитов периферической крови и числом резидентных макрофагов

Таблица 1

Среднее число клеток Купфера в группах больных с ХГС в зависимости от выраженности фиброза печени

Степень выраженности фиброза (Knodell R.G. et al., 1981)	n	Среднее число клеток Купфера в поле зрения	Интервал
F ₀ (нет фиброза)	3	26,6±9,6	11,7–44,6
F ₁ (легкий фиброз)	21	22,0±2,9 ^{*,**}	2,1–52,2
F ₃ (тяжелый фиброз)	3	6,7±2,6 [*]	1,8–10,5
F ₄ (цирроз)	3	8,9±1,5 ^{**}	6,5–11,6

* — статистически значимое различие между группами F₁ и F₃ ($p=0,02$). ** — статистически значимое различие между группами F₁ и F₄ ($p=0,05$).

При статистической обработке данных, полученных после иммуногистохимического исследования всего у 17 пациентов с известным временем заражения гепатитом С, обнаружили, что чем более длительным было время инфицированности вирусом гепатита С, тем ниже было среднее число клеток Купфера в препарате ($r_s=-0,63$, $p=0,007$). Таким образом, чем больше насчитывали резидентных макрофагов в препарате, тем меньшей оказывалась продолжительность инфекции ХГС. Связь ме-

становится очень слабой из-за уже установившегося «клеточного равновесия» в синусоидах печени, где число клеток Купфера детерминировано и на определенном этапе в процессе фиброзирования будет уменьшаться.

Данные в группах пациентов, разделенных по результатам морфологического исследования при окраске гематоксилином и эозином приведены в табл. 2. Оказалось, что среднее абсолютное число моноцитов периферической крови при нарастании пролиферации клеток Купфера

Таблица 2

Среднее абсолютное число моноцитов периферической крови у 52 пациентов в зависимости от выраженности пролиферации клеток Купфера (при окраске гематоксилином и эозином)

	Пролиферация клеток Купфера		
	Слабая (n=18)	Умеренная (n=23)	Выраженная (n=11)
Среднее абсолютное число моноцитов (интервал) ×10 ⁹ /л	0,30±0,04 [*] (0,08–0,67)	0,52±0,04 [*] (0,29–0,96)	0,43±0,06 (0,96–0,77)

* — статистически значимое различие между группами с $p=0,001$.

жду выраженностью пролиферации активированных клеток Ито на отдалении от портальных триад и длительностью инфекции оказалась положительной с $p<0,05$. Данное явление можно объяснить иницирующим активирующим влиянием клеток Купфера на клетки Ито и фиброгенез.

Клетки Купфера берут свое начало от моноцитарного ростка периферической крови [20]. В последнее время обсуждается несколько возможных источников происхождения резидентных макрофагов, но данные разных авторов крайне противоречивы. Мы попытались выявить связи между показателями абсолютного числа моноцитов и результатами, полученными при иммуногистохимическом исследовании в разных группах больных с ХГС.

сначала растет, а затем уменьшается. Между группами слабой и умеренной пролиферации клеток Купфера обнаружили статистически значимое различие с $p=0,001$.

Обращает внимание также и группа больных с величиной индекса гистологической активности (ИГА) 4–8 баллов ($n=12$), что соответствует хроническому гепатиту со слабо выраженной активностью. В данной группе, чем больше было абсолютное число моноцитов периферической крови, тем выше было число клеток Купфера при иммуногистохимическом исследовании по экспрессии CD68 ($r_s=0,58$, $p=0,05$). Данные результаты снова свидетельствуют о наличии корреляции между абсолютным числом моноцитов и числом клеток Купфера при хроническом гепатите низкой активности. Возможно,

на этой стадии происходит основная дифференцировка мононуклеаров в будущие клетки Купфера. При хроническом гепатите С с умеренной активностью и при тяжелом хроническом гепатите С эта связь перестает быть достоверной ($p=0,06$), но все же становится отрицательной, что можно принимать во внимание как тенденцию к падению числа клеток Купфера при нарастании ИГА и по мере утяжеления фиброза.

Среднее абсолютное число моноцитов периферической крови у пациентов с разными по величине и форме клетками Купфера было различным и выше у пациентов с более крупными и отростчатыми клетками Купфера. К тому же в группе больных с длительностью инфекции ХГС 11–15 лет ($n=4$), клетки Купфера были тем крупнее, чем больше было абсолютное число моноцитов периферической крови ($r_s=0,95$, $p=0,05$). Статистически значимую связь нашли также между абсолютным числом моноцитов и присутствием в основном отростчатых клеток Купфера в препарате в группе у 7 пациентов с минимальной активностью АЛТ (1,5–2 раза выше нормы) ($r_s=0,79$, $p=0,03$).

В группах пациентов, разделенных по активности АЛТ, обнаружили, что при 1,5–3-кратном увеличении АЛТ от нормального у пациентов этой группы, чем выше было абсолютное число моноцитов периферической крови, тем большим было количество клеток Купфера по экспрессии CD68 (табл. 3).

следования биоптатов, окрашенных гематоксилином и эозином (табл. 4).

У пациентов с ХГС в группе с выраженной пролиферацией клеток Купфера ($n=7$) по данным морфологического исследования при окраске гематоксилином и эозином, чем интенсивнее была иммуногистохимически выявленная перипортальная экспрессия α SMA, тем ниже было абсолютное число моноцитов периферической крови ($r_s=-0,95$, $p=0,001$).

Данные корреляции и статистически значимые различия подтверждают одно из широко признанных мнений о моноцитарном происхождении клеток Купфера. На ранних стадиях ХГС в отсутствие обострения, а также у пациентов с активностью АЛТ, не превышающей 120 Ед/л, можно ориентировочно судить о состоянии клеток Купфера в синусоидах печени по клиническому анализу периферической крови, а именно по абсолютному числу моноцитов. Например, у пациента, при соблюдении вышеприведенных условий, чем выше абсолютное число моноцитов, тем более выражена пролиферация и число активных клеток Купфера в синусоидах печени, причем большее число этих клеток будет иметь крупный размер и отростчатую форму, что говорит об их активности на момент исследования.

Приводим два примера описания иммуногистохимической картины биоптатов печени при различной выраженности фиброза.

Таблица 3
Среднее абсолютное число моноцитов и клеток Купфера (КК) по экспрессии CD68 у пациентов в зависимости от активности АЛТ

Группы по активности АЛТ	Среднее абсолютное число моноцитов ($\times 10^{12}/л$)	Среднее число КК (по экспрессии CD68)
<40 Ед/л	$0,43 \pm 0,05$	$16,6 \pm 4,1$
В 1,5–3 раза выше нормы	$0,41 \pm 0,04^*$	$20,5 \pm 4,0^*$
В 3 и более раз выше нормы	$0,51 \pm 0,07$	$21,9 \pm 6,1$

* — показатели связаны прямой корреляцией $r_s=0,65$, $p=0,02$.

Абсолютное число моноцитов и число клеток Купфера по CD68 различалось в группах пациентов, разделен-

У пациентки Щ. с 1а генотипом HCV, с ИГА 7 при отсутствии фиброза F₀ при микроскопическом исследова-

Таблица 4
Среднее абсолютное число моноцитов периферической крови и среднее число клеток Купфера у пациентов в группах в зависимости от выраженности пролиферации клеток Купфера (по данным морфологического исследования и окраске гематоксилином и эозином)

Группы по выраженности пролиферации клеток Купфера (окраска гематоксилином и эозином)	Среднее абсолютное число моноцитов ($\times 10^{12}/л$)	Среднее число клеток Купфера (по экспрессии CD68)
Слабая	$0,30 \pm 0,04^*$ ($n=18$)	$12,9 \pm 4,7^{**}$ ($n=10$)
Умеренная	$0,52 \pm 0,04^*$ ($n=23$)	$22,9 \pm 2,7^{**}$ ($n=13$)
Выраженная	$0,43 \pm 0,06$ ($n=11$)	$20,6 \pm 6,8$ ($n=7$)

* — между результатами статистически значимая разница ($p=0,001$). ** — между результатами статистически значимая разница ($p=0,01$).

ных по выраженности пролиферации клеток Купфера, полученной по данным рутинного морфологического ис-

следования иммуногистохимически окрашенных препаратов кусочка печени имели несколько утолщенные портальные

тракты. Гепатоциты с крупными ядрами и набухшей цитоплазмой без видимых включений и зернистости. Участки фиброза в препарате отсутствуют. В синусоидах огромное количество овальных неинтенсивно окрашенных клеток Купфера среднего размера местами в виде скоплений, но в основном располагающихся диффузно в препарате (рис. 1). В срезе биоптата оценено 36 полей зрения, в которых в сумме сосчитано 1605 клеток Купфера

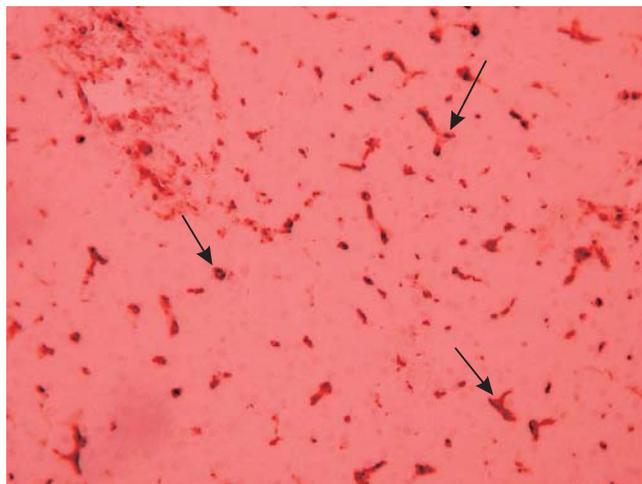


Рис. 1. Экспрессия макрофагального маркера CD68 (коричневая окраска) клетками Купфера (↑) в синусоидах печени. Иммуногистохимический метод. Ув. об. 10.

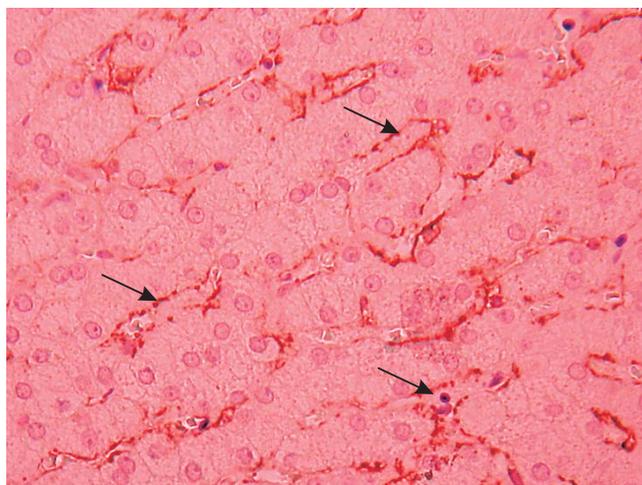


Рис. 2. Перисинусоидальная экспрессия маркера α SMA (красно-коричневая окраска) активными звездчатыми клетками Ито (↑). Иммуногистохимический метод. Ув. об. 20.

со средним числом 44,58 клеток в поле зрения. Активированных клеток Ито по экспрессии α SMA у порталных триад, а также в средней и центрилобулярной зонах умеренное количество (рис. 2).

Таким образом, все клетки здесь располагаются диффузно и относительно равномерно с интенсивной экспрес-

сией CD68 и умеренной экспрессией α SMA. Возможно у пациентки стадия инициации активации клеток Ито клетками Купфера. Здесь иммуногистохимическое исследование не подтверждает отсутствия фиброза, но, наоборот, говорит о его активном запуске по экспрессии α SMA клетками Ито. Как известно, активность клеток Ито нельзя оценить только по окраске гемтоксилином и эозином.

Пациентка Б. с 3а генотипом HCV, ИГА 12, фиброз F4. При микроскопии фрагмент печени имел резко измененную структуру и ложные печеночные дольки, с грубыми фиброзными порто-портальными и порто-центрными септами. Желчные протоки со склерозированными стенками и часто сдавленными участками фиброзирования. Клеток Купфера в препарате было малое количество — в среднем 6,53 клетки в поле зрения (всего 418 в 64 полях). Клетки Купфера больше овальной формы. Экспрессия CD68 слабая, клетки располагались в основном в средней и центрилобулярной зонах, а также в участках склерозирования (рис. 3). В некоторых фрагментах препарата CD68 не определялись совсем. Экспрессия α SMA была значительной в перипортальных зонах

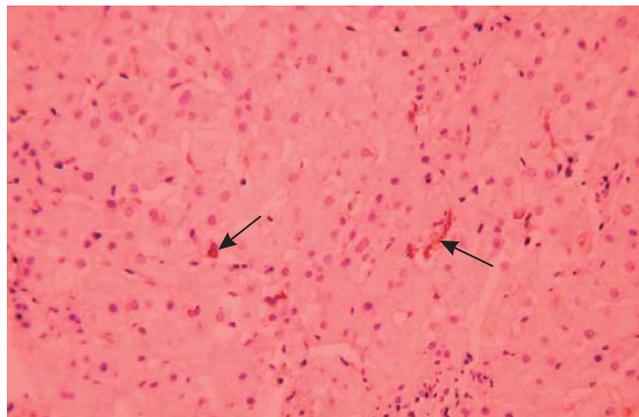


Рис. 3. Экспрессия макрофагального маркера CD68 клетками Купфера (↑) в синусоидах печени. Иммуногистохимический метод. Ув. об. 10.

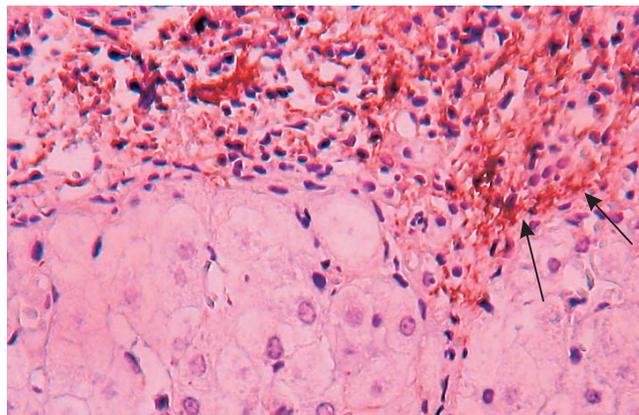


Рис. 4. Перисинусоидальная экспрессия маркера α SMA (красно-коричневая окраска) активными звездчатыми клетками Ито (↑). Иммуногистохимический метод. Ув. об. 20.

и очень слабой или отсутствовала вдали от порталных триад. В препарате обнаружили интенсивное формирование фиброзных септ, в которых экспрессия α SMA была наиболее выражена (рис. 4).

Предположительно, на данном этапе, уже запущен порочный цитокиновый круг активации фибробластов и резидентных макрофагов. Текущий процесс цирротизации здесь сопровождается объяснимой высокой активностью клеток Ито, которые, возможно, были активированы в том числе и клетками Купфера.

Результаты показали, что чем ниже выраженность фиброза печени и чем короче время инфицированности вирусом гепатита С, тем выраженнее пролиферация клеток Купфера по экспрессии маркера CD68 и тем меньше активность клеток Ито по экспрессии α SMA. По мере нарастания фиброза, число клеток Купфера падает и в препарате они встречаются в умеренном или незначительном количестве. Клетки Ито наиболее активны при тяжелом фиброзе F3, когда самая интенсивная экспрессия α SMA отмечается в участках соединительной ткани, а далее и в фиброзных балках по достижении стадии цирроза F4, однако мы заметили, что по мере утяжеления цирроза отмечается не только падение числа клеток Купфера, но и снижение активности клеток Ито.

Можно предположить, что клетки Купфера наиболее интенсивно экспрессируют маркер CD68 в самой активной ранней стадии фиброобразования F1, причем по мере прогрессирования фиброза эта интенсивность уменьшается вместе с иницирующей активирующей функцией резидентных макрофагов.

Установлено, что у пациентов с более длительным сроком инфицированности вирусом гепатита С определяется меньшее число резидентных макрофагов. У большинства больных в разных группах число клеток Купфера тем выше, чем выше абсолютное число моноцитов периферической крови. Чем ниже выраженность фиброза печени и чем короче срок инфицированности вирусом HCV, тем выраженнее пролиферация клеток Купфера.

У пациентов без явных нарушений функций печени по абсолютному числу моноцитов периферической крови можно косвенно судить о выраженности пролиферации резидентных макрофагов и о тяжести гепатита по величине индекса гистологической активности. У пациентов с незначительными нарушениями функций печени по мере нарастания диффузных изменений печени абсолютное число моноцитов и число клеток Купфера уменьшается. У пациентов со значительными нарушениями функций печени при малом абсолютном числе

моноцитов, интенсивность окраски клеток Купфера оказывается более высокой.

Метод иммуногистохимии позволил нам более детально описать клетки Купфера, включая возможность их подсчета, определения размера, формы, интенсивности экспрессии их специфического маркера CD68, а также маркера активации клеток Ито α SMA. Благодаря иммуногистохимической окраске мы оценили и преимущественную локализацию этих клеток — ведущих участников фиброгенеза. Выявление названных выше маркеров делает возможным описание не только структурных характеристик клеток Купфера и клеток Ито, но и позволяет косвенно судить о функциональных особенностях этих клеток. Иммуногистохимическое исследование можно считать более точным и высоко информативным методом; оно значительно расширяет понимание этиопатогенеза гепатита С и безусловно может помочь в определении прогноза и выборе тактики лечения пациентов.

Заключение и выводы. По результатам иммуногистохимического исследования можно косвенно судить о длительности HCV-инфекции, если отсутствуют очевидные признаки цирроза. При высокой длительности ХГС число клеток Купфера уменьшается, а также уменьшаются признаки их активности. Пролиферация клеток Ито (основных участников фиброобразования), наоборот, нарастает, однако между длительностью инфекции и выраженностью фиброза статистически значимой корреляции не выявлено, что свидетельствует о разных темпах фиброобразования у различных больных. При нарастании фиброза печени, число клеток Купфера, а также признаки их активности уменьшаются. Большое число клеток Купфера обнаружили у пациентов с ХГС без фиброза, а также при слабом фиброзе, т.е. на раннем этапе фиброобразования, когда противовирусная терапия является особо своевременной. Результаты морфологического и иммуногистохимического исследования при оценке клеток Купфера различаются. Между пролиферацией клеток Купфера (при окраске гематоксилином и эозином) и числом клеток Купфера (по экспрессии CD68), определяемом иммуногистохимически, статистически значимой корреляции не нашли. Возможно, при рутинном морфологическом исследовании клеток Купфера в счет попадают не только резидентные макрофаги, но и другие клетки синусоида. Абсолютное число циркулирующих моноцитов косвенно отражает пролиферацию клеток Купфера в синусоидах печени, особенно при невысоких ИГА и активности АЛТ (<120 Ед/л). Абсолютное число моноцитов нарастает в начале фиброгенеза и постепенно снижается по мере его утяжеления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hashem B., El-Serag H.B. Epidemiology of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. medscape // Medscape Gastroenterology. — 2007. — URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/560012> (дата обращения 10.03.2014).

2. *Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G.* Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity // *Virchows Arch.* — 1994. — Vol. 425 (1). — P. 3–24.
3. *Kinnman N., Francoz C., Barbu V., Wendum D., Rey C., Hultcrantz R., Poupon R., Housset C.* The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis // *Lab. Invest.* — 2003. — Vol. 83 (2). — P. 163–173.
4. *Chedid A., Arein S., Snyder A., Mathurin P., Capton F., Naveau S.* The Immunology of fibrogenesis in alcoholic liver disease // *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* — 2004. — Vol. 128 (11) — P. 1230–1238.
5. *Ramm G.A., Nair V.G., Bridle K.R., Shepherd R.W., Crawford D.H.G.* Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia // *Am. J. Pathol.* — 1998. — Vol. 153(2). — P. 527–535.
6. *Harty M.W., Papa E.F., Huddleston H.M., Young E., Nazareth S., Riley C.A., Ramm G.A., Gregory S.H., Tracy T.F.* Hepatic macrophages promote the neutrophil-dependent resolution of fibrosis in repairing cholestatic rat livers // *Surgery.* — 2008. — Vol. 143 (5). — P. 667–678.
7. *Matsuoka M., Tsukamoto H.* Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: Implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis // *Hepatology.* — 1990. — Vol. 11. — P. 599–605.
8. *Utrasun R., Nieto N.* Hepatic stellate cells and oxidative stress // *Rev. Esp. Enferm. Dig.* — 2007. — Vol. 99 (4). — P. 223–230.
9. *Lapis K., Zalatai A., Timar F., Thorgeirson U.P.* Quantitative evaluation of lysozyme- and CD68-positive Kupffer cells in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in monkeys // *Carcinogenesis.* — 1995. — Vol. 16. — P. 3083–3085.
10. *Lough J., Rosenthal L., Arzoumanian A., Goresky C.A.* Kupffer cell depletion associated with capillarization of liver sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis // *J. Hepatol.* — 1987. — Vol. 5 (2). — P. 190–198.
11. *Revie D., Salahuddin S.Z.* Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infection // *World J. Gastroenterol.* — 2014. — Vol. 20 (11). — P. 2777–2784.
12. *Hosomura N., Kono H., Tsuchiya M., Ishii K., Ogiku M., Matsuda M., Fujii H.* HCV-related proteins activate Kupffer cells isolated from human liver tissues // *Dig. Dis. Sci.* — 2011. — Apr. 56 (4). — P. 1057–1064.
13. *Heydtmann M.* Macrophages in Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections // *J. Virol.* — 2009. — Vol. 83 (7). — P. 2796–2802.
14. *Albrecht R.M., Hong R.* Basic and clinical considerations of the monocyte-macrophage system in man // *Journal of Pediatrics.* — 1976. — Vol. 88 (5). — P. 751–765.
15. *Sato A., Nakashima H., Nakashima M.* Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl4-induced acute hepatitis injury // *PLOS ONE.* — 2014. — Vol. 9. — Issue 3. — P. 1–11.
16. *Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis // *Hepatology.* — 1981. — Vol. 1. — P. 431–435.
17. *Петров С.В., Райхлин Н.Т.* Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. — Казань, 2000. — С. 287.
18. *Kumar V., Abbas A.K., Fausto N.* Robbins and Cotran pathologic basis of disease / Elsevier. — 2005. — 7th Ed. — P. 879.
19. *Кламт Э.К.* Атлас патологии Роббинса и Котрана. — М.: Логосфера, 2010. — С. 544.
20. *Klein I., Cornejo J.C., Polakos N.K., John B., Wuensch S.A., Topham D.J., Pierce R.H., Crispe I.N.* Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages // *Blood.* — 2007. — Vol. 110 (12). — P. 4077–4085.

Статья поступила 19.04.2014 г.

Сведения об авторе:

Шевалдин Анатолий Геннадьевич — к.м.н., врач-инфекционист, зав.отделением инфекционно-паразитарных заболеваний и иммунопрофилактики, СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 74», г. Кронштадт, ул. Комсомола, 2, тел.: (812) 311-61-22, e-mail: shanatol@mail.ru

ПОДПИСНЫЕ ИНДЕКСЫ:
ОБЪЕДИНЕННЫЙ КАТАЛОГ «ПРЕССА РОССИИ» — 42178
КАТАЛОГЕ АГЕНТСТВА «РОСПЕЧАТЬ» — 57990