

О.М.Гаврилюк

Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького

Ключові слова: CD117+ клі-
тини/телоцити, хронічний стеато-
гепатит, вірусний гепатит С.

Надійшла: 21.08.2016
Прийнята: 12.09.2016

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.3.89-93>
УДК: 616.36-002.2-018.1

CD117-ПОЗИТИВНІ КЛІТИНИ / ТЕЛО- ЦИТИ ПРИ ХРОНІЧНОМУ СТЕАТО- ГЕПАТИТІ ТА ВІРУСНОМУ ГЕПАТИТІ С: ГІСТОТОПОГРАФІЧНІ ТА КІЛЬКІ- СНІ ОСОБЛИВОСТІ

Дослідження є фрагментом планової наукової роботи кафедри патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького на тему: «Вивчення патоморфологічних та патогенетичних особливостей захворювань цитоподібної залози, печінки, серцево-судинної і репродуктивної систем та пухлин системи крові з метою вдосконалення їх морфологічної діагностики» (номер державної реєстрації 0108U001134).

Реферат. Аналіз тканини печінки у 20 автопсійних випадках хронічного гепатиту (стеатогепатиту та вірусного гепатиту С) показав, що CD117+ клітини/телоцити виявлялись переважно у сегментальному компартменті на межі стромальних та паренхіматозних елементів – в ділянці «ніші стовбурових клітин». Експресія маркера CD117 була більш вираженою при хронічному стеатогепатиті, ніж у випадках вірусного гепатиту С, але відмінності не були значущими. **Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 89-93.
© О.М.Гаврилюк, 2016
✉ e.m.gavrilyuk@gmail.com

Gavrilyuk E.M. CD117+ cells/telocytes in chronic steatohepatitis and hepatitis C virus infection: histotopographic and quantitative features.

ABSTRACT. Background. The course of the most common chronic liver diseases depends on the balance in fibrosis and reparative regeneration. Interrelations between these processes depend on many factors, including recently described cellular type CD117+ cells/telocytes which are involved in paracrine regulation. **Objective.** The aim is to study histotopographic and quantitative features of CD117+ cells/telocytes in chronic steatohepatitis and hepatitis C virus infection. **Methods.** 20 autopsies with diagnosed alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and viral hepatitis C (fibrosis stage 2-3, METAVIR) were enrolled in this study. The CD117+ cells/telocytes were 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. Differences between groups were analyzed using Student's t-test; $p < 0,05$ was considered as significant. **Results.** Microscopic examination shows presence of CD117+ cells/telocytes in the interstitial compartment, mostly at the margin between the parenchyma and fibrous tissue – an area associated with “stem cell niche”. Such localization confirms the idea about regulatory role of CD117+ cells/telocytes in liver fibrosis and regeneration, which depends on direct intercellular contacts and paracrine effects. Evaluation of CD117+ cells/telocytes area in the liver section shows the higher degree in chronic steatohepatitis group ($1,98 \pm 0,25$) than in patients with hepatitis C virus infection ($1,15 \pm 0,4$) ($p > 0,05$). **Conclusion.** Differences in the amount of CD117+ cells/telocytes in the area of “stem cell niche” in patients with chronic steatohepatitis and hepatitis C virus infection correlates with the hypothesis about existence of multiple pathogenetic pathways of fibrosis and regeneration which depends on the etiologic factors or secondary influences induced during the course of the disease.

Key words: CD117+ cells/telocytes, chronic steatohepatitis, hepatitis C virus infection.

Citation:

Gavrilyuk EM. [CD117+ cells/telocytes in chronic steatohepatitis and hepatitis C virus infection: histotopographic and quantitative features]. *Morphologia.* 2016;10(3):89-93. Ukrainian.

Вступ

На пізніх стадіях хронічного гепатиту переважають процеси фіброзу та репаративної регенерації. Від їх вираженості та співвідношення, які підтримуються складними регуляторними механізмами, залежить подальша тканинна реор-

ганізація і функціональна недостатність органу. Важливою ланкою такої регуляції є паракринні впливи, які здійснюються групою взаємодіючих спеціалізованих паренхіматозних і інтерстиційних клітин та елементами позаклітинного матриксу. До найменш вивченої на сьогодні клітинної

популяції відносяться телочити (Тлц), вперше описані Popescu L.M. у 2010 році [1]. Ці клітини мають характерний фенотип при електронномікроскопічному дослідженні: від невеликого тіла клітини (9-15 мкм) відходить різна кількість (1-5) винятково довгих (10-1000 мкм) тонких (менше 0.2 мкм) телоподів з ділянками подомерів (80 нм) та подомів (250-300 нм), що чергуються. Ядро, що займає 25% тіла клітини, містить гранули гетерохроматину, прикріплені до ядерної оболонки. Перинуклеарна цитоплазма багата на мітохондрії та містить невеликий комплекс Гольджі, ендоплазматичний ретикулум та цитоскелет. Телоподи зв'язані гомо- та гетероцелюлярними зв'язками та формують трьохвимірну сітку. Телоподи виділяють три типи екстрацелюлярних везикул: екзосоми, ектосоми та мультивезикулярні носії задіяні у паракринній регуляції [2]. Крім того Тлц характеризуються специфічним імунотипом, профілем мікроРНК, генетичними особливостями та протеомними маркерами. Все це дозволяє відрізнити їх від інших інтерстиціальних клітин і перш за все від фіброblastів.

Тлц описані у багатьох органах [3]. Підтвердженою є їх участь у процесах фіброзу та репарації при різних захворюваннях. Зокрема описано зменшення їх кількості у міокарді в ділянках постінфарктного фіброзу, при системному склерозі, хворобі Крона, хронічному гепатиті різного походження [4]. У експериментальних дослідженнях (модель парціальної гепатектомії у мишей) виявлена потенційна роль Тлц у регенерації [5], частина авторів відмічають значення цієї клітинної популяції у регенераторній медицині [6,7]. Але, незважаючи на інтенсивне вивчення залишаються відкритими багато питань щодо ролі Тлц у репаративній регенерації та склерозі, зокрема при циротичній трансформації печінки.

Мета роботи: на основі імуногістохімічного дослідження виявити кількісні та гістотопографічні особливості CD117-позитивних клітин/телочитів при хронічному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С

Матеріали та методи

Було проаналізовано історії хвороби та матеріали автопсійного дослідження 20 розтинів померлих з ознаками хронічного стеатогепатиту (алкогольного та неалкогольного) та вірусного гепатиту С на стадії неповного септального цирозу, проведених у 2010-2014 р.р. у Львівському обласному патологоанатомічному бюро. Підтвердження діагнозу алкогольного стеатогепатиту 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) [8]. Верифікація діагнозу неалкогольного стеатогепатиту включала виявлення проявів метаболічного синдрому та типових морфологічних змін печінки (критерії Brunt, 2010) [9]. У дослідження включались випадки, в яких стадія захворювання складала F2-F3 за METAVIR.

Взяті на секції шматочки тканини печінки фіксували у 10% розчині формаліну та фарбували гематоксилін-еозинном для рутинного патогістологічного опису та трихромом Массона для оцінки ступеня фіброзу. Гістологічні зрізи вивчали під світлооптичним мікроскопом «БІОЛАМ И» (ЛОМО, 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).

Вважається, що електронна мікроскопія є необхідною для ідентифікації Тлц, а імуногістохімічне виявлення подвійних маркерів CD34 та c-kit/CD117 або PDGFR α , віментин допомагає зорієнтувати діагностичний процес. Оскільки метою нашої роботи було вивчення особливостей телочитів при різних захворюваннях, а не їх диференціювання з іншими клітинами, ми обмежились одним імуногістохімічним маркером c-kit/CD117, який деякими авторами вважається найбільш специфічним для даної клітинної популяції [10].

Імуногістохімічне дослідження Тлц проводилось з використанням поліклональних антитіл Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit English code A4502 («DakoCytomation», Данія) з наступним використання системи візуалізації EnVision (DakoCytomation). Оцінку експресії маркера проводили у відповідності з рекомендаціями інших дослідників [11]. Вираженість експресії CD117 визначалась за допомогою морфометричного аналізу з обчисленням відносної площі CD117-позитивних клітин, забарвлених коричневим кольором. Для цього в кожному випадку було досліджено 20 фотографій тканини печінки на великому збільшенні (x400) для оцінки загальної відносної площі, яку займають CD117+ клітини. Великі судини та жовчеві протоки виключались з дослідження. Аналіз зображення проводився за допомогою програми Image-ProPlus (Version 6.).

Одержані дані були представлені у вигляді середніх величин \pm стандартне квадратичне відхилення. Виявлення статистично значущих відмінностей між групами проводилось з визначенням критерію Ст'юдента ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

Загальна характеристика досліджуваних випадків представлена у таблиці 1. У групі хворих на хронічний стеатогепатит включались пацієнти

Таблиця 1

Клініко-морфологічні дані пацієнтів з досліджуваних груп

	Хронічний стеатогепатит (n=10)	Вірусний гепатит С (n=10)
Стать (Ч/Ж)	6/5	7/3
Вік	41-65 (55,7)	22-60 (43,6)
Ступінь фіброзу (METAVIR) (F2,3 – n)	F2 – 7 F3 – 3	F2 – 4 F3 – 6

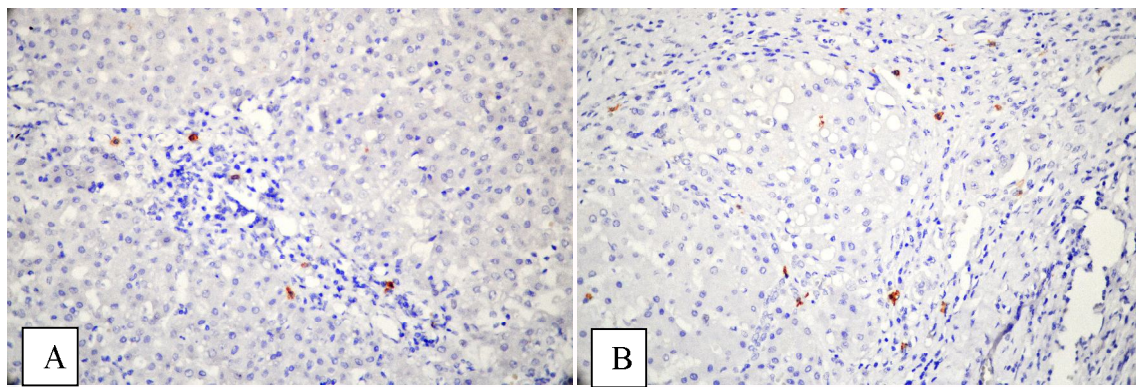


Рис. 1. CD117+ клітини розміщені у пограничній зоні між стромою та паренхімою (коричневий колір). А. Тонка фіброзна септа (стадія фіброзу F2). В. Широка септа, що межує з паренхіматозним вузлом (стадія фіброзу F3). Імуногістохімічне дослідження. $\times 400$.

Результати нашого дослідження показали, що CD117+ клітини виявлялись переважно у септальному компартменті, в більшості випадків у пограничній ділянці між паренхімою та стромою (рис.1).

Для кількісної характеристики досліджуваних клітин більшість авторів застосовували підрахунок CD117+ клітин у одному полі зору на великому збільшенні. Ми віддали перевагу мор-

фометричному аналізу з визначенням відносного показника – % площі, яку займають дані клітини. Результати порівняння цього показника у досліджуваних групах представлені у табл.2. При хронічному стеатогепатиті відносна площа, яку займають CD117+ клітини, є дещо вищою, ніж у випадках вірусного гепатиту С, але виявлені відмінності не є значущими.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика відносної площі, яку займали CD117+ клітини, при хронічному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С

	Хронічний стеатогепатит	Вірусний гепатит С	P
% площі	1,98 \pm 0,25	1,15 \pm 0,4	0,11

На сьогодні вважається, що Тлц виконують функцію підтримки гомеостазу тканини за допомогою формування трьохвимірної сітки із відростків та міжклітинних контактів та відповідно беруть участь у процесах репарації та фіброзу за рахунок впливу на печінкові клітини попередники – компоненти «ніші стовбурових клітин» [12,13,14,15].

S. Fu з колегами (2015) на основі вивчення біопсійного матеріалу хворих на хронічний гепатит різного генезу виявили зменшення кількості Тлц при прогресуванні фіброзу печінки. Автори

запропонували гіпотезу про потенційну роль Тлц у фіброзі печінки, згідно якої імовірно є два механізми: (1) безпосередній вплив на активність фіброгенних клітин, зокрема печінкових зірчастих клітин; (2) сприяння фіброзу за рахунок взаємодії з печінковими клітинами-попередниками – компонентами «ніші стовбурових клітин» [16].

Роль Тлц у регенерації печінки вивчалась в експериментальній роботі F.Wang (2014). Автори на основі дослідження печінки мишей після парціальної гепатектомії протягом 168 годин виявили зростання кількості Тлц на момент максима-

льної проліферативної активності паренхіматозних клітин [5].

Згідно сучасних поглядів тканинна реорганізація, характерна для хронічних захворювань печінки, є результатом динамічної рівноваги між прогресією та регресією процесів фіброзу та репаративної регенерації. При цьому описано декілька варіантів поєднання та розвитку цих процесів, які асоціюються з різними етіологічними чинниками та стадіями захворювання (перисинусоїдний фіброз на місці загиблих гепатоцитів, дуктулярна реакція в поєднанні з перипортальним фіброзом та інші) [17]. Виходячи із потенційної центральної регулюючої ролі Тлц, можна думати, що кількісні та гістотопографічні особливості цієї клітинної популяції можуть відображати різні морфогенетичні варіанти репарації та фіброзу і використовуватись при диференційній діагностиці хронічних гепатитів. Одержані нами результати підтверджують наявність таких особливостей, але потребують подальших досліджень.

Основним обмеженням даного дослідження

є використання лише одного імуногістохімічного маркера CD117+, в той час як інші автори застосовували подвійне або потрійне забарвлення. Звичайно, за таких умов достовірність результатів підвищується, але в той же час наша робота показала, що навіть урахування експресії лише одного маркера CD117 дозволяє аналізувати особливості поширеності та гістотопографії даної клітинної популяції.

Підсумок

CD117+ клітини виявлялись переважно у септальному компартменті на межі стромальних та паренхіматозних елементів. Експресія маркера CD117 була більш вираженою при хронічному стеатогепатиті, ніж у випадках вірусного гепатиту С.

Перспективи подальших розробок

Оскільки прогресування хронічного гепатиту у значному ступені залежить від балансу між репаративною регенерацією та фіброзом, розуміння ролі Тлц у цих процесах дозволить вивчити різні патогенетичні механізми захворювань та розробити варіанти їх фармакологічної корекції.

Літературні джерела References

1. Popesku LM, Faussone-Pellegrini MS. Telocytes – a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of cajal (icc), via interstitial cajal-like cells (ICLC) to telocytes. *J Cell Mol Med.* 2010;14:729-40.
2. Xiao J, Wang F, Liu Z, Yang C. Telocytes in liver: electron microscopic and immunofluorescent evidence. *J Cell Mol Med.* 2013;17(12):1537-42.
3. Nizyaeva NV, Shchegolev AI, Marey MV, Suchich GT. [Interstitial Pacemaker Cells]. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2014;7-8:17-24.
4. Cretoiu SM, Popesku LM. Telocytes revisited. *Biomol Concepts.* 2014;5(5):353-69.
5. Wang F, Song Y, Bei Y, Zhao Y, Xiao J, Yang C. Telocytes in liver regeneration: possible roles. *J Cell Mol Med.* 2014;18:1720-6.
6. Bei Y, Wang F, Yang C, Xiao J. Telocytes in regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* 2015;19(7):1441-54.
7. Boos AM, Weigand A, Brodbeck R, Beier JP, Arkudas A, Horch RE. The potential role of telocytes in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;55:70-8.
8. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24:289-93.
9. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16(42):5286-96.
10. Mirancea N. Telocyte - a particular cell phenotype. Infrastructure, relationships and putative functions. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(1):7-21.
11. Dabbs D., author. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic application. 3rd ed. New-York: Saunders Elsevier; 2010. 1452 p.
12. Zheng Y, Bai C, Wang X. Telocyte morphologies and potential roles in diseases. *J Cell Physiol.* 2012;227(5):2311-7.
13. Ibbá-Manneschi L, Rosa I, Manetti M. Telocyte implications in human pathology: An overview. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;55:62-9.
14. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Díaz-Flores LJr, Gomez MG, Saez FJ, Madrid JF. Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;55:50-61.
15. Liu J, Cao Y, Song Y, Huang Q, Wang F, Yang W, Yang C. Telocytes in Liver. *Curr Stem Cell Re Ther.* 2016;11(5):415-9.
16. Fu S, Wang F, Yang C, Xiao J. Telocytes in human liver fibrosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2015;19(3):676-83.
17. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translation success story. *Gut.* 2015;64(5):830-41.

Гаврилук Е.М. CD117+клетки/телоциты при стеатогепатите и вирусном гепатите С: гистото-

пографические и количественные особенности.

Реферат. Анализ ткани печени в 20 аутопсийных наблюдениях хронического гепатита (стеатогепатита и вирусного гепатита С) показал, что CD117+ клетки/телоциты выявлялись преимущественно в интерстициальном компартменте на границе стромальных и паренхиматозных элементов – в зоне «ниши стволовых клеток». Экспрессия маркера CD117 была более выраженной при хроническом стеатогепатите, чем в случаях вирусного гепатита С, но отличия не были статистически значимыми.

Ключевые слова: CD117+клетки/телоциты, хронический стеатогепатит, вирусный гепатит С.