

РОЛЬ МАКРОФАГІВ У МОРФО- І ПАТОГЕНЕЗІ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТУ

В. В. Ільченко, О. О. Дядик,
В. І. Заріцька, Ю. І. Бекетова

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика

У роботі розглянуто питання ролі популяції печінкових макрофагів у морфо- та патогенезі неалкогольного стеатогепатиту (NASH). Головним завданням стало продемонструвати зв'язок між кількістю Купферівських клітин у біоптаті печінки та розвитком фіброзу, використовуючи сучасні підходи до статистичного аналізу патоморфологічних даних. Визначення морфологічних аспектів розвитку NASH є актуальним питанням у сучасних дослідженнях, оскільки дана патологія стає однією з провідних причин розвитку цирозу печінки та печінкової недостатності. Робота спрямована на виявлення кореляції між кількістю CD68-позитивних клітин Купфера в біоптатах печінки зі ступенем фіброзу печінки за індексом METAVIR. За результатами дослідження встановлено, що наявна статистично достовірна відмінність між рівнями експресії маркера макрофагів CD68 між різними групами пацієнтів, розподіленими за ступенем фіброзу печінки за індексом METAVIR. Доведено, що наявна статистично-достовірна лінійна кореляція між рівнями експресії маркера макрофагів CD68 зі ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR. У подальшому необхідно дослідити гіпотезу про кореляції між кількістю підгрупи печінкових макрофагів, асоційованих із фіброзуванням (TREM2 і CD9 позитивних рубцево-асоційованих макрофагів) із ступенем фіброзу печінки, спираючись на статистично достовірні результати даного дослідження.

Ключові слова: неалкогольний стеатогепатит, фіброз печінки, макрофаги, Купферівські клітини, CD68, TREM-2, METAVIR.

THE ROLE OF MACROPHAGES IN THE MORPHO- AND PATHOGENESIS OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

V. V. Ilchenko, O. O. Dyadyk,
V. I. Zaritska, Yu. I. Beketova

Shupyk National Healthcare University of Ukraine

Background. The issues of modern data analytics are considered, among which the risk of discrimination is the most acute. There are still no major studies on this topic in pathomorphology. Our work aims to identify the causes and consequences of discrimination in data mining and explore potential solutions to this problem. The purpose of the work was to identify the correlation between the number of CD68-positive Kupffer cells in liver biopsies and the degree of liver fibrosis according to the METAVIR index.

Materials and methods. Results. According to the results of the study, it was established that there is a statistically significant difference between the expression levels of the CD68 marker between different groups of patients, divided by the degree of liver fibrosis according to the METAVIR index. It was proved that there is a statistically significant linear correlation between the expression levels of the CD68 marker and the degree of liver fibrosis according to the METAVIR Index.

Conclusions. In the future, it is necessary to investigate the hypothesis regarding the correlation between the number of a subpopulation of scar-associated liver macrophages (TREM2 and CD9 positive macrophages) and the degree of liver fibrosis, based on the statistically reliable results of this study.

Keywords: nonalcoholic steatohepatitis, liver fibrosis, macrophages, Kupffer cells, CD68, TREM-2, METAVIR.

Вступ. Неалкогольний стеатогепатит (NASH) є запальним підтипом неалкогольної жирової хвороби печінки (NAFLD) та пов'язаний із прогресуванням захворювання, розвитком цирозу, подальшою потребою в трансплантації печінки [1]. Сьогодні NASH є однією з головних причин розвитку гепатоцелюлярної карциноми – щорічна частота виникнення якої в 12 разів вища в групі пацієнтів із NASH у порівнянні з пацієнтами з NAFLD [2, 3]. Морфологічні відмінності NASH від ізольованого стеатозу печінки полягають у наявності запалення,

гепатоцелюлярного ураження та різного ступеню фіброзу [4]. Незважаючи на свою важливість цьому захворюванню приділяється недостатньо уваги в клінічній практиці.

У виникненні та прогресуванні NASH і запальних захворювань печінки вагому роль відіграє порушення функціонування популяції макрофагів печінки, роль яких полягає в «оркеструванні» запального процесу, ангіо- і фіброгенезу та інших процесів, порушення рівноваги яких може призводити до прогресування захворювання

та розвитку фіброзу [5]. Треба зауважити, що при прогресуванні NASH під дією цитокінів, метаболітів ліпідів та інших сигнальних молекул відбувається динамічна активація макрофагів печінки [6, 7]. Популяція макрофагів печінки в основному складається з Купферівських клітин (що є CD68-позитивними) та стаціонарно знаходяться в печінці та циркулюючих макрофагів моноцитарного походження [8]. Дослідження останніх років виявили ще одну патогенну субпопуляцію макрофагів, що отримала назву рубцево-асоційованих макрофагів, ці клітини дають позитивну експресію з імуногістохімічними маркерами TREM2 і CD9 та була доведена позитивна кореляція між експансією даної субпопуляції макрофагів із ступенем індукованого NASH фіброзу печінки [9].

Мета дослідження: виявлення кореляції між кількістю CD68-позитивних клітин Купфера в біоптатах печінки зі ступенем фіброзу печінки за індексом METAVIR.

Концепція дослідження. За основу концепції дослідження прийнято гіпотезу, відповідно до якої існує кореляція між кількістю CD68-позитивних клітин Купфера (в 10 полях 0.2 мм² із найвищим маркуванням («hot spots»), зі ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR [10]. Для визначення ступеню фіброзу використовувалось додаткове гістохімічне забарвлення Masson trichrom та Van Gieson's trichrome, імуногістохімічне дослідження (ІГХД) із α -SMA (α -гладком'язовим актином).

Матеріал і методи дослідження. План дослідження. Виходячи з типу наявних даних і мети дослідження для отримання статистично достовірних результатів обрано ретроспективний тип дослідження.

Нами було відібрано 53 клінічних випадки з діагнозом NASH із наявними парафіновими блоками з тканинами трепан-біопсій печінки. Після патоморфологічної оцінки гістологічного матеріалу кожного з даних кейсів їх було розподілено на такі групи:

I. Група A1 (20 випадків) із ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR від F0 до F1.

II. Група A2 (18 випадків) із ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR від F2 до F3.

III. Група A3 (15 випадків) із ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR F4 і цирозом печінки.

Використовувалось таке забарвлення гістологічного матеріалу всіх 53 випадків:

1. Стандартне забарвлення гематоксиліном та еозином для загальної морфологічної оцінки кожного препарату.

2. Гістохімічне дослідження з Masson trichrom та Van Gieson's trichrome та ІГХД з α -SMA для визначення наявності, розповсюдження та ступеню фіброзу.

3. ІГХД із моноклональним антитілом (МКА) до CD68 (Clone PG-M1) із подальшим проведенням оцінювання експресії відповідно до шкал і рекомендацій виробника даного клону.

Наведемо приклади клінічних випадків, що були віднесені до відповідних груп.

Приклад клінічного випадку групи A1. Пацієнт 13 років. Морфологічні ознаки свідчать на користь хронічного стеатогепатиту з мінімальною активністю (Індекс Knodell 9 балів) і відсутністю ознак Фіброзу (F0 за METAVIR). На рис. 1 представлена морфологічна картина в біоптаті даного пацієнта при забарвленні гематоксиліном та еозином – спостерігаються дегенеративні зміни гепатоцитів за типом переважно велико- та в окремих ділянках дрібно-крапельної жирової дистрофії, ділянки зернистої та вакуольної дистрофії гепатоцитів.

Вогнищеві лімфо-гістіоцитарні інфільтрати навколо триад, уздовж частини порталних трактів, поодинокі лімфоцити в печінкових дольках проміж гепатоцитів. На рис. 2 імуногістохімічна реакція з МКА до CD68 виявила помірну кількість макрофагів у клітинних інфільтратах навколо триад, зустрічаються макрофаги всередині дольок, окремі позитивні Купферівські клітини.

Приклад клінічного випадку групи A2. Пацієнтка 43 років. Морфологічні ознаки свідчать на користь хронічного стеатогепатиту – II G moderate (помірна стадія) з помірно вираженою активністю. Індекс гістологічної активності (індекс Knodell) 10 балів, фіброз (F2 за METAVIR). Забарвлення гематоксиліном та еозином на рис. 3 демонструє набряк паренхіми, тенденцію до порушення архітектоніки за рахунок виразних дегенеративних змін гепатоцитів за типом велико- та на окремих ділянках дрібно-краплинної жирової дистрофії, наявна гіпертрофія окремих Купферівських клітин; перипортальні, внутрішньочасточкові некротизовані гепатоцити, частина порталних трактів нерівномірно розширені, вогнищеві дрібні лімфо-гістіоцитарні клітинні інфільтрати навколо триад, уздовж порталних трактів, сегментарно дрібні запальні клітини проміж гепатоцитів, нерівномірно

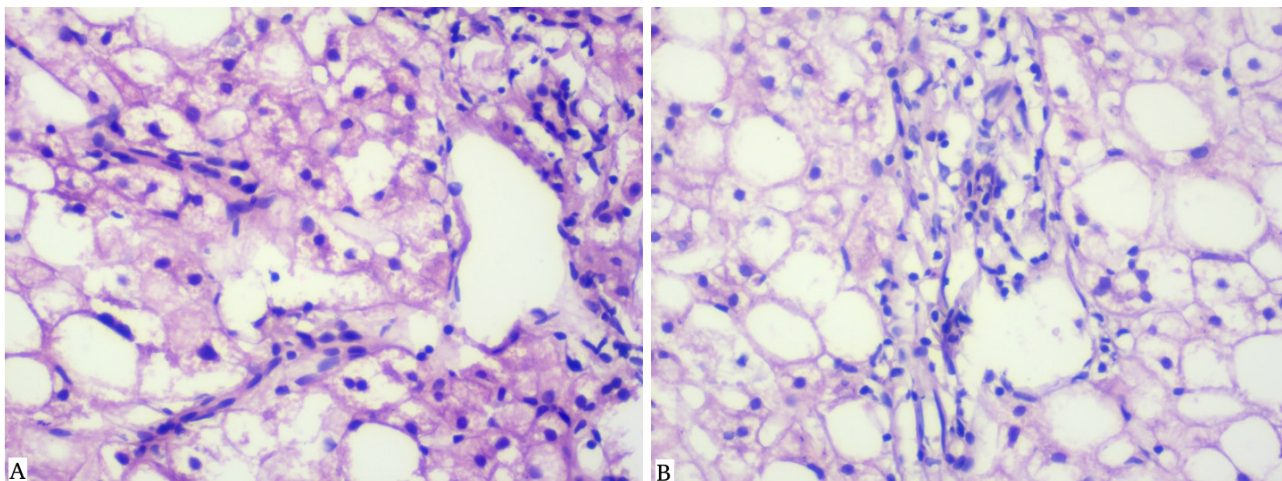


Рис. 1. Дегенеративні зміни гепатоцитів, вогнищеві лімфо-гістіоцитарні інфільтрати. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 200$ (А, В)

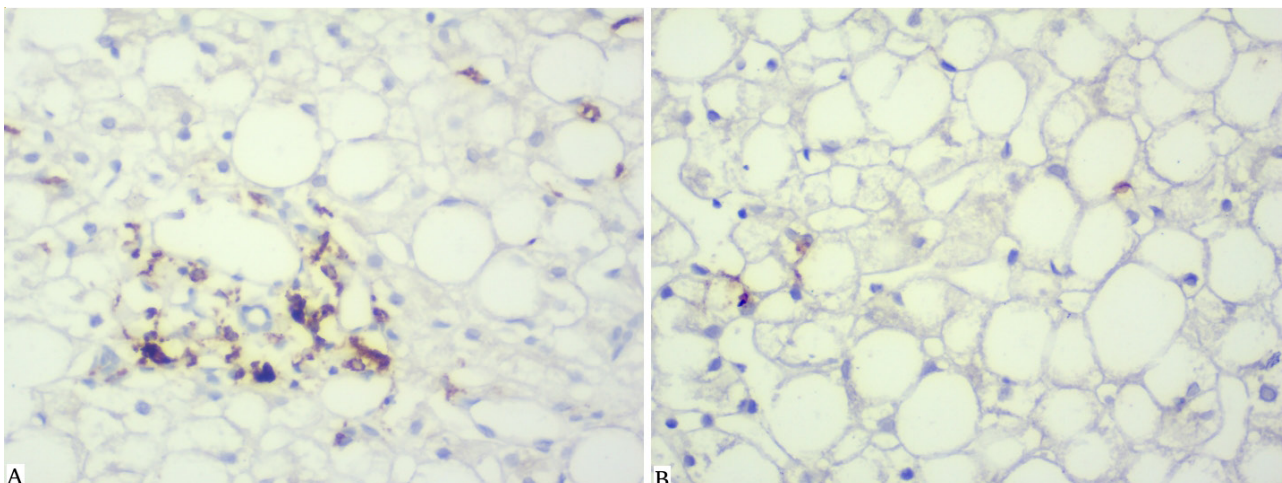


Рис. 2. Помірна кількість макрофагів у клітинних інфільтратах. Імуногістохімічна реакція з МКА до CD68, збільшення $\times 200$ (А, В)

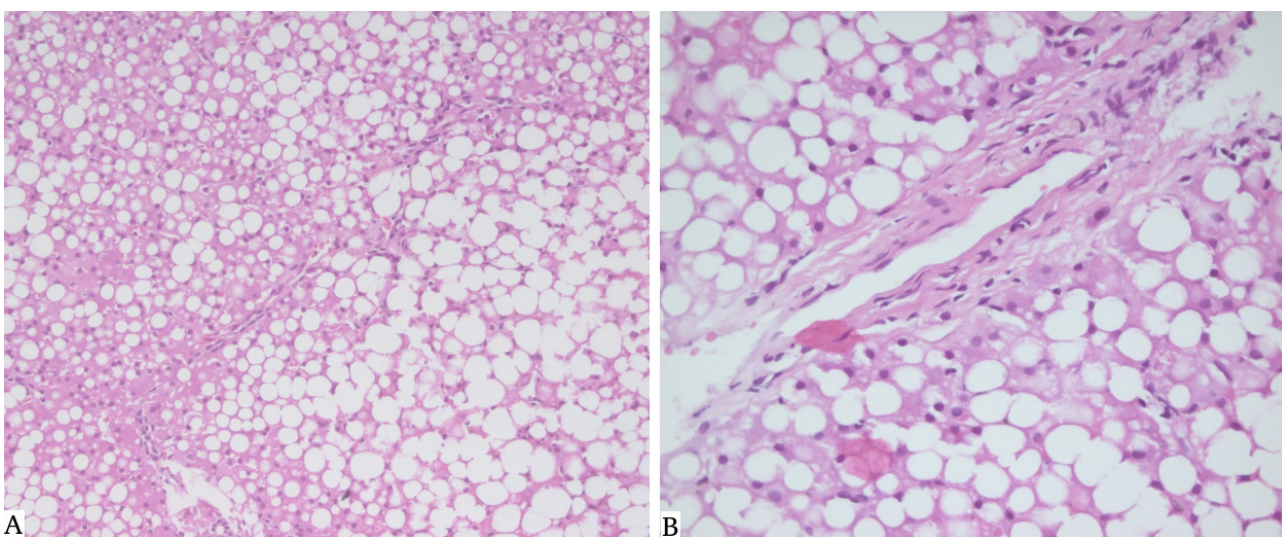


Рис. 3. Дегенеративні зміни гепатоцитів за типом жирової дистрофії, вогнищеві дрібні лімфо-гістіоцитарні клітинні інфільтрати, перипортальний фіброз. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення А $\times 100$, В $\times 200$ (А, В)

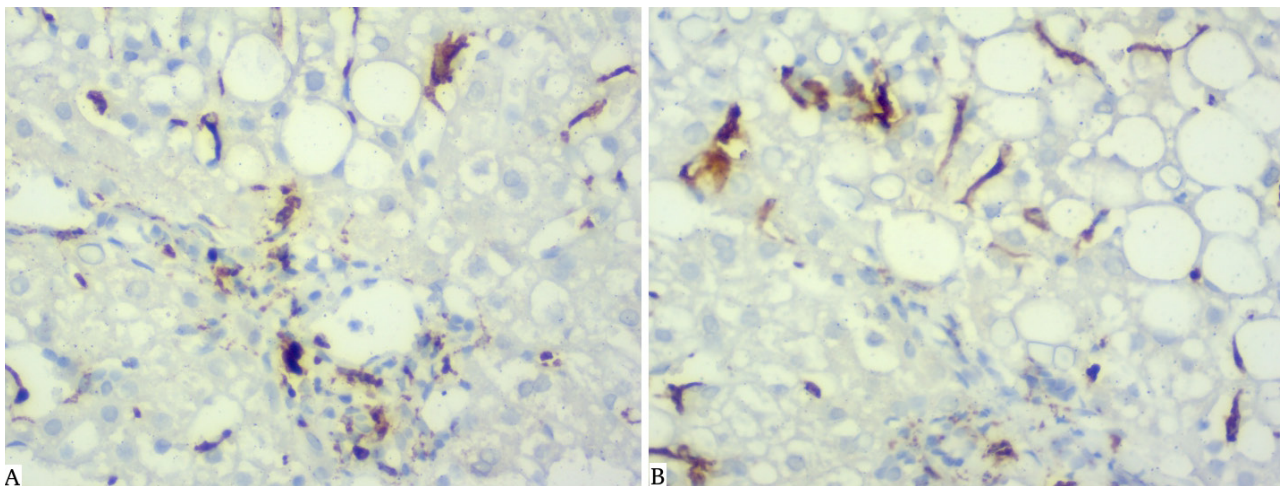


Рис. 4. Більша кількість макрофагів у порівнянні з попереднім пацієнтом із групи А1. Імуногістохімічна реакція з МКА до CD 68, збільшення x200 (А, В)

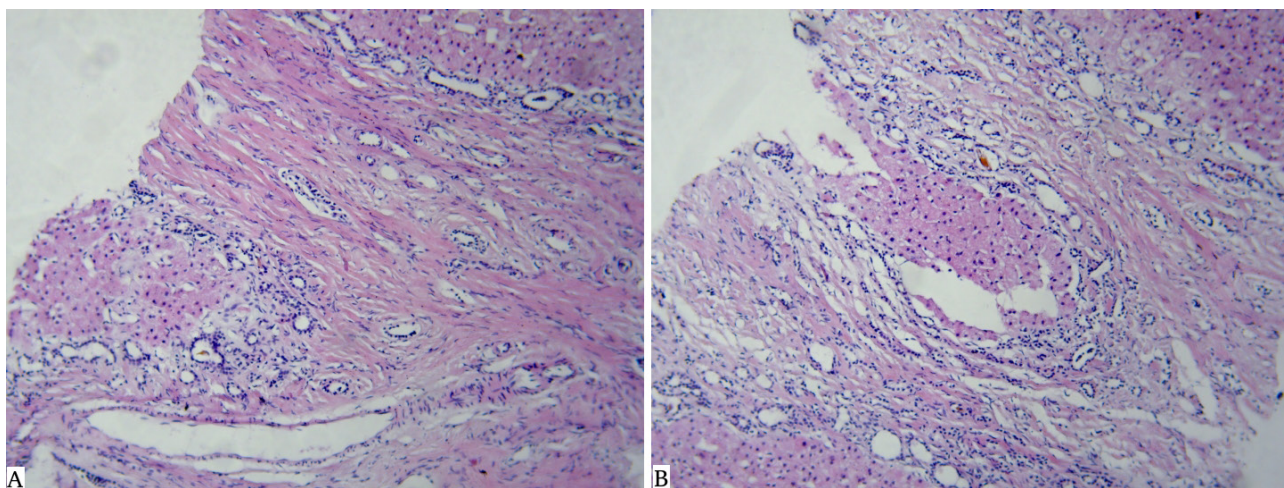


Рис. 5. Розростання сполучної тканини, формування септ, виразний фіброз портальних трактів, формування хибних дольок. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення x200 (А, В)

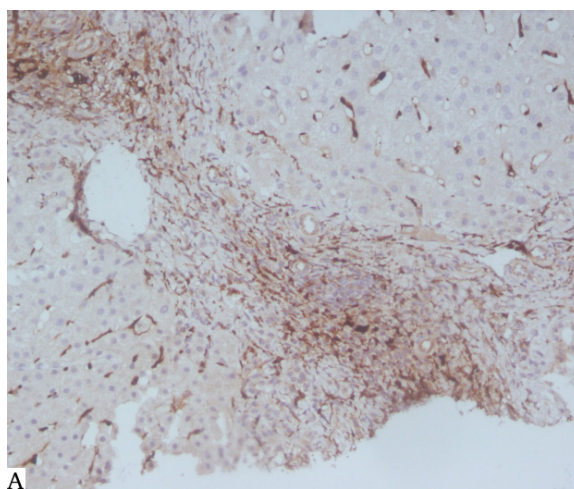


Рис. 6. Велика кількість виразної експресії макрофагів, позитивні гіпертрофовані Купферівські клітини. Імуногістохімічна реакція з МКА до CD68, збільшення x200

виразний перисинусоїдальний, перипортальний фіброз. ІГХ реакція з МКА до CD68 на рис. 4 виявила більшу кількість макрофагів в клітинних інфільтратах навколо тріад, всередині дольок і Купферівських клітин, у порівнянні з попереднім пацієнтом із групи А1.

Приклад клінічного випадку групи А3. Пацієнтка 29 років із розвитком цирозу печінки та портальною гіпертензією. Як бачимо на рис. 5 при забарвленні гематоксиліном та еозинном у біоптаті даної пацієнтки визначаються ознаки порушення архітекτονіки за рахунок розростання різного ступеню зрілості сполучної тканини, формування внутрішньодолькових, порто-портальних, порто-центральных септ, виразний фіброз портальних трактів, формування хибних дольок різного розміру. На рис. 6 ІГХ реакція з МКА до CD68 виявила велику кількість виразної експресії макрофагів в клітинних інфільтратах, у ділянках фіброзу, всередині дольок, позитивні гіпертрофовані Купферівські клітини.

Для оброблення результатів дослідження використовувалась мова програмування R із наявними в її середовищі пакетами бібліотеками для статистичної обробки даних [11]. У ході дослідження нами побудовано лінійну модель для формування зв'язку між ступенем фіброзу за індексом METAVIR (з відповідним розподілом на групи дослідження, що був описаний вище) та кількістю CD68-позитивних клітин (у 10 полях 0.2 мм² із найвищим маркуванням («hot spots») із урахуванням даних, отриманих із кожного з 53 кейсів. Наступним кроком було використання простої лінійної регресії [12] для встановлення зв'язку між двома описаними вище параметрами дослідження.

Результати та їх обговорення. За результатами статистичної обробки отриманих даних встановлено, що наявна наступна статистично достовірна відмінність між рівнями експресії маркеру CD68:

- Між групами А1 і А2: $t\text{-score} = 1.58735$, $p = 0.022341$
- Між групами А1 і А3: $t\text{-score} = 4.02492$, $p = 0.031528$

Література.

1. Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults / Marengo A., Jouness R. I. K., Bugianesi E. // Clin Liver Dis. – 2016. – № 20, 2. – P. 313-324.
2. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Spectrum of Clinical and Pathological Severity / Matteoni C. A., Younossi Z. M., Gramlich T., Voparai N., Liu Y. C.,

- Між групами А2 і А3: $t\text{-score} = 2.26312$, $p = 0.028417$.

Після аналізу даних можна зробити висновок про існування статистично-достовірної лінійної кореляції між рівнями експресії маркеру CD68 зі ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR.

Беручи до уваги актуальність патоморфологічних досліджень NASH і статистично достовірні результати даного дослідження можливо запропонувати проведення подібних досліджень для окремих субпопуляцій макрофагів печінки для більш точного виявлення причинно-наслідкових зв'язків між даними клітинами і розвитком та прогресуванням NASH.

Враховуючі потужну інфраструктуру комп'ютерної мови R із наявністю великої кількості пакетів та бібліотек із відкритим кодом ми вважаємо доцільним розробку комп'ютерної моделі для статистично достовірного прогнозування ступеню фіброзу печінки, що працюватиме спираючись на аналіз даних по різним популяціям макрофагів у біоптаті печінки та це є подальшою темою нашого дослідження.

Висновки. 1. За результатами дослідження встановлено, що наявна статистично достовірна відмінність між рівнями експресії маркеру макрофагів CD68 між різними групами пацієнтів, розподіленими за ступенем фіброзу печінки за індексом METAVIR.

2. Доведено наявність статистично-достовірної лінійної кореляції між рівнями експресії маркеру макрофагів CD68 зі ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR.

3. У подальшому необхідно дослідити гіпотезу про кореляцію між кількістю підгрупи печінкових макрофагів, асоційованих із рубцями (TREM-2 позитивних макрофагів) із ступенем фіброзу печінки, спираючись на статистично достовірні результати даного дослідження.

McCullough A. J. // Gastroenterology. – 1999. – № 116, 6. – P. 1413-1419.

3. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes / Younossi Z. M., Koenig A. B., Abdelatif D., Fazel Y., Henry L., Wymer M. // Hepatology. – 2016. – № 64, 1. – P. 73-84.

4. Nonalcoholic steatohepatitis: a Review / Sheka A. C., Adeyi O., Thompson J., Hameed B., Crawford P. A., Ikramuddin S. // *JAMA*. – 2020. – № 23. – P. 1175-1183.

5. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis / Kazankov K., Jorgensen S. M. D., Thomsen K. L., Moller H. J., Vilstrup H., George J. et al. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2019. – № 16. – P. 145-159.

6. Adapted immune responses of myeloid-Derived cells in fatty liver disease / Hundertmark J., Krenkel O., Tacke F. // *Front Immunol*. – 2018. – № 9. – P. 2418.

7. Mechanisms of fibrosis development in nASH / Schwabe R. F., Tabas I., Pajvani U. B. // *Gastroenterology*. – 2020. – № 158. – P. 1913-1928.

8. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis / Tacke F., Zimmermann H. W. // *J Hepatology*. – 2014. – № 60. – P. 1090-1096.

References.

1. Marengo, A., Jouness, R. I. K., Bugianesi, E. (2016). Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. *Clin Liver Dis*. 20(2), 313-324. DOI: 10.1016/j.cld.2015.10.010.

2. Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., McCullough, A. J. (1999). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Spectrum of Clinical and Pathological Severity. *Gastroenterology*. 116(6), 1413-1419. DOI: 10.1016/j.cld.2015.10.010.

3. Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 64(1), 73-84. DOI: 10.1002/hep.28431.

4. Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., Ikramuddin S. (2020). Nonalcoholic steatohepatitis: a Review. *JAMA*. 23, 1175-1183. DOI: 10.1001/jama.2020.2298.

5. Kazankov, K., Jorgensen, S. M. D., Thomsen, K. L., Moller, H. J., Vilstrup, H., George, J., Schuppan, D., Gronbaek, H. (2019). The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 16, 145-159. DOI: 10.1038/s41575-018-0082-x.

6. Hundertmark, J., Krenkel, O., Tacke, F. (2018). Adapted immune responses of myeloid-Derived cells in fatty liver disease. *Front Immunol*. 9, 2418. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02418.

7. Schwabe, R. F., Tabas, I., Pajvani, U. B. (2020). Mechanisms of fibrosis development in nASH.

9. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level / Ramachandran P., Dobie R., Wilson-Kanamori J. R., Dora E. F., Henderson B. E. P., Luu N. T. et al. // *Nature*. – 2019. – № 575. – P. 512-518.

10. BMS-986263 in Patients with Advanced Hepatic Fibrosis: 36-Week Results from a Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial / Lawitz E.J., Shevell D.E., Tirucherai G.S., Du S., Chen W., Kavita U., Coste A., Poordad F., Karsdal M., Nielsen M. et al. // *Hepatology*. – 2021. – № 75, 4. – P. 912-923.

11. Applying Statistical Methods to Library Data Analysis / Yongming W., Jia M. // *The Serials Librarian*. – 2019. – № 76, 1-4. – P. 195-200.

12. Simple linear regression approach for evaluating models to estimate stature based on upper limb dimensions of adult Bangladeshi males / Hossain Parash M. T., Rahman M. M., Naushaba H. et al. // *Egypt J Forensic Sci*. – 2022. – № 12, 20.

Gastroenterology. 158, 1913-1928. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.11.311.

8. Tacke, F., Zimmermann, H. W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. 60, 1090-1096. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.12.025.

9. Ramachandran, P., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J. R., Dora, E. F., Henderson, B. E. P., Luu, N. T. et al. (2019). Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature*. 575, 512-518. DOI: 10.1038/s41586-019-1631-3.

10. Lawitz, E. J., Shevell, D. E., Tirucherai, G. S., Du, S. et al. (2021). BMS-986263 in Patients with Advanced Hepatic Fibrosis: 36-Week Results from a Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *Hepatology*. 75(4), 912-923. DOI: 10.1002/hep.32181.

11. Yongming, W., Jia, M. (2019). Applying Statistical Methods to Library Data Analysis. *The Serials Librarian*. 76, 1-4, 195-200. DOI: 10.1080/0361526X.2019.1590774.

12. Hossain, Parash, M. T., Rahman, M. M., Naushaba, H., Sharmin, H., Choudhury, S. (2022). Simple linear regression approach for evaluating models to estimate stature based on upper limb dimensions of adult Bangladeshi males. *Egypt J Forensic Sci*. 12(20). DOI: 10.1186/s41935-022-00277-3.

ORCID:

Vladyslav V. Ilchenko: 0000-0002-6790-9230

Olena O. Dyadyk: 0000-0002-9912-4286

Valentyna I. Zaritska: 0000-0002-8837-8213

Yuliya I. Beketova: 0000-0001-8635-1802