

УДК 616.36-003.826 + 616-091.8

МОРФОМЕТРИЧНА КАРТИНА ПЕЧІНКИ ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНІЙ ЖИРОВІЙ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, ПОЄДНАНІЙ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ТИПУ 2**С.А.Павловський**, Національний університет імені О.О.Богомольця

Резюме. Патогістологічна картина печінки вивчена на автопсійному матеріалі від 5 хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки, поєднану з цукровим діабетом типу 2. Контролем служили шматочки печінки 5 раптово померлих здорових осіб. При НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом патоморфологічна картина характеризується поліморфністю гістологічних змін при збереженій загальній будові часточки. Численні гепатоцити централобулярної (третьої) зони містили жирові вакуолі у вигляді жирових крапель різного розміру та ацидофільну зернистість. Тіла і ядра гепатоцитів деформовані. Гепатоцити в першій і другій (перипортальній і проміжній) зонах виявляли ознаки дрібно- і крупновакуольної дистрофії, деформації, апоптозу. Часто спостерігали вогнища фокального некрозу, між другою і третьою зоною печінкової часточки визначалися мостоподібні некрози. Площа профілю гепатоцита, у середньому, збільшилася до $(231,94 \pm 11,05)$ мкм², площа профілю ядра зменшилася до $(13,26 \pm 0,42)$ мкм², співвідношення між площею профілю ядра і площею профілю клітини зменшилося до $(0,12 \pm 0,005)$, коефіцієнт форми гепатоцита і ядра виявив ознаки їхньої деформації. Кореляційний аналіз показав, що ступінь кореляції між показником площі гепатоцита і ядра позитивна: $r=0,49$; характер кореляційної залежності між показниками площі профілю гепатоцита і відношенням площ профілей ядра і клітини оберненопропорційний $r=-0,75$; між площею профілю ядра (S_n) та коефіцієнтом його форми (F_n) встановлені оберненопропорційні кореляційні відношення $r=-0,018$.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, цукровий діабет, гепатоцити, морфометрія.

Вступ. За різними даними поширеність неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) є досить високою і його зростання набуває швидких темпів. Деякі автори вказують на частоту НАЖХП не менше 30% від усієї популяції [3]. І.М. Скрипник [4] повідомив, що тільки 1% пацієнтів, які звернулися до лікаря-терапевта з різних приводів, знають про те, що в них розвивається НАЖХП, а решта не підозрюють за це. Нині, гістологічна оцінка проведених прижиттєвих біопсій печінки є «жорстко кінцевою точкою», яка може бути визначена з достатньо великою надійністю [6]. Біопсія печінки залишається «золотим стандартом» для діагностики та визначення кількості некрозозапальної активності, наявності чи відсутності фіброзу, а також ремоделювання паренхіми печінки у хворих на НАЖХП. Водночас визнані обмеження біопсії. Виконання біопсії печінки в кожного пацієнта з підозрою на НАЖХП залишається спірним питанням у повсякденній практиці, явно не

практичне її застосування в якості інструменту «скрінінгу» [5].

Дослідження автопсійного матеріалу залишається актуальним, особливо з метою порівняння з клінічною картиною захворювання. Тобто при розгортанні патологічного процесу при захворюваннях печінки на підставі біохімічних, ультрасонографічних та інших ознак НАЖХП і відповідної при цьому захворюванні патогістологічної картини можна уточнити діагноз і окреслити заходи з метою подальшої поглибленої діагностики, виставлення остаточного діагнозу і призначення відповідного курсу лікування таких хворих.

Мета роботи - вивчити патогістологічну і морфометричну картину печінки хворих на НАЖХП, поєднану з цукровим діабетом типу 2, із конкретизацією морфометричних параметрів гепатоцитів.

Матеріал і методи дослідження. Патогістологічна картина печінки вивчена на

автопсійному матеріалі від 5 хворих на НАЖХП, діагноз яким був виставлений прижиттєво на підставі аналізу перебігу захворювання, біохімічних досліджень та ультразвукового обстеження. Контролем служили шматочки печінки 5 раптово померлих здорових осіб без клінічних лабораторних проявів пошкодження печінки.

Матеріал фіксували в 10% нейтральному формаліні. Зрізи з парафінових блоків забарвлювали гематоксином і еозином, згідно класичних прописів патогістологічної техніки і вивчали в світловому мікроскопі.

Морфометричне дослідження гепатоцитів здійснювали за допомогою аналізатора зображень (мікроскоп Люмам Р-8 із мікрофотонасадкою МФН-10-1, оптичний перехідний пристрій, телевізійна камера Косом (digital CCD color camera КСС-310 ND/PD), фреймграббер із програмним забезпеченням Fly video серії EZ та персональний комп'ютер). Застосовували програмне забезпечення UTHSCSA Image ToolT for Windows T (version 2.00) в інтерактивному режимі з використанням об'єктива $\times 40$ і фотоокуляра $\times 1,7$. Калібрування аналізатора зображень здійснювали з допомогою тестового зразка "МИРА" (ГК 7.216.028-01, виробництво НДІ "Квант". Зображення фрагментів печінкової часточки послідовно сканували і записували у вигляді окремих *.tff-файлів, із використанням рекомендацій О.І. Дельцової і співавт. [1].

Визначали такі показники гепатоцитів: площу профілю клітин (Sh) та їхніх ядер (Sn), співвідношення між площею профілю ядра і площею профілю гепатоцита (Sn/Sh), коефіцієнт форми гепатоцита (Fh) та його ядра (Fn) за рекомендаціями В.Л. Ісакова, В.Г. Пінчука, Л.М. Ісакової [2]. Для кожного випадку було зроблено виміри 500 одноядерних гепатоцитів, в яких зріз пройшов через ядерець.

Варіаційно-статистичний метод аналізу отриманих результатів виконували за допомогою персонального комп'ютера та прикладної програми для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel. Статистичну обробку матеріалу здійснювали

методами парної статистики, а також використовували метод відмінності, із використанням t-критерію Ст'юдента "STATISTICA for Windows®". Результати вважалися вірогідними в тому випадку, коли коефіцієнт достовірності був менший або рівний 0,05.

Результати дослідження та їх обговорення. При НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом патоморфологічна картина характеризується поліморфністю гістологічних змін. Цитоархітектоніка печінкових часточок виявила незначні зміни зі збереженням загальної будови часточки. Численні гепатоцити централобулярної (третьої) зони містили жирові вакуолі у вигляді жирових крапель різного розміру. Тут же в цитоплазмі гепатоцитів ідентифікувалась ацидофільна зернистість. Тіла гепатоцитів деформовані. Ядра гепатоцитів не завжди округлі і містять нерівномірно конденсований по периферії хроматин. Гепатоцити у першій і другій (перипортальній і проміжній) зонах виявляли ознаки дрібно- і крупновакуольної дистрофії, при забарвленні зрізів гематоксином і еозином вони виглядали прозорими. Частина гепатоцитів мали дрібні розміри і втрачали округлість форми. Були виражені прояви апоптозу. Часто спостерігали вогнища фокального некрозу. Між другою і третьою зоною печінкової часточки спостерігали мостоподібні некрози.

До ознак стеатогепатиту ми віднесли запальну лімфо-плазмодитарну інфільтрацію в портальній сполучній тканині, а також присутність імуноцитів у третій зоні печінкової часточки. Між гепатоцитами відмічали тонкі сполучнотканинні волокна, що формували перичелюлярний і перисинусоїдальний каркас. Із посиленням фіброзувальних реакцій вміст фіброзної тканини збільшувався і на місці некрозів виникав вогнищевий/поширений фіброз.

У ділянках печінкових тріад зауважили проліферацію жовчних проток, які характеризувалися розширеним просвітом і кубічної форми епітеліоцитами.

Морфометричні показники гепатоцитів за НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом зазнали значних змін. Так, площа профілю гепатоцита, у середньому, збільшилася до $(231,94 \pm 11,05)$ мкм², $p < 0,05$, порівняно зі здоровими – $(190,74 \pm 4,49)$ мкм². Проведене нами морфометричне дослідження гепатоцитів здійснювали не вибірково, а в усьому полі зору мікроскопу на предмет визначення середніх показників площі профілю гепатоцитів та їхніх ядер. При вивченні розподілу гепатоцитів за площею профілю клітини встановлено, що виявлено більше клітин із площею від 150 до 200 мкм² - 37,63%; від 200 до 250 мкм² - 27,18%;

водночас збільшилася в цілому кількість гепатоцитів із площею понад 200 мкм², зокрема, спостерігали клітини з площею 250 до 300 мкм² - 13,12%, понад 300 мкм² - 4,26%. Останні являють собою пул гепатоцитів із крупними ліпідними краплями. У здорових гепатоцити з площею профілю від 100,0 до 150,0 мкм² виявлялись у кількості 21,66%. Кількість клітин із площею від 150,0 до 200,0 мкм² - становило 36,85%. 200,0 до 250,0 мкм² - 24,66%; понад 250,0 мкм² - 15,02%). Тобто найчисленнішою була популяція гепатоцитів із розмірами площі профілю від 150,0 до 200,0 мкм² (рис. 1).

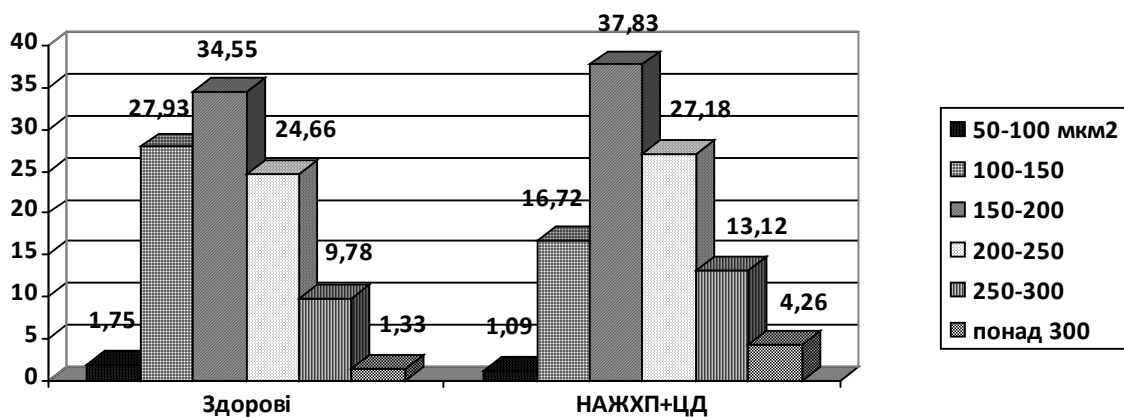


Рис. 1. Гістограма розподілу гепатоцитів (%) за величиною показника площі профілю клітини (мкм²) у здорових і у хворих неалкогольну жирову хворобу печінки, поєднану з цукровим діабетом (НАЖХП+ЦД).

Такий підхід спрямував нас для визначення характеристики клітин при різних патологічних станах. При співставленні результатів світлооптичного і морфометричного дослідження ми визначили, що площа профілю гепатоцитів переважно

зменшувалася, що надало підстав стверджувати про зменшення паренхіми печінки загалом.

Площа профілю ядра зменшилася до $(13,26 \pm 0,42)$ мкм², порівняно зі здоровими – $(31,09 \pm 0,62)$ мкм², $p < 0,05$. Привертає увагу факт, що 2/5 кількості ядер мали площу до 20 мкм²) (табл. 1).

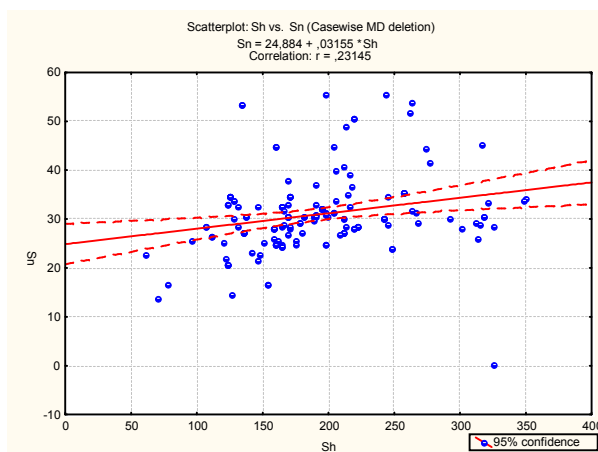
Таблиця 1

Кількість гепатоцитів (%) із різною площею профілю ядер у здорових та у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки

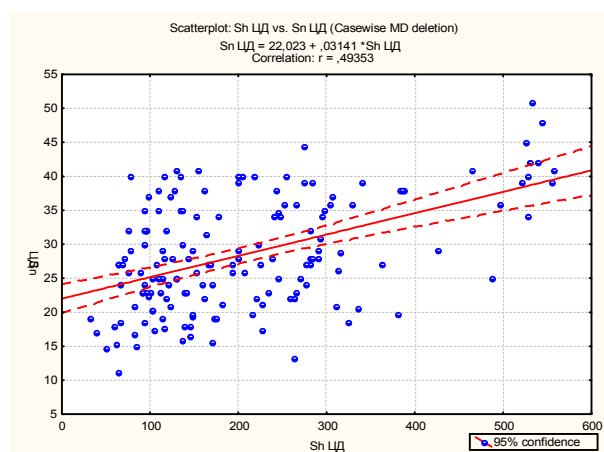
Площа профілю ядра гепатоцита, мкм ²	Здорові (n=5)	Група хворих
		Неалкогольна жирова хвороба печінки в поєднанні з цукровим діабетом типу 2 (n=5)
до 20,0	1,91	1,22
20,0-30,0	40,76	52,76
30,0-40,0	48,41	10,28
40,0-50,0	5,73	5,45
понад 50,0	3,19	10,29

Результати кореляційного аналізу між показником площі профілю гепатоцита і площі профілю його ядра в здорових показали, що ступінь кореляції між показником площі гепатоцита і ядра позитивний (рис. 2А) та описувалася формулою: S_n (площа ядра) = $24,88 \pm 0,03 \times S_h$ (площа гепатоцита), коефіцієнт кореляції $r=0,23$. Позитивна кореляція між цими показниками була найбільш

вираженою у хворих на НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом: $r=0,49$ (формула, за якою описувалася $S_n=23,02 \pm 0,31$ (рис. 2Б). Ці дані вказують на те, що зміни між площею профілю гепатоцита і площею профілю ядра односпрямовані і характеризують однотипність процесів у печінці хворих на НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом.



А



Б

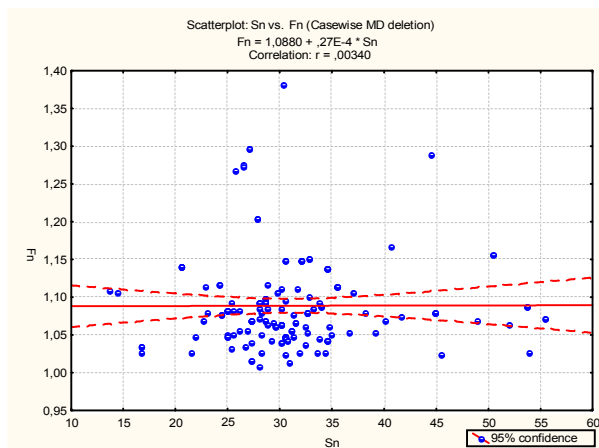
Рис. 2. Кореляційні співвідношення між площами профілей гепатоцита (S_h) та його ядра (S_n) у здорових (А) та у хворих НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом (Б, ЦД)

Співвідношення між площею профілю ядра і площею профілю клітини зменшилося до $(0,12 \pm 0,005)$. Співвідношення, характерне для клітин здорових осіб $(0,15-0,20)$ збереглося в 49,72% гепатоцитів (майже таке саме, як у здорових - 52,87%), тоді як показник, менший від 0,10 зменшився, а понад 0,25 - значно збільшився.

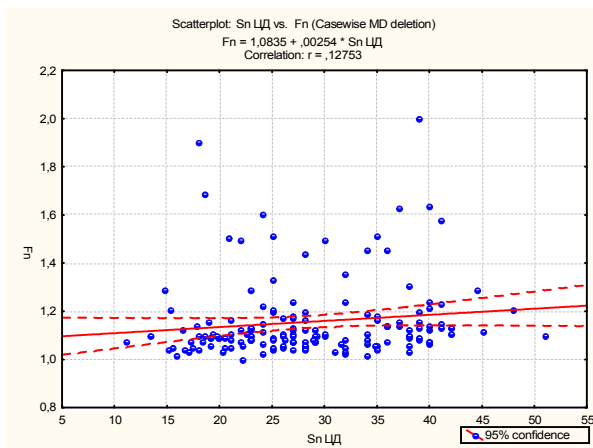
За показниками форми гепатоцитів при НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом клітин із коефіцієнтом форми клітини, який наближає клітини до округлої, виявилось 10,62% (у здорових - 26,10%). Водночас спостерігаються 21,11% клітин із коефіцієнтом понад 1,30 (у здорових - 11,43%), що засвідчує виражену деформацію таких клітин.

Найбільш значні зміни встановлені щодо форми ядра. Ядра тільки 50,65% гепатоцитів наближалися до округлої форми (коефіцієнт форми ядра - 1,00-1,10), тоді як у здорових –

72,61%. З'являється багато гепатоцитів із деформованими ядрами (коефіцієнт форми - понад 1,30), їх налічується 36,66%. Таким чином, морфометрична характеристика гепатоцитів доповнює й уточнює їхній морфофункціональний стан, підкреслює, що зміни печінки при стеатозі не обмежуються жировою дистрофією гепатоцитів, але й визначаються глибокими порушеннями їхніх метричних показників. Була досліджена залежність між площею гепатоцита (Sh) та його формою (Fh). У здорових залежність характеризувалася $r=0,58$ (формула, за якою описувалася $Sh=0,28 \times 10^{-4} \times Sh$). Тобто більш однорідною була група гепатоцитів, яка мала округлу форму зі збільшенням площі профілю гепатоцита. При НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом залежність визначалася $r=0,06$, що також свідчить за те, що форма гепатоцита мало змінювалася зі змінами площі гепатоцита.



А



Б

Рис. 3. Кореляційні співвідношення між площею профілю ядра (Sn) та його формою (Fn) у здорових (А) і у хворих НАЖХП, поєднану з цукровим діабетом (Б)

Характер кореляційної залежності між показниками площі профілю гепатоцита і відношенням площ профілей ядра і клітини в здорових $r=-0,58$ –

оберненопропорційний - зі збільшенням площі профілю гепатоцита зменшувався показник Sn/Sh.

У хворих на НАЖХП, поєднану з цукровим діабетом $r=-0,71$ (характер кореляційної

залежності між показниками площі профілю гепатоцита і відношенням площ профілей ядра і клітини оберненопропорційний $r=-0,75$, (у здорових $r=-0,58$).

Між площею профілю ядра (Sn) та коефіцієнтом його форми (Fn) у здорових встановлені прямопропорційні кореляційні відношення $r=0,003$ (рис. 3А), у хворих на НАЖХП, поєднану з цукровим діабетом $r=0,12$ (рис. 3Б).

Таким чином, навіть, при малосимптомному перебігу НАЖХП і відносно "спокійних" біохімічних показниках крові, при стеатозі виявляються не тільки гепатоцити, переповнені жировими краплями, але відбуваються зміни їхньої функціональної здатності, які підтверджені відповідними морфометричними показниками.

Перспективи подальших досліджень: на підставі інформації за функціональний стан і діяльність паренхіматозних клітин печінки, можна створити систему моделювання з метою поліпшення діагностики і лікування пацієнтів із НАЖХП, поєднаної з цукровим діабетом типу 2.

Висновки

1. При НАЖХП у поєднанні з цукровим діабетом патоморфологічна картина характеризується поліморфністю гістологічних змін при збереженій загальній будові часточки. Численні гепатоцити центрлобулярної (третьої) зони містили жирові вакуолі у вигляді жирових крапель різного розміру та ацидофільну зернистість. Тіла і ядра гепатоцитів

Література

1. Застосування комп'ютерної морфометрії в діагностиці захворювань печінки / О.І. Дельцова, С.Б. Геращенко, А.Д. Захараш [та інші] // Вісник проблем біології і медицини. – 2003. – Вип.1. – С.72-73.
2. Исаков В.Л., Пинчук В.Г., Исакова Л.М. Современные методы автоматизации цитологических исследований. - К.: Наукова думка, 1988. - 212 с.
3. Мехтиев С. Н. Неалкогольная жировая болезнь печени: клиника, диагностика и лечение / С. Н. Мехтиев, В. Б. Гриневиц, Ю. А. Кравчук // Лечащий врач. - 2008. - №2.- С. 29-37.
4. Скрыпник И. Н. Оценка терапевтических подходов к лечению неалкогольного стеатогепатита

деформовані. Гепатоцити у першій і другій (перипортальній і проміжній) зонах виявляли ознаки дрібно- і крупновакуольної дистрофії, деформації, апоптозу. Часто спостерігали вогнища фокального некрозу, між другою і третьою зоною печінкової часточки спостерігали мостоподібні некрози.

2. Площа профілю гепатоцита, у середньому, збільшилася до $(231,94 \pm 11,05)$ мкм², площа профілю ядра зменшилася до $(13,26 \pm 0,42)$ мкм², співвідношення між площею профілю ядра і площею профілю клітини зменшилося до $(0,12 \pm 0,005)$, коефіцієнт форми гепатоцита і ядра виявив ознаки їхньої деформації.

3. Кореляційний аналіз показав, що ступінь кореляції між показником площі гепатоцита і ядра позитивна: $r=0,49$; характер кореляційної залежності між показниками площі профілю гепатоцита і відношенням площ профілей ядра і клітини оберненопропорційний $r=-0,75$; між площею профілю ядра (Sn) та коефіцієнтом його форми (Fn) встановлені оберненопропорційні кореляційні відношення $r=-0,018$.

в Украине и его взаимосвязь с факторами риска: результаты открытого мультицентрового проспективного исследования DIREG_L_04443 / И.Н. Скрыпник // Сучасна гастроентерологія. - 2013. - №2(70). - С. 64-71.

5. Fitzpatrick E. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future / E. Fitzpatrick, A. Dhawan // World J. Gastroenterol. - 2014. - Vol. 20(31). - P.10851-10863.

6. Nalbantoglu I.L. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease / I.L. Nalbantoglu E.M. Brunt // World J. Gastroenterol. - 2014. - Vol 20(27). - P. 9026-9037.

Науковий рецензент доктор медичних наук, професор Рум'янцева Ю.В.