

## СОБЛИВОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ ЕрСАМ+ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ СТЕАТОГЕПАТИТІ ТА ВІРУСНОМУ ГЕПАТИТІ С

О.М. Гаврилюк

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, м. Львів, Україна

Аналіз кількісних та гістотопографічних особливостей популяції ЕрСАМ+ гепатоцитів на матеріалі 20 автопсійних випадків хронічного стеатогепатиту (алкогольного та неалкогольного) та вірусного гепатиту С виявив відмінності у експресії маркера при різних захворюваннях, які свідчать про роль етіологічних чинників у механізмах репаративної регенерації, зокрема у задіюванні різних ніш ПКП та у формуванні напрямку специфікації новоутворених клітин.

**Ключові слова:** алкогольний стеатогепатит, неалкогольний стеатогепатит, вірусний гепатит С, ЕрСАМ+ гепатоцити.

## ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ЕрСАМ + ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ И ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

Е.М. Гаврилюк

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, Львов, Украина

Анализ количественных и гистотопографических особенностей популяции ЕрСАМ+ гепатоцитов на материале 20 атопсийных случаев хронического стеатогепатита (алкогольного и неалкогольного) и вирусного гепатита С выявил различия в экспрессии маркера при различных заболеваниях, свидетельствующих о роли этиологических факторов в механизмах репаративной регенерации, в частности в задействовании различных ниш ПКП и в формировании направления спецификации вновь клеток.

**Ключевые слова:** алкогольный стеатогепатит, неалкогольный стеатогепатит, вирусный гепатит С, ЕрСАМ+ гепатоциты.

## EpCAM+ HEPATOCYTE POPULATION IN CHRONIC STEATOHEPATITIS AND HEPATITIS C VIRAL INFECTION

O.M.Gavrilyuk,

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

The aim of the study was to compare quantitative and histotopographic features of EpCAM+ hepatocytes in patients with chronic hepatitis C viral infection and steatohepatitis (alcoholic and nonalcoholic). Twenty autopsy cases from Lviv regional pathologoanatomic bureau obtained between 2010 and 2014 were enrolled in the study. The patients' diagnoses were alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infection at the stage F2-F3 (METAVIR). EpCAM+ cell area and localization were compared in two groups – chronic steatohepatitis and viral hepatitis C. Amount of EpCAM+ hepatocytes is the highest in cases of hepatitis C virus infection ( $15,15 \pm 0,4$ ). Their periportal/periseptal localization imply activation of the canals Hering associated precursor liver cells niche and/or severe adaptive response due to metabolic derangements. In steatohepatitis amount of EpCAM+ hepatocytes was lower ( $8,98 \pm 0,25$ ) and they are present in different parts of the parenchymal compartment. In these cases regeneration likelihood involves not only periportal, but also intralobular precursor liver cells niche and is associated with induction of other cell populations and other mechanisms. Degree of hepatocyte injury in such cases may also be lower. Differences in amount and localization of precursor liver cells with hepatocyte specification manifested by EpCAM positivity in various diseases suggest the existence of heterogeneous repair pathways depending on etiologic factors and support further studies.

**Key words:** alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, hepatitis C virus infection, EpCAM+ hepatocytes.

**Вступ.** При хронічних захворюваннях печінки репаративна регенерація здійснюється переважно за рахунок активації незрілих печінкових клітин попередників (ПКП). Ця популяція є гетерогенною і включає як елементи з властивостями стовбурових клітин, так і їх похідні, які диференціюються у напрямку гепатоцитів або холангіоцитів [1-3]. Проліферація та специфікація ПКП відбувається у нішах СК, де вони безпосередньо

контактують з найближчим мікроочередженням – зрілими паренхіматозними та мезенхімальними клітинами та елементами позаклітинного матриксу [4]. Дослідження ПКП затруднене, оскільки потребує використання різних, нерідко поєднаних маркерів. Одним з універсальних імуногістохімічних маркерів ПКП є EpCAM, який експресується на клітинах різного ступеня та напрямку диференціювання [5, 6]. Зокрема, EpCAM виявляєть-

ся на клітинах з різним фенотипом: незрілих стовбурових, біліарного ряду та гепатоцитах. Більшість із проведених досліджень є експериментальними і тільки в окремих роботах використовується матеріал біопсій та автопсій. Незважаючи на значні досягнення у розумінні окремих механізмів репаративної регенерації за участю ПКП, особливості при різних захворюваннях залишаються невиясненими. У декількох сучасних дослідженнях було продемонстровано наявність ЕрСАМ+ гепатоцитів при цирозі печінки та підтверджено їх потенційне походження з ПКП, а отже їх участь у репаративній регенерації [7]. Враховуючи, що репаративні процеси багато в чому залежать від етіологічних чинників, ініціюючих захворювання, важливо виявити особливості ПКП та їх окремих субпопуляцій при різних нозологічних формах.

Метою роботи було вивчення кількісних та гістотопографічних особливостей ЕрСАМ+ гепатоцитів при хронічному стеатогепатиті та 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 рр. у Львівському обласному патологоанатомічному бюро. Підтвердження діагнозу алкогольного стеатогепатиту базувалось на даних анамнезу про тривале зловживання алкоголем (більше 210 грамів на тиж-

день 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 (RNAHCV) 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-еозином для рутинного патогістологічного опису та трихромом Массона для оцінки ступеня фіброзу. Гістологічні зрізи вивчали під світлооптичним мікроскопом «БИОЛАМ И» (ЛОМО, Росія). Мікрофотографування проводили на мікроскопі Leica DM 750/4 (Німеччина) з цифровою камерою Leica DFC 420 (Німеччина) та програмним забезпеченням Leica Application Suit (Version 3.8).

Імуногістохімічне дослідження проводилось з використанням моноклональних антитіл Monoclonal-Mouse Anti-Human Epithelial Membrane Antigenclone E29 Isotype IgG2a, kappa («DakoCytomation», Данія) з наступним використанням системи візуалізації En Vision (Dako Cytomation). Оцінку експресії маркера проводи-

ли у відповідності з рекомендаціями інших дослідників [10]. Вираженість експресії ЕрСМ+ визначалась за допомогою морфометричного аналізу з обчисленням відносної площі ЕрСМ-позитивних клітин, забарвлених коричневим кольором. В кожному випадку було досліджено 20 фотографій тканини печінки при великому збільшенні ( $\times 400$ ) для оцінки загальної відносної площі, яку займають ЕрСМ+ 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 досліджень

Загальна характеристика досліджуваних випадків представлена у табл.1. До групи хворих на хронічний стеатогепатит включались пацієнти з алкогольним ураженням (5) та хворі на неалкогольний стеатогепатит (5).

При патогістологічному дослідженні виявлено, що популяція ЕрСМ+ клітин була неоднорідною (табл. 2). Маркер виявлявся у ПКП, які формували дуктулярну реакцію (переважно дифузна цитоплазматична експресія) та у гепатоцитах (гомогенна експресія вздовж плазматичної мембрани).

Загальна площа, яку займали ЕрСМ+ клітини була більшою при ВГС, але відмінності від групи випадків із хронічним стеатогепатитом були граничними ( $p=0,06$ ).

ЕрСМ+ гепатоцити спостеріга-

Таблиця 1.

### Клініко-морфологічні дані про пацієнтів з досліджуваної групи (мінімальне, максимальне та середнє значення)

	Хронічний стеатогепатит (n=10)	Вірусний гепатит С (n=10)
Стать (Ч/Ж)*	6/5	7/3
Вік	41-65 (55,7)	21-57 (43,6)
Загальний білірубін (мкМ/л)	41,2-165,7 (84,6)	54,3-178,5 (91,7)
Аланінамінотрансфераза (мккат/л)	0,5-22,7 (6,1)	0,7-23,4 (6,8)
Протромбінний індекс (%)	36-64 (52,1)	43-58 (55,2)
Ступінь фіброзу (METAVIR) (F2,3 - n)	F2 - 7 F3 - 3	F2 - 4 F3 - 6

\*Ч-чоловіки, Ж- жінки

Таблиця 2.

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

Параметр (% площі)	Хронічний стеатогепатит	Вірусний гепатит С	P
ЕрСМ+ ПКП	15,81 $\pm$ 0,31	21,72 $\pm$ 0,25	0,06
ЕрСМ+ гепатоцити	8,98 $\pm$ 0,25	15,15 $\pm$ 0,4	0,02

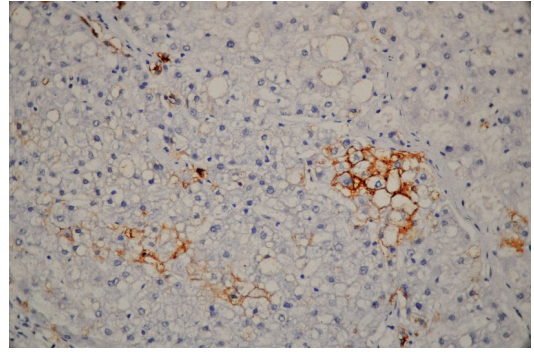
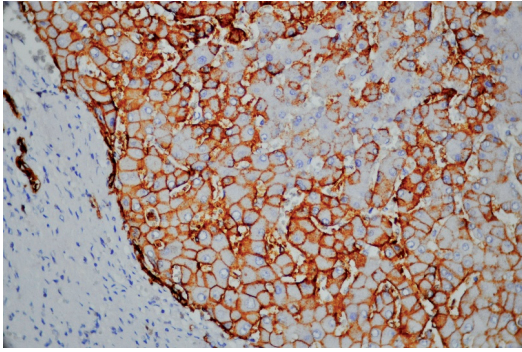


Рисунок 1. ЕрСАМ+ гепатоцити при гепатиті С (А) та при алкогольному стеатогепатиті (В) (ЕрСАМ, × 400)

лись у всіх досліджуваних випадках (рис.1). Виявлено, що при ВГС кількість ЕрСАМ+ гепатоцитів була значуще вищою. Клітини розміщувались переважно у перисептально/перипортальних ділянках і формували великі комплекси, а в окремих випадках захоплювали більшу частину паренхіматозного вузла. При СГ групи ЕрСАМ+ гепатоцитів були меншими і виявлялись вони як всередині, так і по периферії часточок.

**Обговорення результатів.** Відомо, що під час ембріо-, фетогенезу, так і в подальшому в печінці спостерігається динаміка в експресії ЕрСАМ: виявляється у незрілих клітинах та втрачається в міру їх дозрівання у гепатоцитах та холангіоцитах. Вважається одним з найкращих маркерів для виділення стовбурових клітин. Невирішеним залишається питання щодо причин реекспресії ЕрСАМ у печінці людини.

Однією з найбільш поширених є гіпотеза, згідно якої експресія ЕрСАМ є необхідною умовою для диференціювання клітин під час регенерації. При цьому це не стосується процесу утворення нових гепатоцитів шля-

хом поділу зрілих печінкових клітин. L.Zhang із співавторами виявили, що при масивному некрозі печінки проявом репаративної регенерації була експансія ЕрСАМ+ ПКП при відсутності експресії даного маркера на всіх інших клітинних популяціях, включаючи гепатоцити. Натомість при біліарному цирозі репаративні процеси включали гепатобласти з мембранною експресією ЕрСАМ, яка корелювала з експансією ПКП[11].

Ці дані знайшли підтвердження і в інших роботах. Під час хронічного пошкодження при вірусних гепатитах (В та С), ЕрСАМ виявлявся на гепатоцитах, які недавно утворились із ранніх ПКП, і були відсутніми на клітинах, утворених внаслідок поділу зрілих гепатоцитів. При цьому ЕрСАМ+ гепатоцити розміщувались поблизу ділянок ДР і мали довші теломери, що підтверджує їх походження із повільноциркулюючих ПКП [7].

В деяких дослідженнях було запропоновано варіанти гіпотетичних функцій ЕрСАМ під час репаративних процесів. Stueck А.Е. та співавтори виявили, що паралельно із дозріванням

клітин спостерігається розвиток МЦР, про що свідчила втрата експресії CD34 у центрі бруньки гепатоцитів в міру їх диференціювання у синусоїд та збереження на периферії. Імовірно це свідчить про те, що ЕрСАМ можна розцінювати як молекулярну платформу для скупчення CD34+ ендотеліоцитів, які забезпечують правильне диференціювання паренхіматозних клітин [12].

Однією з можливих функцій ЕрСАМ під час репарації печінки може бути необхідність мембранної реекспресії маркера у ПКП для успішного диференціювання в напрямку гепатоцитів у відповідь на ініціюючі сигнали від інших компонентів ніші СК. І хоча мезенхімальні стромальні та клітинні компоненти ніші є основними регуляторами цих процесів, ЕрСАМ може підтримувати здатність до трансляції сигналів, які ПКП отримують від мікрооточення, регулюючи стан рецепторів. В такій ситуації наявність ЕрСАМ на плазматичній мембрані у недиференційованому гепатоциті буде сприяти Wnt-опосередкованому диференціюванню в напрямку гепатоцитів [13,14].

За останні роки з'явилися дані про те, що клітинна пластичність ЕрСАМ може бути пов'язана не тільки з необхідністю регуляції репаративної регенерації, а і з іншими процесами. В декількох дослідженнях було продемонстровано, що одразу після пошкодження відбуваються значні зміни у метаболізмі печінки, які передують процесам репарації. Виявлення порушень метаболічних зон при пошкодженні печінки стало основою для гіпотези, згідно якої реекспресія

ЕрСАМ на зрілих гепатоцитах у лобулярній паренхімі у відповідь на пошкодження може бути адаптивною реакцією для компенсації печінкової недостатності шляхом зміни зон метаболізму [3,15,16].

Крім того реекспресія ЕрСАМ може спостерігатись при канцерогенезі, наприклад, при гепатоцелюлярній карциномі ЕрСАМ розцінюється як маркер незрілих пухлинних клітин. Дійсно, Yamashita з колегами показали, що ЕрСАМ+/ $\alpha$ FP+ пухлинні клітини мають ознаки, характерні для раку печінки, включаючи здатність до самовідтворення, диференціювання та індукування інвазивної гепатоцелюлярної карциноми у NOD/SCID мишей [17].

Домінування ЕрСАМ+ гепатоцитів при ВГС, виходячи з існуючих гіпотез, можна пояснити як переважанням механізму регенерації за рахунок експансії компонентів ніші в ділянці каналів Герінга, так і значним ступенем адаптивних змін у відповідь на пошкодження гепатоцитів. При СГ репаративна регенерація на етапі помірного фіброзу/неповного септального цирозу імовірно відбувається переважно в інших нішах (центролобулярних), в яких домінують інші механізми, що не супроводжуються значною експресією ЕрСАМ на новоутворених гепатоцитах. Ступінь пошкодження гепатоцитів в таких випадках теж може бути нижчим. Підтвердженням цього є дані, одержані іншими дослідниками. Так, зокрема при НАСГ G.Carpino із співавторами (2013) описує два механізми фіброзу та репарації, які роз-

виваються на різних стадіях захворювання: з переважним задіюванням центролобулярної або перипортальної ніші ПКП. При цьому автори вважають, що активація ПКП є компонентом адаптивної реакції у відповідь на окисний стрес при НАСГ[18].

Назагал у сучасній літературі домінують дослідження на молекулярному рівні, присвячені тонким механізмам регенерації. При цьому більшість авторів розглядають механізми регенерації як універсальний процес, розрізняючи лише два варіанти: при гострому пошкодженні: за рахунок проліферації зрілих гепатоцитів та при хронічному пошкодженні – за рахунок проліферації ПКП. Виявлені у нашому дослідженні відмінності у експресії EpCAM при різних захворюваннях свідчать про важливу роль етіологічних факторів при репаративних процесах, які зумовлюють додаткові особливості, зокрема з переважним задіюванням різних ніш ПКП або із домінуванням певного виду специ-

фікації – у напрямку гепатоцитів або холангіоцитів. Але ці питання потребують подальших досліджень.

До обмежень даної роботи можна віднести невелику кількість випадків, а також використання тільки одного імуногістохімічного маркера, що не дозволило, зокрема, врахувати роль можливої пухлинної трансформації гепатоцитів, яка також супроводжується експресією EpCAM.

### **ВИСНОВКИ.**

EpCAM+ гепатоцити виявлялись у всіх випадках хронічного стеатогепатиту та вірусного гепатиту С на стадії неповного септального цирозу.

Виявлені відмінності у кількості та гістотопографії EpCAM+ гепатоцитів при хронічному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С свідчать про роль етіологічних чинників у механізмах репаративної регенерації, зокрема у задіюванні різних ніш печінкових клітин попередників та у формуванні напрямку специфікації новоутворених клітин.

### **Література**

1. Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL, Liver regeneration // *Transl Res.* – 2014. – Vol.163, №4. – P.352-362.
2. Riehle RJ, Dan YY, Campbell JS et al., New concepts in liver regeneration // *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* – 2011. – Vol.26, №1. – P.203-12.
3. Hugh M, Dolle L, The plastic cellular states of liver cells: are EpCAM an Lgr5 fit for purpose? // *Hepatology.* – 2016. – Vol.64. – P.652-62.
4. Vestentoft PS, Development and molecular composition of the hepatic progenitor cell niche // *Dan Med J.* – 2013. – Vol.60, №5. – P.1-17.
5. Tanimizu N, Mitaka T, Re-evaluation of liver stem/progenitor cells // *Organogenesis.* – 2014. – Vol.10, №2. – P.208-215.
6. Dolle L, Theise ND, Schmeltzer E et al., EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells // *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.* – 2015. – Vol.308. – P.233-50.

7. Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R et al., Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans // *Hepatology*. – 2011. – Vol.53. – P.964-73.
8. Bedossa P, Poynard T, An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group // *Hepatology*. – 1996. – Vol.24. – P.289-293.
9. Brunt EM, Tiniakos DG, Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease // *World J Gastroenterol*. – 2010. – Vol.16, №42. – P.5286-96.
10. Dabbs D, *Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic application*. – 3<sup>rd</sup> ed. – New-York: Saunders Elsevier, 2010. – 1452 p.
11. Zhang L, Theise ND, Chua M et al., The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration // *Hepatology*. – 2008. – Vol.48. – P.1598-607.
12. Stueck AE, Wanless I, Hepatocyte buds derived from progenitor cells repopulate regions of parenchymal extinction in human cirrhosis // *Hepatology*. – 2015. – Vol.61. – P.1696-707.
13. Boulter L, Govaere O, Bird TG et al., Macrophage-derived WNT opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease // *Nat Med*. – 2012. – Vol.18. – P.572-9.
14. Lu H, Mo J, Yono Y, EpCAM is an endoderm-specific Wnt depressor that licenses hepatic development // *Dev Cell*. – 2013. – Vol.24. – P.543-53.
15. Gebhardt R, Matz-Soya M, Liver zonation: novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis // *World J Gastroenterol*. – 2014. – Vol.20. – P.8491-504.
16. Huang J, Rudnick DA, Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration // *Am J Pathol*. – 2014. – Vol.184. – P.309-21.
17. Yamashita T, Ji J, Budhu A et al., EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol.136. – P.1012-24.
18. Role of hepatic progenitor cells in nonalcoholic fatty liver disease development: cellular cross-talks and molecular networks / G.Carpino, A.Renzi, P.Onori, E.Gaudio // *Int. J. Mol. Sci*. – 2013. – Vol. 14. – P.20112-30.