

## ORIGINALNI NAUČNI RADOVI

### HEPATIČNI SINUSOIDALNI MAKROFAGI (KUPFEROVE I ENDOTELNE ČELIJE) KOD INTRAVENSKIH HEROINOMANA

Goran ILIĆ i Jovan STOJANOVIĆ

*Zavod za sudsku medicinu u Nišu*

U ovom radu primenjena su histološka, histohemijska i ultrastrukturalna ispitivanja jetre da bi se precizno sagledale vrste oštećenja jetre izazvana zloupotrebom heroina. Morfometrijski je utvrđena promena broja hepatičnih sinusoidalnih makrofaga (Kupferovih i endotelih ćelija) u odnosu na prisutna morfološka oštećenja tkiva jetre. Studija je obuhvatila analizu 50 autopsija i to 40 iz grupe intravenskih heroinomana, a 10 obdukcija je predstavljalo kontrolnu grupu. Broj Kupferovih i endotelih ćelija je značajno veći u obdukcijama slučajevima intravenskih heroinomana sa hroničnim aktivnim hepatitisom bez obzira da li je istovremeno prisutna i posthepatična ciroza. Kod autopsijskih slučajeva intravenskih heroinomana, gde su sa drugim morfološkim lezijama istovremeno bile prisutne i alkoholne masne promene, nije bilo značajne razlike u broju Kupferovih i endotelih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu, što je najverovatnije posledica imunosupresivnog delovanja alkohola.

*Cljučne reči:* intravenski heroinoman, hepatični sinusoidalni makrofagi

#### UVOD

Zid sinusoida jetre sastoji se od isprekidane bazalne membrane na koju naležu dva tipa ćelija: tipične endotelne ćelije i fiksirani makrofagi - Kupferove ćelije (Volkova et al., 1981; Nikolić, 1991; Ross et al., 1995).

Zvezdaste Kupferove ćelije su fiksirani makrofagi jetre i najbrojnije su u zoni 1 acinusa. Pored prevashodne fagocitne aktivnosti imaju ulogu i u sekreciji endogenih pirogena, kolagenaze, eritropoetina, citokina i dr. (Wake and Sato, 1993). Produžeci ovih ćelija mestimično premošćuju zidove sinusoida. Imaju izraženi enocitozni kapacitet i igraju važnu ulogu u imunom odgovoru. Lizoosomalni enzimi su u većoj količini u zoni 1 acinusa, a samim tim je ovde i veća fagocitna aktivnost. Citotoksičnost je izraženija u zoni 3 acinusa (Bouwens et al., 1992).

Endotelne ćelije su spljoštene, sa malim kompaktnim jedrom izduženog oblika, velikim brojem mikropinocitoznih vezikula, malo mitohon-

drija i po kojim rapavim ER-om. Periferni delovi njihove citoplazme pokazuju fenestre. Glavna uloga im je u pinocitozi, procesima transćelijskog transporta i sintezi vanćelijskog matriksa (*Bouwens et al., 1992*). Endotelne ćelije sadrže male fenestre koje omogućavaju slobodnu difuziju supstanci, ali ne i partikula poput hilomikrona, između krvi i površine hepatocita. Ovo filtriranje omogućuje protok masti u jetri. Imaju i izraženi kapacitet endocitoze, koji ih čini važnim delom mononuklearnog fagocitnog sistema. Aktivne su i u sekreciji bioaktivnih materija i komponenti ekstraćelijskog matriksa jetre. Zonalna raznolikost endotelijalnog niza ogleda se u većoj poroznosti zone 3 u odnosu na zonu 1 acinusa, a većim kapacitetom zavezivanja lecitina u zoni 1 prema zoni 3 (*Bouwens et al., 1992; Ross et al., 1995; Krstić, 1984*).

Jetra predstavlja vrlo važan organ u ljudskom telu, ona je najveća žlezda u organizmu i igra ključnu ulogu u uklanjanju lipofilnih materija iz plazme, gde spadaju i morfin i njegov derivat heroin. Hepatocit je glavno mesto biotransformacijskih sistema koji svojim enzimima omogućavaju da se metaboliti ovih jedinjenja izluče iz organizma. U toku ovih procesa dolazi i do toksičnih oštećenja tkiva jetre, a uz to samo intravensko unošenje heroina dovodi i do nastanka infekcija jetrinog tkiva (hepatitis, AIDS), dolazi do ultrastrukturnih promena na hepatocitima itd., te su efekti unošenja heroina na jetri najizraženiji i najkarakterističniji. Morfološke promene na tkivu jetre praćene su njenom izmenjenom funkcijom što ima za posledicu drugačiji metabolizam heroina i drugih toksina koji se istovremeno sa njim unose u organizam (alkohol, lekovi), te su i efekti zloupotrebe ovih supstancija izmenjeni i često iznenađujući (*Ilić, 1999*).

### **Cilj rada**

Histološka, histoheмиjska i ultrastrukturna ispitivanja jetre su primenjena u ovom radu da bi se precizno sagledale vrste oštećenja jetre izazvane zloupotrebom heroina. Osnovni cilj ovog istraživanja je da se morfometrijski utvrdi kako se menja broj hepaticnih sinusoidalnih makrofaga (Kupferovih i endotelnih ćelija) u odnosu na nađena morfološka oštećenja tkiva jetre.

### **Materijal i metode**

Studija je obuhvatila analizu 50 autopsija i to 40 iz grupe intravenskih heroinomana, a 10 obdukcija je predstavljalo kontrolnu grupu (leševi mladih i zdravih osoba smrtno stradali zbog mehaničkih trauma koje nisu zahvatile jetru). Od analizovanih obdukcija, 49 ih je obavljeno u Institutu za sudsku medicinu, a jedna u Institutu za patologiju u Nišu.

Od 40 obdukovanih leševa intravenskih heroinomana - 34 su bili leševi osoba muškog, a 6 ženskog pola.

Ukupno je bilo 5 leševa osoba u starosnoj grupi od 15. do 20. godina, 9 u grupi od 21. do 25. godine, 12 od 26. do 30., 5 od 31. do 35., 6 od 36. do 40. i 3 u starosnoj grupaciji preko 40. godine života.

U kontrolnoj grupi, 8 leševa je bilo osoba muškog i 2 ženskog pola.

Iz ove grupe jedna osoba je bila starosti do 15 godina, 2 u starosnoj grupaciji 16. do 20. godine života, 5 od 21. do 25. godine starosti, 1 u grupi od 26. do 30. godine života i 1 od 31. do 35. godine starosti.

Kao dokaz da se radi o intravenskim heroinomanima služio je obdukcioni nalaz (sveži i stari ubodi nastali intravenskom aplikacijom heroína i dr.), hemijsko-toksikološko dokazivanje heroína u krvi i organima, podaci iz evidencije Odseka za bolesti zavisnosti Zavoda za mentalno zdravlje u Nišu, podaci iz evidencije Odeljenja za borbu protiv narkotika MUP-a Niš, kao i podaci dobijeni od bliskih rođaka pre same obdukcije u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu. Na isti način su dobijene informacije o dužini staža i o zloupotrebi heroína, o učestalosti i o aplikaciji, o postojanju eventualnih faza apstinencije, o unošenju alkohola i/ili lekova za smirenje (benzodiazepina i drugih).

U toku obdukcija uzimani su isečci jetre (od 3 do 5), koji su fiksirani u 10% rastvoru formaldehida, obrađeni u autotehnikonu. Za ultrastrukturno (elektronomikroskopsko) ispitivanje izvršena je fiksacija isečaka jetre u glutar-aldehidu, a kalupljenje tkiva u eponu. Parafinski preseći, debljine 5  $\mu\text{m}$ , su bojeni sledećim metodama:

- klasičnom (HE) metodom;
- histochemijskom metodom (Van Gieson);

Ultrastrukturno su proučavane ćelijske organele, kolagen, makrofagi, kao i promene na drugim strukturama. Istaknuto ispitivanje je izvršeno na transmisionom elektronskom mikroskopu JEM 100 CX JEOL.

Morfometrijski su ispitivani hepatički sinusoidalni makrofagi (Kupferove i endotelne ćelije). Za ovo istraživanje korišćen je testni sistem M 42 koji je pomoću objektivnog mikrometra ukalibriran za povećanje na kojem su ćelije brojane — objektiv 40 x i okular 10 x. Na tom povećanju površina testnog sistema iznosila je  $A_t = 0,058 \text{ mm}^2$ , a na ovoj površini su brojane ćelije "metodom šah polja" i to na 10 polja. Iz zbira izbrojanih ćelija i površine testnog sistema izračunat je prosečan broj,  $N_k$ , hepatičkih sinusoidalnih makrofaga (Kupferovih i endotelnih ćelija) na  $1 \text{ mm}^2$  (Kališnik, 1977; Kališnik, 1985.; Gudović i sar., 1944).

Od statističkih metoda korišćena je srednja vrednost —  $\bar{X}$ , standardna devijacija — SD, standardna greška — SE, studentov T— test i Fišerov test egzaktno verovatnoće.

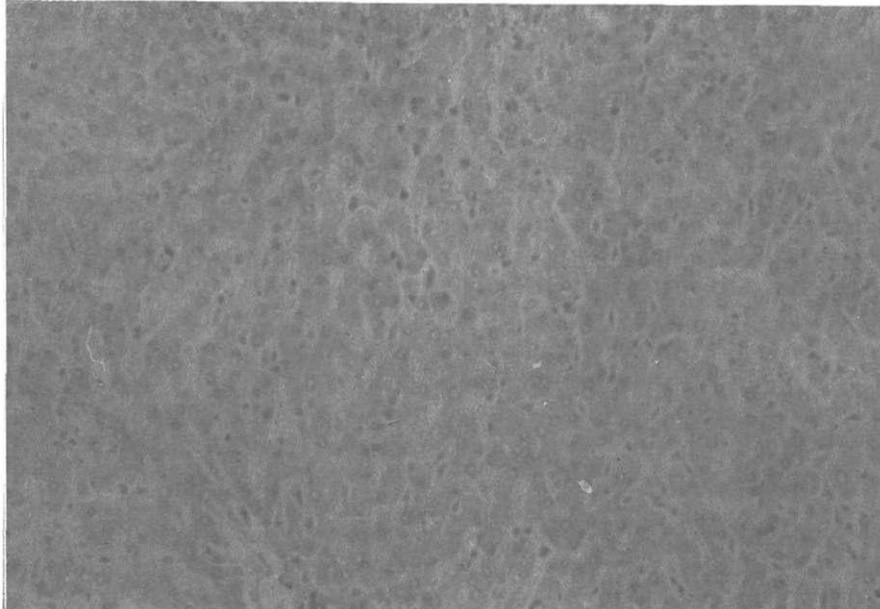
## Rezultati rada

Mikromorfološkim ispitivanjem utvrđene su lezije tkiva jetre, obdukcijski slučajevi su grupisani po vrsti nađenih morfoloških promena, izvršeno je brojanje Kupferovih i endotelnih ćelija jetre, kao hepatičkih sinusoidalnih makrofaga, a zatim je izvršena statistička obrada dobijenih rezultata (tabela 1).

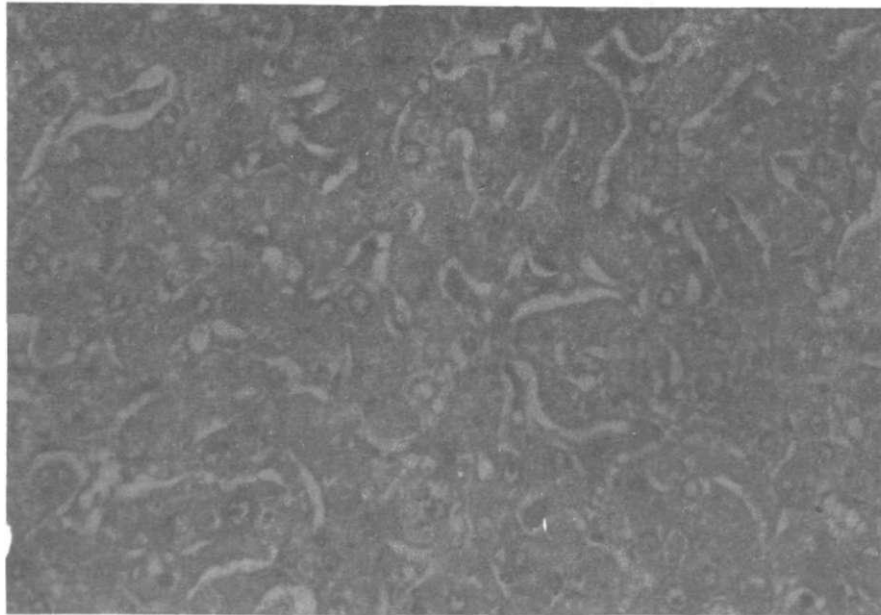
*Tabela 1.* Broj hepatičnih sinusoidalnih makrofaga (Kupferove i endotelne ćelije) u zavisnosti od morfoloških promena na jetri

	Kontrola	Hronični aktivni hepatitis	Hronični aktivni hepatitis i ciroza	Hronični aktivni hepatitis, ciroza i difuzne masne promene	Difuzne masne promene i ciroza	Ostale degenerativne promene
N	10	8	6	5	4	17
$\bar{X}$	332	439	458	337	334	350
$\pm$ SD	13.75	75.58	40.50	49.26	38.09	42.61
SE	4.58	28.56	18.11	24.63	21.99	10.65
t		3.95028	7.38226	0.2138	0.08702	1.5917
p		p < 0.01	p < 0.001	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

Dobijeni rezultati pokazuju daje statistički signifikantno veći broj ovih makrofaga u odnosu na kontrolu samo za grupe slučajeva sa hroničnim aktivnim hepatitisom, odnosno sa hroničnim aktivnim hepatitisom i postehepatičnom cirozom, dok ostale grupe nisu pokazivale signifikantno veći broj ovih ćelija u odnosu na kontrolu. Hiperplazija i hipertrofija hepatičkih sinusoidalnih makrofaga prikazane su na slikama 1 i 2. Ultrastrukturni izgled hipertrofisane Kupferove ćelije prikazan je na slici 3.



Slika 1. Hronični aktivni hepatitis: acidofilna degeneracija i hiperplazija Kupferovih ćelija. HE x 200



Slika 2. Hiperplazija i hipertrofija sinusoidalnih makrofaga (Kupferovih i endotelinih ćelija). Van Gieson x 300



Slika 3. Dominantna hipertrofija Kupferove ćelije uz suženje lumena sinusoida. Hiperaktivnost Kupferove ćelije, tj. hiperplazija Goldži zone i RER-a. Istanjenje i ljuštenje mikrovila na vaskularnom polu hepatocita. Istovremeno je prisutna marginalizacija i kondenzacija jedarnog hromatina hepatocita. EM x26 000

## Diskusija

Brojanjem Kupferovih i endotelnih ćelija utvrđena je signifikantna razlika između kontrole i grupa sa hroničnim aktivnim hepatitisom bez ciroze i sa cirozom, dok između sinusoidalnih makrofaga kontrole i ostalih grupa signifikantna razlika nije nađena.

*Mills i Scheuer* (1985) su proučavali hepatične sinusoidalne makrofage pomoću lizozima, koji je veoma dobar marker za ove ćelije. Utvrdili su (na osnovu 54 jetrine biopsije bolesnika sa alkoholnom bolešću jetre i 15 kontrola) da je bilo signifikantno manje ovih makrofaga u slučajevima sa alkoholnom bolešću jetre u odnosu na kontrole. Smanjenje makrofaga je korelisalo sa stepenom oštećenja jetre.

*Mainfold i sar.* (1982) su istraživali tkivnu distribuciju lizozima (kao markera jetrinih mononuklearnih makrofaga) kod bolesnika sa primarnom bilijarnom cirozom, hroničnim hepatitisom, mešovitim bolestima jetre i kod normalnih subjekata. Sadržaj lizozima u svim intralobularnim ćelijama je opadao u svim istraživanim bolestima, dok su lizozimi portalnog trakta rasli samo u primarnoj bilijarnoj cirozi i hroničnom hepatitisu.

*Elsisi i sar.* (1993) smatraju da aktivisane Kupferove ćelije povećavaju oštećenje hepatocita preko oslobađanja reaktivnih kiseonikovih radikala, pa tako, vitaminom A aktivisane Kupferove ćelije, dovode do nekroze jetre i pri malim dozama CCl<sub>4</sub>. Aktivacija sinusoidalnih ćelija je takođe poznati faktor u stvaranju fibroze i nastajanju ciroze, pri dugotrajnom delovanju hemijskih toksina.

U ovoj studiji sinusoidalni makrofagi su signifikantno aktivisani u slučajevima sa hroničnim aktivnim hepatitisom, bez obzira da li je istovremeno bila prisutna i posthepatična ciroza. U grupama gde su istovremeno bile prisutne i alkoholne masne promene (tri navedene autopsijske grupe), nije bilo signifikantne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Sugerisano je da delovanje alkohola onemogućava aktivisanje sinusoidalnih makrofaga, što ide u prilog njegovom imunosupresivnom delovanju (*Jerrells i Pruett*, 1994). Nasuprot tome, u slučajevima sa hroničnim aktivnim hepatitisom dolazi do aktivacije makrofaga, a ovo može dovesti do produbljenja morfoloških promena najetri, onako kako su to opisali *Elsisi i sar.* (1993). Ultrastrukturno lumen sinusoida je smanjen zbog hipertrofičnih sinusoidalnih makrofaga, kao i umnoženih limfocita i plazmocita.

Prethodno navedeni rezultati *Mills-a* i *Scheuer-a* (1985), odnosno *Mainfold-a* i sar. (1982), u saglasnosti su sa rezultatima ove studije, jer su takođe istakli da se broj, lizozim pozitivnih, hepatičnih sinusoidalnih makrofaga smanjuje u svim oblicima alkoholne bolesti jetre u korelaciji sa stepenom njenog oštećenja, odnosno da raste u slučajevima hroničnog hepatitisa. Kako aktivacija sinusoidalnih ćelija dovodi do oštećenja hepatocita i predstavlja faktor u nastanku fibroze i ciroze, u slučajevima sa hroničnim aktiv-

nim hepatitisom, gde dolazi do povećanja broja hepatičnih sinusoidalnih makrofaga, favorizovan je nastanak prethodno navedenih promena.

### Zaključak

Broj Kupferovih i endotelnih ćelija je signifikantno veći u obdukcijским slučajevima intravenskih heroinomana sa hroničnim aktivnim hepatitisom bez obzira da li je istovremeno prisutna i posthepatična ciroza. Ova aktivacija sinusoidalnih ćelija može dovesti do produbljenja oštećenja hepatocita i biti favorizujući faktor u nastanku fibroze i ciroze. U autopsijskim slučajevima intravenskih heroinomana, gde su sa drugim morfološkim lezijama istovremeno bile prisutne i alkoholne masne promene, nije bilo signifikantne razlike broja Kupferovih i endotelnih ćelija u odnosu na kontrolu, što je najverovatnije posledica imunosupresivnog delovanja alkohola.

### Literatura

- Bouwens, L., De Blese, P., Vanderkeren, K., Geerts, B. and Wisse, E. (1992).* Liver cells heterogeneity: Functions of man perenchymal cells. *Enzyme*, 46, 155-168.
- Elsisi, A. E. D., Earnest, D. L. and Sipes, I.G. (1993).* Vitamin A potention of carbon-tetrachloride hepatotoxicity: Role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 295, 295-301.
- Ilić, G. (1999).* Moifološka studija oštećenja jetre kod intravenskih heroinomana. Doktorska disertacija. Univerzitet. Niš.
- Krstić, R. V. (1984).* Illustrated Encyclopedia of human hystology. Springer. Berlin.
- Mainfold, H. H., Bishop, F. M., Cloke, P., Triger, D. R. and Underwood, J. C. E. (1983).* Lysozyme in chronic liver disease: a biochemical and histological study. *J. Clin. Pathol.*, 35, 815-819.
- Mills, L. R. and Scheuer, P. J. (1985).* Hepatic sinusoidal macrophages in alcoholic liver disease. *Journal of Pathology*, 147, 127-132.
- Nikolić, I. (1991).* Dinamika razvoja i morfološke karakteristike interlobusnih prostora jetre čoveka od embrionalnog perioda do 10. godine života. Magistarski rad. Medicinski fakultet. Niš.
- Ross, M. H. Romrell, L. J. and Kaye, G.I. (1985).* Hystology - A text and Atlas. Williams-Wilkins. Baltimore-Tokyo.
- Valkova, O. V., Šahlamova, V. A. and Mironova, A. A. (1987).* Atlas skenirujušči elektonnei mikroskopii kletok, tkanei i organov. *Medicina*. Moskva, 35-142.
- Wake, K. and Sato, T. (1983).* Intralobular heterogenity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tiss. Res.*, 273, 227-257.

MACROPHAGES SINUSOIDALS HEPATIQUES (CELLULES DE  
KUPFER ET ENDOTHELLES) CHEZ HEROIN ADDICTS  
INTRAVEINEUX

Goran ILIĆ et Jovan STOJANOVIĆ

*Foyer pour la medecine legale de Niš*

Les auteurs ont applique les recherches histologique el ultrastructurales du foie pour examiner precisement les especis des dedommagements du foie provoques par l'abus du heroine. On a constate par morphometrie le changement du nombre des macrophages sinusoi'dals hepatices (cellules de Kupfer et endothelles) par rapport aux dedomagements presents du tissu du foie. L' etude a compris l' analyse de 50 autopsies dont 40 du groupe des heroin addicts intraveineux et 10 autopsie presentaient le groupe de controle. Le nombre des cellules de Kupfer et des cellules endothelles etait significativement plus grand chez les cas d'autopsie des heroin addicts intraveineux avec le hepatite actif chronique sans egard si en meme temps la cyrrose posthepatique etait presente. Chez les autopsies des heroin addicts intraveineux ou avec les autres lesions morphologiques etaient en meme temps les changements alcooliques grassex il n'y avait pas de difference significative entre les nombres des cellules de Kupfer et des cellules endothelles par rapport au foie du groupe de controle, ce qui etait probablement la consequence de l'effet immunosupressif de l'alcool.

*Les mots cles:* Heroin addict intraveineux, macrophages sinusoidals hepatices

HEPATIC SINUSOIDAL MACROPHAGES (KUPFER'S AND  
ENDOTHELIAL CELLS) IN THE HEROIN ADDICTS

Goran ILIĆ and Jovan STOJANOVIĆ

*Institute for Judicial Medicine, Niš*

The histological, histo-chemical and ultrastructural examinations of the liver have been done in order to have a precise view of the liver damages induced by the heroin abuse. The change in the number of the hepatic sinusoidal macrophages (Kupfer's and endothelial cells) has been determined with respect to the present liver tissue damages. The study has comprised an analysis of 50 autopsies, while 40 of them were from the group of the intravenous heroin addicts and 10 autopsies represented a control group. The number of the Kupfer's and endothelial cells has been significantly greater in the autopsy cases of the intravenous heroin addicts with the chronic active hepatitis regerdless of whether there was any posthepatic cirrhosis at the same time or not. In the intravenous heroin addict autopsies where together with



other morphological changes there were also alcohol obese changes there was not any significant difference in the number of the Kupfer's and endothelial cells with respect to the control group liver which is most probably a consequence of the alcohol immunosuppressive effect.

*Key words:* Intravenous Heroin Addict, Hepatic Sinusoidal Macrophages

Autor: Ass. dr sci Goran Ilić, specijalista sudske medicine, Zavod za sudsku medicinu u Nišu; kućna adresa: Niš, Filipa Kljajića 15a/39.

(Rad je Uredništvo primilo 15. novembra 2000. godine)