

## ORIGINALNI RAD / ORIGINAL PAPER

DOI 10.2298/VETGL1502003K

UDK 616.995.122  
616.36-003.6/-004

**DISTRIBUCIJA ZVEZDASTIH ČELIJA JETRE I NJIHOVA ULOGA  
U NASTANKU PARAZITSKE FIBROZE I CIROZE JETRE  
KOD DOMAĆIH ŽIVOTINJA\***  
*DISTRIBUTION OF HEPATIC STELLATE CELLS AND THEIR ROLE  
IN THE DEVELOPMENT OF PARASITIC FIBROSIS AND LIVER CIRRHOSIS  
IN DOMESTIC ANIMALS*

Kukolj V., Nešić S., Vučićević Ivana\*\*

*Povećanje ekstracelularnog matriksa kod pacova, kao i kod ljudi, nastaje kao posledica aktivacije zvezdastih ćelija jetre (HSCs). Cilj ovog rada je izučavanje uloge ovih ćelija u razvoju fibroze i ciroze jetre koje nastaju kao posledice infekcija ovaca i goveda velikim (*Fasciola hepatica*) i malim (*Dicrocoelium dendriticum*) metiljem. Uzorci jetri 12 goveda i 10 ovaca koje su u prirodnim uslovima inficirane velikim i malim metiljem su fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafin. Parafinski isečci su bojeni hematoksilin-eozinom i Mason-trihromnom metodom, kao i imunohistohemijskom metodom za  $\alpha$ -glatko-mišićni aktin ( $\alpha$ -SMA). Svi ispitani uzorci su prema histološkim kriterijumima podeljeni u tri grupe: jetre inficiranih životinja sa I stepenom fibroze, jetre inficiranih životinja sa II stepenom fibroze i jetre inficiranih životinja sa cirozom. Distribucija HSCs je zavisila od stepena fibroze jetre. Imunohistohemijski reaktivne HSCs su bile predominantno smeštene u perisinusoidnim prostorima. U uzorcima jetre sa cirozom HSCs su bile smeštene na periferiji pseudolobulusa. Čelije različitog oblika i veličine su bile pozitivne na  $\alpha$ -SMA. HSCs igraju važnu ulogu u sintezi komponenti ekstracelularnog matriksa tokom razvoja parazitske fibroze i ciroze jetre kod domaćih životinja.*

*Ključne reči: ciroza, fibroza, jetra, zvezdaste ćelije*

\* Rad primljen za štampu 17. 08. 2014. godine

\*\* Dr sc. vet. med. Kukolj Vladimir, docent, dr sc. vet. med. Nešić Slađan, asistent, dr sc. vet. med. Vučićević Ivana, asistent, Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

## Uvod / Introduction

Deregulacija u stvaranju i remodeliranju ekstracelularnog matriksa, kao odgovor ćelija jetre na oštećenja izazvana različitim toksinima, virusima, bakterijama, parazitima i drugim agensima, manifestuje se fibrozom i cirozom. Najznačajniju ulogu u razvoju fibroze i ciroze jetre kod životinja imaju paraziti koji stalno parazitiraju ili u toku svog razvoja migriraju kroz jetru (Rushton i Murray, 1977; Marcos i sar., 2007). Najčešće parazitsko oboljenje jetre kod domaćih životinja je metiljavost izazvana velikim (*Fasciola hepatica*) i malim (*Dicrocoelium dendriticum*) metiljem. Veliki i mali metilj parazitiraju u žučnim kanalićima i tokom migracije mogu da oštete jetrin parenhim. Razvoj promena i njihov stepen zavise od dužine trajanja i težine infekcije, kao i starosti životinje. U slučaju kratkotrajnih infekcija malim brojem parazita promene mogu da izostanu (Doy i Hughes, 1984; Otranto i Traversa, 2003). Promene u jetrinom parenhimu mogu da se manifestuju u akutnom i hroničnom obliku. Akutne lezije su u osnovi traumatske prirode. Pri akutnom obliku promene podrazumevaju oštećenje jetrinog parenhima i krvnih sudova, tj. sinusoidnih kapilara (Perez i sar., 1999; Manga-Gonzalez i sar., 2004; Shirai i sar., 2006). U hroničnom obliku promene se uglavnom sreću na žučnim kanalićima u vidu različitih formi holangitisa (Dalton, 1999). Perzistentna oštećenja jetrinog parenhima i žučnih kanalića dovode do razvoja parazitske fibroze i ciroze jetre. Eksperimentalno je dokazano da se fibroza I stepena razvija u jetri kod 17% goveda inficiranih velikim metiljem. Fibroza II stepena takođe je ustanovljena kod 17%, a difuzne fibrotične lezije III stepena, tj. ciroza, kod 66% inficiranih goveda. Stepenn fibroze je u korelaciji sa stepenom infekcije, odnosno, brojem prisutnih metilja u jetri (Marcos i sar., 2007). Generalno, mehanizam nastanka i razvoja fibroze i ciroze u jetri nije u svemu poznat i sa stanovišta današnjih saznanja obuhvata perzistentno oštećenje hepatocita i/ili epitela žučnih kanalića sa različitim stepenom nekroze i apoptoze, prisustvo hroničnog inflamatornog infiltrata, aktivaciju različitih tipova ćelija koje proizvode matriks i promene u kvalitetu i kvantitetu ekstracelularnog matriksa (Parola i Pinzani, 2009). Hronično oštećenje jetrinog parenhima i žučnih kanalića dovodi do aktivacije različitih populacija ćelija i njihove transdiferencijacije u miofibroblaste koji imaju kontraktilna, proinflatorna i fibrogenetička svojstva (Bataller i Brenner, 2005; Moreira, 2007). Prema svojoj lokalizaciji u jetri i imunofenotipskim karakteristikama miofibroblasti u jetri pacova i čoveka se dele na tri subpopulacije: 1) portalni ili septalni miofibroblasti koji se nalaze u portalnim prostorima ili u novoformiranim vezivno-tkivnim septama i najvećim delom potiču od portalnih fibroblasta; 2) granični (*interface*) miofibroblasti prisutni na granici između parenhima i vezivnog tkiva portalnih prostora ili novoformiranih vezivno-tkivnih septi i prema svom antigenom profilu verovatno vode poreklo od aktiviranih HSCs i 3) perisinusoidno smeštene aktivirane HSCs koje potiču od mirnih neaktivnih HSCs (Parola i Pinzani, 2009; Cassiman i sar., 2002; Forbes i Parola, 2011). Nakon aktivacije miofibroblasti se po svojim fenotipskim osobinama razlikuju od fibroblasta, odnosno ćelija od kojih vode poreklo.

Morfološki, sposobnost kontrakcije se ogleda u tome da miofibroblasti ekspimiraju  $\alpha$ -SMA, kontraktilni protein u svojoj citoplazmi (Atzori i sar., 2009; Duffield i sar., 2013; Fausther i sar., 2013). Dokazano je da kod čoveka, pacova, psa, mačke i jelena lopatara ključnu ulogu u sintezi komponenti ekstracelularnog matriksa pri razvoju fibroze i ciroze jetre imaju aktivirane HSCs (Cassiman i sar., 2002; Ide i sar., 2001; Mekonnen i sar., 2007; Gibelli i sar., 2008; Knežević i sar., 2009; Aleksić-Kovačević i sar., 2010; Marinković i sar., 2013). Cilj ovog rada je izučavanje uloge ovih ćelija u razvoju fibroze i ciroze jetre koja nastaje kao posledica infekcije ovaca i goveda velikim (*Fasciola hepatica*) i malim (*Dicrocoelium dendriticum*) metiljem.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

Ovim ispitivanjem su obuhvaćeni uzorci jetri 12 goveda i 10 ovaca oba pola, obdukovane na Katedri za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Životinje su u prirodnim uslovima inficirane velikim (*Fasciola hepatica*) i malim (*Dicrocoelium dendriticum*) metiljem. Nakon detaljnog makroskopskog pregleda prikupljeni su uzorci parazita i jetre. Izolacija i identifikacija prikupljenih parazita urađena je u nativnom preparatu prosvetljenom laktofenolom, na osnovu morfoloških i morfometrijskih karakteristika izdvojenih parazita. Uzorci jetre su fiksirani u 10% neutralnom formalinu nakon čega je tkivo standardno obrađeno u automatskom tkivnom procesoru (dehidratacija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski isečci, debljine 3–5  $\mu$ m su bojeni hematoksilin-eozinom i Mason-trihromnom metodom, kao i imunohistohemijskom metodom za  $\alpha$ -glatko-mišićni aktin ( $\alpha$ -SMA). Od imunohistohemijskih metoda korišćena je trostepena streptavidin-biotin metoda (LSAB2). U tkivnim isečcima je najpre izvršeno demaskiranje antigena kuvanjem u citratnom puferu (pH=6,0) 21 minut. Sva ispiranja i razblaženja tokom reakcije rađena su u PBS-u pH = 7,2–7,4. Preinkubacija je vršena u 10% kozjem serumu u PBS-u 20 minuta na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Isečci su inkubirani primarnim antitelom  $\alpha$ -SMA, clone 1A4, *monoclonal mouse anti-human antibody* (DAKO, M0851) u razređenju 1:50 na sobnoj temperaturi 60 minuta. Nakon inkubacije i ispiranja primarnog antitela, isečci su tretirani odgovarajućim komponentama iz kita za detekciju (*Dako Cytomation LSAB2 System-HRP*; Dako, K0675). Antigen-antitelo kompleks koji je nastao u tkivu postao je vidljiv primenom diaminobenzidina (DAB+, Dako, K3468) 5 do 15 minuta. Na mestu pozitivne reakcije javlja se precipitat smeđe boje. Kontrastiranje isečaka izvršeno je u koncentrovanom hematoksilinu (*Mayer-ov hematoksilin*) 2 sekunde. Nakon bojenja, isečci su montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje *Glycergel* (Dako, C563).

## Rezultati / Results

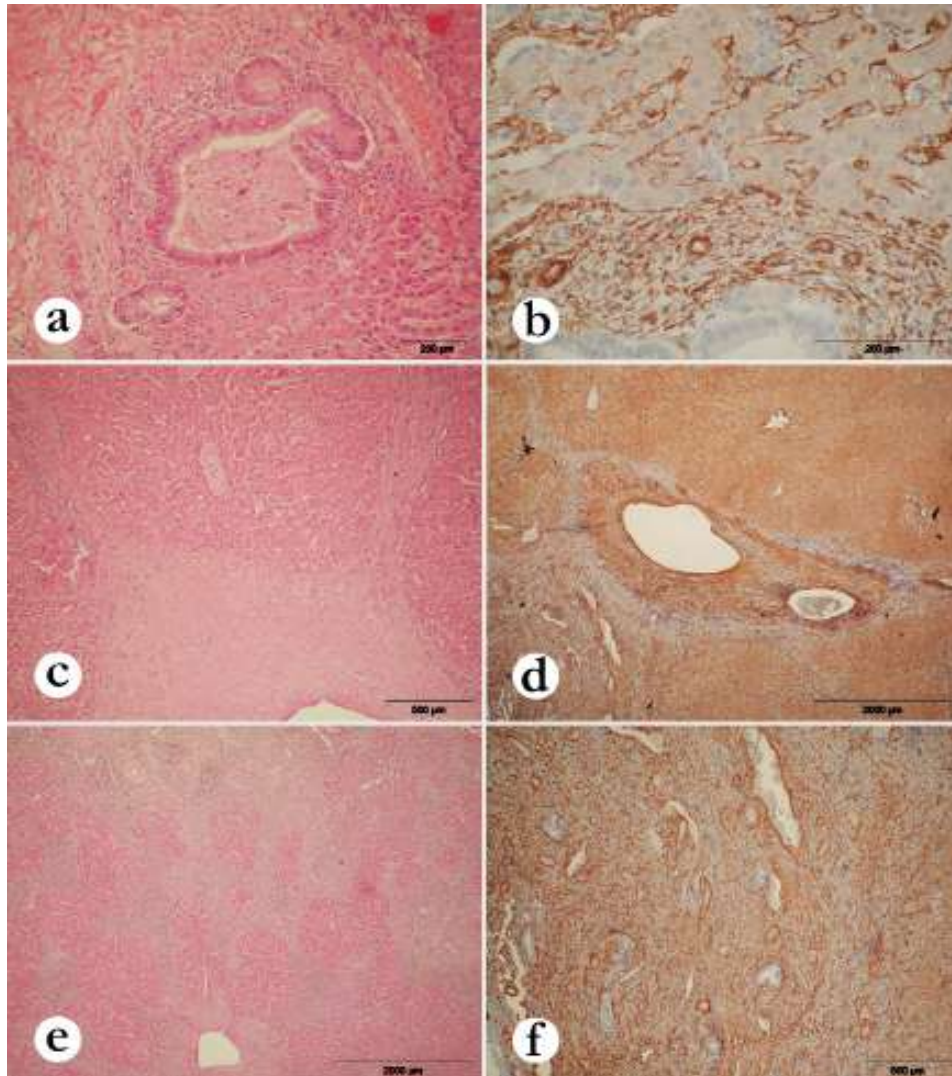
Makroskopskim pregledom ustanovljeno je da je jetra inficiranih goveda i ovaca bila povećana, tupih rubova, čvrsto-elastične do žilave konzistencije, dok je u šest slučajeva jetra bila normalne veličine i trošne konzistencije. U pojedinim slučajevima u parenhimu su uočene migratorne trake ispunjene hemoragično-nekrotičnim sadržajem. Kod svih ispitanih životinja zasecanjem jetrinog parenhima u žučnim kanalićima video se sluzav sadržaj žutozelene do smeđezelene boje u kojem su se uočavali odrasli oblici velikog (*Fasciola hepatica*) i malog (*Dicrocoelium dendriticum*) metilja. Zid žučnih kanala je zadebljan, bele boje i čvrste konzistencije.

Svi ispitani uzorci su prema histološkim kriterijumima podeljeni u tri grupe: jetre inficiranih životinja sa I stepenom fibroze, jetre inficiranih životinja sa II stepenom fibroze i jetre inficiranih životinja sa cirozom.

Mikroskopskim pregledom jetre sa I stepenom fibroze uočava se veća količina vezivnog tkiva u portalnim prostorima, sastavljenog od kolagenih vlakana i fibroblasta. Vezivno tkivo portalnih prostora je infiltrirano limfocitima, makrofagima i manjim brojem eozinofilnih granulocita. Epitelne ćelije i sluzne ćelije žučnih kanalića su umereno proliferisane. Lumen žučnih kanala je ispunjen tečnošću i detritusom (slika 1a). Imunohistohemijska pozitivnost na  $\alpha$ -SMA u vidu depozita fino-zrnastog izgleda zapaža se na perisinusoidnim ćelijama zvezdastog oblika i njihovim dugačkim citoplazmatskim nastavcima (slika 1b). Samo retke perisinusoidne ćelije imaju vakuolu u citoplazmi. Imunohistohemijska pozitivnost na  $\alpha$ -SMA je prisutna i na vretenastim glatkomišićnim ćelijama u zidu većih krvnih sudova.

Jetra sa II stepenom fibroze odlikuje se prisustvom vlaknastog vezivnog tkiva u portalnom prostoru odakle se, u vidu širih ili užih vezivno-tkivnih septi, pruža između režnjeva ka susednim portalnim prostorima (slika 1c). U jednom portalnom prostoru se vidi 5–7 žučnih kanalića. Epitel žučnih kanalića je proliferisan i mestimično odvojen od bazalne membrane, smešten u lumenu, zajedno sa nekrotizovanim ćelijama i nešto seroznog eksudata. Oko žučnih kanalića nalazi se vezivno tkivo infiltrirano limfocitima i eozinofilnim granulocitima. Na  $\alpha$ -SMA intenzivno su obojene perisinusoidne zvezdaste ćelije sa citoplazmatskim nastavcima u kojima se ne uočavaju lipidne vakuole. Pored perisinusoidnih ćelija, brojne  $\alpha$ -SMA pozitivne ćelije se nalaze u vezivnom tkivu portalnih prostora i fibroznim septama. Ove ćelije su vretenastog oblika i smeštene su u centralnom delu septe kao i na granici vezivno-tkivne septe i parenhima (slika 1d).

Jetra sa razvijenom cirozom pokazuje enormno prisustvo vezivnog tkiva. Vlaknasto vezivo u vidu širih ili užih traka difuzno prožima jetrin parenhim, deleći ga na pseudolobuluse nepravilnih oblika i međusobno nejednakih veličina. Novoformirani pseudolobulusi su najčešće okruglog do ovalnog oblika, sa nepravilnim rasporedom hepatocita i ekscentrično postavljenom centralnom venom. U



Slika 1. Histološke (a,c,e) i imunohistohemijske (b,d,f) promene u jetri ovaca (a,b) i goveda (c,d,e,f) inficiranih velikim i malim metiljem; a) jetra ovce sa I stepenom fibroze, umnoženo vezivno tkivo u portalnom prostoru, tečnost i detritus u lumenu žučnog kanala, HE; b) jetra ovce sa I stepenom fibroze, ekspresija  $\alpha$ -SMA na perisinusoidnim zvezdastim ćelijama i portalnim fibroblastima,  $\alpha$ -SMA, LSAB2; c) jetra govečeta sa II stepenom fibroze, vezivno-tkivne septe se šire u vidu traka između lobulusa, HE; d) jetra govečeta sa II stepenom fibroze, ekspresija  $\alpha$ -SMA na zvezdastim i glatkomišićnim ćelijama,  $\alpha$ -SMA, LSAB2; e) jetra govečeta sa cirozom, vezivno tkivo deli jetrin parenhim na pseudolobuluse, HE; f) jetra govečeta sa cirozom, ekspresija  $\alpha$ -SMA na zvezdastim ćelijama smeštenim na periferiji pseudolobulusa i glatkomišićnim ćelijama krvnih sudova,  $\alpha$ -SMA, LSAB2/

*Picture1. Histological (a,c,e) and immunohistochemical (b,d,f) changes in the liver of sheep (a,b) and cattle(c,d,e,f) infected with large and small fluke a) liver of a sheep with the first degree of fibrosis, multiplied connective tissue in portal space, fluid and detritus in the lumen of bile duct, HE; b) liver of a sheep with the first degree of fibrosis, expression of  $\alpha$ -SMA on perisinusoid stellate cells and portal fibroblast,  $\alpha$ -SMA, LSAB2; c) liver of a beef with the second level of fibrosis, connective tissue of septa spreading in the form of strips between the lobule, HE; d) liver of a beef with the second level of fibrosis, expression of  $\alpha$ -SMA on stellate and smooth muscle cells,  $\alpha$ -SMA, LSAB2; e) liver of a beef with cirrhosis, connective tissue dividing liver parenchyma on pseudolobulus, HE; f) liver of a beef with cirrhosis, expression of  $\alpha$ -SMA on stellate cells placed on periphery of pseudoglobulus and smooth muscle cells of blood vessels,  $\alpha$ -SMA, LSAB2.*

vezivnom tkivu je prisutan hronični ćelijski infiltrat sastavljen od limfocita, makrofaga, plazmocita i manjeg broja eozinofilnih granulocita (slika 1e). U jetri sa cirozom perisinusoidne ćelije se veoma intenzivno boje  $\alpha$ -SMA antitelom. Ove ćelije su najbrojnije na periferiji pseudolobulusa, imaju veoma naglašene citoplazmatske nastavke i u njihovoj citoplazmi se ne vidi vakuola. Imunohistohemijsku pozitivnost na  $\alpha$ -SMA pokazuju i brojne ćelije u vezivnom tkivu koje okružuje regenerativne lobule.  $\alpha$ -SMA pozitivne ćelije u vezivnom tkivu su polimorfne, vretenaste, okrugle, u obliku kapljice ili nepravilnog oblika (slika 1f).

#### **Diskusija / Discussion**

Makroskopski ustanovljeno povećanje jetre gumaste konzistencije ukazivalo je na fibrozu različitog stepena koja je nastala kao posledica dugotrajne infekcije velikim i malim metiljem. Razvoj parazitske fibroze različitog stepena u vezi sa infekcijom preživara velikim metiljem je opisana i od strane drugih autora (Marcos i sar., 2007). U svim ispitanim uzorcima jetre promene ukazuju na deregulaciju remodeliranja vezivnog tkiva i bilijarnu hiperplaziju. Ustanovljene mikroskopske promene na strukturama jetre posledica su direktnog dejstva parazita i reakcije ćelija jetre na perzistentno prisustvo parazita (Anthony i sar., 2010; Duffield i sar., 2013).

Ćelije imunohistohemijski reaktivne na  $\alpha$ -SMA bile su predominantno smeštene u perisinusoidnim prostorima i po svojim imunofenotipskim karakteristikama i lokalizaciji odgovaraju HSCs i bile su distribuirane difuzno, kroz ceo parenhim jetre. Odsustvo masne kapljice, koja u normalnim uslovima predstavlja depo vitamina A, u većini HSC u uzorcima jetre sa fibrozom i cirozom ukazuje na njihovu aktivaciju i objašnjava se hidrolizom retinil-estara, koji zatim u formi retinola napuštaju ćeliju (Bataller i Brenner, 2005; Moreira, 2007). Perisinusoidne HSC najintenzivnije se boje  $\alpha$ -SMA u jetri sa razvijenom cirozom. Ovakvi rezultati idu u prilog zapažanjim pojedinih autora da sa povećanjem stepena fibroze u jetri raste i intenzitet ekspresije  $\alpha$ -SMA na HSCs (Cassiman i sar., 2002; Mekonnen i sar., 2007; Knežević i sar., 2009). Intenzivnija reakcija perisinusoidnih ćelija na  $\alpha$ -SMA prati fibrozu jetre II stepena. Brojne  $\alpha$ -SMA pozitivne ćelije u vezivnom

tkivu portalnih prostora i fibroznim septama odgovaraju septalnim i graničnim miofibroblastima (Golbar i sar., 2013). Pretpostavlja se da septalni miofibroblasti potiču iz portalnog područja, a granični miofibroblasti verovatno vode poreklo od aktiviranih HSCs (Cassiman i sar., 2002; Parola i Pinzani, 2009). Nalaz  $\alpha$ -SMA imunohistohemijski pozitivnih ćelija različitog oblika i veličine u vezivnom tkivu portalnih prostora fibrotične jetre ukazuje da bi portalni fibroblasti mogli takođe da budu izvor miofibroblasta. S obzirom na činjenicu da je u ispitanim uzorcima jetre konstatovanaolestaza, moguće je da je uloga ovih ćelija slična opisanoj kod razvoja fibroze indukovane podvezivanjem žučnih kanala (Dranoff i Wells, 2010; Lemoinne i sar., 2013).

Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da aktivirane HSCs igraju važnu ulogu u sintezi komponenti ekstracelularnog matriksa tokom razvoja parazitske fibroze i ciroze jetre kod domaćih životinja. Njihova distribucija zavisila je od stepena fibroze jetre. Aktivirane HSCs, kao i portalni i septalni miofibroblasti, su u korelaciji sa stepenom fibroze jetre.

#### Literatura / References

1. Aleksić-Kovačević S, Kukulj V, Kureljušić B, Marinković D, Knežević Dj, Ignjatović I, Jovanović M, Knežević M, Gledić D. Role of hepatic stellate cells (HSCs) in the development of hepatic fibrosis in cats with polycystic kidney disease (PKD). *Acta Vet* 2010; 60(4): 391-400.
2. Anthony B, Allen JT, Li YS, McManus DP. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. *Parasit Vectors* 2010; 3(1): 60, doi: 10.1186/1756-3305-3-60.
3. Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(8-9): 1639-42.
4. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-18.
5. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002; 36(2): 200-9.
6. Dalton JP. Fasciolosis. Wallingford: CABI Publishing, UK, 1999.
7. Doy TG, Hughes DL. Early migration of immature *Fasciola hepatica* and associated liver pathology in cattle. *Res Vet Sci* 1984; 37(2): 219-22.
8. Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 2010; 51(4): 1438-44.
9. Duffield JS, Lupher M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 241-76.
10. Fausther M, Lavoie EG, Dranoff JA. Contribution of myofibroblasts of different origins to liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 2013; 1(3): 225-30.
11. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25(2): 207-17.
12. Gibelli NE, Tannuri U, Mello ES. Immunohistochemical studies of stellate cells in experimental cholestasis in newborn and adult rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2008; 63(5): 689-94.
13. Golbar HM, Izawa T, Juniantito V, Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. Immunohistochemical characterization of macrophages and myofibroblasts in fibrotic liver lesions due to *Fasciola* infection in cattle. *J Vet Med Sci* 2013; 75(7): 857-65.
14. Ide M, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S, Takeya M. Immunohistochemical analysis of macrophages and myofibroblasts appearing in hepatic and renal fibrosis of dogs. *J Comp Pathol* 2001; 124(1): 60-9.

15. Knežević M, Gledić D, Kukulj V, Knežević D, Jovanović M, Božić T, Aleksić-Kovačević S. Expression of  $\alpha$ -SMA, desmin and vimentin in canine liver with fibrosis. *Acta Vet* 2009; 59(4): 361-70.
16. Lemoinne S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(7): 948-54.
17. Manga-Gonzalez MY, Ferreras MC, Campo R, Gonzalez-Lanza C, Perez V, Garcia-Marin JF. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol Res* 2004; 93(5): 344-55.
18. Marcos LA, Yi P, Machicado A, Andrade R, Samalvides F, Sanchez J, Terashima A. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. *J Helminthol* 2007; 81(4): 381-6.
19. Marinković D, Kukulj V, Aleksić-Kovačević S, Jovanović M, Knežević M. The role of hepatic myofibroblasts in liver cirrhosis in fallow deer (*Dama dama*) naturally infected with giant liver fluke (*Fascioloides magna*). *BMC Vet Res* 2013; 9: 45, doi: 10.1186/1746-6148-9-45.
20. Mekonnen GA, Ijzer J, Nederbragt H. Tenascin-C in chronic canine hepatitis: immunohistochemical localization and correlation with necro-inflammatory activity, fibrotic stage, and expression of alpha-smooth muscle actin, cytokeratin 7, and CD3+ cells. *Vet Pathol* 2007; 44(6): 803-13.
21. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(11): 1728-34.
22. Otranto D, Traversa D. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends Parasitol* 2003; 19(1): 12-5.
23. Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2009; 2(1): 4-9.
24. Perez J, Martin de las Mulas J, Carrasco L, Gutierrez PN, Martinez-Cruz MS, Martinez-Moreno A. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *J Comp Path* 1999; 120(2): 199-210.
25. Rushton B, Murray M. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *J Comp Path* 1977; 87(3): 459-70.
26. Shirai W, Sato T, Shibuya H, Naito K, Tsukise A. Anatomicopathological study of vascular and biliary systems using cast samples of *Fasciola* – infected bovine livers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53(5): 239-45.

ENGLISH

**DISTRIBUTION OF HEPATIC STELLATE CELLS AND THEIR ROLE IN THE DEVELOPMENT OF PARASITIC FIBROSIS AND LIVER CIRRHOSIS IN DOMESTIC ANIMALS**

**Kukulj V., Nešić S., Vučićević Ivana**

Increasing of the extracellular matrix in rats, as well as in humans, occurs as a consequence of hepatic stellate cells (HSCs) activity. The objective of this work was to investigate the role of these cells in the development of fibrosis and liver cirrhosis which occurs as a consequence of infection of sheep and goats with large (*Fasciola hepatica*) and small (*Dicrocoelium dendriticum*) fluke. Liver samples taken from 12 cattle and 10 sheep infected under natural conditions with large and small fluke were fixed in formalin and embedded in paraffin. Paraffin clips were stained with hematoxylin-eosin and masson trichrome method, and immunohistochemical method for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). All tested



samples were divided into three groups according to histological criteria: livers of infected animals with the first degree of fibrosis, livers of infected animals with the second degree of fibrosis, and livers of infected animals with cirrhosis. Distribution of HSCs depended on the degree of liver fibrosis. Immunohistochemically reactive HSCs were predominantly placed in perisinusoidal space. In liver samples with cirrhosis, HSCs were placed on the periphery of pseudolobulus. Cells of a different shape and size were positive to  $\alpha$ -SMA. HSCs play an important role in synthesis of components of extracellular matrix during the development of parasitic fibrosis and liver cirrhosis in domestic animals.

Key words: cirrhosis, fibrosis, liver, stellate cells.

**РУССКИЙ**

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ИХ РОЛЬ  
В ВОЗНИКНОВЕНИИ ПАРАЗИТАРНОГО ФИБРОЗА И  
ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ**

**Куколь В., Нешич С., Вучичевич Ивана**

Увеличение содержания внеклеточного матрикса у крыс, как и у человека, возникает вследствие активации звездчатых клеток печени (HSC). Целью данного этого исследования является изучение роли этих клеток в развитии фиброза и цирроза печени, возникающего как последствие заражения овец и КРС большой (*Fasciola hepatica*) и малой (*Dicrocoelium dendriticum*) трематодой. Образцы печени 12 коров и 10 овец, в естественных условиях инфицированных большой и малой трематодой фиксировались в формалине и заливались парафином. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином и методом трихромного окрашивания по Массону, а также выполнялось иммуногистохимическое окрашивание на гладкомышечный актин ( $\alpha$ -SMA). Все исследованные образцы по гистологическим критериям были отнесены к трем группам: печень зараженных животных с первой степенью фиброза, печень зараженных животных со второй степенью фиброза и печень зараженных животных с циррозом. Распределение HSC зависело от степени фиброза печени. Иммуногистохимически реактивные HSC преимущественно располагались в перисинусоидальном пространстве. В образцах печени с циррозом HSC располагались на периферии ложных долек. Клетки различной формы и размеров позитивны к  $\alpha$ -SMA. HSC играют важную роль в синтезе компонентов внеклеточного матрикса в процессе развития паразитарного фиброза и цирроза печени домашних животных.

Ключевые слова: цирроз, фиброз, печень, звездчатые клетки