

Non solo epatociti: descrizione della citomorfologia, normale e patologica relativa alle “altre” cellule del fegato

RIASSUNTO

La popolazione cellulare predominante del fegato è rappresentata dagli epatociti (65% delle cellule), di cui la presentazione morfologica, i rapporti architetturali e le trasformazioni in senso neoplastico costituiscono il target diagnostico principale in citopatologia epatica. Tuttavia il fegato è popolato da elementi cellulari diversi dagli epatociti, che ne coadiuvano l'attività, integrano le grandi funzioni dell'organo e svolgono ruoli di importanza imprescindibile. Il presente articolo si propone di enumerare le cellule epatiche diverse dagli epatociti e di descriverne l'aspetto citologico e le funzioni in corso di normalità o le alterazioni patologiche.

CENNI DI MICROANATOMIA EPATICA

Un'analisi dettagliata della microanatomia epatica permette di apprezzare una distribuzione architetturale ordinata degli epatociti, in assenza della quale essi non potrebbero svolgere praticamente nessuna delle loro funzioni; nel contesto di questo ordine strutturale trovano collocazione una serie di cellule non epatocitarie, che svolgono funzioni di sorveglianza immunitaria, di attività fagica, di conduzione dei prodotti secretori, di immagazzinamento e ruoli totipotenti, che si attivano in particolari condizioni o sotto determinati stimoli patologici. Nello specifico, le filiere di epatociti sono sottese tra un tratto portale ed il vaso centrolobulare; il sangue portale arterioso e venoso, proveniente rispettivamente dall'arteria epatica e dalla vena porta, scorre all'interno di *vasi sinusoidi*, delimitati da cellule endoteliali il cui citoplasma fenestrato permette il passaggio di soluti e molecole plasmatiche con diametro fino a ca. 1000 Å (angstrom) e che conseguentemente favorisce gli scambi metabolici con gli epatociti (Immagine 1); le cellule endoteliali non poggiano su una membrana basale e sono separate dagli epatociti dallo *spazio di Disse*, una sottile intercapedine supportata da un quantitativo minimo di fibrille collagene, soprattutto di tipo I e III, oltre che da molecole di proteoglicani o glicoproteine, quali fibronectina e laminina, complessivamente identificate con il termine di matrice extracellulare (ECM). A ridosso delle fenestrature dei capillari sinusoidi, nel versante vascolare, si localizzano le cellule di Kupffer, macrofagi epatici specializzati e rari elementi linfocitari, mentre nel lume dello spazio di Disse sono situate le cellule stellate e rari mastociti, soprattutto in corrispondenza dei segmenti centrolobulari. Il sangue, scorrendo nei sinusoidi, e dopo aver operato gli scambi metabolici con gli epatociti, raggiunge il lume della vena centrolobulare, dal quale viene immesso nel circolo venoso epatico per uscirne tramite la vena epatica, che a sua volta si getta nella vena cava caudale. A fronte di un flusso ematico che percola i sinusoidi con direzione porto-centrolobulare, esiste un flusso con direzione opposta, che trasporta invece la bile, uno dei principali prodotti di secrezione del fegato, dagli epatociti verso lo spazio portale, dapprima attraverso sottili canalicoli biliari tra gli epatociti, successivamente in piccoli dotti periportali delimitati da cellule cuboidali e da epatociti, detti *canali di Hering*, che raggiungono il vaso biliare localizzato nel contesto dello spazio portale e delimitato a sua volta da cellule cuboidali.

Le cellule di cui analizzeremo di seguito i caratteri sono le *cellule di Kupffer*, le *cellule epiteliali biliari*, le *cellule stellate*, ed i *mastociti residenti*.

Cellule di Kupffer

Sono macrofagi specializzati residenti nel compartimento epatico; derivano dai monociti circolanti e sono localizzati in corrispondenza del-

Carlo Masserdotti

DVM, Dipl ECVCP, Spec Bioch Clin IAT

Laboratorio Veterinario “San Marco”, Padova

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 13/12/2010 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 02/08/2011”.

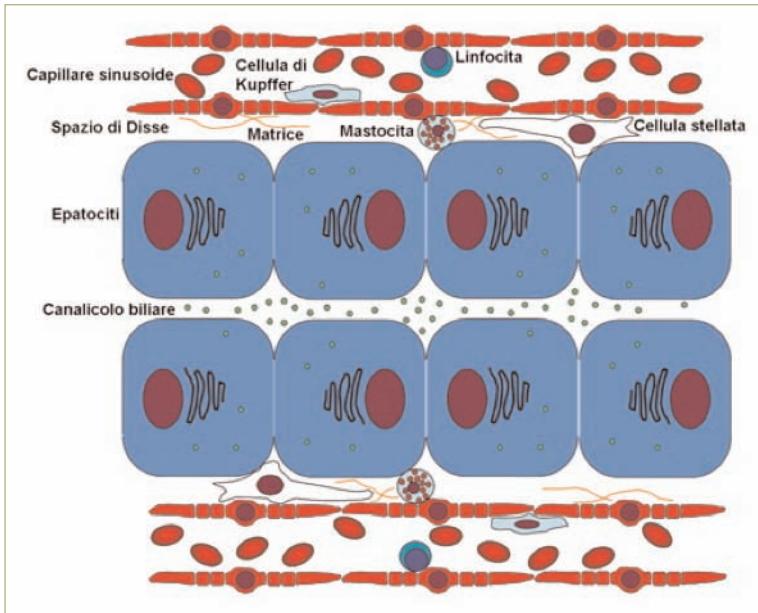


IMMAGINE 1 - Rappresentazione schematica dei rapporti tra microvascolarizzazione sinusoidale, epatociti e cellule non epatocitarie; gli endotelioцитi dei sinusoidi sono caratterizzati da canali transcitoplasmatici definiti “fenestrature”, attraverso cui si verifica il passaggio di numerose molecole plasmatiche verso gli epatociti; a ridosso della superficie endovascolare dei sinusoidi aderiscono le **cellule di Kupffer**, macrofagi epatici stanziali e rari **linfociti**. Le filiere di epatociti sono separate dai capillari sinusoidi dallo **spazio di Disse**, all'interno del quale, immersi in un modestissimo quantitativo di fibrille collagene, si localizzano le **cellule stellate** e rari **mastociti**. Tra due filiere di epatociti adiacenti si stabiliscono connessioni che determinano la formazione del canalicolo biliare.

le fenestrature sinusoidali, ancorati alla superficie luminale delle cellule endoteliali o con esse occasionalmente interdigitate: l'adesione all'endotelio è mediata da protrusioni citoplasmatiche, che penetrano nelle fenestrature per entrare in contatto con lo spazio di Disse o che talora si estendono attraverso il lume vascolare per ancorarsi analogamente sul versante opposto¹; il loro numero, nel topo, è maggiore nei sinusoidi adiacenti allo spazio

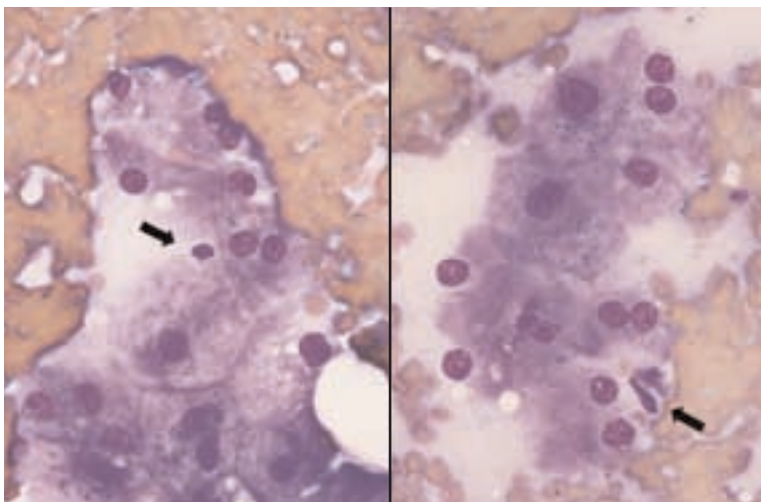


FIGURA 1 - Le frecce indicano due cellule di Kupffer normali, incuneate tra gli epatociti. Si noti il citoplasma indistinto e il nucleo rotondo (a sinistra) o triangolare (a destra), a cromatina compatta (May-Grünwald Giemsa; 100X).

portale rispetto a quello midzonale o centrolobulare². La loro localizzazione strategica esalta il ruolo di fagocita professionista cui sono adibite queste cellule e che è diretto nei confronti di particelle, cellule, quali epatociti apoptotici, batteri, tra cui *Lysteria spp* e *Salmonella spp*³, sostanze tossiche, tra cui alcune endotossine e l'etanolo⁴, provenienti dal circolo portale⁵. La capacità di sorveglianza e di eliminazione di agenti eziologici batterici potenzialmente nocivi costituisce una delle funzioni principali, tanto che fenomeni focali di necrosi tissutale, che determinino la scomparsa di queste cellule, rappresentano una porta di ingresso alle infezioni; inoltre essi sono produttori di mediatori chimici, quali eicosanoidi, radicali liberi, citochine, interferone, enzimi lisosomiali, PAF (Platelet Activating Factor) che svolgono un ruolo determinante sia nei meccanismi di difesa sia in processi patologici del fegato⁷: l'attivazione delle cellule di Kupffer mediata da agenti infettivi, sostanze chimiche, tossine e farmaci è infatti responsabile del rilascio di sostanze biologicamente attive, quali citochine, enzimi proteolitici e radicali ossidanti che innescano i processi di danno epatocitario⁸.

Citologia

Come ogni macrofago tissutale, le cellule di Kupffer in condizioni di quiescenza o di non-attivazione possono essere difficili da riconoscere, o addirittura non essere identificabili con certezza, a causa delle piccole dimensioni e della loro sede di localizzazione: esse sono caratterizzate da piccole dimensioni, citoplasma scarso a bordi indistinguibili, nucleo rotondo o piramidale, a cromatina coartata, generalmente incuneate tra i bordi citoplasmatici di due epatociti⁹ (Figura 1). Quando invece la cellula di Kupffer è attivata, l'aspetto morfologico si caratterizza fundamentalmente per un aumento delle dimensioni e per vacuolizzazione citoplasmatica di intensità variabile (Figura 2). Come precedentemente espresso, numerose condizioni possono stimolare l'attività macrofagica (Figura 3): tra esse si annoverano gli agenti eziologici, soprattutto di tipo batterico o protozooario, il detrito lipidico, rilevabile in casi di steatosi epatica, il materiale biliare, il cui accumulo può essere una conseguenza di fenomeni di stasi, il pigmento ceroidale, costituito da granuli di cromatismo intensamente basofilo, derivante dalla perossidazione lipidica come conseguenza di fenomeni necrotici, il pigmento ferrico costituito da granuli brunastri, derivante da fenomeni di eritrofagocitosi o come espressione di rare malattie da accumulo, quali l'emocromatosi. Nei casi in cui la sola presentazione morfologica non permetta di riconoscere con certezza il materiale fagocitato, può essere utile ricorrere alle colorazioni speciali¹⁰. Tra esse si segnalano l'Oil-Red-O, per il riconoscimento dei lipidi neutri, la Fouchet-Van Gieson per la bilirubina, lo Ziehl-Neelsen (metodo modi-

ficato) per il pigmento ceroide, il Blu di Prussia per il pigmento ferrico (Figura 3 bis)

Talora è possibile osservare cellule di Kupffer a citoplasma variabilmente vacuolizzato, talora pigmentato e raggruppate in aggregati che rappresentano l'espressione citologica del lipogranuloma, ossia un accumulo focale di macrofagi contenenti pigmento ceroide e globuli lipidici, a volte associati a cellule infiammatorie di tipo linfocitario o plasmocellulare, che si forma a seguito di necrosi focale di epatociti¹¹ (Figura 4).

Cellule epiteliali biliari

Esse delimitano il lume dei canali che trasportano la bile ma sono dotate di capacità secretoria ed assorbente, che contribuisce a modificarne la composizione e la fluidità finale¹². La bile, prodotta dagli epatociti, scorre all'interno di *canalicoli biliari* che si creano per effetto di giunzioni intercitoplasmatiche tra due filiere di cellule epatocitarie adiacenti giustapposte (Immagine 1). I canalicoli biliari, si continuano nei cosiddetti *canali di Hering*, o dotti terminali, delimitati sia da cellule cuboidali sia da epatociti, in corrispondenza dei quali si localizzano le *cellule ovali*, elementi progenitori con funzione rigenerativa¹³; essi sfociano nei dotti biliari interlobulari portali (Immagine 2), delimitati da cellule epiteliali biliari di aspetto cuboidale, che a loro volta proseguono nei grandi dotti biliari intra ed extraepatici, il cui lume è delimitato da cellule con aspetto colonnare.

Citologia

Gli elementi biliari sono reperto raro ed inconstante in campioni citologici provenienti dal fegato, sia normale che patologico; quando presenti, essi si differenziano dagli epatociti per le dimensioni nettamente inferiori, per il citoplasma scarso, ed il nucleo rotondo ed ipercromatico. Le cellule biliari manifestano forma cuboidale e sono organizzate generalmente in piccoli lembi con architettura di tipo honeycomb, detta anche, per la forma geometrica che assumono, a "favo d'alveare" oppure, all'aumentare del calibro del dotto da cui provengono, forma colonnare e disposizione in brevi palizzate regolari¹⁴ (Figura 5). Le cellule epiteliali biliari possono diventare numerose come conseguenza di condizioni iperplastiche indotte da proliferazione duttale, quali soprattutto disordini ostruttivi o colangiti croniche. In questi casi, accanto ad epatociti ed a quote variabili di cellule infiammatorie, è possibile osservare lembi bidimensionali di cellule cuboidali a scarso citoplasma debolmente basofilo e nucleo rotondo modicamente dismetrico a cromatina compatta (Figura 6). Tra le alterazioni morfologiche osservabili è infrequente la vacuolizzazione citoplasmatica, presumibile effetto citopatico o conseguenza di fenomeni metaplastici¹⁵ (Figura 7), descritti anche con il termine di "goblet-cell meta-

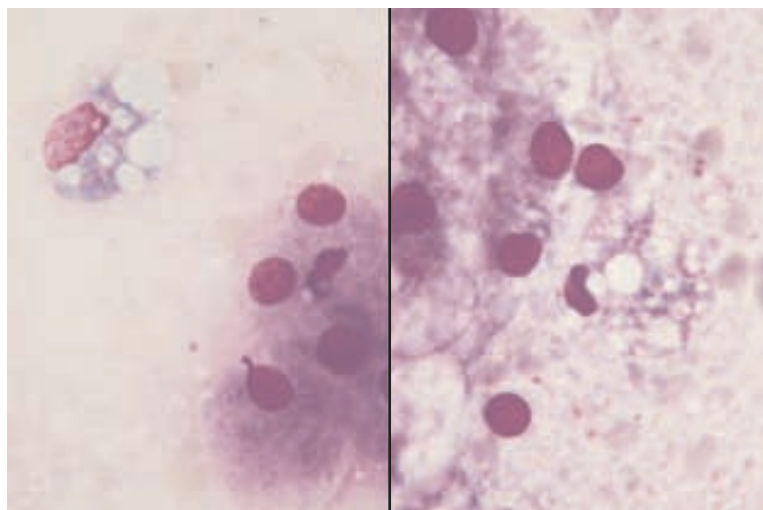


FIGURA 2 - Due cellule di Kupffer attivate, ad ampio citoplasma rotondeggiante, dilatato dall'accumulo di vacuoli voluminosi e da materiale granulare basofilo (May-Grünwald Giemsa; 100X).

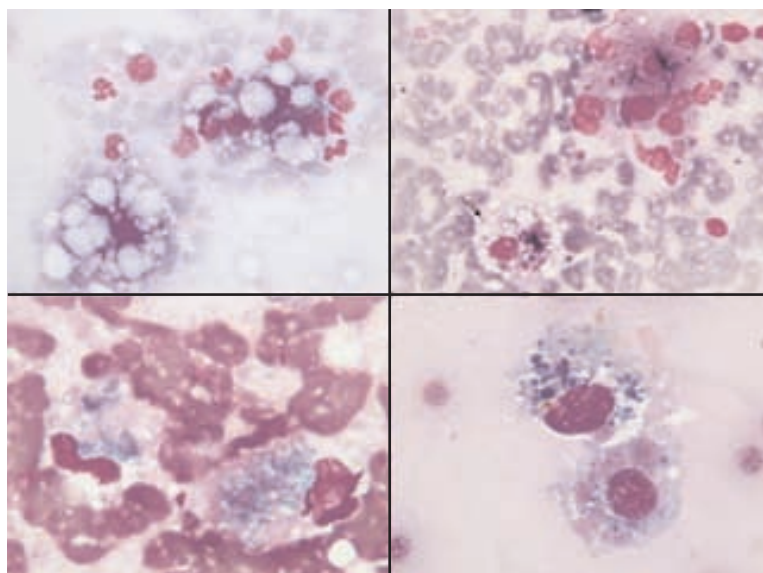


FIGURA 3 - In alto a sinistra: lipofagocitosi (May-Grünwald Giemsa; 40X). In alto a destra: coleliti; notare i casts di materiale biliare tra gli epatociti (in alto) ed il materiale analogo nella cellule di Kupffer (in basso, indicato da una freccia) (May-Grünwald Giemsa; 40X). In basso a sinistra: fagocitosi di pigmento ceroide (May-Grünwald Giemsa; 100X). In basso a destra: fenomeni di eritrofagocitosi (cellula in basso) e siderofagocitosi (cellula in alto) (May-Grünwald Giemsa; 100X).

plasia"¹⁶; descrizioni relative a questa alterazione sono state associate a casi di epatite cronica¹⁷. Questa alterazione morfologica, priva di correlazioni comprovate da dati scientifici è talora presente anche in cellule dell'epitelio biliare di cani diabetici: malgrado questa affermazione sia basata su osservazioni personali, provenienti da esperienze dirette e da opinioni del tutto empiriche, esistono in bibliografia dati inerenti il rapporto tra aumento del glucosio plasmatico e biliare, sua captazione da parte dei colangiociti ed assorbimento concomitante di acqua, come causa plausibile della vacuolizzazione¹⁸.

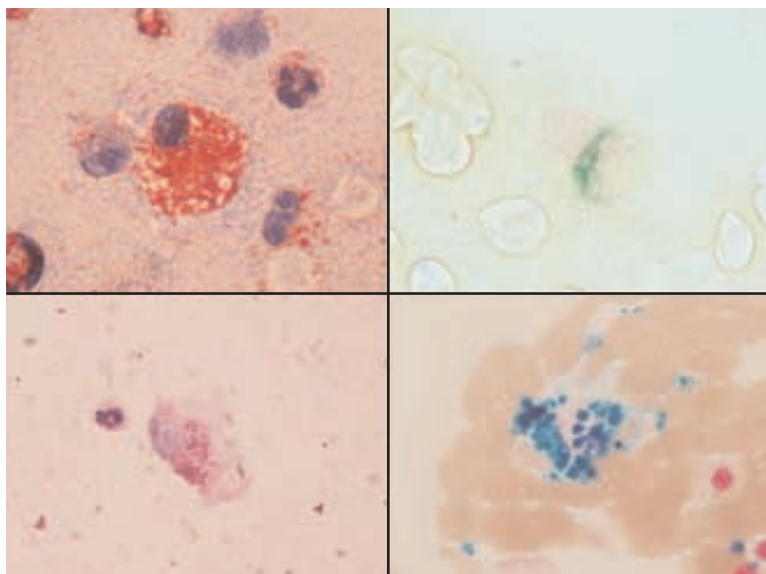


FIGURA 3 bis - In alto a sinistra: lipofagocitosi; i globuli lipidici assumono colore rosso (Oil-Red-O; 100X). In alto a destra: colefagocitosi; il materiale biliare assume colore verde brillante (Fouchet Van Gieson; 100X). In basso a sinistra: fagocitosi di pigmento ceroide, che assume colore magenta (Ziehl-Neelsen modificato, procedura lunga; 100X). In basso a destra: siderofagocitosi; il pigmento ferrico assume colore blu (Blu di Prussia; 100X).

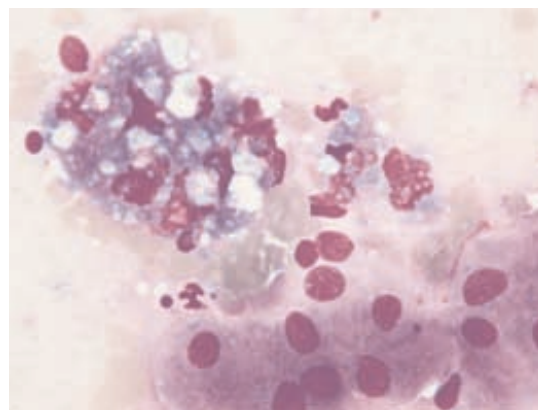


FIGURA 4 - Accanto ad un piccolo lembo di epatociti (in basso a destra) si osserva un lipogranuloma (in alto a sinistra), costituito da macrofagi a citoplasma ingombro da globuli acromatici (May-Grünwald Giemsa; 100X).

Tra i processi di trasformazione neoplastica delle cellule biliari, il colangioma è una condizione raramente descritta nel cane: in un report relativo a 110 casi di neoplasie epatiche canine primarie, non viene descritto alcun caso di colangioma¹⁹, mentre nel gatto sembra rappresentare una condizione più frequente, costituendo il 34% di 47 neoplasie epatiche feline primarie²⁰; questa

condizione è caratterizzata dalla replicazione di dotti biliari marcatamente dilatati, con aspetto ectasico o cistico, delimitati da linee singole di cellule biliari, supportate da sottili setti stromali²¹. Citologicamente il campione manifesta fondo pulito o finemente proteinaceo ed esfoliazione di scarsissima cellularità, rappresentata da rari lembi di elementi epiteliali a citoplasma cuboidale e nucleo rotondo a cromatina finemente irregolare²² (Figura 8). Descrizioni inerenti l'aspetto citologico di lesioni cistiche non neoplastiche dei dotti biliari sono riportate in bibliografia umana e limitate alla descrizione di sporadici elementi epiteliali colonnari in piccoli aggregati dispersi su fondo pulito²³.

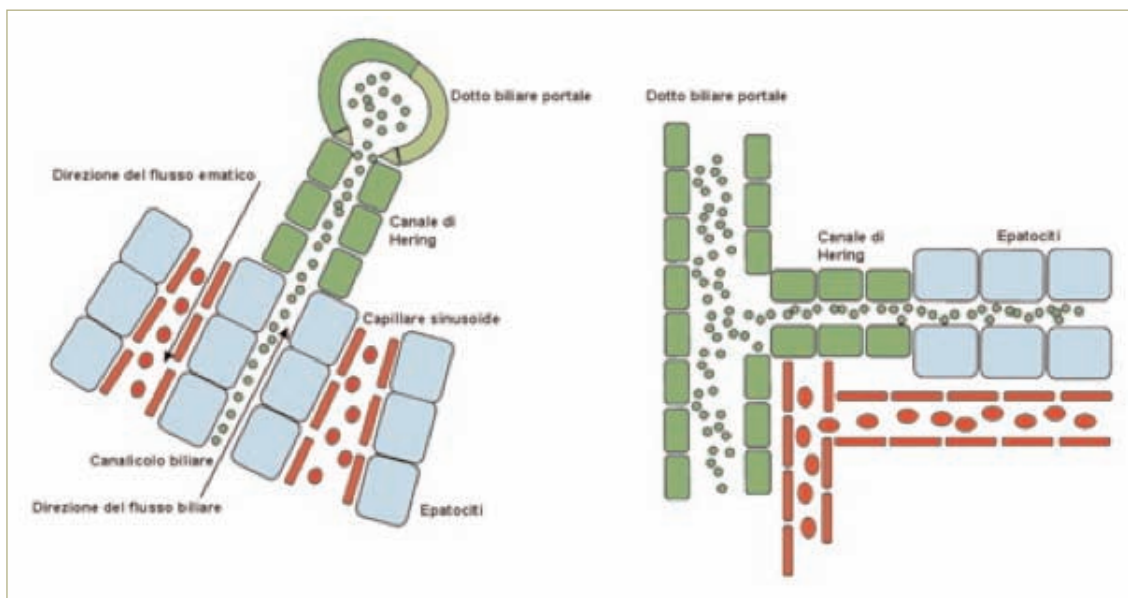


IMMAGINE 2 - Rappresentazione schematica della canalizzazione biliare. La bile, prodotta dagli epatociti, si riversa nel **canalicolo biliare**, costituito da uno spazio tra le facce degli epatociti opposte a quelle rivolte verso il capillare sinusoidale. Il canalicolo biliare è quindi costituito da pareti di membrane epatocitarie, salvo per la sua parte terminale periportale, dove il ruolo degli epatociti è sostituito dalle cellule cuboidali, che costituiscono il **canale di Hering**, il quale a sua volta sbocca nel **dotto biliare interlobulare portale**.

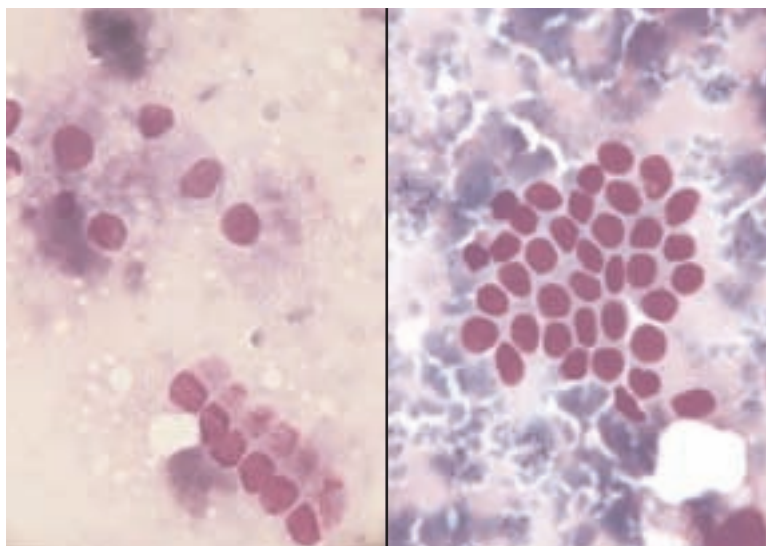


FIGURA 5 - Le cellule biliari normali possono presentarsi disposte in filiere a palizzata con citoplasma colonnare (a sinistra), o cuboidale ed organizzate in lembi coesi bidimensionali (a destra); il nucleo è generalmente rotondo, regolare, a cromatina compatta (May-Grünwald Giemsa; 100X).

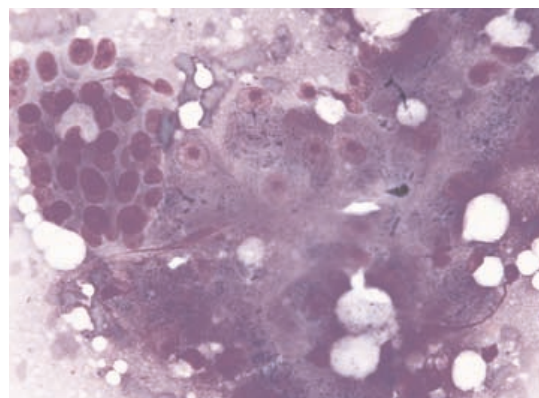


FIGURA 6 - Accanto ad un lembo di epatociti, attraversato da brevi stampi ramificati di materiale biliare, si rileva (in alto a sinistra) un aggregato di cellule biliari, a citoplasma cuboidale, talora vacuolizzato e nucleo modicamente dimetrico a cromatina compatta; il rilievo di stasi biliare extracitoplasmatica con l'aumento di cellule biliari, unitamente ai dati clinici ed anamnestici, permette di ipotizzare la presenza di disordini a carico del deflusso biliare (May-Grünwald Giemsa; 100X).

La controparte maligna della proliferazione biliare, o colangiocarcinoma, è molto più frequente nel cane^{24,25}, mentre nel gatto risulta di incidenza inferiore rispetto al colangioma²⁶. La proliferazione neoplastica è generalmente caratterizzata da aspetti di atipia citocariologica marcati, rappresentati da citoplasma basofilo, talora vacuolizzato, nucleo rotondeggiante dimetrico a cromatina irregolarmente zollata macronucleolato, talora in attività mitotica atipica; gli elementi neoplastici tendono a disporsi in lembi bi-tridimensionali, nel cui contesto assumono disposizioni acinari od in filiere irregolari (Figura 9). È necessario specificare che i rilievi citologici descritti potrebbero essere simili in corso di localizzazioni metastatiche di neoplasie epiteliali con caratteri ghiandolari, quali neoplasie prostatiche, pancreatiche o renali; nei casi dubbi è indispensabile eseguire una attenta valutazione clinica, che aiuti ad identificare la presenza eventuale della neoplasia primaria²⁵.

Cellule stellate

Denominate anche *cellule di Ito*, *fat-storing cells* o *lipociti*, hanno la funzione, in corso di normalità, di immagazzinare retinoidi, soprattutto vitamina A, che viene accumulata nel citoplasma²⁷; questa caratteristica funzionale conferisce alla cellula stellata il suo aspetto morfologico tipico, ossia un citoplasma occupato da voluminosi globuli acromatici a margini netti, espressioni di almeno due tipi di accumulo: le goccioline di tipo I, di piccole dimensioni, delimitate da membrana e le goccioline di tipo II, singole, voluminose, prive di contenimento membranario²⁸. Il ruolo delle cellule stellate è molto più articolato e complesso di una semplice funzio-

ne di magazzino: la loro localizzazione perisinusoidale ed il loro citoplasma dotato di filamenti di actina individuano una capacità contrattile, come conseguenza della quale si ipotizza un ruolo nel controllo della regolazione del flusso ematico attraverso i sinusoidi²⁹; oltre a ciò le cellule stellate

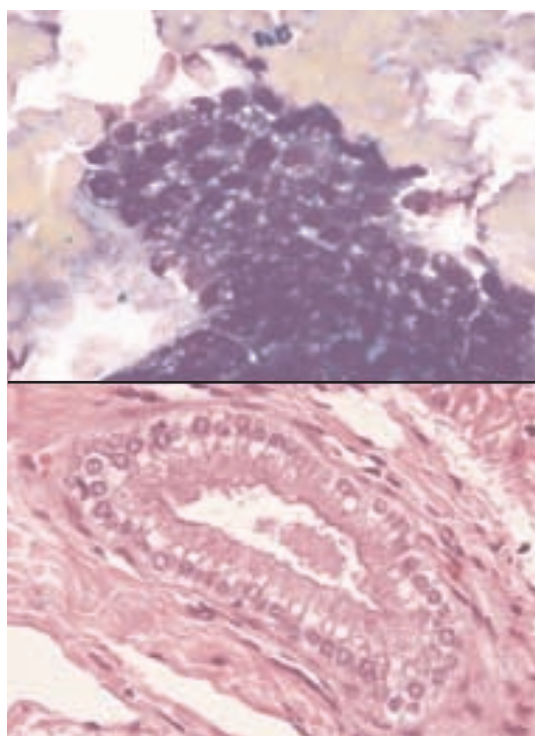


FIGURA 7 - In alto: un lembo compatto di cellule biliari a citoplasma vacuolizzato e nucleo rotondo a cromatina compatta (May-Grünwald Giemsa; 100X). In basso: dotto biliare delimitato da elementi biliari a citoplasma vacuolizzato (Ematossilina-Eosina; 40X).

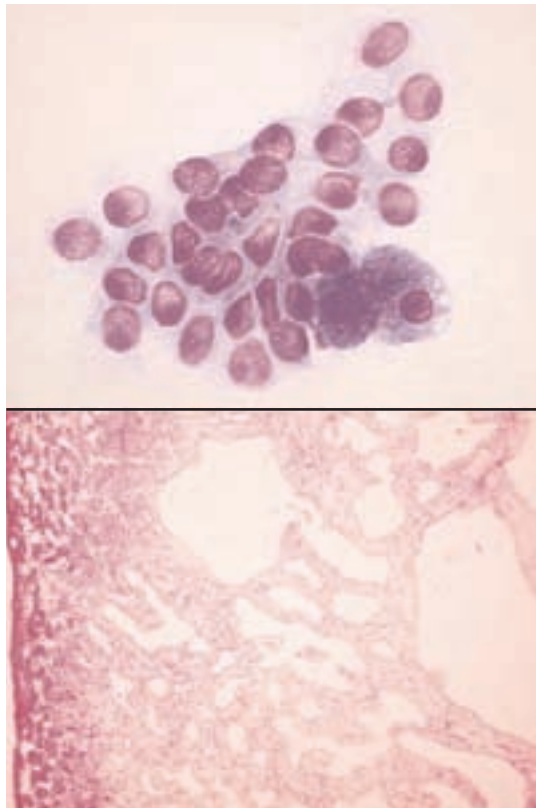


FIGURA 8 - In alto: un piccolo lembo di cellule epiteliali a scarso citoplasma cuboidale e nucleo rotondo a cromatina compatta, ottenuto dall'agoaspirazione di un colangioma, associato a due epatociti (May-Grünwald Giemsa; 100X). In basso: aspetti istologici del colangioma, caratterizzato dalla proliferazione di spazi otticamente vuoti, delimitati da linea singola di elementi biliari (Ematossilina-Eosina; 20X).

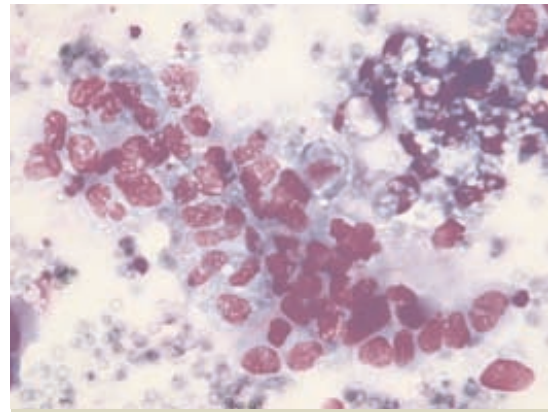


FIGURA 9 - Un aggregato di cellule epiteliali di origine biliare, ottenute da un colangiocarcinoma, caratterizzate da citoplasma microvacuolizzato, con nucleo rotondeggiante dismetrico a cromatina irregolare, talora nucleolato. Notare la disposizione in brevi palizzate irregolari (in basso a destra) od in formazioni microacinari (in alto a sinistra) (May-Grünwald Giemsa; 40X).

sono dotate di proprietà immunomodulatrici, producono apolipoproteina E, fattori di crescita, numerosissime citochine, posseggono capacità di detossificazione e presiedono al controllo dell'omeostasi della matrice extracellulare (ECM) dello spazio di Disse³⁰.

La caratteristica saliente delle cellule stellate è di essere dotate di capacità multipotenti e di elevata sensibilità all'azione di stimoli chimici, prodotti dalle conseguenze di danni acuti epatocitari, endoteliali o dalla stimolazione patologica delle cellule di Kupffer; tali mediatori chimici, identificati soprattutto in radicali liberi e citochine inducono dapprima alterazioni geniche e fenotipiche che predispongono la cellula stellata a stimoli successivi. La prosecuzione del danno epatico comporta alterazioni a carico delle cellule stellate, che si concretizzano in fenomeni di proliferazione, fibrogenesi, perdita della capacità di immagazzinamento di retinoidi, acquisizione di capacità contrattile, chemioattrazione per i leucociti. La conseguenza di questi fenomeni è la trasformazione della cellula stellata da elemento inerte, adibito allo stoccaggio di retinoidi, a cellula con proprietà simili a quelle di un miofibroblasto, cellula fibrogenica con proprietà contrattili, la cui azione determina la deposizione di matrice extracellulare nello spazio di Disse e la promozione di processi di fibrosi³¹ (Immagine 3).

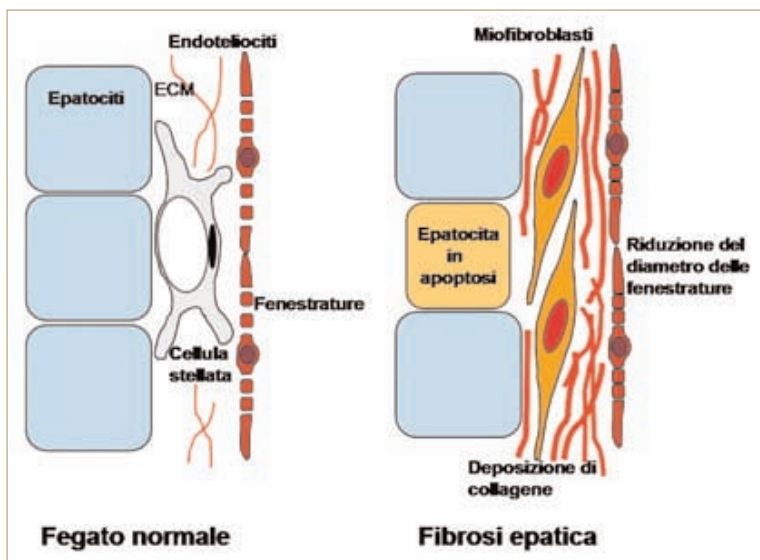


IMMAGINE 3 - A sinistra la rappresentazione schematica dei rapporti tra epatocita, cellula stellata ed endotelioцитi sinusoidali; nello spazio di Disse si localizzano normalmente piccoli quantitativi di matrice extracellulare (ECM), costituita soprattutto da collagene di tipo I e III. A destra, a seguito di processi patologici quali per esempio l'apoptosi epatocitaria o un qualunque altro stimolo infiammatorio cronico, si innesca una cascata di eventi che comporta la trasformazione della cellula stellata in miofibroblasto, produttore di matrice extracellulare; quest'ultima si accumula nello spazio di Disse, alterando gli scambi metabolici tra epatociti e flusso ematico, e rappresentando la base di insorgenza della fibrosi.

Citologia

L'aspetto della cellula stellata quiescente è caratterizzato da forma irregolarmente rotondeggiante e da citoplasma ingombro da un numero variabile di globuli lipidici acromatici di calibro variabile, che tendono a spiazzare il nucleo ipercromatico in periferia (Figura 10). Il loro aspetto non deve essere confuso con epatociti interessati da fe-

nomeni di steatosi e per distinguerle bisogna considerare anzitutto la loro distribuzione singola e dispersa, che nel contesto degli aggregati epatocitari tende ad avere localizzazione marginale e l'aspetto del nucleo, generalmente piccolo ed ipercromatico, frequentemente dislocato ai margini citoplasmatici per effetto dell'accumulo del materiale lipidico.

È segnalata in bibliografia un'alterazione morfologica a significato ignoto, descritta da un aumento del numero delle cellule stellate e dalla presenza, in sede citoplasmatica, di un unico grande globulo lipidico che spiazza il nucleo in periferia; tale alterazione è presente soprattutto in gatti anziani³¹. In corso di intossicazione da vitamina A è descritta un'ipertrofia con iperplasia delle cellule stellate, unitamente a fibrosi e steatosi epatocellulare, benché non esistano pubblicazioni circa gli aspetti citologici di questa alterazione³².

Le cellule stellate attivate da processi flogistici si trasformano in cellule analoghe a miofibroblasti, che assumono profilo fusato e perdono la vacuolizzazione citoplasmatica caratteristica; in corso di tali fenomeni la cellula stellata trasformata in miofibroblasto si dispone in fasci più o meno voluminosi, che attraversano od interconnettono i lembi di epatociti³³ (Figura 11).

Mastociti

Nel cane è nota la localizzazione normale di un piccolo numero di mastociti epatici residenti nello spazio di Disse³⁴; alcuni autori hanno osservato una distribuzione di mastociti sporadici in stretta vicinanza alle cellule stellate ed alle cellule di Kupffer, ipotizzando un'interazione tra queste cellule³⁵. Indagini ultrastrutturali hanno localizzato i mastociti epatici a ridosso degli endotelociti sinusoidi soprattutto in zona centrolobulare, della vena centrolobulare e della vena sublobulare³⁶. È riconosciuto un ruolo dei mastociti in corso di varie condizioni patologiche epatiche, aumentando il loro numero in corso di epatopatie acute, croniche, malattie autoimmuni ed in corso di disordini biliari^{37,38,39}. Sicuramente le acquisizioni moderne individuano un ruolo chiave del mastocita epatico nei processi di fibrogenesi, attribuendogli funzioni nella promozione della stessa, nei processi di deposizione di matrice extracellulare e di capillarizzazione sinusoidale, un fenomeno patologico che comporta gravi alterazioni degli scambi tra sangue ed epatocita.

Studi specifici hanno evidenziato un numero elevato di mastociti in corso di cirrosi, con concentrazione particolarmente evidente in regione portale ed in corrispondenza dei setti fibrosi⁴⁰; altri autori hanno stabilito che il numero dei mastociti aumenta con la progressione della fibrosi⁴¹ in corso di malattia alcolica, di cirrosi biliare primaria e di coledocolitiasi ed uno studio recente ha dimostrato, nel cane, un numero signifi-

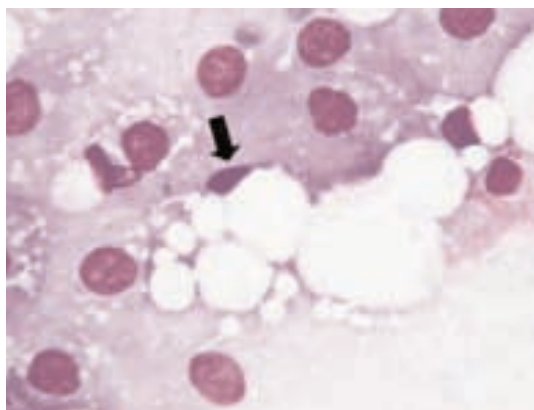


FIGURA 10 - Adiacente agli epatociti si osserva una cellula (freccia), di cui si nota il citoplasma occupato da globuli acromatici voluminosi, che spiazzano il nucleo piccolo ed ipercromatico alla periferia. In assenza di alterazioni degli epatociti riferibili a fenomeni di steatosi, l'elemento rappresentato può essere considerato una cellula stellata, o cellula di Ito, il cui contenuto citoplasmatico è verosimilmente costituito da accumulo di vitamina A (May-Grünwald Giemsa; 100X).

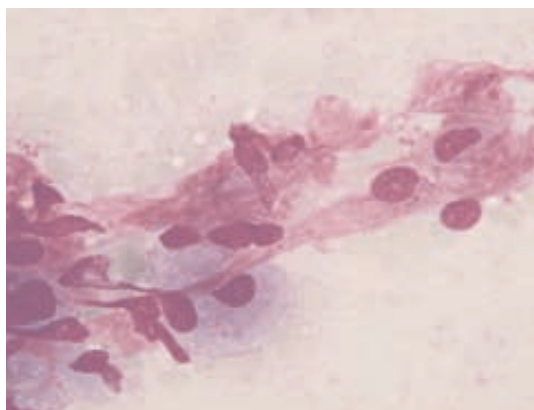


FIGURA 11 - L'attivazione delle cellule stellate comporta una loro trasformazione morfologica in cellule fusate, a citoplasma eosinofilo e nucleo ovoido a cromatina irregolare, organizzate in brevi fasci tra gli epatociti (May-Grünwald Giemsa; 100X).

cativamente più alto di mastociti in campioni citologici provenienti da fegati interessati da processi di fibrosi⁴².

L'azione dei mastociti sembra essere mediata dalla chimasi contenuta nei granuli citoplasmatici, che, rilasciata in sede extracellulare, converte l'angiotensina I in II: quest'ultima, oltre all'azione sulla muscolatura liscia vasale, stimola la proliferazione, l'ipertrofia e la migrazione di cellule muscolari lisce e di miofibroblasti; inoltre è accertata una correlazione tra la chimasi prodotta dai mastociti ed i processi di trasformazione in miofibroblasti delle cellule stellate⁴³, nonché la loro produzione di matrice extracellulare. Infine è dimostrato che nelle fasi tardive di fibrogenesi epatica, i mastociti esibiscono attività di inibizione proteasica nei setti fibrosi.

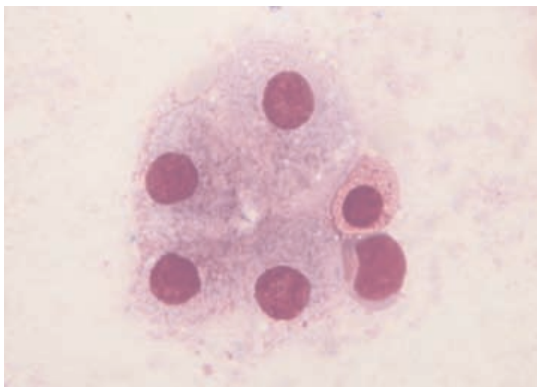


FIGURA 12 - Un mastocita, a citoplasma rotondeggiante repleto di microgranuli metacromatici e nucleo a cromatina coartata, appoggiato ad un lembo di epatociti (May-Grünwald Giemsa; 100X).

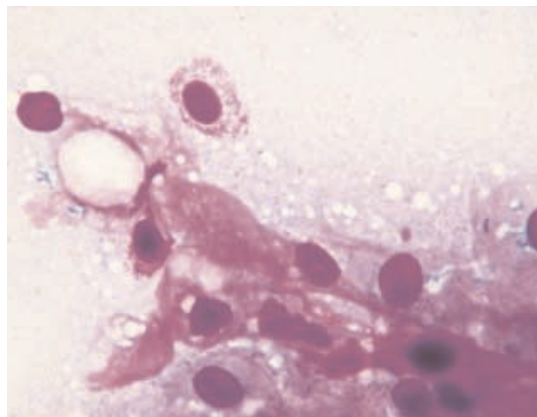


FIGURA 13 - In contesto di fenomeni di fibrosi è possibile osservare la presenza di mastociti singoli, con caratteri morfologici tipici (May-Grünwald Giemsa; 100X).

Citologia

Il mastocita epatico è una cellula piccola, rotondeggiante, dotata di granuli metacromatici di aspetto coartato e di nucleo rotondo ipercromatico paracentrale (Figura 12); può essere difficile da visualizzare in preparati citologici provenienti da fegati normali, ma l'impiego di colorazioni speciali quali il Blu di Toluidina⁴⁴ permette, grazie al cromatismo dei granuli, di riconoscerne il profilo, che spicca tra i citoplasmi degli epatociti. In corso di fenomeni di fibrosi è possibile osservare la presenza di mastociti singoli in corrispondenza dei ponti di cellule fusate che interconnettono i lembi di epatociti⁴² (Figura 13). La conoscenza dell'intervento di mastociti in processi patologici come la fibrosi è indispensabile per non attribuire loro un ruolo errato quando si valutano possibili estensioni metastatiche nel compartimento epatico di neoplasie mastocitarie; un lavoro relativamente recente ha stabilito che non esistono differenze significative nel conteggio di mastociti in campioni citologici di fegato, ecograficamente normale, di cani affetti da mastocitoma rispetto a cani normali⁴⁵. Altri autori hanno invece stabilito che la presenza di mastociti di aspetto ben differenziato in aggregato, oppure singoli ma in numero elevato rappresenta un indice morfologico significativo in corso di estensione metastatica di mastocitoma al parenchima epatico⁴⁶.

CONCLUSIONI

L'analisi morfologica citologica del fegato non può essere considerata completa se non si attribuisce

alle cellule non epatocitarie il ruolo che loro compete. La conoscenza del loro aspetto, del numero, del comportamento in corso di eventi patologici e delle relative trasformazioni morfologiche permette l'acquisizione di un numero elevato di informazioni, indispensabili nell'indirizzare le considerazioni diagnostiche nella direzione corretta.

Parole chiave

Fegato, cellule di Kupffer, cellule stellate, cellule biliari, mastociti.

■ Non-hepatocytic cells: description of normal and pathologic cytomorphology of the "others" liver cells

Summary

Morphologic features, arrangements and neoplastic transformation of hepatocytes, the most important cells of liver (65% of the cells), represent the main diagnostic target in hepatic cytopathology. Nevertheless the liver is also composed by different cell lines, other than hepatocytes, that help and integrate their activity and carry out a crucial role in main biological functions. The aim of this paper is to describe non-hepatocytic liver cells, to discuss their roles and cytomorphologic features in normal conditions or in pathologic changes.

Key words

Liver, Kupffer cells, stellate cells, cholangiocytes, mast cells.

BIBLIOGRAFIA

1. McCuskey RS, McCuskey PA. Fine structure and function of Kupffer cells. *J Electron Microscop Tech Mar*; 14(3):237-246, 1990.
2. Sleyster EC, Knook DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest* 47:484-490, 1982.
3. Gregory SG, Wing EJ. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol Aug*; 72(2):239-48, 2002.
4. Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol. Dec*; 8(6):961-5, 2002.
5. Wisse E, Braet F, Luo D et al. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol*, 24:100-111, 1996.
6. Kelly WR. The liver and biliary system In Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer NG. *Pathology of domestic animals*. New York, Academic Press, 1993, pp 239-240.
7. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages. *Eur J Biochem* 192:245-26, 1990.
8. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol Dec* 14; 12(46):7413-7420, 2006.
9. Orell SR, Sterret GF, Walters Max NI, Whitaker D. Retroperitoneum, Liver and Spleen, in Orell SR, Sterret GF, Walters Max NI, Whitaker D, *Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology*, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, Churchill Livingstone, 1992, pp 247-248.
10. Scott M., Buriko K. Characterization of the pigmented cytoplasmic granules common in canine hepatocytes. *Vet Clin Pathol* 34(suppl):281-282, 2005.
11. Van Winkle T, Cullen JM, Van den Ingh TSGAM, Charles JA, Desmet VJ. Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. In: *WSAVA Standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver disease*. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, Saunders Elsevier, 2006, pp 103-116.
12. Strazabosco M, Fabris L. Functional anatomy of normal bile ducts. *The anatomical record* 291:653-660, 2008.
13. Ijzer J, Schotanus BA, Vander Borgh S, Roskams TA, Kisjes R, Penning LC, Rothuizen J, van den Ingh TS. Characterisation of the hepatic progenitor cell compartment in normal liver and in hepatitis: an immunohistochemical comparison between dog and man. *Vet J. Jun*; 184(3):308-14, 2010.
14. Koss LG, Woyke S, Olszewsky W. The liver. In: *Aspiration Biopsy. Cytologic interpretation and histologic bases*. 2nd ed. Tokyo, Igaku-Shoin; 1992, pp 351-357.
15. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. *Liver Biopsy Interpretation*. 11th Ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2006, pp 337-338.
16. Sun T. Pathology and Immunology of *Clonorchis sinensis* infection in the liver. *Ann Clin Lab Sci* 14:208-215, 1984.
17. Meyer DJ. The Liver, in Raskin RE, Meyer DJ, *Canine and Feline Cytology, a Color Atlas and Interpretation Guide*. St Louis, Missouri, Saunders, 2010, pp 227-229.
18. Masyuk AI, Masyuk TV, Tietz PS, Sprinter PL, LaRusso NF. Intrahepatic bile ducts transport water in response to absorbed glucose. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C785-C791, 2002.
19. Patnaik AK, Hurvitz AI, Lieberman PH. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. *Vet Pathol* 17: 553-564, 1980.
20. Patnaik AK. A Morphologic and Immunocytochemical Study of Hepatic Neoplasms in Cats. *Vet Pathol* 29: 405-415, 1992.
21. Adler R, Wilson DW. Biliary cystadenoma of cats. *Vet Pathol. Jul*; 32(4):415-418, 1995.
22. DeMay RM. Liver. In: *The Art and Science of Cytopathology*. Chicago, IL, American Society for Clinical Pathology, 1996, pp 1026-1027.
23. Koss LG. *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*. 4th ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott; 1992, pp 355-357.
24. Patnaik AK, Hurvitz AI, Lieberman PH, Johnson GF. Canine bile duct carcinoma. *Vet Pathol. Jul*; 18(4):439-44, 1981.
25. Cullen JM, Popp JA. Biliary Neoplasms, in Meuten DJ *Tumors in Domestic Animals*. Iowa State Press, 2002, pp 493-502.
26. Patnaik AK. A morphologic and immunocytochemical study of hepatic neoplasms in cats. *Vet Pathol* 29:405-415, 1992.
27. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *The FASEB Journ Mar* 1; 5(3):271-277, 1999.
28. Yamamoto K, Ogawa K. Fine structure and cytochemistry of lysosomes in the Ito cells of the rat liver. *Cell Tissue Res* 233:45-47, 1983.
29. Soon RK, Yee HF. Stellate cell contraction: role, regulation and potential therapeutic target. *Clin Liver Dis. Nov*; 12(4):791-803, 2008.
30. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev Jan*; 88:125-172, 2008.
31. Wynn T. Cellular and molecular mechanism of fibrosis. *J Pathol Jan*; 214(2):199-210.
32. Rothuizen J, Bunch SE, Charles JA, Cullen JM, Desmet VJ, Szatmari V, Twedt DC, Van den Ingh TSGAM, Van Winkle T, Washabau RJ. WSAVA standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver disease, Saunders Elsevier, 2006, pp 111-112.
33. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2):209-218, 2005.
34. Stockhaus C., Teske E., Van Den Ingh T., Rothuizen J. The Influence of Age on the Cytology of the Liver in Healthy Dogs. *Vet Pathol January* 39:154-158, 2002.
35. Kobayashi K, Sakata K, Miyata K, Iino T, Iwasaki S, Takahashi K. Mast cell-Ito cell pairings found in the Disse's spaces in the liver of the beagle dog. *Arch Histol Jpn. Dec*; 48(5):483-96, 1985.
36. Yamamoto K. Electron microscopy of mast cells in the venous wall of canine liver. *J Vet Med Sci* 62(11):1183-1188, 2000.
37. Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol. Jul*; 94(7):1923-32, 1999.
38. Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology. Oct*; 22(4 Pt 1):1175-81, 1995.
39. Yamashiro M, Kouda W, Kono N, Tsuneyama K, Matsui O, Nakanuma Y. Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary disorders. An immunohistochemical study. *Virchows Arch. Nov*; 433(5):471-9, 1998.
40. Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol* 92:2245-2249, 1997.
41. Murata K, Okudaira M, Akashio K. Mast cells in human liver tissue. Increased mast cell number in relation to the components of connective tissue in the cirrhotic process. *Acta Derm Venereol (Suppl)* 73:157-165, 1973.
42. Masserdotti C, Bertazzolo W. Caratteristiche citologiche della fibrosi epatica del cane: descrizione di 11 casi. *Veterinaria* 22(3):9-14, 2008.
43. Satomura K, Yin M, Shimizu S, Kato Y et al. Increased chymase in livers with autoimmune disease: colocalization with fibrosis. *J Nippon Med Sch* 7(6): 490-495, 2003.
44. Kawarai S, Masuda K, Ohmori K, Matsuura S, Yasuda N, Nagata M, Sakaguchi M, Tsujimoto H. Cultivation and characterization of canine skin-derived mast cells. *J. Vet. Med. Sci* 72(2): 131-140, 2010.
45. Finora K, Leibman NF, Fettman MJ, Powers BE, Hackett TA, Withrow SJ. Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. *Veterinary and Comparative Oncology* 4(3):178-183, 2006.
46. Stefanello D, Valenti P, Faverzani S, Bronzo V, Fiorbianco V, Pinto da Cunha N, Romussi S, Cantatore M, Caniatti M. Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: a prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *J Vet Intern Med Sep-Oct*; 23(5):1051-7. Epub 2009 Jul 28, 2009.