

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ШЕБЕКО ЮЛІА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК:616.36-002.17+616.36-004]:616.36-002.2-022.6]-091.8

**ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ТА ПРОГРЕСУВАННЯ ФІБРОЗУ
І ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С**

14.03.02 – патологічна анатомія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2011

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор **Туманський Валерій Олексійович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини з основами права.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Шпонька Ігор Станіславович**, Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини;

доктор медичних наук, професор **Сорокіна Ірина Вікторівна**, Харківський національний медичний університет МОЗ України, професор кафедри патологічної анатомії.

Захист дисертації відбудеться « 09 » грудня 2011 року о 15.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 07 » листопада 2011 року

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

А.В.Євсєєв

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хронічні вірусні гепатити С і В відрізняються малосимптомним перебігом та безсимптомним розвитком фіброзу печінки, разом з алкогольним та неалкогольним стеатогепатитом, вони є головними причинами розвитку фіброзу печінки та його прогресування в цироз з такими смертельними ускладненнями, як печінкова недостатність, кровотеча, гепатоцелюлярна карцинома (Duvnjak M. et al., 2007; Андрейчин М.А. і співавт., 2010). В останні роки в усьому світі нараховується близько 500 млн. хворих на хронічний вірусний гепатит С (ХВГ С), з яких у 30-70% реєструється прогресуючий фіброз та цироз печінки (Марієвський В.Ф. і співавт., 2007; Белобородова Е.В. и др., 2008).

Високоінформативним способом діагностики хронічного вірусного гепатиту є пункційна біопсія печінки, яка дозволяє не тільки розпізнати захворювання, але також визначити активність гепатиту, стадію і ступінь розвитку фіброзу печінки (Saleh H.A., 2007; Зубов А.Д., 2009). Але розроблені більш ніж 15 років тому і широко розповсюджені серед гепатологів системи напівкількісної оцінки фіброзу печінки (Knodel R.G. et al., 1981; Scheuer P.J., 1991; Ishak K.G., 1994; METAVIR, 1994; Desmet V. et al., 1995; Batts K.P., 1996) засновані на застарілому уявленні про розвиток і прогресування фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит (ХВГ) з портальних трактів. В цих градаціях не враховується інтенсивність фіброзу центролобулярних вен і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів, а також можливість розвитку вогнищового внутрішньодолькового фіброзу, чим значно обмежується об'єктивна патоморфологічна оцінка ступеня реального фіброзу печінки у хворих на ХВГ.

Поки ще не обґрунтовані молекулярно-клітинні особливості формування тяжкого перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу печінки у хворих на ХВГ, який, при відсутності цирозу, веде до розвитку портальної гіпертензії. До цього часу не визначені прогностичні морфологічні ознаки імовірного прогресування фіброзу печінки, необхідні для своєчасного попередження розвитку цирозу печінки у хворих на ХВГ С. Недостатньо вивчені патоморфологічні особливості прогресування стабільного цирозу в декомпенсований цироз печінки. В патологоанатомічній і судово-медичній практиці поки ще не знайшли широкого застосування експрес-методи діагностики вірусного гепатиту С, необхідні для попередження інфікування гепатитом медичного персоналу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом 2-х науково-дослідних робіт Запорізького державного медичного університету: «Нові технології ранньої діагностики онкологічних, нейро-ендокринних, серцево-судинних, цереброваскулярних, аутоімунних і інфекційних захворювань», 2006-2010рр. (№ державної реєстрації 0106U003709) і «Морфогенез і рання діагностика онкологічних, серцево-судинних захворювань, фіброзу печінки та підшлункової залози» 2011-2013 рр. (№ державної реєстрації 0111U005859).

Мета і завдання дослідження. Визначити морфогенез основних типів фіброзу печінки у хворих на ХВГ С та патоморфологічні ознаки його прогресування в декомпенсований цироз печінки для біопсійної діагностики і оптимізації лікування.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. У трепанобіоптатах і інтраопераційних біоптатах печінки хворих на ХВГ С, з урахуванням маркерів апоптозу (p53, Bcl-X_L, каспази-3), макрофагів (CD68) та CD5, CD8, CD20, CD45R0 лімфоцитів вивчити патоморфологічні і імуногістохімічні (ІГХ) зміни в печінці, які передують розвитку фіброзу;
2. У гепатобіоптатах хворих на ХВГ С визначити морфогенез основних типів фіброзу печінки з урахуванням експресії α -ізоформи гладком'язового актину (α -SMA) та колагенів I і IV типів;
3. В печінці хворих на ХВГ С вивчити патогістологічні (ПГ), гістохімічні (ГХ) та ІГХ особливості портально-септального, перисинусоїдально-центролобулярного, periцеллюлярного і змішаного фіброзу печінки та визначити їх градацію за ступенем тяжкості для використання в патоморфологічній діагностиці;
4. Охарактеризувати особливості експресії матриксної металопротеїнази MMP-9 та її тканинного інгібітора TIMP-1 клітинами-продуцентами цих ферментів у хворих на ХВГ С з фіброзом печінки;
5. З урахуванням особливостей експресії маркерів проліферації (Ki-67, PCNA), апоптозу (каспази-3), α -гладком'язового актину (α -SMA), колагену IV, CD68+ макрофагів, CD8+ і CD20+ лімфоцитів та розповсюдження фіброзу вивчити ознаки імовірного прогресування фіброзу в цироз печінки у хворих на ХВГ С;
6. З урахуванням особливостей експресії маркерів фіброгенних клітин, колагену, клітинної проліферації і апоптозу в гепатобіоптатах визначити морфологічні ознаки стабільного і активного цирозу та основні шляхи прогресування цирозу в декомпенсований цироз печінки;
7. Оптимізувати методику імунохроматографічної експрес-діагностики наявності антитіл проти вірусу гепатиту С (ВГС) в тканині трепанобіоптата печінки, і в крові померлих хворих та впровадити її для використання в біопсійній і патологоанатомічній практиці.

Об'єкт дослідження – морфогенез фіброзу і цирозу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С.

Предмет дослідження – патоморфологічні особливості прогресування фіброзу і цирозу печінки при ХВГ С за даними інтраопераційних і трепанобіобсій печінки.

Методи дослідження: патогістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні та комп'ютерно-морфометричні (КМ) дослідження біоптатів печінки для визначення морфогенезу і прогресування фіброзу та цирозу печінки при ХВГ С; порівняльний аналіз морфологічних і клініко-лабораторних даних хворих на ХВГ С з різним ступенем фіброзу печінки; кореляційний аналіз отриманих результатів; імунохроматографічний експрес-аналіз (ІХА) наявності антитіл проти ВГС в тканині трепанобіоптів печінки, в крові померлих і хворих на ХВГ С.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі комплексного ПГ, ГХ, ІГХ і КМ дослідження вперше визначені основні морфологічні типи фіброзу печінки у хворих на ХВГ С: перисинусоїдально-центролобулярний, портально-септальний, periцеллюлярний та змішаний фіброз.

Вперше детально охарактеризовані молекулярно-клітинні особливості морфогенезу перисинусоїдально-центролобулярного та periцеллюлярного фіброзу печінки у хворих на ХВГ С.

У роботі обґрунтовані прогностичні ГХ і ІГХ ознаки імовірного прогресування основних типів фіброзу печінки. Вперше доведено, що в прогресуванні перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу важливу роль відіграє проліферація перисинусоїдальних зірчастих клітин та поява в печінці нових поколінь α -SMA+ фіброгенних зірчастих клітин, в той час як прогресування портально-септального фіброзу обумовлює імуноклітинна деструкція печінки, поява активних септ та активованих α -SMA+ фібробластів. На підставі виконаних ІГХ досліджень в біоптатах печінки продемонстровано, що у хворих на ХВГ С при фіброзі печінки зростає продукція матриксної металопротеїнази MMP-9 і її тканинного інгібітора TIMP-1 не тільки перисинусоїдальними зірчастими клітинами і макрофагами, а також і гепатоцитами та лімфоцитами імуноклітинних інфільтратів.

За результатами ГХ та ІГХ досліджень достали подальшого розвитку уявлення про мікроскопічні особливості стабільного і активного цирозу печінки та про основні патоморфологічні шляхи прогресування і декомпенсації цирозу печінки.

Практичне значення отриманих результатів. У роботі вперше доказана необхідність урахування перисинусоїдально-долькового фіброзу при визначенні ступеня фіброзу печінки в гепатобіоптатах та охарактеризовані диференціальні ПГ та ІГХ ознаки перисинусоїдально-долькового, портально-септального, змішаного і перичелюлярного фіброзу печінки, а також обґрунтовані принципи їх градації за розповсюдженістю і ступенем тяжкості.

Для використання в біопсійній патоморфологічній діагностиці вперше запропонований мінімальний перелік ГХ та ІГХ методик для визначення ступеня вираженості різних типів фіброзу печінки в гепатобіоптатах хворих на ХВГ С та перелік методик, необхідних для прогнозування імовірного прогресування фіброзу в цироз печінки.

Разом з науковим керівником розроблений і запатентований спосіб експрес-діагностики вірусного гепатиту С в тканині трепанобіоптатів печінки. Апробований і запропонований імунохроматографічний експрес-метод визначення антитіл проти ВГС в крові померлих хворих для попередження непередбаченого інфікування судово-медичних експертів і патологоанатомів. На підставі результатів проведених досліджень через МОЗ України, у співавторстві, видані методичні рекомендації «Посмертна імунохроматографічна діагностика ВІЛ-інфекції і вірусних гепатитів» – Київ: МОЗ України, 2009.

Результати дисертаційного дослідження з позитивним діагностичним ефектом впроваджені в практичну роботу КУ «Запорізьке обласне патологоанатомічне бюро» ЗОР, КУ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро», КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро» та КУ «Запорізьке обласне бюро судово-медичної експертизи» ЗОР.

Нові теоретичні і практичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі патоморфології Донецького національного медичного університету ім. М. Горького МОЗ України, на кафедрі патологічної анатомії ДУ «Кримський державний медичний університет ім.С.І. Георгієвського» МОЗ України, на кафедрі патологічної анатомії і судової медицини з основами

права Запорізького державного медичного університету МОЗ України та на кафедрі патологічної анатомії і судової медицини Дніпропетровської державної медичної академії МОЗ України.

Особистий внесок дисертанта. Дисертація є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим керівником визначені тема і завдання та складена програма дисертаційного дослідження. Дисертантом особисто виконані патентно-інформаційний пошук і проаналізована література по даній проблемі, самостійно виконані ПГ, ГХ, ІГХ і КМ дослідження біоптатів печінки хворих на ХВГ С, проведені систематизація і статистичний аналіз отриманих даних. Дисертантом самостійно написані всі розділи дисертації, сформульовані висновки і рекомендації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи були представлені і обговорені на VIII Міжнародному Конгресі патологів України «Сучасні проблеми патологічної анатомії» (Полтава, 2008), на V Національному Конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів» (Запоріжжя, 2008), на Всеукраїнських науково-практичних конференціях молодих вчених «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2009, 2011), на Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Медична наука – 2009» (Полтава, 2009), на VII Міжнародній конференції студентів та молодих вчених ВНДЗУ «Буковинський державний медичний університет» (Чернівці, 2010), на Всеукраїнській науково-практичній конференції патологоанатомів з міжнародною участю «Актуальні проблеми онкоморфології» (Харків, 2011), на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Нейроендокринні і імунні процеси в нормі та патології: від теорії до практики» (Запоріжжя, 2011).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових праць: 8 статей у фахових наукових виданнях України (з них 1 стаття – без співавторів), 4 тези в матеріалах Всеукраїнських науково-практичних конференцій та 1 методичні рекомендації, видані через МОЗ України. Отримано патент України на корисну модель № 47598.

Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена державною мовою на 212 сторінках. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалу й методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу і обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій і списку з 213 використаних літературних джерел (34 вітчизняних і 179 закордонних авторів). Робота ілюстрована 168 рисунками і 3 таблицями, що займають 78 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи досліджень. Мікроскопічні, ГХ та ІГХ особливості морфогенезу фіброзу печінки, а також прогресування фіброзу і цирозу при ХВГ С визначені в інтраопераційних біопсіях і трепанобіопсіях у 130 хворих і 12 померлих хворих віком від 16 до 64 років (88 чоловіків і 54 жінки). За результатами морфологічного обстеження 120 хворих на ХВГ С розподілені на 4 групи спостережень за різним типом фіброзу печінки, а 10 пацієнтів без вірусного

гепатиту (5 жінок, 5 чоловіків) склали групу умовного контролю. В І групу спостережень включені 30 хворих на ХВГ С з портально-септальним фіброзом печінки, II групу склали 30 хворих на ХВГ С з централобулярно-перисинусоїдальним фіброзом печінки, в III групу ввійшли 30 хворих на ХВГ С зі змішаним фіброзом печінки, IV групу склали 30 хворих на ХВГ С з цирозом печінки. У групи спостережень відібрані тільки пацієнти, яким було проведене комплексне клініко-лабораторне обстеження і патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів печінки. У пацієнтів групи умовного контролю, у яких при ультразвуковому дослідженні і при мікроскопії трепанобіопсій була діагностована гемангіома печінки, досліджувався стовпчик тканини печінки на віддаленні від гемангіоми.

У 20 хворих із загальної кількості морфологічно обстежених пацієнтів з діагнозом ХВГ С під час біопсії проводився швидкий ІХА для визначення наявності антитіл проти ВГС в крові і в тканині трепанобіоптатів печінки. Крім цього, у 12 померлих хворих на ХВГ С з цирозом або фіброзом печінки проведено ІХА для визначення наявності в крові антитіл проти ВГС через 4, 12, 15, 18, 20, 24, 32, 38, 48 годин після біологічної смерті.

Особливості клінічного перебігу ХВГ С та формування цирозу печінки визначені при ретроспективному клініко-патоморфологічному аналізі у 268 хворих, яким з 2001 по 2011 рік були виконані діагностичні біопсії печінки з використанням стандартних ПГ і ГХ методик.

Діагностика ХВГ С у хворих проводилась після клініко-лабораторного обстеження в гепатологічному центрі Запорізької обласної інфекційної клінічної лікарні з урахуванням наявності в сироватці крові анти-HCV IgG, анти-HCV IgM і РНК HCV, а також синдрому цитолізу за рівнем в крові аланін- і аспартат-амінотрансферази (АлАТ і АсАТ). Пункційні трепанобіопсії печінки під контролем ультразвукового дослідження виконувалися хірургом в 3-ій клінічній лікарні м. Запоріжжя, інтраопераційні біопсії печінки виконувалися хірургами Запорізької обласної клінічної лікарні. При пункції отримували 3-5 стовпчиків тканини печінки 10x0,8мм, на операції вирізали шматочок краю печінки 10x8x5мм, в яких визначалась не менш ніж 18-20 дольок і 10-12 портальних трактів для повного і інформативного морфологічного дослідження.

Для ПГ та ГХ досліджень стовпчики і шматочки біоптатів печінки фіксували в забуференому 10% формаліні та заливали в парафін, серійні зрізи завтовшки 4 мкм виготовляли на ротаційному мікротомі НМ 3600 («MICROM Laborgerate GmbH» – Німеччина). В мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, визначали основні патогістологічні зміни в печінці та індекс гістологічної активності (ІГА) ХВГ С за Knodell R.G. зі співавт. (1981). В мікропрепаратах, забарвлених за Ван-Гізон і Масон-триколом, визначали різний ступінь (F1–F4) портально-септального фіброзу печінки в градації METAVIR (1994) і Desmet V. зі співавт. (1995). Враховуючи виявлені нами різні типи фіброзу печінки, для визначення ступеню їх вираженості аналізувалася гістотопографія фіброзу і ступінь його розвитку в різних компартментах печінки: в портальних трактах і в перипортальних зонах; у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах і централобулярних венах; в

портально-долькових, порто-центрально-портальних і порто-портальних фіброзних септах, а також у фіброзних прошарках навколо істинних дольок і псевдодольок печінки. З урахуванням цих даних в гепатобіоптатах визначали слабкий, помірний і тяжкий фіброз без псевдодольок, а також цироз печінки.

Згідно стандартизованих протоколів в парафінових зрізах печінки виконувались ІГХ дослідження з використанням відповідних первинних антитіл та систем візуалізації DAKO EnVision+ System з діамінобензидином або LSAB2 System («DAKO», Данія). Для ІГХ визначення експресії про- та антиапоптотичних білків використовували моноклональні антитіла *Mo a-Hu p53 Protein, Clone DO-7* проти ядерного антигену p53 («DAKO», Данія) та моноклональні антитіла *Mo a-Hu Bcl-X_L, Clone 2H12* проти білка Bcl-X_L («Zymed», США). Рівень апоптозу в клітинах печінки визначався за допомогою моноклональних антитіл до каспази-3 *Mo a-Hu Caspase Ab-3, Clone 3CSP03* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Проліферативна активність клітин печінки визначалась з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1* («DAKO», Данія) та *Mo Anti- Proliferative Cell Nuclear Ag (PCNA), Clone PC10* («DAKO Cytomation», Данія). Субпопуляції CD20 В-лімфоцитів, CD5 лімфоцитів, CD8 і CD45R0 Т-лімфоцитів маркували з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu CD20cy Clone L26*; *Mo a-Hu CD5 Clone 5/54/F6*; *Mo a-Hu CD8, T-cell Clone C8/144B*; *Mo a-Hu CD45R0, T-Cell Clone UCHL1* (всі антитіла фірми «DAKO», Данія). Для визначення клітин Купфера та макрофагів портально-перипортальних зон печінки використовували моноклональні антитіла *Mo a-Hu CD68, Clone PG-M1* («DAKO» – Данія). Активовані зірчасті перисинусоїдальні клітини Іто та активовані фібробласти портальних трактів і фіброзних септ в печінці визначались з використанням моноклональних антитіл до α -SMA *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4* («DAKO» (Данія). ІГХ дослідження накопичення колагену в печінці проводилося за допомогою моноклональних антитіл до колагену I і IV типу *Mo a-Hu Collagen IV, Clone CIV 22* та *Mo a-Hu Collagen I, MSX HU-100UG* («DAKO» – Данія). Рівень експресії MMP-9 клітинами печінки визначався при застосуванні поліклональних антитіл *Rb a-Hu MMP-9 (92kDa Collagenase IV)*, а рівень експресії TIMP-1 - моноклональними антитілами *Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

На комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення KS 200 («Kontron Elektronik» – Німеччина), інтегрований в мікроскоп Axioplan 2 («Carl Zeiss» – Німеччина) з відеокамерою DXC-151A («Sony» – Японія), визначались площі, зайняті активованими α -SMA+ фібробластами в 5 портально-перипортальних зонах печінки у 3 підгрупах хворих на ХВГС з ознаками слабого, помірного і тяжкого фіброзу печінки. Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили на персональному комп'ютері в програмі «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Обчислювали середнє значення (M), стандартну помилку репрезентативності середнього значення (m), розраховували 95% довірчий інтервал середнього значення. Статистична значущість величин площ портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при різному ступені фіброзу печінки оцінювалась методом однофакторного

дисперсійного аналізу з подальшим попарним порівнянням за Games-Howell. Порівняння груп за якісними ознаками проводили за допомогою критерію χ^2 .

ІХА проводився з використанням зареєстрованих в Україні тест-касет «СІТО-TEST HCV» «Acon Biotech Co.» (Китай). Для визначення наявності в крові антитіл проти ВГС перед біопсією печінки у хворих забирали цілісну кров з пальця, краплю якої поміщали в лунку (S) тест-касети «СІТО-TEST HCV» і через 10 хвилин оцінювали результат ІХА тестування крові. Далі хірургом проводилася трепанобіопсія печінки, один стовпчик трепанобіоптату клали в лунку (S) тест-касети «СІТО-TEST HCV», додавали 1 краплю (40 мкл) буфера і через 10 хвилин оцінювали результат ІХА тканини печінки. Поява 2-х червоних ліній, в зоні контролю (C) і в зоні тесту (T) тест-касети, оцінювалась як позитивний результат наявності в крові або в тканині біоптату печінки антитіл проти ВГС. Поява однієї червоної або рожевої лінії в зоні контролю (C), за відсутності червоної або рожевої лінії в зоні тесту (T), свідчило про негативний результат. Чутливість інтрабіопсійного експрес-методу виявлення антитіл проти ВГС в тканині трепанобіоптатів печінки визначали за формулою:

$$\text{Чутливість} = \frac{\text{дійсно позитивні результати ІХА}}{\text{дійсно позитивні результати} + \text{хибно негативні результати ІХА}} \times 100\%$$

Для посмертного визначення наявності в крові антитіл проти ВГС використовували зареєстровані в Україні тест-касети «СІТО-TEST HCV» «AmeriTec Inc» (США). До початку розтину померлого, при пункції правого шлуночку серця отримували 5 мл крові, яку відстоювали при кімнатній температурі 30 хвилин до появи над шаром крові шару сироватки. 4 краплі сироватки поміщали в лунку (S) тест-касети «СІТО-TEST HCV» та через 10 хвилин оцінювали результат ІХА крові. При наявності в крові антитіл проти ВГС в зоні контролю (C) і в зоні тесту (T) тест-касети з'являлись 2 червоні імунохроматографічні лінії (позитивний результат), а за відсутності в крові антитіл в зоні контролю (C) тест-касети з'являлась одна червона імунохроматографічна смуга (негативний результат).

Результати дослідження та їх обговорення. При комплексному ПГ та ІГХ дослідженні було встановлено, що розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГ С передують дистрофія, апоптоз і некроз окремих гепатоцитів, а також імуноклітинна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів CD5+ лімфоцитами, CD20+ В-лімфоцитами, CD8+ і CD45R0+ Т-лімфоцитами та CD68+ макрофагами. Ці клітини або дифузно заповнюють і потовщують портальні тракти або формують в них округлі фолікулоподібні структури, в центрі яких розміщуються CD20+ В-лімфоцити, а на периферії - Т-лімфоцити. У складі перисинусоїдальних клітинних ланцюжків в дольках печінки в різних пропорціях визначаються CD5+, CD8+, CD20+ лімфоцити, CD68+ макрофаги Купфера та α -SMA+ зірчасті клітини Іто. Сучасні дослідження показали, що ВГС стимулює проліферацію В-лімфоцитів, які через плазматичні клітини відіграють важливу роль у продукції аутоантитіл та імунних комплексів при ХВГ С (Андрейчин М.А. і співавт., 2010), але функціональна роль імуноцитарної інфільтрації печінки при ХВГ С до цього часу повністю не вивчена. Novobrantseva T.I. et al., (2005), Zhou X.

et al., (2005), Rashpal K. et al., (2005) вважають, що наявність В-лімфоцитів в тканині печінки хворих на ХВГ С впливає на розвиток фіброзу органу. Вважається, що CD5+ лімфоцити є продуцентами поліреактивних низькоафінних «природних» антитіл до екзогенних антигенів та аутореактивних антитіл (Leong A.S-Y., 1999), але їх роль в печінці хворих на ХВГ С поки ще не визначена. Виявлені нами у складі імуноклітинних інфільтратів CD45R0+ лімфоцити, на думку Шишкіна М. А. (2008), пов'язані з персистенцією вірусів гепатиту і хронізацією процесу; за даними Lin C.Y. et al., (2007) і Muhanna N. et al., (2007) вони експресують високий рівень профіброгенних цитокінів IL-4, IL-6, IL-13, які сприяють розвитку фіброзу печінки. В роботах багатьох дослідників (Gressner A.M. et al., 2002; Jing-Lin X. et al., 2006; Фадеєнко Г.Д. с соавт., 2010) доведено, що присутність активованих CD68+ макрофагів Купфера сприяє прогресуванню фіброзу печінки шляхом продукції профіброгенного трансформуючого фактору росту TGF- β_1 і тромбоцитарного фактору росту PDGF-мітогену для колагенпродукуючих клітин печінки.

Застосування ІГХ методик показало, що виразність притаманної для ХВГ С імунітарної інфільтрації портальних трактів і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів відповідають ІГА хронічного гепатиту в градації Knodell R.G. et al. (1981) та METAVIR (1994). У обстежених нами хворих ХВГ С з мінімальною активністю (ІГА 1-3 бали) виявлений у 23% пацієнтів, з низькою активністю (ІГА 4-8 балів) – у 24% осіб, з помірною активністю (ІГА 9-12 балів) – у 32% пацієнтів, з високою активністю (ІГА 13-18 балів) – у 21% хворих. При низькому ІГА ХВГ С в печінці відмічається слабка лімфоцитарна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів, при помірному ІГА реєструється помірна імуноклітинна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів та наявність імуноклітинних «ступінчастих некрозів», при високому ІГА ХВГ С в печінці має місце значна імунітарна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів, велика кількість «ступінчастих некрозів» та поодинокі імуноклітинні «мостоподібні некрози».

За результатами ІГХ аналізу у хворих на ХВГ С визначена імуноклітинна деструкція печінки, проявами якої є наявність перипортальних імуноклітинних інфільтратів різної довжини і глибини (так званих «ступінчастих некрозів») і портопортальних імуноклітинних інфільтратів («мостоподібних некрозів»), в яких переважають CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ макрофаги, CD20+ В-лімфоцити з домішкою NK-клітин і α -SMA+ фібробластів, а також наявність внутрішньодолькових вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, в яких ідентифікуються CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ макрофаги, поодинокі NK-клітини і α -SMA+ зірчасті клітини. ІГ та ІГХ аналіз доказав, що в цих зонах переважають імунні клітини цитотоксичного спрямування, які здійснюють імуноклітинний кілінг (імунне знищення інфікованих гепатоцитів) шляхом патогенно індукованого апоптозу, рідше – шляхом каріоцитолізу (некрозу). Інші дослідники (Cruise M.W. et al., 2005; Caetano J. et al., 2008) також вважають, що загибель гепатоцитів при ХВГ С відбувається не під впливом цитотоксичної дії вірусу гепатиту, а в результаті цитокінової активації імункомпетентних клітин. За даними Willberg Ch.B. et al. (2007) саме CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити обумовлюють знищення інфікованих

гепатоцитів шляхом імуноклітинного кілінгу. Дослідження останніх років показали, що у вогнищах імуноклітинного кілінгу реалізується рецептор-опосередкований апоптоз гепатоцитів, які мають в плазматичній мембрані декілька рецепторів апоптотичної загибелі. При рецепторній активації апоптозу цитотоксичні Т-лімфоцити реагують з Fas/CD95 рецептором і з TNF-R1 рецептором; активовані макрофаги Купфера взаємодіють з TNF-R1, Fas/CD95 и TRAIL-R1/R2 рецепторами. Апоптоз гепатоцитів також визивають NK-клітини, які вивільняють гранзим В і перфорин (Fischer R., Baumert T., Blum H.E., 2007). Вважають, що найбільш імовірним шляхом каріоцитоліза гепатоцитів при імунному кілінгу може бути перфорин / гранзим В-залежний механізм, який використовують NK-клітини і, можливо, нові клони специфічних для ВГС цитотоксичних лімфоцитів (Fischer R., Baumert T., Blum H.E., 2007).

Нами встановлено, що в печінці хворих на ХВГ С гепатоцити в різних фазах апоптозу найчастіше виявляються у вогнищах імуноклітинної деструкції, рідше поодинокі апоптотично змінені гепатоцити визначаються в печінкових дольках. При ініціації апоптоза виявляється експресія p53 в ядрах структурно мало змінених гепатоцитів, або експресія Bcl-X_L в цитоплазмі гепатоцитів. В ефекторній фазі апоптоза у вогнищах кілінгу в приречених на загибель, зморщених гепатоцитах виявляється високий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3, а при гістологічному дослідженні спостерігаються зменшені апоптотичні гепатоцити з еозинофільною цитоплазмою і пікнотичним ядром (тілця Каунсілмена), які також описані в роботах Guido M. et al. (2002), Серова В.В. зі спіавт. (2004). Визначено, що найбільш надійним маркером апоптозу в біоптатах печінки є експресія апоптотично зміненими гепатоцитами каспази-3.

Встановлено, що імунохроматографічним експрес-методом з використанням зареєстрованих в Україні тест-касет «CITO-TEST HCV» виробництва «Acon Biotech Co.» (Китай) та «AmeriTec Inc» (США) антитіла до вірусу гепатиту С з 90% чутливістю визначаються в мізерній кількості крові в нефіксованій тканині трепанобіоптатів печінки, а також з 100% чутливістю - в краплі крові хворого, та в крові померлих хворих в інтервалі від 4-х до 48 годин після біологічної смерті.

Проведені ПГ та ІГХ дослідження підтвердили дані Bataller R., Brenner D.A. (2005), Friedman S.L. (2008) стосовно того, що основними продуцентами надлишку колагену IV і I типів та інших компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ) при фіброзі печінки є нові покоління α -SMA⁺ перисинусоїдальних зірчастих клітин в дольках і α -SMA⁺ фібробластів в портальних трактах. Визначено, що фіброз печінки може розвиватися і прогресувати з декількох її зон - джерел фіброгенезу: з портальних трактів, з централобулярних вен і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів печінки, з перипортальних «ступінчастих некрозів» та з вогнищ імуноклітинної деструкції в дольках печінки.

Результати паралельних ПГ, ГХ та ІГХ досліджень показали, що у хворих на ХВГ С розвивається три типи фіброзу печінки: портально-септальний, перисинусоїдально-централобулярний і змішаний (портально-септальний та перисинусоїдально-централобулярний). Різновидом перисинусоїдального внутрішньодолькового фіброзу є перицелюлярний фіброз навколо гепатоцитів у

хворих на ХВГ С зі стеатозом печінки.

Встановлено, що перисинусоїдально-центролобулярний фіброз характеризується переважанням значного фіброзу центролобулярних вен і перисинусоїдальних просторів над незначним фіброзом портальних трактів внаслідок надмірного синтезу молекул ПКМ і колагену IV і I типу активованими α -SMA+ перисинусоїдальними зірчастими клітинами Іто фіброгенного фенотипу, а також стійким розширенням синусоїдів печінкових дольок. Перисинусоїдальному фіброзу передують проліферація Ki-67+ перисинусоїдальних зірчастих клітин та збільшення кількості α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин. Перисинусоїдально-центролобулярний фіброз в біопсіях печінки хворих на ХВГ С розподіляється на слабкий, помірний і тяжкий. Слабкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки характеризується слабо вираженою вогнищевою або дифузною колагенизацією до 25% внутрішньодолькових синусоїдів і початковим слабким фіброзом стінки центролобулярних вен при відсутності або початковій слабкій вираженості фіброзу в портальних трактах. Помірний перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки характеризується фіброзом і колагенизацією 26-50% внутрішньодолькових синусоїдів і слабким або помірним фіброзом центролобулярних вен при відсутньому або слабкому фіброзі портальних трактів. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки характеризується вираженим фіброзом і поширеною колагенизацією розширених перисинусоїдальних просторів більш ніж у 50% внутрішньодолькових синусоїдів та тяжким фіброзом значно розширених центролобулярних вен.

Портально-септальний фіброз відрізняється значним фіброзом портальних трактів і перипортальних зон та утворенням портально-долькових фіброзних септ без помітного фіброзу і колагенизації перисинусоїдальних просторів в дольках печінки внаслідок надмірного синтезу молекул ПКМ, колагену IV і I типу активованими α -SMA+ фібробластиками, які з'являються і кількісно збільшуються в портальних трактах, в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» та в портально-долькових септах. Подальша еволюція портально-септального фіброзу у хворих на ХВГ С характеризується слабким F1, помірним F2 і тяжким F3 фіброзом печінки за градацією METAVIR (1995).

Змішаний фіброз проявляється фіброзом портальних трактів з фіброзними септами і водночас перисинусоїдально-центролобулярним фіброзом печінки, про що свідчить накопичення колагену IV типу та наявність активованих α -SMA+ фіброгенних клітин у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах, навколо центролобулярних вен і в портальних трактах. У хворих на ХВГ С реєструється помірний та тяжкий змішаний портально-септальний і перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки.

Внутрішньодольковий перицелюлярний фіброз формується у вогнищах значного дрібно- крупновакуольного стеатозу гепатоцитів, які трансформуються в дрібні стеатокісти. При ІГХ аналізі з'ясовано, що перисинусоїдальні CD68+ макрофаги мігрують до гепатоцитів зі значним стеатозом і посилюють фагоцитарну активність, водночас в печінці з'являються зони зі збільшеною кількістю α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто і поступово формується

значний і розповсюджений в дольках печінки перичелюлярний фіброз. Особливості перичелюлярного фіброзу при стеатозі печінки на тлі ХВГ С описані в роботі інших авторів (Bataller R., 2004; Pattullo V. et al., 2011).

Встановлено, що при ХВГ С виразність експресії MMP-9 і кількість MMP-9+ клітин та виразність експресії TIMP-1 і кількість TIMP-1+ клітин залежить від інтенсивності імуноклітинної інфільтрації печінки і зростає при підвищенні її рівня, а також зростає при імуноклітинній деструкції печінкових дольок. Підвищення рівня імуноклітинної інфільтрації печінки у хворих на ХВГ С, на відміну від норми, стимулює експресію MMP-9 гепатоцитами, внутрішньодольковими перисинусоїдальними зірчастими клітинами і клітинами Купфера, макрофагами і лімфоцитами портальних трактів і «ступінчастих некрозів», а також макрофагами внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратів. Аналогічні результати отримані Ljumovica D. et al., 2004; [Hemmann S.](#), 2007). Максимального рівня експресія MMP-9 досягає в зонах імуноклітинної деструкції дольок печінки, в яких виявлялась виражена експресія MMP-9 в значній кількості гепатоцитів, активованих клітин Купфера і клітин Іто, а також в лімфоцитах імуноклітинних інфільтратів.

ІГХ дослідження експресії тканинного інгібітора металопротеїназ TIMP-1 показало, що на відміну від нормальної печінки, в печінці хворих на ХВГ С з помірним і тяжким фіброзом та внутрішньодольковою імуноклітинною деструкцією печінки зростає експресія TIMP-1 у збільшеній кількості активованих перисинусоїдальних зірчастих клітин, а також визначається експресія TIMP-1 клітинами Купфера, гепатоцитами, макрофагами і лімфоцитами імуноклітинних інфільтратів портальних трактів та «ступінчастих некрозів», що підтверджено в роботах інших авторів (Friedman S.L., 2000; Bergheim I., 2006). Таким чином, доведено, що при фіброзі печінки у хворих на ХВГ С активація імуноклітинної інфільтрації і деструкції одночасно стимулює експресію MMP-9 і TIMP-1.

Проведені комплексні ПГ, ГХ, КМ і ІГХ дослідження показали, що основними прогностичними ознаками імовірного прогресування фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є виражена активація імуноклітинної деструкції печінки та значного вогнищового цитолізу гепатоцитів, проліферація і збільшення кількості фіброгенних зірчастих клітин в дольках та активованих фіброblastів в портальних трактах, поява активних фіброзних септ, а також прогресування значної дрібно-крупновакуольної дистрофії гепатоцитів та стеатокіст при стеатозі печінки.

Про імовірну активацію портально-септального фіброзу насамперед свідчить збільшення числа α -SMA+ фіброblastів в портально-перипортальних зонах печінки та розширення їх площі. За даними КМ досліджень встановлено, що площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фіброblastами при слабкому фіброзі печінки F1 складає $12014,4 \pm 2017,7$ мкм², що достовірно менше ніж площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фіброblastами при помірному фіброзі печінки F2, яка дорівнює $20421,1 \pm 1626,8$ мкм² ($p < 0,05$). Визначено, що площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фіброblastами при тяжкому фіброзі печінки F3 складає $48197,7 \pm 7668,6$ мкм² і достовірно більша ніж площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фіброblastами при слабкому фіброзі печінки F1 ($p < 0,05$) і помірному фіброзі F2 ($p < 0,05$). Таким чином доведено, що площа α -SMA+

фіброblastів в портально-перипортальних зонах печінки у хворих на ХВГ С достовірно збільшується по мірі прогресування портально-перипортального фіброзу, що співпадає з даними Шишкіна М.А. (2008).

З імовірною активацією портально-септального фіброзу печінки у хворих на ХВГ С також тісно пов'язане утворення множинних активних септ з підвищеною кількістю CD8+ Т-кілерів і CD68+ макрофагів на їх вільних кінцях, в яких на межі з тканиною печінки спостерігаються каспаза-3+ гепатоцити, що гинуть апоптозом. Отримані дані уточнили уявлення про активні септи, опубліковані [Orfei E.](#) (2009). При подальшій еволюції в активних септах появляється значна кількість α -SMA+ фіброblastів, імуноклітинна інфільтрація септ зменшується і формується фіброз подовжених септ.

Результати виконаних ПГ, ГХ і ІГХ досліджень довели, що основними прогностичними ознаками імовірного прогресування перисинусоїдального фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є наявність в гепатобіоптаті проліферації Ki-67+ перисинусоїдальних зірчастих клітин або збільшення в печінкових дольках кількості активованих α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин. ІГХ методами встановлено, що виражена експресія α -SMA в значній кількості перисинусоїдальних зірчастих клітин печінки на тлі слабкої або помірної колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів та слабого або помірного перисинусоїдального фіброзу свідчить про подальшу прогресію перисинусоїдального фіброзу. Яскравим показником активації перисинусоїдального фіброзу є стан центролобулярних вен, навколо яких концентрується велика кількість активованих α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин у вигляді широких клітинних муфт.

Мала кількість α -SMA+ фіброгенних клітин на тлі слабкої або помірної колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів печінки вказує на відсутність активації фіброгенезу. Слабка експресія α -SMA+ зірчастих клітин печінки на тлі вираженої перисинусоїдальної і центролобулярної колагенізації та наявності центролобулярно-перисинусоїдального фіброзу свідчить про стабілізацію вже сформованного помірного або тяжкого фіброзу. Проведені дослідження показали, що для точного прогнозування розвитку перисинусоїдального фіброзу слід також визначати в гепатобіоптатах рівень апоптозу перисинусоїдальних зірчастих клітин. Виражена експресія каспази-3 у великій кількості перисинусоїдальних клітин знижує вигоідність розвитку перисинусоїдального фіброзу навіть при значній кількості α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин в дольках печінки. На зростання апоптозу активованих фіброгенних клітин при стабілізації фіброгенезу вказують також A. Melhem et al., 2006.

За результатами патоморфологічного аналізу виразності ступеня фіброзу і імуноклітинної деструкції печінки та рівнем сироваткової АлАТ у хворих на ХВГ С встановлено, що статистично значуща асоціація між виразністю імуноклітинної деструкції і рівнем маркеру печінкового цитолізу АлАТ спостерігається при слабкій імуноклітинній деструкції у хворих зі слабким фіброзом печінки F1 ($\chi^2=3,79$ при $p<0,05$), а також у хворих з помірним фіброзом печінки F2 ($\chi^2=4,5$ при $p<0,05$). У цих пацієнтів, при слабкій виразності імуноклітинної деструкції, достовірно частіше реєструється нормальний рівень сироваткової АлАТ. При тяжкому фіброзі F3

($\chi^2=0,5$ при $p>0,05$) відмінності статистично не значущі. Встановлено, що при помірному фіброзі печінки F2 ($\chi^2=3,75$ при $p<0,05$) і тяжкому фіброзі печінки F3 ($\chi^2=6,4$ при $p<0,01$) на тлі високої імуноклітинної деструкції печінки достовірно рідше спостерігається нормальний рівень сироваткової гепатоспецифічної АЛАТ. Таким чином, визначено, що у хворих на ХВГ С з високою імуноклітинною деструкцією печінки при тяжкому фіброзі мають місце статистично значущі прояви цитолітичного синдрому у порівнянні з аналогічним ступінем фіброзу, але низькою імуноклітинною деструкцією печінки, що дозволяє виділити імуноклітинну деструкцію печінки як важливий предиктор розвитку імунобумовленого цитолітичного синдрому.

Аналіз патогістологічних і клініко-лабораторних даних 268 осіб показав практично безсимптомний розвиток цирозу у 18% хворих, у яких на тлі вперше виявлених маркерів ХВГ С при біопсії було діагностовано цироз печінки. Встановлено, що на початку розвитку цирозу з'являються нечисленні псевдодольки внаслідок глибокої пенетрації в дольки активних портально-долькових септ, появи множинних порто-дольково-портальних «мостоподібних» септ, а також інтенсифікації утворення активованими фібробластиами та перисинусоїдальними клітинами надлишку колагену I і IV типу. Кумуляція надлишку колагенів та інших компонентів ПКМ в свою чергу сприяє посиленню фіброзу та потовщенню портальних трактів і численних порто-центральных і «мостоподібних» сполучнотканинних септ. Проведені дослідження довели, що, на відмінність від тяжкого фіброзу, при цирозі в фіброзно потовщених портальних трактах і фіброзно розширених сполучнотканинних септах спостерігається підвищена кількість мікросудин і дрібних холангіол, що також підтверджено в роботах інших дослідників (Kemeny N.E. et al., 2006; Xia F. et al., 2006). Про неоангіогенез і проліферацію холангіол свідчить позитивна експресія PCNA і Ki-67 в ядрах ендотелія мікросудин і холангіоцитів.

В останні роки патологами виділений стабільний і активний цироз печінки (Orfei E., 2009). Нами встановлено, що при паралельному застосуванні ПГ, ГХ та ІГХ методик в біоптатах печінки у хворих на ХВГ С діагностується стабільний цироз і активний цироз печінки з ознаками прогресування. Стабільний цироз печінки характеризується стабільним фіброзом і накопиченням колагену I та IV типу в потовщених портальних трактах, в численних септах і в сполучнотканинних прошарках навколо дольок і псевдодольок, без наявності в зонах фіброзу суттєвої імуноклітинної інфільтрації. В дольках і псевдодольках відсутні імуноклітинні інфільтрати, відсутні перипортальні і перисептальні імуноклітинні «некрози» та ішемічні некрози. Характерна низька проліферативна активність фіброblastів і перисинусоїдальних зірчастих клітин печінки, що підтверджує мінімальна або відсутня експресія PCNA і Ki-67 в ядрах цих клітин. Спостерігається низький рівень експресії MMP-9 в невеликій кількості клітин Купфера і перисинусоїдальних зірчастих клітинах та нечисленні TIMP-1+ перисинусоїдальні зірчасті клітини.

Ознаками активності цирозу є імуноклітинна деструкція та активація фіброгенезу в циротично зміненій печінці. Для активного цирозу з ознаками

імуноклітинної деструкції характерна поширена імуноцитарна інфільтрація, а також морфологічні прояви імуноклітинної деструкції в дольках і псевдодольках.

Морфологічними проявами імуноклітинної деструкції дольок печінки при цирозі є численні імуноклітинні «ступінчасті некрози» та «мостоподібні некрози», які значно поглиблюються в дольки і псевдодольки та суттєво змінюють їх цитоархітектоніку. При зростанні імунодеструкції в активному цирозі печінки спостерігається посилення експресії MMP-9 і TIMP-1, а при стабільному цирозі печінки визначається мала кількість MMP-9+ і TIMP-1+ клітин.

Проведені ПГ, ГХ і ІГХ дослідження дозволили визначити морфогенез основних типів прогресування цирозу печінки: зростання імуноклітинної деструкції печінки, прогресування септального і перисинусоїдального фіброзу в дольках та псевдодольках, прогресування перицелюлярного фіброзу в дольках і псевдодольках при стеатозі печінки, поширений некроз гепатоцитів в дольках і псевдодольках внаслідок порушення гемомікроциркуляції, колапс дольок печінки при портально-центролобулярному шунтуванні кровообігу.

Основною мікроскопічною ознакою активації фіброзу в циротично зміненій печінці є збільшення кількості дрібних і тонких фіброзних септ в дольках і псевдодольках печінки, поява сегментарного перисинусоїдального фіброзу, а також поширення перипортального фіброзу. Встановлена також достатньо інтенсивна проліферація Ki-67+ фібробластоподібних клітин в потовщених фіброзних септах. Визначено, що найбільш надійним показником активації фіброзу в циротично зміненій печінці є співставлення в серійних зрізах рівня фіброзу, а також рівня експресії колагену IV типу і α -SMA в фіброзних прошарках навколо дольок і псевдодольок, та в самих дольках і псевдодольках. При інтенсифікації фіброгенезу в циротично зміненій печінці на тлі різного рівня експресії колагену IV типу в фіброзних прошарках навколо дольок печінки і у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах водночас визначається високий рівень експресії α -SMA внутрішньодольковими зірчастими фіброгенними клітинами, а також фібробластами портальних трактів, фіброзних прошарків та множинних септ. При активації фіброзу в цирозі печінки також спостерігається позитивна експресія PCNA і Ki-67 в ядрах перисинусоїдальних клітин в дольках і псевдодольках. На протилежність цьому, високий рівень фіброзу і експресії колагену IV типу в септах навколо дольок печінки і у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах та водночас низька експресія α -SMA в поодиноких фіброгенних клітинах в дольках, потовщених портальних трактах і септах свідчить про стабільний тяжкий фіброз в циротично зміненій печінці. Наслідком прогресування фіброзу при цирозі печінки є переважання площі фіброзу над площею залишків тканини печінки.

Проведені дослідження показали, що одним із шляхів прогресування цирозу печінки у хворих на ХВГ С може бути посилення перицелюлярного фіброзу навколо гепатоцитів зі стеатозом в істинних дольках і псевдодольках печінки. ІГХ аналіз виявив поширене розповсюдження колагену IV типу в перицелюлярних сполучнотканинних прошарках і виражену α -SMA+ експресію в активованих перисинусоїдальних клітинах Іто. Мікроскопічні дослідження показали, що

прогресуючий цироз печінки визначався у 80% хворих на ХВГС із жировою дистрофією гепатоцитів різного ступеня вираженості.

Визначено, що при зростанні портально-центролобулярного шунтування крові значно активується апоптоз печінкових клітин і водночас зростає міжклітинний фіброз, виникає так званий колапс дольок печінки зі зближенням портальних трактів. Стійка перебудова типової мікроангіоархитектоніки у хворих на цироз печінки з портальною гіпертензією негативно проявляється ішемією і дрібновогнищевими некрозами гепатоцитів в дольках і псевдодольках під час операцій з формування позапечінкових судинних анастомозів. У деяких хворих після таких операцій в біоптатах визначається ішемічний та геморагічний некроз значної кількості дольок і псевдодольок. Такі механізми прогресії цирозу печінки зазначають і інші автори ([Orfei E.](#), 2009; [Spengler U.](#), 2009).

Прогностично найбільш несприятливими для хворих різновидами прогресування цирозу є поширені некротичні зміни дольок і псевдодольок, які ускладнюються печінково-клітинною недостатністю, а також імуноклітинна деструкція печінки, за якою прогресує тяжкий фіброз з портальною гіпертензією.

ВИСНОВКИ

У дисертації приведені теоретичне узагальнення і нове рішення наукової задачі щодо визначення морфогенезу і патоморфологічних ознак прогресування основних типів фіброзу печінки в декомпенсований цироз печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С для біопсійної діагностики та оптимізації лікування хворих.

1. Розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГ С передують дистрофія, апоптоз і некроз окремих гепатоцитів, інфільтрація лімфоцитами перисинусоїдальних просторів, дифузна або фолікулоподібна інфільтрація портальних трактів з наявністю CD20+, CD8+, CD45R0+ і CD5+ лімфоцитів, а також імуноклітинна деструкція печінки. Проявами імуноклітинної деструкції печінки є наявність імуноклітинних портально-долькових і перипортальних «ступінчастих некрозів», в яких переважають CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ макрофаги, CD20+ В-лімфоцити з домішкою NK-клітин і α -SMA+ фібробластів, а також внутрішньодолькових вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, в яких ідентифікуються CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ макрофаги, поодинокі NK-клітини і α -SMA+ зірчасті клітини. В цих зонах відбувається імунне знищення інфікованих гепатоцитів, які гинуть апоптозом або каріоцитолізисом (некрозом).

2. У хворих на ХВГ С розвивається три основні типи фіброзу печінки: портально-септальний, перисинусоїдально-центролобулярний і змішаний (портально-септальний та перисинусоїдально-центролобулярний) фіброз. Перичелюлярний фіброз навколо гепатоцитів є різновидом перисинусоїдального внутрішньодолькового фіброзу при стеатозі печінки у хворих на ХВГ С.

3. Перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки відрізняється переважанням значного фіброзу центролобулярних вен і перисинусоїдальних просторів над слабким фіброзом портальних трактів внаслідок надмірного синтезу колагену I та IV типу і молекул ПКМ активованими α -SMA+ перисинусоїдальними

зірчастими клітинами Іто фіброгенного фенотипу, а також розширенням синусоїдів печінкових дольок. Його прогресуванню до помірного і важкого фіброзу передують проліферація Ki-67+ перисинусоїдальних зірчастих клітин та збільшення кількості α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки проявляється у хворих синдромом портальної гіпертензії.

4. Портально-септальний фіброз печінки характеризується значним фіброзом портальних трактів і перипортальних зон та утворенням портально-долькових фіброзних септ внаслідок надмірного синтезу колагену I та IV типу і молекул ПКМ активованими α -SMA+ фібробластами, кількість яких збільшується в портальних трактах, в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» та в портально-долькових септах; він еволюціонує в цироз через слабкий F1, помірний F2 і важкий F3 фіброз печінки за градацією METAVIR (1994). При комп'ютерно-морфометричному дослідженні встановлено, що площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при слабкому фіброзі печінки F1 достовірно менше ніж площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при помірному фіброзі печінки F2 і важкому фіброзі печінки F3. Площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при важкому фіброзі печінки F3 достовірно більша за площу портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при слабкому фіброзі F1 і помірному фіброзі печінки F2.

5. У хворих на ХВГ С зростання імунітарної інфільтрації фіброзно зміненої печінки стимулює експресію MMP-9 і TIMP-1 перисинусоїдальними зірчастими клітинами і макрофагами Купфера, гепатоцитами, макрофагами і лімфоцитами портальних та внутрішньодолькових імунітарних інфільтратів. При імунітарній деструкції печінки експресія MMP-9 і TIMP-1 досягає максимального рівня і визначається у великій кількості зірчастих клітин Іто, гепатоцитів, макрофагів Купфера, лімфоцитів і макрофагів портально-перипортальних імунітарних інфільтратів та вогнищ імунітарного кілінгу.

6. Прогностичними ознаками імовірного прогресування портально-септального фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є проліферація Ki67+ фібробластів і збільшення кількості α -SMA+ фібробластів в портальних трактах, поява множинних активних септ з підвищеною кількістю в них CD8+ Т-кілерів і CD68+ макрофагів, а також значне збільшення в септах і портально-перипортальних імунітарних «ступінчастих некрозах» кількості α -SMA+ активованих фібробластів. На місці великих внутрішньодолькових осередків цитолізу гепатоцитів та їх імунітарної деструкції CD8+ Т-кілерами і CD68+ макрофагами, після активації перисинусоїдальних α -SMA+ зірчастих клітин, утворюються великі неупорядковані осередки фіброзу і фіброзні септи.

7. Про можливе прогресування перисинусоїдального фіброзу печінки свідчить проліферація Ki-67+ перисинусоїдальних зірчастих клітин та збільшення в печінкових дольках кількості α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин при низькому рівні експресії ними апоптотичної каспази-3, а також виражена експресія α -SMA значною кількістю перисинусоїдальних зірчастих клітин на тлі слабого фіброзу і колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів. До посилення

periцелюлярного фіброзу веде прогресування значної дрібно-крупновакуольної дистрофії гепатоцитів та утворення стеатокіст при стеатозі печінки.

8. Ознаками активного цирозу є імуноцитарна інфільтрація прошарків сполучної тканини і фібровано потовщених портально-перипортальних зон, а також імуноклітинна деструкція дольок і псевдодольок з наявністю CD8⁺ Т-лімфоцитів і CD68⁺ макрофагів з домішком CD45R0⁺ Т-лімфоцитів і CD20⁺ В-лімфоцитів в портально-перипортальних інфільтратах і у розширених внутрішньодолькових синусоїдах. Декомпесация цирозу печінки обумовлена 4-ма морфогенетичними шляхами його прогресування: активацією імуноклітинної деструкції циротично зміненої печінки; прогресуванням септального, перисинусоїдального і periцелюлярного фіброзу в дольках і псевдодольках печінки; ішемічним і геморагічним некрозом дольок та псевдодольок; колапсом дольок печінки внаслідок апоптозу гепатоцитів при портально-центролобулярному шунтуванні кровотоку в печінці.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. При патоморфологічному дослідженні парафінових зрізів інтраопераційних біопсій та трепанобіоптатів печінки з наявністю не менш ніж 18-20 дольок і 10-12 портальних трактів, при забарвленні гематоксиліном та еозином, за Ван-Гізон, трихром-Масон та ІГХ визначенні рівня експресії α -SMA і колагену IV типу, у хворих на ХВГ С діагностується портально-септальний, перисинусоїдально-центролобулярний, periцелюлярний і змішаний (портально-септальний та перисинусоїдально-центролобулярний) фіброз печінки.

2. Для визначення ступеня вираженості різних типів фіброзу печінки аналізується гістотопографія фіброзу і ступінь його розвитку в різних компартментах печінки: в портальних трактах і в перипортальних зонах; у внутрішньодолькових центролобулярних венах і перисинусоїдальних просторах; в портально-долькових, порто-центрально-портальних і порто-портальних фіброваних септах, а також у фіброваних прошарках навколо істинних дольок і псевдодольок печінки. З урахуванням цих даних в гепатобіоптатах хворих на ХВГ С визначається слабкий, помірний і тяжкий фіброз без псевдодольок, а також цироз печінки.

3. Для прогнозування імовірного прогресування фіброзу печінки в парафінових зрізах гепатобіоптатів, окрім забарвлення гематоксиліном та еозином, за Ван-Гізон, трихром-Масон та ІГХ виявлення експресії α -SMA і колагену IV типу, необхідно визначити рівень експресії клітинами печінки і клітинами імуноцитарних інфільтратів Ki-67, каспази-3, CD68, а також визначити розповсюдження і локалізацію CD8⁺ Т-лімфоцитів і CD20⁺ В-лімфоцитів.

4. Імунохроматографічний експрес-метод виявлення тест-касетами «CITO-TEST HCV» фірм «AmeriTec Inc» (США) та «Acon Biotech Co» (Китай) антитіл до вірусу гепатиту С в дрібних стовпчиках тканин трепанобіоптатів печінки має достовірно високу 90% чутливість; його можна рекомендувати для швидкої діагностики вірусного гепатиту С в біопсійній практиці, а також для швидкого виявлення антитіл до вірусу гепатиту С в тканинах органів під час операцій для попередження інфікування вірусами гепатиту медичного персоналу.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шебеко Ю. О. Характеристика експресії MMR-9 і TIMP-1 при фіброзі і цирозі печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С / Ю. О. Шебеко // Патологія. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 111–113.
2. Туманский В. А. Интраоперационная иммунохроматографическая экспресс-диагностика вирусного гепатита С в ткани трепанобиоптатов печени / В.А. Туманский, Ю. А. Шебеко // Патологія. – 2010. – Т. 7, № 2. – С. 107–109. *(Автором самостійно проводились імунохроматографічні дослідження біопсій печінки і крові хворих, обробка та аналіз результатів дослідження).*
3. Туманський В. О. Клініко-морфологічне обґрунтування градації фіброзу печінки в біопсійній практиці / В. О. Туманський, Ю. О. Шебеко // Патологія. – 2009. – Т. 6, № 2 – С. 64–70. *(Автором самостійно проводився набір більшої частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження, формулювалися висновки).*
4. Туманский В. А. Цирроз печени: пути прогрессии и возможности репаративной регенерации / В. А. Туманский, Ю. А. Шебеко, А. С. Тугушев // Патологія. – 2009. – Т. 6, № 3. – С. 17–25. *(Автором забезпечено морфологічне дослідження матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження)*
5. Шебеко Ю. О. Імуногістохімічна характеристика експресії маркерів проліферації при фіброзі та цирозі печінки / Ю. О. Шебеко // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2009. – Вип. 22, т. 1 (клінічна медицина). – С. 166–167.
6. Туманский В. А. Патогенно индуцированный апоптоз гепатоцитов при хроническом вирусном гепатите: молекулярные механизмы и микроскопическая диагностика / В. А. Туманский, Ю. А. Шебеко // Патологія. – 2008. – Т. 5, № 3 – С. 29–34. *(Автором самостійно проводився набір більшої частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження).*
7. Туманский В. А. Иммуноклеточный киллинг: морфогенез и последствия для больных хроническим вирусным гепатитом / В. А. Туманский, М. А. Шишкин, Ю. А. Шебеко // Патологія. – 2008. – Т. 5, № 3 – С. 110–112. *(Автором самостійно проводився набір частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження).*
8. Тяжкий фіброз печінки: особливості морфогенезу, біопсійної діагностики та клінічних проявів / В. О. Туманський, М. А. Шишкін, Ю. О. Шебеко, А. В. Куртєв // Світ медицини та біології. – 2008. – № 2. – С. 102–104. *(Автором самостійно проводився набір більшої частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження, формулювалися висновки).*
9. Туманский В. А. Особенности морфогенеза тяжелого фиброза-цирроза печени при хроническом стеатогепатите и вирусном гепатите / В. А. Туманский, Ю. А. Шебеко, А. А. Гаврилюк // Актуальні проблеми онкоморфології. – 2011. – С. 119. *(Автором самостійно проводився набір більшої частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження, формулювалися висновки).*

10. Шебеко Ю. О. Спосіб інтраопераційної експрес-діагностики вірусного гепатиту С / Ю. О. Шебеко // Хист. Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених. – 2010. – Вип. 12. – С. 197.

11. Шебеко Ю. О. Імуногістохімічні та комп'ютерно-морфометричні особливості фіброзу різного ступеня та цирозу печінки / Ю. О. Шебеко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2009. – Т. 9, вип. 4 (28), част. 3. – С. 235.

12. Туманский В. А. Фиброз печени: источники развития, морфогенез и градация интенсивности / В. А. Туманский, Ю. А. Шебеко // 100-летие Российского общества патологоанатомов. – СПб. : Biovitrum, 2009. – С. 315–317. *(Автором самостійно проводився набір більшої частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження).*

13. Посмертна імунохроматографічна діагностика ВІЛ-інфекції і вірусних гепатитів: методичні рекомендації / В.О. Туманський, С.Г. Тимошенко, А.В. Куртєв, Ю. А. Шебеко. – К. : МОЗ України. 2009. – 23 с. *(Автором самостійно проводився набір частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження).*

14. Пат. № 47598 UA, МПК7 G01N 33/00. Спосіб експрес-діагностики вірусного гепатиту С / Туманський В.О., Шебеко Ю.О., Живиця С.Г. (Україна). - № u 200909572; заявл. 18.09.09; опубл. 10.02.10, Бюл.№3. *(Автором самостійно проводились імунохроматографічні дослідження біопсій печінки і крові хворих та аналіз результатів дослідження, проводилась робота з патентом).*

АНОТАЦІЯ

Шебеко Ю. О. Особливості морфогенезу і прогресування фіброзу та цирозу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України. – Запоріжжя, 2011.

На підставі комплексного дослідження біоптатів печінки 120 хворих на ХВГ С та аналізу клініко-лабораторних даних 268 пацієнтів встановлено, що фіброз печінки розвивається в зонах, в яких з'являються нові покоління α -SMA+ фіброгенних клітин. Доведена важлива роль проліферації і апоптозу цих клітин в морфогенезі фіброзу і цирозу печінки. ІГХ-методами вивчено склад імуноклітинних інфільтратів печінки та диференційовані зони її імуноклітинної деструкції.

Вперше детально описані основні морфологічні типи фіброзу печінки. Вперше охарактеризовані особливості морфогенезу перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу печінки у хворих на ХВГ С. Визначені прогностичні ознаки імовірного прогресування кожного морфологічного типу фіброзу, запропоновані параметри градації ступеня тяжкості перисинусоїдально-центролобулярного і змішаного фіброзу печінки.

Зазначені особливості експресії MMP-9 та TIMP-1 при фіброзі і цирозі печінки у хворих на ХВГ С.

В роботі охарактеризовані та систематизовані комплексні ознаки стабільного і активного цирозу печінки, обґрунтовані основні патоморфологічні шляхи

прогресування і декомпенсації цирозу печінки у хворих на ХВГ С.

Розроблено, запатентовано та впроваджено в практичну діяльність спосіб імунохроматографічної експрес-діагностики наявності антитіл до вірусу гепатиту С в тканині печінки і крові померлих.

Ключові слова: фіброз і цироз печінки, морфогенез, прогресування, імуноклітинна деструкція, хронічний вірусний гепатит С.

АННОТАЦИЯ

Шебеко Ю. А. Особенности морфогенеза и прогрессии фиброза и цирроза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия. – Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины. – Запорожье, 2011.

На основании комплексного патоморфологического, гистохимического, иммуногистохимического и компьютерно-морфометрического исследования трепанобиоптатов и интраоперационных биоптатов печени 120 больных ХВГ С, а также анализа клинико-лабораторных данных 268 пациентов определено, что фиброз печени может развиваться в нескольких ее зонах, в которых появляются новые поколения фиброгенных α -SMA⁺ звездчатых клеток и фибробластов: в портальных трактах и перипортальных «ступенчатых некрозах», в центролобулярных венах и перисинусоидальных пространствах, а также в очагах иммуноклеточной деструкции долек печени. Доказана важная роль пролиферации и апоптоза активированных α -SMA⁺ фиброгенных клеток в морфогенезе фиброза и цирроза печени. Иммуногистохимическими методами изучен состав перисинусоидальных и портально-перипортальных иммуноклеточных инфильтратов печени, а также дифференцированы зоны иммуноклеточной деструкции печени (иммуноклеточные «ступенчатые» и «мостовидные некрозы», очаги иммуноклеточного киллинга гепатоцитов), в которых сосредоточены иммунциты цитотоксической направленности.

Впервые детально описаны основные морфологические типы фиброза печени: перисинусоидально-центролобулярный, портально-септальный, смешанный и перицеллюлярный фиброз (разновидность перисинусоидально-центролобулярного фиброза). Впервые охарактеризованы молекулярно-клеточные особенности морфогенеза перисинусоидально-центролобулярного фиброза печени у больных ХВГ С. Изучены и изложены прогностические патогистологические, гистохимические и иммуногистохимические признаки вероятной прогрессии каждого морфологического типа фиброза печени, предложены параметры градации степени тяжести перисинусоидально-центролобулярного и смешанного фиброза печени у больных ХВГ С. Доказана важная роль иммуноклеточной деструкции в прогрессии портально-септального фиброза и развитии синдрома цитолиза у больных ХВГ С.

Охарактеризованы особенности экспрессии матриксной металлопротеиназы MMP-9 и её тканевого ингибитора TIMP-1 клетками печени, а также расширение

спектра клеток-продуцентов этих ферментов при фиброзе с иммуноцитарной инфильтрацией и при циррозе печени.

В работе охарактеризованы и систематизированы патогистологические, гистохимические, иммуногистохимические признаки стабильного и активного цирроза печени, детально обоснованы основные патоморфологические пути прогрессии и декомпенсации цирроза печени у больных ХВГ С.

На основании параллельного анализа особенностей экспрессии α -SMA+ и коллагена IV типа активированными фиброгенными клетками печени предложены прогностические признаки вероятной прогрессии либо стабилизации фиброза и цирроза печени у больных ХВГ С.

Разработан, запатентован и внедрен в практику патологоанатомической службы и судебно-медицинской экспертизы способ иммунохроматографической экспресс-диагностики наличия антител к вирусу гепатита С в ткани печени и в крови умерших больных.

Ключевые слова: фиброз и цирроз печени, морфогенез, прогрессия, иммуноклеточная деструкция, хронический вирусный гепатит С.

ANNOTATION

Shebeko Yu. A. Features of morphogenesis and progression of liver fibrosis and cirrhosis at patients with chronic viral hepatitis C. – As manuscript.

The Thesis for scientific degree of Candidate of Medical Sciences on specialization 14.03.02 – pathological anatomy. – Zaporozhye State Medical University. – Zaporozhye, 2011.

Zones-sources of fibrogenesis with populations of fibrogenic α -SMA+ cells were determined on the base of complex analysis of liver biopsies of 120 patients with chronic HCV-infection and analysis of clinical-laboratory data of 268 patients with hepatitis C virus (HCV). The important role of α -SMA+ activated fibrogenic cells' proliferation and apoptosis in liver fibrosis and cirrhosis morphogenesis was established. A compound of immunocellular infiltration in liver was established and foci of immunocellular liver destruction were differentiated due to IHC analysis.

The main morphological types of liver fibrosis were determined. Features of perisinusoidal-centrolobular liver fibrosis at patients with chronic HCV-infection were also studied. Prognostic signs of possible progression of each morphological types of liver fibrosis were studied and defined. The scoring system was proposed for perisinusoidal-centrolobular and mixed liver fibrosis.

There were determined features of MMP-9 and TIMP-1 expression at patients with chronic HCV-infection.

Complex criteria of stable and active liver cirrhosis were established. The main pathways of liver cirrhosis progression and decompensation were detailed characterized.

Method of immunochromatographic express diagnostics of HCV-antibodies in liver tissue and postmortem blood was designed, patented and embedded in practice.

Key words: liver fibrosis and cirrhosis, morphogenesis, progression, immunocellular destruction, chronic HCV-infection.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ	—	аланінамінотрансфераза
АсАТ	—	аспартатамінотрансфераза
ВГС	—	вірус гепатиту С
ГХ	—	гістохімічні (дослідження)
ІГА	—	індекс гістологічної активності
ІГХ	—	імуногістохімічні (дослідження)
ІХА	—	імунохроматографічний аналіз
КМ	—	комп'ютерна морфометрія
ПГ	—	патогістологічні (дослідження)
ПКМ	—	позаклітинний матрикс
РНК	—	рибонуклеїнова кислота
ХВГ	—	хронічний вірусний гепатит
ХВГ С	—	хронічний вірусний гепатит С
α -SMA	—	α -ізоформа гладком'язового актину
НСV	—	вірус гепатиту С
ІНС	—	імуногістохімічний (аналіз)
ІL	—	інтерлейкіни
MMP-9	—	матриксна металопротеїназа 9
NK-клітини	—	натуральні кілери
PCNA	—	ядерний антиген клітинної проліферації
PDGF	—	тромбоцитарний фактор росту
TGF- β_1	—	трансформуючий фактор росту β_1
TIMP-1	—	тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ-1

Підписано до друку 01.11.2011 р. Гарнітура Times New Roman.
Папір друкарський. Формат 60х90/16. Умовн. друк. арк. 0,9.
Наклад – 100 прим. Зам. № 4923.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26