

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ШЕБЕКО Юлія 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

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Науковий керівник
ТУМАНСЬКИЙ Валерій Олексійович
доктор медичних наук, професор

Запоріжжя, 2011

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ФІБРОЗ І ЦИРОЗ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С: МОРФОГЕНЕЗ, ПАТОМОРФОЛОГІЯ, ГРАДАЦІЯ І КРИТЕРІЇ ПРОГРЕСІЇ.....	12
1.1. Сучасні погляди на морфогенез фіброзу і цирозу печінки.....	12
1.2. Патоморфологія і градація фіброзу і цирозу печінки.....	20
1.3. Клініко-морфологічні критерії прогресії фіброзу і цирозу печінки.....	23
1.4. Особливості лабораторної діагностики фіброзу, цирозу і хронічного вірусного гепатиту С.....	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
2.1. Матеріали дослідження.....	27
2.2. Методи та методики досліджень.....	28
РОЗДІЛ 3. ПАТОГІСТОЛОГІЧНА, ГІСТОХІМІЧНА І ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНИХ ЗМІН В ПЕЧІНЦІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С.....	35
3.1. Патогістологічні і імуногістохімічні зміни в печінці у хворих на хронічний вірусний гепатит С.....	35
3.2. Мікроскопічні і імуногістохімічні прояви імуноклітинної деструкції печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С.....	42
3.3. Імунохроматографічний аналіз наявності антитіл до вірусу гепатиту С в тканині трепанобіоптатів печінки і в крові померлих хворих на хронічний вірусний гепатит С.....	49
РОЗДІЛ 4. МОРФОГЕНЕЗ І ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОСНОВНИХ ТИПІВ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ ТА ЇХ ГРАДАЦІЯ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С.....	55
4.1. Патоморфологічна і імуногістохімічна характеристика.....	57

портально-септального фіброзу печінки різного ступеня.....	
4.2. Патогістологічна, гістохімічна і імуногістохімічна характеристика перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу печінки.....	66
4.3. Патогістологічна, гістохімічна і імуногістохімічна характеристика змішаного фіброзу печінки.....	81
4.4. Патоморфологічна характеристика перицеллюлярного фіброзу печінки.....	89
РОЗДІЛ 5. ПАТОГІСТОЛОГІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОЗНАКИ ІМОВІРНОГО ПРОГРЕСУВАННЯ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С.....	94
5.1. Імуноклітинна деструкція дольок і фіброз печінки.....	94
5.2. Експресія металопротеїнази MMP9 і її тканинного інгібітора TIMP-1 при імуноклітинній інфільтрації і деструкції печінки.....	100
5.3. Морфологічні ознаки прогресування портально-септального та септального фіброзу печінки.....	107
5.4. Патоморфологічне і імуногістохімічне обґрунтування прогресії перисинусоїдального і перицеллюлярного фіброзу печінки.....	123
РОЗДІЛ 6. ПАТОГІСТОЛОГІЧНІ, ГІСТОХІМІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ЗМІНИ В ПЕЧІНЦІ ПРИ ЦИРОЗІ І ЙОГО ПРОГРЕСУВАННІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С.....	137
6.1. Морфологічні відмінності цирозу від тяжкого фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С.....	137
6.2. Морфогенез і основні типи прогресування цирозу печінки та їх клінічні прояви у хворих на хронічний вірусний гепатит С.....	145
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	166
ВИСНОВКИ.....	186
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	189
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	191

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ	– аланінамінотрансфераза
АсАТ	– аспартатамінотрансфераза
АФК	– активні форми кісню
ВГС	– вірус гепатиту С
Зб.	– збільшення
ЗКП	– зірчасті клітини печінки
ІГА	– індекс гістологічної активності
ІГХ	– імуногістохімічне (дослідження)
ІФА	– імуноферментний аналіз
НАСГ	– неалкогольний стеатогепатоз
ПКМ	– позаклітинний матрикс
УЗД	– ультразвукове дослідження
ХВГ	– хронічний вірусний гепатит;
ХВГ С	– хронічний вірусний гепатит С;
FGF	– фактор росту фібробластів
IL	– інтерлейкіни
INF- γ	– γ -інтерферон
HCV	– вірус гепатиту С
HCVAb	– антитіла проти вірусу гепатиту С
HGF	– гепатоцитарний фактор росту
α -SMA	– α -ізоформа гладком'язового актину
MMP-9	– матриксна металопротеїназа 9
NADPH	– нікотинамідаденіндіуклеотидфосфат (оксидаза)
PCNA	– ядерний антиген клітинної проліферації
TIMP-1	– тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ-1
TGF- β 1	– трансформуючий фактор росту β 1
TNF- α	– фактор некрозу пухлин- α
PDGF	– тромбоцитарний фактор росту

ВСТУП

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 (Knodell 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-XL, 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, periцелюлярного 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 інгібітору 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), 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: ПГ, ГХ, ІГХ 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, перицелюлярний та змішаний фіброз.

Вперше детально охарактеризовані молекулярно-клітинні особливості морфогенезу перисинусоїдально-центролобулярного та перицелюлярного 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 інгібітору 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 periцелюлярного 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 біопатів 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 введення, огляду літератури, розділу матеріалу й методів дослідження, 4-х розділів власних досліджень, аналізу і обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій і списку з 213 літературних джерел (34 вітчизняних і 179 закордонних авторів). Робота ілюстрована 168 рисунками і 3 таблицями, що займають 78 сторінок.

РОЗДІЛ 1

ФІБРОЗ І ЦИРОЗ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С: МОРФОГЕНЕЗ, ПАТОМОРФОЛОГІЯ, ГРАДАЦІЯ І КРИТЕРІЇ ПРОГРЕСІЇ

Фіброз печінки – це надмірне накопичення колагенів та інших компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ), яке розвивається внаслідок хронічного ушкодження печінки, характерного для більшості хронічних хвороб печінки [1,2,3,4,5]. Головною причиною фіброзу печінки в індустріально-розвинених країнах є хронічні вірусні гепатити В (ХВГ В) і С (ХВГ С), алкогольний гепатит та неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) [6,7,8,9,10,11,12,13]. Саме ці хвороби відіграють головну роль у прогресуванні фіброзу печінки в цироз з такими смертельними ускладненнями, як печінкова недостатність, кровотеча при портальній гіпертензії, гепатоцелюлярна карцинома [14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24].

В останні роки в усьому світі нараховується близько 500 млн. хворих на ХВГС [25], а прогресуючий фіброз та цироз печінки реєструється у 30-70% хворих на ХВГ В і С [26,27,28,29]. Стрімке розповсюдження ХВГ С, а також алкогольного гепатиту та НАСГ призвело до різкого зростання кількості хворих з вперше виявленим тяжким фіброзом і цирозом печінки.

1.1. Сучасні погляди на морфогенез фіброзу і цирозу печінки

Раніше вважалося, що фіброз печінки – це пасивний, незворотній процес, який розвивається в результаті деградації паренхіми печінки і її заміщення сполучною тканиною, багатою на колаген [30,31]. У ранніх роботах, в 1970х рр., вважали, що фіброз печінки потенційно зворотній [32] але на нього звертали мало уваги аж до 1980-х рр., коли були ідентифіковані перисинусоїдальні зірчасті клітини печінки (ЗКП), або клітини Іто, як

основні печінкові клітини-продуценти колагену [33]. До цього часу ЗКП були формально відомі як ліпоцити, що накопичують та зберігають ретиноїди. У нормальній печінці перисинусоїдальні клітини Іто знаходяться в просторах Дісе внутрішньодолькових синусоїдів, де виконують роль головного резервуару вітаміну А [34,35,36]. Вперше ці клітини були описані Купфером в 1876 р., який встановив, що в умовах хронічного ураження печінки перисинусоїдальні клітини Іто набувають фіброгенних властивостей [37].

В 1980-х рр. була стандартизована методика отримання ЗКП у людини та гризунів [38,39] і при їх довготривалому культивуванні на платівках *in vitro* була визначена їх фіброгенна роль [40,41,42]. Була розроблена експериментальна модель для вивчення фіброгенезу в печінці у щурів і трансгенних мишей із застосуванням клітинних культур, що привело до ідентифікації ключових медіаторів фіброзу [43,44,45]. Згідно сучасної концепції, фіброз печінки при її хронічних захворюваннях є наслідком циклічних деструктивно-репаративних змін в органі. Після гострого пошкодження, наприклад, при гострому перебігу ХВГ С, гепатоцити регенерують і заміщають клітини, що загинули шляхом апоптозу або некрозу. Цей процес асоціюється із запальною відповіддю і обмеженим накопиченням білків ПКМ. В разі персистенції пошкоджуючого агента регенерація сповільнюється, і гепатоцити заміщаються надлишковою кількістю протеїнів ПКМ, включно фібрилярним колагеном. Розподіл колагену залежить від етіології, локалізації та площі зон деструкції. При ХВГ і хронічних холестатичних захворюваннях печінки, фіброз печінки спочатку локалізується переважно навколо порталних трактів, тоді як при алкогольній хворобі печінки – в перицентральної або перисинусоїдальній зоні [46,47,48,49,50]. По мірі прогресування хронічного захворювання печінки спостерігається поширення і потовщення сполучнотканинних септ у «мостоподібний» фіброз і, зрештою, відбувається трансформація важкого фіброзу печінки в цироз.

В останні роки дослідження молекулярно-клітинних механізмів фіброгенезу значно розширилися [51,52,53,54,55]. Було остаточно доказано, що основними продуцентами колагенів та інших компонентів ПКМ в пошкодженій печінці є активовані перисинусоїдальні ЗКП [51,55,56,57,58]. При хронічному пошкодженні печінки спостерігається активація ЗКП та диференціювання їх в міофібробластоподібні клітини, які набувають скоротливі, прозапальні і фіброгенні властивості [55,57,58,59,60,61]. Вважається, що активовані ЗКП мігрують і кумуються в місці ураження тканини, де секретують велику кількість компонентів ПКМ і регулюють деградацію молекул ПКМ. Макрофаги печінки, зокрема клітини Купфера, продукують похідний від тромбоцитів фактор росту (PDGF) – предомінантний мітоген для активованих ЗКП. Синтез колагену активованими ЗКП регулюється на рівні транскрипції [62]. Підвищення вмісту інформаційної колагенової РНК виконує роль чинника-посередника, який підвищує синтез колагену активованими ЗКП.

Внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які опосередковують фіброгенез в печінці, вивчались переважно в культурі ЗКП, а визначення їх ролі в прогресії фіброзу *in vivo* було встановлено в експериментах на мишах [53,54,63,64,65]. Вважається, що існує декілька основних мітоген-активованих протеїнкиназ, які модулюють фіброгенну дію ЗКП. Позаклітинні кінази-регулятори, які стимулюються експериментально індукованим пошкодженням печінки, опосередковують проліферацію і міграцію ЗКП [66,67,68]. У протилежність, c-jun N-терміналкаіназа регулює апоптоз гепатоцитів і секрецію запальних цитокінів в культурі ЗКП [69,70,71]. Такий регулятор ЗКП, як пероксисомний рецептор активації проліферації (PPAR), активується і при експериментальному фіброзі. PPAR- γ ліганди пригнічують фіброгенну дію ЗКП і сприяють зворотному розвитку фіброзу *in vivo* [72,73]. Ядерний транскрипційний фактор NF- κ B може проявляти інгібіторну активність на фіброз печінки [74,75,76]. Інші фактори транскрипції, пов'язані з активацією ЗКП, можуть також грати важливу роль у фіброгенезі печінки

[74,77,78]. Останніми дослідженнями підтверджена роль внутрішньоклітинних сигнальних шляхів toll, що активуються, toll-подібними рецепторами і b-катепсином [79,80].

ЗКП експресують велику кількість нейроендокринних маркерів, таких як реєлін, нестін, нейротрофіни, синаптофізін і гліально-фібрилярні кислотні протеїни, а також несуть рецептори нейротрансмітерів [74,77,81,82,83,84]. У стані спокою перисинусоїдальні ЗКП експресують такі маркери, як PPAR і Srebp-1c, які характеризують клітини як адипоцити. У разі активації ЗКП відбувається експресія міогенних маркерів, головним з яких є α -ізоформа гладком'язового актину (α -SMA) [85,86,87].

Активовані перисинусоїдальні ЗКП є основним джерелом внутрішньодолькового синтезу і продукції колагенів та інших компонентів ПКМ, в портальних трактах домінують активовані портальні фіброblastи. Після активації ЗКП і портальні фіброblastи диференціюються в фіброгенні клітини, які відповідають на апоптотичні стимули [74,81,85,88,89,]. Окрім перисинусоїдальних ЗКП і портальних фіброblastів [51,57,88,89,90,91,92,93] фіброгенний потенціал мають також міофіброblastи централобулярних вен [93,94] і колагенпродукуючі клітини, трансформовані з гемопоетичних стовлових клітин-мігрантів [95,96], епітелій дрібних жовчних холангіол [97,106], і навіть гепатоцити – в результаті епітеліально-мезенхімального переходу [98,106]. Ці клітини активуються фіброгенними цитокінами, такими як трансформуючий фактор росту β_1 (TGF- β_1), ангіотензин-II, лептин, інтерлейкіни 1α і 1β (IL1 α і IL1 β), туморонекротичний фактор α (TNF- α), васкулоендотеліальний фактор росту (VEGF) та інші [74,77,92,97,98,99,100].

Відомо, що при експериментальному холестазі міофіброblastи з дрібних портальних судин проліферують навколо біліарних протоків печінки і в подальшому обумовлюють накопичення колагену [101,102]. При хронічних захворюваннях печінки, під впливом різних факторів росту, ушкоджений орган заселяють CD34+ і CD38+ гемопоетичні стовбурні клітини, які диференціюються в фіброblastи, що секретують надлишок

колагенів і інших компонентів ПКМ з розвитком фіброзу печінки [95,96]. Таким чином, стовбурні гемопоетичні клітини можуть бути джерелом фіброгенних клітин в пошкодженій печінці. Додатковим потенційним джерелом фіброгенних клітин печінки можуть бути циркулюючі фіброцити з фенотипом (колаген I+/CD11b+/CD13+/CD34+/CD45R0+/ГКГС II класу+/CD86+) з їх наступним диференціюванням у фібробласти печінки [103] і в гепатоцити внаслідок епітеліально-мезенхимального переходу.

Фіброз печінки асоціюється із зміною як кількісного, так і якісного складу ПКМ [57,74,77,104]. При виражених стадіях фіброзу печінка містить приблизно в 6 разів більше ПКМ у порівнянні з нормою, включно колагени I, III і IV типів, а також фібронектин, ундулін, еластин, ламінін, гіалуронан і протеоглікани [57,77,104,105,106,107]. Кумуляція ПКМ відбувається внаслідок підвищеного синтезу компонентів ПКМ з одного боку і зниження їх деградації з іншої сторони [2,57,105,107,108]. Накопиченню колагену і інших молекул ПКМ при фіброзі печінки також сприяє порушення внутрішньопечінкового балансу між фіброгенезом і фібролізом на користь першого. Зниження швидкості руйнування надлишку компонентів ПКМ і нестача молекул матриксних металопротеїназ (ММР) є в основному наслідком надлишку секреції і звільнення їх специфічних тканинних інгібіторів матриксних металопротеїназ (ТІМР) [108, 109,110].

Фіброгенез печінки при її хронічних захворюваннях є складним процесом, обумовленим комплексною взаємодією між різними типами печінкових клітин [2,57,62,66,67,74,77,78,89,90,105]. Основною ціллю більшості гепатотоксичних чинників, таких як віруси гепатиту, алкоголь, жовчні кислоти є гепатоцити. Пошкодження гепатоцитів веде до звільнення активних форм кисню (АФК) і медіаторів фіброгенезу. Пошкодження і апоптоз гепатоцитів стимулює фіброгенні клітини печінки різного походження і локалізації [74,77,81,89,90,91,93,94,95,96,98,106,111]. Лімфоцити активують ЗКП до синтезу і продукції колагену [105,112,113]. Активовані ЗКП секретують запальні хемокіни, які модулюють активацію

лімфоцитів [112,114]. Таким чином, при хронічному ушкодженні печінки відбувається двобічна стимуляція імунокомпетентними клітинами і активованими ЗКП одне одного [67,77,113]. Розвиток фіброзу впливає і на різні субпопуляції Т-лімфоцитів, наприклад, на Т-лімфоцити Th₂, відповідальні за активацію фіброгенезу [115,116]. Клітини Купфера, які є резидентними макрофагами, грають важливу роль в розвитку запалення печінки, що реалізується за допомогою АФК і цитокінів [117,118,119]. При хронічних холестатичних порушеннях (таких, як первинний біліарний цироз або первинний склерозуючий холангіт), епітеліальні клітини стимулюють акумуляцію порталними фібробластами колагену навколо пошкоджених жовчних протоків [101]. Нарешті, зміни у складі ПКМ можуть безпосередньо стимулювати фіброгенез. Тип IV колагену, фібриноген і урокіназа, активатор плазміногену стимулюють резидентні ЗКП до активації латентних цитокінів таких, як TGF- β_1 [120]. Фібрилярний колаген може стимулювати ЗКП за допомогою дискоїдних рецепторів DDR2 та інтегринів. Більш того, молекули ПКМ можуть виступати як джерело факторів росту і MMP [121].

Цитокіни грають важливу роль в регуляції запальної відповіді на пошкодження гепатоцитів і моделюють фіброгенез в печінці як *in vivo*, так і *in vitro* [77,78,116,122]. Моноцитарний хемотаксичний протеїн першого типу є стимулятором фіброгенезу, тоді як IL-10 і γ -інтерферон (IFN γ) спричиняють протилежний ефект [116,123,124]. Серед факторів росту TGF- β_1 є головним медіатором в регуляції фіброгенезу у людини [77,105,125,126,127,128,]. TGF- β_1 сприяє трансформації ЗКП в фіброгенні клітини, які синтезують компоненти ПКМ і блокують його деградацію. Різні чинники впливу на синтез TGF- β_1 або сигнальні шляхи, які реалізуються за допомогою TGF- β_1 , вагомо знижують фіброз при експериментальних моделях [125,126]. PDGF є найбільш потужним мітогеном ЗКП і, відповідно, призводить до надлишкової секреції компонентів ПКМ активованими ЗКП і розвитку фіброзу печінки [128,129,130].

Цитокіни з вазоактивними властивостями також регулюють фіброгенез в печінці. Такі вазоділятатори, як нітрит азоту, релаксин мають антифібротичну активність, в той час як вазоконстриктори (норадреналін, ангіотензин II), навпаки, проявляють фіброгенні властивості [131,132]. Ендотелін-1, потужний вазоконстріктор, стимулює фіброгенез [133]. Серед вазоактивних цитокінів ангіотензин II, вірогідно, відіграє основну роль у фіброгенезі печінки. Ангіотензин II є ефекторним пептидом ренін-ангіотензінової системи, головним регулятором артеріального тиску у людини. Ключові компоненти ренін-ангіотензінової системи експресуються локально при хронічному ураженні печінки, а активовані ЗКП *de novo* продукують ангіотензин II [134,135]. Ангіотензин II індукує розвиток запалення в печінці і стимулює фіброгенну активність активованих ЗКП різного походження і локалізації та секрецію прозапальних цитокінів і синтез колагену [136,137]. Ці дії в основному опосередкують генерацією АФК нефагоцитарними формами NADPH-оксидази. NADPH-оксидаза фіброгенних клітин генерує відносно високий рівень оксидантів у відповідь на цитокінову стимуляцію внутрішньоклітинних шляхів і грає ключову роль в розвитку запальної активності Купферовських клітин [138].

Адипокіни, цитокіни жирової тканини, також беруть участь у фіброгенезі печінки [86]. Лептин необхідний для активації ЗКП і розвитку фіброзу [139]. Адипонектин, навпаки, переважно пригнічує фіброгенез печінки як *in vivo*, так і *in vitro* [140,141]. Дія цих цитокінів важлива при розвитку фіброзу печінки у пацієнтів з ХВГ С, пов'язаного зі стеатозом [142].

Фіброгенез при ХВГ С вивчений недостатньо внаслідок того, що поки що не розроблена модель ХВГ в експерименті на гризунах [143]. Вірус гепатиту С порушує опосередковану HLA-II імунну відповідь і, відповідно, веде до розвитку оксидативного стресу та індукує прогресуюче накопичення запальних клітин. Це призводить до активації ЗКП і накопиченню колагену. Більш того, декілька білків ВГС безпосередньо стимулюють запалення і фіброгенну активність ЗКП [144].

При хронічних холестатичних порушеннях, таких як первинний біліарний цироз печінки, Т-лімфоцити і цитокіни опосередковують персистуюче ураження жовчних шляхів [90]. Біліарні клітини секретують фіброгенні медіатори, які активують сусідні порталні фібробласти і вони починають секретувати молекули ПКМ. Зрештою, приєднуються активовані перісинусоїдальні ЗКП, що призводить до розвитку внутрішньодолькового фіброзу. Патогенез фіброзу печінки при НАСГ також недостатньо вивчений. Ожиріння, цукровий діабет 2 типу і дісліпідемія є найбільш частими станами, асоційованими з фіброзом печінки [145]. Передбачається, що гіперглікемія і резистентність до інсуліну веде до підвищення в сироватці рівня вільних жирних кислот, внаслідок чого розвивається стеатоз печінки. З іншого боку, оксидативний стрес і прозапальні цитокіни індукують апоптоз гепатоцитів і ведуть до накопичення імунокомпетентних клітин і таким чином сприяють прогресуванню фіброзу.

Після того, як у 1990-х рр. клініко-лабораторними методами було показано, що навіть тяжкий фіброз печінки може бути зворотнім, почався пошук ефективних антифібротичних препаратів [146,147]. Були винайдені препарати, які здатні редукувати сполучну тканину в експериментальних моделях хронічного ураження печінки. Серед них найбільш перспективними визначені блокатори ренін-ангіотензинової системи і антиоксиданти, однак їх ефективність ще не перевірена на людях у клінічних випробуваннях з тривалим спостереження за хворими. Тому сьогодні поки ще вважається, що найбільш ефективна терапія печінкового фіброзу – це виключення причин фіброзу [146,147,148,149,150].

Цироз печінки був анатомічно описаний у 1761 р. Морган'ї, та у 1826 р., завдяки жовтувато-коричневому кольору печінки, був визначений Лаєнеком як «цироз». Лише у 1930 р. Ресле охарактеризував цироз як процес паренхіматозного переродження, регенерації і рубцювання печінки. На міжнародному Конгресі гастроентерологів у Лос-Анджелесі в 1994 р. [151] була підтверджена морфологічна класифікація цирозу печінки, яка була

раніше прийнята Всесвітньою асоціацією гепатологів (Акапулько, 1974) та ВООЗ (1978), згідно якої виділяють мікронодулярний цироз печінки (діаметр вузлів 1–3 мм), макронодулярний цироз печінки (діаметр вузлів більш за 3 мм), неповний септальний цироз печінки і змішаний цироз (вузли різні за розмірами) [152].

За останні 30 років, по мірі вивчення відмінностей тяжкого фіброзу від цирозу, змінились уявлення про сутність цирозу печінки. На теперішній час відомо 5 морфогенетичних критеріїв цирозу печінки: декомпенсована загибель гепатоцитів, дифузне розростання сполучної тканини, різний ступінь вузлової регенерації з формуванням псевдодольок, втрата і метапластична перебудова печінкових дольок, а також дезінтеграція портальної і артеріальної системи гемомікроциркуляції в печінці [153]. Стійкі зміни в печінці, які мікроскопічно проявляються феноменом капіляризації внутрішньодолькових синусоїдів, надмірним артеріо-капілярним ангиогенезом, відсутністю синусоїдального ремоделювання в регенераторних вузлах, а також атрофією печінкових дольок в результаті редукції портального кровотоку— основні відмінності цирозу від тяжкого фіброзу печінки і критичні критерії сформованого цирозу [154,155,156,157].

1.2. Патоморфологія і градація фіброзу і цирозу печінки

На сьогодні трепанобіопсія печінки залишається «золотим стандартом» у визначенні стадії фіброзу та в діагностиці цирозу печінки [158,159]. При гістологічному дослідженні печінки діагностується основні причини хвороби печінки, а також гістологічна активність вірусних гепатитів і стадія фіброзу. Для визначення ступеня і морфологічного типу фіброзу використовується специфічне гістохімічне забарвлення за методом Ван Гізон і трихром-Масон.

Сьогодні ступінь розвитку фіброзу печінки в гепатобіопсіях визначається напівкількісними системами за V. Desmet et al. (1995), R.G. Knodell et al. (1981), P.J. Scheuer (1991), K.G. Ishak (1994), K. P. Batts

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика систем напівкількісної оцінки фіброзу печінки

Бали	V. Desmet 1995	R.G.Knodell, 1981	P.J.Scheuer, 1991	K.G.Ishak, 1994	K.P.Batts, 1995	METAVIR, 1994
0	Фіброз відсутній	Фіброз відсутній	Фіброз відсутній	Фіброз відсутній	Фіброз відсутній	Фіброз відсутній
1	Перипортальний фіброз	Фіброзне розширення портальних трактів	Фіброзне розширення портальних трактів	Фіброзне розширення портальних трактів з / без коротких фіброзних септ	—	Фіброз портальних трактів без утворення септ
2	Порто-портальні септи > 1 септи	—	Перипортальні або порто-портальні септи, структура не порушена	Фіброз більшості портальних трактів з/без коротких фіброзних септ	Портальний фіброз	Фіброз портальних трактів з поодинокими порто-портальними септами
3	Портально-центрально-ні септи > 1 септи	Мостоподібний фіброз – порто-портальні / порто-центрально-ні септи	Фіброз з порушенням структури печінки без цирозу	Фіброз більшості портальних трактів з поодинокими мостоподібними порто-портальними септами	Перипортальний фіброз, септальний фіброз	Фіброз портальних трактів з численними порто-центрально-ними септами без цирозу
4	Цироз	Цироз	Вірогідний або безсумнівний цироз	Фіброз портальних трактів з мостоподібними порто-портальними і порто-центрально-ними септами	Цироз	Цироз
5	—	—	—	Численні мостоподібні септи з поодинокими вузлами (неповний цироз)	—	—
6	—	—	—	Цироз	—	—

(1995), METAVIR (1994) [160,161,162,163,164,165], в яких джерелом фіброзу вважаються активовані фібробласти, що мігрують з портальних трактів в пошкоджені дольки печінки і таким чином сприяють прогресії фіброзу [90] (табл. 1.1). В основі цих градацій полягає застаріла доктрина морфогенезу склерозу і цирозу органів, які раніше розглядались як процес, що виникає після некрозу клітин і тканин.

Всі наведені градації фіброзу печінки відображують прогресування фіброзу у вигляді послідовних стадій/ступенів, які відрізняються певними морфологічними ознаками. Суттєвими недоліками всіх наведених класифікацій фіброзу печінки є те, що вони базуються на застарілому уявленні про розвиток фіброзу печінки з портальних трактів і не враховують вираженість та поширення перисинусоїдального фіброзу і фіброзу навколо центролобулярних вен; а також те, що стадії/ступені фіброзу печінки не пов'язані з певними клініко-лабораторними ознаками дисфункції печінки, портальної гіпертензії і печінково-клітинної недостатності. Найбільш активно використовується у світі і є найбільш поширеною градація фіброзу печінки за METAVIR (1994).

Для оцінки ступеня фіброзу печінки були запропоновані шкали, в основі яких полягали рутинні лабораторні тести, що включають активність АлАТ, АсАТ, кількість тромбоцитів, протромбіновий час, гострофазні протеїни [166,167]. Рівень протеїнів сироватки крові безпосередньо залежить від процесів фіброгенезу і теж може використовуватися як сурогатний маркер фіброзу [168], включаючи n-фрагмент пропептида колагену III типа, гіалуронову кислоту, тканинні інгібітори металопротеїнази 1-го типу (TIMP-1) та інші. Зазвичай ці шкали дозволяють відокремити пацієнтів з цирозом від хворих з відсутністю або слабкою вираженістю фіброзу, але неефективні для диференціювання пацієнтів у середині шкал. Також специфічні маркери фіброзу можуть відображати фіброгенез в інших органах (наприклад, фіброз підшлункової залози у хворих, які страждають на алкоголізм).

В останні роки накопичується досвід визначення ступіню фіброзу печінки розробленою у Франції системою ФіброТест (визначення в сироватці крові альфа 2-макроглобуліну, гаптоглобіну, аполіпопротеїну, гама-глутамилтранспептидази, загального білірубіну, АЛАТ) [169] та еластометрією або фіброскануванням печінки на апараті "Фіброскан" з використанням спеціального XL датчика [170]. На сьогодні отримані цими методиками показники поки ще співставляються зі ступенем розвитку фіброзу печінки, визначеному в гепатобіопсіях хворих за градацією METAVIR (1994).

1.3. Клініко-морфологічні критерії прогресування фіброзу і цирозу печінки

Сьогодні визначено, що хронічні вірусні гепатити В і С, алкогольний гепатит та НАСГ відіграють головну роль у прогресуванні фіброзу печінки в цироз печінки [6,7,8,9,10,11,12,13]. У хворих на ХВГ на клінічному рівні було ідентифіковано швидкопрогресуючий і повільний фіброз печінки, та вивчений перебіг фіброзу печінки від його ранніх проявів до печінкового цирозу. Встановлено, що у більшості пацієнтів прогресування фіброзу в цироз печінки спостерігається після 10-15 років перебігу захворювання [105]. У хворих на ХВГ частково розкриті генетичні чинники і фактори довкілля, які впливають на прогресування фіброзу [23,25,105].

Поширена сьогодні класифікація цирозу печінки, прийнята у 1994 році на міжнародному Конгресі гастроентерологів у Лос-Анджелесі [151], включає не тільки морфологічний і етіологічний розподіл цирозів, але і ступінь активності цирозу печінки, який рекомендовано визначати за рівнем в крові АЛАТ та інших ферментів, а також за морфологічними змінами в печінці.

З урахуванням отриманих останніми роками даних, цироз є не тільки вищою F4 стадією фіброзу печінки, скільки якісно новим етапом прогресії

хронічного захворювання печінки, на якому тяжкі морфологічні зміни в органі обумовлюють розвиток характерних ускладнень. Основні клінічні ускладнення цирозу включають прояви внутрішньопечінкової портальної гіпертензії: асцит, печінкову енцефалопатію, кровотечу з розширених вен стравоходу. Всіма гепатологами підтримується клініко-морфологічна доктрина про те, що зниження числа гепатоцитів при цирозі печінки призводить до жовтяниці, набряків, гіпокоагуляції крові, анемії і порушень метаболізму; фіброз і перебудова судинної системи – до портальної гіпертензії із спленомегалією, асцитом, варикозним розширенням вен стравоходу, кардії і гемороїдальних вен. У пацієнтів з цирозом основні прояви можуть бути відстрочені на декілька років (компенсований цироз).

Для оцінки ступеня тяжкості цирозу використовують бальну шкалу печінкових функцій за Чайльд–П'ю [172], яка включає такі параметри як наявність або відсутність асциту, енцефалопатії, рівень білірубіну і альбуміну у сироватці крові, протромбіновий час, а також ступінь харчування. Згідно суми балів за шкалою Чайльд–П'ю цироз печінки поділено на 3 класи: сума в 5-6 балів відповідає класу А (компенсований цироз), 7-8 балів – відповідно клас В (субкомпенсований цироз) і 10-15 балів визнані як клас С (декомпенсований цироз).

Дані про морфологічні зміни в печінці при прогресуванні цирозу майже відсутні. П'ятий Панамериканський конгрес гастроентерологів (Гавана, 1956р.) рекомендував оцінювати прогресію цирозу печінки за даними повторних пункцій біопсій з рецидивами «мостоподібних» або «ступінчастих» некрозів печінки. В національному керівництві Росії з патологічної анатомії 2011 року [173] вказано, що, в залежності від темпу прогресування хвороби і вираженості запальної реакції, виділяють неактивні і активні цирози (з мінімальною, помірною і вираженою активністю). Однак, морфологічні прояви прогресування цирозу печінки не приведені.

Декомпенсація цирозу виникає внаслідок зростаючого пошкодження гепатоцитів і прогресуючої портальної гіпертензії, при цьому виникають

найбільш тяжкі ускладнення, які погрожують життю хворого: печінкова кома і енцефалопатія, печінково-ниркова недостатність, шлунково-кишкова кровотеча з варикозно розширених вен стравоходу і кардії, тромбоз портальної вени, асцит і перитоніт [14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24]. При розвитку декомпенсованого цирозу спостерігається висока летальність і єдиним ефективним методом терапії є трансплантація печінки [174,175].

1.4. Особливості лабораторної діагностики фіброзу, цирозу і хронічного вірусного гепатиту С

Важливим фактором зростання кількості хворих на цироз печінки є пізня клінічна діагностика фіброзу печінки, який передуює цирозу і розпізнається на ранній стадії тільки при патоморфологічному дослідженні біопсій печінки. Початок фіброзу печінки у хворих на ХВГ С зазвичай непомітний: більшість пов'язаних з ним симптомів виявляється на прикінцевих стадіях тяжкого фіброзу або цирозу [17,19,20,21,22,23,24,25]. Визначення у сироватці крові хворих на хронічні захворювання печінки підвищеного рівня маркерів фіброгенезу (фіброгенних цитокінів; колагенів I, III, IV типів; металопротеїназ і їх тканинних інгібіторів, гіалуронової кислоти, деяких компонентів ПКМ) має обмежену діагностичну цінність і характеризує розвиток фіброзу у будь-якому органі: в печінці, легенях, підшлунковій залозі, тощо [169].

Вірусний гепатит С діагностується на підставі виявлення в крові пацієнта HCV-РНК, антигенів вірусу і/або антитіл до нього [8,177] стандартними високо чутливими методами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і імуноферментного аналізу (ІФА) [8,176,178], які проводяться в лабораторних умовах і вимагають певного часу для отримання результату. Сьогодні в лабораторній діагностиці популярний імунохроматографічний аналіз (ІХА), заснований на взаємодії антигенів (або антитіл), фіксованих на хроматографічній мембрані, з антитілами (або антигенами) в сечі, цілісній

крові, сироватці або плазмі крові, слині, тощо [178,179]. ІХА у вигляді експрес-тестів широко застосовується в різних напрямках медицини з метою виявлення, моніторингу і попередження передачі ВГС [178,179]. В той же час, ІХА експрес-діагностика інфікування вірусом гепатиту С малого за об'ємом фрагменту тканини трепанобіоптату печінки хворих і крові у померлих хворих поки не розроблена.

Таким чином, аналіз літератури показав, що 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. Широко розповсюджені серед гепатологів системи напівкількісної оцінки фіброзу печінки (Knodell 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, вони значно обмежують об'єктивну патоморфологічну оцінку ступеня реального фіброзу печінки у хворих на ХВГ, тому що не враховують інтенсивність фіброзу центролобулярних вен і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів, а також можливість розвитку вогнищового внутрішньодолькового фіброзу.

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.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Мікроскопічні, гістохімічні і імуногістохімічні 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 чотири групи спостережень за різним типом фіброзу печінки, а 10 пацієнтів без вірусного гепатиту склали групу умовного контролю. В першу групу спостережень включені 30 хворих на ХВГ С з портально-септальним фіброзом печінки, другу групу спостережень склали 30 хворих на ХВГ С з центролобулярно-перисинусоїдальним фіброзом печінки, в третю групу спостережень увійшли 30 хворих на ХВГ С зі змішаним фіброзом печінки, четверту групу спостережень склали 30 хворих на ХВГ С з цирозом печінки. Групу умовного контролю склали 10 осіб (5 жінок і 5 чоловіків) без клініко-лабораторних ознак вірусного ураження печінки, у яких при ультразвуковому дослідженні і при мікроскопії трепанобіопсій була діагностована гемангіома печінки (використовувався стовпчик тканини печінки на віддаленні від гемангіоми). У групи спостережень відібрані тільки пацієнти, яким було проведене комплексне клініко-лабораторне обстеження і патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів печінки.

Швидкий імунохроматографічний аналіз проводився під час біопсії 20 хворим на ХВГ С із загальної кількості обстежених пацієнтів для виявлення наявності антитіл до вірусу гепатита С в крові і в тканині трепанобіоптатів печінки, а також 12 померлим хворим на ХВГ С для

визначення наявності антитіл до вірусу гепатиту С в крові в різний час після біологічної смерті.

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

2.2. Методи та методики досліджень

Для діагностики хронічного вірусного гепатиту С, відповідно до сучасного протоколу, всім хворим проведено клінічне та лабораторне обстеження в гепатологічному центрі Запорізької обласної інфекційної клінічної лікарні. Етіологія вірусного гепатиту і фаза інфекційного процесу визначалися за допомогою імуноферментного методу і методу ампліфікації з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Хронічний вірусний гепатит С верифікували за наявності в сироватці крові HCV IgG, анти-HCV IgM, і РНК HCV. Фаза реплікації вірусу у хворих на ХВГ С визначалася за наявності в сироватці крові РНК HCV і анти-HCV IgM. Виразність синдрому цитолізу визначали на підставі виявлення в крові рівня аланін- і аспартат-амінотрансферази (АлАТ і АсАТ).

Пункційні трепанобіопсії печінки під контролем УЗД виконувалися лікарем-хірургом в 1-му хірургічному відділенні 3-ої міської клінічної лікарні Запоріжжя, інтраопераційні інцизійні біопсії печінки виконувалися хірургами Запорізької обласної клінічної лікарні. Пункційна черезшкірна трепанобіопсія печінки проводилася голками Uni-Cut або BioCut 14-16G під контролем апарату УЗД Conbizon-320-5 Ultima-Pro-30 із застосуванням секторального і конвексного датчиків з ультразвуковою частотою випромінювання першого датчика 3-4 МГц і 3,5 МГц – другого датчика. В результаті пункції отримували 3-5 стовпчиків тканини печінки довжиною

10мм і товщиною 0,6-0,8мм, під час операції отримували шматочок краю печінки 10х8х5мм, що дозволяло провести повне і інформативне морфологічне дослідження біоптатів.

Для патоморфологічного і імуногістохімічного дослідження стовпчики трепанобіоптатів і шматочки інтраопераційних інцизійних біопсій печінки фіксували в забуференому 10% формаліні і заливали в парафін. На прецизійному ротаційному мікротомі HM 3600 (фірми «MICROM Laborgerate GmbH» – Німеччина) виготовляли серійні зрізи завтовшки 4 мкм, які розміщали на звичайні предметні скельця (для стандартного патогістологічного фарбування) або на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» фірми «DAKO» – Данія (для імуногістохімічних досліджень).

Для виявлення основних патогістологічних змін парафінові зрізи трепанобіоптатів печінки фарбували гематоксиліном та еозином, для оцінки вираженості фіброзу печінки застосовувались гістохімічні методики забарвлення за Ван-Гізон і Масон-трикологор.

В мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, визначали індекс гістологічної активності хронічного вірусного гепатиту за R.G. Knodell зі співавт. (1981), з урахуванням якого розрізняли гепатит з мінімальною активністю (ІГА 1-3 бали), із слабкою активністю (ІГА 4-8 балів), з помірною активністю (ІГА 9-12 балів) і з вираженою активністю (ІГА 13-18 балів).

В мікропрепаратах, забарвлених за Ван-Гізон і Масон-трикологор, визначали ступінь фіброзу печінки в градації METAVIR (1995) і V. Desmet зі співавт. (1995) У відповідності до цих градацій визначали різний ступінь портально-септального фіброзу печінки (F1 – слабкий фіброз портальних трактів, F2 – портальний фіброз з рідкісними септами в дольках (помірний фіброз), F3 – портальний фіброз з множинними септами в дольках без наявності псевдодольок (тяжкий фіброз) і F4 – цироз печінки).

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 централобулярних венах і перисинусоїдальних просторах; 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 хворих на ХВГ С визначали слабкий, помірний і тяжкий фіброз без псевдодольок, а також цироз печінки.

Імуногістохімічні дослідження з використанням моноклональних антитіл виконувались в парафінових зрізах тканини печінки згідно стандартизованих протоколів, детально викладених у відповідних керівництвах з імуногістохімії [213,214]. Після депарафінізації і регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів (шляхом нагрівання на водяній бані в цитратному (pH=6,0) або в Трис-ЕДТА буфері з pH=9,0) та подавляли активність ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню. Після нанесення блокуючої сироватки і інкубації з первинними антитілами проводилась візуалізація відповідних антигенів системами візуалізації DAKO EnVision+ System з діамінобензидином або LSAB2 System (фірми «DAKO», Данія).

Імуногістохімічне визначення експресії про- та антиапоптотичних білків проводилось з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu p53 Protein, Clone DO-7* проти ядерного антигену p53 (фірми «DAKO», Данія) та моноклональних антитіл *Mo a-Hu Bcl-X_L, Clone 2H12* проти білка Bcl-X_L (фірми «Zymed», США).

Рівень апоптозу в клітинах печінки імуногістохімічно визначався з використанням моноклональних антитіл до каспази-3 *Mo a-Hu Caspase Ab-3, Clone 3CSP03* (фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Проліферативна активність клітин печінки визначалась з використанням моноклональних антитіл проти ядерних антигенів Ki-67 *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1* («DAKO», Данія) та проти PCNA *Mo Anti-Proliferative Cell Nuclear Ag (PCNA), Clone PC10* («DAKO Cytomation»,

Данія).

Субпопуляції CD20 В-лімфоцитів, CD5 лімфоцитів, CD8 Т-лімфоцитів і CD45R0 Т-лімфоцитів в імуноклітинних інфільтратах дольок та портальних трактів печінки 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).

Клітини Купфера та макрофаги портально-перипортальних зон печінки імуногістохімічно визначались за допомогою моноклональних антитіл *Mo a-Hu CD68, Clone PG-M1* («DAKO» – Данія) проти поверхневого рецептора макрофагів.

Активовані зірчасті перисинусоїдальні клітини Іто та активовані фібробласті портальних трактів і фіброзних септ в печінці визначались при імуногістохімічних дослідженнях з використанням моноклональних антитіл до α -ізоформи гладком'язового актину (α -SMA) *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4* виробництва фірми «DAKO» (Данія).

Імуногістохімічне дослідження накопичення колагену в печінці проводилося за допомогою моноклональних антитіл до колагену 1-го і 4-го типу *Mo a-Hu Collagen IV, Clone CIV 22* та *Mo a-Hu Collagen I, MSX HU-100UG* («DAKO» – Данія).

Рівень експресії матриксної металопротеїнази MMP-9 клітинами печінки визначався при застосуванні поліклональних антитіл *Rb a-Hu MMP-9 (92kDa Collagenase IV)* (фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США), а рівень експресії її тканинного інгібітора TIMP-1 визначався за допомогою моноклональних антитіл *Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1* (фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Комплексне патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів та інтраопераційних біопсій печінки із застосуванням гістологічних, гістохімічних і імуногістохімічних методик проводилось при наявності в біоптаті не менш ніж 18-20 дольок і 10-12 портальних трактів; діагностично

достатня кількість матеріалу печінки дозволила встановити початкові прояви, локалізацію, ступінь фіброзу та морфологічні ознаки його вірогідного прогресування.

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), визначали площі, зайняті активованими α -SMA+ клітинами в портально-перипортальних зонах печінки у 3 підгрупах хворих з ознаками слабого, помірного і тяжкого фіброзу печінки. Для морфометричних вимірювань використовувалося 5 портальних трактів в одному біоптаті 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 ступеню 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 .

Імунохроматографічні дослідження застосовували для визначення можливості екстреного виявлення наявності антитіл до вірусу гепатиту С в мінімальній кількості крові трепанобіоптату печінки і паралельно – в краплі крові хворих на ХВГ С, а також для швидкого визначення наявності антитіл до вірусу гепатиту С в крові померлих хворих в інтервалі від 4-х годин до 2 діб після біологічної смерті. Імунохроматографічний експрес-аналіз проводився з використанням зареєстрованих в Україні тест-касет «CITO-TEST HCV» виробництва «Acon Biotech Co.» (Китай) і «AmeriTec Inc» (США).

Імунохроматографічне дослідження трепанобіоптатів печінки і

цілісної крові проведене у 20 пацієнтів 25-57 років, що знаходились на диспансерному обліку в гепатоцентрі Запорізької обласної клінічної інфекційної лікарні з верифікованим діагнозом ХВГ С. Напередодні аналізу тест-касети «CITO-TEST HCV» заздалегідь адаптували до кімнатної температури і розпаковували безпосередньо перед початком імунохроматографічного дослідження. Для визначення наявності в крові хворих антитіл до вірусу гепатиту С перед виконанням трепанобіопсії печінки проводили забір цілісної крові з пальця, краплю крові поміщали в лунку (S) тест-касети «CITO-TEST HCV» і через 10 хвилин оцінювали результат імунохроматографічного тестування крові. Далі лікарем-хірургом проводилася черезшкірна трепанобіопсія печінки під контролем апарату УЗД, в результаті якої отримували 3-5 стовпчиків тканини печінки. Один стовпчик клали в лунку (S) тест-касети «CITO-TEST HCV», додавали 1 краплю буфера (біля 40мкл) і через 10 хвилин оцінювали результат імунохроматографічного тестування біоптата тканини печінки. Поява двох чітких ліній червоного і/або рожевого кольору в зоні контролю (C) і в зоні тесту (T) тест-касети вказувало на те, що тест позитивний і в досліджуваному зразку тканини печінки виявлені антитіла до вірусного гепатиту С. Поява однієї червоної або рожевої лінії в зоні контролю (C), за відсутності червоної або рожевої лінії в зоні тесту (T), свідчило про негативний результат, тобто про те, що антитіла до вірусу гепатиту С не були виявлені в досліджуваному зразку тканини печінки. Якщо визначалася повна відсутність двох червоних або рожевих ліній в зонах контролю (C) і тесту (T), або наявність тільки однієї червоної або рожевої лінії в зоні тесту (T) – такий результат тесту вважали недійсним.

Чутливість інтрабіопсійного експрес-методу виявлення антитіл до вірусу гепатиту С в тканині трепанобіоптатів печінки визначали за формулою:

дійсно позитивні результати ІХА

$$\text{Чутливість} = \frac{\text{дійсно позитивні рез-ти ІХА}}{\text{дійсно позитивні рез-ти ІХА} + \text{хибнонегативні рез-ти ІХА}} \times 100\%$$

Визначення наявності в крові антитіл до вірусу гепатиту С проведено у 12 померлих хворих на цироз або тяжкий фіброз F3 печінки. Для посмертного виявлення наявності в крові антитіл проти ВГС використовували зареєстровані в Україні тест-касети «CITO-TEST HCV» фірми «AmeriTec Inc» (США). До початку розтину померлого, після дезінфекції шкіри спиртом, стерильною голкою із стерильним шприцем проводилась пункція правого шлуночку серця, з якого в шприц набиралось 5 мл крові. Кров поміщалась в стерильну пробірку без коагулянту, закривалась стерильною пробкою та відстоювалась при кімнатній температурі 30 хвилин до появи над шаром крові шару сироватки. Далі стерильною піпеткою відбиралось 4 краплі сироватки, які поміщали в лунку (S) тест-касети «CITO-TEST HCV» та через 10 хвилин проводили оцінку результату імунохроматографічного тестування крові на наявність антитіл до вірусів гепатиту С. При наявності в досліджуваній крові антитіл до вірусів гепатиту С у віконці тест-касети з'являлась контрольна (С) і тестова (Т) імунохроматографічна смуга (позитивний результат), а за відсутності в досліджуваній крові антитіл у віконці тест-касети з'являлась тільки контрольна (С) імунохроматографічна смуга (негативний результат). Таким чином, за 40 хвилин до початку розтину померлого хворого отримувалась об'єктивна інформація про інфікування трупа вірусом гепатиту С.

РОЗДІЛ 3

ПАТОГІСТОЛОГІЧНА, ГІСТОХІМІЧНА І ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНИХ ЗМІН В ПЕЧІНЦІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

Патоморфологічне, гістохімічне, імуногістохімічне та комп'ютерноморфометричне дослідження пункційних та інтраопераційних біоптатів печінки 90 хворих на хронічний вірусний гепатит С (ХВГ С) дозволило визначити патогістологічні і імуногістохімічні зміни в печінці при ХВГ С та особливості морфогенезу фіброзу печінки при цій хворобі.

3.1. Патогістологічні і імуногістохімічні зміни в печінці у хворих на хронічний вірусний гепатит С

Встановлено, що морфологічні зміни в печінці у хворих на ХВГ С відрізняються поєднанням вірус-обумовленого пошкодження і знищення гепатоцитів, активації імунної системи і імуноклітинної деструкції печінки та безсимптомною поступовою прогресією фіброзу печінки.

При мікроскопії гепатобіоптатів виділені неспецифічні гістологічні зміни в печінці, патогномонічні для ХВГ С. Інфікування гепатоцитів вірусами і їх внутрішньоклітинна реплікація визиває певні патогістологічні зміни ядер та цитоплазми, а також індукує апоптоз і селективний некроз гепатоцитів. Морфологічними проявами вірус-обумовленого пошкодження гепатоцитів є ядерний поліморфізм з наявністю «пісочних», пікнотичних і вакуолізованих ядер (Рис. 3.1); дрібно-крупновакуольна жирова дистрофія гепатоцитів (Рис. 3.1); інколи – внутрішньоклітинні холестази в гепатоцитах (Рис. 3.2); наявність в дольках поодиноких гепатоцитів в стані апоптозу (тілець Каунсілмена) і в стані каріоцитолізу (Рис. 3.3 і 3.4).

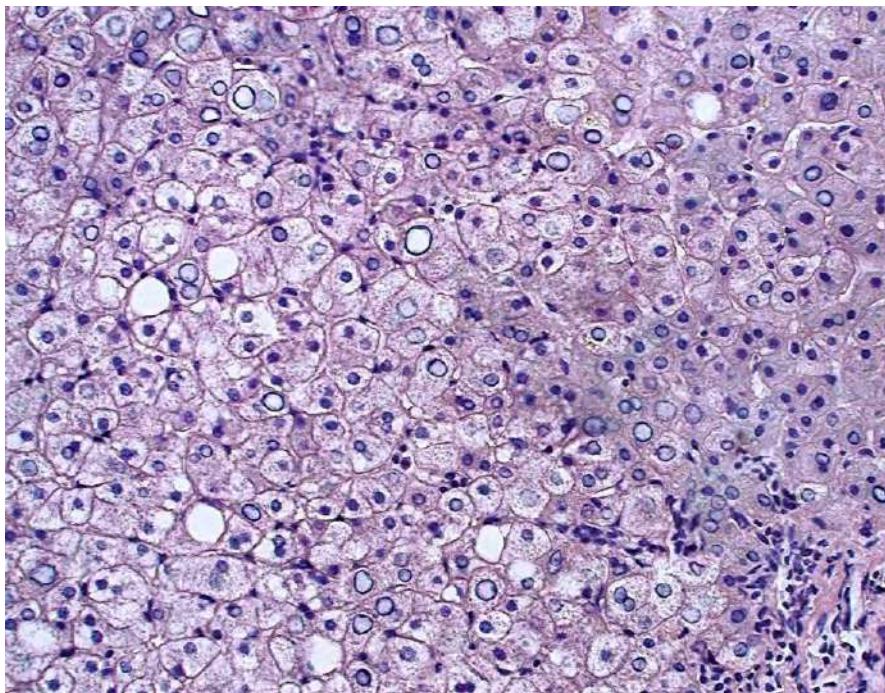


Рис. 3.1. Ядерний поліморфізм з наявністю «пісочних» і вакуолізованих ядер та жирова дистрофія гепатоцитів у трепанобіоптаті печінки при ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

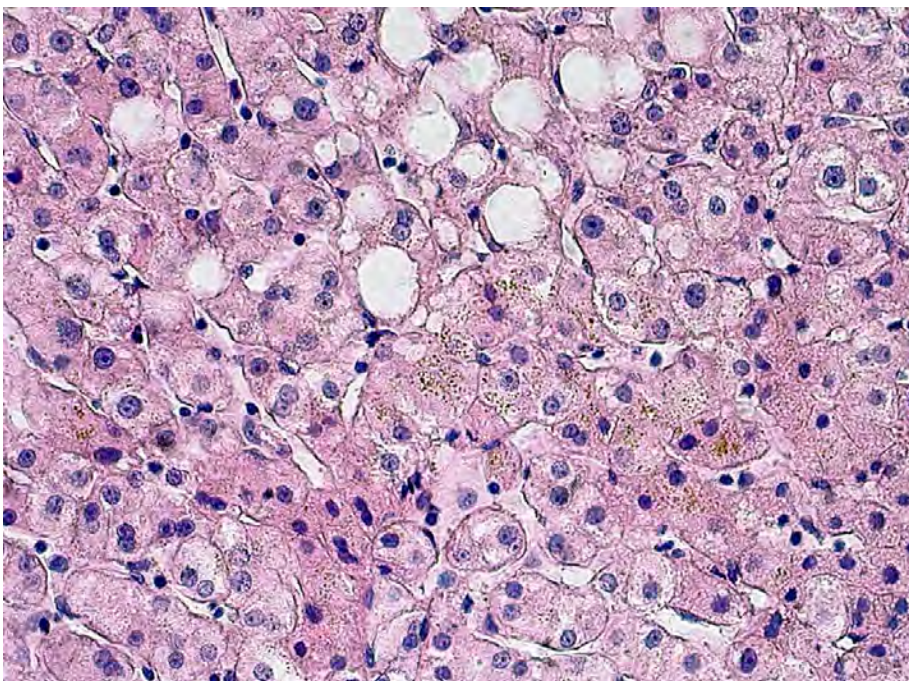


Рис. 3.2. Внутрішньоклітинні холестази малої інтенсивності і жирова дистрофія гепатоцитів при ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 600.

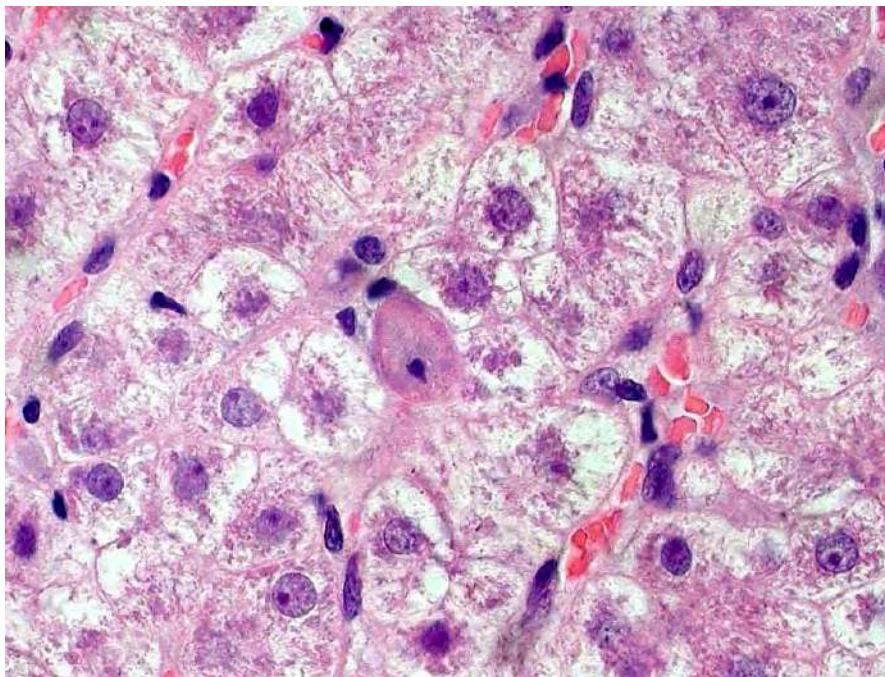


Рис. 3.3. Апоптоз поодинокого гепатоциту (рання ефекторна стадія) при ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 36. x 1000.

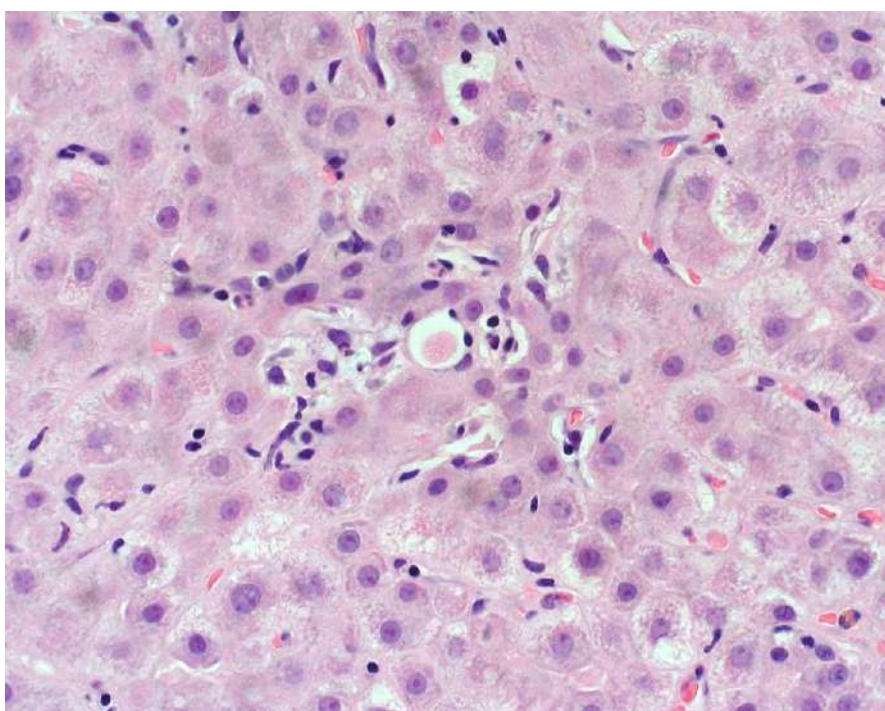


Рис. 3.4. Каріоцитолісис поодинокого гепатоциту при ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 36. x 600.

Результати проведених досліджень довели, що морфологічними проявами активації імунної відповіді, яка визначається практично у всіх хворих на ХВГ С, є наявність лімфоцитарної інфільтрації різної виразності в портальних трактах і у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах. За нашими даними сегментарна перисинусоїдальна лімфоцитарна інфільтрація різного ступеня являє собою різної довжини ланцюжки з лімфоцитів, серед яких спостерігаються CD20+ В-лімфоцити, CD5+ і CD8+ Т-лімфоцити. В клітинних інфільтратах портальних трактів визначаються CD20+ В-лімфоцити, CD5+ лімфоцити, CD45R0+ Т-лімфоцити і CD8+ Т-лімфоцити. Ці клітини або дифузно заповнюють і потовщують портальний тракт (Рис. 3.5, 3.6), або формують в портальному тракті фолікулоподібні структури (Рис. 3.7А). В центрі фолікулоподібних структур розміщуються CD20+ В-лімфоцити, на периферії - Т-лімфоцити (Рис. 3.7Б).

Застосування імуногістохімічних методик показало, що виразність притаманної для ХВГ С імуноцитарної інфільтрації портальних трактів і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів відповідає поняттю «запальна» інфільтрація печінки, яка враховується при обчисленні індексу гістологічної активності (ІГА) хронічного гепатиту за R.G. Knodell зі співавт. (1981). У обстежених нами хворих ХВГ 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 індексі гістологічної активності ХВГ С в печінці відмічається слабка лімфоцитарна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів (Рис. 3.8), при помірному ІГА реєструється помірна імуноклітинна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів та наявність імуноклітинних «ступінчастих некрозів» (Рис. 3.9), при високому ІГА ХВГ С в печінці має місце значна імуноцитарна інфільтрація трактів і перисинусоїдальних просторів, велика кількість «ступінчастих некрозів» та поодинокі імуноклітинні «мостоподібні некрози» (Рис. 3.10).

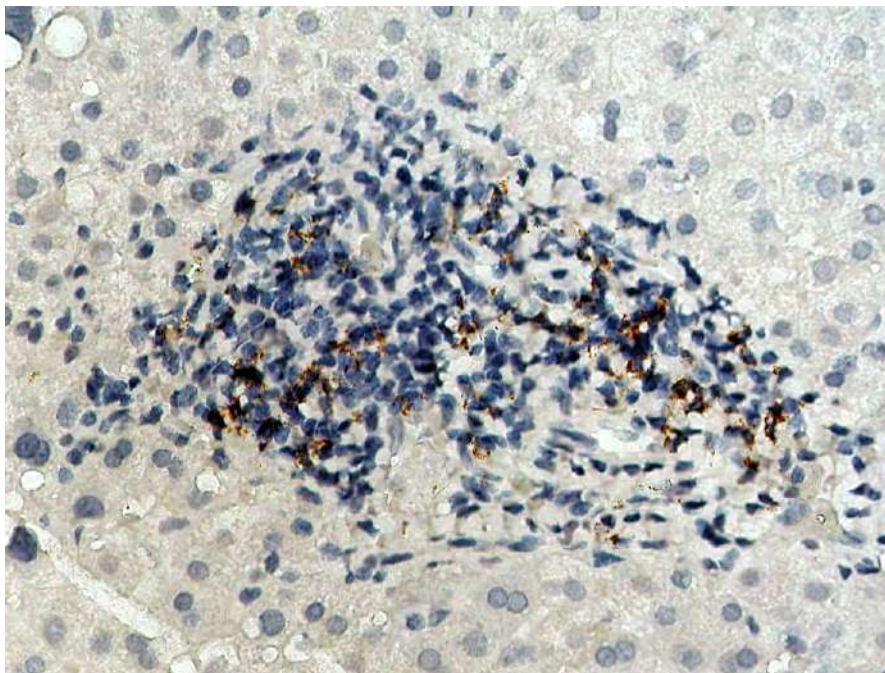


Рис. 3.5. CD5+ Т-лімфоцити в дифузному імуноклітинному інфільтраті портального тракту. Anti-CD5, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

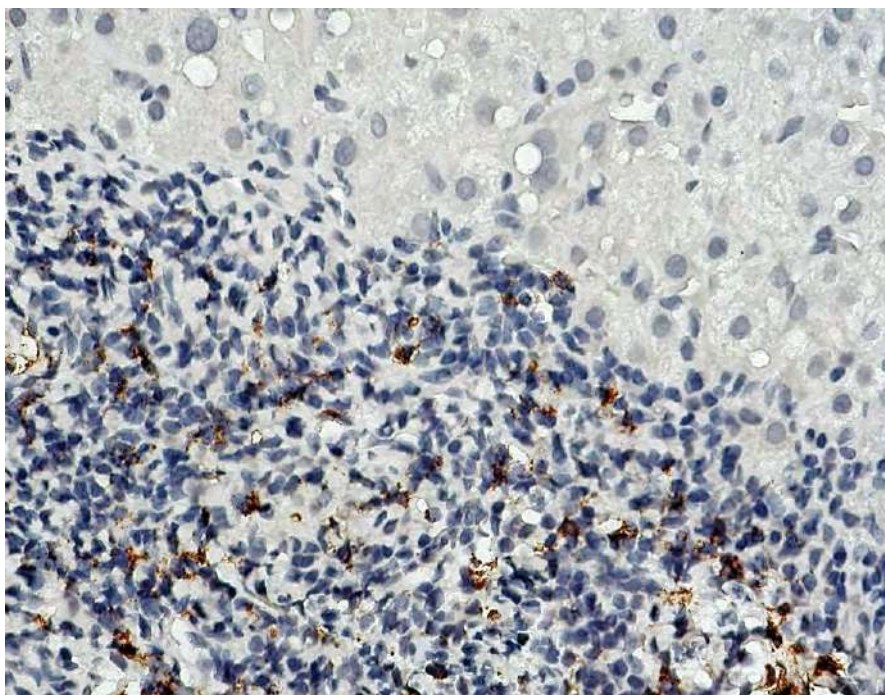


Рис. 3.6. CD45R0+ Т-лімфоцити в дифузному імуноклітинному інфільтраті портального тракту. Anti-CD45R0, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

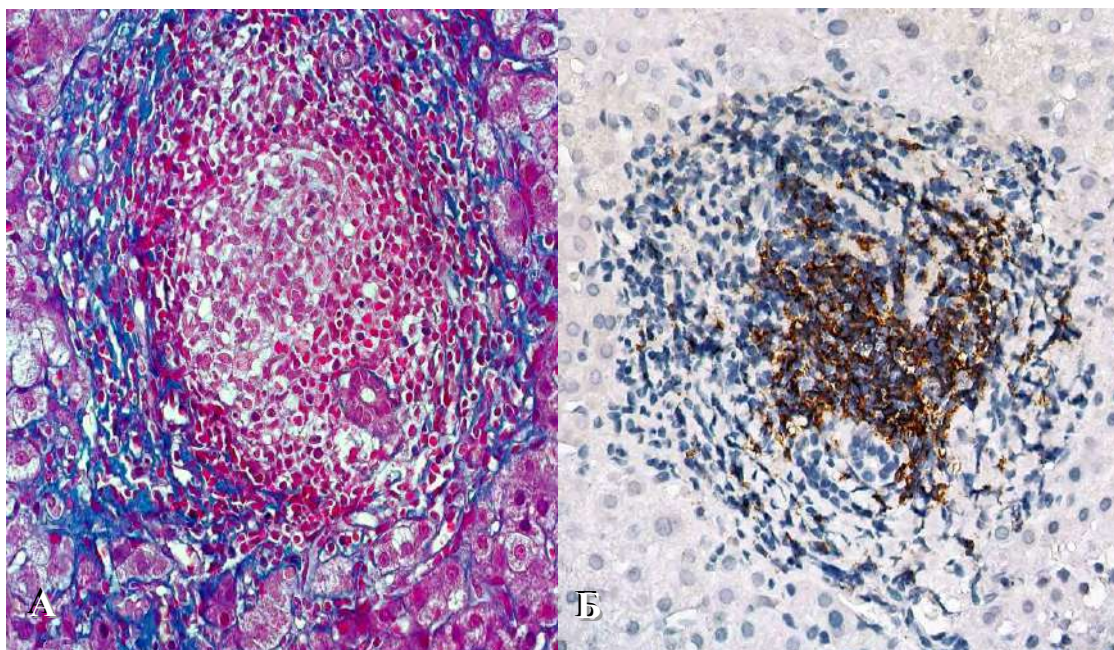


Рис. 3.7. Фолікулоподібний імуноклітинний інфільтрат портального тракту: А – трихромний метод Масона; Б – CD20+ В-лімфоцити в центрі інфільтрата. Anti-CD20, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

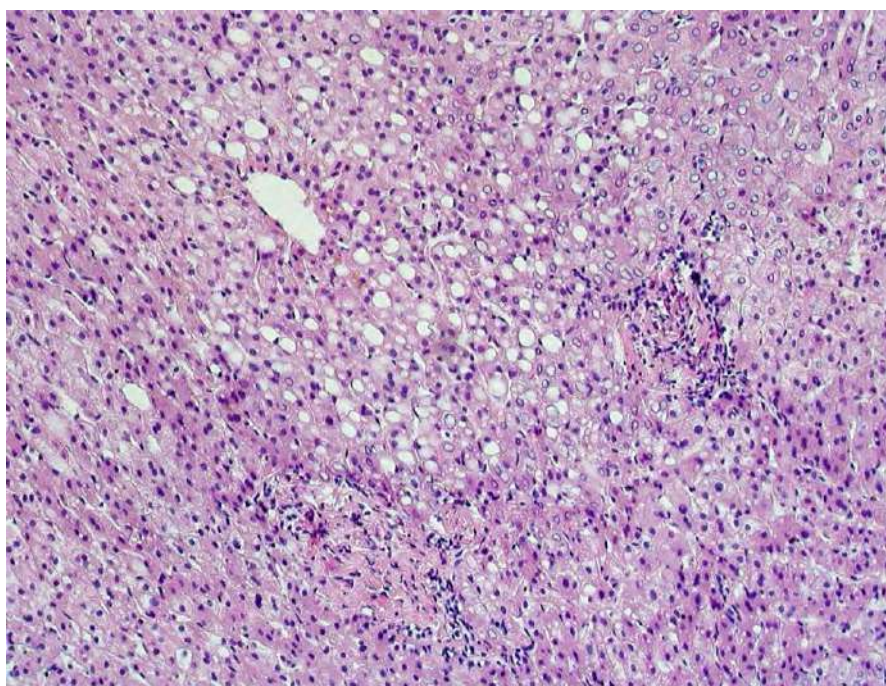


Рис. 3.8. Слабка імуноклітинна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів, «пісочні» ядра і жирова дистрофія гепатоцитів при ХВГ С з низьким індексом гістологічної активності. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. x 100.

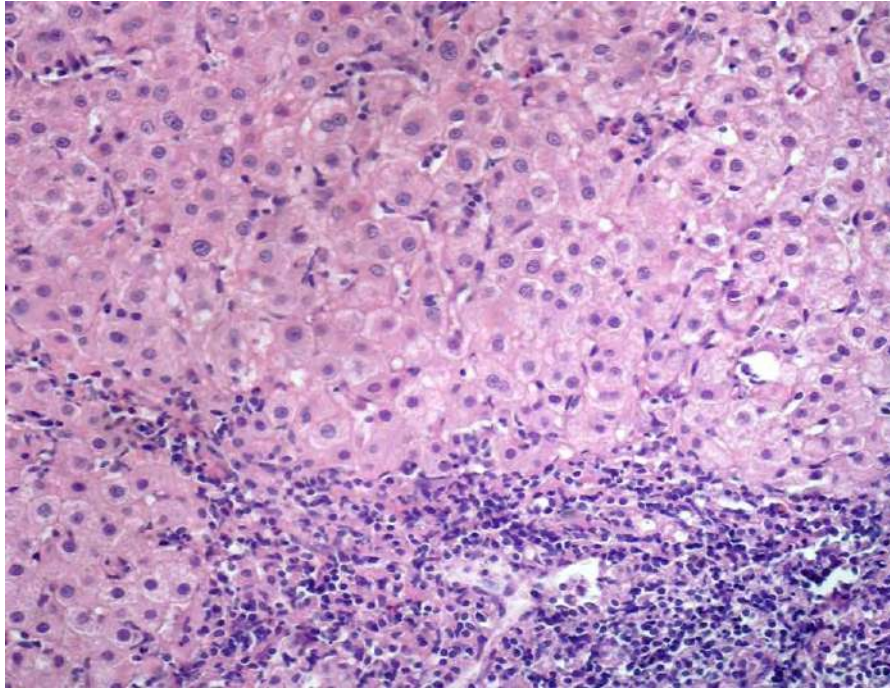


Рис. 3.9. Помірна дифузна імуноклітинна інфільтрація портального тракту зі «ступінчастими некрозами» і лімфоцитарна інфільтрація перисинусоїдальних просторів при помірній гістологічній активності ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

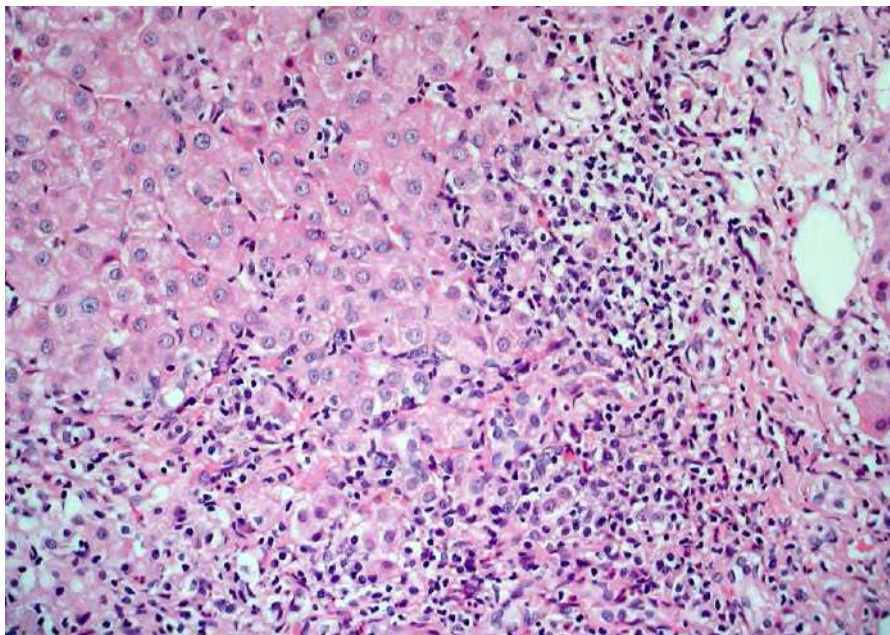


Рис. 3.10. ХВГ С при високій гістологічній активності. Наявність «ступінчастих некрозів» і осередків імуноклітинного кілінгу, а також «мостоподібного некрозу» між портальними трактами (внизу). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

3.2. Мікроскопічні і імуногістохімічні прояви імуноклітинної деструкції печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С

Морфологічними проявами імуноклітинної деструкції печінки при ХВГ С є наявність в дольках різної кількості вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів; наявність в печінці перипортальних імуноклітинних інфільтратів різної довжини і глибини (так званих «ступінчастих некрозів») і порто-портальних імуноклітинних інфільтратів («мостоподібних некрозів»).

Вогнище імуноклітинного кілінгу в печінці являє собою скупчення імунних клітин навколо 1-2 гепатоцитів (Рис. 3.11). У вогнищах імуноклітинного кілінгу в дольках печінки переважають CD8⁺ Т-лімфоцити-кілери (Рис. 3.12), присутні поодинокі CD68⁺макрофаги (Рис. 3.13) і активовані α -SMA⁺ клітини Іто, а іноді також і великі гранульовані NK-клітини (ріт-клітини), що містять в цитоплазмі щільні гранули і порожні міхурці з перфорином і гранзимом В (Рис. 3.11).

Імуногістохімічний і гістологічний аналіз довів, що у вогнищах імуноклітинного кілінгу дійсно відбувається імунне знищення інфікованих гепатоцитів, які гинуть частіше шляхом апоптозу, рідше – шляхом каріоцитолізу (некрозу). Патогенно індукований апоптоз в фазі його молекулярної ініціації імуногістохімічно ідентифікується в гепатоцитах, які за вираженістю мікроскопічних змін поки ще структурно не відрізняються від популяції аналогічних спеціалізованих клітин органу. При ініціації апоптозу виявляється експресія p53 в ядрах структурно мало змінених гепатоцитів (Рис. 3.14А), або експресія Bcl-X_L в цитоплазмі гепатоцитів (Рис. 3.14Б). В ефекторній фазі апоптозу у вогнищах кілінгу, в приречених на загибель зморщених гепатоцитах виявляється високий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 (Рис. 3.15), а при гістологічному дослідженні спостерігаються зменшені апоптотичні гепатоцити з еозинофільною цитоплазмою і пікнотичним ядром (Рис. 3.16А). У вогнищах імуноклітинного кілінгу, при мікроскопії, також визначаються гепатоцити в стані каріоцитолізу (Рис. 3.16Б).

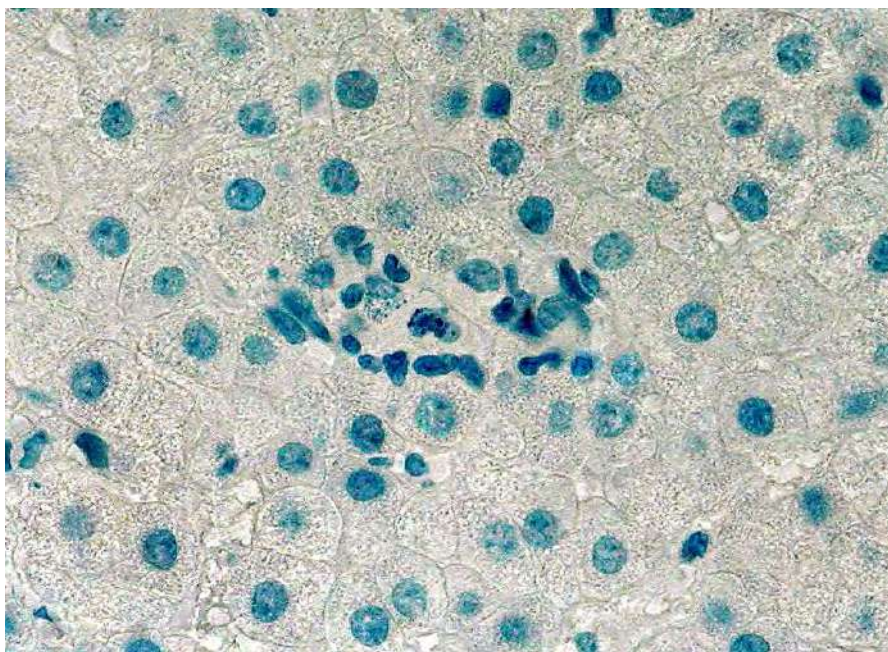


Рис. 3.11. Вогнище імуноклітинного кілінгу (в центрі) представлене скупченням лімфоцитів навколо гепатоциту, з наявністю макрофага і великої гранульованої NK-клітини. Забарвлення толуїдиновим синім. 36. x 1000.

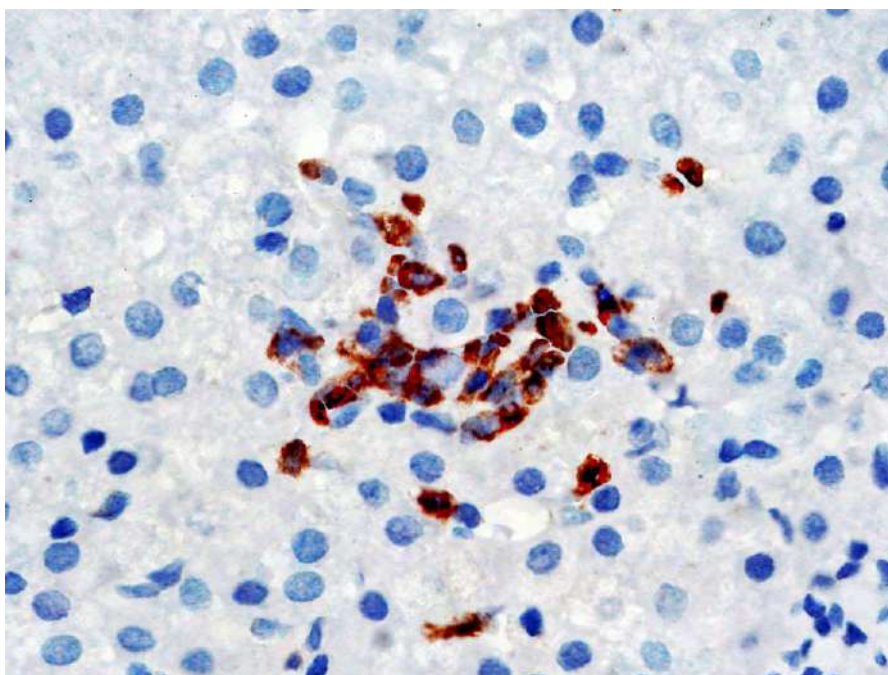


Рис. 3.12. Значна кількість CD8⁺ Т-лімфоцитів у вогнищі імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. Anti-CD8, система візуалізації DAKO EnVision⁺ з діамінобензидином. 36. x 1000.

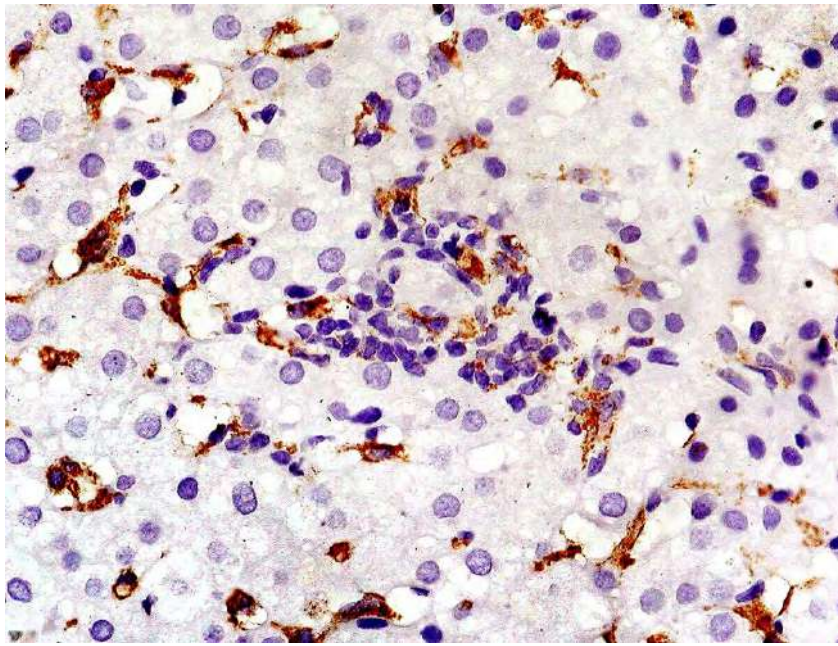


Рис. 3.13. CD68+макрофаги Купфера серед лімфоцитів у вогнищі імуноклітинного кілінгу гепатоциту (в центрі) та в перисинусоїдальних просторах. Anti-CD68, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 800.

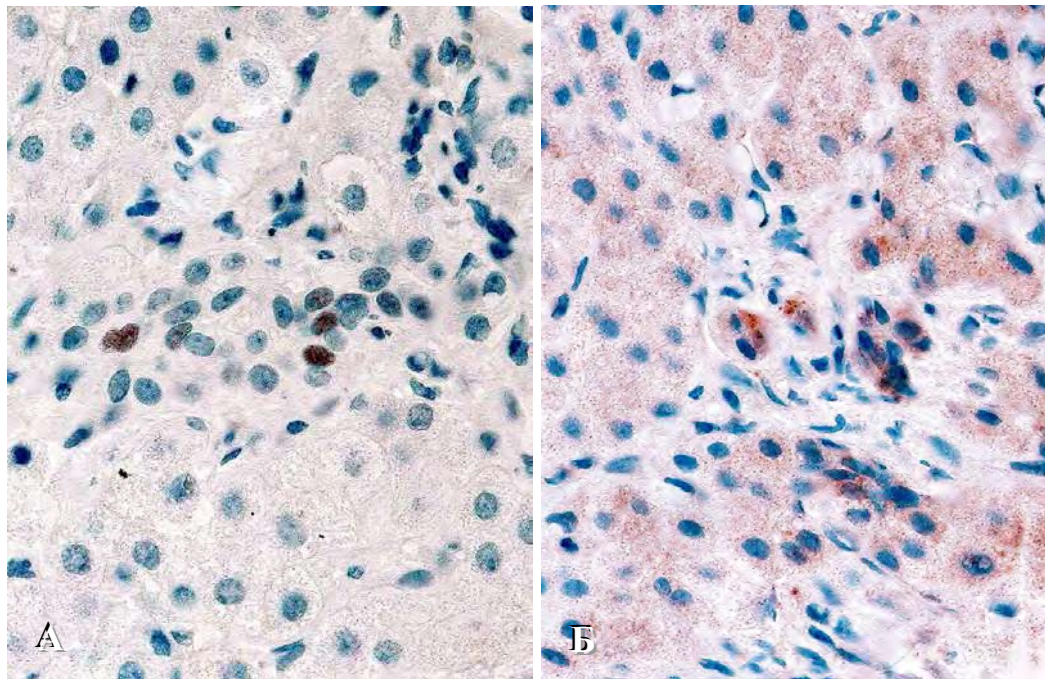


Рис. 3.14. Експресія p53 в ядрах (А) і Bcl-X_L в цитоплазмі гепатоцитів (Б) у вогнищі імуноклітинного кілінгу. А – Anti-p53, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином, Зб.х 800; Б– Anti-Bcl-X_L, система візуалізації LSAB2 System. Зб. х 700.

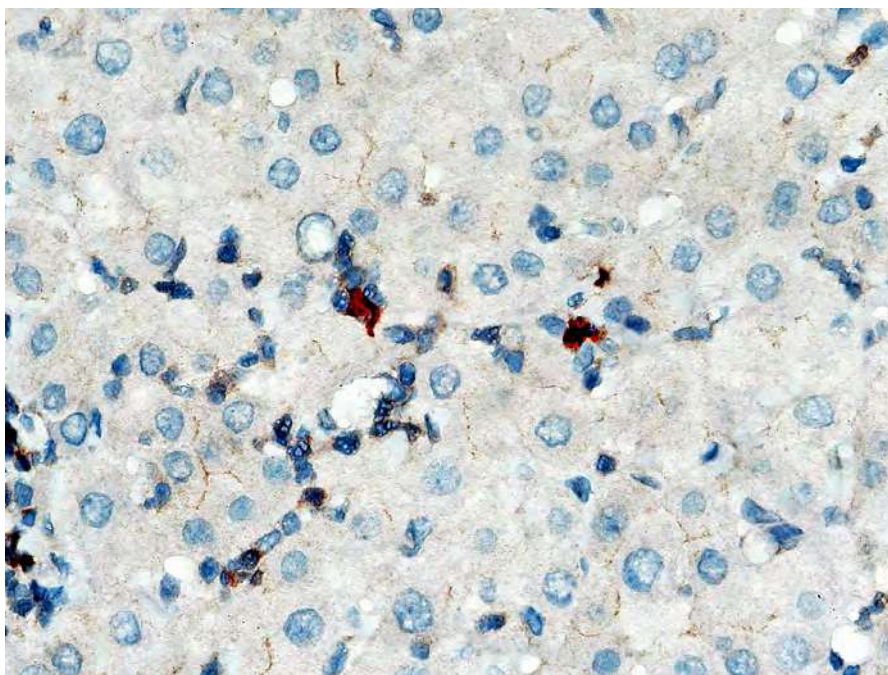


Рис. 3.15. Експресія каспази-3 в гепатоцитах, що гинуть апоптозом у вогнищах імуноклітинного кілінгу. Anti-Caspase Ab-3, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

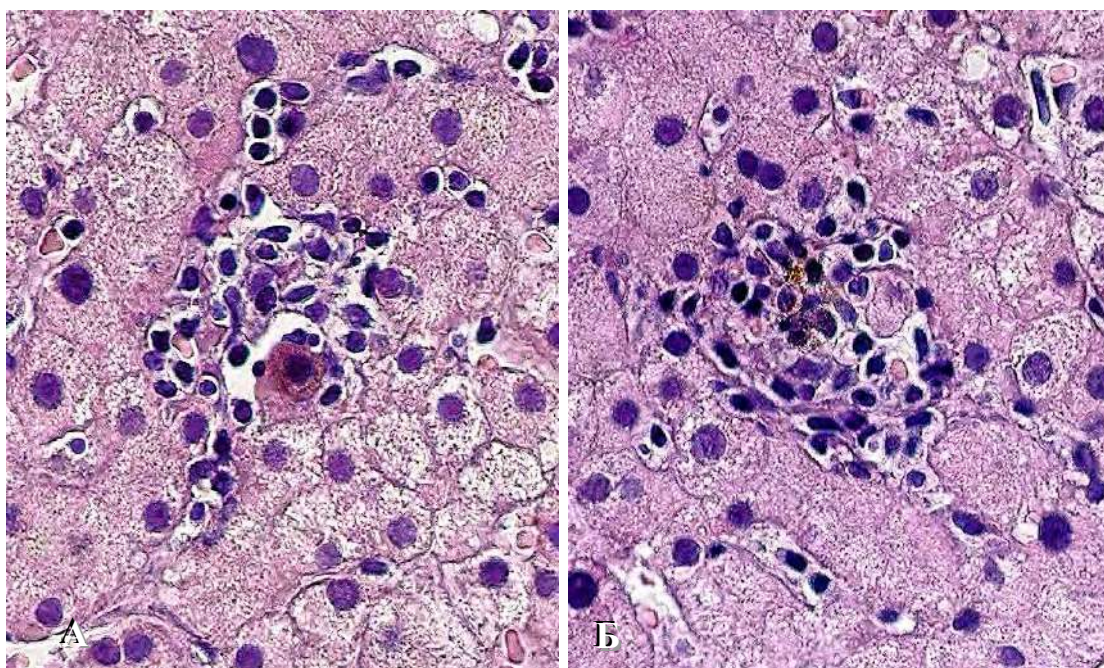


Рис. 3.16 А – апоптотично змінений гепатоцит у вогнищі імуноклітинного кілінгу; Б – каріоцитолізіс гепатоциту у вогнищі імуноклітинного кілінгу. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 36. x 800

Проведені нами імуногістохімічні дослідження показали, що в зонах «ступінчастих некрозів» і «мостоподібних некрозів» також відбувається імуноклітинний кілінг з патогенно індукованим апоптозом і каріоцитолізисом гепатоцитів. У вогнищах імуноклітинного кілінгу в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» присутні в великій кількості цитотоксичні CD8⁺ Т-лімфоцити, відносно численні CD68⁺макрофаги, активовані α -SMA⁺ клітини Іто та, як виняток, NK-клітини (Рис. 3.17, 3.18) .

При мікроскопії біоптатів печінки хворих на ХВГ С у вогнищах імуноклітинного кілінгу в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» в оточенні декількох імунокомпетентних клітин визначаються приречені на загибель гепатоцити з високим рівнем експресії каспази-3 (Рис. 3.19), які в рутинних гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, мають вигляд оксифільних тілець Каунсілмена (Рис. 3.20).

Гістологічні і імуногістохімічні дослідження показали, що зморщені гепатоцити в фазі пізньої апоптотичної деградації з дрібним пікнотичним ядром (тільця Каунсілмена) та дрібні ацидофільні гепатоцити з гіперхромними апоптотичними тільцями розтрощеного ядра, як правило, відділені від оточуючих клітин просвітленим обідком розширеного міжклітинного простору, в якому містяться відростки макрофагів (Див. рис. 3.16 А, рис. 3.20). Крім цього, поодинокі дрібні округлі ацидофільні залишки загиблих гепатоцитів з ядерними апоптотичними тільцями виявляються при світловій мікроскопії в отворах внутрішньодолькових синусоїдів або в краях імуноклітинних «ступінчастих некрозів». Розміри ацидофільних апоптотичних залишків загиблих гепатоцитів не більш ніж вдвічі-втричі перевищують розміри еритроцитів.

Проведені дослідження показали, що в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» в оточенні імунокомпетентних клітин також визначаються гепатоцити, які гинуть шляхом каріоцитолізу. Вважають, що каріоцитолізис гепатоцита можуть викликати Pit-клітини після екзоцитозу ними перфोरину.

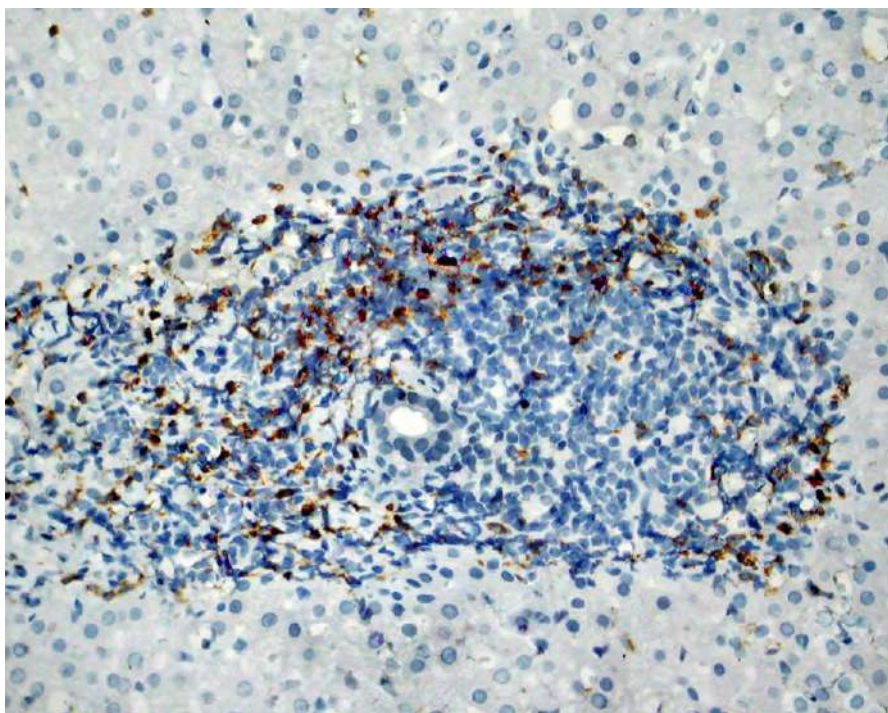


Рис. 3.17. CD8+ Т-лімфоцити в зоні перипортального імуноклітинного «ступінчастого некрозу». Anti-CD8, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

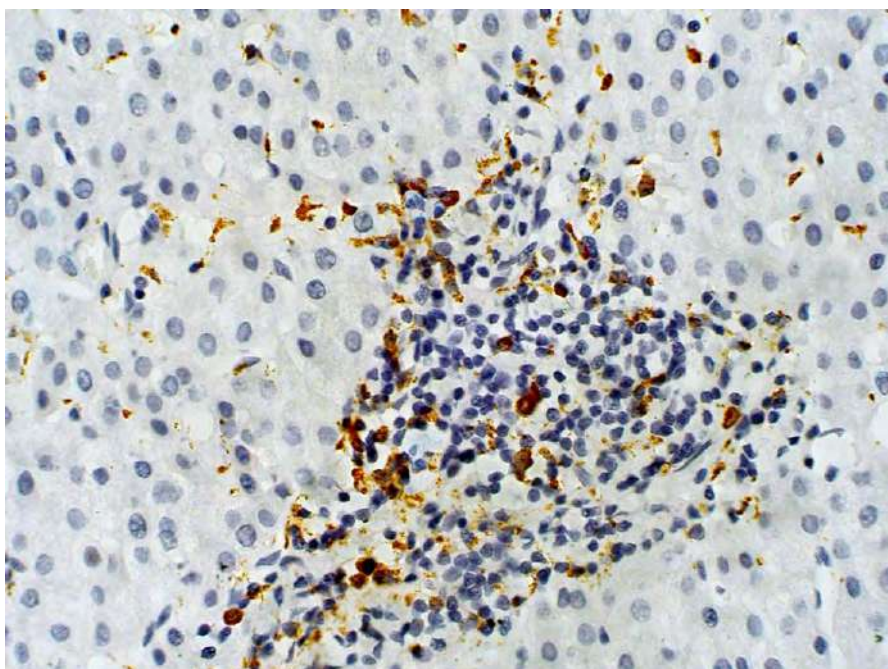


Рис. 3.18. CD68+ макрофаги в зоні перипортального імуноклітинного «ступінчастого некрозу». Anti-CD68, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

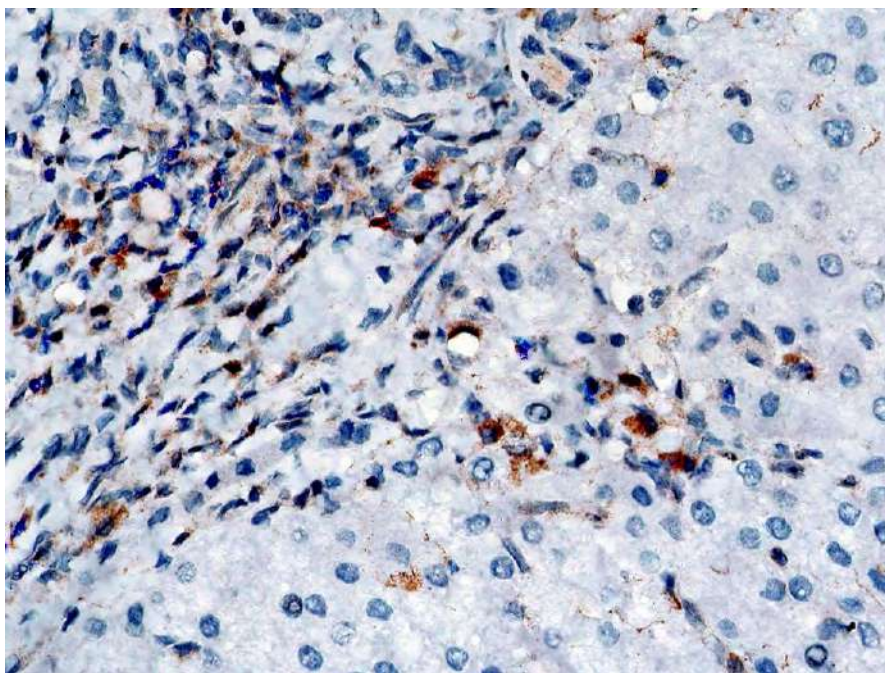


Рис. 3.19. Експресія каспази-3 апоптотичними гепатоцитами в зоні перипортального імуноклітинного «ступінчастого некрозу». Anti-Caspase Ab-3, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 800.

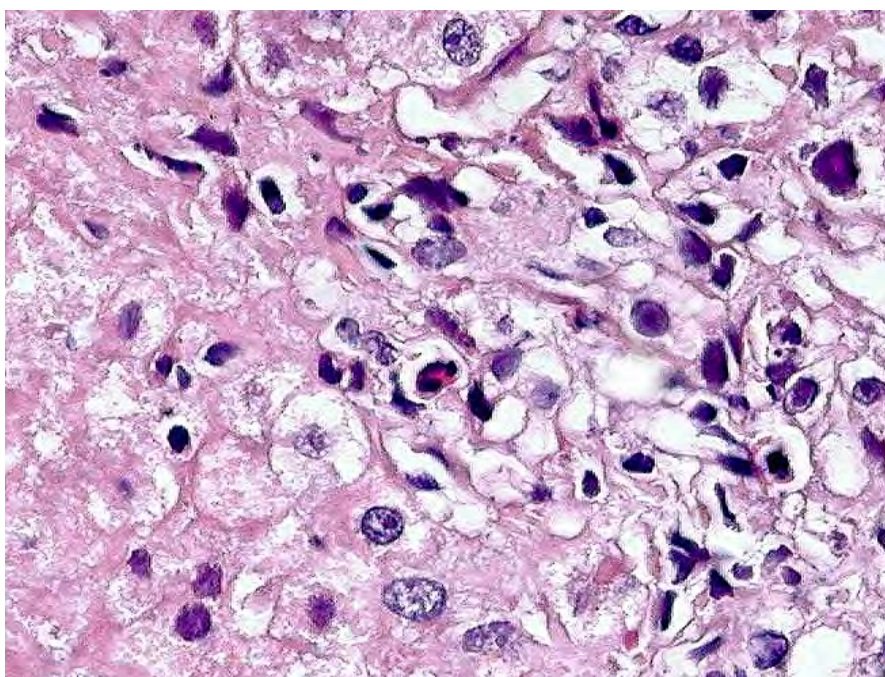


Рис. 3.20. Гепатоцит у фазі пізньої апоптотичної деградації на периферії муноклітинного «ступінчастого некрозу». Забарвлення гематоксиліном і еозином. 3б. х 1000.

3.3. Імунохроматографічний аналіз наявності антитіл до вірусу гепатиту С в тканині трепанобіоптатів печінки і в крові померлих хворих на хронічний вірусний гепатит С

Імунохроматографічний аналіз з використанням зареєстрованих в Україні тест-касет «CITO-TEST HCV» «Acon Biotech Co.» (Китай) і «AmeriTec Inc» (США) застосували для визначення можливості екстреного виявлення наявності антитіл до ВГС в мінімальній кількості крові трепанобіоптату печінки і паралельно – в краплі крові хворих на ХВГ С, а також для швидкого визначення наявності антитіл до вірусу гепатиту С в крові померлих хворих в різні строки після біологічної смерті.

Імунохроматографічне дослідження трепанобіоптатів печінки і цілісної крові у 20 пацієнтів 25-57 років, що знаходились на диспансерному обліку в гепатоцентрі Запорізької обласної клінічної інфекційної лікарні з верифікованим діагнозом ХВГ С показало, що імунохроматографічний експрес-метод є високочутливим способом виявлення антитіл до вірусу гепатиту С, але він не визначає кількості або рівня антитіл в біологічному матеріалі.

В результаті проведених нами досліджень з використанням тест-касет «CITO-TEST HCV» у всіх 20 пацієнтів в краплі крові імунохроматографічним експрес-методом через 10 хвилин від початку дослідження визначені антитіла до вірусу гепатиту С (Рис. 3.21). При паралельному дослідженні тест-касетами «CITO-TEST HCV» у цих же пацієнтів антитіла до вірусу гепатиту С в стовпчику нефіксованої тканини трепанобіоптату печінки з мізерною кількістю крові були визначені у 90% осіб, у 10% хворих на ХВГ С було отримано хибнонегативний результат аналізу тканини печінки (тобто антитіла були виявлені в краплі крові 2-х хворих і не були виявлені в тканині їх трепанобіоптатів печінки) (Рис. 3.21). Таким чином, встановлено, що антитіла до вірусу гепатиту С імунохроматографічним експрес-методом з використанням тест-касет «CITO-TEST HCV» виробництва «Acon

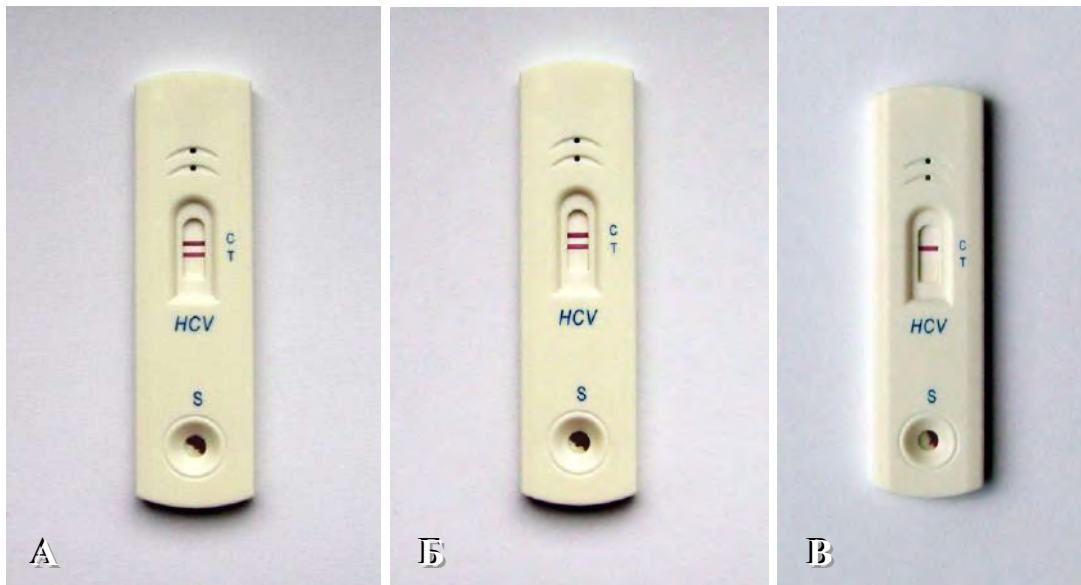


Рис. 3.21. Результати термінового імунохроматографічного виявлення антитіл до вірусу гепатиту С: А – позитивний результат в краплі крові хворого (дві червоно-фіолетові смуги в зоні контролю «С» і в зоні тесту «Т» тест-касети «CITO-TEST HCVAb»); Б – позитивний результат в стовпчику тканини трепанобіоптата печінки хворого (дві червоно-фіолетові смуги в зоні контролю «С» і в зоні тесту «Т» тест-касети «CITO-TEST HCVAb»); В – негативний результат в стовпчику тканини трепанобіоптата печінки (одна червоно-фіолетова смуга в зоні контролю «С» тест-касети «CITO-TEST HCVAb»).

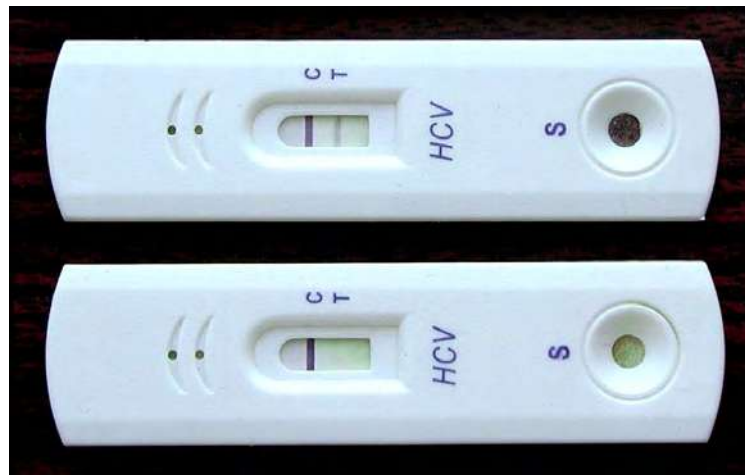


Рис. 3.22. Позитивний імунохроматографічний «CITO TEST» HCVAb на наявність в крові померлого хворого антитіл до вірусу гепатиту С через 48 годин після смерті (зверху). Знизу – негативний тест на HCVAb.

Biotech Co.» (Китай) визначаються з 90% чутливістю в нефіксованій тканині трепанобіоптатів печінки і з 100% чутливістю – в краплі крові хворих на ХВГ С. Враховуючи непередбачено малу кількість крові в стовпчику трепанобіоптата печінки і відповідно дуже низький рівень антитіл в ньому, при отриманні хибнонегативного результату імунохроматографічного експрес-аналізу необхідне додаткове виявлення вірусу гепатиту стандартними методами ПЛР або ІФА.

Дослідження швидкого визначення наявності антитіл до вірусу гепатиту С з використанням тест-касет «CITO-TEST HCV» виробництва «AmeriTec Inc» (США) в крові померлих хворих в різні строки після біологічної смерті дало наступні результати. Антитіла до вірусу гепатиту С (HCVAb) за допомогою тест-касет «CITO TEST HCV» були виявлені в крові у 9 померлих хворих 24-42 років, що страждали мікронодулярним цирозом печінки. Позитивна імунохроматографічна реакція на наявність в крові HCVAb отримана через 4, 12, 15, 18, 20, 24, 32, 38, 48 годин після біологічної смерті (див.рис.3.22). За даними проведених розтинів причинами смерті цих хворих стала печінково-клітинна недостатність (4 хворих), субтотальна фібринозно-гнійна пневмонія (4 хворих), субтотальний крововилив в півкулю головного мозку (1 хворий). У 3-х померлих хворих віком від 32 до 44 років, що страждали мікронодулярним цирозом печінки при імунохроматографічному дослідженні в інтервалі 8, 11, 18 годин після біологічної смерті в крові були виявлені антитіла проти вірусу гепатиту В і С. За даними проведених розтинів у одного з них розвинувся сепсис з поліорганною недостатністю; у другого розвинулася двостороння субтотальна фібринозно-гнійна пневмонія; у третього – смертельна печінково-клітинна недостатність. Таким чином визначено, що антитіла до вірусу гепатиту С виявляються імунохроматографічним експрес-методом в крові померлих хворих мікронодулярним цирозом печінки в інтервалі від 4 до 48 годин після смерті.

Посмертне імунохроматографічне дослідження крові померлих рекомендоване патологоанатомам і судово-медичним експертам для виявлення ХВГ С у померлих хворих та для проведення необхідних профілактичних заходів по попередженню непередбаченого зараження медичного персоналу, а також для уточнення танатогенезу при формулюванні остаточного діагнозу. Детально методика проведення імунохроматографічного експрес-дослідження трупної крові, його обмеження і правила застосування викладені у виданих нами методичних рекомендаціях, затверджених МОЗ України [193].

Висновки. При комплексному патогістологічному і імуногістохімічному дослідженні в печінці хворих на ХВГ С були визначені особливості клітинного складу імуноклітинних інфільтратів в перисинусоїдальних просторах, в портальних трактах і в перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозах» та у вогнищах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. Встановлено, що в перисинусоїдальних просторах серед лімфоцитів спостерігаються CD20+ В-лімфоцити і CD8+ Т-лімфоцити, в той час як у складі клітинних інфільтратів портальних трактів визначаються CD20+ В-лімфоцити, CD45R0+ лімфоцити і CD8+ Т-лімфоцити. Ці клітини або дифузно заповнюють і потовщують портальний тракт або формують в портальному тракті округлі фолікулоподібні структури, в центрі яких розміщуються CD20+ В-лімфоцити, а на периферії – Т-лімфоцити.

Застосування імуногістохімічних методик показало, що вираженість притаманної для ХВГ С імуноцитарної інфільтрації портальних трактів і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів відповідають ІГА хронічного гепатиту. При низькому індексі гістологічної активності 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 імуноцитарна інфільтрація трактів і перисинусоїдальних просторів, велика кількість «ступінчастих некрозів» та поодинокі імуноклітинні «мостоподібні некрози».

Встановлено, що морфологічними проявами імуноклітинної деструкції печінки при ХВГ С є наявність в дольках різної кількості вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів; наявність в печінці перипортальних імуноклітинних інфільтратів різної довжини і глибини (так званих «ступінчастих некрозів») і порто-портальних імуноклітинних інфільтратів («мостоподібних некрозів»). Імуногістохімічний і гістологічний аналіз довів, що у вогнищах імуноклітинного кілінгу в дольках печінки і в перипортальних зонах «ступінчастих некрозів» відбувається імунне знищення інфікованих гепатоцитів, які гинуть частіше шляхом апоптозу, рідше – шляхом каріоцитолізу (некрозу). У внутрішньодолькових вогнищах імуноклітинного кілінгу переважають CD8⁺ Т-лімфоцити-кілери, присутні поодинокі CD68⁺макрофаги і активовані α -SMA⁺ клітини Іто, а іноді також і великі гранульовані NK-клітини (pit-клітини). У зонах імуноклітинних перипортальних «ступінчастих некрозів» присутні у великій кількості CD8⁺ Т-лімфоцити-кілери, відносно численні CD68⁺макрофаги, активовані α -SMA⁺ клітини Іто та, як виняток, NK-клітини.

В печінці хворих на ХВГ С гепатоцити в різних фазах апоптозу найчастіше виявляються у вогнищах імуноклітинного кілінгу та в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», рідше поодинокі апоптотично змінені гепатоцити визначаються в печінкових дольках. При ініціації апоптозу виявляється експресія p53 в ядрах структурно мало змінених гепатоцитів, або експресія Bcl-X_L в цитоплазмі гепатоцитів. В ефекторній фазі апоптозу 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 (тільця

Каунсілмена). Найбільш надійним маркером апоптозу є експресія апоптотично зміненими гепатоцитами каспази-3.

Проведені дослідження показали, що у вогнищах імуноклітинного кілінгу та в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» в оточенні імунокомпетентних клітин також визначаються гепатоцити, які гинуть шляхом каріоцитолізу.

Імунохроматографічним експрес-методом з використанням зареєстрованих в Україні тест-касет «CITO-TEST HCV» виробництва «Acon Biotech Co.» (Китай) і «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.

Матеріали розділу відображені у статтях та тезах: [181], [186], [187], [189], [192], [193].

РОЗДІЛ 4

МОРФОГЕНЕЗ І ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОСНОВНИХ ТИПІВ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ ТА ЇХ ГРАДАЦІЯ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

Поглиблений імуногістохімічний і гістохімічний аналіз показали, що у хворих на ХВГ С продуцентами надлишку колагенів та інших протеїнів позаклітинного матриксу (ПКМ) в печінці є активовані ЗКП, які раніше, до визначення їх фіброгенної ролі, отримали різну назву в залежності від їх локалізації: 1) зірчасті перисинусоїдальні клітини Іто просторів Дісе внутрішньодолькових синусоїдів і зірчасті клітини Іто у вогнищах значного стеатозу гепатоцитів; 2) фібробласти портальних трактів і міофібробласти центролобулярних вен; 3) фібробласти у зонах перипортальних імуноклітинних «ступінчастих» і «мостоподібних некрозів».

Встановлено, що основною відмінністю нових поколінь активованих ЗКП фіброгенного типу є виражена експресія ними α -SMA, який при відсутності фіброзу визначається в печінці в м'язовому шарі судин портальних трактів, в поодиноких портальних фібробластах і поодиноких клітинах Іто (Рис. 4.1, 4.2).

Було визначено, що фіброз печінки може розвиватися і прогресувати з декількох її зон – джерел фіброгенезу: з портальних трактів печінки, центролобулярних вен, внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів, з перипортальних «ступінчастих некрозів» та з вогнищ імуноклітинної деструкції в дольках печінки. За морфогенезом, в залежності від переважаючих джерел фіброгенезу, фіброз печінки був розподілений нами на 3 основні типи: портально-септальний (класичний), перисинусоїдально-центролобулярний і змішаний тип. Різновидом перисинусоїдально-долькового фіброзу є перицелюлярний фіброз навколо гепатоцитів печінки.

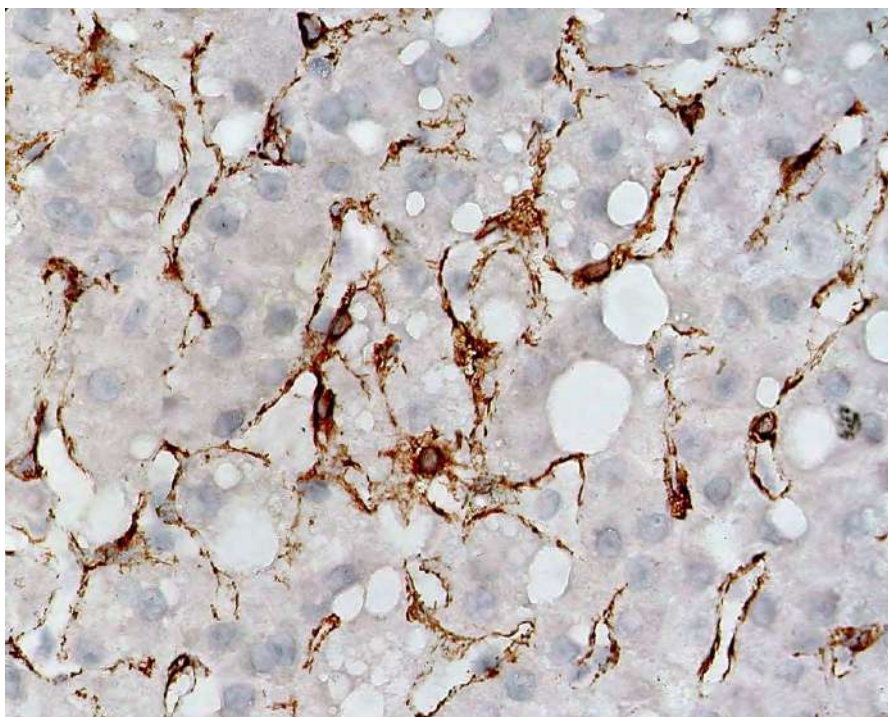


Рис. 4.1. Виражена експресія α -гладком'язового актину (α -SMA) активованими зірчастими перисинусоїдальними клітинами Іто при фіброзі печінки у хворого на ХВГ С. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 1000.

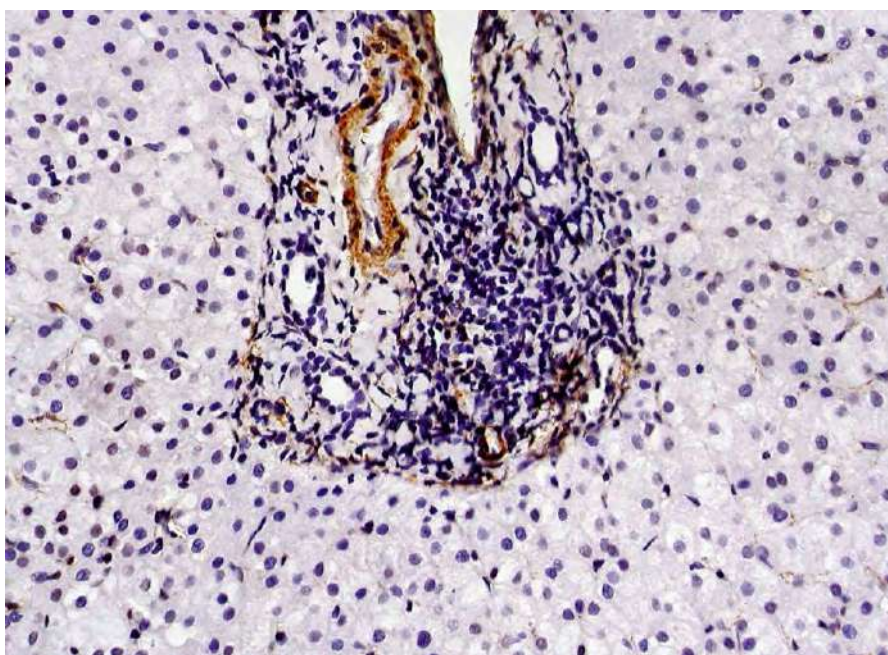


Рис. 4.2. Значна експресія α -SMA гладком'язовими клітинами артеріоли портального тракту, слабка експресія α -SMA деякими портальними фібробластами і поодинокими перисинусоїдальними зірчастими клітинами Іто при відсутності фіброзу печінки у хворого на ХВГ С. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

4.1. Патоморфологічна і імуногістохімічна характеристика портально-септального фіброзу печінки різного ступеня

Проведені дослідження показали, що морфологічною особливістю портально-септального фіброзу печінки, яка визначається в гістологічних препаратах, забарвлених за Ван-Гізон і Масон-трихром, є фіброз і колагенізація портальних трактів різного ступеня та утворення портально-долькових септ без помітного фіброзу і колагенізації перисинусоїдальних просторів в дольках печінки (Рис. 4.3).

Особливістю його морфогенезу є розвиток на початковому етапі фіброзу портальних трактів при практично незмінених внутрішньодолькових синусоїдах та централобулярних венах з подальшим посиленням портального фіброзу і утворенням різної кількості портально-долькових фіброзних септ. Продуцентами надлишку колагену і інших компонентів ПКМ є активовані α -SMA+ фібробласти, які з'являються і кількісно збільшуються в портальних трактах, в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» та в портально-долькових септах. Накопичення колагену і протеїнів ПКМ лежить в основі феномену фіброзного розширення портальних трактів і появи фіброзних септ, який враховується при градації портально-септального фіброзу печінки в напівкількісних системах METAVIR (1994), V. Desmet et al. (1995) та інших. В той же час, розширення портальних трактів печінки при ХВГ С також завжди відбувається при їх дифузній або фолікулоподібній інфільтрації імуноцитами, яку треба диференціювати з портальним фіброзом. Як правило, сполучнотканинні волокна накопичуються в самому портальному тракті, в середині імуноклітинного інфільтрату, по периферії фолікулоподібного інфільтрату, а також в зонах перипортальних «ступінчастих некрозів» (Рис. 4.4).

Гістохімічне забарвлення біоптатів печінки за Ван Гізон і трихром-Масон дозволило виявити початкові етапи формування портально-септального фіброзу печінки, а також диференціювати його ступінь згідно

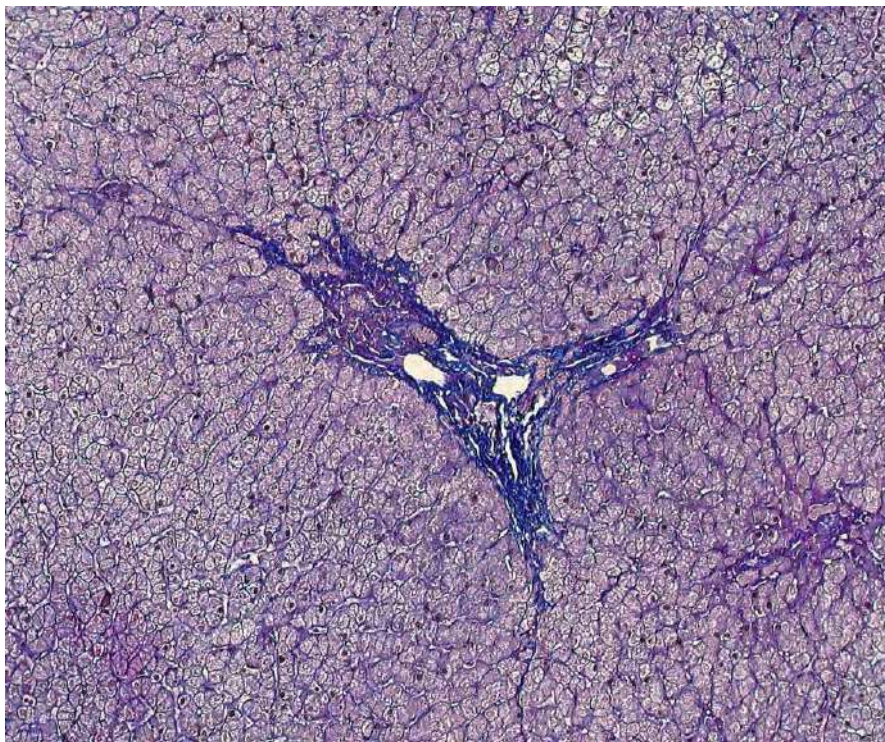


Рис. 4.3. Фіброз портальних трактів з утворенням портально-долькових септ при помірному портально-септальному фіброзі печінки у хворого на ХВГ С. Синє забарвлення фіброзу методом трихром-Масон. Зб. х 100.

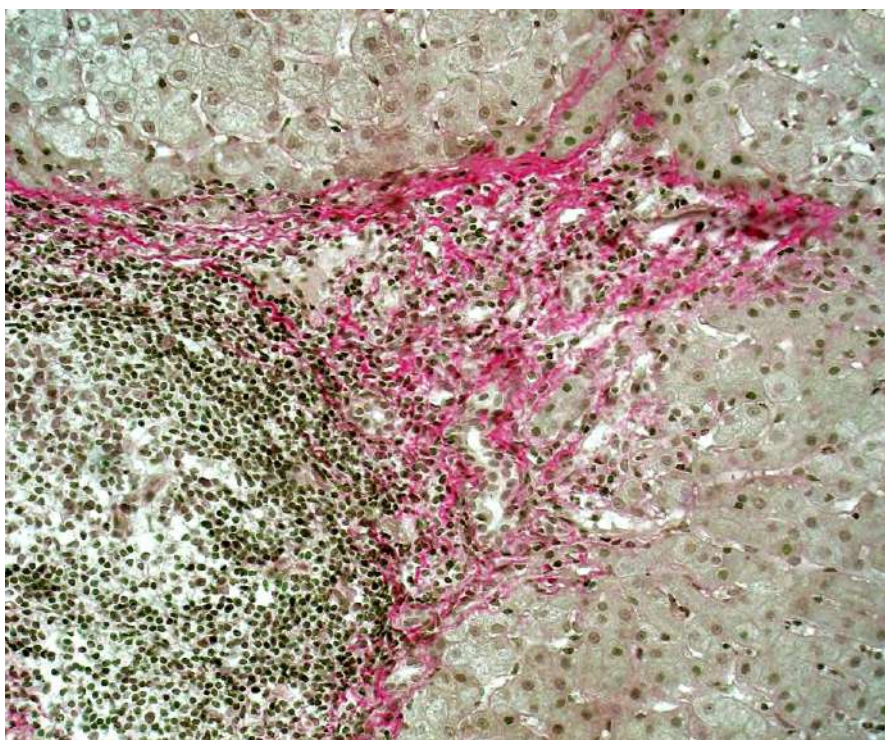


Рис. 4.4. Сполучнотканинні фібрили в портальному тракті та на периферії фолікулоподібного імуноклітинного інфільтрату. Забарвлення за Ван Гізон. Зб. х 400.

напівкількісним системам METAVIR (1994) і V. Desmet et al. (1995).

Слабкий фіброз F1 за METAVIR характеризувався слабо вираженим фіброзом і незначним фіброзним розширенням портальних трактів без формування септ або початком їх утворення (Рис. 4.4). В частині портальних трактів спостерігалась слабка імуноклітинна інфільтрація без формування імуноклітинних «ступінчастих некрозів», в частині портальних трактів визначались тонкі сполучнотканинні фібрили серед імуноклітинних інфільтратів або на їх периферії (Рис. 4.5). При імуногістохімічних дослідженнях встановлено, що при слабкому фіброзі F1 у хворих на ХВГ С в портальних трактах визначаються нечисленні α -SMA+ фібробласти (Рис. 4.6А), а також слабка колагенізація портальних трактів, про що свідчила експресія в них колагену I і IV типу у вигляді вогнищевих тонких фібрилярних відкладень (Рис. 4.6 Б).

Помірний портально-септальний фіброз характеризувався помірним фіброзом і помірним фіброзним розширенням портальних трактів з наявністю різної кількості портально-долькових фіброзних септ (Рис. 4.7, 4.8). Спостерігались короткі і масивні фіброзні септи, а також тонкі та довгі портально-долькові фіброзні септи. Імуногістохімічні дослідження із застосуванням моноклональних антитіл до α -SMA виявили значну кількість α -SMA+ фібробластів як в портальних трактах, так і у фіброзних септах (Рис. 4.9, 4.10), а також експресію колагену I і IV типу у вигляді вогнищевих фібрилярних відкладень, розповсюджених в портальних трактах і в портально-долькових фіброзних септах. У частини хворих визначалась різної інтенсивності дифузна або фолікулоподібна імуноклітинна інфільтрація фіброзно змінених портальних трактів, яка значно збільшувала їх товщину. У частини хворих імуноклітинна інфільтрація з портальних трактів поширювалася на перипортальні зони, утворюючи так звані «ступінчасті некрози», в яких, при забарвленні за Ван-Гізон і Масон-трихром, також спостерігалось накопичення сполучнотканинних волокон.

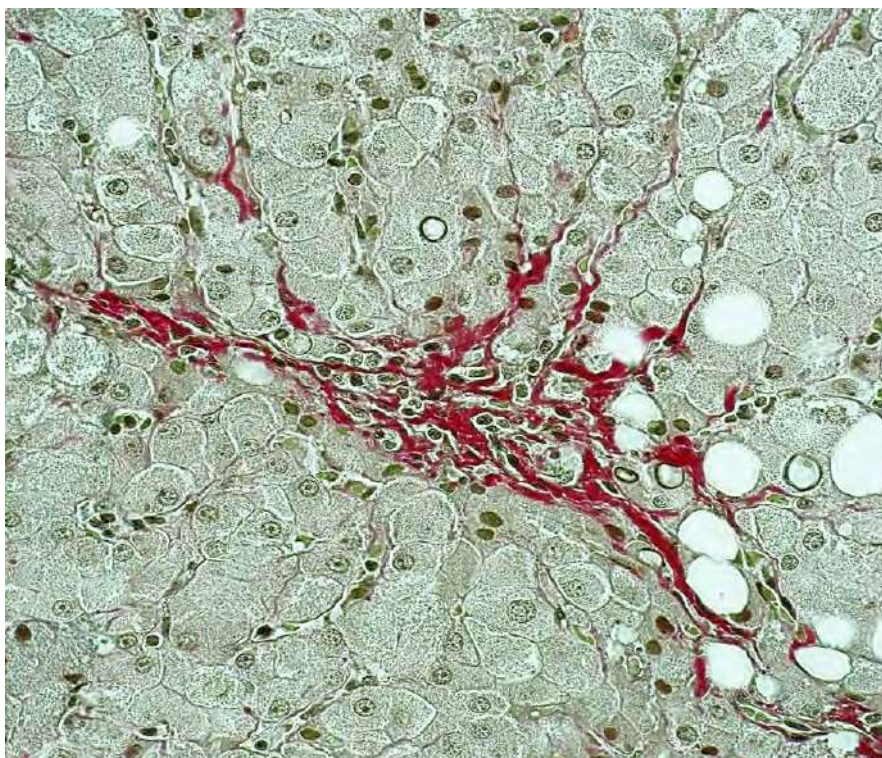


Рис. 4.5. Слабкий фіброз портального тракту печінки F1 з наявністю фіброзних септ при ХВГС. Забарвлення за Ван Гізон. Зб. х 600.

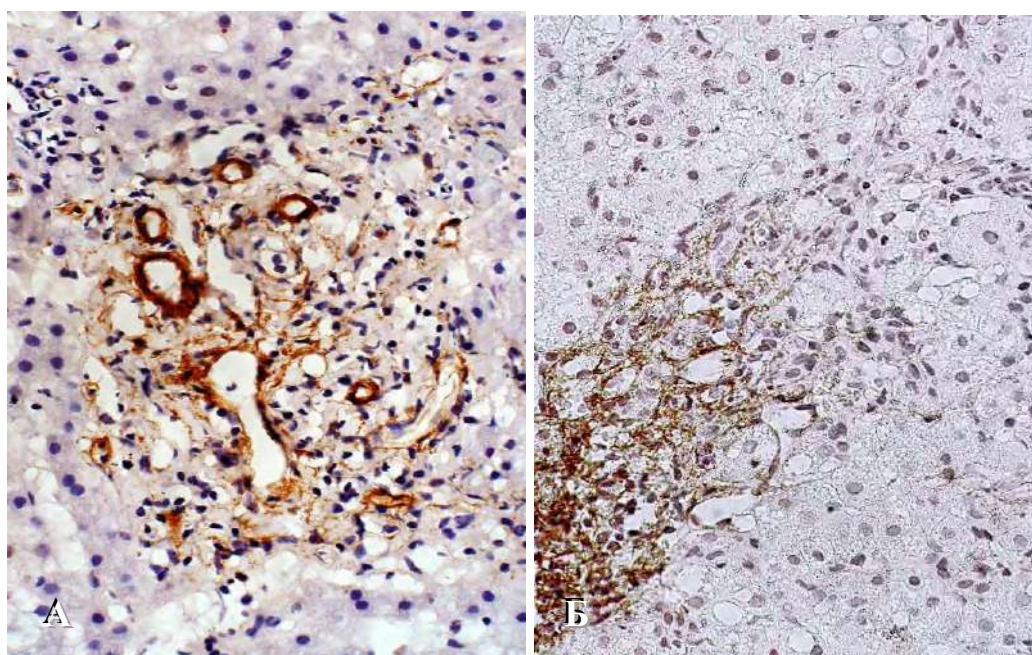


Рис. 4.6. Слабкий F1 портально-септальний фіброз печінки. А – α -SMA+ фібробласти і гладком'язові клітини судин в портальному тракті. Anti- α -SMA. Б – Вогнищеві та тонкі фібрилярні відкладення колагену IV типу. Anti-Collagen IV. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

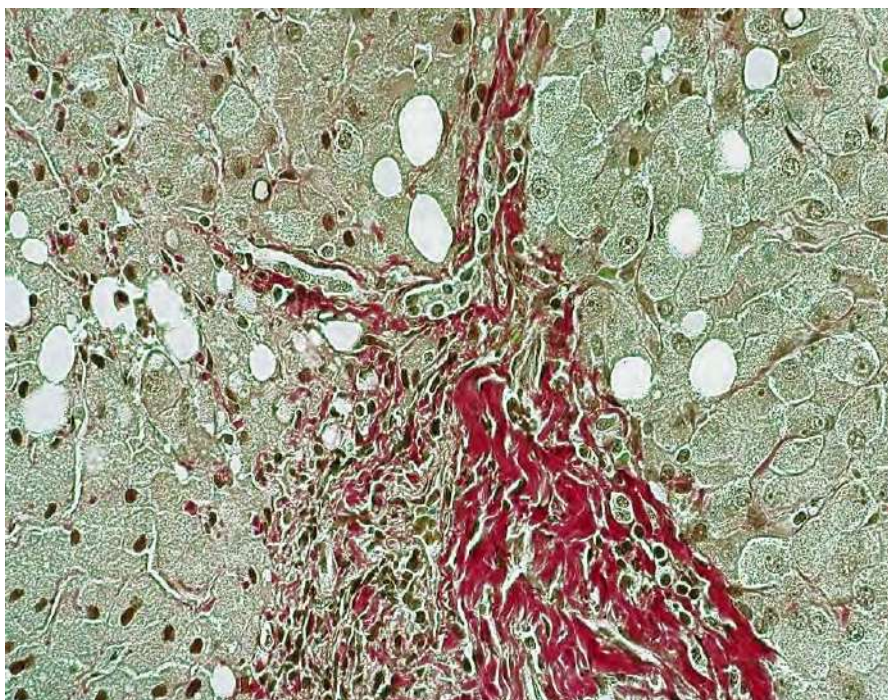


Рис. 4.7. Помірний фіброз портального тракту печінки з портально-дольковими фіброзними септами. Зabarвлення за Ван Гізон. Зб. х 600.

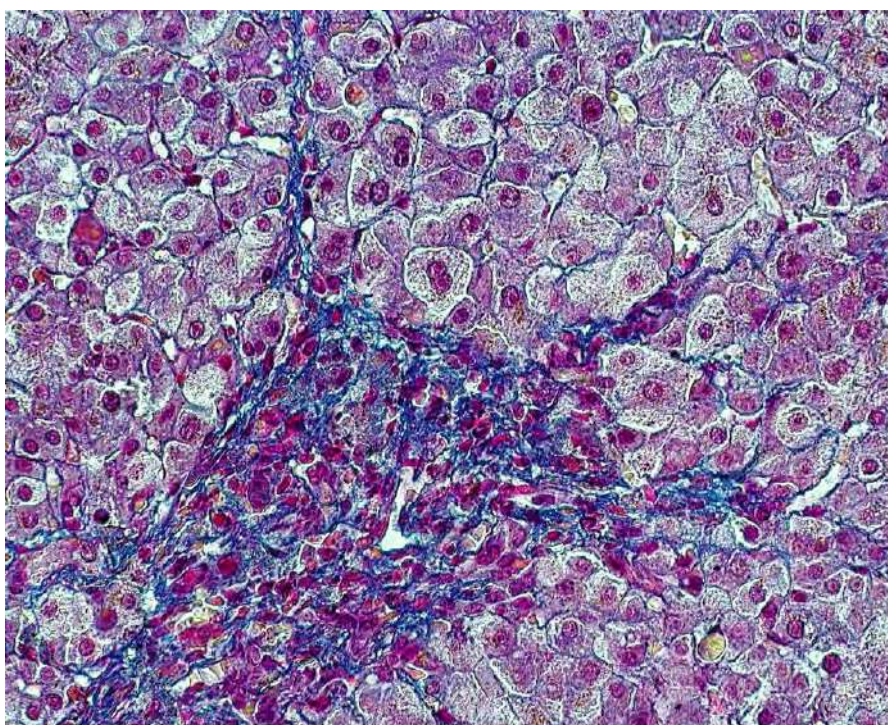


Рис. 4.8. Помірний фіброз портального тракту печінки з портально-дольковими фіброзними септами. Зabarвлення методом трихром-Масон. Зб. х 600.

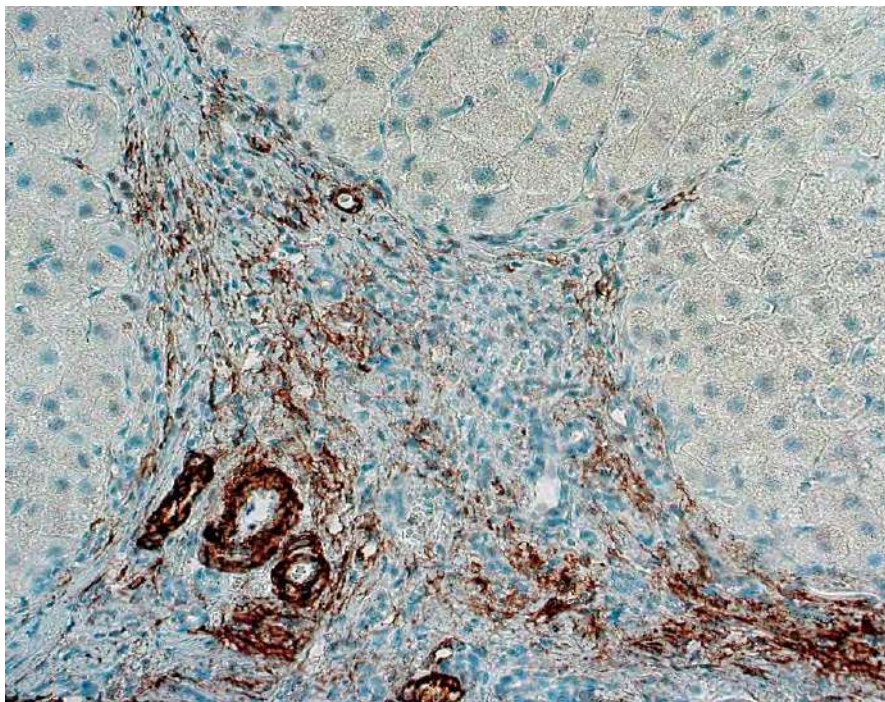


Рис. 4.9. α -SMA+ фібробласти портального тракту, значно розширеного за рахунок імуноклітинного інфільтрату, при помірному портально-септальному фіброзі печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

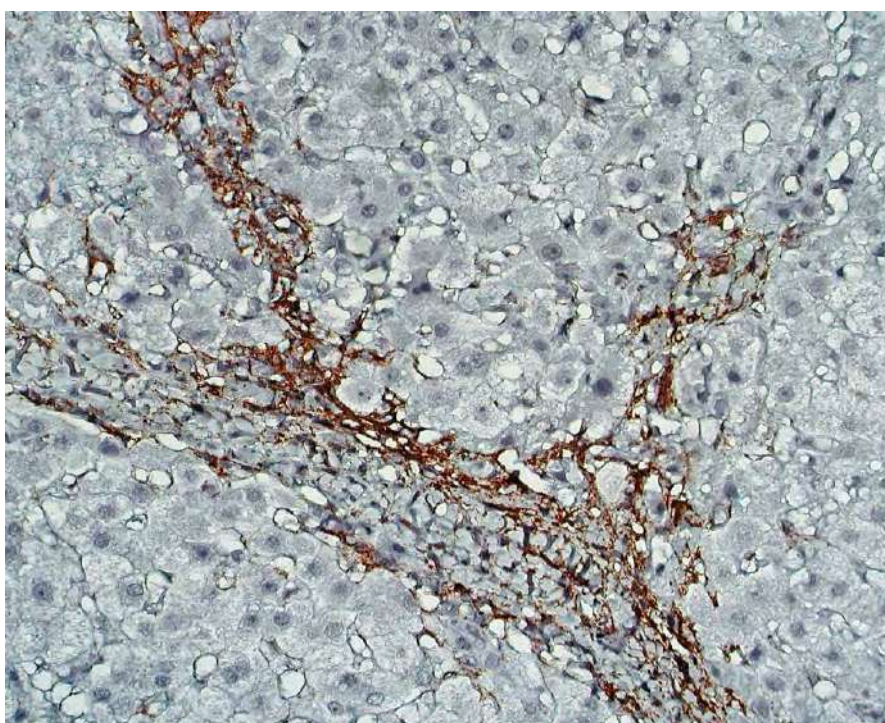


Рис. 4.10. α -SMA+ фібробласти фіброзних септ при помірному портально-септальному фіброзі печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

При тяжкому портально-септальному фіброзі печінки, в препаратах, забарвлених за Ван-Гізон і трихром-Масон, визначалось значне фіброзне потовщення портальних трактів у поєднанні з великою кількістю портально-долькових і порто-центральных фіброзних септ без утворення псевдодольок (Рис. 4.11). З фіброзно змінених портальних трактів в печінкові дольки проникали як численні короткі портально-долькові фіброзні септи, так і велика кількість тонких і довгастих портально-долькових фіброзних септ (Рис. 4.12А, Б). В печінці також виявлялись так звані мостоподібні фіброзні септи між сусідніми портальними трактами, які формувались на місці імуноклітинних «мостоподібних некрозів» (Рис. 4.12 Б).

Тяжкий портально-септальний фіброз печінки характеризувався значною кількістю α -SMA+ фіброblastів в портальних трактах і в численних портально-долькових і порто-центральных, а також у порто-портальних фіброзних септах (Рис.4.13). Різна кількість α -SMA+ фіброblastів також визначалась в середині і на периферії імуноклітинних «ступінчастих некрозів», що свідчило про активацію фіброгенних клітин в зонах імуноклітинної деструкції (Рис.4.13).

При тяжкому портально-септальному фіброзі печінки виявлялась значно виражена експресія колагену I і IV типу в середині розширених портальних трактів, в середині і на периферії перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів», а також у портально-долькових, порто-центральных і мостоподібних порто-портальних септах (Рис.4.14).

Порівняння результатів паралельних імуногістохімічних досліджень експресії α -SMA та колагену I і IV типу при слабкому, помірному і тяжкому портально-септальному фіброзі показало, що зростання фіброзного розширення портальних трактів обумовлено активацією фіброгенних клітин в самому тракті і в перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозах», які синтезують надлишок колагену I і IV типу та сприяють його накопиченню в цих зонах печінки.

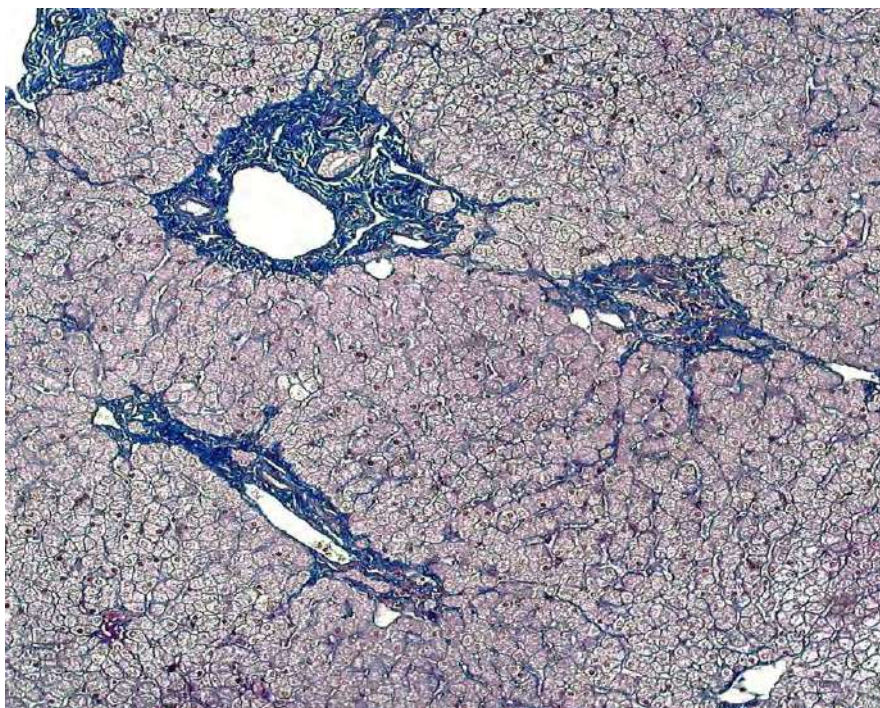


Рис. 4.11. Тяжкий портально-септальний фіброз печінки: значне фіброзне потовщення портальних трактів з багатьма портально-дольковими фіброзними септами. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 100.

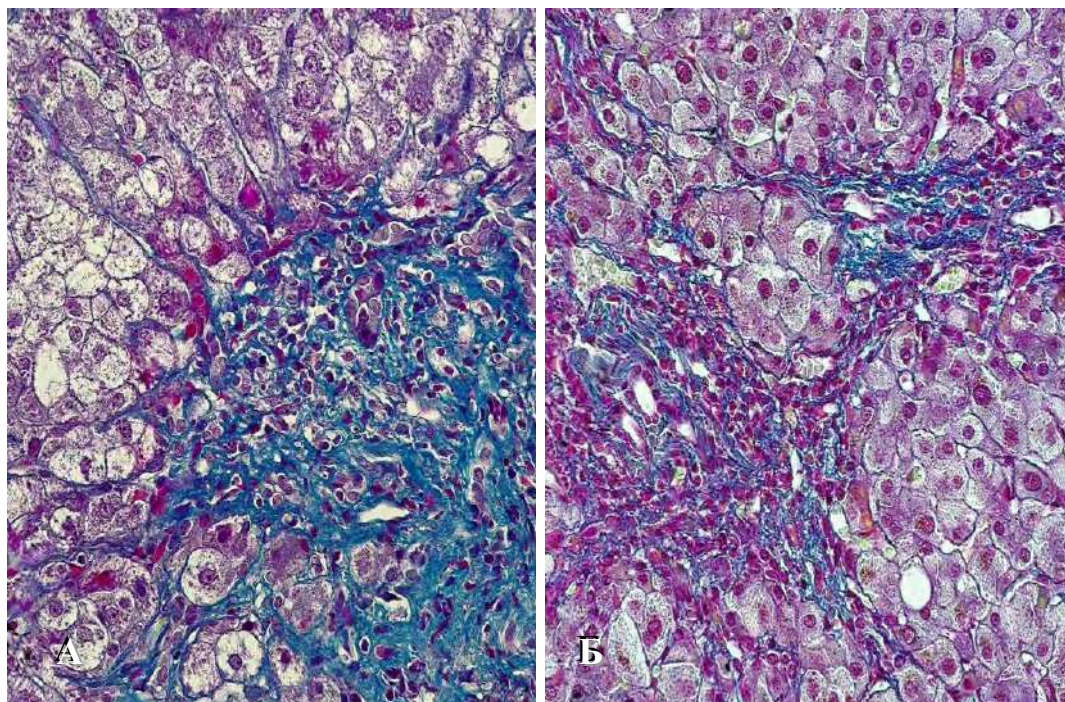


Рис. 4.12. Тяжкий F3 портально-септальний фіброз печінки: А – значне фіброзне потовщення портального тракту з багатьма короткими портально-дольковими фіброзними септами; Б – наявність тонких портально-долькових фіброзних септ і портально-портальної «мостоподібної» фіброзної септи. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 400.

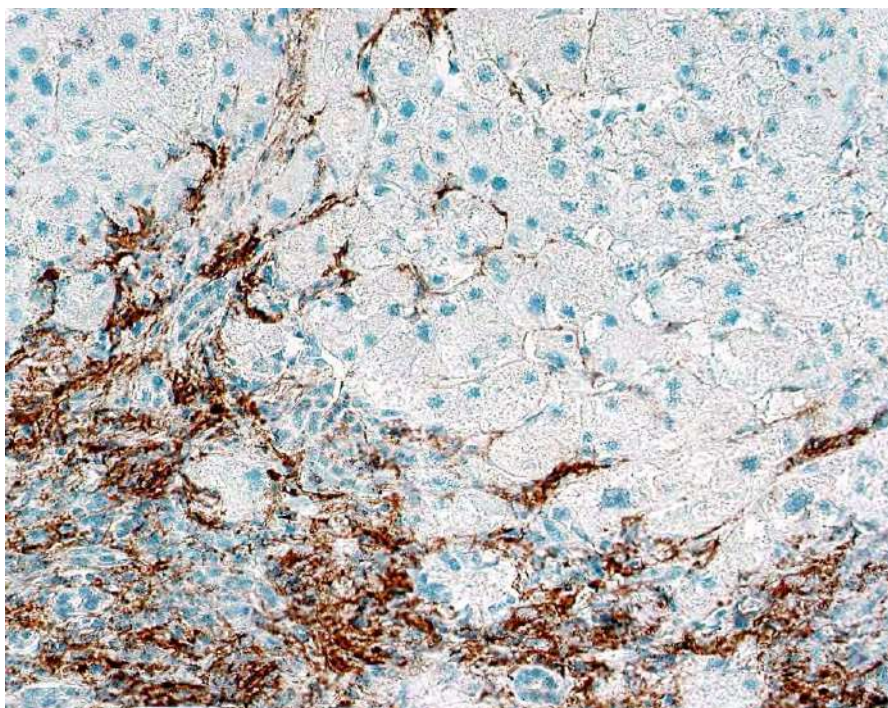


Рис. 4.13. Експресія α -SMA в фіброзно розширеному портальному тракті, в імуноклітинному «ступіпчастому некрозі» і в фіброзних септах при тяжкому F3 портально-септальному фіброзі печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36.x 400.

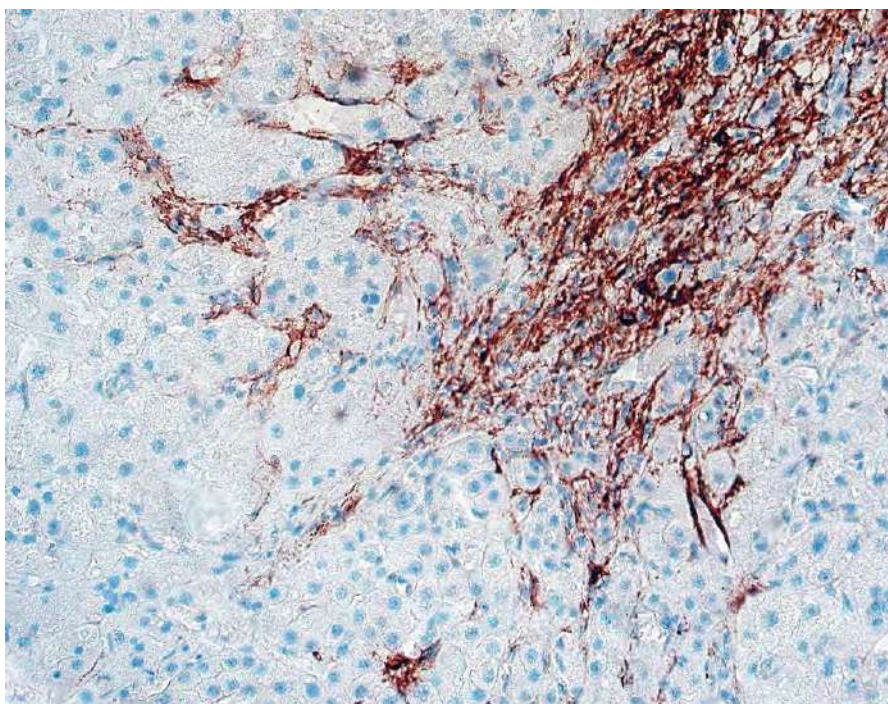


Рис. 4.14. Експресія колагену I типу в фіброзно розширеному портальному тракті і в портально-долькових фіброзних септах при тяжкому F3 портально-септальному фіброзі печінки. Anti-Collagen I, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 200.

4.2 Патогістологічна, гістохімічна і імуногістохімічна характеристика перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу печінки

При патоморфологічному дослідженні гепатобіоптатів у 30 хворих на ХВГС була виявлена сукупність певних гістологічних ознак, які дозволили виділити особливий за морфогенезом і гістологічною структурою перисинусоїдально-центролобулярний тип фіброзу печінки. Загальною морфологічною особливістю такого фіброзу, яка визначається в гістологічних препаратах печінки, забарвлених за Ван-Гізон і Масон-трихром, є переважання значного фіброзу центролобулярних вен і перисинусоїдальних просторів над незначним фіброзом портальних трактів (Рис. 4.15, 4.16).

Особливістю морфогенезу перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу печінки є насамперед розвиток фіброзу і колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів та центролобулярних вен печінки при практично незмінених портальних трактах, в подальшому посилюється фіброз і колагенізація внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів та центролобулярних вен на тлі незначної фібротизації портальних трактів, отвори більшості внутрішньодолькових синусоїдів розширюються, а отвори центролобулярних вен з фіброзом не тільки розширюються, але і значно збільшуються в площі.

Із застосуванням паралельних гістологічних, гістохімічних і імуногістохімічних досліджень встановлено, що в основі такого фіброзу лежить збільшення кількості активованих α -SMA+ ЗКП в перисинусоїдальних просторах та навколо центролобулярних вен, які посилюють синтез і сприяють накопиченню колагенів і інших компонентів ПКМ в цих зонах: тобто визивають колагенізацію і фіброз внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів та фіброз навколо центролобулярних вен.

Проведений ІГХ аналіз з використанням антитіл до маркеру

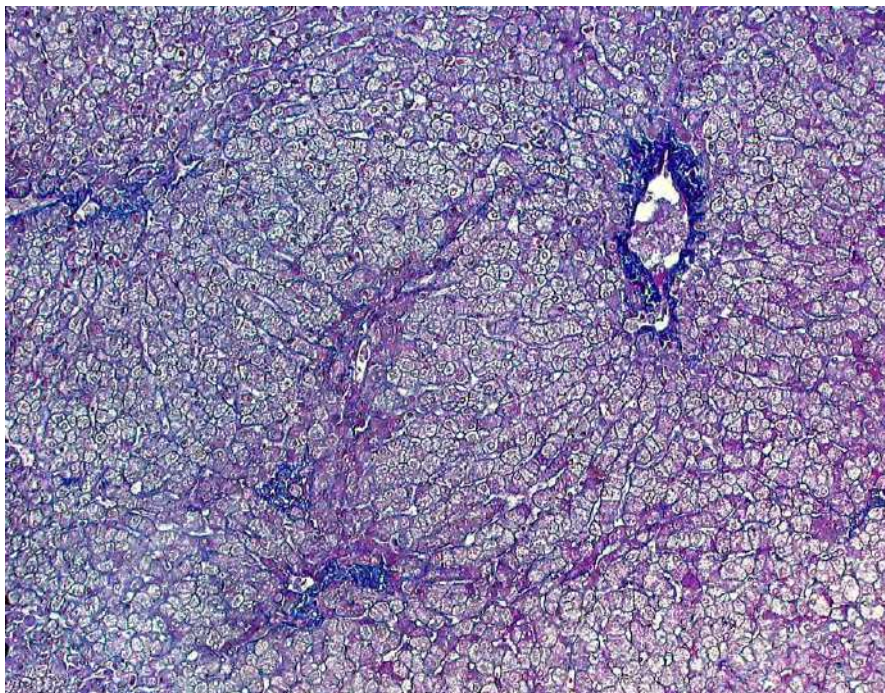


Рис. 4.15. Переважання значного центробулярного і перисинусоїдального фіброзу над слабким фіброзом портальних трактів при ХВГ С. Синє забарвлення фіброзу методом трихром-Масон. Зб. х 100.

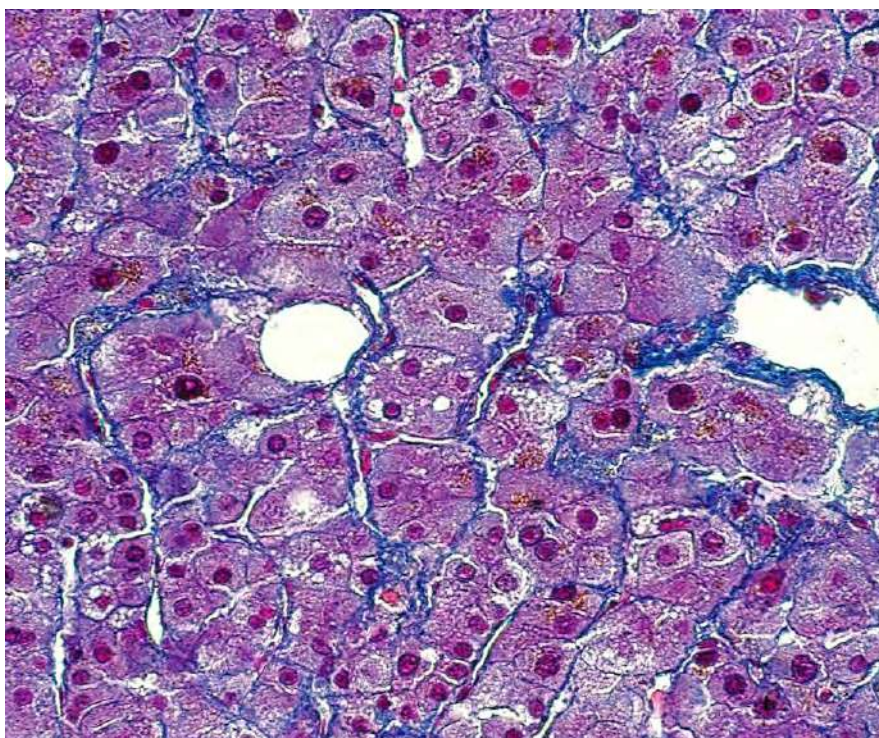


Рис. 4.16. Значний фіброз центробулярної вени (справа) і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів при ХВГ С. Синє забарвлення фіброзу методом трихром-Масон. Зб. х 800.

проліферації Ki-67 показав, що перисинусоїдальному фіброзу передують проліферація перисинусоїдальних ЗКП (Рис. 4.17), що забезпечує збільшення кількості активованих зірчастих клітин Іто в перисинусоїдальних просторах, які виявляються при гістохімічному дослідженні трепанобіоптатів печінки (Рис. 4.18). Паралельне імуногістохімічне визначення α -SMA доказало, що збільшені в кількості α -SMA+ клітини є активованими перисинусоїдальними ЗКП фіброгенного типу (Рис.4.19), а паралельне визначення колагену IV типу підтвердило колагенізацію внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів (Рис. 4.20).

За вираженістю сукупності патогістологічних, гістохімічних і імуногістохімічних ознак, які виявляються в біоптатах печінки, перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки у хворих на ХВГ С був поділений на слабкий, помірний і тяжкий.

Слабкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки у хворих на ХВГС характеризувався слабо вираженою вогнищевою або дифузною колагенізацією до 25% внутрішньодолькових синусоїдів і початковим слабким фіброзом стінки центролобулярних вен при відсутності або початково слабкій вираженості фіброзу в портальних трактах.

При мікроскопічному дослідженні у 57% хворих зі слабким перисинусоїдально-центролобулярним фіброзом печінки в забарвлених гематоксиліном-еозином зрізах органу визначалось вогнищеве розширення деяких синусоїдів та незначне збільшення кількості клітин Іто подовженої форми в перисинусоїдальних просторах (Рис. 4.21). Подекуди виявлялась фокальна лімфоцитарна інфільтрація внутрішньодолькових синусоїдів і портальних трактів та розширення деяких центролобулярних вен. При гістохімічному забарвленні за методом Ван Гізона і трихром-Масона у всіх обстежених хворих зі слабким перисинусоїдально-центролобулярним фіброзом печінки визначався слабкий фіброз помірно розширених центролобулярних вен та слабкий сегментарний або дифузний фіброз перисинусоїдальних просторів (Рис.4.22) менш ніж у 25% загальної кількості

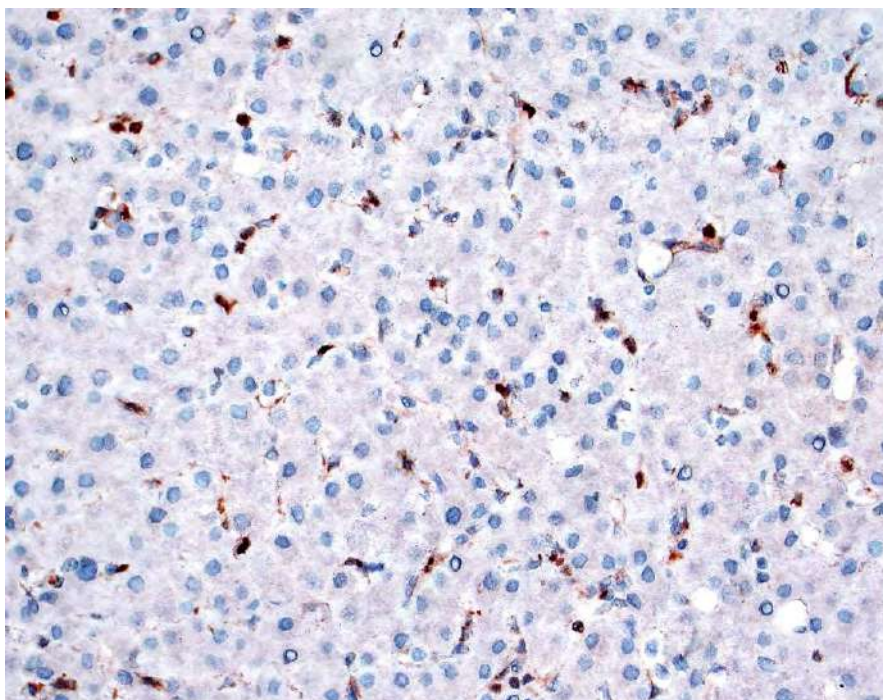


Рис. 4.17. Експресія Ki-67 при проліферації зірчастих клітин у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах печінки. Anti-Ki-67, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

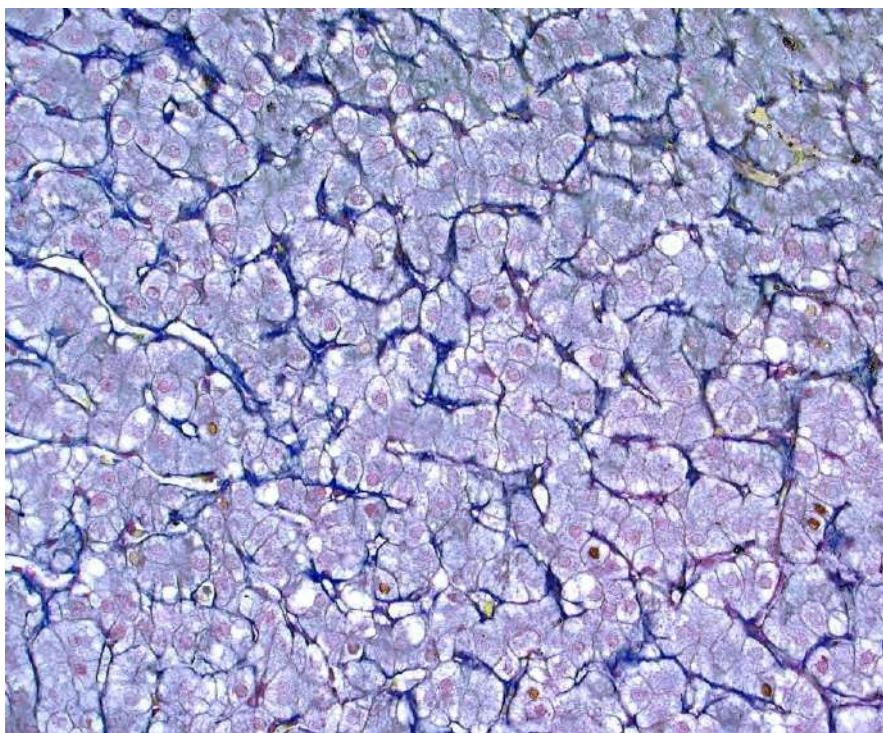


Рис. 4.18. Велика кількість зірчастих клітин Іто у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах при перисинусоїдально-центролобулярному фіброзі печінки. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 400.

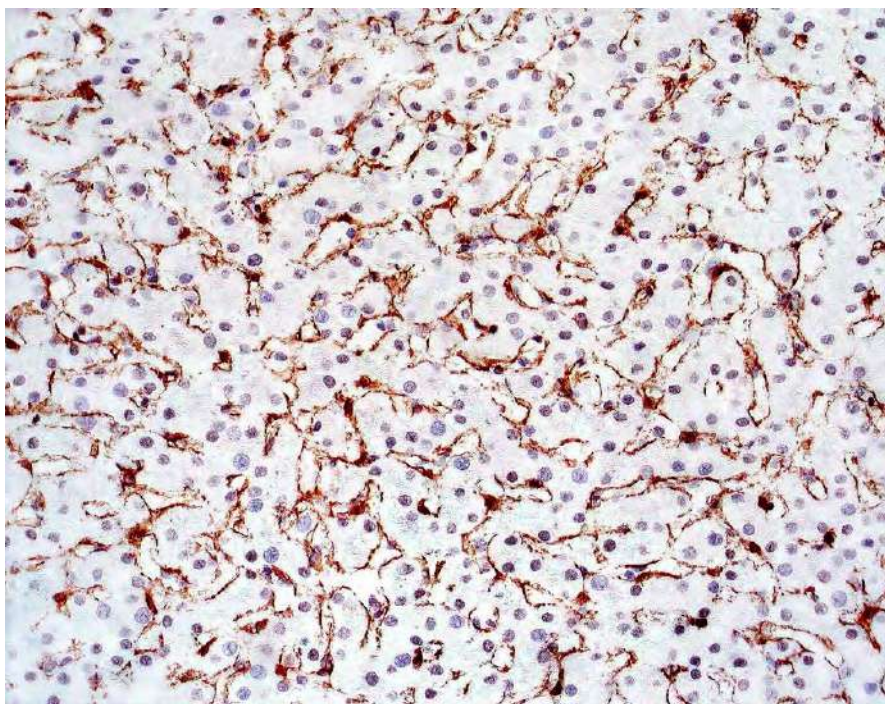


Рис. 4.19. Велика кількість α -SMA+ зірчастих клітин Іто у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах при перисинусоїдально-центролобулярному фіброзі печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 200.

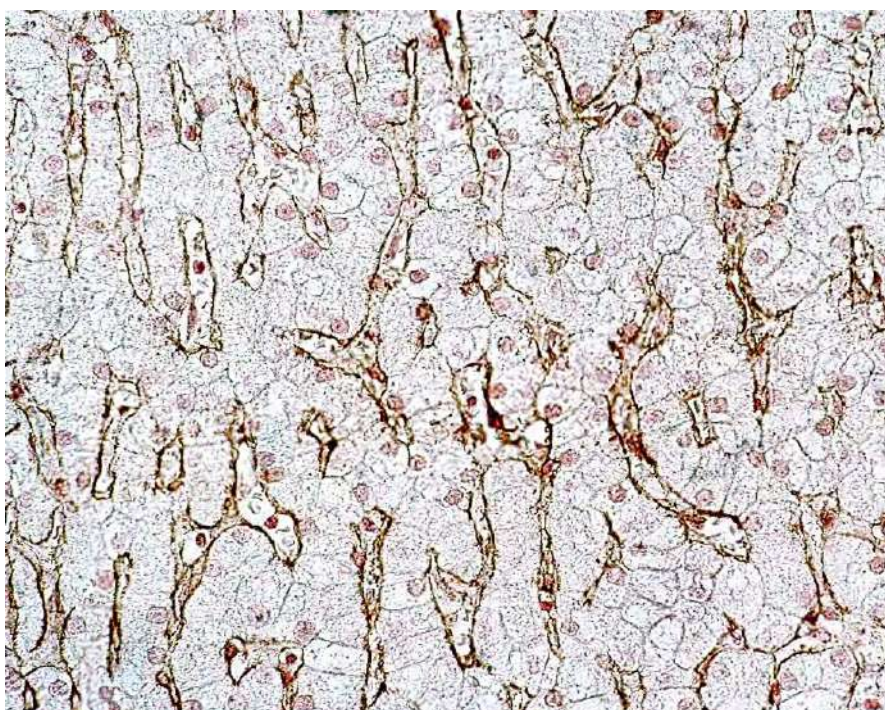


Рис. 4.20. Експресія колагену IV типу у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах при перисинусоїдально-центролобулярному фіброзі печінки. Anti-Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 400.

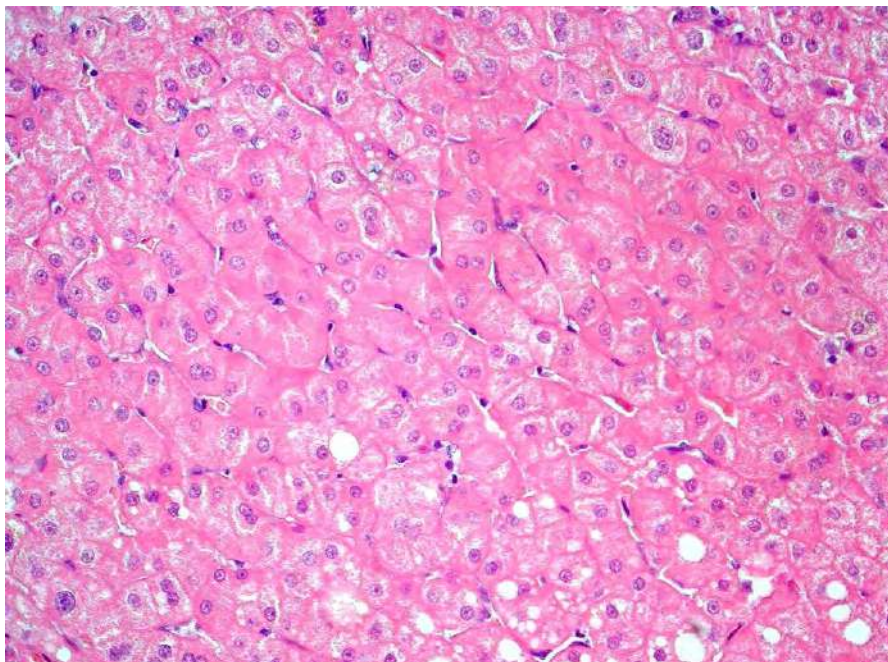


Рис. 4.21. Слабкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: вогнищеве розширення деяких синусоїдів та незначне збільшення кількості клітин Іто подовженої форми в перисинусоїдальних просторах. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

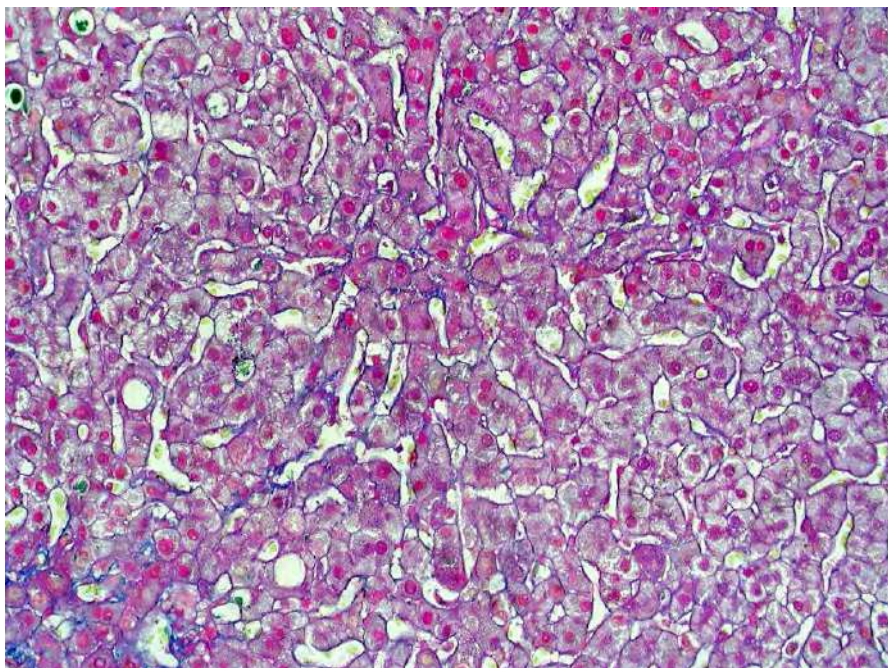


Рис. 4.22. Слабкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: слабкий фіброз внутрішньодолькових синусоїдів. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 200.

внутрішньодолькових синусоїдів печінки. В портальних трактах суттєві зміни не спостерігались у 25% обстежених осіб, у 75% пацієнтів визначався початковий слабо виражений портальний фіброз.

Паралельний ІГХ аналіз показав вогнищеве збільшення кількості α -SMA+ активованих ЗКП у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах (Рис. 4.23), а також зростання числа α -SMA+ ЗКП навколо централобулярних вен (Рис. 4.24) при практичній відсутності α -SMA+ фібробластів в портальних трактах (Рис. 4.23), що свідчило про активацію фіброгенезу в цих зонах, а також слабку внутрішньосинусоїдальну і централобулярну експресію колагену IV типу. В портальних трактах лише подекуди визначались поодинокі α -SMA+ фібробласти при дрібновогнищевому слабкому накопиченні колагену IV типу, або при відсутності експресії колагену IV типу, що свідчило про низьку або взагалі відсутню фіброгенну активність в портальних зонах.

Помірний перисинусоїдально-централобулярний фіброз печінки у хворих на ХВГ С характеризувався фіброзом і колагенизацією 26-50% внутрішньодолькових синусоїдів і слабким або помірним фіброзом централобулярних вен при відсутньому або слабкому фіброзі портальних трактів.

При мікроскопії зрізів печінки, забарвлених гематоксиліном і еозином та трихром-Масон, визначалось помірне розширення значної кількості синусоїдів і централобулярних вен та значне зростання числа перисинусоїдальних ЗКП (Рис. 4.25). У деяких дольках спостерігались зони значного розширення отворів внутрішньодолькових синусоїдів (Рис.4.26). В зрізах печінки, забарвлених за Ван Гізон і трихром-Масон, визначався помірний фіброз централобулярних вен і більш ніж 25% внутрішньодолькових синусоїдів печінки при незначних змінах у портальних трактах. Так, у 1/3 пацієнтів портальні тракти не мали фібротичних змін, у 2/3 хворих спостерігався початковий слабкий або помірний фіброз без

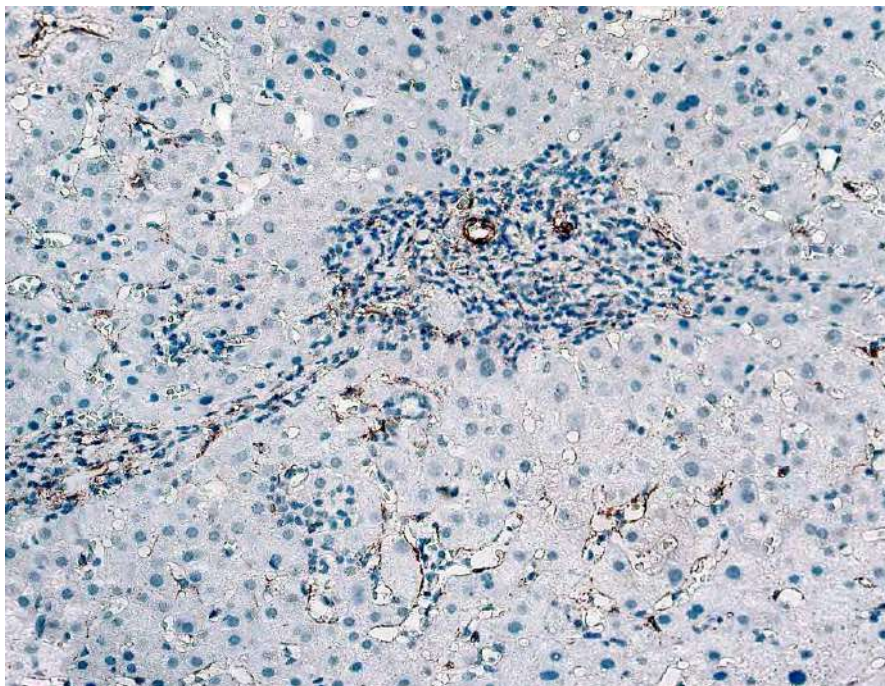


Рис. 4.23. Слабкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: збільшення кількості α -SMA+ зірчастих перисинусоїдальних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах при практичній відсутності α -SMA+ фібробластів в портальних трактах. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 200.

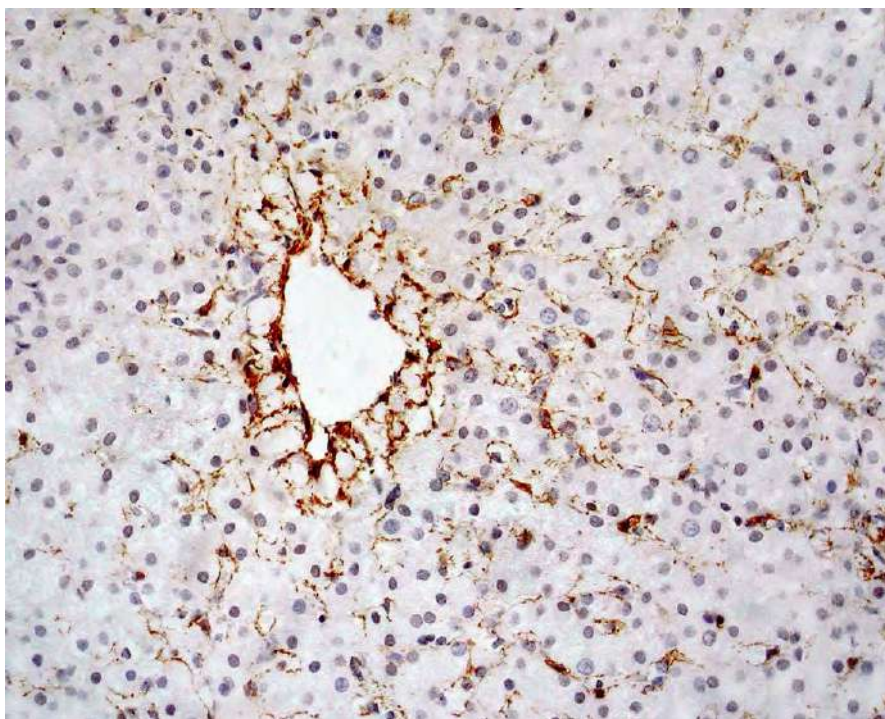


Рис. 4.24. Збільшення кількості α -SMA+ активованих клітин Іто навколо центролобулярної вени і в перисинусоїдальних просторах дольки печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

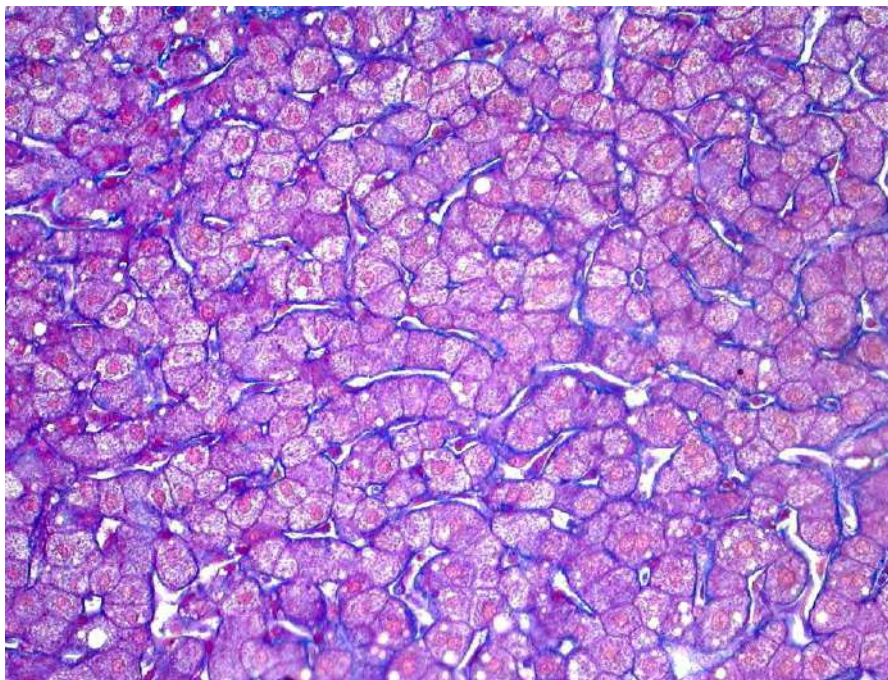


Рис. 4.25. Помірний перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: фіброз і помірне розширення синусоїдів та значне зростання числа перисинусоїдальних клітин Іто. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 400.

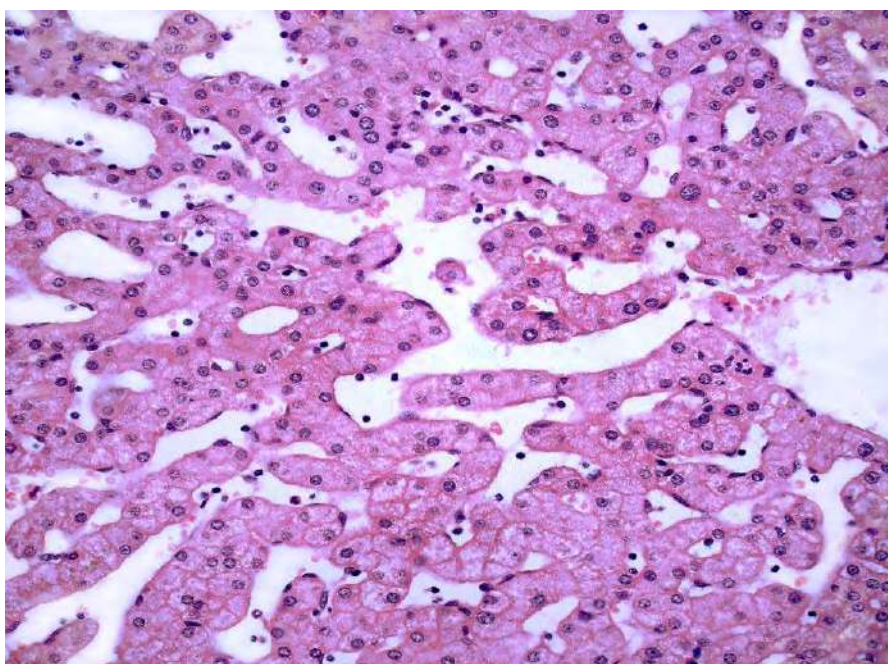


Рис. 4.26. Помірний перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: зона значного розширення отворів внутрішньодолькових синусоїдів (справа в центрі – розширений отвір центролобулярної вени). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 200.

формування сполучнотканинних септ. ІГХ аналіз показав посилення перисинусоїдально-центролобулярної активації утворення колагену і фіброгенезу при слабкій фіброгенній активності в портальних трактах. При застосуванні моноклональних антитіл до α -SMA значна кількість активованих α -SMA+ ЗКП визначалась в більшості внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів при малій кількості α -SMA+ активованих міофібробластів в портальних трактах (Рис.4.27). ІГХ дослідження показало експресію α -SMA в значній кількості активованих ЗКП навколо центролобулярних вен і в перисинусоїдальних просторах дольок печінки (Рис. 4.28). В розширених внутрішньодолькових синусоїдах, які складали 26-50% від усіх синусоїдів, та в розширених центролобулярних венах спостерігалась помірна експресія колагену IV типу, в деяких дольках визначались зони значної колагенізації перисинусоїдальних просторів. В портальних трактах визначалась слабо або помірно розповсюджена експресія колагену IV типу у вигляді вогнищевих його накопичень.

Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки у хворих на ХВГ С характеризувався вираженим фіброзом і поширеною колагенізацією розширених перисинусоїдальних просторів більш ніж у 50% внутрішньодолькових синусоїдів та тяжким фіброзом значно розширених центролобулярних вен.

В зрізах тканини печінки, забарвлених гематоксиліном та еозином, спостерігалось значне розширення внутрішньодолькових синусоїдів та збільшення в 2-5 разів, у порівнянні з нормою, діаметру отворів центролобулярних вен і помірне або значно виражене потовщення їх стінки. В гістологічних препаратах, забарвлених за Ван-Гізон і трихром-Масон, в отворах розширених синусоїдів пристінково виявлялась велика кількість перисинусоїдальних ЗКП, в дольках часто виявлялись лакуноподібно-розширені синусоїди. Значний фіброз перисинусоїдальних просторів більш ніж у 50% синусоїдів або субтотальний перисинусоїдальний фіброз та значно

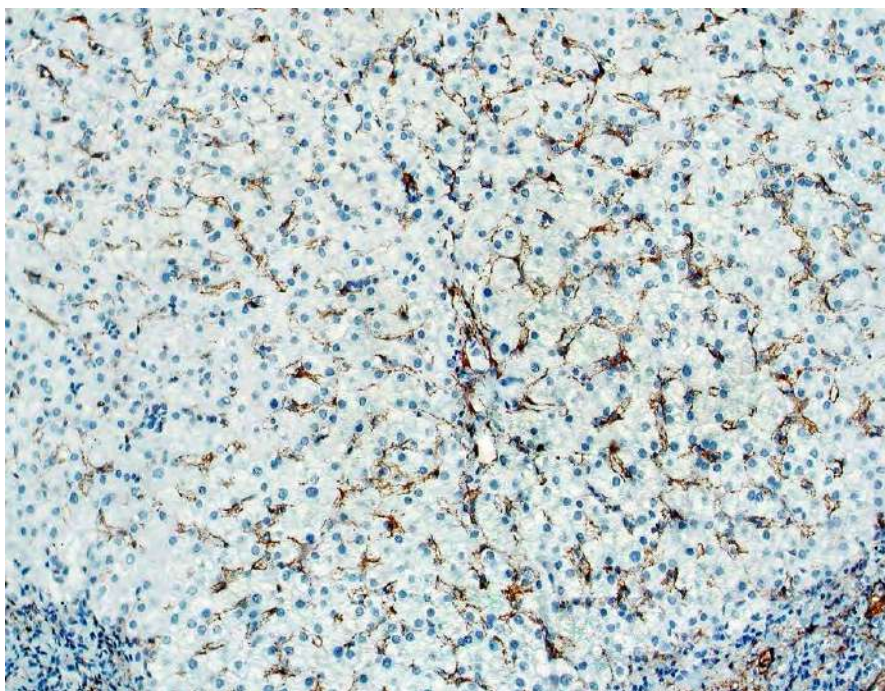


Рис. 4.27. Помірний перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: значна кількість активованих α -SMA+ зірчастих клітин в більшості внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів при малій кількості α -SMA+ фіброblastів в портальних трактах. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 200.

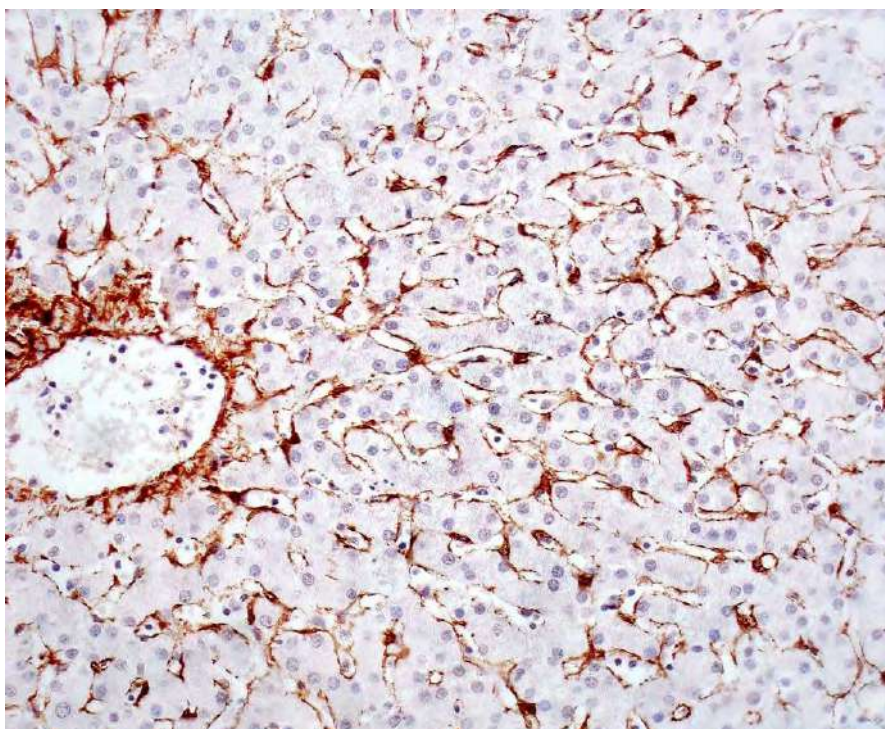


Рис. 4.28. Помірний перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: експресія α -SMA в значній кількості активованих ЗКП навколо центролобулярної вени і в перисинусоїдальних просторах дольки печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

виражена або тяжка фібротизація центролобулярних вен визначались в зрізах, забарвлених за Ван-Гізон і трихром-Масон (Рис. 4.29, рис. 4.30). В портальних трактах спостерігалась імуноклітинна інфільтрація різної інтенсивності та слабкий фіброз без формування септ або з їх наявністю.

Імуногістохімічний аналіз із застосуванням моноклональних антитіл до α -SMA виявив велику кількість α -SMA⁺ активованих перисинусоїдальних клітин Іто практично у всіх розширених синусоїдах та експресію α -SMA в активованих ЗКП навколо центролобулярних вен (Рис. 4.31, рис. 4.32А). З цим контрастувала незначна кількість α -SMA⁺ активованих фібробластів в портальних трактах (Рис. 4.31).

Імуногістохімічні дослідження підтвердили, що навколо значно потовщених і розширених центролобулярних вен виявляється велика кількість α -SMA⁺ перисинусоїдальних клітин, які утворюють циркулярне муфтоподібне потовщення (Рис. 4.32А). Активація синтезу колагену і інших компонентів ПКМ цими клітинами веде до утворення потовщеної фіброзної муфти навколо центролобулярної вени, яке виявляється при гістохімічному забарвленні за Ван-Гізон і трихром-Масон (Рис. 4.32Б).

При дослідженні експресії колагену IV типу спостерігалась значна колагенізація і потовщення перисинусоїдальних просторів у 50-100% внутрішньодолькових синусоїдів (Рис. 4.33), а також колагенізація потовщених стінок розширених центролобулярних вен. При тяжкій колагенізації перисинусоїдальних просторів визначались локуси облітерації синусоїдальних отворів, щільно заповнених колагеном, а також зони значного лакуноподібного розширення синусоїдів (Рис. 4.34). Колаген IV типу спостерігався в невеликій кількості в портальних трактах у вигляді вогнищевих відкладень.

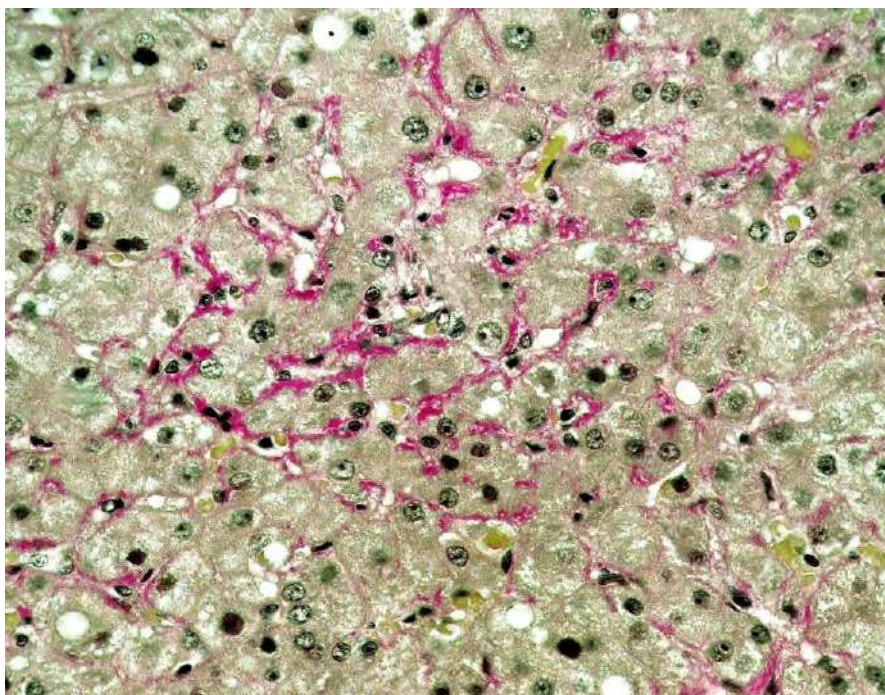


Рис. 4.29. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: значний фіброз розширених синусоїдів та збільшення кількості клітин Іто в перисинусоїдальних просторах. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 600.

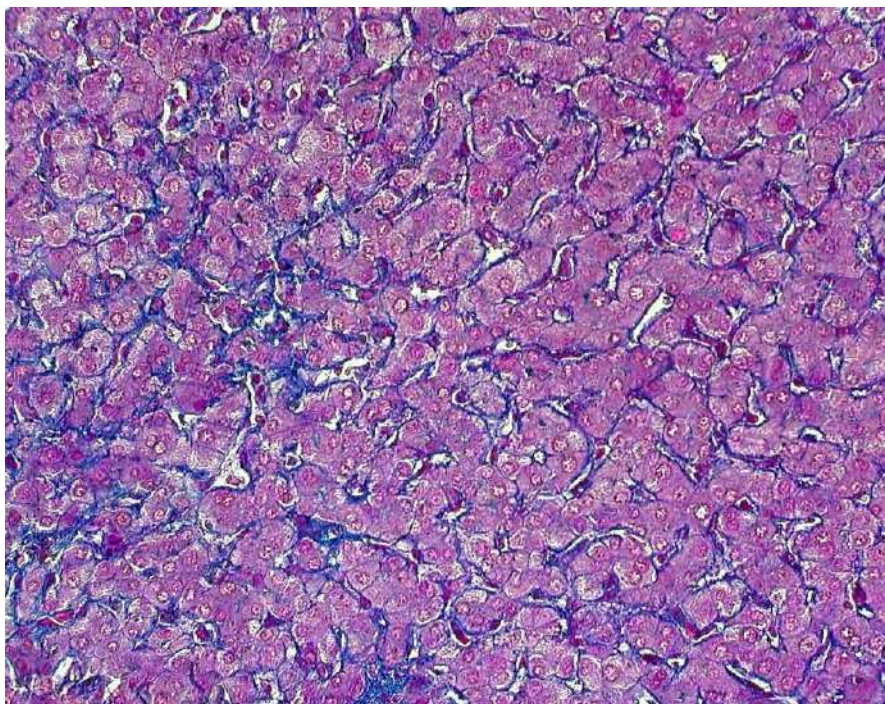


Рис. 4.30. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: значний фіброз розширених синусоїдів та збільшення кількості клітин Іто в перисинусоїдальних просторах. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 400.

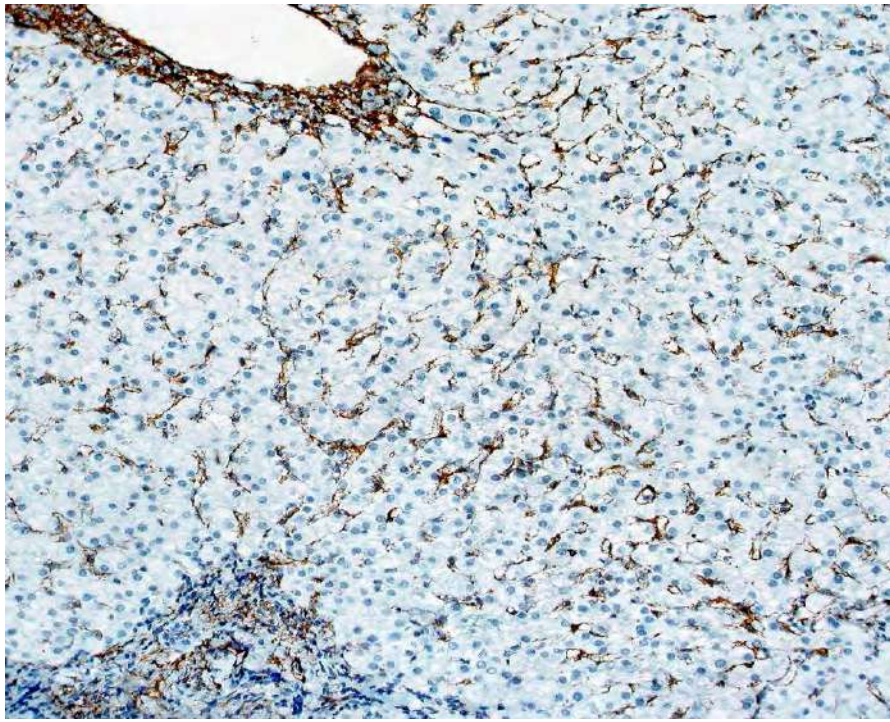


Рис. 4.31. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: виражена експресія α -SMA в значній кількості активованих зірчастих клітин навколо центролобулярної вени і в перисинусоїдальних просторах дольки печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 100.

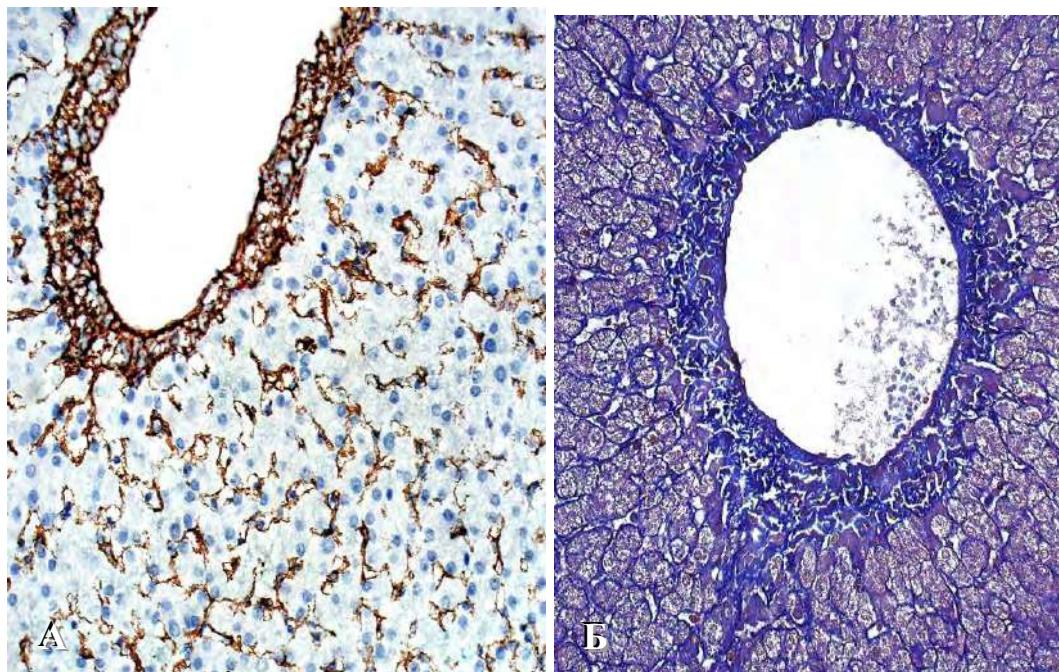


Рис. 4.32. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: А – виражена експресія α -SMA в значній кількості активованих ЗКП навколо центролобулярної вени і в перисинусоїдальних просторах. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Б – тяжкий фіброз центролобулярної вени і значний фіброз перисинусоїдальних просторів. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. x 200.

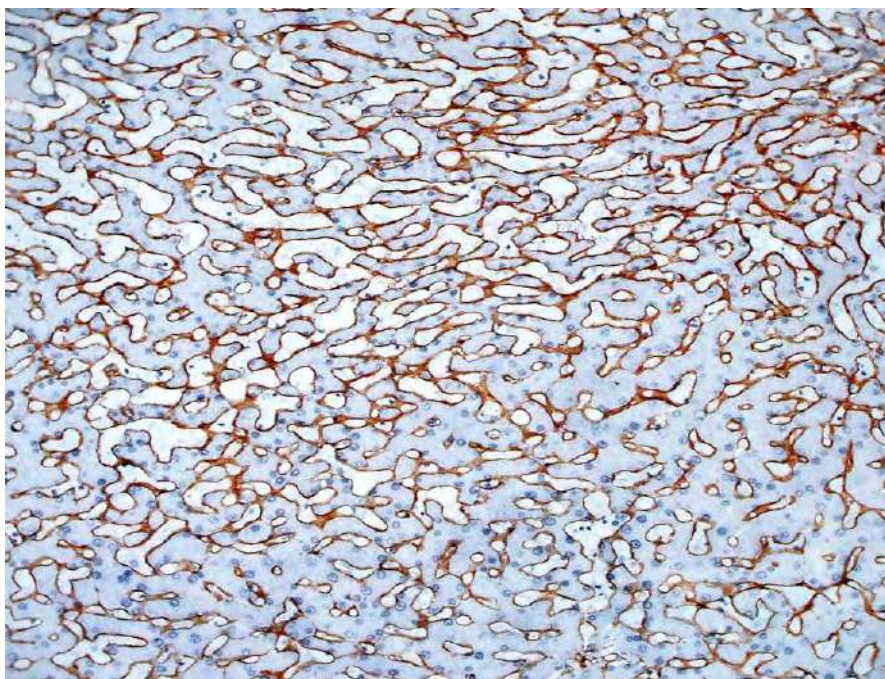


Рис. 4.33. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: значна експресія колагену IV типу в більшості розширених перисинусоїдальних просторів дольки печінки. Anti-Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 200.

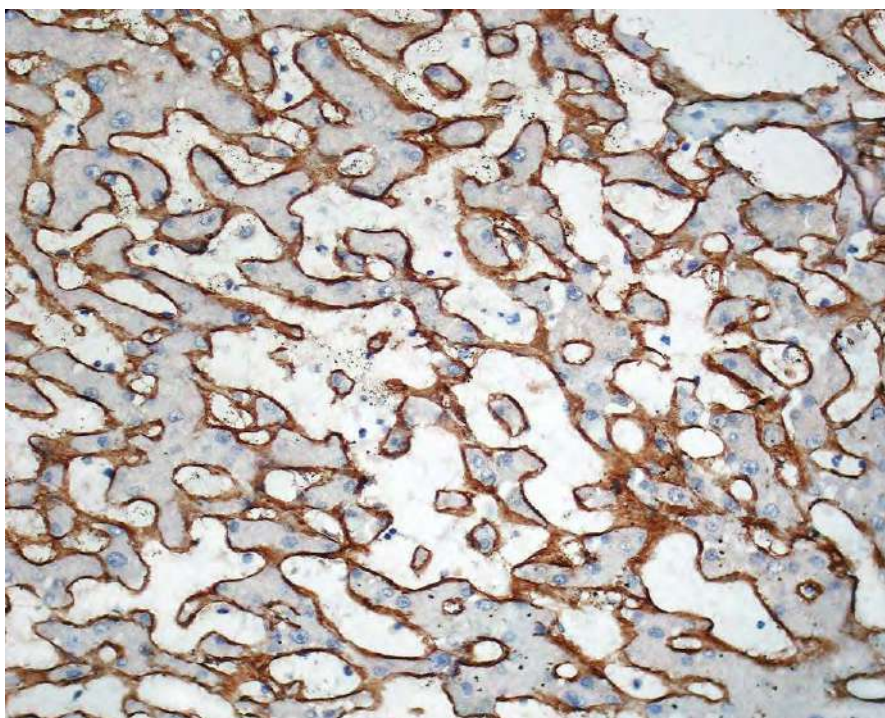


Рис. 4.34. Тяжкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки: експресія колагену IV типу і значна колагенізація лакуноподібно розширених перисинусоїдальних просторів дольки печінки. Anti-Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 400.

4.3. Патогістологічна, гістохімічна і імуногістохімічна характеристика змішаного фіброзу печінки

Комплексе патоморфологічне, гістохімічне і імуногістохімічне дослідження гепатобіоптатів хворих на ХВГ С показало, що змішаний фіброз проявляється фіброзом портальних трактів з фіброзними септами і водночас перисинусоїдально-центролобулярним фіброзом печінки (Рис.4.35). Про це свідчить накопичення колагену IV типу та наявність α -SMA+ ЗКП у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах, навколо центролобулярних вен і в портальних трактах (Рис.4.36). В більшості випадків у хворих на ХВГ С змішаний портально-септальний і перисинусоїдально-центролобулярний фіброз, за виразністю проявів розцінюється як помірний або тяжкий фіброз печінки.

Вірогідно, існує два шляхи розвитку змішаного типу фіброзу печінки: відбувається трансформація слабого переважно портально-септального чи перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу в змішаний помірний і тяжкий фіброз печінки, або змішаний фіброз починається з самого початку з колагенізації синусоїдів і портальних трактів.

Про вірогідність першого варіанту морфогенезу свідчить те, що у одних хворих з помірним змішаним фіброзом спостерігаються окремі дольки з перисинусоїдально-центролобулярним фіброзом, а у інших хворих визначаються ділянки портально-септального фіброзу, що не виключає можливості прогресування під впливом цитокінової активації початкового перисинусоїдально-центролобулярного або портально-септального фіброзу в помірний або тяжкий змішаний фіброз.

При другому морфогенетичному варіанті змішаного фіброзу печінки з самого початку спостерігається слабка, але одночасна активація α -SMA+ ЗКП різної локалізації: фіброгенних фібробластів в портальних трактах і фіброгенних зірчастих клітин Іто в перисинусоїдальних просторах і навколо центролобулярних вен, що призводить до одночасної активації фіброгенезу в



Рис. 4.35. Змішаний помірний портально-септальний і перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки при ХВГ С. Червоне забарвлення фіброзу за Ван-Гізон 3б. х 100.

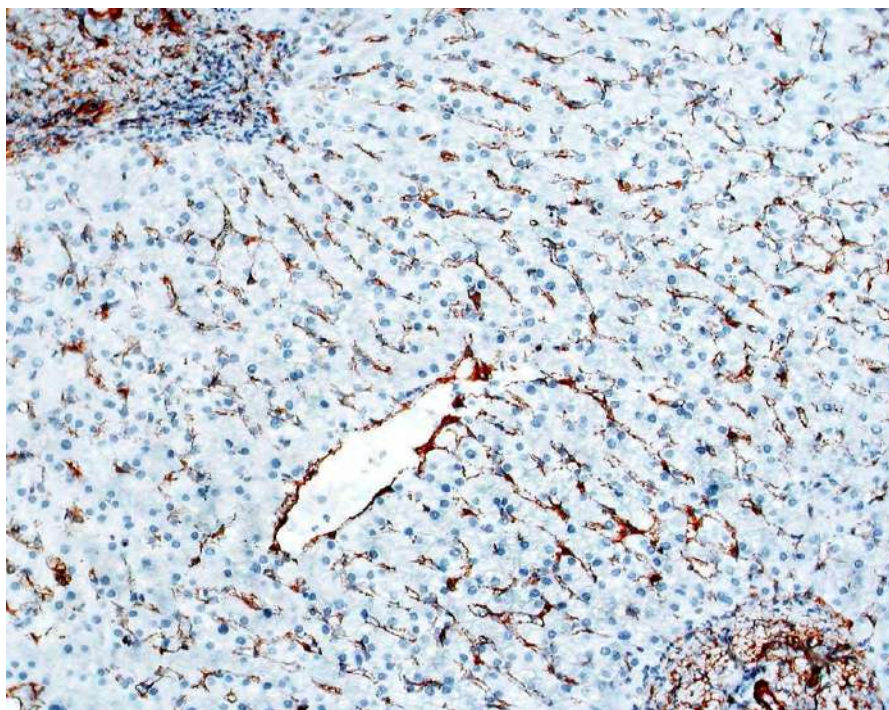


Рис. 4.36. Змішаний помірний фіброз печінки: наявність α -SMA+ зірчастих клітин Іто у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах, навколо центролобулярної вени і в портальних трактах. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 200.

портальних трактах і у внутрішньодолькових перисинусоїдально-центролобулярних просторах печінки (Рис. 4.37).

Помірний змішаний фіброз печінки характеризувався фіброзом помірно потовщених портальних трактів з різною кількістю портально-долькових сполучнотканинних септ, помірним фіброзом стінки центролобулярних вен та до 50% перисинусоїдальних просторів внутрішньодолькових синусоїдів, що визначалось при мікроскопії мікропрепаратів, забарвлених за Ван-Гізон і трихром-Масон (Рис.4.38).

При імуногістохімічному аналізі з моноклональними антитілами до α -SMA спостерігалась помірна кількість α -SMA+ ЗКП у перисинусоїдальних просторах до 50% внутрішньодолькових синусоїдів і навколо центролобулярних вен, а також помірне число α -SMA+ фібробластів в потовщених портальних трактах та у портально-долькових фіброзних септах (Рис. 4.39). За експресією колагену IV типу визначалась помірна колагенізація потовщених портальних трактів і портально-долькових септ різної товщини, а також перисинусоїдальних просторів не менш ніж 25%–50% внутрішньодолькових розширених синусоїдів (Рис. 4.40). ІГХ дослідження колагену IV типу встановило нерівномірний рівень його накопичення в різних компартментах печінки. Так, в частині дольок спостерігалось значне перисинусоїдальне накопичення колагену орієнтовно у 50% синусоїдів і помірна колагенізація портальних трактів і центролобулярних вен. В інших ділянках печінки визначалось вогнищеве помірне або значне накопичення колагену в портальних трактах при відносно слабкій колагенізації 25% внутрішньодолькових синусоїдів. Спостерігалась також слабка або помірна лімфоцитарна інфільтрація портальних трактів, формування імуноклітинних «ступінчастих некрозів», у дольках визначались вогнища імуноцитарного кілінгу, незначне розширення центролобулярних вен, і подекуди – слабка лімфоцитарна інфільтрація синусоїдів печінки.

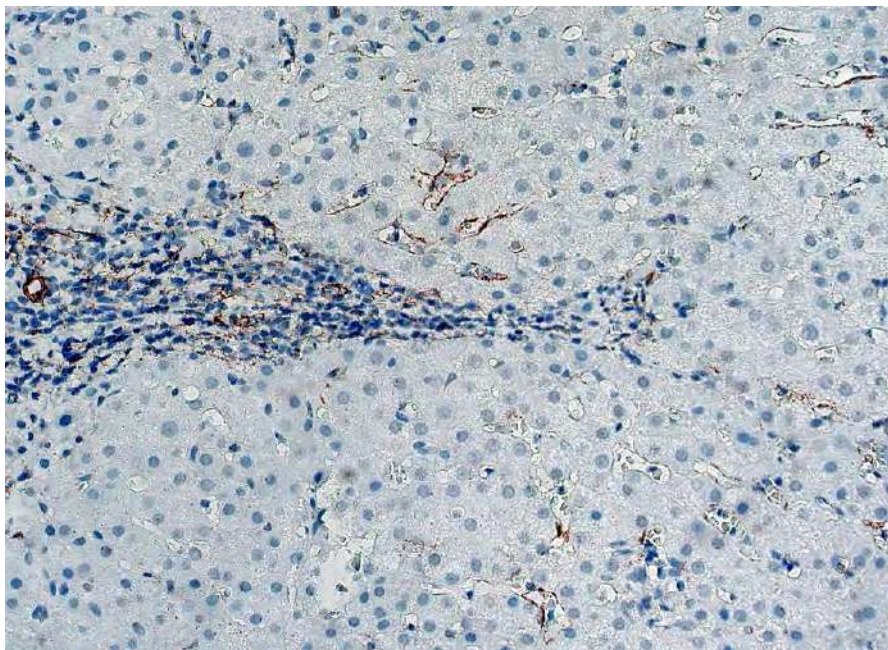


Рис. 4.37. Слабкий змішаний фіброз печінки: невелика кількість α -SMA+ зірчастих клітин Іто у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах і α -SMA+ фібробластів в портальному тракті. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

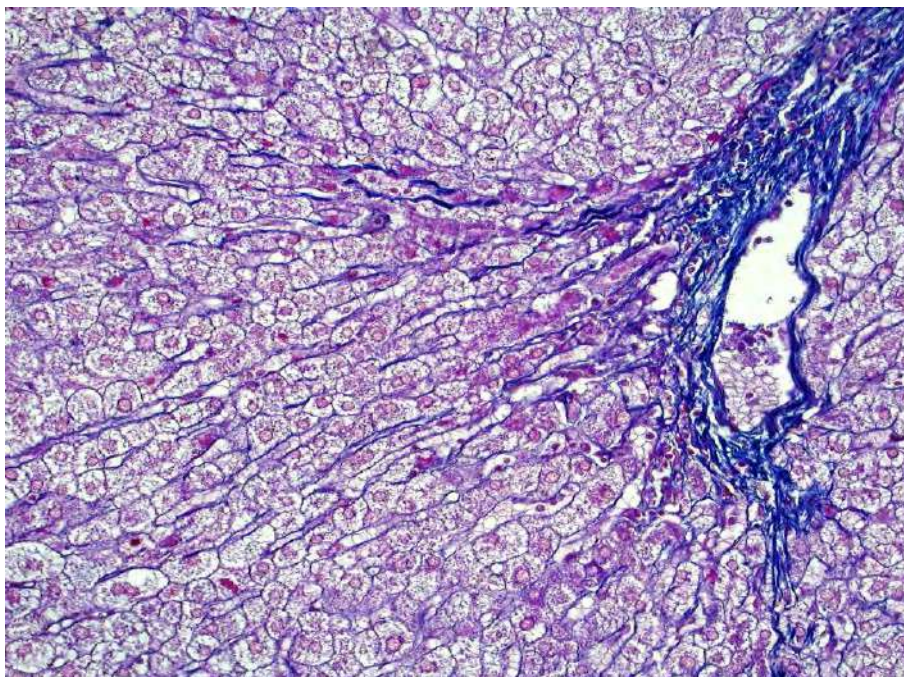


Рис. 4.38. Помірний портально-септальний і перисинусоїдальний фіброз печінки. Синє забарвлення фіброзу методом трихром-Масон. Зб. х 400.

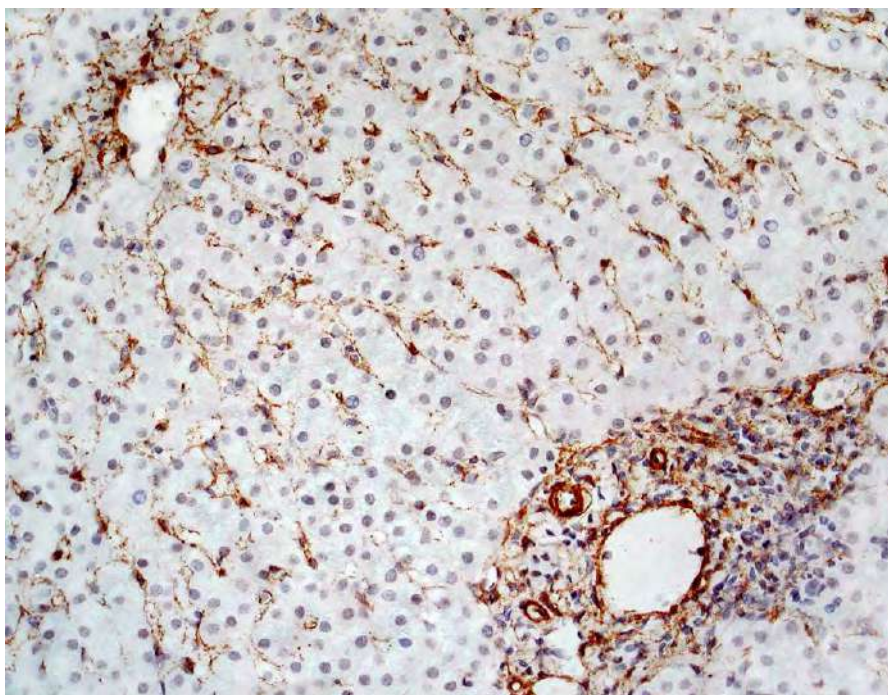


Рис. 4.39. Помірний змішаний фіброз печінки: помірна кількість α -SMA+ зірчастих клітин Іто у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах і навколо централобулярної вени, помірне число α -SMA+ фіброblastів в портальному тракті. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 400.

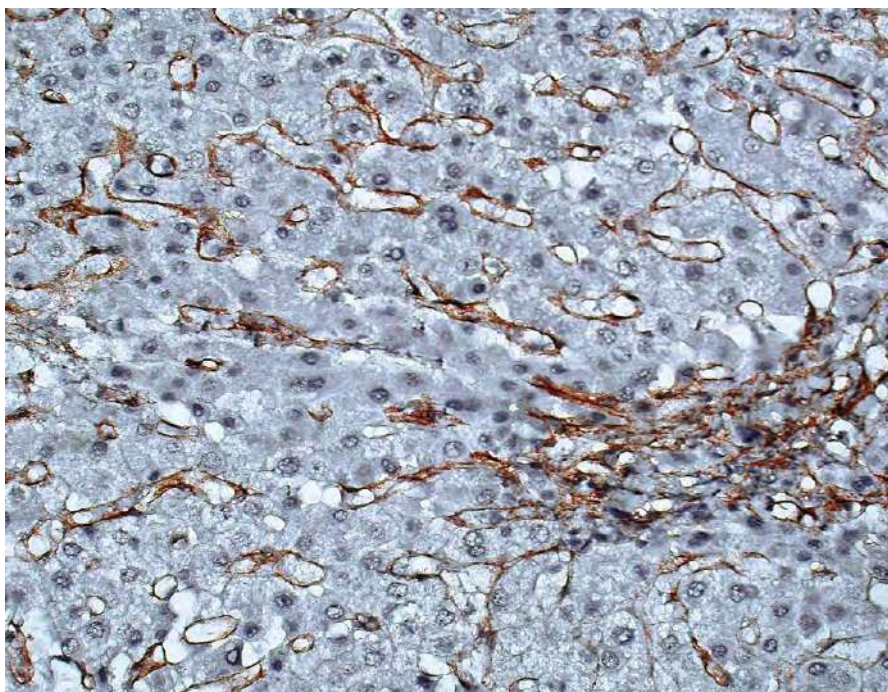


Рис. 4.40. Помірний змішаний фіброз печінки: помірна експресія колагену IV типу у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах розширених синусоїдів та у портальному тракті. Anti-Cillagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 600.

Тяжкий змішаний фіброз печінки характеризувався фіброзом значно потовщених порталних трактів, фіброзом портално-долькових септ різної товщини і довжини, портално-центральных септ та портално-портальных мостоподібних септ, фіброзом значно потовщених централобулярних вен та фіброзом перисинусоїдальних просторів у 50% – 100% внутрішньодолькових синусоїдів (Рис. 4.41, 4.42). До такого типу фіброзу не відносився тяжкий змішаний фіброз печінки з утворенням псевдодольок.

При ІГХ дослідженні визначалась значна кількість перисинусоїдальних α -SMA+ зірчастих клітин Іто у 50% – 100% розширених внутрішньодолькових синусоїдів, а також велике число α -SMA+ фібробластів в потовщених порталних трактах, в портално-долькових, портално-центральных і мостоподібних фіброзних септах (Рис. 4.43). В дольках реєструвалось значне збільшення кількості α -SMA+ активованих перисинусоїдальних клітин навколо потовщених і розширених централобулярних вен.

Значне накопичення колагену IV типу спостерігалось в потовщених порталних трактах, в потовщених портално-долькових і портално-центральных сполучнотканинних септах, а також в перисинусоїдальних просторах переважної більшості внутрішньодолькових синусоїдів і в стінках потовщених централобулярних вен (Рис. 4.44).

В мікропрепаратах печінки, забарвлених гематоксиліном та еозином, а також при імуногістохімічному виявленні колагену IV типу у хворих на ХВГ С визначалось суттєве розширення більшості внутрішньодолькових синусоїдів, вогнищеві злиття і варикозні розширення їх отворів. Навіть при такому тяжкому фіброзі у частини хворих спостерігалась дифузна або фолікулоподібна інфільтрація імуніцитами потовщених порталних трактів, різна кількість перипортальных імуніклітинних «ступінчастих некрозів» та сегментарна лімфоцитарна інфільтрація деяких синусоїдів.

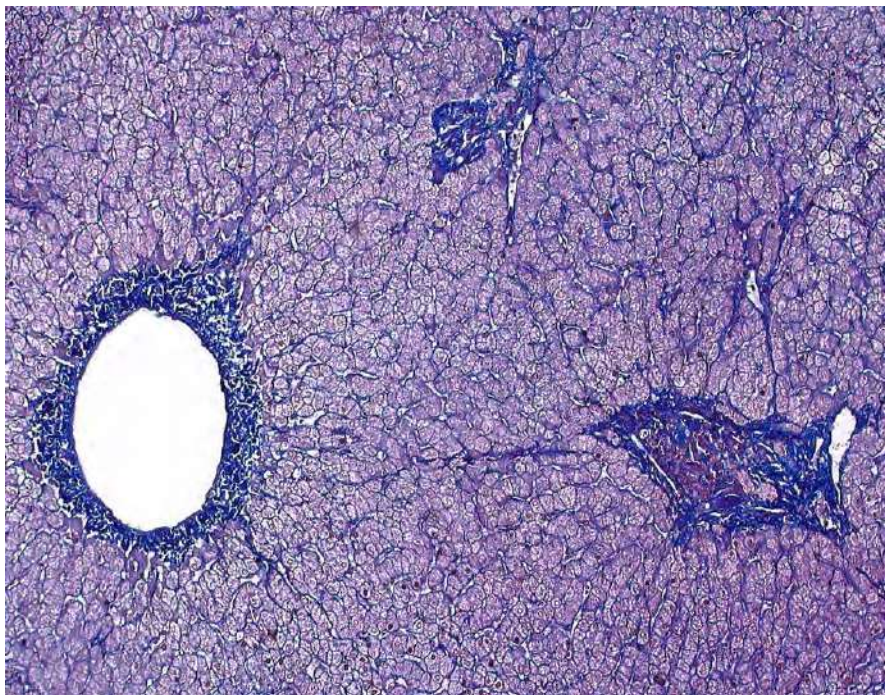


Рис. 4.41. Тяжкий змішаний портально-септальний і перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки при ХВГ С. Синє забарвлення фіброзу методом трихром-Масон. Зб. х 100.

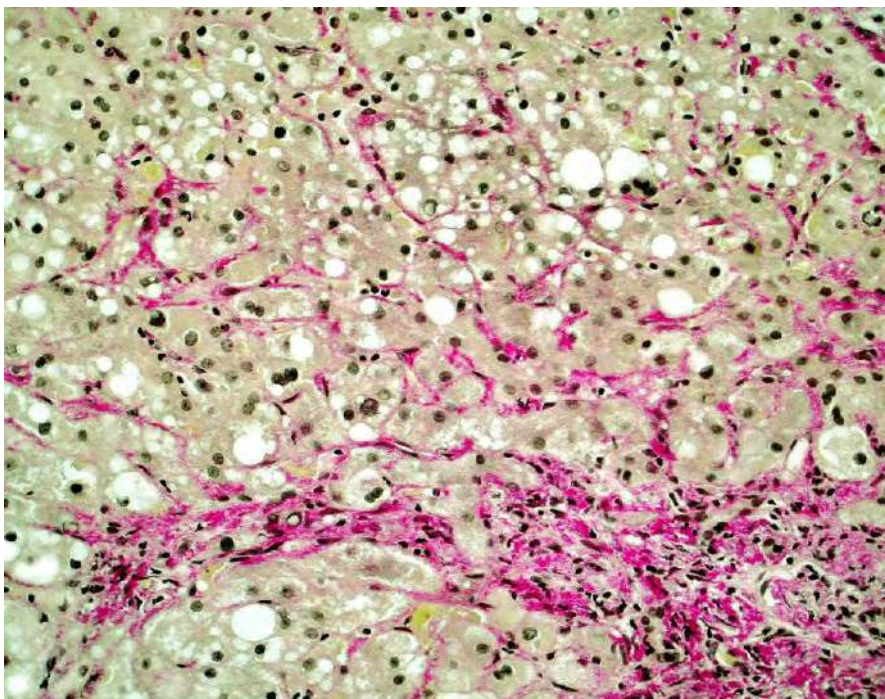


Рис. 4.42. Тяжкий змішаний фіброз портального тракту, товстої портально-долькової септи і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів. Червоне забарвлення фіброзу за Ван-Гізон Зб. х 400.

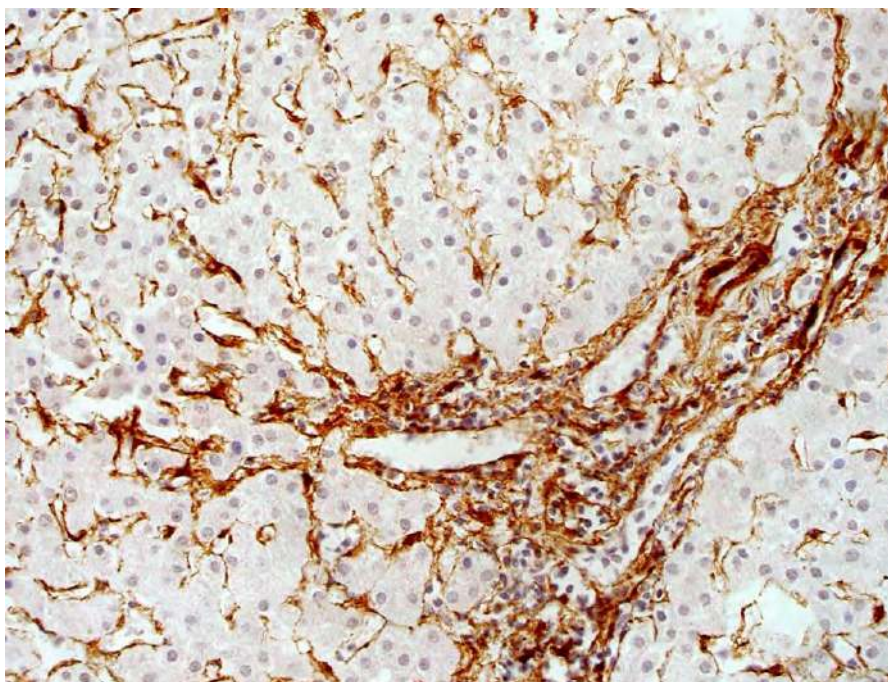


Рис. 4.43. Тяжкий змішаний фіброз печінки: значна кількість α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто у розширених внутрішньодолькових синусоїдах і у потовщеному портальному тракті. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

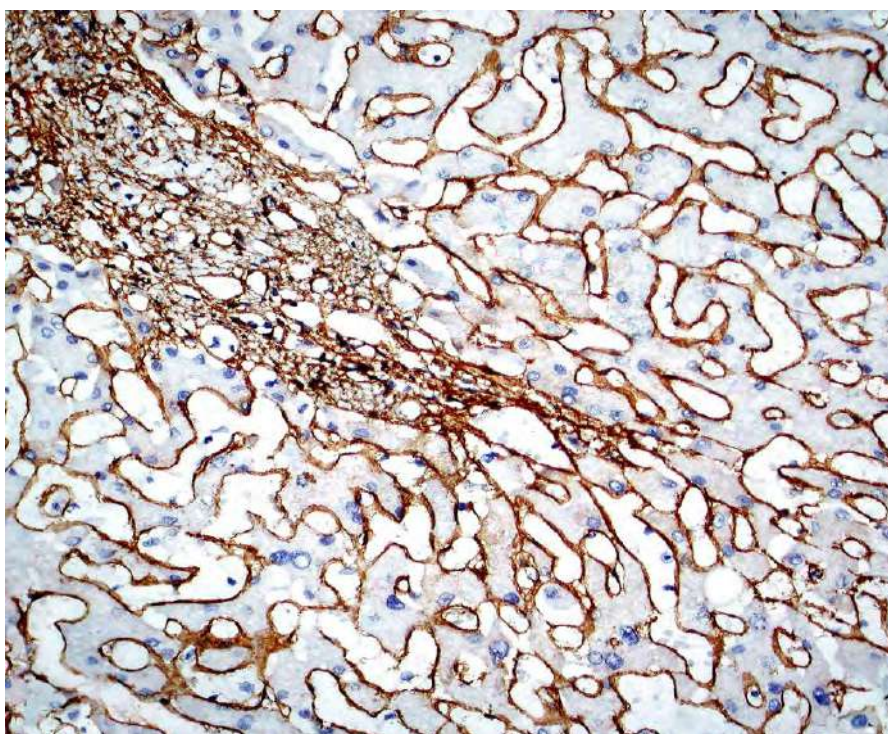


Рис. 4.44. Тяжкий змішаний фіброз печінки: виражена експресія колагену IV типу у перисинусоїдальних просторах значно розширених внутрішньодолькових синусоїдів та у потовщеному портальному тракті. Anti-Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

4.4. Патоморфологічна характеристика periцелюлярного фіброзу печінки

Проведені імуногістохімічні і гістохімічні дослідження показали, що внутрішньодольковий periцелюлярний фіброз навколо гепатоцитів є різновидом перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу і виникає у хворих на ХВГ С зі стеатозом печінки. З патоморфологічних позицій стеатоз печінки при ХВГ С характеризується значною дрібно-крупновакуольною дистрофією гепатоцитів, наявністю в дольках вогнищ значного дрібновакуольного стеатозу гепатоцитів, які трансформуються в дрібні стеатокісти (Рис. 4.45А,Б). Стеатоз гепатоцитів ініціює імуноклітинний кілінг і апоптоз гепатоцитів, а високий рівень ліпополісахаридів в крові і зростання перекисного окислення ліпідів в гепатоцитах активує макрофаги Купфера. При ІГХ аналізі з'ясовано, що перисинусоїдальні CD68+ макрофаги мігрують до гепатоцитів зі значним крупновакуольним стеатозом, посилюють фагоцитарну активність і при цьому значно збільшуються в розмірах. Найбільш яскраво цей процес виражений у вогнищах формування стеатокіст (Рис. 4.46), в яких рано починається розвиток вогнищового periцелюлярно-перисинусоїдального фіброзу навколо стеатокіст та гепатоцитів зі значною дрібновакуольною жировою дистрофією. Цей процес спостерігається у мікропрепаратах, забарвлених за Ван-Гізон і трихром-Масон (Рис. 4.48 А). В печінці також з'являються зони зі збільшеною кількістю α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто (Рис. 4.47) і поступово формується значний і розповсюджений в дольках печінки periцелюлярний фіброз, який виявляється при забарвленні мікропрепаратів за Ван-Гізон і трихром-Масон (Рис. 4.48 Б).

Таким чином, на відмінність від упорядковано розповсюдженого перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу, periцелюлярно-дольковий фіброз розвивається як вогнищевий процес в осередках максимального стеатозу гепатоцитів і утворення дрібних стеатокіст з подальшим субтотальним внутрішньодольковим прогресуванням.

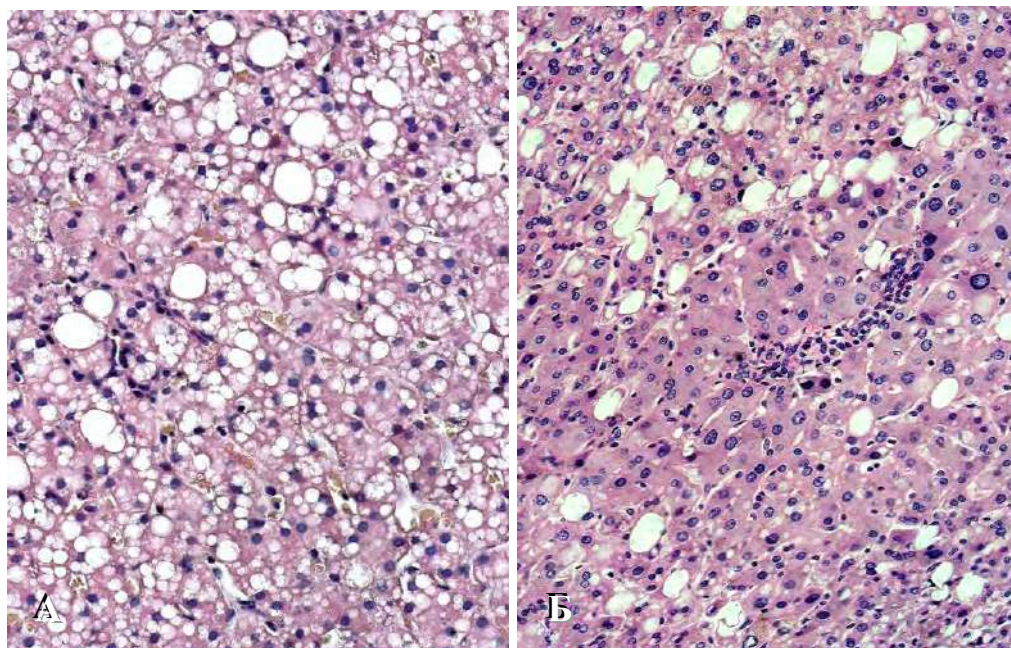


Рис. 4.45. Значно виражена дрібно-крупновакуольна дистрофія гепатоцитів (А) та дрібні стеатокісти (Б) при стеатозі печінки у хворого на ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200.

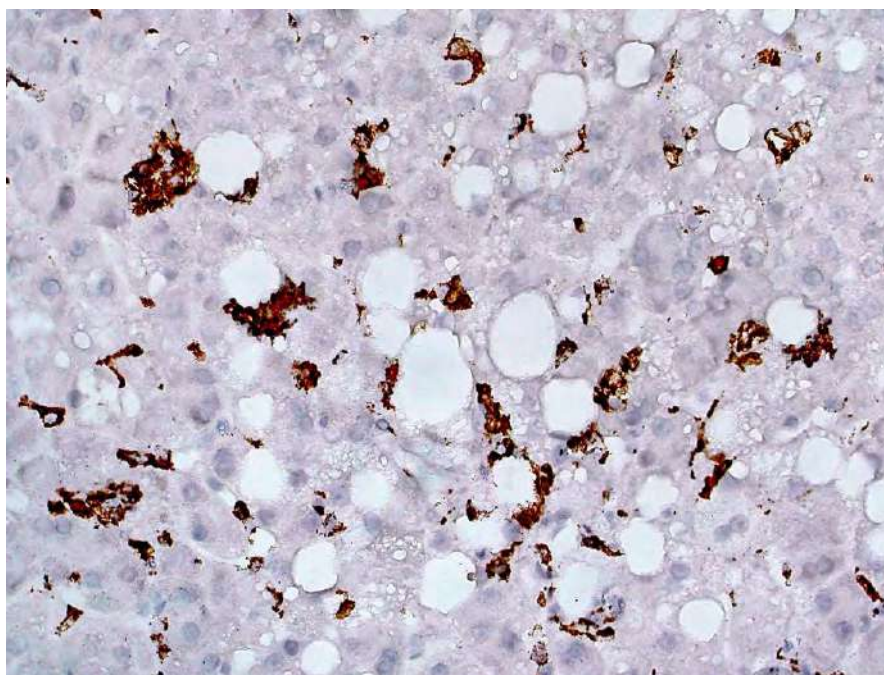


Рис. 4.46. Збільшення кількості і розмірів CD68+ макрофагів, що фагоцитують, у вогнищі формування стеатокіст. Anti-CD68, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

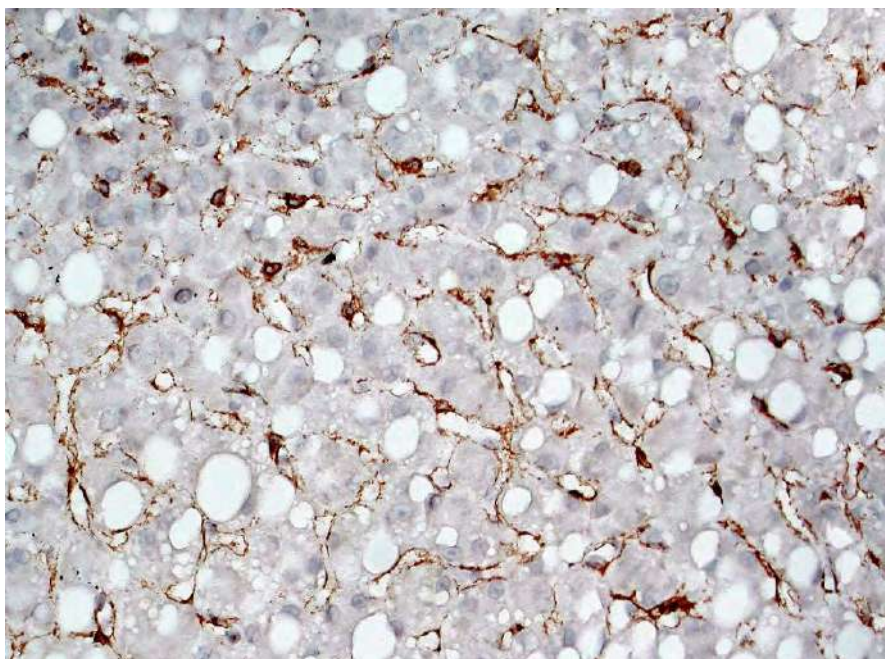


Рис. 4.47. Збільшення кількості α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто при стеатозі гепатоцитів у хворого на ХВГ С. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

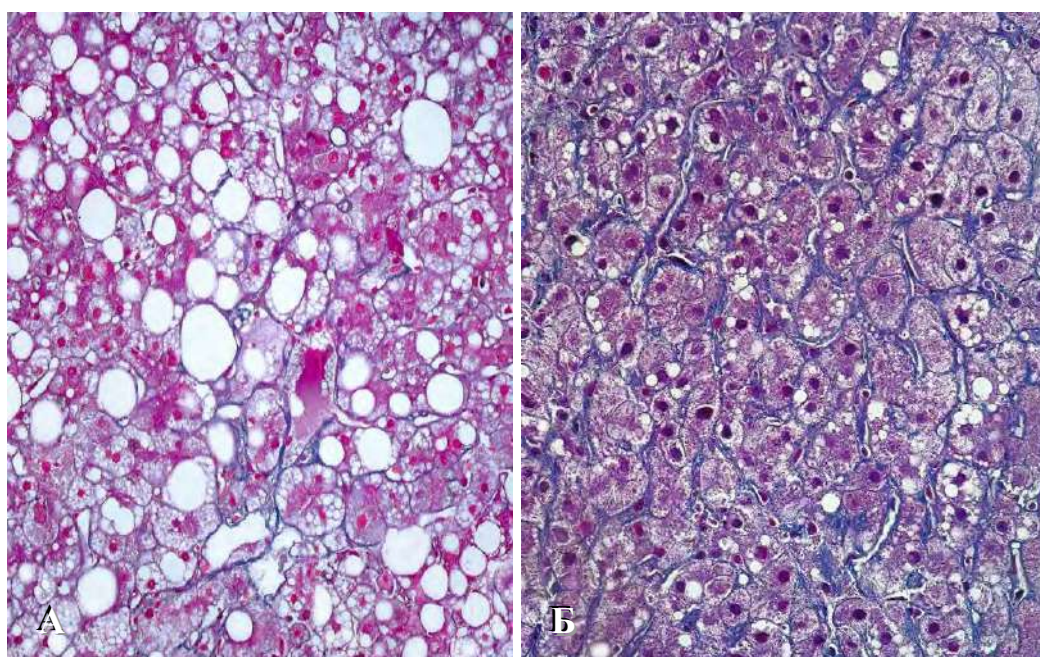


Рис. 4.48. А – початок вогнищового перицелюлярно-перисинусоїдального фіброзу у вогнищі дрібних стеатокіст; Б – значно виражений перицелюлярно-перисинусоїдальний фіброз печінки при стеатозі гепатоцитів у хворого на ХВГ С. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 400.

Висновки. Результати паралельних патогістологічних, гістохімічних і імуногістохімічних досліджень показали, що у хворих на хронічний вірусний гепатит С розвивається три типи фіброзу печінки: портально-септальний, перисинусоїдально-центролобулярний і змішаний (портально-септальний та перисинусоїдально-центролобулярний). Різновидом перисинусоїдального внутрішньодолькового фіброзу є перицелюлярний фіброз навколо гепатоцитів у хворих на ХВГ С зі стеатозом печінки.

Перисинусоїдально-центролобулярний фіброз характеризується переважанням значного фіброзу центролобулярних вен і перисинусоїдальних просторів над незначним фіброзом портальних трактів внаслідок надмірного синтезу молекул ПКМ, 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.

За сукупністю гістологічних, гістохімічних і імуногістохімічних ознак, які виявляються в біоптатах печінки у хворих на ХВГ С, перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки розподіляється на слабкий, помірний і тяжкий. Слабкий перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки характеризується слабковираженою вогнищевою або дифузною колагенизацією до 25% внутрішньодолькових синусоїдів і початковим слабким фіброзом стінки центролобулярних вен при відсутності або початково 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 колагенізації перисинусоїдальних просторів в дольках печінки внаслідок надмірного синтезу молекул ПКМ, колагену IV і I типу активованими α -SMA+ фібробластами, 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 α -SMA+ ЗКП у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах, навколо центролобулярних вен і в портальних трактах. В більшості випадків у хворих на ХВГ С змішаний портально-септальний і перисинусоїдально-центролобулярний фіброз за виразністю проявів розцінюється як помірний або тяжкий фіброз печінки.

Внутрішньодольковий перицелюлярний фіброз формується у вогнищах значного дрібновакуольного стеатозу гепатоцитів, які трансформуються в дрібні стеатокісти. При ІГХ аналізі з'ясовано, що перисинусоїдальні CD68+ макрофаги мігрують до гепатоцитів зі значним крупновакуольним стеатозом, посилюють фагоцитарну активність і при цьому значно збільшуються в розмірах. В печінці також з'являються зони зі збільшеною кількістю α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто і поступово формується значний і розповсюджений в дольках печінки перицелюлярний фіброз.

Матеріали розділу відображені у статтях та тезах: [182], [184], [188].

РОЗДІЛ 5

ПАТОГІСТОЛОГІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОЗНАКИ ІМОВІРНОГО ПРОГРЕСУВАННЯ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

Проведені комплексні патогістологічні, гістохімічні, комп'ютерно-морфометричні і імуногістохімічні дослідження показали, що головними прогностичними ознаками імовірного прогресування фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є поява в гепатобіоптаті вираженої імуноклітинної деструкції печінки та значного вогнищового цитолізу гепатоцитів, проліферація і збільшення кількості фіброгенних ЗКП в дольках та активованих фібробластів в портальних трактах, поява активних фіброзних септ, а також прогресування значного дрібно-крупновакуольного стеатозу та стеатокіст при стеатогепатозі.

5.1. Імуноклітинна деструкція дольок і фіброз печінки

Активація імуноклітинної деструкції печінки у хворих на ХВГ С морфологічно проявляється проникненням з портальних трактів в дольки імуноклітинних інфільтратів, які займають в дольках велику площу або мають вигляд розгалужених ланцюгів (Рис. 5.1, 5.2). В гістологічних препаратах частіше за все імуноклітинні інфільтрати зв'язані з портальним трактом тонким клітинним ланцюжком (Рис. 5.1, 5.2), інколи такий зв'язок не простежується. ІГХ аналіз клітинного складу таких інфільтратів показав наявність в них CD8⁺ Т-кілерів (Рис. 5.3), CD68⁺ макрофагів з мікроскопічними ознаками активного фагоцитозу (Рис. 5.4), а також поодиноких α -SMA⁺ зірчастих клітин і CD20⁺ В-лімфоцитів.

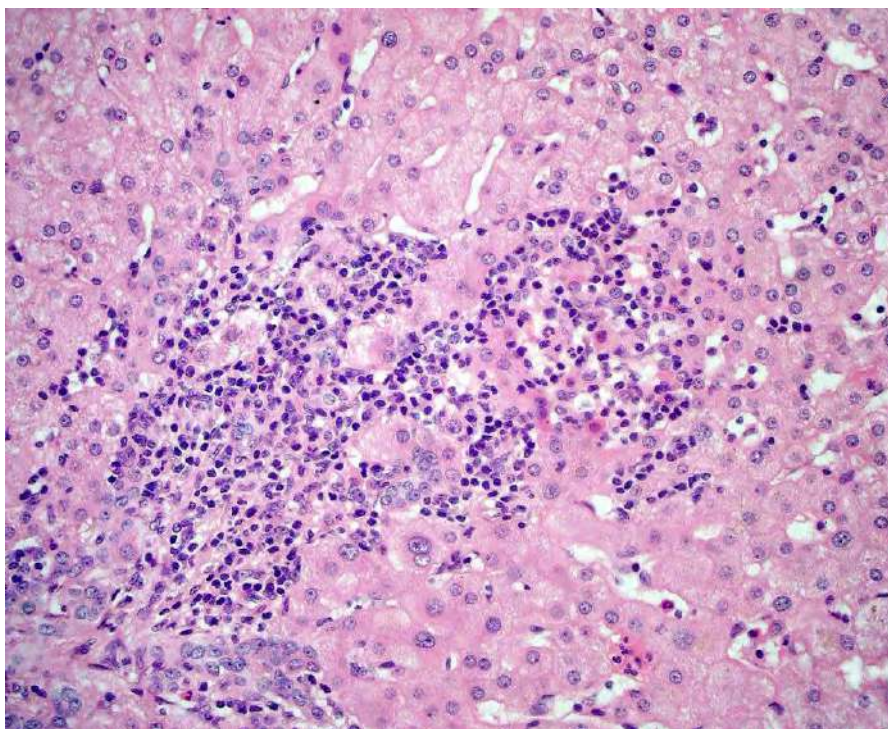


Рис. 5.1. Великий за площею імуноклітинний інфільтрат в дольці печінки з наявністю апоптотично змінених гепатоцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

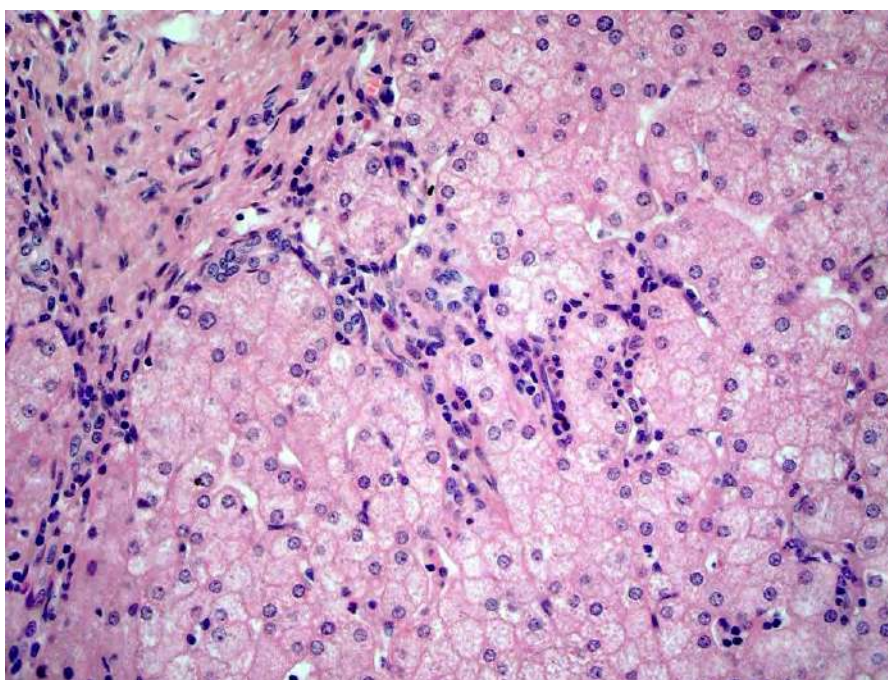


Рис. 5.2. Імуноклітинний інфільтрат в дольці печінки у вигляді розгалужених клітинних ланцюгів з наявністю апоптотично змінених гепатоцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

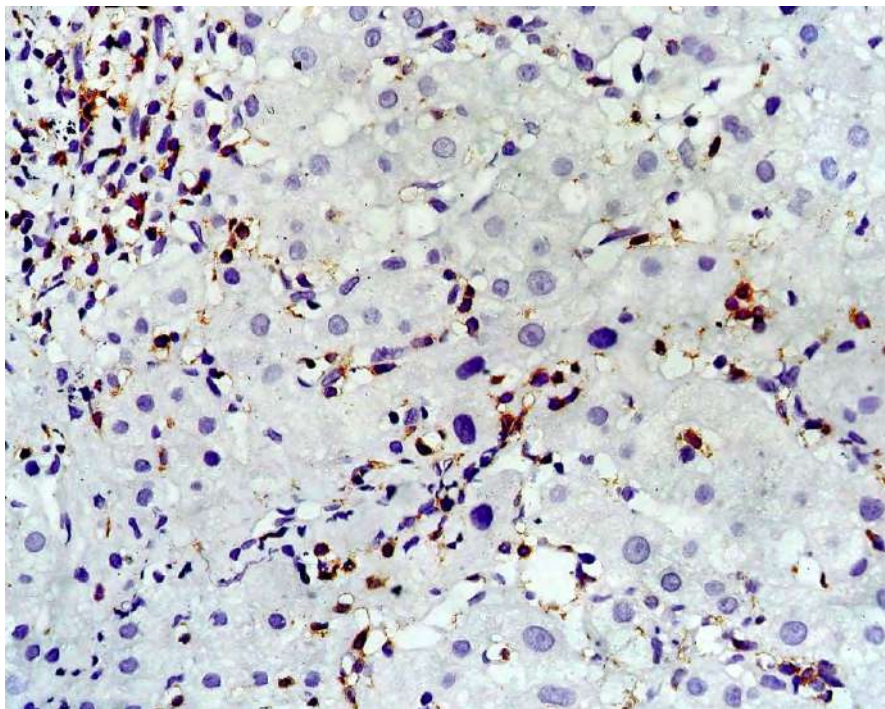


Рис. 5.3. Значна кількість CD8+ Т-кілерів у внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратах. Anti-CD8, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 800.

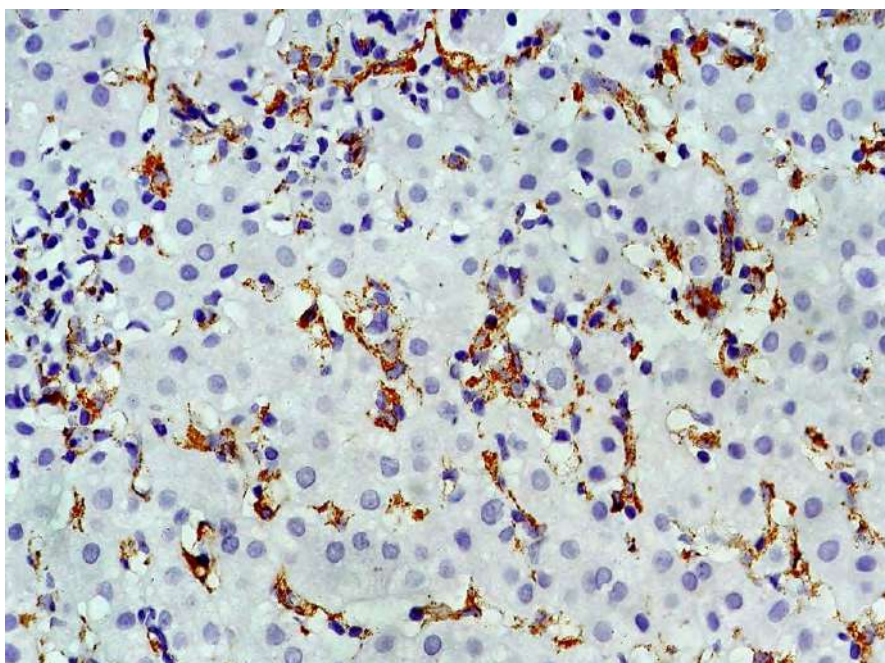


Рис. 5.4. Велика кількість CD68+ макрофагів з мікроскопічними ознаками активного фагоцитозу у внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратах. Anti-CD68, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 800.

У внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратах визначається апоптотична загибель гепатоцитів, про що свідчить виражена експресія каспази-3 в значній кількості печінкових клітин (Рис. 5.5), гепатоцити в стані апоптозу спостерігаються в таких інфільтратах також в мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином (Див. рис. 5.1, 5.2). У деяких хворих на місці імуноклітинної інфільтрації визначається велике вогнище цитолізу гепатоцитів (Рис. 5.6), в якому клітини печінки гинуть шляхом некрозу. Інтенсивна загибель гепатоцитів шляхом апоптозу і некрозу активує фагоцитоз клітинних залишків CD68+ макрофагами, які мігрують у вогнища загибелі гепатоцитів. Мікроскопічними ознаками фагоцитозу є збільшення площі розгалужених відростків, а також цитоплазми CD68+ макрофагів у вогнищах імуноклітинної деструкції, що визначається при імуногістохімічному дослідженні (Див. рис. 5.4).

ІГХ дослідження із застосуванням моноклональних антитіл до α -SMA показали, що у внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратах з'являється і активується значна кількість перисинусоїдальних крупних α -SMA+ ЗКП фіброгенного типу (Рис. 5.7). Ці клітини забезпечують розвиток на місці внутрішньодолькових осередків імуноклітинної деструкції і осередків цитолізу гепатоцитів неупорядкованих вогнищ фіброзу неправильної форми, не прив'язаних до будь яких долькових структур, а також розвиток на місці внутрішньодолькових імуноклітинних ланцюгів тонких фіброзних септ. Неупорядковані вогнища фіброзу неправильної форми і тонкі фіброзні септи в дольках печінки візуалізуються при імуногістохімічному забарвленні за Ван-Гізона та трихром-Масона (Рис. 5.8).

Морфологічним проявом імуноклітинної деструкції є також збільшення в дольках кількості вогнищ імуноклітинного клінінгу гепатоцитів. Але за даними проведених гістохімічних і імуногістохімічних досліджень загибель гепатоцитів в дрібних вогнищах імуноклітинного клінінгу не завершується розвитком внутрішньодолькового фіброзу.

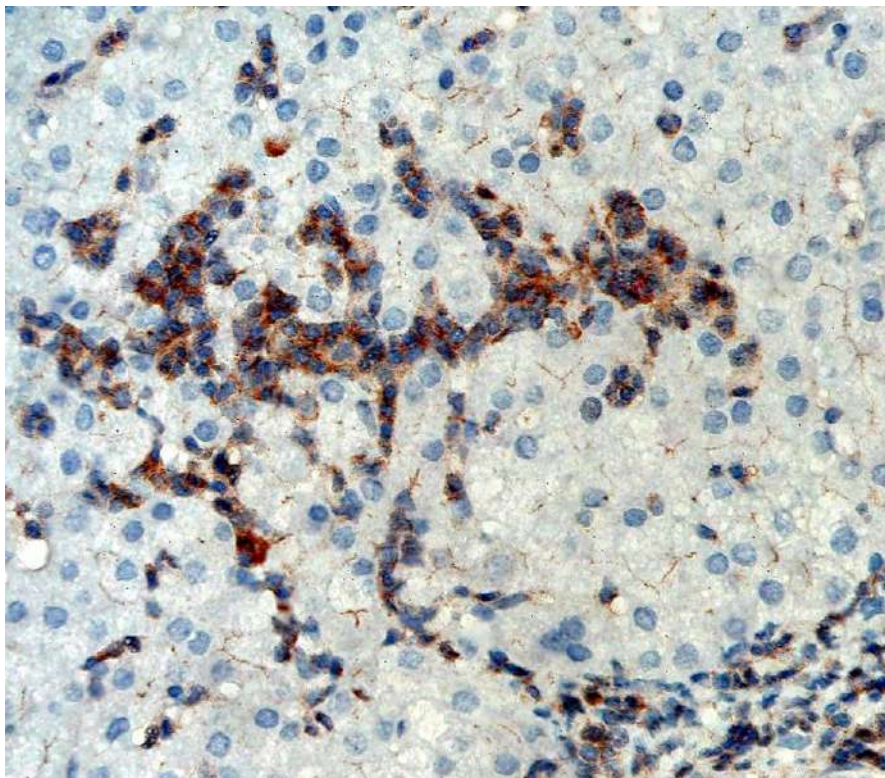


Рис. 5.5. Виражена експресія каспази-3 в значній кількості печінкових клітин у внутрішньодольковому імуноклітинному інфільтраті. Anti-Caspase Ab3, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 800.

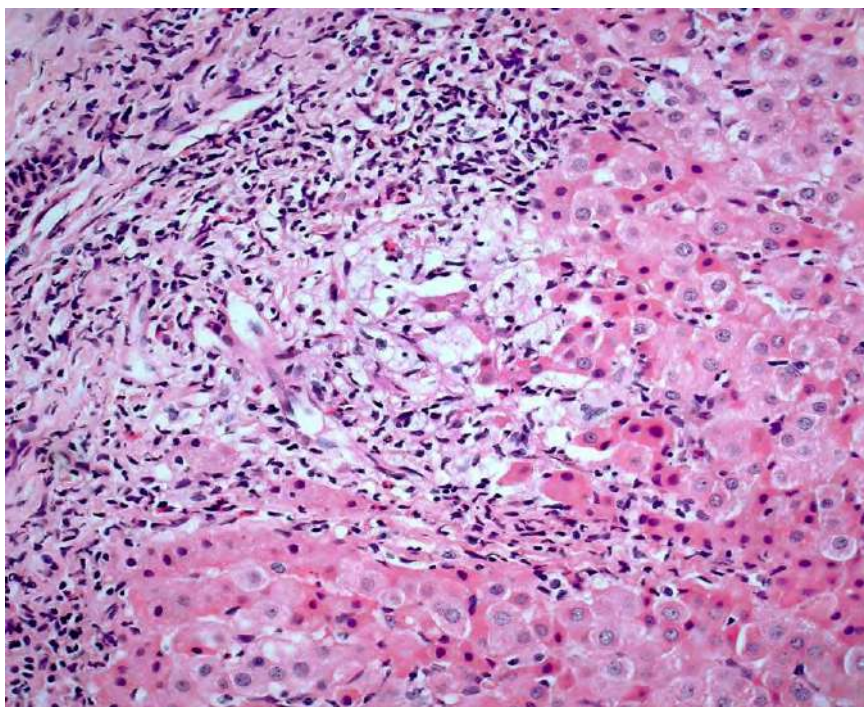


Рис. 5.6. Велике вогнище цитолізу гепатоцитів на місці імуноклітинного інфільтрату в дольці печінки. Зabarвлення гематоксилином та еозином. Зб. х 400.

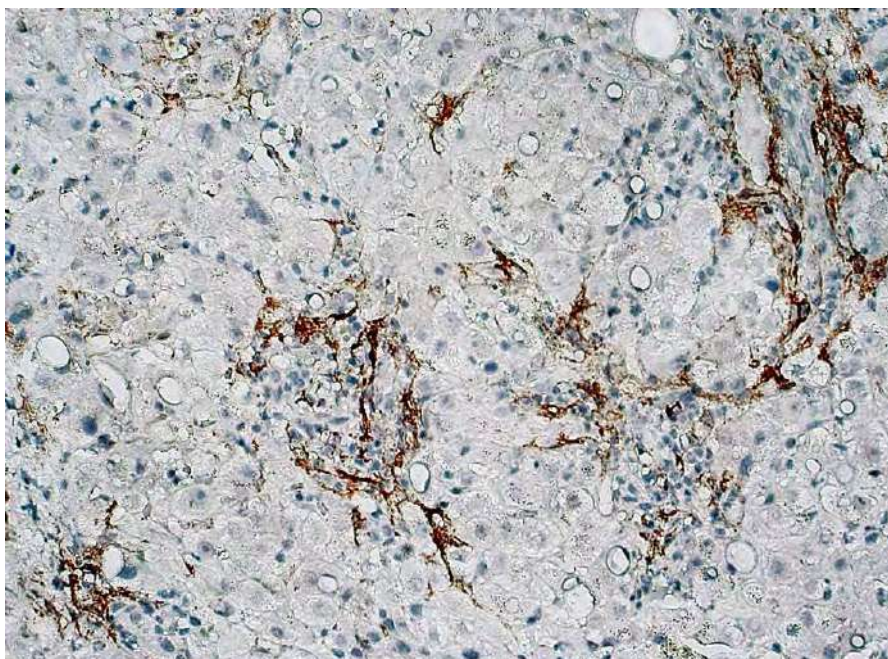


Рис. 5.7. Значна кількість α -SMA+ активованих зірчастих клітин у внутрішньодолькових вогнищах імуноклітинної інфільтрації. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

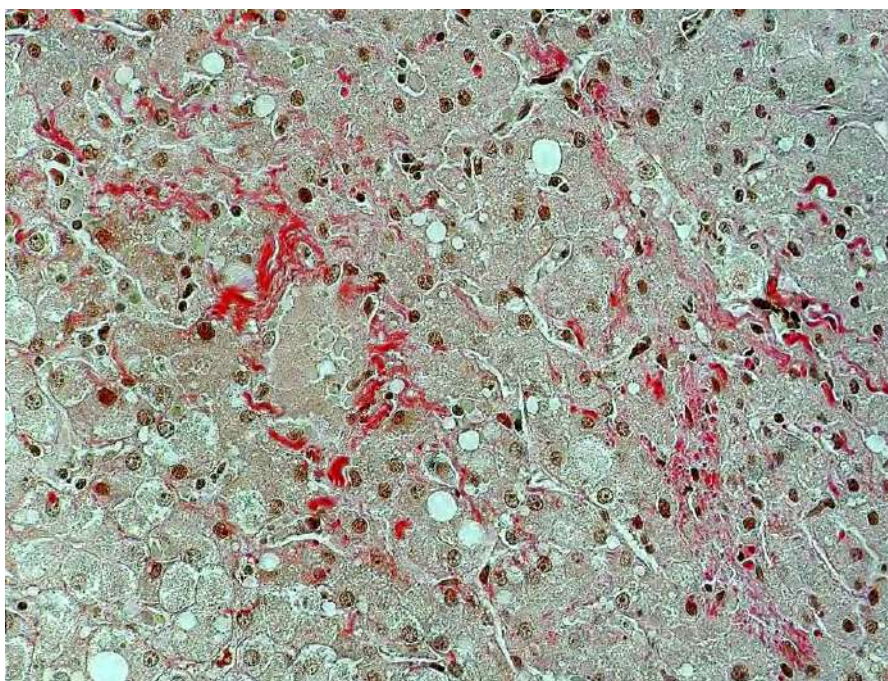


Рис. 5.8. Внутрішньодольковий неупорядкований вогнищевий фіброз печінки з наявністю тонких фіброзних септ. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 400.

5.2. Експресія металопротеїнази MMP-9 і її тканинного інгібітора TIMP-1 при імуноклітинній інфільтрації і деструкції печінки

На підставі проведених імуногістохімічних досліджень встановлено, що при ХВГ С виразність експресії MMP-9 і кількість MMP-9+ клітин та виразність експресії TIMP-1 і кількість TIMP-1+ клітин залежали від інтенсивності імуноклітинної інфільтрації печінки і зростали при підвищенні її рівня, а також зростали при імуноклітинній деструкції печінкових дольок.

У хворих, які не страждали на ХВГ С, в тканині печінки без фіброзу, експресія MMP-9 була виявлена в цитоплазмі поодиноких крупних клітин Купфера і подовжених перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто у вигляді дифузних скупчень дрібних коричневих гранул (Рис. 5.9А), а також експресія TIMP-1 в цитоплазмі поодиноких перисинусоїдальних клітин Іто (Рис. 5.9Б), що свідчило про збалансований стан ПКМ. Експресія MMP-9 і TIMP-1 в гепатоцитах і в портальних трактах не спостерігалась.

При імуногістохімічному дослідженні в трепанобіоптатах печінки у хворих на ХВГ С виявлене значне збільшення MMP-9+ клітин Купфера і перисинусоїдальних зірчастих клітин, а також поява MMP-9+ гепатоцитів та MMP-9+ макрофагів і лімфоцитів в портальних трактах.

У хворих на ХВГ С з слабким і помірним фіброзом печінки без її суттєвої імуноклітинної інфільтрації експресія MMP-9 визначалась в цитоплазмі більшої кількості внутрішньодолькових макрофагів і подовжених відросчатих перисинусоїдальних клітин Іто та в лімфоцитах незначних імуноклітинних інфільтратів портальних трактів, а також слабка експресія MMP-9 у вигляді дрібних коричневих гранул в цитоплазмі гепатоцитів (Рис. 5.10 А). У хворих з слабким і помірним фіброзом печінки без її суттєвої імуноклітинної інфільтрації також визначалась експресія MMP-9 імунними клітинами у вогнищах імуноклітинного клінігу гепатоцитів. (Рис. 5.10 Б).

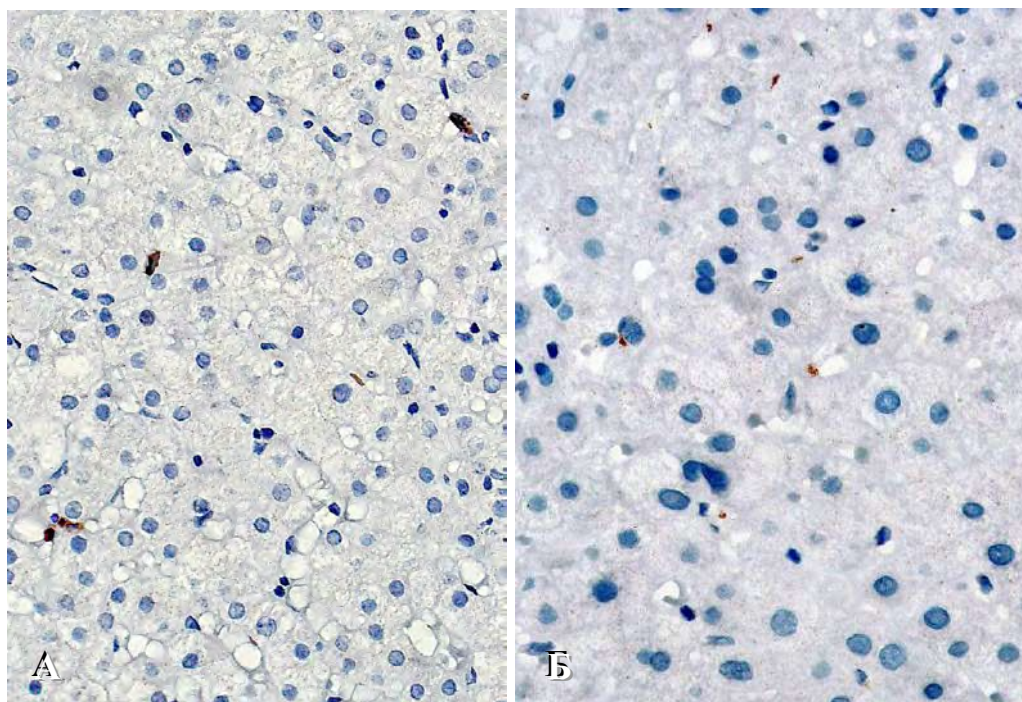


Рис. 5.9. Печінка без фіброзу. А – експресія ММР-9 в поодиноких клітинах Купфера і перисинусоїдальних клітинах Іто, anti-MMP-9; Б – експресія TIMP-1 в поодиноких перисинусоїдальних клітинах Іто, anti-TIMP-1. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400 (А), x 800 (Б).

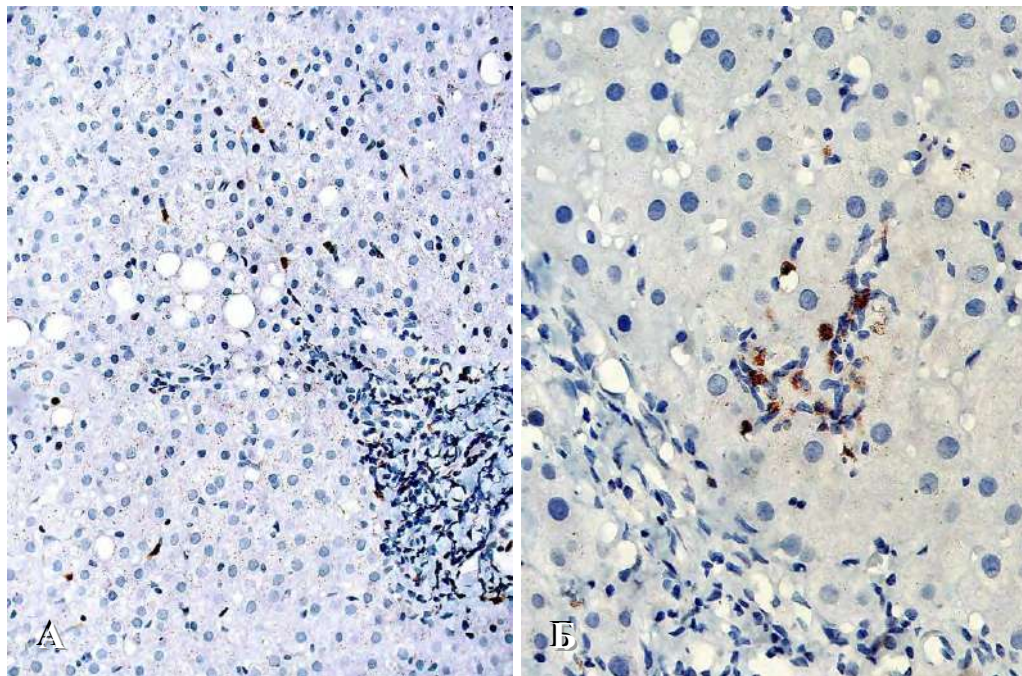


Рис. 5.10. А – слабка експресія ММР-9 в гепатоцитах, поодиноких активованих клітинах Купфера, клітинах Іто і лімфоцитах імуноклітинного інфільтрату портального тракту; Б – експресія ММР-9 імунними клітинами у вогнищі імуноклітинного клінігу гепатоцита при ХВГ С з помірним фіброзом без суттєвої імуноклітинної інфільтрації печінки. Anti-MMP-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 200 (А), x 600 (Б).

У хворих на ХВГ С з помірним фіброзом і помірною імуноклітинною інфільтрацією печінки спостерігалась помірна експресія ММР-9 у вигляді коричневих гранул в цитоплазмі численних гепатоцитів (Рис.5.11), та експресія ММР-9 в значній кількості активованих клітин Купфера і перисинусоїдальних клітин Іто (Рис. 5.11). Крім цього, експресія ММР-9 також визначалась в макрофагах і лімфоцитах імуноклітинних інфільтратів портальних трактів (Рис. 5.12 А), в макрофагах внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратів (Рис. 5.12 Б), в клітинах «ступінчастих некрозів» (Рис. 5.13) і в імунних клітинах внутрішньодолькових вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. Таким чином, підвищення рівня імуноклітинної інфільтрації печінки стимулювало експресію ММР-9 гепатоцитами, внутрішньодольковими перисинусоїдальними ЗКП і клітинами Купфера, макрофагами і лімфоцитами портальних трактів і «ступінчастих некрозів», а також макрофагами внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратів.

Не виявлено прямої залежності між експресією ММР-9 і ступенем фіброзу печінки. Так, у випадках помірного фіброзу F2 і тяжкого фіброзу F3-F4 з вираженою імуноклітинною інфільтрацією печінки визначалась значна експресія ММР-9, в той час як при слабкому фіброзі F1 і при тяжкому фіброзі F3-F4 зі слабкою імуноклітинною інфільтрацією печінки експресія ММР-9 була незначною.

Максимального рівня експресія ММР-9 досягала в зонах імуноклітинної деструкції дольок печінки. В таких випадках в зонах внутрішньодолькової значної і поширеної імуноклітинної інфільтрації виявлялась виражена експресія ММР-9 в значній кількості гепатоцитів, в активованих клітинах Купфера і клітинах Іто, а також в окремих лімфоцитах імуноклітинних інфільтратів (Рис. 5.15).

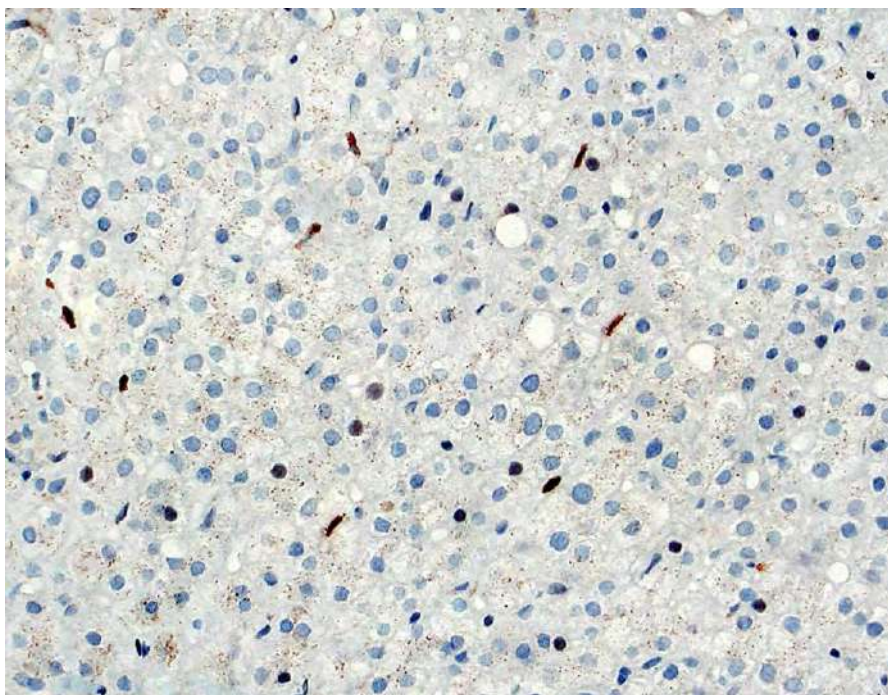


Рис. 5.11. Помірна експресія MMP-9 в гепатоцитах, в значній кількості клітин Купфера і перисинусоїдальних зірчастих клітин при ХВГ С з помірним фіброзом і помірною імунноклітинною інфільтрацією печінки. Anti–MMP-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 400.

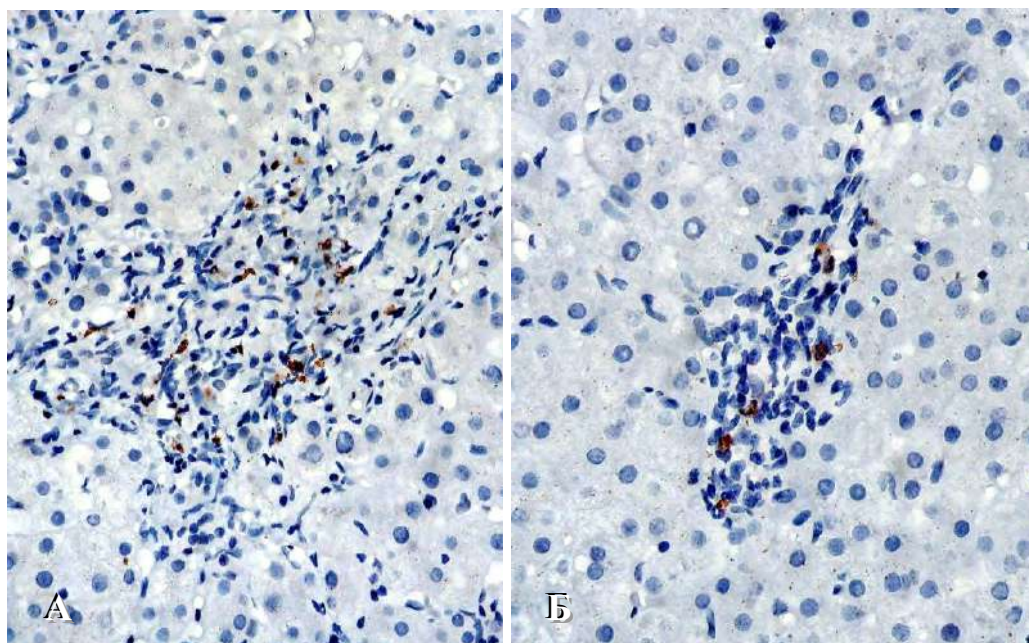


Рис. 5.12. А – експресія MMP-9 макрофагами і лімфоцитами портального тракту. Б – експресія MMP-9 макрофагами внутрішньодолькового імунноклітинного інфільтрату при ХВГ С з помірним фіброзом і помірною імунноклітинною інфільтрацією печінки. Anti–MMP-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 400 (А), х 600 (Б).

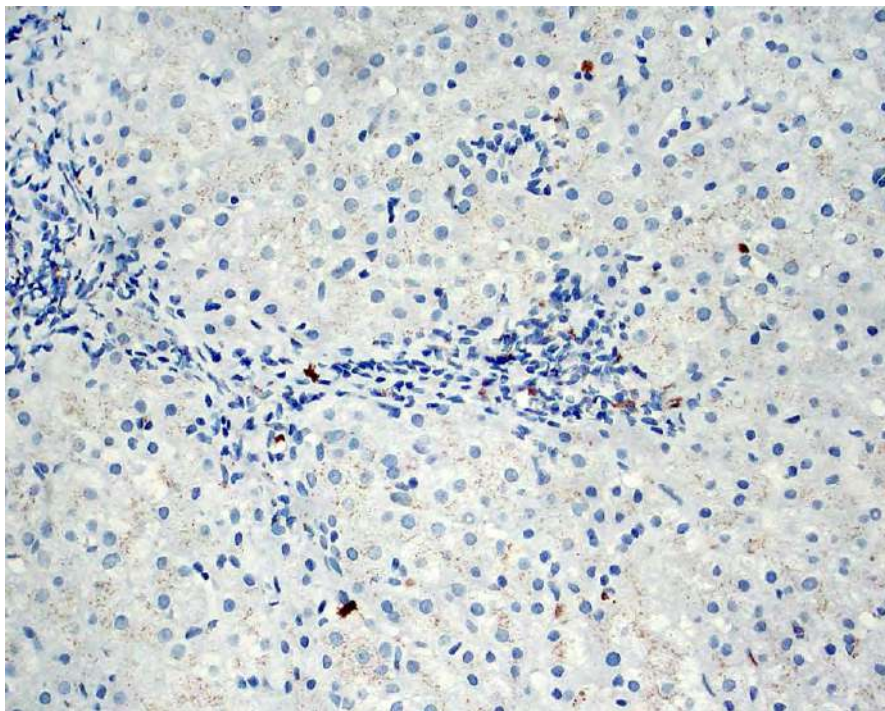


Рис. 5.13. Експресія ММР-9 в гепатоцитах, поодиноких активованих клітинах Купфера і в клітинах імунклітинного «ступінчастого некрозу» при ХВГ С з помірним фіброзом і помірною імунклітинною інфільтрацією. Anti–ММР-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 400.

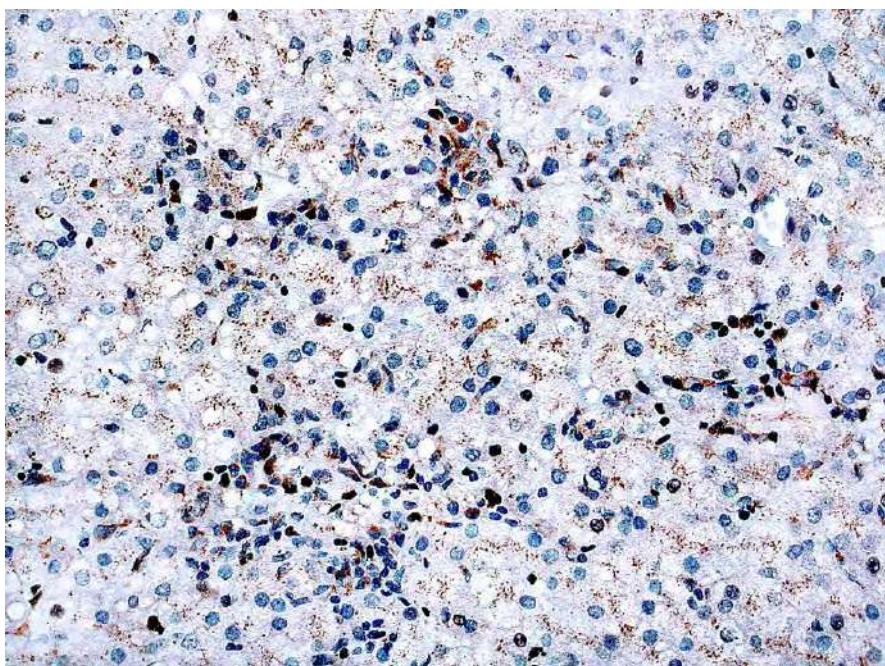


Рис. 5.14. Виражена експресія ММР-9 в гепатоцитах, в активованих клітинах Купфера і клітинах Іто, а також в лімфоцитах імунклітинних інфільтратів при помірному фіброзі з імунклітинною деструкцією дольок печінки. Anti–ММР-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 400.

Імуногістохімічні дослідження експресії тканинного інгібітора металопротеїназ TIMP-1 показало, що на відміну від нормальної печінки, в печінці хворих на ХВГ С зростає експресія TIMP-1 збільшеною кількістю перисинусоїдальних ЗКП, а також визначається експресія TIMP-1 клітинами Купфера, гепатоцитами, макрофагами і лімфоцитами імуноклітинних інфільтратів портальних трактів та «ступінчастих некрозів».

Нами виявлено зростання експресії TIMP-1 цими клітинами при зростанні імуноклітинної інфільтрації печінки у хворих на ХВГ С. При помірному фіброзі і помірній імуноклітинній інфільтрації печінки спостерігалась виражена цитоплазматична експресія TIMP-1 у вигляді щільних коричневих дрібнозернистих скупчень в активованих зірчастих перисинусоїдальних клітинах і в клітинах Купфера, та менш виражена дрібногранулярна експресія в цитоплазмі гепатоцитів. Позитивна експресія TIMP-1 також визначалась в лімфоцитах імуноклітинних інфільтратів портальних трактів, «ступінчастих некрозів» і вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, та в лімфоцитах внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратів (Рис. 5.15). У хворих з помірним фіброзом і значною імуноклітинною інфільтрацією печінки експресія TIMP-1 також спостерігалась в цитоплазмі макрофагів і лімфоцитів на периферії великих фолікулоподібних імуноклітинних інфільтратів портальних трактів та в дифузних імуноклітинних інфільтратах портальних трактів.

У хворих з помірним і тяжким фіброзом та внутрішньодольковою імуноклітинною деструкцією печінки в зонах поширеної внутрішньодолькової інфільтрації визначалась значно виражена експресія TIMP-1 в цитоплазмі численних гепатоцитів і активованих зірчастих перисинусоїдальних клітин Іто (Рис.5.16). Таким чином, доведено, що при фіброзі печінки у хворих на ХВГ С активація імуноклітинної інфільтрації і деструкції одночасно стимулює експресію металопротеїнази MMP-9 та її тканинного інгібітора TIMP-1.

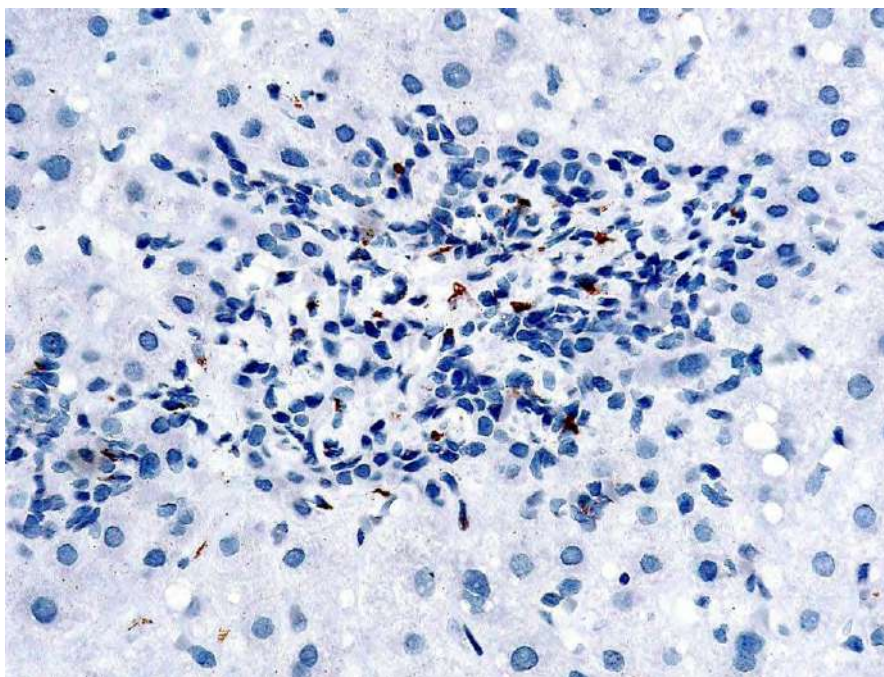


Рис. 5.15. Експресія ТІМР-1 лімфоцитами імуноклітинного інфільтрату при помірному фіброзі і помірній імуноклітинній інфільтрації печінки. Anti-TIMP-1, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

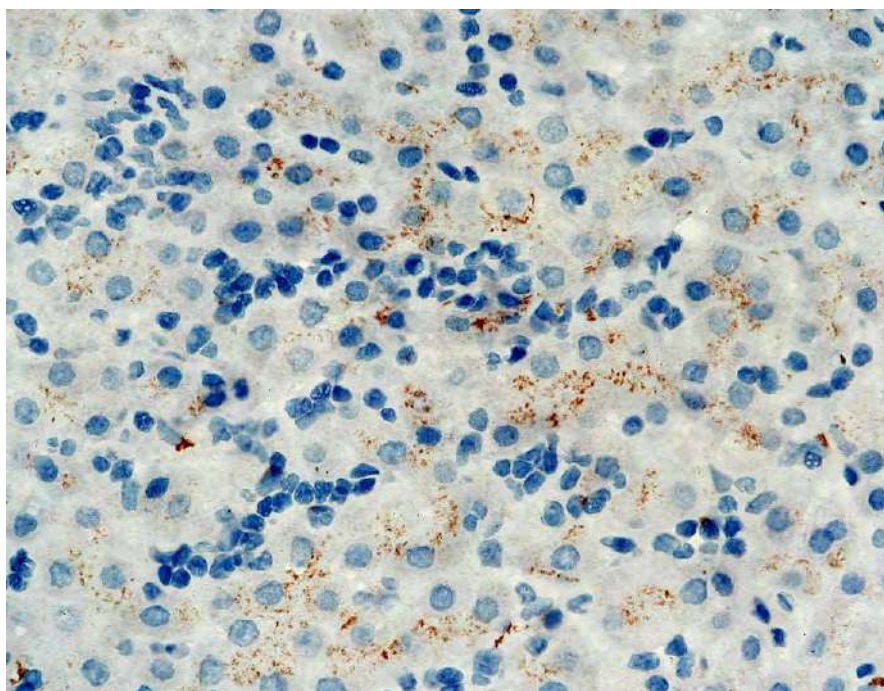


Рис. 5.16. Значна експресія ТІМР-1 в гепатоцитах і поодиноких активованих клітинах Іто в зоні внутрішньодолькового імуноклітинного інфільтрату при ХВГ С з помірним фіброзом і з імуноклітинною деструкцією дольок печінки. Anti-TIMP-1, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

5.3. Морфологічні ознаки прогресування портально-септального та септального фіброзу печінки

Морфологічним проявом активації імуноклітинної деструкції печінки є також збільшення висоти, протяжності та кількості зон перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів». При мікроскопії в таких випадках спостерігаються поширені «ступінчасті некрози» і імуноклітинні інфільтрати, які глибоко проникають в печінкові дольки (Рис. 5.17). При значній деструкції імуноклітинні інфільтрати з перипортальних зон простираються назустріч один одному крізь печінкові дольки (Рис. 5.18). Про імуноклітинну деструкцію в таких зонах свідчить наявність в них значної кількості CD8+ Т-лімфоцитів кілерів (Рис. 5.19), а також наявність апоптотично і некротично змінених гепатоцитів в мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином (Рис. 5.20). Активацію імуноклітинної деструкції віддзеркалює висока експресія каспази-3, що визначається в значній кількості гепатоцитів, розташованих в перипортальних зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» (Рис. 5.21). В подальшому інтенсивність імуноклітинної інфільтрації в зонах «ступінчастих некрозів» знижується і відмічається значне збільшення кількості α -SMA+ активованих фібробластів, які сприяють розвитку перипортального фіброзу (Рис. 5.22). Збільшення перипортального фіброзу визначається при забарвленні за Ван-Гізон, трихром-Масон, а також гематоксиліном та еозином. На місці зустрічних імуноклітинних інфільтратів між портальними трактами формуються тонкі множинні фіброзні септи.

Слід відзначити, що в мікропрепаратах печінки хворих на ХВГ С перипортальний фіброз на місці поширених і сплосчених «ступінчастих некрозів» неможливо відокремити від фіброзу портальних трактів зі значною дифузною імуноклітинною інфільтрацією, в зв'язку з тим, що значний дифузний імуноклітинний інфільтрат, як правило, плавно переходить у сплосчений і поширений імуноклітинний «ступінчастий некроз». Тому в

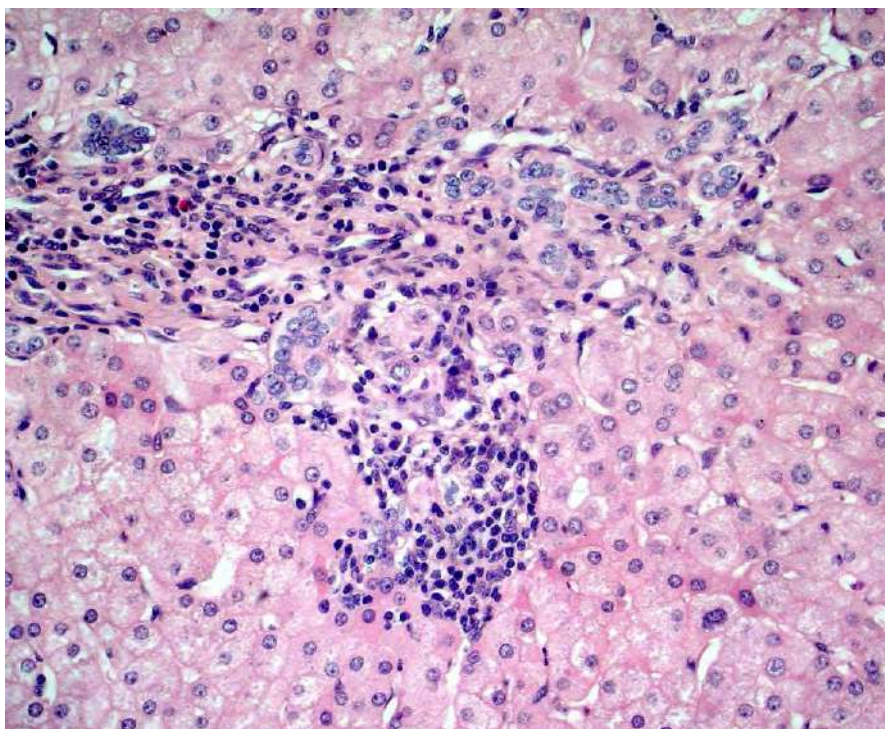


Рис. 5.17. Імуноклітинний «ступінчастий некроз», який глибоко проникає в печінкову дольку. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

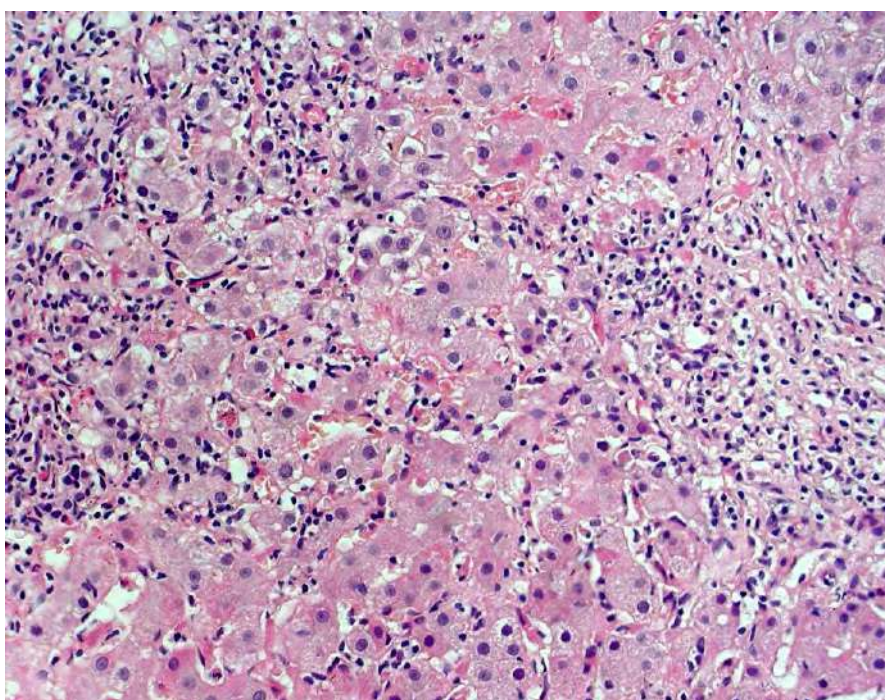


Рис. 5.18. Імуноклітинні інфільтрати, які з перипортальних зон простираються назустріч один одному крізь печінкову дольку. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

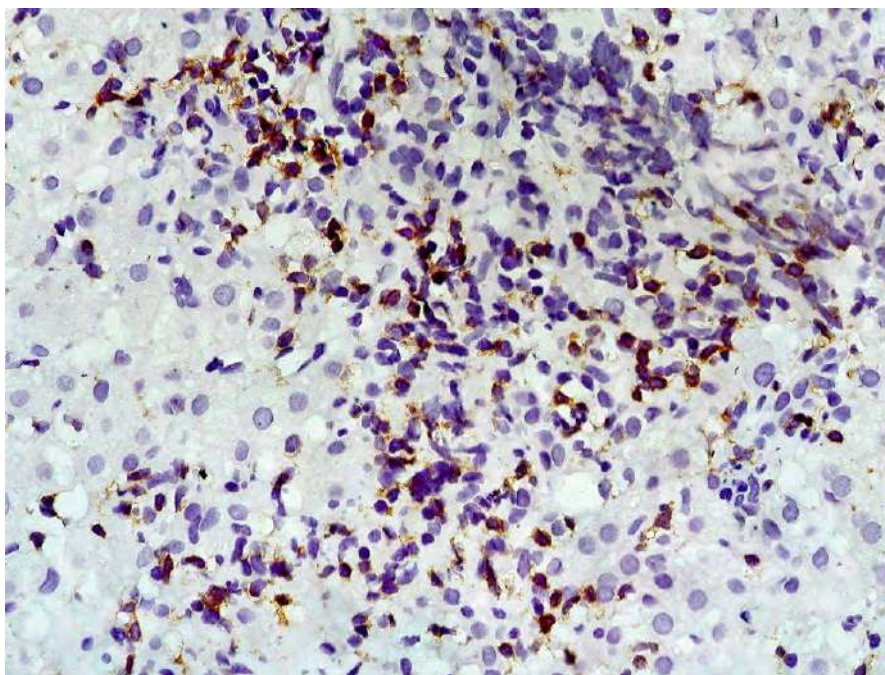


Рис. 5.19. Значна кількість CD8+ Т-кілерів в зоні перипортальної імуноклітинної деструкції печінки. Anti-CD8, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

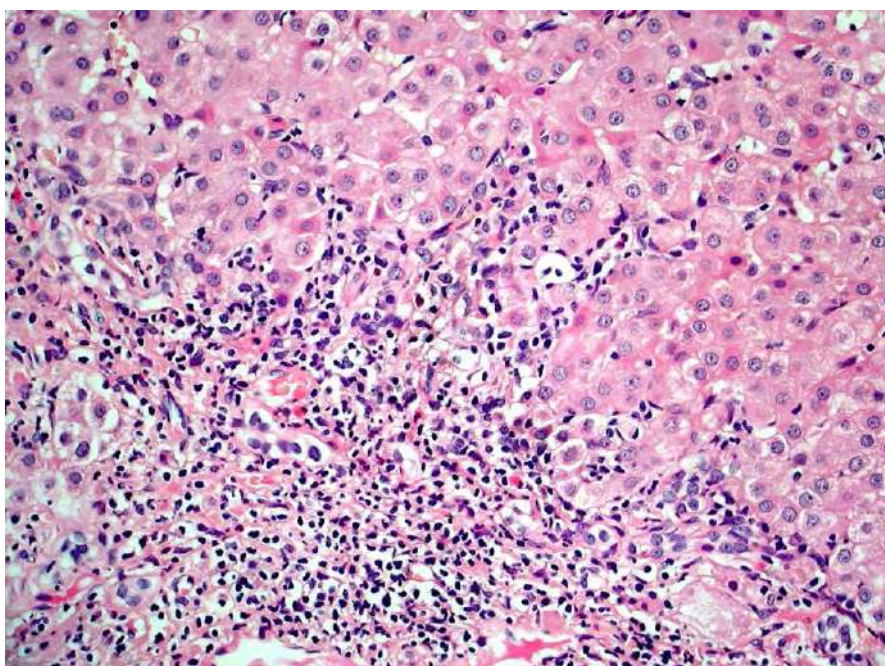


Рис. 5.20. Наявність апоптотично і некротично змінених гепатоцитів в зоні перипортального імуноклітинного «ступінчастого некрозу». Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

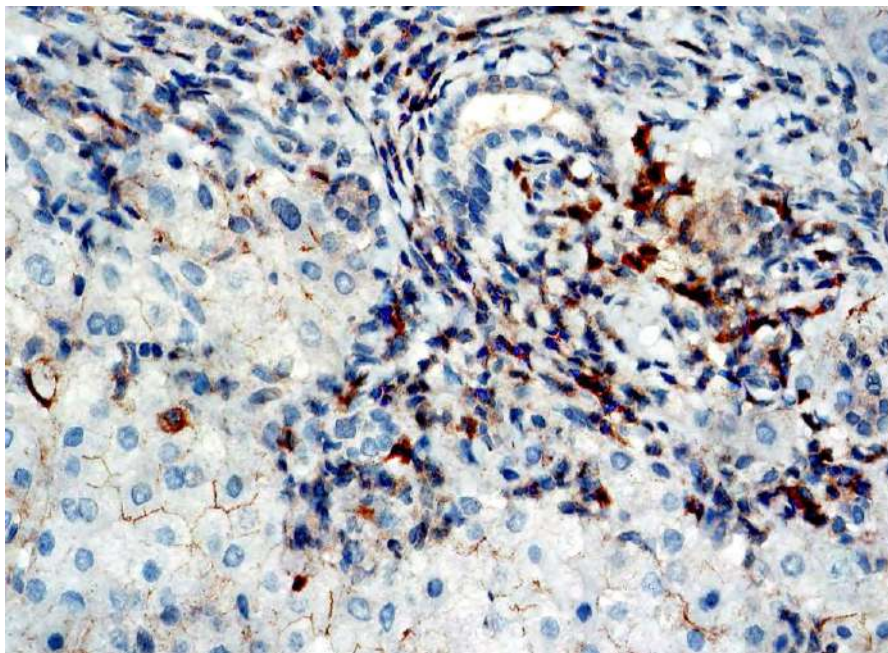


Рис. 5.21. Виразна експресія каспази-3 в значному числі гепатоцитів, розташованих в перипортальній зоні імуноклітинного «ступінчастого некрозу». Anti-Caspase Ab3, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 600.

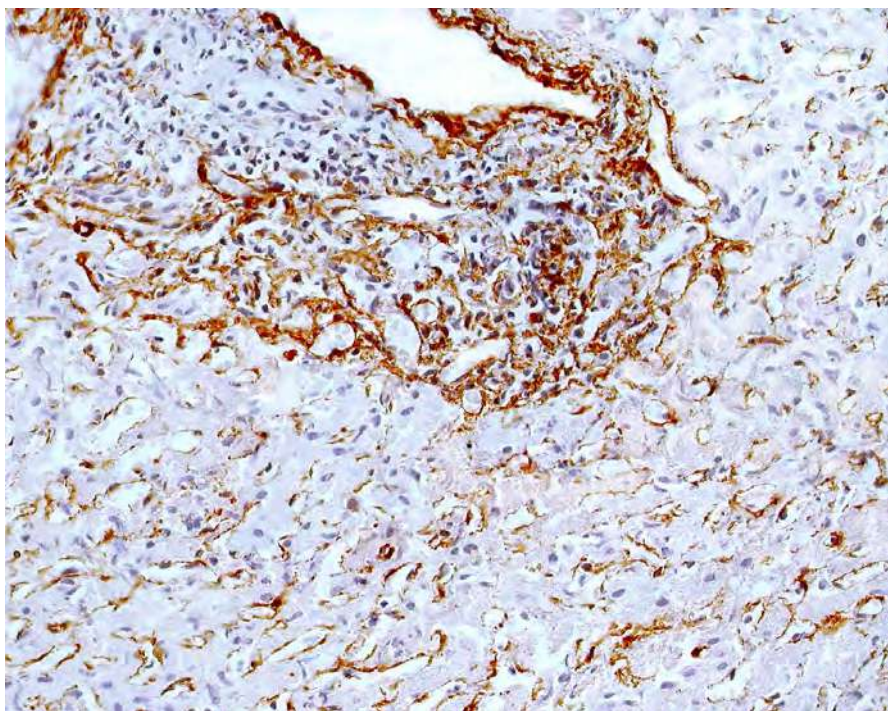


Рис. 5.22. Збільшення кількості α -SMA+ активованих фіброblastів в зоні перипортального фіброзу на місці імуноклітинної інфільтрації. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

фіналі, частіше за все при мікроскопії визначається значний комбінований портально-перипортальний фіброз.

Результати паралельного патогістологічного, гістохімічного і імуногістохімічного аналізу трепанобіоптатів печінки свідчить про те, що у внутрішньопортальних дифузних імуноклітинних інфільтратах теж розвивається фіброз суто портальних трактів. При його розвитку в мікропрепаратах, забарвлених за Ван-Гізон і трихром-Масон, серед імунних клітин портального інфільтрату ідентифікуються волокна сполучної тканини різної товщини, які поступово зливаються в осередки і циркулярні полоси фіброзу різної площі і довжини. Наявність вогнищево-циркулярного фіброзу в імуноклітинних інфільтратах потовщених портальних трактів реєструється також при забарвленні зрізів гематоксиліном та еозином (Рис. 5.23). Поступово значне потовщення портальних трактів внаслідок їх імуноклітинної інфільтрації трансформується в значне їх фіброзне потовщення. ІГХ дослідження показали, що розвитку значного фіброзу портальних трактів передують суттєве збільшення в них кількості α -SMA+ активованих фібробластів, які синтезують надлишок колагенів (Рис. 5.24). Накопиченню колагенів сприяє значна експресія портальними макрофагами і лімфоцитами TIMP-1, який подавляє фібролітичну активність металопротеїназ (Рис. 5.25). В фіналі, на місці попередньої портально-перипортальної інфільтрації визначається виражений портально-перипортальний фіброз зі значним загальним потовщенням портального тракту (Рис. 5.26).

Проведене нами імуногістохімічне дослідження експресії α -SMA+ фібробластів в портальних трактах і перипортальних зонах з подальшою комп'ютерною морфометрією площі портально-перипортальних зон з α -SMA+ фіброгенними клітинами дозволило виявити у хворих на ХВГ С певний взаємозв'язок між різним ступенем фіброзу печінки в градації METAVIR і площею, яку займали α -SMA+ фібробласти (табл. 5.1).

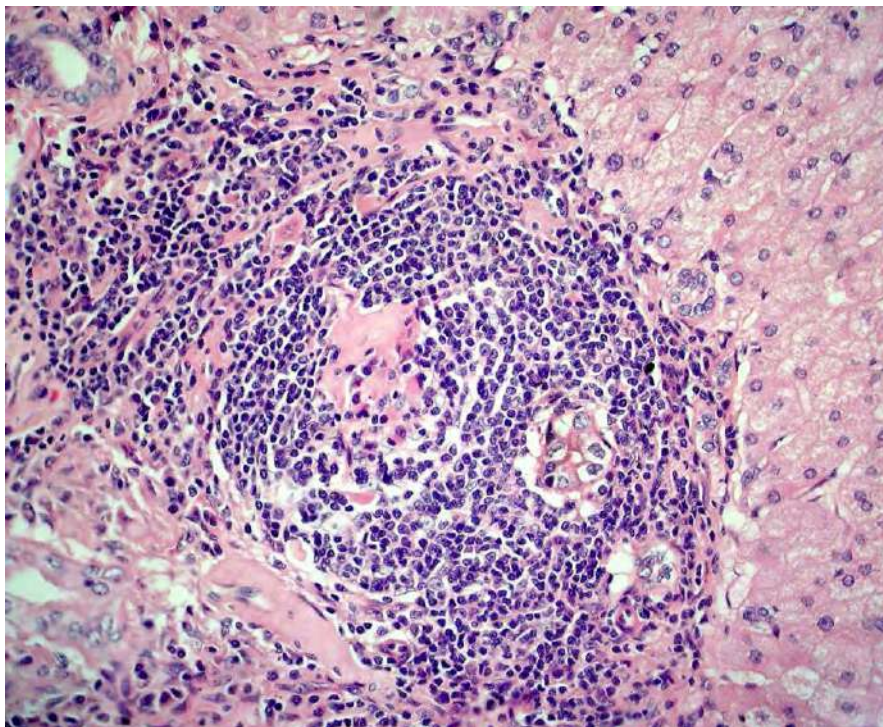


Рис. 5.23. Наявність вогнищево-циркулярного фіброзу в імуноклітинному інфільтраті потовщеного портального тракту.Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

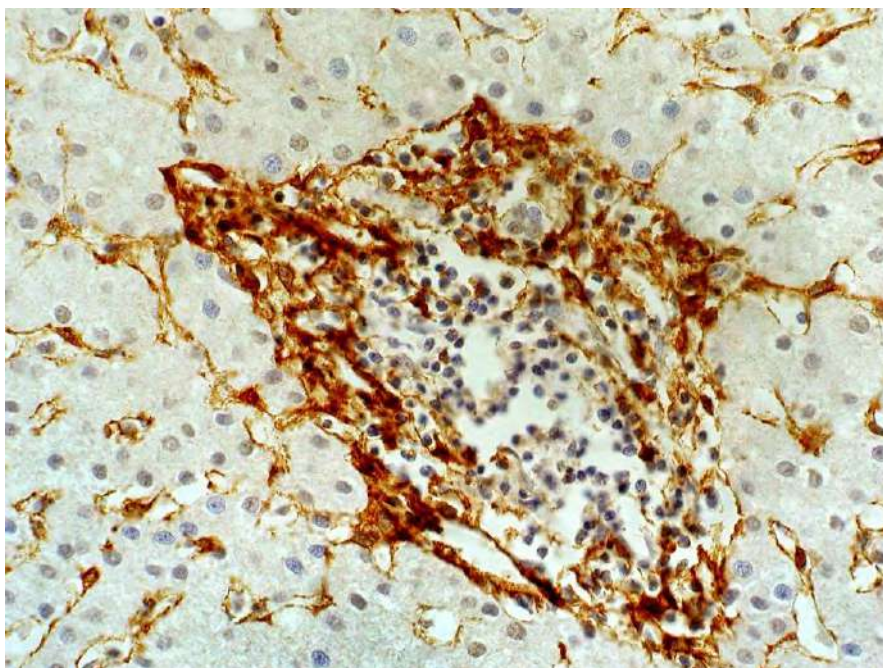


Рис. 5.24. Суттєве збільшення кількості α -SMA+ активованих фібробластів в імуноклітинному інфільтраті потовщеного портального тракту. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

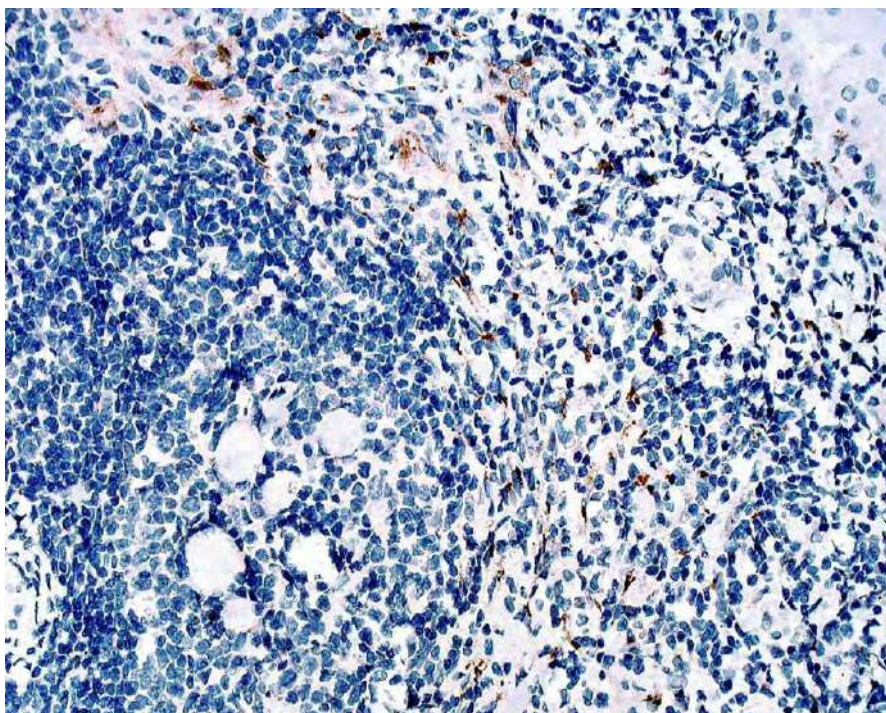


Рис. 5.25. Експресія TIMP-1 портальними макрофагами і лімфоцитами при слабкому фіброзі портального тракту. Anti-TIMP-1, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 600.

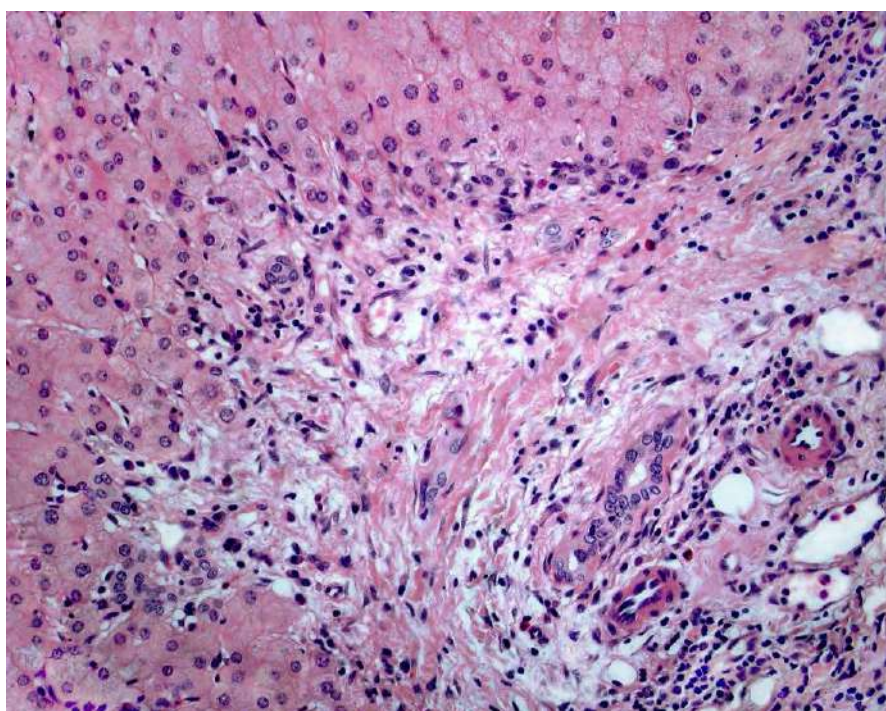


Рис. 5.26. Виражений портально-перипортальний фіброз зі значним загальним потовщенням портального тракту на місці попереднього імуноклітинного інфільтрату. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

Таблиця 5.1

**Площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при
фіброзі печінки різного ступеня за градацією METAVIR (1994) у хворих
на ХВГ С, ($M \pm m$)**

	Ступінь фіброзу печінки	Площа портально- перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при фіброзі печінки різного ступеня у хворих на ХВГ С в $\text{мкм}^2, (M \pm m)$	95% довірчий інтервал	
			Нижня межа (мкм^2)	Верхня межа (мкм^2)
1	Слабкий фіброз F1 (n=20)	12014,4 $\pm$ 2017,7	7791,4	16237,5
2	Помірний фіброз F2 (n=25)	20421,1 $\pm$ 1626,8	17063,6	23778,6
3	Тяжкий фіброз F3(n=20)	48197,7 $\pm$ 7668,6	32147,1	64248,4
P ₁₋₂		<0,05		
P ₁₋₃		<0,05		
P ₂₋₃		<0,05		

За результатами проведених патоморфологічних і комп'ютерно-морфометричних досліджень встановлено, що площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при слабкому фіброзі печінки F1 складає 12014,4 $\pm$ 2017,7 мкм^2 , що достовірно менше ніж площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при помірному фіброзі печінки F2, яка дорівнює 20421,1 $\pm$ 1626,8 мкм^2 ($p < 0,05$). Визначено, що площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при тяжкому фіброзі печінки F3 складає 48197,7 $\pm$ 7668,6 мкм^2 і достовірно більша ніж площі портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при слабкому фіброзі печінки F1 ($p < 0,05$) і помірному фіброзі F2 ($p < 0,05$).

Таким чином, за даними комплексного патоморфологічного і комп'ютерно-морфометричного дослідження трепанобіоптатів печінки

хворих на ХВГ С доведено, що кількість і площа α -SMA+ фібробластів в портально-перипортальних зонах достовірно збільшується при прогресуванні портально-перипортального фіброзу печінки у хворих на ХВГ С.

Зі збільшенням інтенсивності перипортальних імуноклітинних інфільтратів тісно пов'язане утворення численних коротких трикутних клітинних інфільтратів, які проникають в печінкові дольки (Рис. 5.27), а також поява подовжених активних портально-долькових септ. У складі коротких трикутних клітинних інфільтратів виявляється значна кількість CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів, а між ними визначаються гепатоцити в різних фазах апоптозу зі значною експресією каспази-3. Після активації α -SMA+ фібробластів на місці коротких трикутних портально-долькових інфільтратів формуються короткі трикутні перипортальні фіброзні септи, які визначаються при забарвленні гістологічних препаратів за Ван-Гізон і трихром-Масон.

Паралельний патогістологічний і імуногістохімічний аналіз перипортальних коротких трикутних портально-долькових інфільтратів показав на межі їх з печінковими дольками наявність значної кількості Ki-67+ клітин з вузькими овально-витянутими ядрами, які проникають в дольки печінки (Рис. 5.28). Ці ІГХ спостереження є свідченням проліферації фібробластів на верхівках трикутних фіброзних септ, яка сприяє їх росту і подовженню та активному проникненню в дольки печінки. Водночас в середині подовжених фіброзно-клітинних септ з'являються мікросудини і формуються так звані активні фіброзні септи.

Активні фіброзні септи завжди оточені імунними клітинами, які визначаються на їх вільному кінці (Рис. 5.29), а також формують численні дрібні імуноклітинні «ступінчасті некрози» вздовж септ (Рис. 5.30). При ІГХ аналізі на вільному кінці активних септ, розташованих в дольках печінки, визначається підвищена кількість CD8+ Т-кілерів (Рис. 5.31) і CD68+ макрофагів. При застосуванні імуногістохімічних методик на межі вільного кінця активної септи з тканиною печінки спостерігаються каспаза-3+

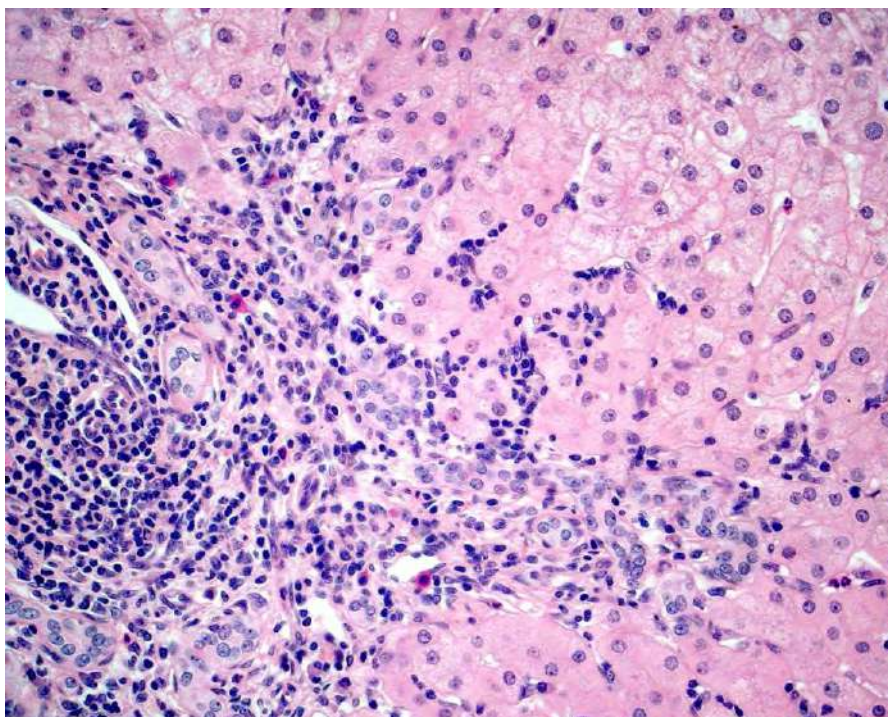


Рис. 5.27. Численні короткі трикутні клітинні інфільтрати, які проникають з перипортальної зони в печінкову дольку. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 3б. х 400.

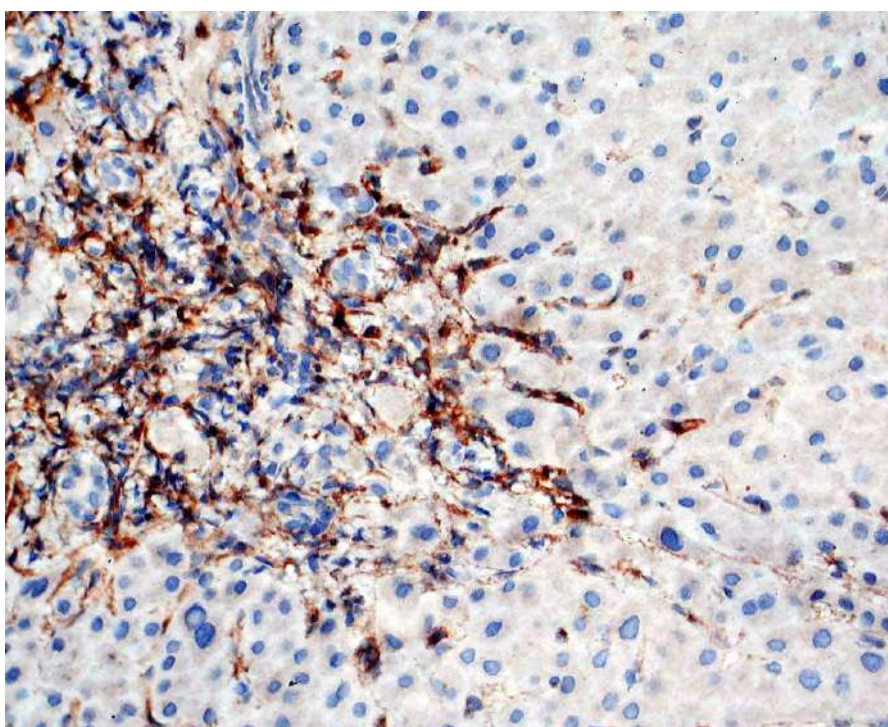


Рис. 5.28. Значна кількість Ki-67+ фібробластів на верхівках трикутних клітинних інфільтратів на межі їх з печінковими дольками. Anti-Ki-67, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 600.

гепатоцити, що гинуть шляхом апоптозу (Рис. 5.32), а при рутинній світловій мікроскопії – тільця Каунсілмена (Рис. 5.29).

При подальшій еволюції в активних септах появляється значна кількість α -SMA⁺ фібробластів (Рис. 5.33), імуноклітинна інфільтрація септи зменшується і формується фіброз подовжених септ, який нерідко визначається як тяжкий септальний фіброз (Рис. 5.34). Таким чином, збільшення кількості активних фіброзних септ в печінкових дольках, які виявляються при забарвленні гематоксиліном та еозином (Рис. 5.35), сприяє прогресуванню тяжкого септального фіброзу печінки.

Окремої уваги заслуговують так звані мостоподібні порто-лобулярно-портальні імуноклітинні інфільтрати, які розповсюджуються з одного портального тракту до сусіднього через печінкову дольку (Рис. 5.36). ІГХ дослідження продемонстрували активацію та збільшення кількості в таких мостоподібних імуноклітинних інфільтратах α -SMA⁺ перисинусоїдальних зірчастих клітин фіброгенного типу (Рис. 5.37). Тому через деякий час на місці таких імуноклітинних інфільтратів при гістохімічному забарвленні за Ван-Гізон і трихром-Масон ідентифікуються притаманні тяжкому фіброзу печінки мостоподібні фіброзні септи різної товщини (Рис. 5.38) з накопиченням колагену IV типу, в печінці утворюються протяжні зони мостоподібного мультилобулярного фіброзу.

5.4. Патоморфологічне і імуногістохімічне обґрунтування прогресії перисинусоїдального і перицелюлярного фіброзу печінки

Паралельне імуногістохімічне дослідження α -SMA⁺ активованих перисинусоїдальних ЗКП, колагену IV типу та вираженості фіброзу при гістохімічному забарвленні за Ван-Гізон і трихром-Масон дозволило визначити в гепатобіоптатах хворих на ХВГ С стан фіброгенезу в печінці при наявності в ній фіброзу. ІГХ методами встановлено, що виражена експресія α -SMA в значній кількості перисинусоїдальних ЗКП на тлі слабкої або

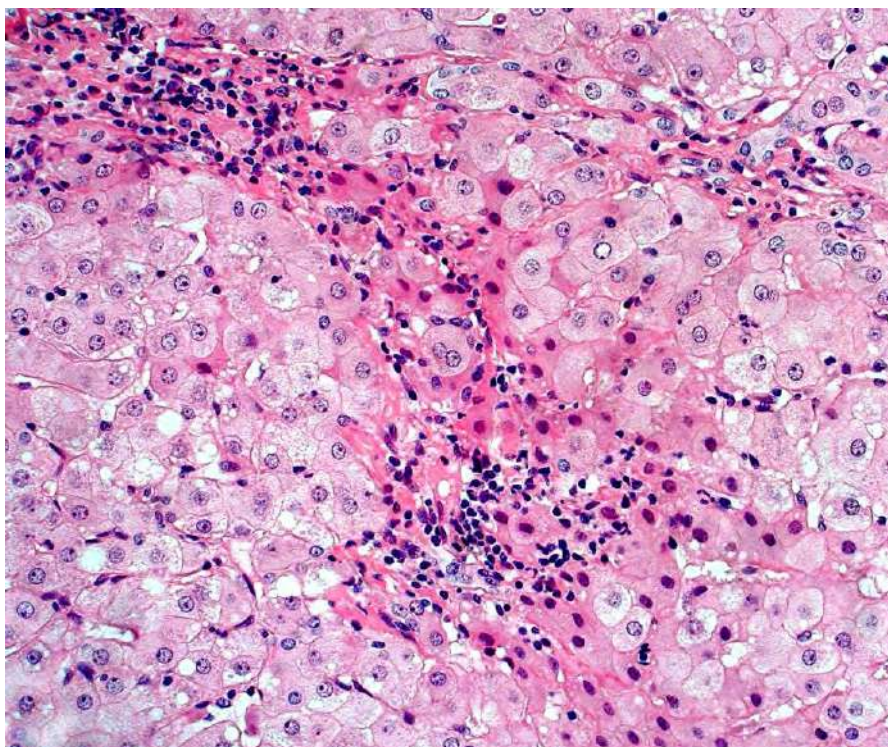


Рис. 5.29. Активна фіброзна септа з імунними клітинами на її вільному кінці. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

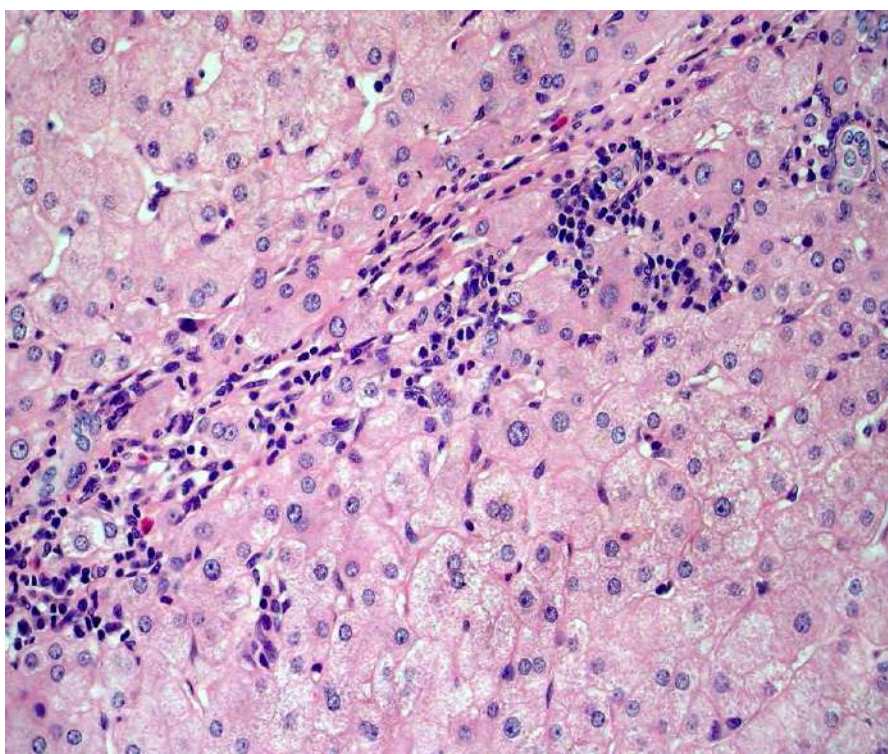


Рис. 5.30. Активна фіброзна септа, оточена імуноцитами, які утворюють дрібні імуноклітинні «ступінчасті некрози». Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

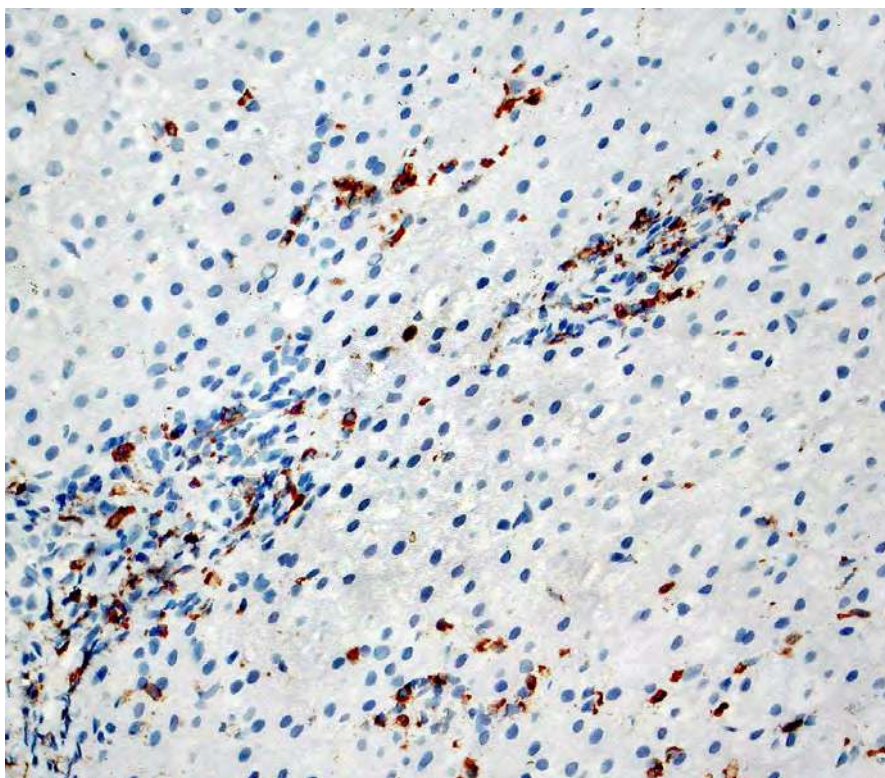


Рис. 5.31. Підвищена кількість CD8+ Т-кілерів на вільному кінці активної септи. Anti-CD8, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

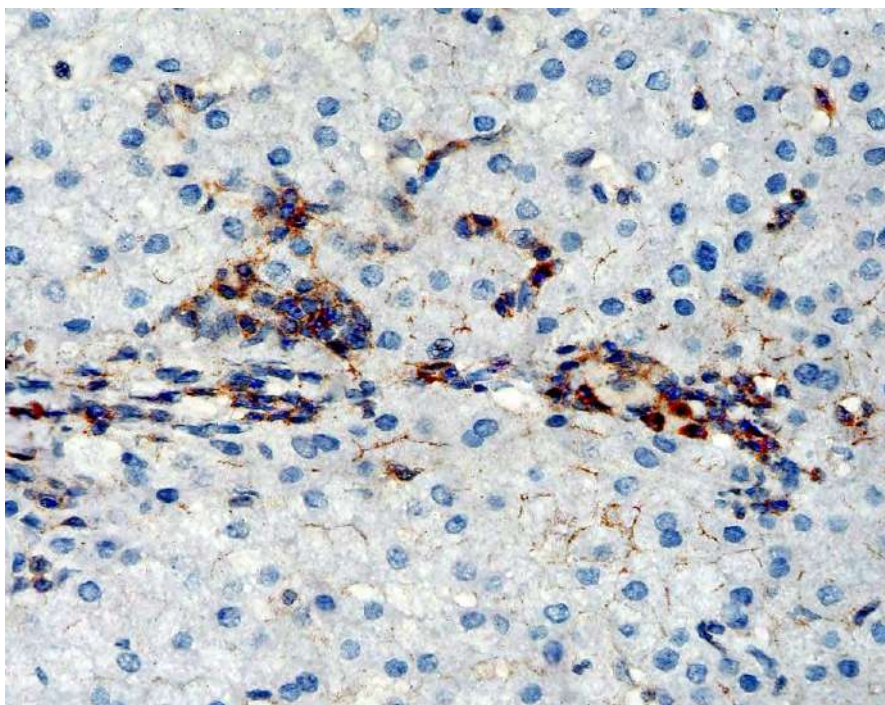


Рис. 5.32. Каспаза-3+ гепатоцити, що гинуть апоптозом, на вільному кінці активної септи. Anti-Caspase Ab3, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 800.

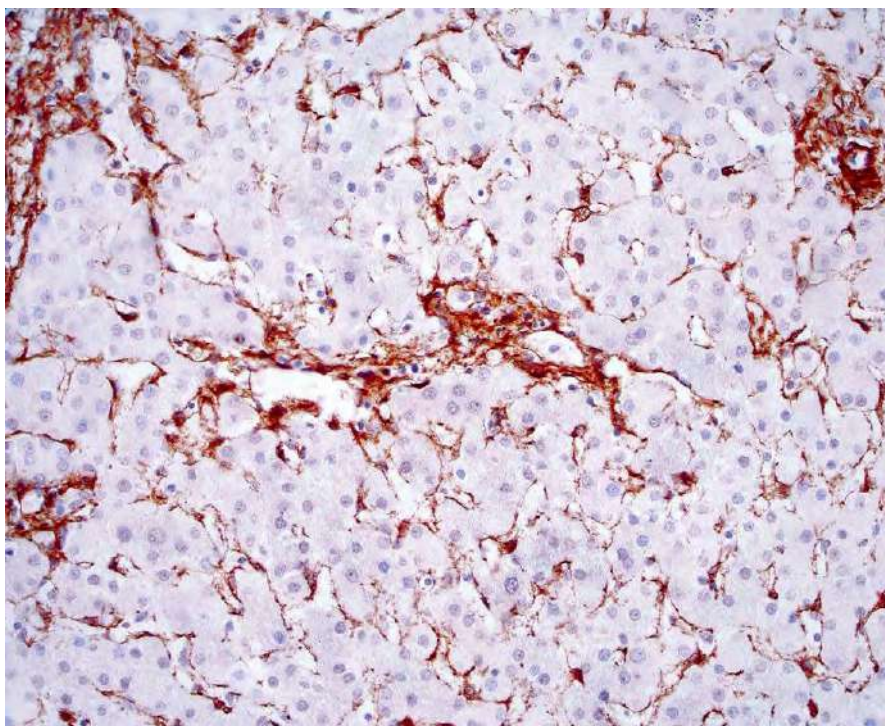


Рис. 5.33. Значна кількість α -SMA+ фіброblastів в подовженій внутрішньодольковій септі. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 800.

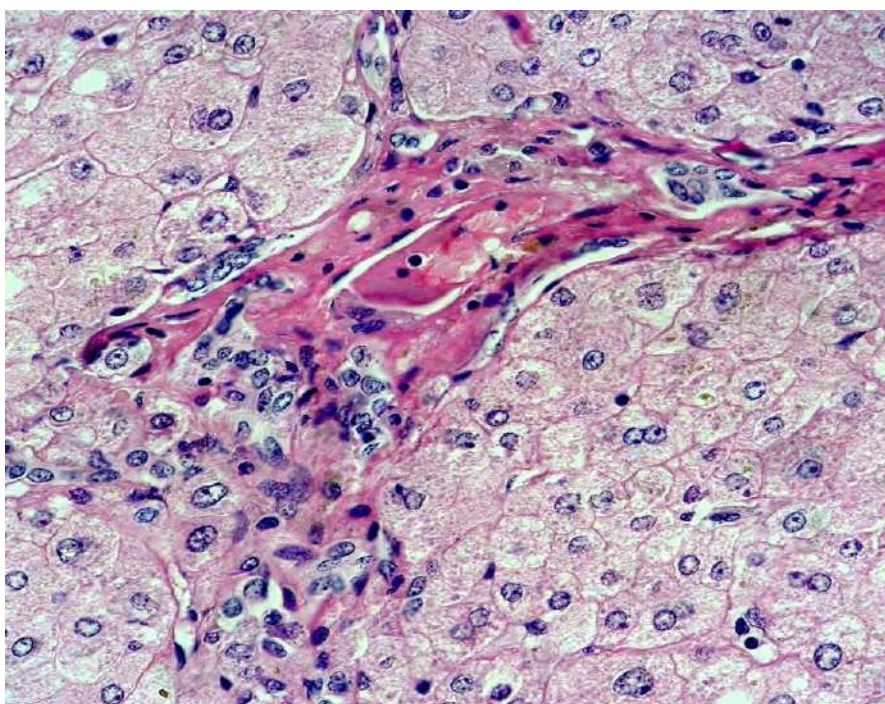


Рис. 5.34. Тяжкий фіброз внутрішньодолькової подовженої септи і її вільного кінця. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 800.

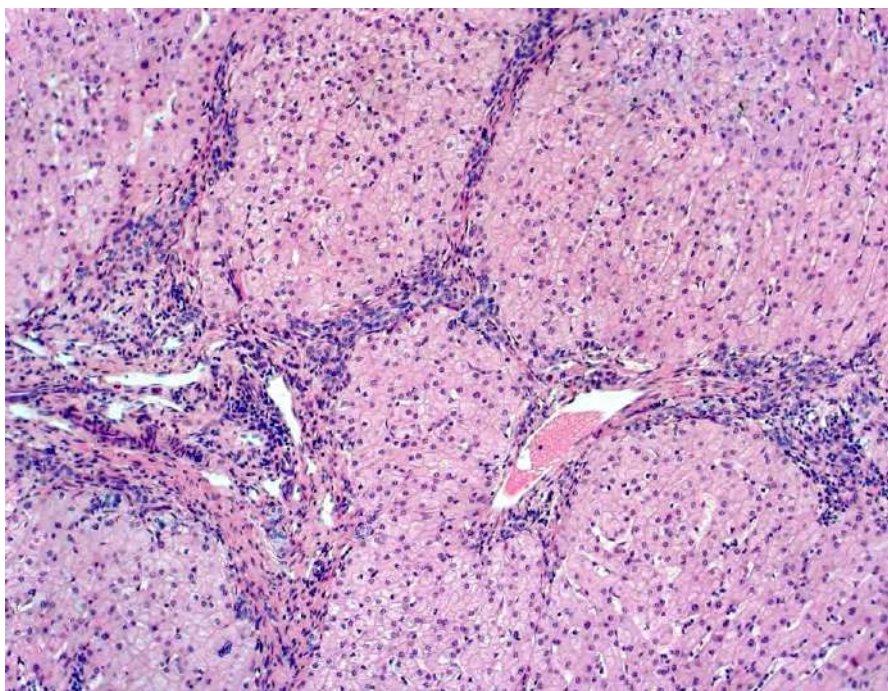


Рис. 5.35. Збільшення кількості активних фіброзних септ в печінкових дольках. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 100.

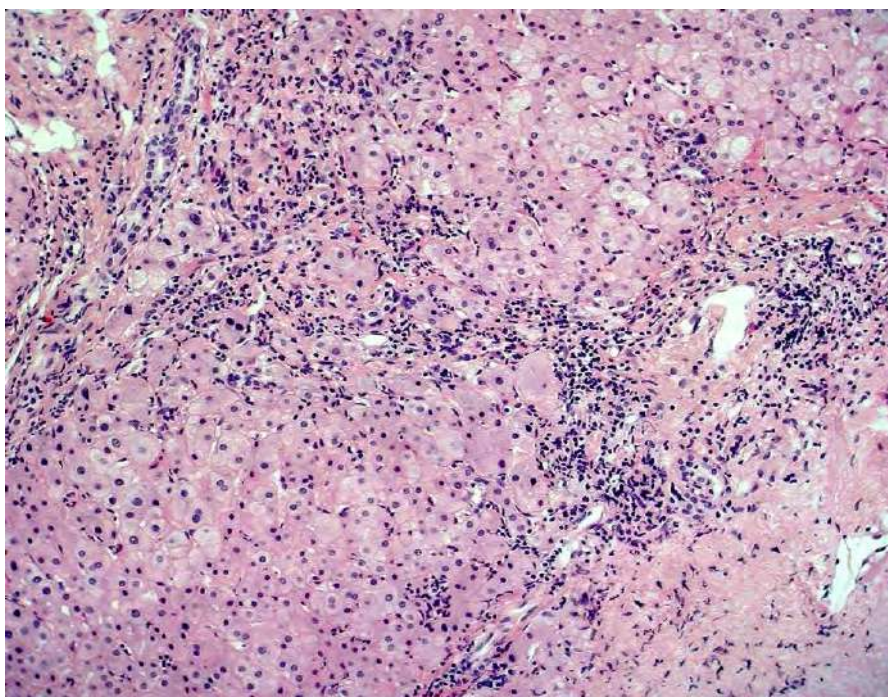


Рис. 5.36. Порто-лобулярно-портальні (мостоподібні) імуноклітинні інфільтрати, які розповсюджуються з одного портального тракту до сусіднього через печінкову дольку. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 200.

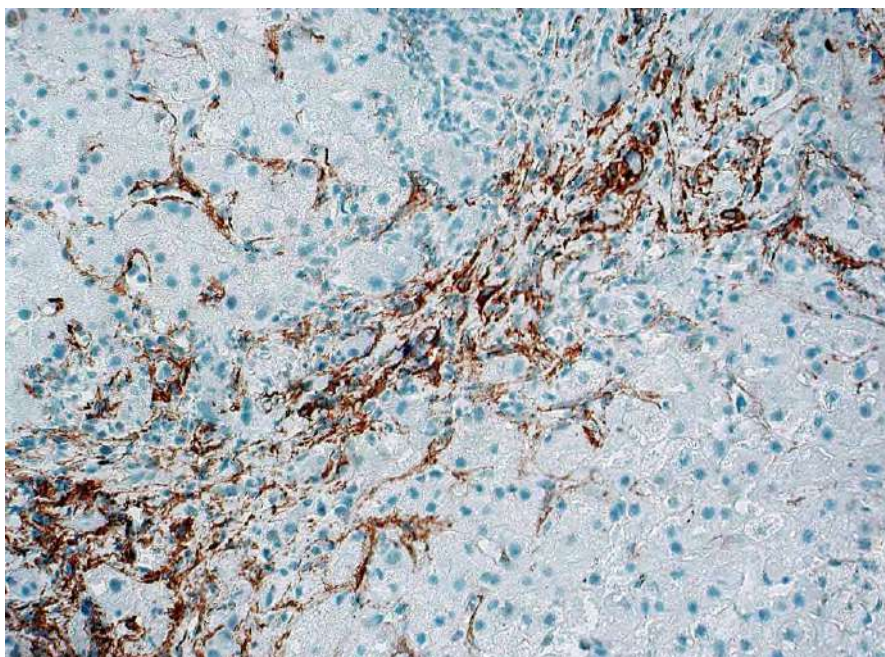


Рис. 5.37. Значна кількість α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин в мостоподібному імуноклітинному інфільтраті. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

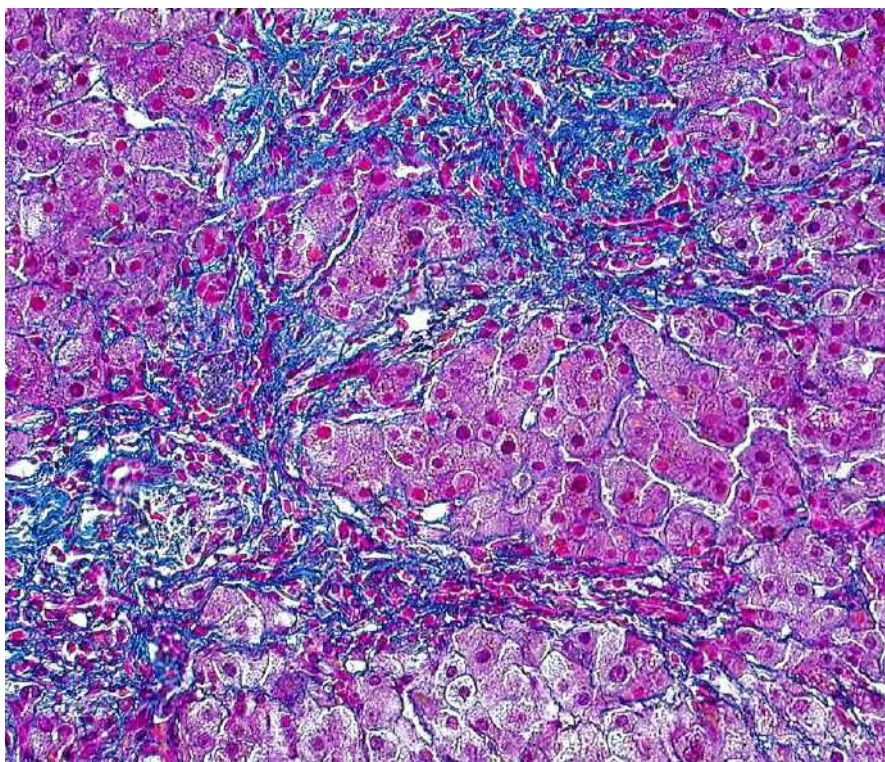


Рис. 5.39. Мостоподібні фіброзні септи різної товщини на місці порто-лобулярно-портальних імуноклітинних інфільтратів. Забарвлення трихром-Масон. Зб. х 400.

помірної колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів та слабкого або помірного перисинусоїдального фіброзу (при забарвленні за Ван-Гізон і трихром-Масон) свідчить про активацію фіброгенезу (Рис. 5.40 А, Б) і про подальшу можливу прогресію фіброзу. 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 в мікропрепаратах, забарвлених за Ван-Гізон та трихром-Масон, свідчить про стабілізацію вже сформованного помірного або тяжкого фіброзу (Рис. 5.41 А, Б).

Крім цього, результати виконаних комплексних патогістологічних, гістохімічних та імуногістохімічних досліджень довели, що основними прогностичними ознаками імовірного прогресування перисинусоїдального фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є поява в гепатобіоптаті ознак проліферації перисинусоїдальних зірчастих клітин або збільшення в печінкових дольках кількості активованих α -SMA⁺ перисинусоїдальних зірчастих клітин. При цьому стан внутрішньодолькових синусоїдів (без структурних змін, з помірним або значним розширенням їх отворів) не має суттєвого прогностичного значення.

Про процес перисинусоїдальної проліферації свідчить поява в дольках печінки значної кількості Ki-67⁺ перисинусоїдальних ЗКП (Рис. 5.42). Ki-67⁺ перисинусоїдальні клітини можуть ідентифікуватись в практично незмінених синусоїдах, що розцінюється як початок розвитку в найближчій час перисинусоїдального фіброзу, можуть визначатись в помірно або значно розширених синусоїдах, що свідчить про наявність в них фіброзу і про подальше прогресування перисинусоїдального фіброзу.

Не менш важливим прогностичним показником прогресування перисинусоїдального фіброзу є значне збільшення кількості активованих α -SMA⁺ перисинусоїдальних ЗКП в дольках печінки, які можуть виявлятись

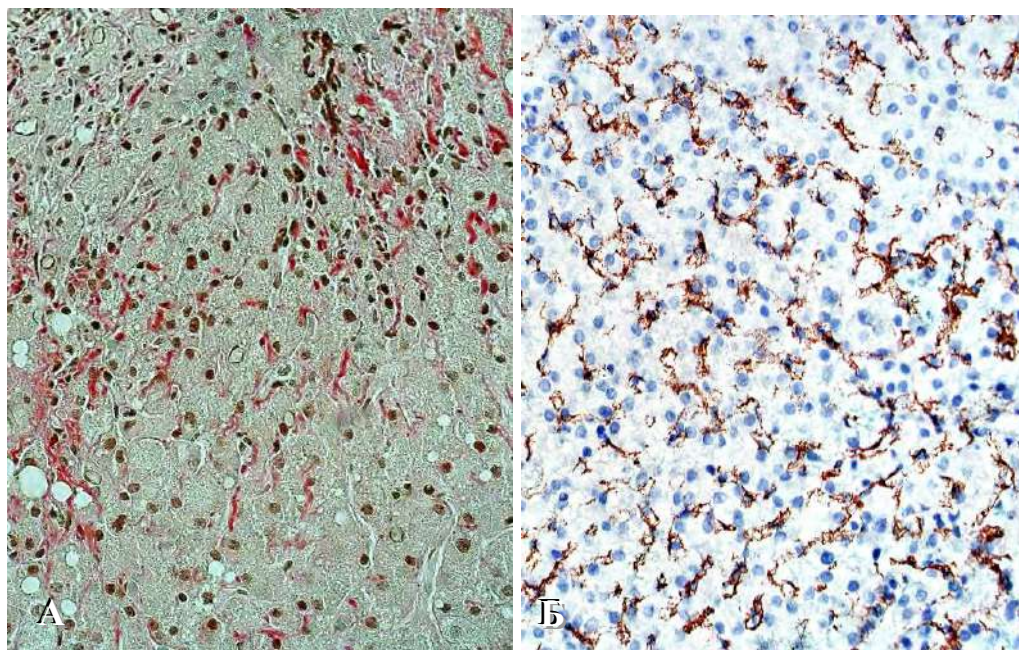


Рис. 5.40. Ознаки активації фіброгенезу на тлі помірного перисинусоїдального фіброзу. А – сегментарний перисинусоїдальний фіброз, забарвлення за Ван-Гізон. Б – виражена експресія α -SMA в значній кількості перисинусоїдальних зірчастих клітин, anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

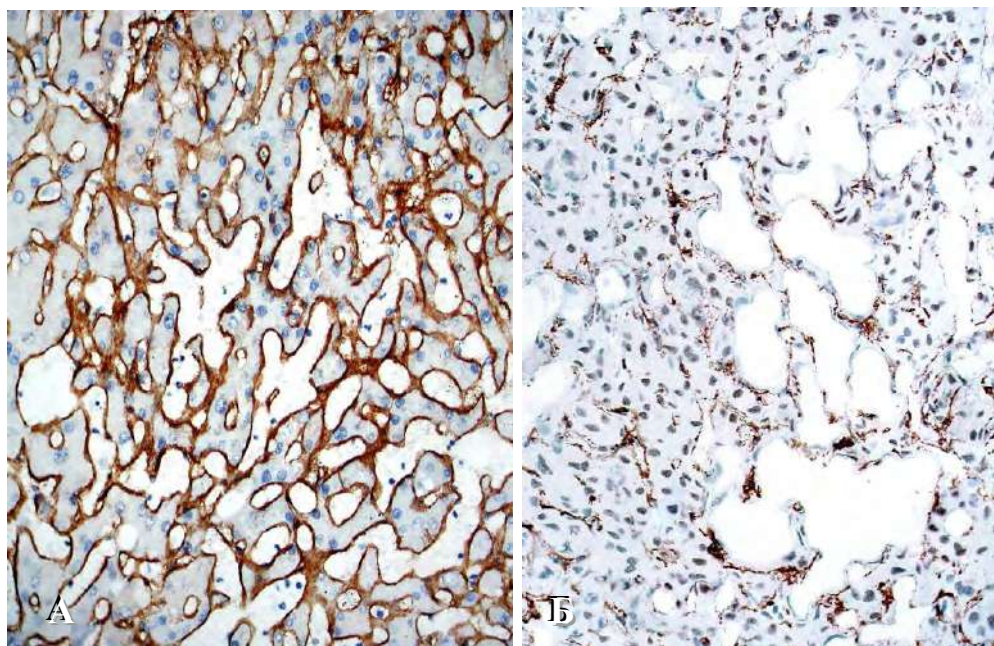


Рис. 5.41. Ознаки стабілізації вже сформованного важкого фіброзу А – колаген IV типу в перисинусоїдальних просторах значно розширених синусоїдів, anti-Collagen IV. Б – слабка експресія α -SMA в невеликій кількості перисинусоїдальних зірчастих клітин, anti- α -SMA. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400 (А), х 200 (Б).

як в мало змінених, так і у помірно розширених синусоїдах (Рис. 5.43), а також можуть визначатись на тлі вже значно вираженого перисинусоїдально-центролобулярного фіброзу, що спостерігається при паралельному забарвленні зрізів трепанобіоптатів печінки за Ван-Гізон і трихром-Масон (Рис. 5.44). Яскравим показником активації перисинусоїдального фіброзу є стан центролобулярних вен, навколо яких завжди концентрується велика кількість активованих α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин. При значній активації центролобулярного фіброзу α -SMA+ ЗКП утворюють навколо центролобулярних вен своєрідні широкі клітинні муфти.

Проведені дослідження показали, що для точного прогнозування розвитку перисинусоїдального фіброзу слід також визначати рівень апоптозу перисинусоїдальних ЗКП. В трепанобіоптатах деяких хворих на ХВГ С спостерігається значна кількість α -SMA+ перисинусоїдальних ЗКП, а при паралельному визначенні рівня апоптозу в значному числі цих збільшених у кількості перисинусоїдальних клітин ідентифікується виражена експресія каспази-3 (Рис. 5.45), що знижує імовірність розвитку перисинусоїдального фіброзу.

В результаті проведених патоморфологічних досліджень гепатобіоптатів визнано, що фактором ризику посилення фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є також прогресування стеатогепатозу. При посиленні дрібно-крупновакуольного стеатозу печінкових клітин у хворих на ХВГ С в дольках з'являються конгломератні вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів (Рис. 5.46 А) та зростає кількість стеатокіст (Рис. 5.46 Б). При посиленні стеатогепатозу в дольках печінки зростає загальна кількість α -SMA+ перисинусоїдальних ЗКП, які локалізуються навколо гепатоцитів зі значним стеатозом (Рис. 5.47), а також навколо стеатокіст (Рис. 5.48).

Результати паралельних гістохімічних і імуногістохімічних досліджень довели, що наслідком конгломератного кілінгу гепатоцитів є формування в дольках дрібних локусів фіброзу (Рис. 5.49), а навколо стеатокіст

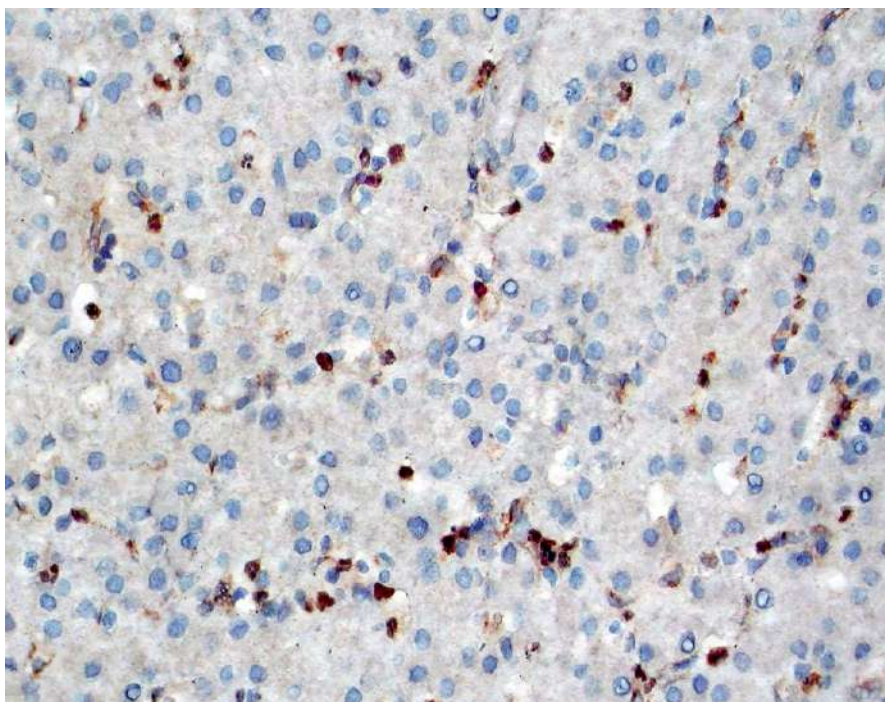


Рис. 5.42. Значна кількість Ki-67+ перисинусоїдальних зірчастих клітин. Anti-Ki-67, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 600.

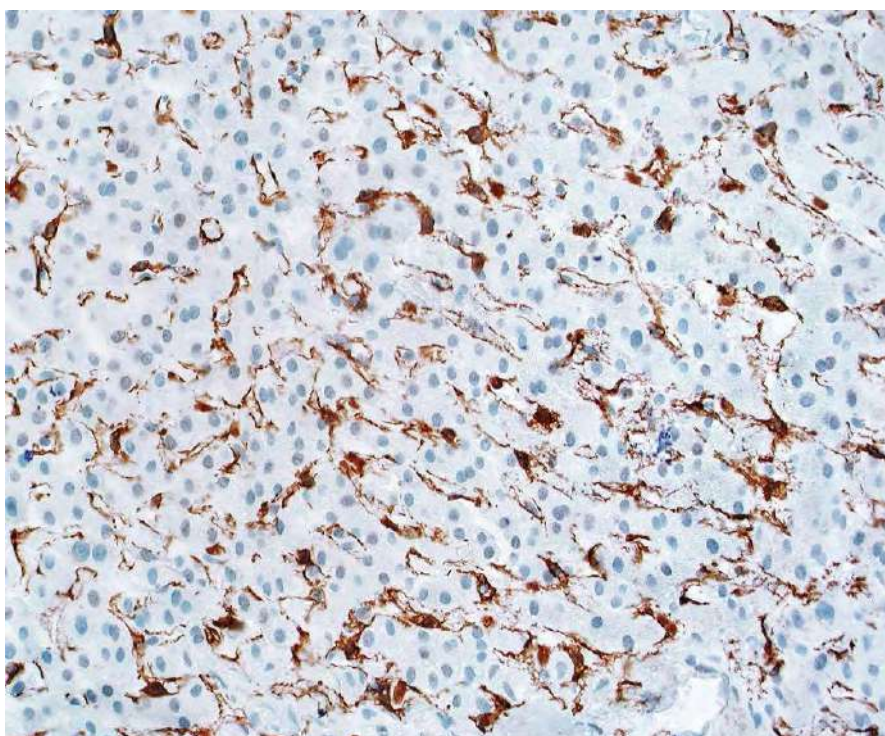


Рис. 5.43. Збільшення кількості α -SMA+ перисинусоїдальних ЗКП в помірно розширених синусоїдах. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 400.

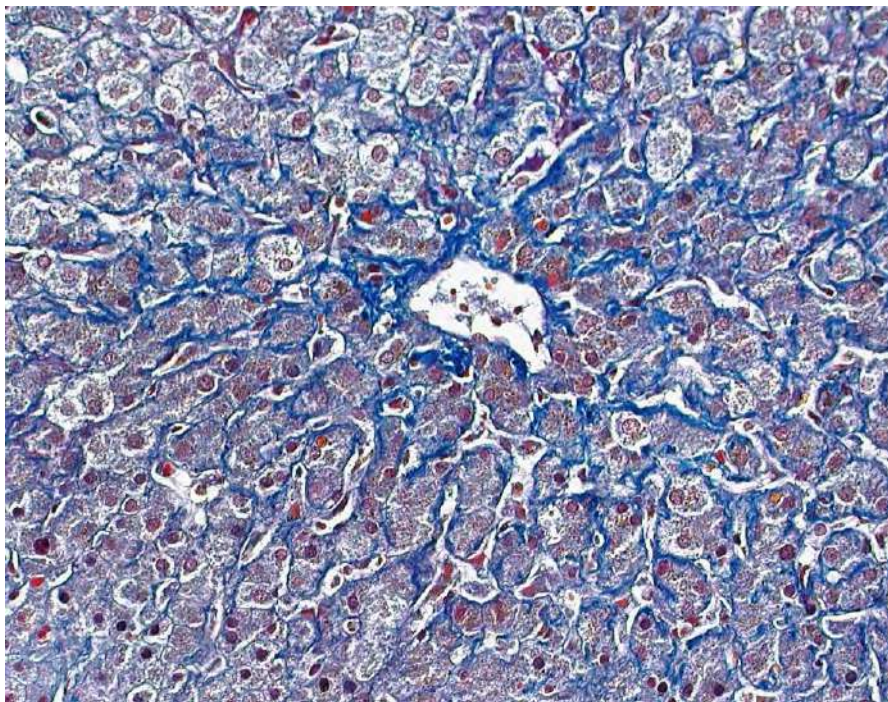


Рис. 5.44. Значний центролобулярно-перисинусоїдальний фіброз у хворого на ХВГ С з імуногістохімічними ознаками подальшої активації фіброзу печінки. Забарвлення трихром-Масон. Зб. х 400.

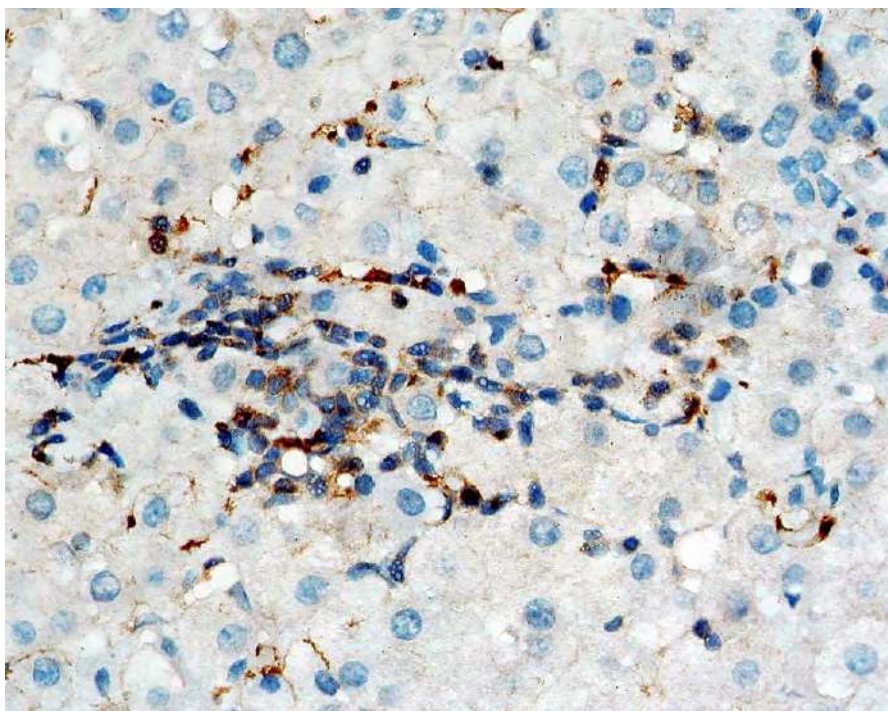


Рис. 5.45. Виражена експресія каспази-3 в значному числі збільшених у кількості перисинусоїдальних клітин. Anti-Caspase Ab3, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 800.

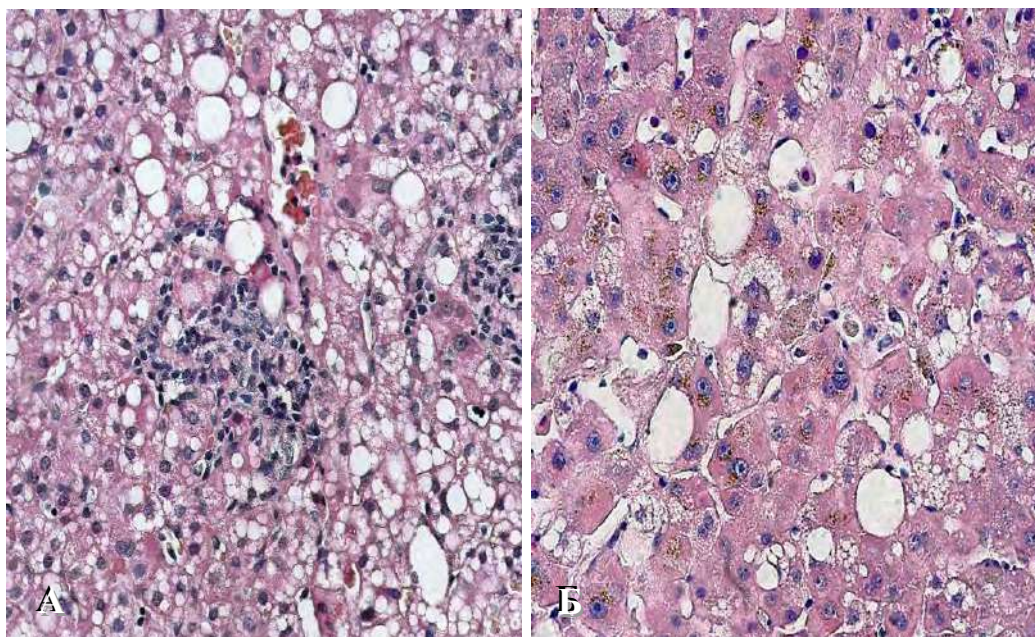


Рис. 5.46. Конгломератні вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів (А) та стеатокісти (Б) при посиленні дрібно-крупновакуольного стеатозу печінкових клітин у хворих на ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 200 (А), х 400 (Б).

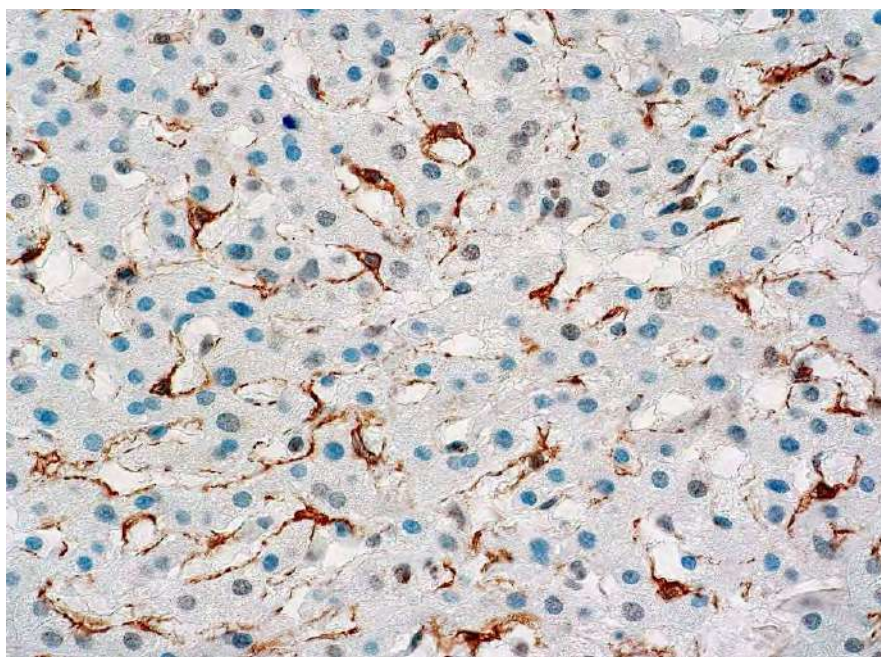


Рис. 5.47. Велика кількість активованих α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин, які локалізуються навколо гепатоцитів зі значним стеатозом. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

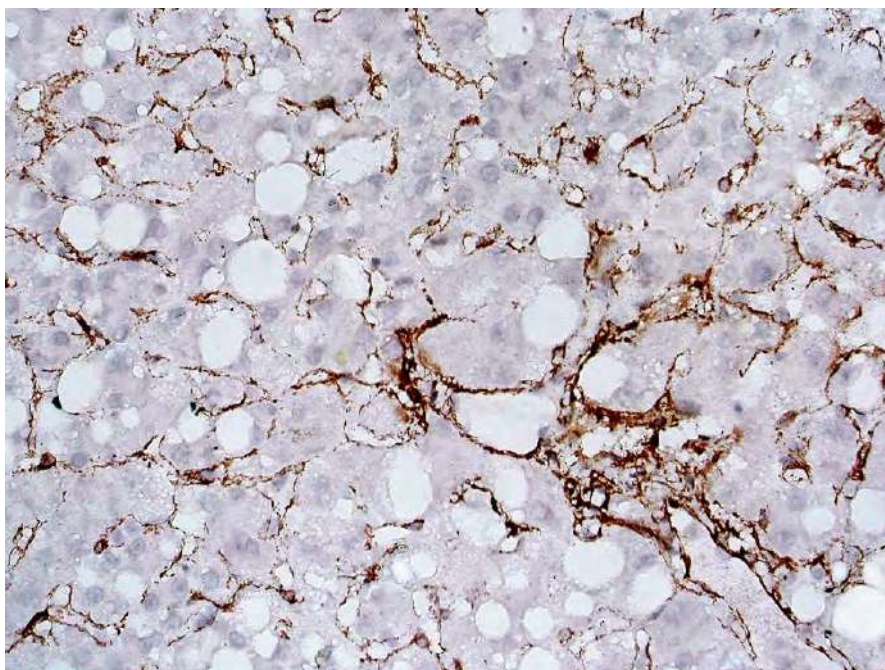


Рис. 5.48. Концентрація активованих α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин навколо стеатокіст. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 400.

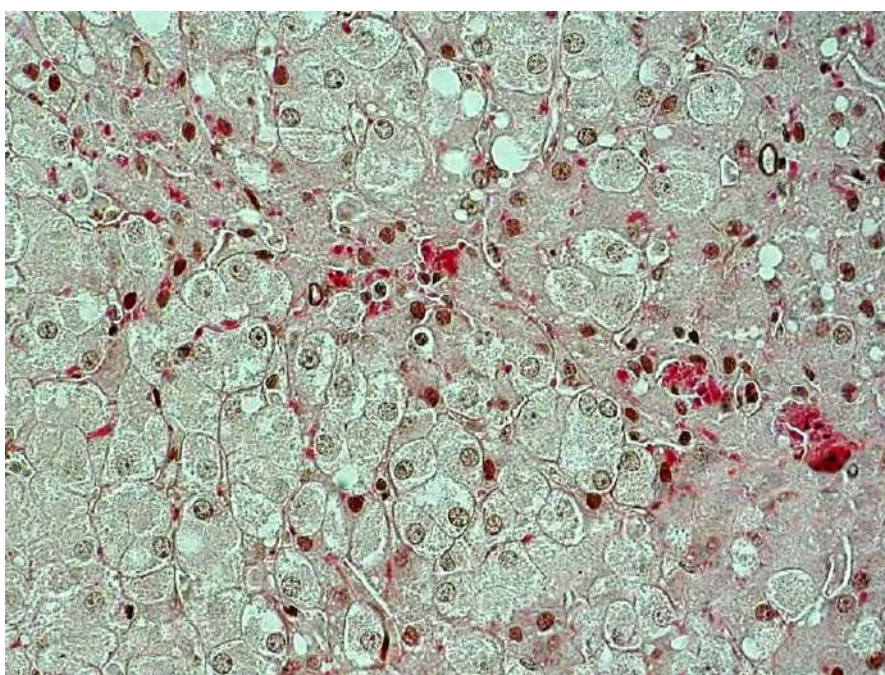


Рис. 5.49. Внутрішньодолькові дрібні локуси фіброзу на місці конгломератних вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів при посиленні стеатогепатозу у хворих на ХВГ С. Забарвлення за Ван-Гізон. 36. x 400

утворюються вогнища внутрішньодольного нерівномірного фіброзу з накопиченням навколо кіст колагену I і IV типу.

При посиленні стеатогепатозу у хворих на ХВГ С активація значної кількості α -SMA+ ЗКП навколо гепатоцитів зі значним стеатозом призводить до розвитку тяжкого внутрішньодолькового перичелюлярного фіброзу (Рис. 5.50) зі значним накопиченням колагену IV типу навколо вражених клітин печінки (Рис. 5.51).

При порівняльному аналізі патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів і інтраопераційних біоптатів печінки 90 хворих на ХВГ С із різним ступенем фіброзу печінки і різною виразністю імуноклітинної деструкції печінки та клініко-лабораторними даними щодо рівня сироваткової АлАТ було виявлено певну асоціацію між виразністю імуноклітинної деструкції печінки при нормальному рівні АлАТ і ступенем фіброзу печінки у хворих на ХВГС. (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Асоціація виразності імуноклітинної деструкції печінки при нормальному рівні АлАТ зі ступенем фіброзу печінки у хворих на ХВГ С (за даними розрахунку χ^2)

Імуноклітинна деструкція при нормальному рівні АлАТ	Ступені фіброзу печінки					
	Слабкий фіброз F1, n=19		Помірний фіброз F2, n=26		Тяжкий фіброз F3, n=6	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
Слабка, n=31	3,79	0,04	6,74	0,01	0,2	0,6
Помірна, n=17	4,5	0,03	0,42	0,53	0,1	0,7
Висока, n=3	0,5	0,48	3,75	0,04	6,4	0,01

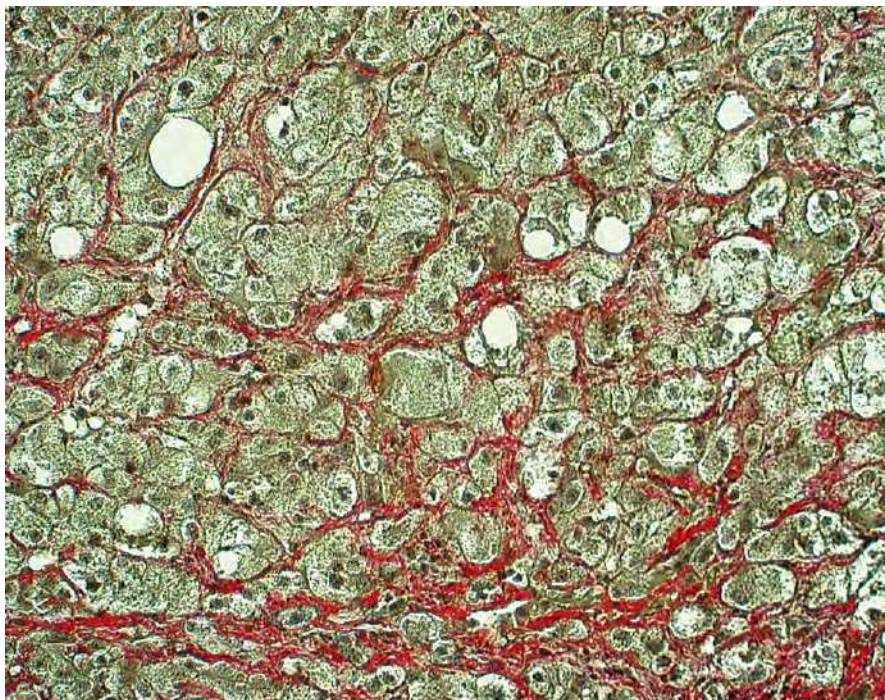


Рис. 5.50. Тяжкий внутрішньодольковий перицелюлярний фіброз печінки при посиленні стеатогепатозу у хворих на ХВГ С. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 400.

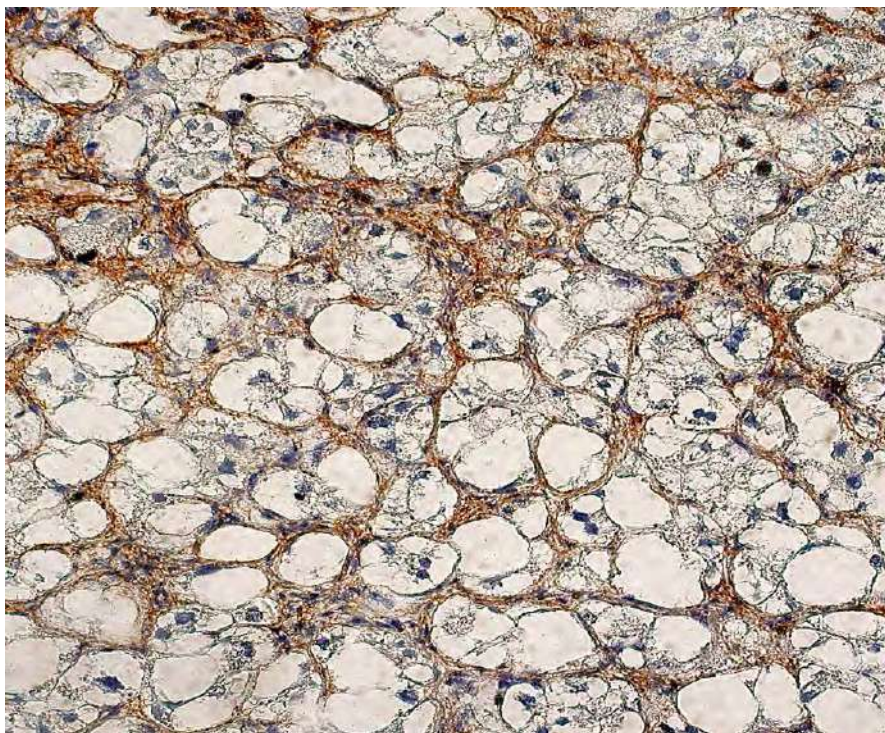


Рис. 5.51. Тяжкий внутрішньодольковий перицелюлярний фіброз печінки: значне накопичення колагену IV типу навколо вражених гепатоцитів при посиленні стеатогепатозу у хворих на ХВГ С. Anti–Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

За результатами комплексного аналізу даних патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів печінки з різним ступенем фіброзу і різною виразністю імуноклітинної деструкції та клініко-лабораторного визначення рівня сироваткової АлАТ у хворих на ХВГ С встановлено, що статистично значуща асоціація між виразністю імуноклітинної деструкції і рівнем клінічного маркера порушення печінкової функції 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 хворими с аналогічним ступенем фіброзу, але при низькій імуноклітинній деструкції печінки, що дозволяє виділити імуноклітинну деструкцію печінки як важливий предиктор розвитку імунобумовленого цитолітичного синдрому у хворих на ХВГ С.

Висновки. Встановлено, що формування в дольках осередків імуноклітинної деструкції і осередків цитолізу гепатоцитів призводить до утворення внутрішньодолькових великих неупорядкованих осередків фіброзу, а на місці імуноклітинних ланцюгів з клітинами цитолітичного спрямування формуються тонкі фіброзні септи. Збільшення протяжності та числа зон перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів»

призводить до зростання портально-перипортального фіброзу в печінці, збільшення кількості активних портально-долькових септ призводить до прогресування септального фіброзу печінки, поява імуноклітинних мультилобулярних і «мостоподібних некрозів» завершується утворенням протяжних зон порто-лобулярно-портального і мультилобулярного фіброзу, який знаходиться на межі з цирозом печінки.

Проведені комплексні патогістологічні, гістохімічні, комп'ютерно-морфометричні і ІГХ дослідження показали, що головними прогностичними ознаками вірогідного прогресування фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є виражена активація імуноклітинної деструкції печінки та значного вогнищового цитолізу гепатоцитів, проліферація і збільшення кількості фіброгенних ЗКП в дольках та активованих фібробластів в портальних трактах, поява активних фіброзних септ і прогресування значної дрібно-крупновокуольної дистрофії гепатоцитів та стеатокіст при стеатозі печінки.

Активація імуноклітинної деструкції печінки морфологічно проявляється появою в дольках імуноклітинних інфільтратів з CD8⁺ Т-кілерами і CD68⁺ макрофагами, які займають в дольках велику площу або мають вигляд розгалужених ланцюгів. В таких імуноклітинних інфільтратах визначається апоптотична загибель каспаза-3⁺ гепатоцитів, а також формуються великі вогнища цитолізу гепатоцитів в печінкових дольках. ІГХ дослідження показали, що в імуноклітинних інфільтратах з'являється і активується значна кількість перисинусоїдальних α -SMA⁺ ЗКП, які забезпечують розвиток на місці внутрішньодолькових осередків імуноклітинної деструкції неупорядкованих вогнищ фіброзу неправильної форми, а також розвиток на місці внутрішньодолькових імуноклітинних ланцюгів тонких фіброзних септ.

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 макрофагами Купфера, макрофагами і лімфоцитами портальних трактів і «ступінчастих некрозів», а також макрофагами внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратів. 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 більшим числом перисинусоїдальних ЗКП, а також визначається експресія TIMP-1 клітинами Купфера, гепатоцитами, макрофагами і лімфоцитами імуноклітинних інфільтратів портальних трактів та «ступінчастих некрозів». Таким чином, доведено, що при фіброзі печінки у хворих на ХВГ С активація імуноклітинної інфільтрації і деструкції одночасно стимулює експресію металопротеїнази MMP-9 та її тканинного інгібітора TIMP-1.

Морфологічним проявом імовірної активації портально-перипортального фіброзу є значне збільшення в портальних трактах і в зонах перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів» кількості α -SMA+ активованих фібробластів, які синтезують надлишок колагенів, а накопиченню колагенів сприяє значна експресія портальними макрофагами і лімфоцитами TIMP-1, який подавляє фібролітичну активність металопротеїназ.

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+ фібробластиами при помірному фіброзі печінки F2 і тяжкому фіброзі печінки F3. Площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластиами при тяжкому фіброзі печінки F3 достовірно більша ніж площі портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластиами при слабкому F1 і помірному фіброзі печінки F2.

З імовірною активацією фіброзу печінки у хворих на ХВГ С тісно пов'язане утворення множинних активних септ з підвищеною кількістю CD8+T-кілерів і CD68+ макрофагів на їх вільних кінцях, в яких на кордоні з тканиною печінки спостерігаються каспаза-3+ гепатоцити, що гинуть апоптозом. При подальшій еволюції в активних септах з'являється значна кількість α -SMA+ фібробластів, імуноклітинна інфільтрація септ зменшується і формується фіброз подовжених септ.

ІГХ методами встановлено, що виражена експресія α -SMA в значній кількості перисинусоїдальних зірчастих клітин печінки на тлі слабкої або помірної колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів та слабкого або помірному перисинусоїдального фіброзу свідчить про активацію фіброгенезу і про подальшу можливу прогресію фіброзу. Мала кількість α -SMA+ фіброгенних клітин на тлі слабкої або помірної колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів печінки вказує на відсутність активації фіброгенезу. Слабка експресія α -SMA+ ЗКП на тлі вираженої перисинусоїдальної і центролобулярної колагенізації та наявності центролобулярно-перисинусоїдального фіброзу свідчить про стабілізацію вже сформованного помірному або тяжкого фіброзу.

Результати виконаних комплексних патогістологічних, гістохімічних і імуногістохімічних досліджень довели, що основними прогностичними ознаками імовірного прогресування перисинусоїдального фіброзу печінки у хворих на ХВГ С є поява в гепатобіоптаті ознак проліферації Ki-67+ перисинусоїдальних зірчастих клітин або збільшення в печінкових дольках кількості активованих α -SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин. Яскравим показником активації перисинусоїдального фіброзу є стан

центролобулярних вен, навколо яких завжди концентрується велика кількість активованих α -SMA⁺ перисинусоїдальних зірчастих клітин, які утворюють навколо центролобулярних вен своєрідні широкі клітинні муфти.

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 виразність розвитку перисинусоїдального фіброзу навіть при значній кількості α -SMA⁺ перисинусоїдальних зірчастих клітин в дольках печінки.

Матеріали розділу відображені в статтях : [180], [182], [184], [185], [186], [187], [188], [190], [191].

РОЗДІЛ 6

ПАТОГІСТОЛОГІЧНІ, ГІСТОХІМІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ЗМІНИ В ПЕЧІНЦІ ПРИ ЦИРОЗІ І ЙОГО ПРОГРЕСУВАННІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

Цироз печінки у хворих на ХВГ С є подальшою стадією еволюції попереднього тяжкого фіброзу печінки або фіналом безсимптомного перебігу хвороби. З 268 обстежених нами хворих у 18% пацієнтів з вперше виявленими маркерами ХВГ С при біопсії було діагностовано цироз печінки.

6.1. Морфологічні відмінності цирозу від тяжкого фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С

Комплексний патоморфологічний і імуногістохімічний аналіз гепатобіоптатів у хворих на ХВГ С дозволив виділити певні особливості фіброгенезу, які відрізняють цироз від тяжкого фіброзу печінки. З діагностичних позицій цироз на початку його формування, на відмінність від тяжкого фіброзу, характеризується появою перших нечисленних псевдодольок, які представляють собою оточені сполучною тканиною гепатоцелюлярні вузли без централобулярних вен. В їх формуванні провідну роль відіграють три процеси: глибока penetрація в дольки активних портально-долькових септ з мікросудинами, поява численних порто-дольково-портальних «мостоподібних» септ, а також інтенсифікація утворення активованими фібробластами та перисинусоїдальними клітинами фіброгенного типу надлишку компонентів ПКМ, серед яких домінують колагени I і IV типу. Кумуляція надлишку колагенів та інших компонентів ПКМ, в свою чергу, сприяє посиленню фіброза та розширенню портальних трактів і фіброзних септ.

В формуванні ранніх стадій цирозу важливу роль відіграє активація ангиогенезу: при мікроскопічному дослідженні спостерігається збільшення кількості нових капілярів на кінцях активних портально-долькових септ, які розгалужують вільні кінці септ в дольках печінки, а також penetрація з септ і перипортальних зон в печінкові дольки мікросудин, оточених тонкими фіброзними прошарками, і навіть формування ними в дольках кільцеподібних структур (Рис. 6.1). Поступово в печінці зростає кількість порто-дольково-портальних «мостоподібних» септ, порто-портальних і порто-центральных септ, поєднання яких у сукупності призводить до формування в фіброзно змінній печінці невеликих псевдодольок, які спочатку оточені тонкими фіброзними прошарками (Рис. 6.2).

Результати наших досліджень показали, що при подальшому розвитку мікронодулярного цирозу в печінці у хворих на ХВГ С інтенсифікується фіброгенез, про що свідчать виявлені при ІГХ аналізі численні α -SMA+ колагенпродукуючі фібробласти в портальних трактах, перипортальних зонах фіброзу і в сполучнотканинних септах, а також α -SMA+ активовані перисинусоїдальні клітини в дольках печінки і навколо централобулярних вен. Водночас виявляється поширена позитивна експресія колагену I і IV типів в портальних і централобулярних зонах, численних сполучнотканинних септах різної локалізації і фібротизованих перисинусоїдальних просторах Дісе внутрішньодолькових синусоїдів печінки (Рис. 6.3). При гістохімічному забарвленні зрізів печінки за методом Ван Гізона і трихром-Масона виявляється розширення фібротизованих портальних трактів та потовщення і подовження численних порто-центральных і «мостоподібних» сполучнотканинних септ (Рис. 6.4).

Мікроскопічні дослідження гепатобіоптатів у хворих на ХВГ С підтвердили відомі положення про те, що при цирозі печінки має місце аномальна перебудова внутрішньопечінкової артеріально-портальної гемомікроциркуляції, метапластична перебудова печінкових дольок та їх

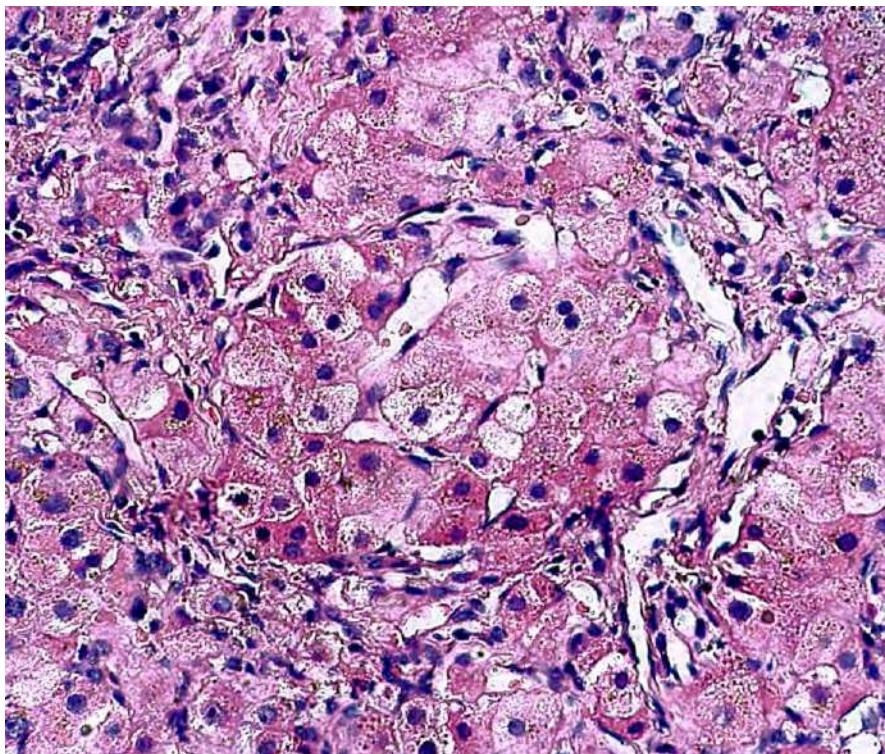


Рис. 6.1. Пенетрація з септ і перипортальних зон в печінкову дольку мікросудин, оточених тонкими фіброзними прошарками, з формуванням кільцеподібних структур. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 600.

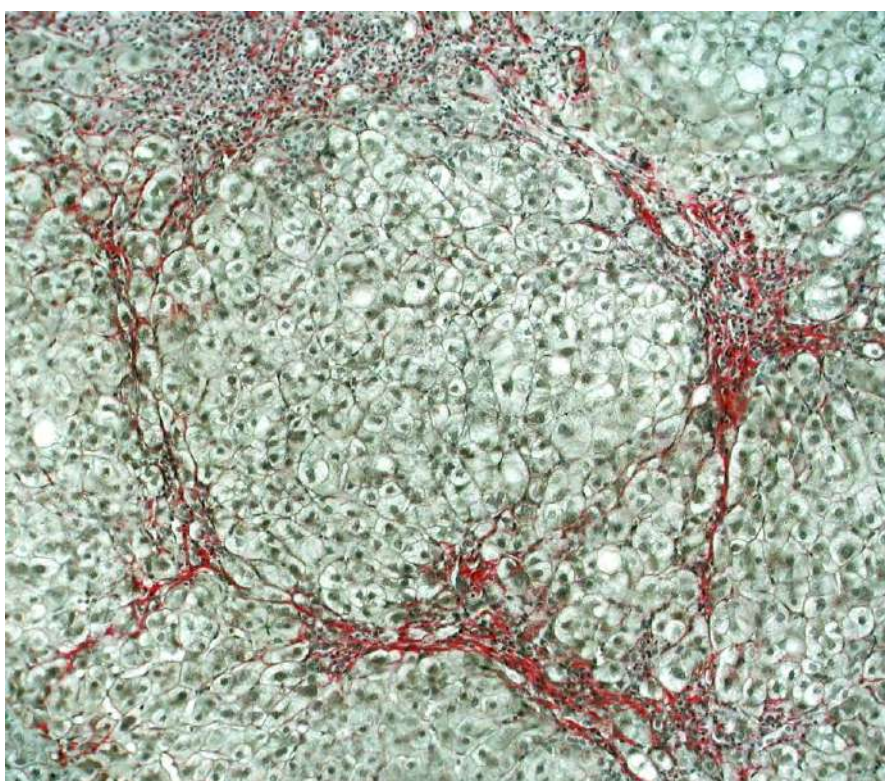


Рис. 6.2. Формування в фіброзно зміненій печінці псевдодольок. Забарвлення за Ван Гізон. Зб. х 400.

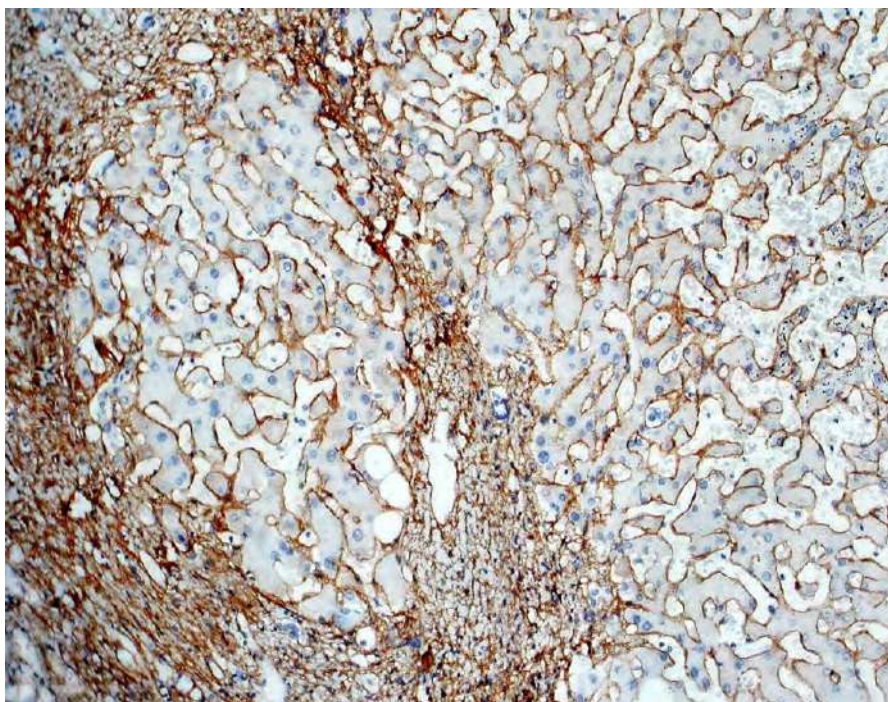


Рис. 6.3. Розповсюджена експресія колагену IV типу в портальному тракті, в сполучнотканинній септі навколо псевдодольки і в фібротизованих перисинусоїдальних просторах Дісе внутрішньодолькових синусоїдів при цирозі печінки. Anti–Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

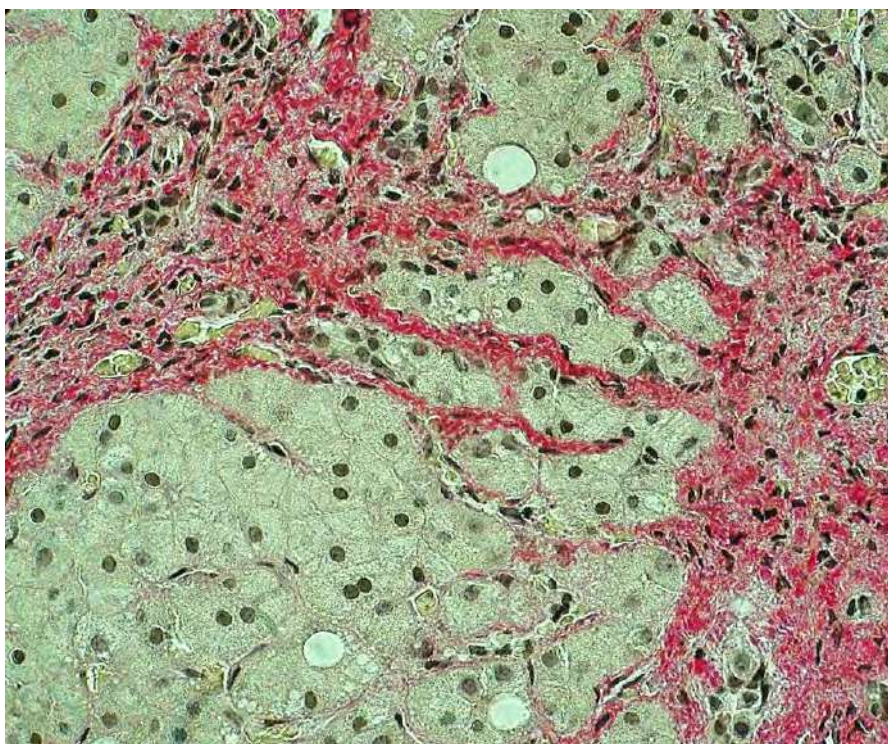


Рис. 6.4. Розширення фібротизованих потральних трактів та потовщення і подовження «мостоподібних» сполучнотканинних септ при цирозі печінки. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. x 600.

втрата, а також значне розростання сполучної тканини в печінці із формуванням псевдодольок.

Мікроскопічні дослідження циротично зміненої печінки у хворих на ХВГ С виявили певні відмінності структури фіброзно потовщених портальних трактів і множинних фіброзних септ у порівнянні з тяжким фіброзом печінки. Так, в фіброзно потовщених портальних трактах і в фіброзно розширених сполучнотканинних септах спостерігається підвищена кількість артеріальних мікросудин і капілярів та значна кількість розширених вен. Про активний неоангіогнез свідчить позитивна експресія PCNA і Ki-67 в ядрах ендотелію мікросудин в портальних трактах і фіброзних септах. В фіброзно потовщених портальних трактах визначається підвищене число дрібних холангіол (Рис. 6.5 А) внаслідок їх проліферації, що підтверджується експресією Ki-67 і PCNA в ядрах значного числа епітеліоцитів холангіол при застосуванні ІГХ методик (Рис. 6.5 Б)

Комплексне патоморфологічне, гістохімічне і імуногістохімічне дослідження показало, що у збережених істинних дольках і новоутворених псевдодольках печінки у хворих на ХВГ С зберігаються патологічні зміни, які передували розвитку цирозу. При світловій мікроскопії в гепатоцитах виявляються білкова і жирова дистрофія, ядерний поліморфізм, подекуди – внутрішньоклітинні холестази і «пісочні ядра» в окремих клітинах. У деяких хворих спостерігається стійке розширення внутрішньодолькових синусоїдів, в перисинусоїдальних просторах яких, при імуногістохімічному дослідженні, виявляється накопичення колагену I і IV типу та численні активовані α -SMA+ клітини Іто. У частини хворих виявляються перипортальні і перисептальні імуноклітинні «ступінчасті некрози» (Рис. 6.6).

При паралельному застосуванні гістологічних, гістохімічних та ІГХ методик в трепанаційних та інтраопераційних гепатобіоптатах у хворих на ХВГ С можливо диференціювати, так званий, стабільний цироз і активний цироз печінки з ознаками прогресування.

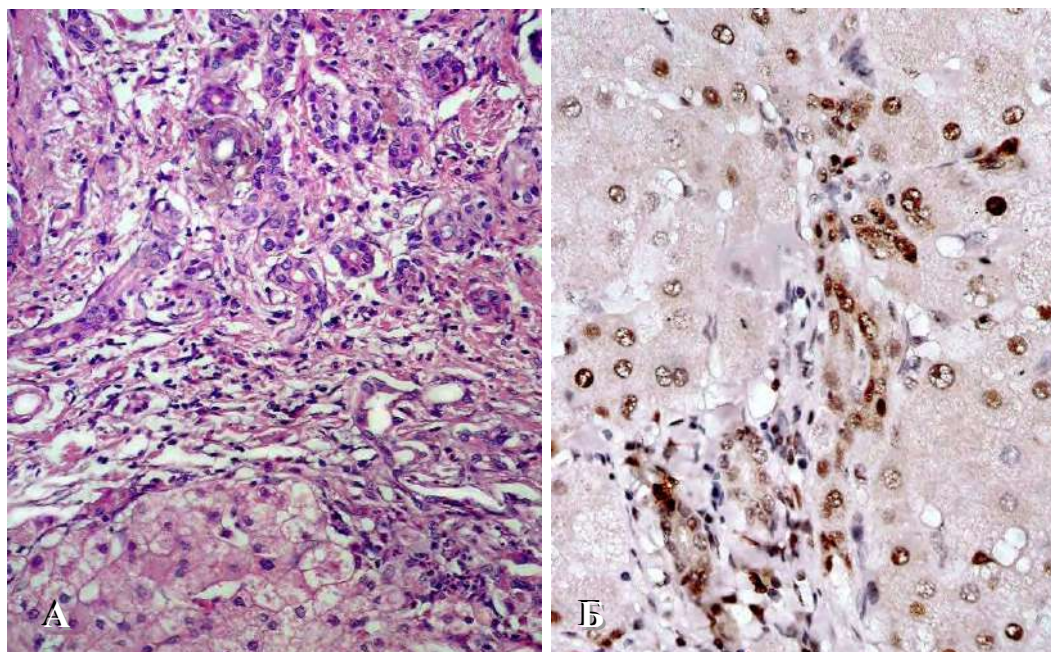


Рис. 6.5. А – підвищене число дрібних холангіол в фіброзно потовщеному портальному тракті. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Б – експресія PCNA в зоні проліферації холангіол і овальних клітин в краю портального тракту при цирозі печінки. Anti-PCNA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400 (А); х 600 (Б).

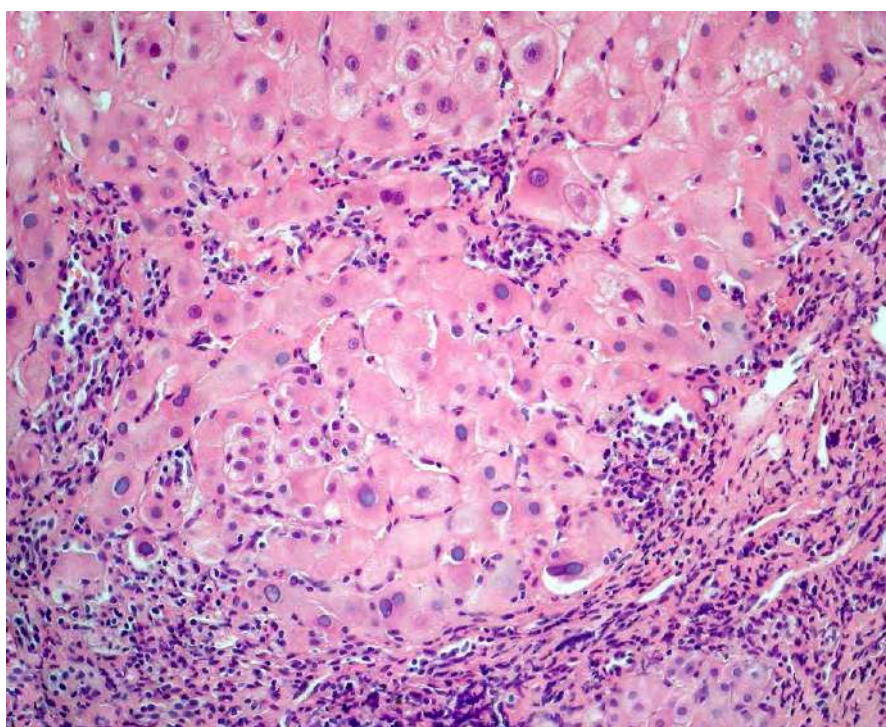


Рис. 6.6. Перипортальні і перисептальні імуноклітинні «ступінчасті некрози» при цирозі печінки у хворого на ХВГ С. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

Стабільний цироз печінки характеризується тяжким фіброзом потовщених портальних трактів і фіброзом різного ступеня численних портально-долькових, міждолькових та «мостоподібних» септ, а також фіброзом навколо дольок і псевдодольок, без наявності в зонах фіброзу суттєвої імуноклітинної інфільтрації (Рис. 6.7). Як правило, в дольках і псевдодольках відсутні імуноклітинні інфільтрати, відсутні перипортальні і перисептальні імуноклітинні «некрози» та ішемічні некрози (Рис. 6.7). В поодиноких портальних трактах подекуди можуть спостерігатись дрібні імуноцитарні інфільтрати, в дольках і псевдодольках інколи трапляються поодинокі вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. Колаген I і IV типу визначається в потовщених портальних трактах і в численних портально-долькових, міждолькових та «мостоподібних» септах, а також у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах. В потовщених портальних трактах і септах визначається невелика кількість α -SMA+ фібробластів, а в перисинусоїдальних просторах і навколо центролобулярних вен визначаються поодинокі α -SMA+ ЗКП та поодинокі CD68+ клітини Купфера без ознак фагоцитарної активності. Характерна низька проліферативна активність фібробластів і фіброгенних перисинусоїдальних ЗКП, стабілізацію фіброгенезу 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 клітин Іто та невелика кількість TIMP-1+ перисинусоїдальних клітин Іто.

Діагноз активний цироз передбачає наявність морфологічних змін в печінці, які свідчать про можливість прогресування цирозу. Ознаками активності цирозу, які частіше за все визначаються в мікропрепаратах, забарвлених за Ван-Гізон або гематоксиліном і еозином, є імуноклітинна деструкція та активація фіброгенезу в циротично зміненій печінці (Рис. 6.8).

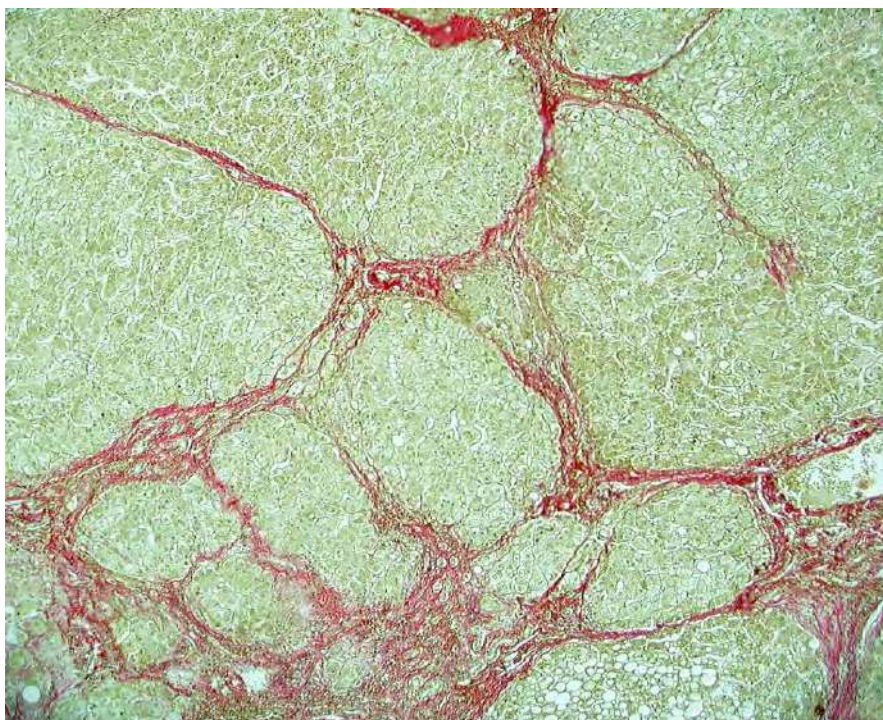


Рис. 6.7. Стабільний мікронодулярний цирроз печінки у хворого на ХВГ С. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 100.

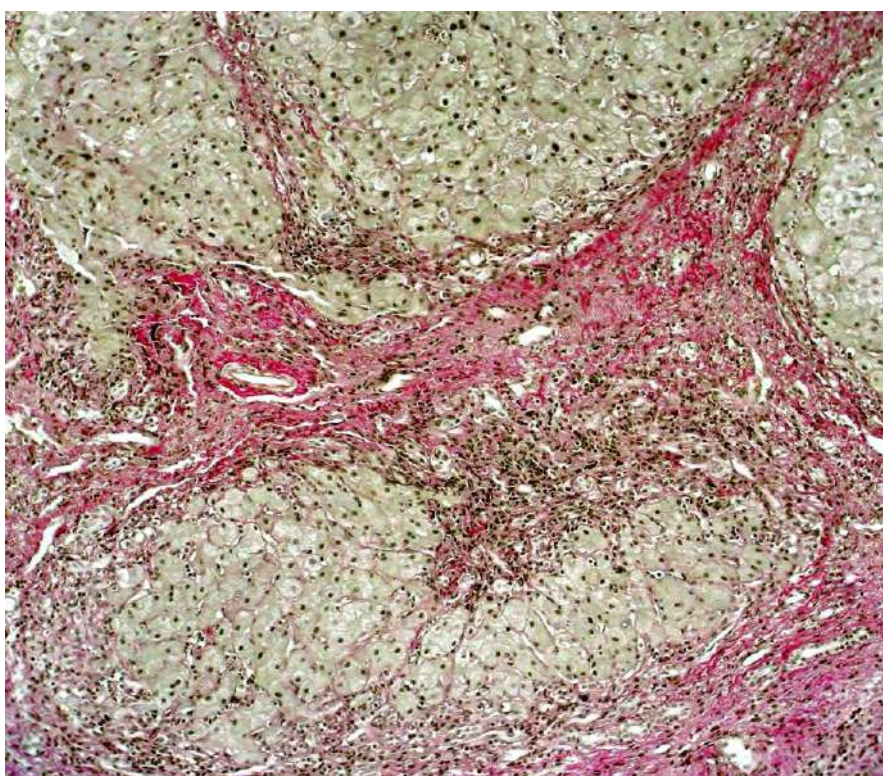


Рис. 6.8. Активний мікронодулярний цирроз з ознаками імуноклітинної деструкції і активації фіброзу печінки у хворого на ХВГ С. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 200.

6.2. Морфогенез і основні типи прогресування цирозу печінки та їх клінічні прояви у хворих на хронічний вірусний гепатит С

Проведені гістологічні, гістохімічні і імуногістохімічні дослідження дозволили визначити морфогенез основних типів прогресування цирозу печінки: зростання імуноклітинної деструкції печінки, прогресування фіброгенезу в дольках і псевдодольках циротично зміненої печінки, прогресування перичелюлярного 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.

За результатами виконаних досліджень найбільш прогностично несприятливими ознаками прогресування цирозу є поширені некротичні зміни дольок і псевдодольок та імуноклітинна деструкція печінки. Поширені некрози дольок і псевдодольок циротично зміненої печінки ускладнюються печінково-клітинною недостатністю, а імуноклітинна деструкція печінки змінюється прогресуючим фіброзом з портальною гіпертензією.

Для активного цирозу з ознаками імуноклітинної деструкції характерна, по-перше, імуноцитарна інфільтрація різної локалізації і різного ступеня вираженості, а також морфологічні прояви імуноклітинної деструкції в дольках і псевдодольках. У морфологічно обстежених нами хворих на ХВГ С з активним цирозом печінки в 33% випадків визначалась помірна імуноцитарна активація, а у 40% хворих вона була вираженою.

В портальних трактах і в фіброзних септах у таких хворих спостерігається вогнищева і дифузна імуноклітинна інфільтрація різного ступеня (від слабкої до вираженої). Слід відзначити, що дифузна імуноцитарна інфільтрація в більшості випадків поширюється з фіброзно потовщених портальних трактів на перипортальні зони, а також на фіброзно потовщені сполучнотканинні прошарки, які оточують дольки і псевдодольки циротично зміненої печінки (Рис. 6.9). В портально-перипортальних

інфільтратах визначаються CD20+ В-лімфоцити, CD45R0+ лімфоцити, CD8+ Т-лімфоцити і CD68+ макрофаги (Рис. 6.10).

В порталних трактах у хворих виявляються фолікулоподібні структури (Рис. 6.11). У фолікулоподібних імуноклітинних інфільтратах в центрі виявляються CD20+ В-лімфоцити і CD68+ макрофаги, на периферії – CD45R0+ лімфоцити, CD8+ Т-лімфоцити і CD68+ макрофаги. Сегментарна імуноклітинна інфільтрація також визначається у розширених внутрішньодолькових синусоїдах, при ІГХ аналізі в перисинусоїдальних просторах виявляються CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ клітини Купфера і поодинокі CD20+ В-лімфоцити.

Морфологічними проявами імуноклітинної деструкції дольок печінки при цирозі є численні імуноклітинні «ступінчасті некрози» та «мостоподібні некрози», а також численні вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. Імуноклітинні «некрози» значно поглиблюються в дольки і псевдодольки та суттєво змінюють їх цитоархітектоніку (Рис. 6.12). При ІГХ аналізі в зонах «ступінчастих некрозів» і «мостоподібних некрозів» визначаються у великій кількості цитотоксичні CD8+Т-лімфоцити, множинні CD68+макрофаги, поодинокі NK-клітини і нечисленні CD20+ В-лімфоцити, а при мікроскопії мікропрепаратів, забарвлених гематоксиліном і еозином, в них визначається імуноклітинний кілінг, патогенно індукований апоптоз і каріоцитолізис гепатоцитів (Рис. 6.13).

У частини хворих на ХВГ С з цирозом печінки внутрішньодолькові зони імуноклітинної деструкції мають дифузний характер, їх інтенсивність коливається від занадто вираженої (Рис. 6.14) до значної (Рис. 6.15). При дифузній внутрішньодольковій імуноклітинній деструкції спостерігається апоптоз і некроз значної кількості гепатоцитів, і водночас визначається внутрішньодольковий фіброз (Рис.6.16).

У численних вогнищах імуноклітинного кілінгу в псевдодольках і дольках при цирозі печінки переважають CD8+Т-лімфоцити-кілери, присутні

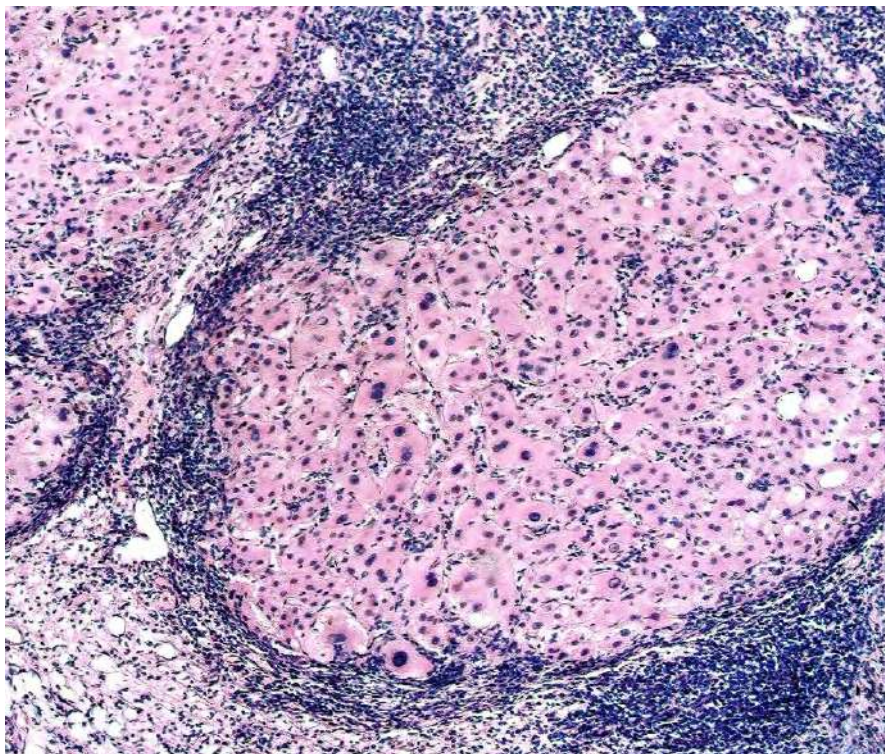


Рис. 6.9. Дифузна імуноцитарна інфільтрація широких сполучнотканинних прошарків, які оточують дольки і псевдодольки при цирозі печінки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 200.

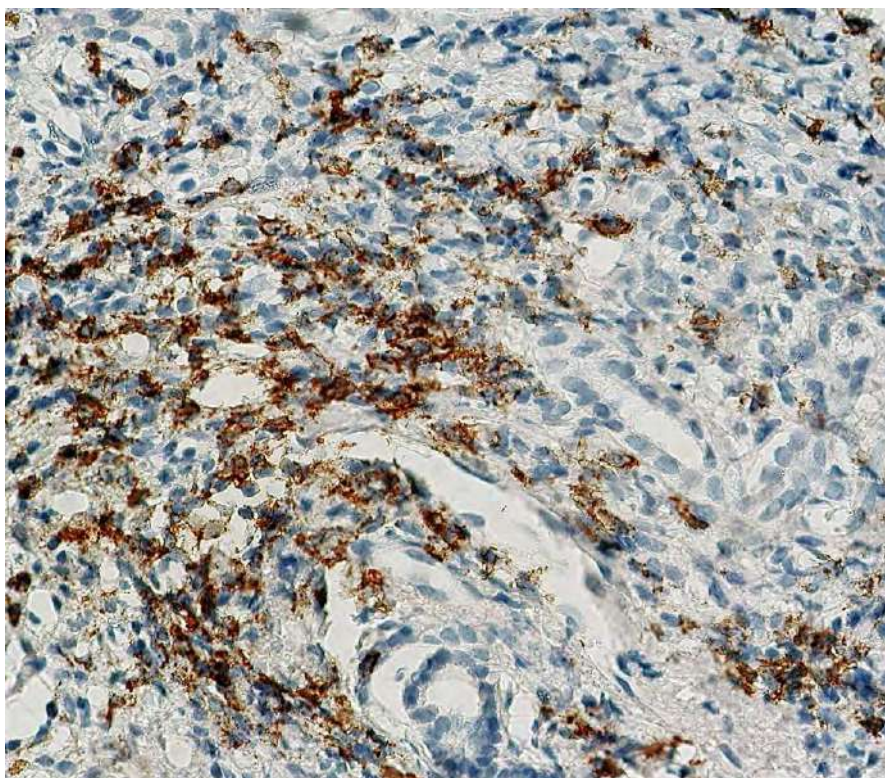


Рис. 6.10. CD45RO+ лімфоцити в портально-перипортальному імуноклітинному інфільтраті. Anti-CD45RO, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 800.

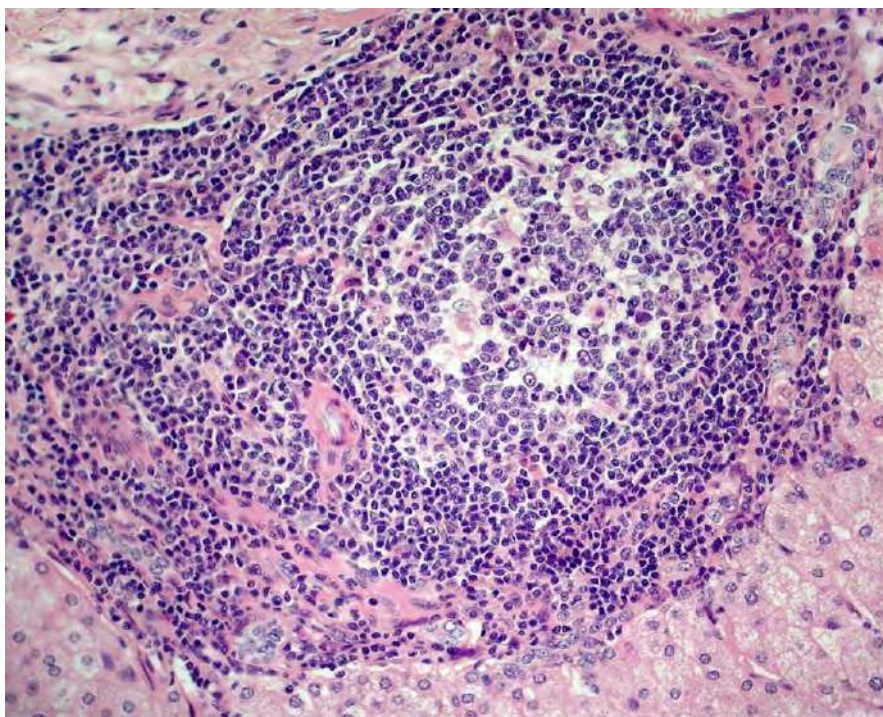


Рис. 6.11. Значний фолікулоподібний імуноклітинний інфільтрат в портальному тракті при цирозі печінки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

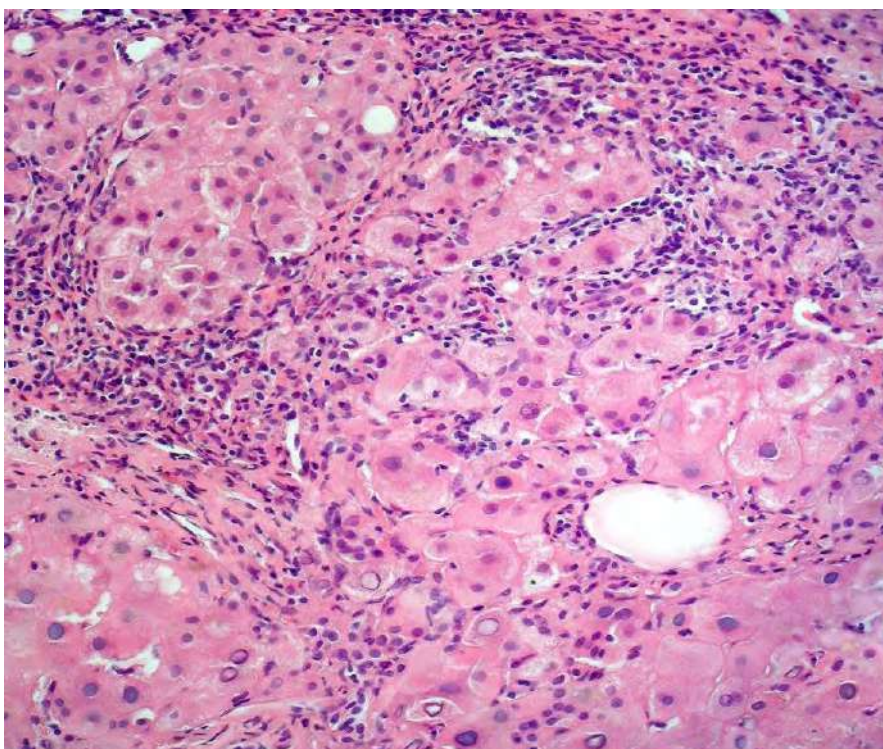


Рис. 6.12. Імуноклітинні «некрози» значно поглиблюються у псевдодольки та суттєво змінюють їх цитоархітектоніку. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 600.

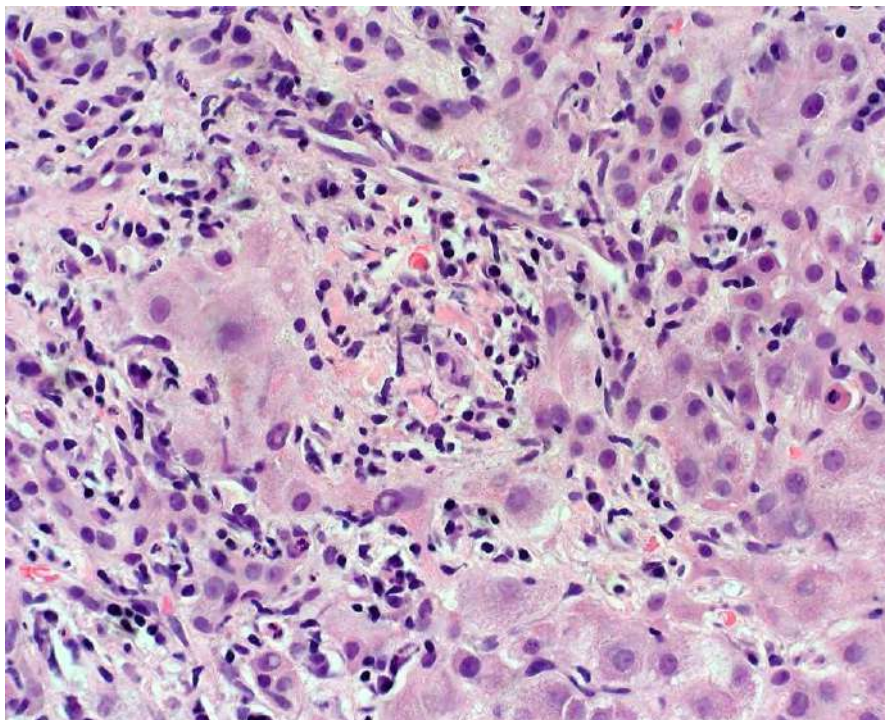


Рис. 6.13. Апоптоз і каріоцитолізіс гепатоцитів в зоні перипортального імуноклітинного «ступінчастого некрозу» при цирозі печінки. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 800.

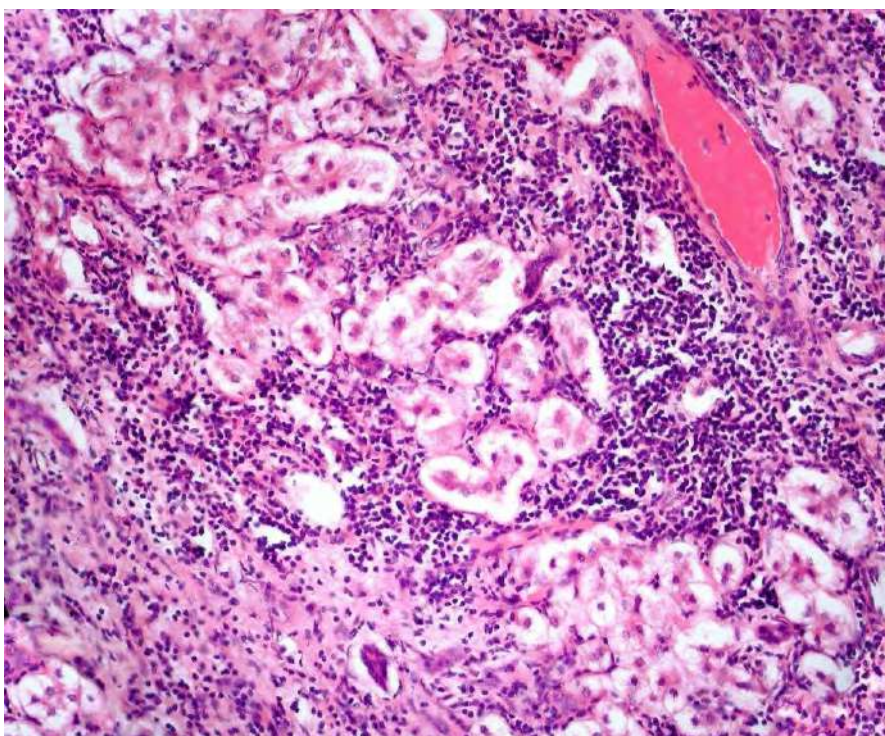


Рис. 6.14. Занадто виражена імуноклітинна деструкція при цирозі печінки. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

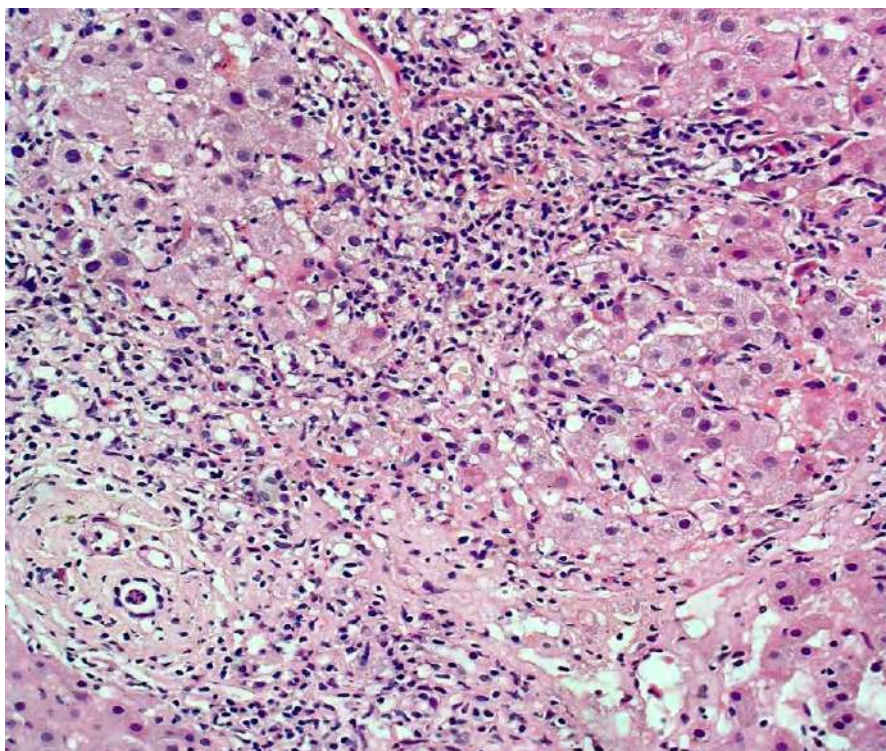


Рис. 6.15. Зона значної дифузної внутрішньодолькової імуноклітинної деструкції при цирозі печінки. Зabarвлення гематоксилином та еозином. 3б. х 400.

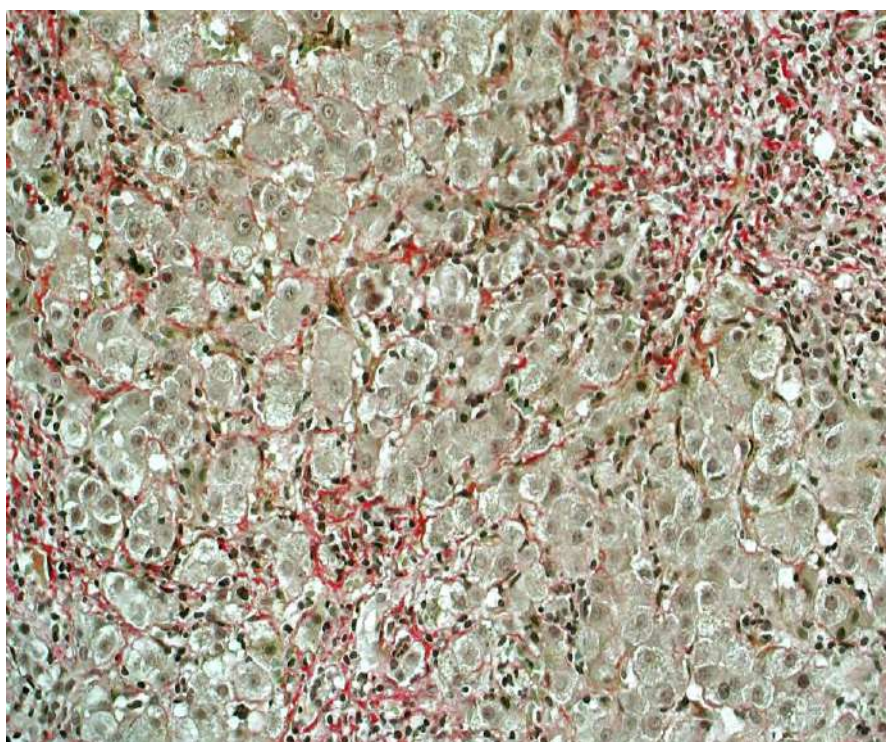


Рис. 6.16. Фіброз в зоні значної дифузної внутрішньодолькової імуноклітинної деструкції. Зabarвлення за Ван-Гізон. 3б. х 400.

CD68+ макрофаги і поодинокі CD20+ В-лімфоцити. При ІГХ аналізі у вогнищах імуноклітинного клінінгу і в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» і «мостоподібних некрозів» визначаються приречені на загибель гепатоцити з високим рівнем експресії каспази-3.

Основною мікроскопічною ознакою активації фіброзу в циротично змінений печінці, яка виявляється при забарвленні зрізів за Ван-Гізон і трихром-Масон, є збільшення кількості дрібних і тонких фіброзних септ в дольках і псевдодольках печінки, поява сегментарного перисинусоїдального фіброзу, а також поширення перипортального фіброзу (Рис. 6.17). Активний розвиток септ і зростання в них фіброзу підтверджують результати проведених ІГХ досліджень проліферативної активності клітин при цирозі печінки. При використанні ІГХ маркерів клітинної проліферації PCNA і Ki-67 встановлена достатньо інтенсивна проліферація Ki-67+ фібробластоподібних клітин в фіброзних септах (Рис. 6.18) та овальних клітин на межі фіброзних септ і печінкових дольок.

Найбільш надійним показником активації фіброзу в циротично змінений печінці є співставлення в серійних зрізах рівня фіброзу (при забарвленні за Ван-Гізон і трихром-Масон), 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 змінений печінці на тлі високого рівня експресії колагену IV типу в фіброзних прошарках навколо дольок печінки і різного рівня експресії колагену IV типу у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах (він може бути низьким при слабкому перисинусоїдальному фіброзі і може бути значним при тяжкому перисинусоїдальному фіброзі) водночас визначається високий рівень експресії α -SMA в активованих внутрішньодолькових ЗКП навколо центролобулярних вен і в перисинусоїдальних просторах, а також в фібробластах портальних трактів, фіброзних прошарках навколо псевдодольок, фібробластах внутрішньодолькових, порто-портальних

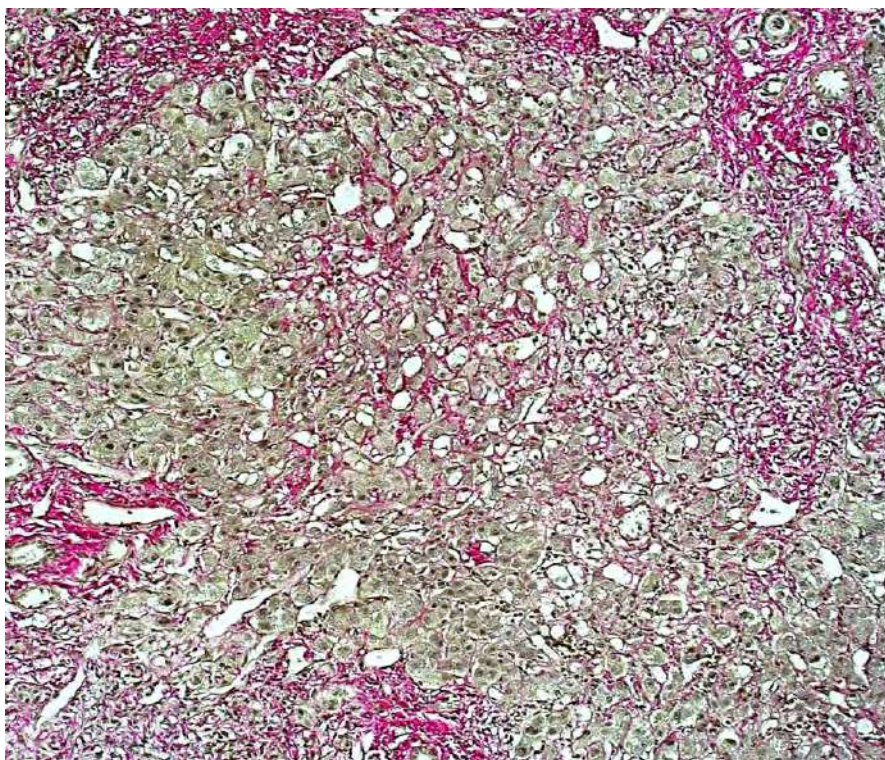


Рис. 6.17. Поява внутрішньодолькового сегментарного перисинусоїдального фіброзу і поширення перипортального фіброзу при цирозі печінки. Зabarвлення за Ван-Гізон. 3б. х 200.

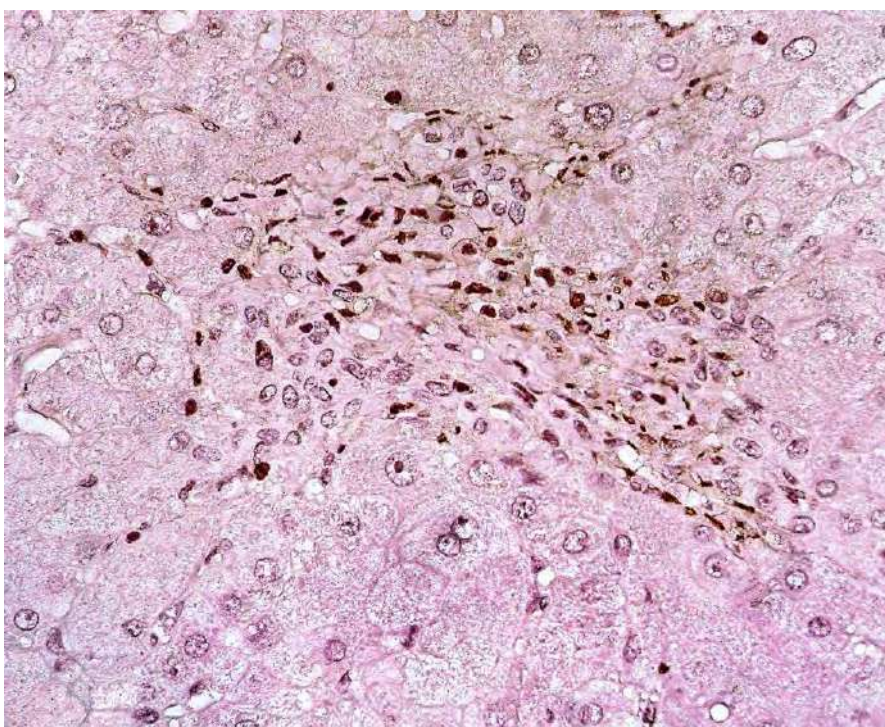


Рис.6.18. Експресія Ki-67 в зоні проліферації фібробластоподібних клітин і перипортальних овальних клітин при цирозі печінки. Anti-Ki-67, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 3б. х 600.

і «мостоподібних» септ (Рис. 6.19). Нами також спостерігалась позитивна експресія PCNA і Ki-67 в ядрах перисинусоїдальних клітин Іто в дольках і псевдодольках при активації фіброзу в цирозі печінки. 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 лише про стабільний тяжкий фіброз в циротично зміненій печінці (Рис. 6.20 А, Б).

При подальшому прогресуванні фіброзу в циротично зміненій печінці, при застосуванні ІГХ методик, у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах, в фіброзно потовщених портальних трактах, сполучнотканинних прошарках навколо псевдодольок і в фіброзних септах спостерігається поширена експресія колагену IV типу (Рис. 6.21) і α -SMA (Рис. 6.22). Наслідком прогресування фіброзу при цирозі печінки, що визначається в трепанобіоптатах, є переважання площі фіброзу над площею залишків тканини печінки. У найбільш тяжких ситуаціях в печінці визначаються надзвичайно розповсюджені зони портально-перипортального фіброзу (Рис. 6.23) та фрагментація псевдодольок фіброзними прошарками на дрібні групи гепатоцитів з перисинусоїдальним фіброзом (Рис. 6.24).

Результати досліджень показали, що в прогресуванні фіброзу в циротично зміненій печінці значну роль відіграє дисбаланс між секрецією і активністю матриксних металопротеїназ та їх тканинних інгібіторів. Встановлено, що при цирозі печінки головними клітинами-джерелами експресії MMP-9 є макрофаги Купфера, фібробласти портальних трактів і прогресуючих фіброзних септ, активовані перисинусоїдальні клітини Іто в синусоїдах і навколо центролобулярних вен, гепатоцити, а також і лімфоцити імуноклітинних інфільтратів портальних трактів, «ступінчастих некрозів», «мостоподібних некрозів», вогнищ імуноклітинного кілінгу. Позитивна експресія TIMP-1 виявлялась переважно в активованих ЗКП, була менш вираженою в клітинах Купфера, гепатоцитах і лімфоцитах

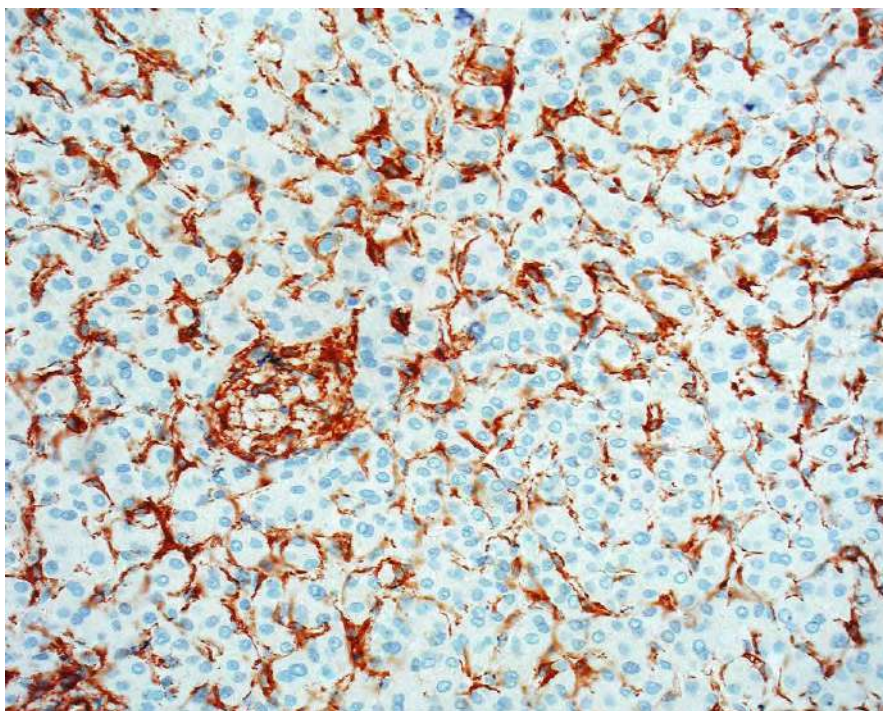


Рис. 6.19. Поширена експресія α -SMA в активованих внутрішньодолькових фіброгенних ЗКП навколо центролобулярних вен і в перисинусоїдальних просторах при активації фіброзу в цирозі печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400.

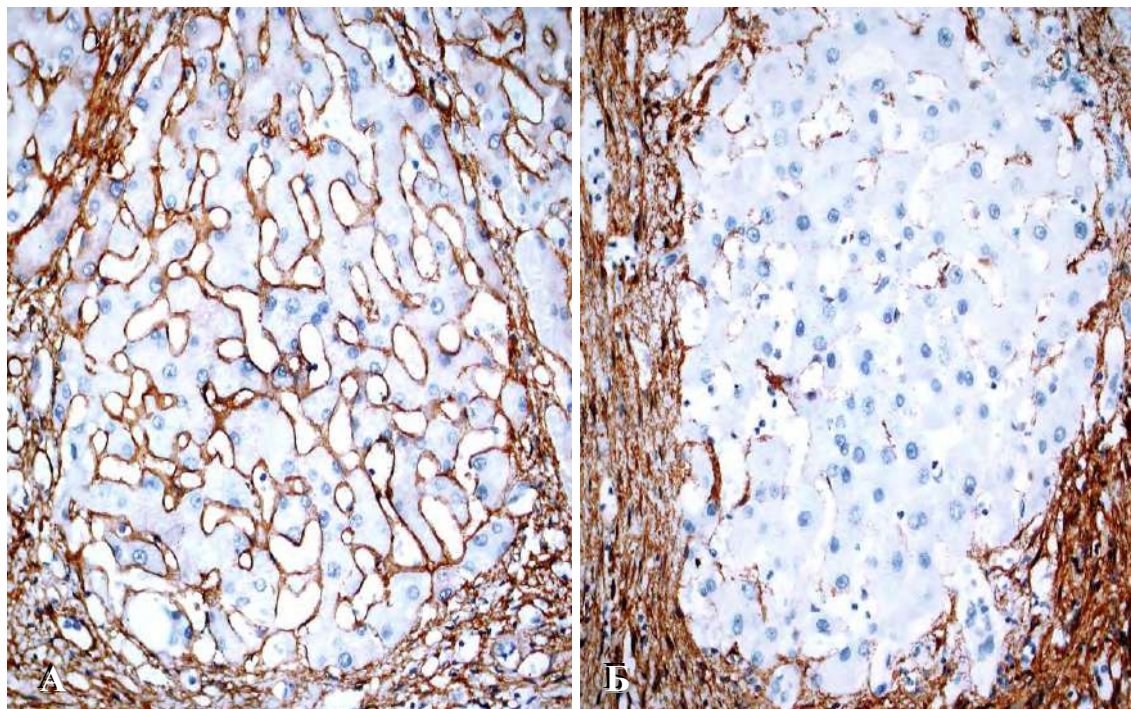


Рис. 6.20. Стабільний фіброгенез при цирозі печінки. А – значна експресія колагену IV типу в септах навколо дольки і у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах. Б – низька експресія α -SMA в поодиноких фіброгенних клітинах в перисинусоїдальних просторах дольки. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. x 400 (А); x 400 (Б).

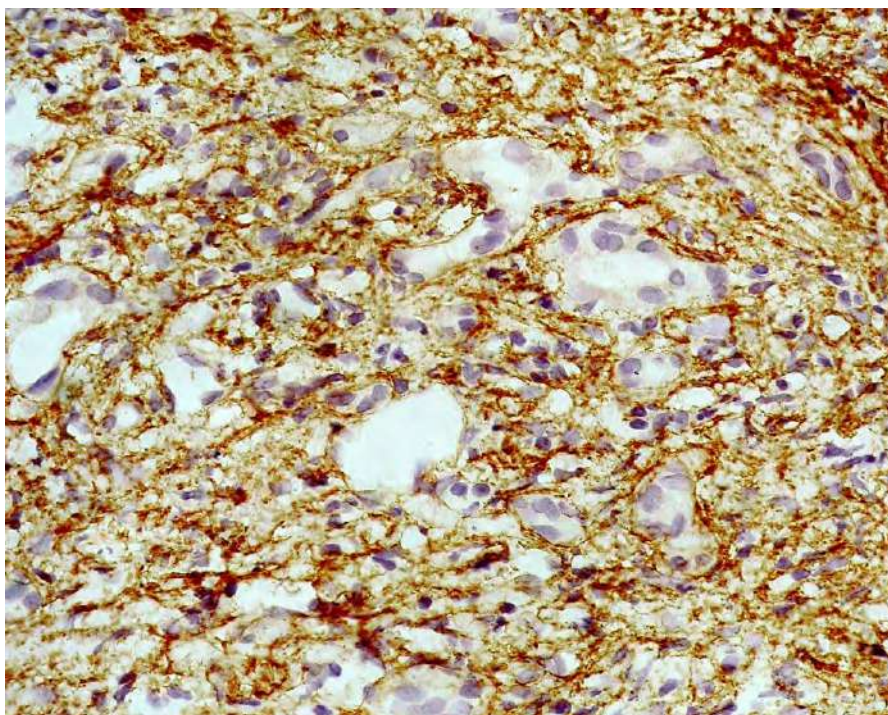


Рис. 6.21. Розповсюджена експресія колагену IV типу в фіброзно потовщеній портально-перипортальній зоні при активації фіброзу в цирозі печінки. Anti-Collagen IV, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 600.

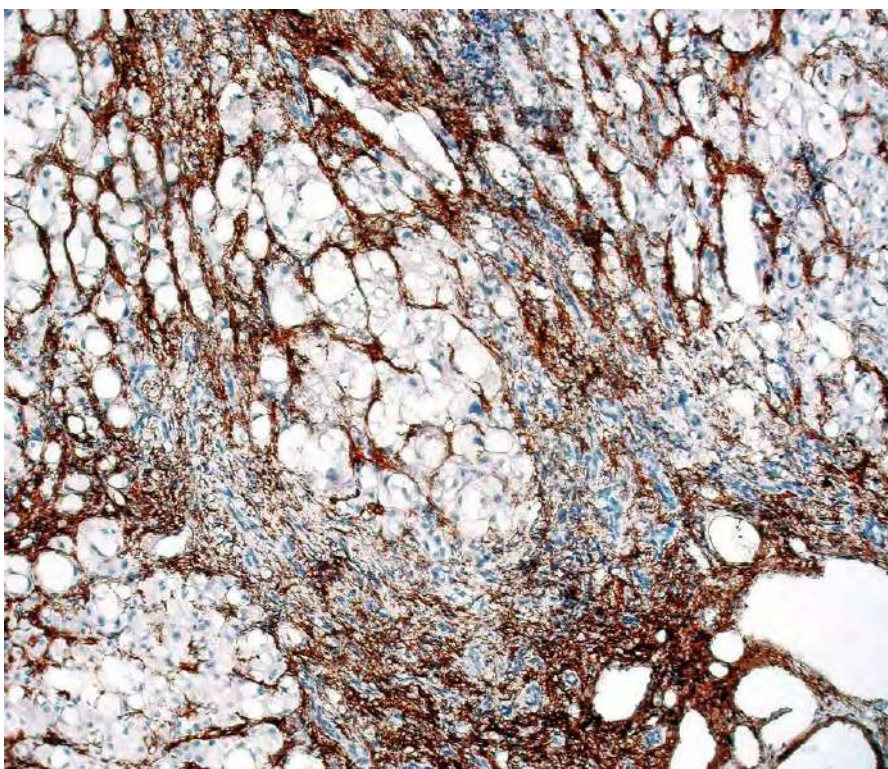


Рис. 6.22. Розповсюджена експресія α -SMA фіброгенними зірчастими клітинами в перисинусоїдальних просторах і в фіброзних прошарках при активації фіброзу в цирозі печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 200.

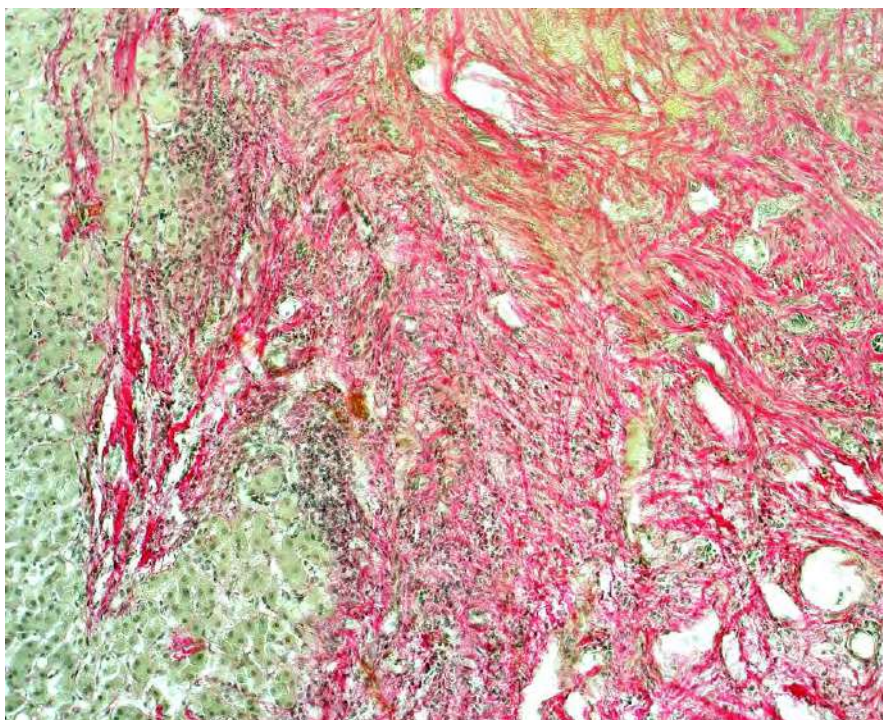


Рис. 6.23. Надзвичайно розповсюджена зона портально-перипортального фіброзу при цирозі печінки. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 100.

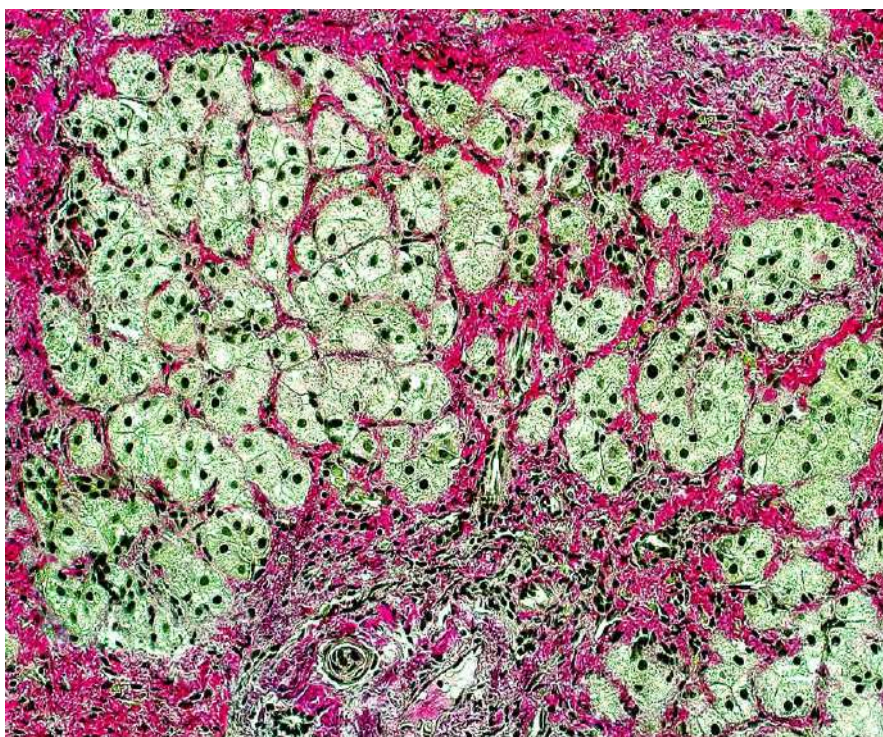


Рис. 6.24. Фрагментація псевдодольок фіброзними прошарками на дрібні групи гепатоцитів з перисинусоїдальним фіброзом при цирозі печінки. Забарвлення за Ван-Гізон. Зб. х 400.

імуноклітинних осередків. Нами спостерігалось посилення експресії MMP-9 і TIMP-1 при зростанні імунодеструктивної активності в циротичній печінці і мала кількість MMP-9+ і TIMP-1+ клітин при стабільному цирозі печінки. Інтенсивність експресії профіброгенного інгібітора TIMP-1, який блокує антифіброгенну металопротеїназу MMP-9, що руйнує головним чином колаген IV типу, обумовлена збільшенням кількості їх продуцентів при активному цирозі печінки і може використовуватись як морфологічний показник можливого прогресування цирозу печінки.

Проведені нами дослідження показали, що одним зі шляхів прогресування цирозу печінки може бути посилення перицелюлярного фіброзу в істинних дольках і псевдодольках печінки, що спостерігається у хворих на ХВГ С зі стеатогепатитом. Він характеризується розростанням тонких фіброзних прошарків навколо окремих клітин зі стеатозом або груп з декількох гепатоцитів зі стеатозом. ІГХ аналіз виявив поширену експресію колагену IV типу в перицелюлярних сполучнотканинних прошарках і виражену α -SMA+ експресію в активованих перисинусоїдальних клітинах Іто (Рис. 6.25). Мікроскопічні дослідження показали, що прогресуючий цироз печінки визначався у 80% хворих на ХВГ С із жировою дистрофією гепатоцитів різного ступеня вираженості. Перицелюлярна колагенизація ізолює гепатоцити, сприяє їх загибелі і водночас сприяє прогресуванню цирозу. В тяжких випадках в печінці порушується структура не тільки істинних дольок, але і псевдодольок. При мікроскопії спостерігаються окремі гепатоцити зі стеатозом або їх дрібні групи, оточені широкими прошарками фіброзу (Рис. 6.26), площа тяжкого фіброзу дорівнює або перевищує площу гепатоцитів зі стеатозом.

Як було зазначено вище, одним з головних факторів прогресування цирозу печінки є порушення нормального внутрішньопечінкового кровообігу в результаті перебудови ангіоархитектоніки і дисбалансу між артеріальною, портальною і централобулярною венозною гемоциркуляцією. При мікроскопії встановлено формування в подовжених фіброзних септах зі

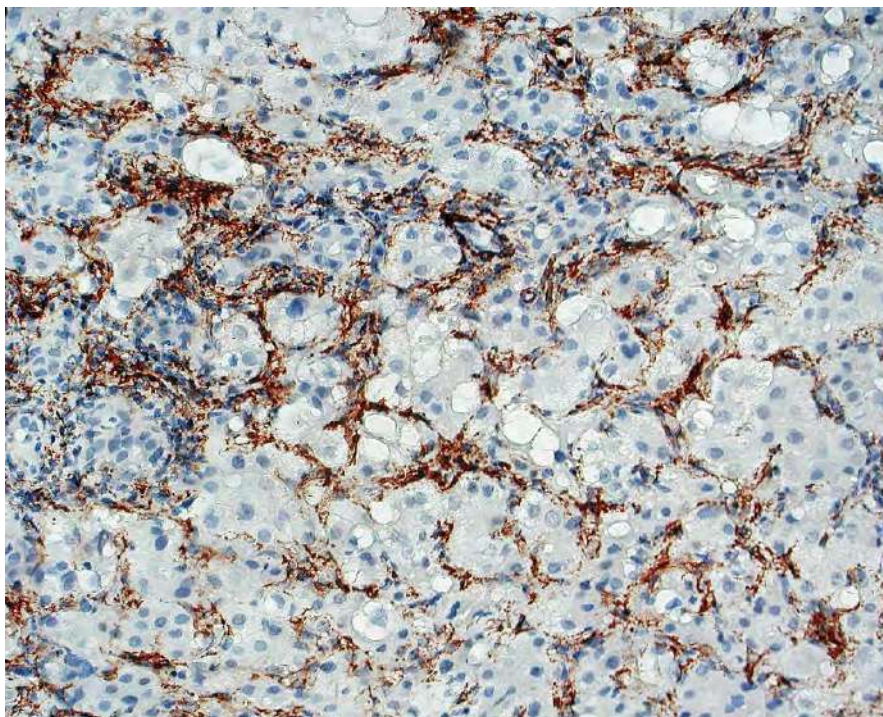


Рис. 6.25. Виражена експресія α -SMA в перицелюлярних просторах і в активованих перисинусоїдальних клітинах Іто при перицелюлярній колагенізації у хворого на ХВГ С зі стеатоцирозом печінки. Anti- α -SMA, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. Зб. х 400.

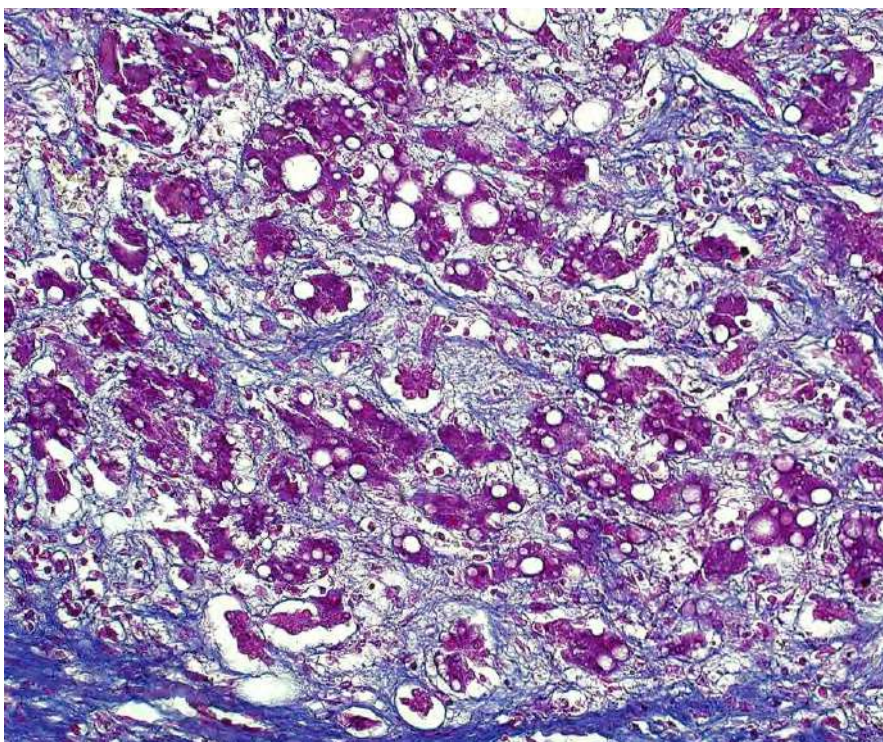


Рис. 6.26. Окремі гепатоцити зі стеатозом та їх дрібні групи, оточені широкими прошарками фіброзу, при стеатоцирозі печінки у хворого на ХВГ С. Забарвлення методом трихром-Масон. Зб. х 400.

склерозованими «мостоподібними некрозами» капілярних шунтів між гілочками печінкової артерії і портальної вени, а також шунтів між гілочками печінкової артерії і портальної вени з аферентного боку і централобулярними венами еферентної ланки внутрішньопечінкової циркуляції крові. В результаті зростаючого шунтування крові велика кількість гепатоцитів в дольках циротично зміненої печінки залишається без гемоперфузії, значно активується апоптоз печінкових клітин і водночас зростає міжклітинний фіброз; розвивається так званий колапс дольок печінки зі зближенням портальних трактів. При мікроскопії в таких дольках на місці втрачених трабекул з гепатоцитів, упорядкованих в портально-центральному напрямі і розділених синусоїдами, визначаються окремі неупорядковані гепатоцити або їх дрібні групи, розділені широкими прошарками еластичних волокон і фіброзу (Рис. 6.27). Для визначення долькового колапсу рекомендується елективне забарвлення еластичних волокон.

Стійка перебудова типової мікроангіоархитектоніки при цирозі печінки негативно проявляється ішемією печінки під час операцій з наложення анастомозів між внепечінковими судинами для ліквідації портальної гіпертензії. В інтраопераційних гепатобіоптатах в таких випадках визначається ішемія дольок і псевдодольок з міграцією лейкоцитів в дольки з мікросудин, а також дрібновогнищеві некрози гепатоцитів в дольках і псевдодольках циротично зміненої печінки (Рис. 6.28).

У деяких хворих з тяжким цирозом і портальною гіпертензією після операцій на позапечінкових судинах в біоптатах визначається ішемічний некроз значної кількості псевдодольок (Рис. 6.29) як прояв гострої недостатності їх кровопостачання. В інших випадках реєструється геморагічний некроз центральної частини дрібних дольок, оточених широкими прошарками фіброзу (Рис. 6.30), причиною якого є тромбоз централобулярних вен.

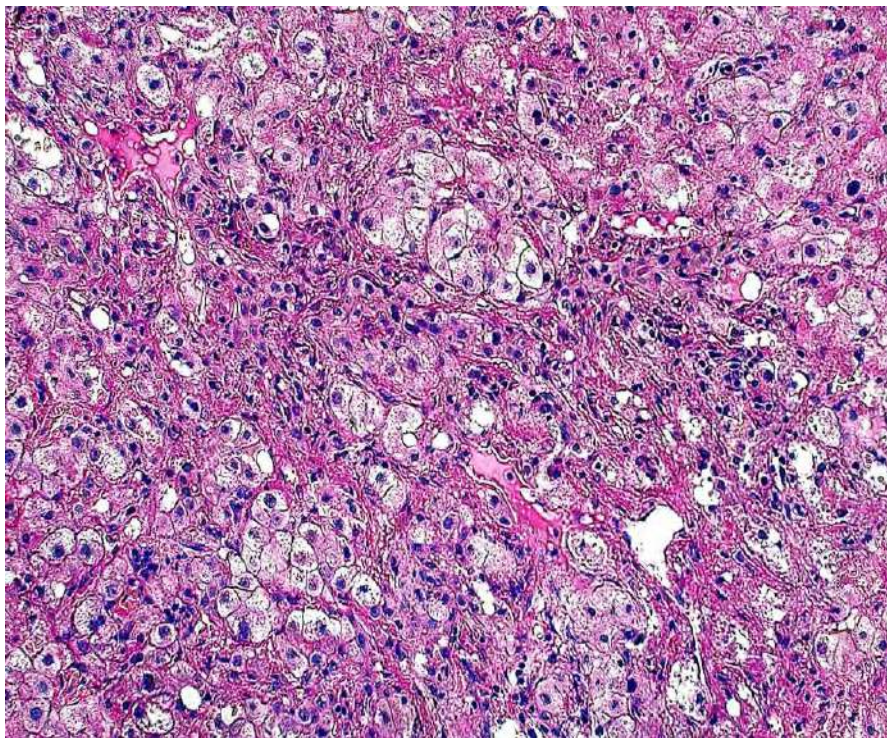


Рис. 6.27. Окремі неупорядковані гепатоцити та їх дрібні групи серед еластичних волокон і фіброзу при колапсі печінкової дольки у хворого на ХВГ С з цирозом печінки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

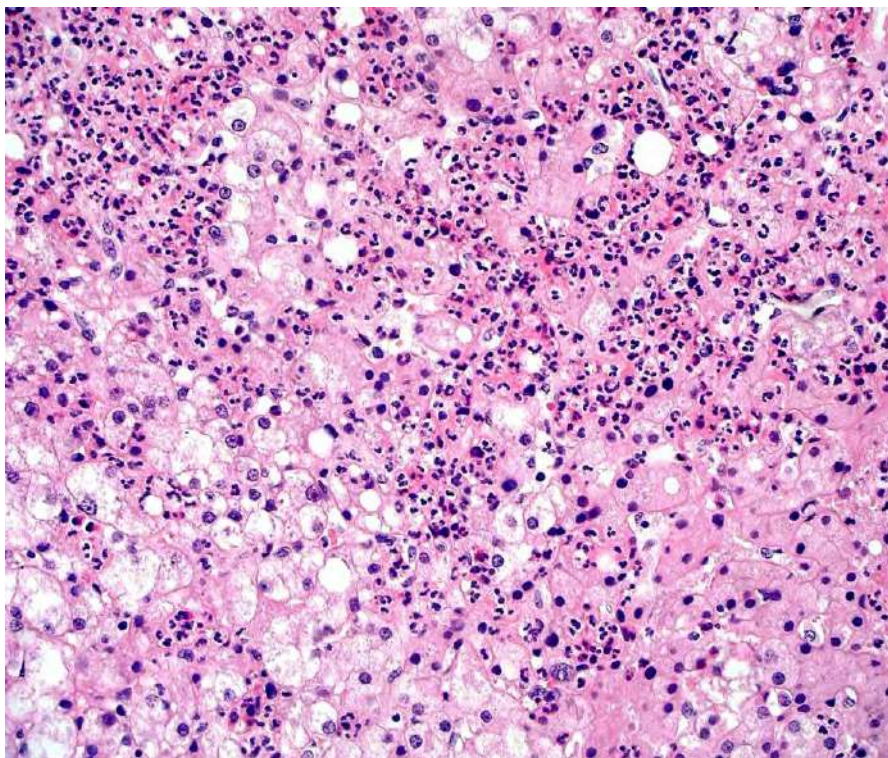


Рис. 6.28. Інтраопераційна ішемія печінкової дольки з міграцією лейкоцитів з мікросудин та некроз окремих гепатоцитів при цирозі печінки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400.

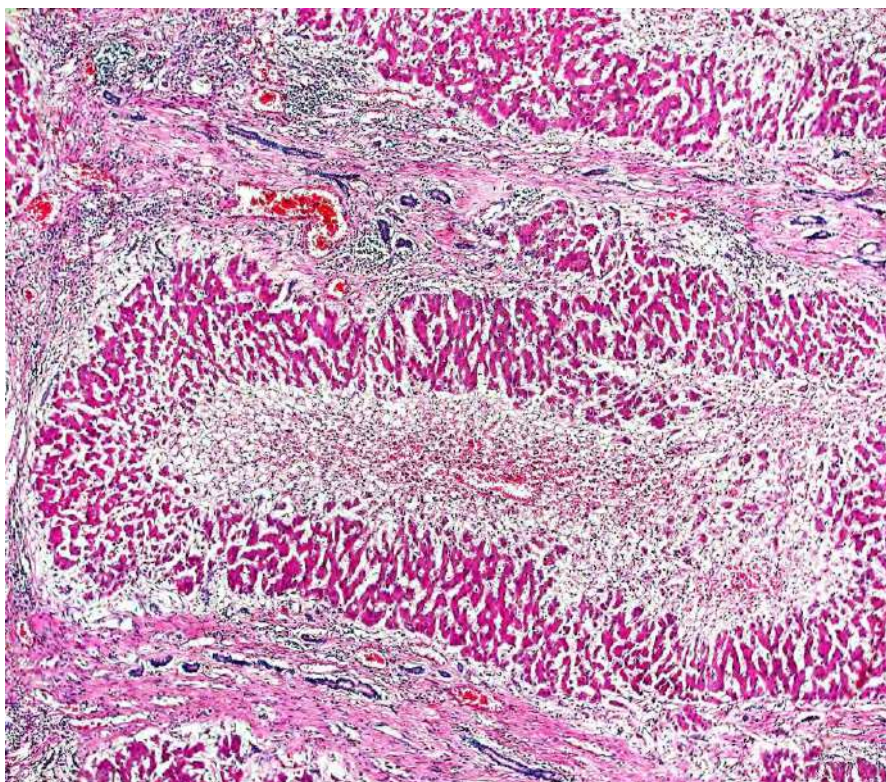


Рис. 6.29. Ішемічний некроз значної площі дольки при цирозі печінки. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. 3б. x 100.

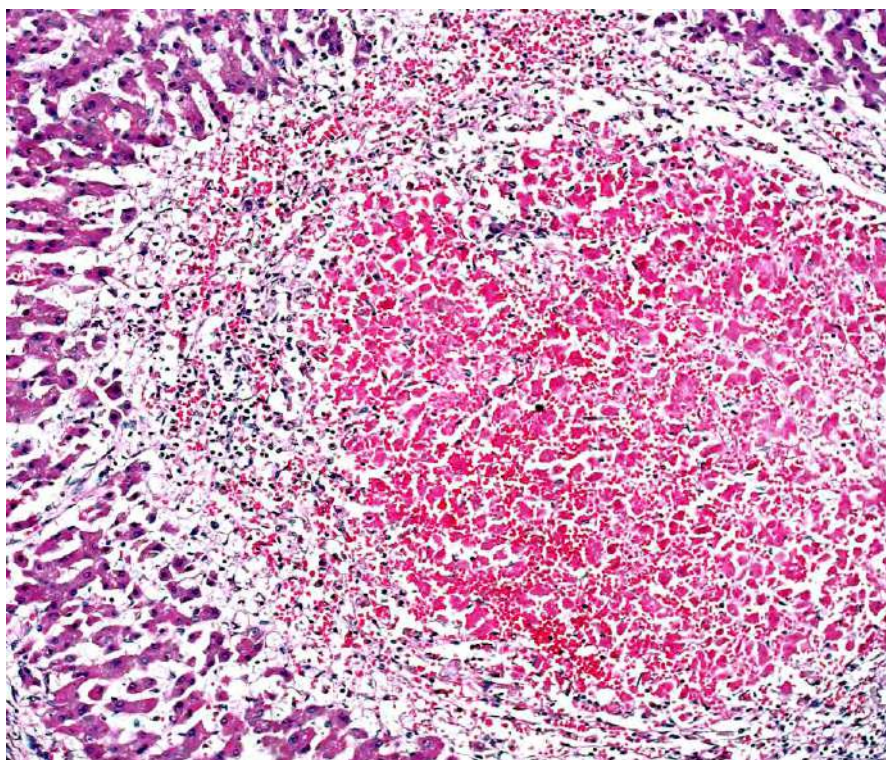


Рис. 6.30. Геморагічний некроз центральної частини дольки при цирозі печінки. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. 3б. x 200.

Порівняльний аналіз патоморфологічних проявів цирозу печінки і даних клініко-лабораторних та інструментальних досліджень показав, що у хворих на декомпенсований цироз печінки при ХВГ С переважають ознаки печінково-клітинної недостатності або прояви синдрому печінкової портальної гіпертензії. Підвищення таких показників печінково-клітинної дисфункції, як АлАТ, АсАТ, тимолова проба, рівень білірубину і його фракцій та альбуміну спостерігалось у хворих, у яких в гепатобіоптатах визначались ознаки вираженої імуноклітинної деструкції циротично зміненої печінки або розповсюджені ішемічні і геморагічні некрози дольок і псевдодольок печінки. У хворих, у яких прогресували клінічні і УЗД ознаки портальної гіпертензії, в біоптатах печінки домінували прояви зростаючого портально-септального і внутрішньодолькового фіброзу.

Висновки. Комплексний патогістологічний, гістохімічний і ІГХ аналіз гепатобіоптатів у хворих на ХВГ С показав, 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 фібробластами та перисинусоїдальними клітинами надлишку колагену I і IV типу. Кумуляція надлишку колагенів і 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 відміну від важкого фіброзу, при цирозі в фіброзно потовщених портальних трактах і фіброзно розширених сполучнотканинних септах спостерігається підвищена кількість мікросудин і дрібних холангіол, про неоангіогенез і проліферацію холангіол свідчить позитивна експресія PCNA і Ki-67 в ядрах ендотелію мікросудин і холангіоцитів.

При паралельному застосуванні гістологічних, гістохімічних та ІГХ методик в біоптатах печінки у хворих на ХВГ С можливо диференціювати

стабільний цироз і активний цироз печінки з ознаками прогресування. Стабільний цироз печінки характеризується стабільним фіброзом з накопиченням колагену I і 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 фібробластів і фіброгенних ЗКП, 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 клітин Іто та невелика кількість TIMP-1+ перисинусоїдальних клітин Іто.

Ознаками активності цирозу є імуноклітинна деструкція та активація фіброгенезу в циротично зміненій печінці. Для активного цирозу з ознаками імуноклітинної деструкції характерна, по-перше, імуноцитарна інфільтрація, яка поширюється з фіброзно потовщених портальних трактів на перипортальні зони і на прошарки сполучної тканини навколо дольок і псевдодольок, а також морфологічні прояви імуноклітинної деструкції в дольках і псевдодольках. В портально-перипортальних інфільтратах визначаються CD20+ В-лімфоцити, CD45R0+, CD8+ Т-лімфоцити і CD68+ макрофаги. Сегментарна імуноклітинна інфільтрація також визначається у розширених внутрішньодолькових синусоїдах, в яких виявляються CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ клітини Купфера і поодинокі CD20+ В-лімфоцити.

Морфологічними проявами імуноклітинної деструкції печінки при цирозі є численні імуноклітинні «ступінчасті» та «мостоподібні некрози» з наявністю великої кількості цитотоксичних CD8+Т-лімфоцитів, CD68+макрофагів і поодиноких NK-клітин та численні вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. Імуноклітинні «некрози» заглиблюються в дольки і псевдодольки, змінюючи їх цитоархітектоніку. При зростанні імунодеструкції в активному цирозі печінки спостерігалось

посилення експресії MMP-9 і TIMP-1, а при стабільному цирозі печінки визначалась мала кількість MMP-9+ і TIMP-1+ клітин. Інтенсивність експресії TIMP-1, який блокує антифіброгенну MMP-9, обумовлена збільшенням кількості продукуючих його клітин при активному цирозі печінки і може використовуватись як морфологічний показник можливого прогресування цирозу печінки.

Проведені комплексні дослідження дозволили визначити морфогенез основних типів прогресування цирозу печінки: зростання імуноклітинної деструкції печінки, прогресування фіброгенезу в дольках і псевдодольках циротично зміненої печінки, прогресування перичелюлярного фіброзу в дольках і псевдодольках при стеатозі печінки, розповсюджений некроз гепатоцитів внаслідок порушення гемомікроциркуляції, колапс дольок печінки при портально-центролобулярному шунтуванні кровообігу.

Основною мікроскопічною ознакою активації фіброзу при цирозі печінки є збільшення кількості тонких фіброзних септ в печінкових дольках і псевдодольках, поява сегментарного перисинусоїдального фіброзу, а також поширення перипортального фіброзу. Встановлена інтенсивна проліферація Ki-67+ фібробластоподібних клітин в потовщених фіброзних септах. Визначено, що найбільш надійним показником активації фіброзу при цирозі печінки є співставлення в серійних зрізах рівня фіброзу, а також рівня експресії колагену IV типу і α -SMA в фіброзних прошарках навколо і 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 фіброгенними ЗКП, 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 ЗКП в дольках, потовщених портальних трактах і септах свідчить про стабільний тяжкий фіброз при цирозі печінки. Наслідком прогресування фіброзу при цирозі печінки є переважання площі фіброзу над площею залишків паренхіми печінки.

Проведені дослідження показали, що одним з шляхів прогресування цирозу печінки може бути посилення перицелюлярного фіброзу навколо гепатоцитів зі стеатозом в дольках і псевдодольках печінки у хворих на ХВГ С зі стеатозом печінки. ІГХ аналіз виявив поширену експресію колагену IV типу в перицелюлярних сполучнотканинних прошарках і виражену експресію α -SMA в активованих перисинусоїдальних ЗКП. Мікроскопічні дослідження показали, що прогресуючий цироз печінки визначався у 80% хворих на ХВГ С зі стеатозом гепатоцитів різного ступеня вираженості.

Визначено, що при зростанні портально-центролобулярного шунтування крові значно активується апоптоз печінкових клітин і водночас зростає міжклітинний фіброз; розвивається так званий колапс дольок печінки зі зближенням портальних трактів. Стійка перебудова типової мікроангіоархітектоніки при цирозі печінки з портальною гіпертензією негативно проявляється під час операцій з накладання позапечінкових судинних анастомозів ішемією і дрібновогнищевими некрозами гепатоцитів в дольках і псевдодольках циротично зміненої печінки. У деяких хворих після таких операцій в біоптатах визначається ішемічний та геморагічний некроз значної кількості дольок і псевдодольок печінки.

За результатами виконаних досліджень прогностично найбільш несприятливими для хворих ознаками прогресування цирозу є поширені некротичні зміни дольок і псевдодольок, які ускладнюються печінково-клітинною недостатністю, а також імуноклітинна деструкція печінки, яка змінюється прогресуючим фіброзом з портальною гіпертензією.

Матеріали розділу відображені у статтях та тезах: [180], [183], [185].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Мікроскопічне дослідження трепанобіоптатів печінки 120 хворих на ХВГ С дозволило виявити патогномонічні для HCV-інфекції гістологічні зміни. Вірус-обумовлене пошкодження гепатоцитів мікроскопічно проявляється ядерним поліморфізмом з наявністю «пісочних», пікнотичних і вакуолізованих ядер, жировою дістрофією, в окремих гепатоцитах спостерігається розвиток каріоцитолізу і патогенно індукованого апоптозу, який мікроскопічно характеризується появою тілець Каунсілмена. Виявлені нами притаманні для ХВГ С морфологічні зміни в клітинах печінки описані в роботах Egger D. et al. (2002), Серова В.В. и соавт. (2004), Stevens A. (2009), Андрейчина М.А. зі співавт. (2010), Lefkowitz J.H. (2010), Ferrell L.D. (2011) та інших дослідників [3,23,34,35,36,157,194,195,196,197,198].

За результатами ІГХ аналізу у хворих на ХВГ С нами визначена імуноклітинна деструкція печінки, проявами якої є наявність перипортальних імуноклітинних інфільтратів різної довжини і глибини (так званих «ступінчастих некрозів») і порто-портальних 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. Проведений нами ІГХ і гістологічний аналіз показав, що в зонах імуноклітинної деструкції переважають імунні клітини цитотоксичного спрямування, які здійснюють імуноклітинний кілінг (імунне знищення інфікованих гепатоцитів) шляхом патогенно індукованого апоптозу, рідше – шляхом каріоцитолізу (некроза). Інші дослідники [199] також вважають, що загибель гепатоцитів при ХВГ С відбувається не під впливом

цитотоксичної дії вірусу гепатиту, а в результаті цитокинової активації імунокомпетентних клітин. За даними Maher. J. J, Kennedy N. J, Lin C.Y et al. [113,114,115] саме CD8⁺ цитотоксичні Т-лімфоцити обумовлюють знищення інфікованих гепатоцитів шляхом імуноклітинного кілінгу. Дослідження останніх років показали, що у вогнищах імуноклітинного кілінга 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 спричиняють NK-клітини, які вивільняють гранзим В і перфорин [201]. Вважають, що найбільш імовірним шляхом каріоцитолізису 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 апоптозу 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 (тільця Каунсілмена), які також описані в роботах Серова В.В. зі спіавт. (2004) та в керівництвах з патології печінки [3,157,197]. Встановлено, що найбільш надійним маркером апоптозу в гепатобіоптатах є експресія апоптотично зміненими гепатоцитами каспази-3.

При комплексному патогістологічному і ІГХ дослідженні нами було встановлено, що розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГ С, крім патологічних змін гепатоцитів, також передують імуноклітинна інфільтрація портальних трактів і перисинусоїдальних просторів CD5⁺ лімфоцитами, CD20⁺ В-лімфоцитами, CD8⁺ і CD45RO⁺ Т-лімфоцитами. Нами також було визначено, що в цих клітинних осередках, окрім лімфоцитів, також присутні NK-клітини (натуральні кілери або Pit-клітини) та CD68⁺ макрофаги печінки, які відіграють певну роль в імуноопосередкованій загибелі гепатоцитів та прогресії фіброзу печінки у хворих на ХВГ С. У багатьох більш ранніх роботах, присвячених проблемі ХВГ С, можна спостерігати активне використання таких термінів як «запальна інфільтрація печінки», «запальні клітини», які також використовувались для визначення ступеня активності гепатиту в індексі гістологічної активності (ІГА), запропонованому і надалі модифікованому Knodell R.G. зі співавт.(1994) [161]. Проведені нами патогістологічні дослідження біоптатів печінки хворих на ХВГ С показали відсутність лейкоцитарного компонента у складі імуноклітинних інфільтратів та імуноцитарних вогнищ деструкції печінки, на підставі чого доцільним вважається визначати інфільтрацію печінки саме як імуноклітинну, а не запальну. Відсутність лейкоцитів у складі імуноклітинних інфільтратів та імуноцитарних зонах деструкції печінки підтверджують в своїх роботах інші дослідники [202,203].

Проведений нами комплексний імуногістохімічний аналіз показав, що CD8⁺ Т-лімфоцити та CD20⁺ В-лімфоцити складають основну масу імуноклітинних інфільтратів та імуноцитарних зон деструкції в печінці при ХВГ С, а також спостерігаються у вигляді поодиноких клітин у просторах внутрішньодолькових синусоїдів печінки. В портальних трактах печінки CD8⁺ Т-лімфоцити і CD20⁺ В-лімфоцити утворюють дифузні або фолікулоподібні інфільтрати з переважним розташуванням CD20⁺ В-лімфоцитів у центральній зоні, а CD8⁺ Т-лімфоцитів у периферійній частині. Відомо, що утворення вторинних фолікулів у лімфатичних вузлах відображає

імунну відповідь на наявність антигенів, але роль формування аналогічних фолікулоподібних структур в портальних трактах в печінці хворих на ХВГ С поки ще уточнюється.

Наявність значної кількості CD8⁺ Т-лімфоцитів і CD20⁺ В-лімфоцитів в тканині печінки хворих на ХВГ С із зазначенням їх ролі у перебігу вірусного гепатиту та фіброзу печінки підтверджують в своїх дослідженнях багато інших авторів [113,114,115,116,200,204,205,206,207,208]. Так, Willberg Ch.B. зі спіавт. (2007) вважає, що в результаті цитокинової стимуляції підвищений рівень CD8⁺ цитотоксичних Т-лімфоцитів в паренхимі печінки у хворих на ХВГ С обумовлює виражену деструкцію HCV-інфікованих гепатоцитів шляхом імуноклітинного кілінгу [200]. Цитотоксичний ефект CD 8⁺ Т-лімфоцитів на вражені гепатоцити та їх подальшу загибель шляхом імунного кілінгу підтверджує в своїх дослідженнях Kennedy N. J. зі спіавт. (2001).

На думку інших дослідників, CD8⁺ Т-лімфоцити грають певну роль у фіброгенезі печінки шляхом прямої і опосередкованої взаємодії між ними та колагенпродукуючими клітинами печінки. Так, в роботі Safadi R. зі спіавт. (2004) встановлена профіброгенна роль CD8⁺ Т-лімфоцитів і доведено прямий зв'язок між збільшенням кількості CD8⁺ Т-лімфоцитів і прогресуванням фіброзу печінки [206]. На думку Muhanna N. зі спіавт. (2007), при хронічному ушкодженні печінки CD8⁺ Т-лімфоцити мігрують в перисинусоїдальні простори Дісе і взаємодіють з активованими ЗКП, що призводить до надлишкової продукції компонентів ПКМ [116].

Наші дослідження показали зростання рівня експресії CD8⁺ Т-лімфоцитів в імуноклітинних інфільтратах портальних трактів, зонах імуноклітинної деструкції і в перисинусоїдальних просторах при помірній і високій імуноклітинній активності ХВГ С, що спостерігалось при прогресуванні фіброзу і цирозу печінки.

Сучасні дослідження показали, що ВГС стимулює проліферацію В-лімфоцитів, які через плазматичні клітини відіграють важливу роль у

продукції аутоантитіл і імунних комплексів при ХВГ С [23,207], але функціональна роль імуноцитарної інфільтрації печінки при ХВГ С до цього часу не конкретизована. Згідно проведених досліджень Novobrantseva T.I. зі співавт. (2005) за відсутності В-лімфоцитів спостерігається слабка фібротизація печінки при хронічних її захворюваннях [204]. Bhogal R.K. зі співавт. (2005) у своїй роботі зазначають декілька можливих шляхів впливу В-лімфоцитів на фіброгенез печінки [207]. По-перше, профіброгенна роль В-лімфоцитів може бути обумовлена шляхом продукції цими клітинами ІЛ-6, профіброгенного цитокіну, який індукує трансформацію фібробластів портальних трактів і перисинусоїдальних клітин Іто в активований фіброгенний стан, стимулює їх проліферацію, посилює цими клітинами синтез колагенів і ТІМР [109]. По-друге, В-лімфоцити продукують аутоантитіла до фібріліну-1, який входить до складу сполучнотканинного каркасу портального тракту і значно збільшується у кількості при фіброзі печінки [205]. Вірогідно, анти-фібрілін-1 аутоантитіла можуть грати певну роль у фіброгенезі. В дослідженнях Zhou X. зі співавт. (2005) було показано, що анти-фібрілін-1 аутоантитіла можуть сприяти збільшенню продукції колагенів і інших компонентів ПКМ шляхом звільнення від фібріліну-1 латентного (недоступного для імунного нагляду) профіброгенного цитокіну TGF- β_1 [125,126]. Проведений нами імуногістохімічний аналіз виявив високий рівень експресії CD20+ лімфоцитів у фолікулоподібних інфільтратах портальних трактів і поодинокі CD20+ лімфоцити в перисинусоїдальних просторах печінки у хворих з прогресуючим фіброзом чи цирозом печінки при вираженій активності ХВГ С, що говорить на користь гіпотези інших дослідників про профіброгенну роль В-лімфоцитів у фіброгенезі печінки при ХВГ С.

У складі імуноклітинних інфільтратів портальних трактів і в зонах імуноцитарної деструкції нами визначались CD68+ макрофаги, рівень експресії яких був низький при слабкій активності ХВГ С і зростав у хворих з високою активністю вірусного гепатиту. Відомо, що активовані CD68+

макрофаги є основним джерелом PDGF-предомінантного мітогену для активованих колагенпродукуючих клітин печінки [129,130] і потужного профіброгенного цитокіну TGF- β_1 [125,126,127]. Таким чином, зростання експресії CD68+ активованих перисинусоїдальних клітин Купфера і CD68+ активованих макрофагів портальних трактів грає важливу роль у збільшенні активованих фібробластів портальних трактів і перисинусоїдальних клітин Іто і надлишкової продукції ними колагенів та інших компонентів ПКМ.

В осередках імуноклітинної інфільтрації та імуноцитарної деструкції окрім лімфоцитів і макрофагів печінки нами спостерігались поодинокі НК-клітини. Вважається, що НК-клітини разом з натуральними Т-кілерами (natural killer T, NKT) і $\gamma\delta$ Т-клітинами представляють природжений імунітет і відповідають за ранню антибактеріальну імунну відповідь та можуть визначити напрямок адаптивної імунної відповіді на антигенну стимуляцію [177]. В роботах Ahmad A. and Alvarez F. (2004) також відзначена наявність НК-клітин в імуноклітинних інфільтратах печінки у хворих на ХВГ С. Автори зауважують, що НК-клітини грають важливу роль в інфільтрації печінки CD4+ і CD8+Т-лімфоцитами шляхом продукції IFN- γ під впливом ВГС і таким чином впливають на виразність імунодеструктивних процесів в печінці [208]. В своїх дослідженнях Россія F. і Agrati C. відзначають, що при ХВГ С функціональна значущість НК-клітин значно зменшується у порівнянні з нормою [177]. На думку Melhem A. зі співавт. (2006), НК-клітини мають антифіброгенний ефект і можуть грати певну роль у подавленні фіброгенезу при ушкодженнях печінки шляхом адгезії на поверхні активованих колагенпродукуючих клітин Іто і портальних фібробластів і стимуляції їх апоптозу [211].

Наші дослідження показали наявність CD45R0+ лімфоцитів переважно на периферії імуноцитарних інфільтратів портальних трактів та поодиноких CD5+ лімфоцитів в осередках імуноцитарної інфільтрації і деструкції, а також подекуди у просторах внутрішnodолькових синусоїдів. Літературні дані свідчать, що CD45R0+ Т-лімфоцити є клітинами пам'яті [115,116], які

експресують високий рівень профіброгенних цитокінів IL-4, IL-6, IL-13 [116], що може сприяти прогресії фіброзу печінки у хворих на ХВГ С. В роботі Шишкіна М.А. (2008) автором визначається велика кількість CD45R0+ Т-лімфоцитів у складі імуноклітинних інфільтратів портальних трактів печінки у хворих на ХВГ і допускається можливість зв'язку між наявністю клітин пам'яті та персистенцією вірусів гепатиту і хронізацією процесу [202].

Виявлені нами в імуноклітинних інфільтратах печінки у хворих на ХВГ С поодинокі CD5+ лімфоцити є продуцентами поліреактивних низько афінних «природних» антитіл до екзогенних антигенів та аутореактивних антитіл [38], роль яких у хворих на ХВГ С поки ще не визначена.

Наші дослідження показали, що присутність різного складу лімфоцитів, макрофагів печінки та NK-клітин у складі імуноклітинних інфільтратів портальних трактів печінки та у внутрішньодолькових осередках імуноцитарної деструкції свідчить насамперед про активацію імунної відповіді на вірусні антигени в печінці та розвиток імунообумовленого знищення гепатоцитів і подальшу прогресію фіброзу печінки. За даними Россіа F. і Agrati С. (2003), в нормі в печінці визначаються CD56+ лімфоцити, NK-клітини, CD8+лімфоцити і в меншій кількості CD4+ лімфоцити, кількість і співвідношення яких при розвитку захворювань печінки змінюється.

Сучасні літературні дані та дослідження багатьох гепатологів засвідчують важливу роль імуноклітинної інфільтрації в регуляції перебігу ХВГ і прогресії фіброзу печінки [113,114,115,116,200,205,206,207,208], яка забезпечується завдяки широкому спектру цитокінів різного напрямку дії.

Застосування ІГХ методик показало, що виразність притаманної для ХВГ С імуноцитарної інфільтрації портальних трактів і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів, в принципі, відповідають ІГА хронічного гепатиту в градації Knodell R.G. et al. (1981) [161] та METAVIR (1994) [165]. У обстежених нами хворих на 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 індексі гістологічної активності 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 імуноцитарна інфільтрація трактів і перисинусоїдальних просторів, велика кількість «ступінчастих некрозів» та одиничні імуноклітинні «мостоподібні некрози».

Встановлено, що імунохроматографічним експрес-методом з використанням зареєстрованих в Україні тест-касет «СІТО-TEST HCV» виробництва фірми «Acon Biotech Co.» (Китай), 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 гістохімічні і ІГХ дослідження підтвердили дані Bataller R., Brenner D.A. (2005) [105] стосовно того, що основними продуцентами надлишку колагену IV і I типів і інших компонентів позаклітинного матриксу при фіброзі печінки є нові покоління α -SMA⁺ перисинусоїдальних зірчастих клітин в дольках і α -SMA⁺ фібробластів в портальних трактах. За сучасними світовими даними відомо, що окрім активованих перисинусоїдальних клітин Іто і портальних фібробластів – основних продуцентів колагенів та інших компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ) в ушкодженій печінці, додатковим джерелом фіброгенних клітин можуть стати циркулюючі попередники мезенхімальних клітин [CD45⁻] і циркулюючі фіброцити [CD45⁺], які складають відповідно 4-5% і 5-10% колагенпродукуючих клітин печінки [95], а також гемопоетичні ствовові клітини («нуль-клітини»), які мігрують з кісткового мозку в печінку і трансформуються в активовані

фібробласти [96], в холагіоцити дрібних холангіол з експресією фіброгенних маркерів (Fsp1⁺, α -SMA і колаген) [97], і в гепатоцити – в результаті епітеліально-мезенхімального переходу [98].

Нами визначено, що фіброз печінки може розвиватися і прогресувати з декількох її зон – джерел фіброгенезу: з портальних трактів, з центролобулярних вен і внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторів печінки, з перипортальних «ступінчастих некрозів» та з вогнищ імуноклітинної деструкції в дольках печінки.

Результати виконаних нами паралельних патогістологічних, гістохімічних і ІГХ досліджень показали, що у хворих на ХВГ С розвивається три типи фіброзу печінки: портально-септальний, перисинусоїдально-центролобулярний і змішаний (портально-септальний та перисинусоїдально-центролобулярний). 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 позаклітинного матриксу, 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 початково 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 позаклітинного матриксу, колагену IV і I типу активованими α -SMA+ фібробластами, 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) [165].

Змішаний фіброз проявляється фіброзом портальних трактів з фіброзними септами і водночас перисинусоїдально-центролобулярним фіброзом печінки, про що свідчить накопичення колагену IV типу та наявність α -SMA-позитивних зірчастих клітин Іто у внутрішньодолькових перисинусоїдальних просторах, навколо центролобулярних вен і в портальних трактах. У більшості 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 також описані Bataller R. (2004).

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 сприяє експресії MMP-9 гепатоцитами, внутрішньодольковими перисинусоїдальними зірчастими клітинами і макрофагами Купфера, макрофагами і лімфоцитами портальних трактів і «ступінчастих некрозів», а також макрофагами внутрішньодолькових імуноклітинних інфільтратів [109,110]. Підвищення експресії MMP-9 цими клітинами стимулюють цитокіни, такі як IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , VEGF та ін. [109,110]. За даними Giannelli et al., експресія і активність MMP-9 знижувалась у хворих на ХВГ С, які позитивно відповідали на терапію α -інтерфероном (α -IFN) і рібавірином, і залишалась незмінною у інтактних до цих препаратів хворих [109], що також свідчить про прямий зв'язок між експресією MMP-9 і активністю ХВГ С. Достеменно невідома роль металопротеїназ в регуляції імунної відповіді при ХВГ С. Однак, враховуючи, що ВГС посилює генну експресію і активність металопротеїназ, можливо припустити, що вони відіграють певну роль в імунній відповіді при ХВГС шляхом впливу на родину CXCR3 хемокинів. Так, у відповідь на стимуляцію α -IFN і α -TNF, гепатоцити, ЗКП, ендотелій синусоїдів виділяють найбільш важливі в патогенезі ХВГС хемокини CXCR3 (CXCL9, CXCL10 і CXCL11). При HCV-інфекції збільшена у кількості і за активністю MMP-9 активно інактивує і руйнує CXCL9, CXCL10 і CXCL11, що призводить до

зменшення кількості CXCR3+ Т-лімфоцитів і, таким чином, значно послаблює імунну відповідь і пригнічує Т-лімфоцитарну ланку імунної відповіді [109]. Такий вплив MMP-9 може сприяти розвитку специфічної імунної толерантності до HCV-інфекції і прогресії фіброзу печінки в цироз на тлі ХВГ С.

Максимального рівня експресія MMP-9 досягає в зонах імуноклітинної деструкції дольок печінки, в яких виявлялась виражена експресія MMP-9 в значній кількості гепатоцитів, активованих клітинах Купфера і клітинах 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 також в роботах Friedman S.L. (2003) [4]. Експресія TIMP-1 регулюється декількома запальними цитокінами: IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α , TGF- β [110]. Імовірно, цим частково пояснюється виявлена нами слабка експресія TIMP-1 на ранніх стадіях фіброзу або при вже розвинутomu тяжкому фіброзі F3 на тлі мінімальної активності ХВГ С. Недостатня кількість і низька активність TIMP-1 звільнює блоковані металопротеїнази і таким чином сприяє уповільненню і стабілізації фіброзу або навіть його регресії, а також посилює проліферацію гепатоцитів [110]. Таким чином, доведено, що при фіброзі печінки у хворих на ХВГ С активація імуноклітинної інфільтрації і деструкції одночасно стимулює експресію металопротеїнази MMP-9 і її тканинного інгібітора TIMP-1.

Проведені комплексні патогістологічні, гістохімічні, комп'ютерно-морфометричні 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 ймовірну активацію портально-септального фіброзу насамперед свідчить збільшення числа α -SMA+ фіброblastів в портально-перипортальних зонах печінки та розширення їх площі. За даними комп'ютерно-морфометричних 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) [153]. При подальшій еволюції в активних септах появляється значна кількість α -SMA+ фіброblastів, імуноклітинна інфільтрація септ зменшується і формується фіброз

подовжених септ.

Результати виконаних патогістологічних, гістохімічних і ІГХ досліджень довели, що основними прогностичними ознаками ймовірного 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 виразна експресія α -SMA в значній кількості перисинусоїдальних зірчастих клітин печінки на тлі слабкої або помірної колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів та слабкого 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 помірно 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. Виразна експресія каспази-3 у великій кількості перисинусоїдальних клітин знижує вірогідність 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) [211].

За результатами патоморфологічного аналізу виразності ступеню 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 маркера 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 мікронодулярний цироз печінки. Встановлено, що на початку розвитку цирозу з'являються нечисленні псевдодольки внаслідок глибокої penetрації в дольки активних портально-долькових септ, появи множинних порто-дольково-портальних «мостоподібних» септ, а також інтенсифікації утворення активованими фібробластами та перисинусоїдальними клітинами надлишку колагену I і IV типу. Кумуляція надлишку колагенів і інших компонентів позаклітинного матриксу в свою чергу сприяє посиленню фіброзу та потовщенню портальних трактів і численних порто-центральных і

«мостоподібних» сполучнотканинних септ. Проведені дослідження довели, що на відміну від важкого 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 [212,213],. Про неоангіогенез і проліферацію холангіол свідчить позитивна експресія PCNA і Ki-67 в ядрах ендотелія мікросудин і холангіоцитів.

Дані про морфологічні зміни в печінці при прогресії цирозу дуже нечисленні. П'ятий Панамериканський конгрес гастроентерологів (Гавана, 1956р.) рекомендував оцінювати прогресію цирозу печінки за даними повторних пункцій біопсій як рецидив «мостоподібних» або «ступінчастих некрозів» печінки. В останні роки патологами виділений стабільний і активний цироз печінки [153,173].

Нами встановлено, що при паралельному застосуванні гістологічних, гістохімічних 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 фібробластів 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 клітин та невелика кількість TIMP-1 позитивних перисинусоїдальних зірчастих клітин.

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

імуноклітинної деструкції характерна розповсюджена 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: за даними Lichtinghagen R. et al. (2006) та Hemmann S. et al. (2007), ВГС сприяє появі нових популяцій клітин-продуцентів MMP-9 і стимулює посилену експресію TIMP-1 м-РНК [109,110]. При стабільному цирозі печінки визначається мала кількість MMP-9 позитивних і TIMP-1 позитивних клітин.

В сучасному російському національному керівництві з патологічної анатомії вказано на можливість прогресування цирозу печінки, але не окреслені морфологічні прояви його еволюції [173]. Проведені нами гістологічні, гістохімічні та 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 порталних 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 порталних 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.

Відомо, що при цирозі печінки головними продуцентами надлишку колагену та інших компонентів ПКМ є нові покоління активованих перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто, фібробластів порталних трактів, міофібробластів з кісного мозку, які активуються TGF- β_1 , ангіотензином II і лептином [137,139]. За даними Brenner D.A. (2009), перивенулярні міофібробласти і порталні фібробласти, а також ендотелій синусоїдів та біліарний епітелій також приймають участь в синтезі ПКМ [78]. Kisseleva T. (2008) визначає, що макрофаги Купфера посилюють колагенпродукуючу функцію міофібробластів через їх toll-подібні рецептори [1]. Продукцію компонентів ПКМ при цирозі печінки стимулює багато профіброгенних молекул (ендотелін-1, FGF, інсуліноподібний фактор росту, IL-1,-4,-6, лептін, PDGF, TGF- α і β_1), а знижують антифіброгенні цитокіни (HGF, INF- γ , IL-10,

TNF- α). Фіброгенез при цирозі печінки характеризується накопиченням колагену I, III і IV типу, а також переважанням тканинних інгібіторів матриксних металопротеїназ над активністю матриксних металопротеїназ, які руйнують ПКМ [1]. При цирозі печінки формується замкнене коло, в якому гепатоцити в стані загибелі, пошкоджені холангіоцити, імуніцити і фіброгенні клітини стимулюють одне одного [77,78]. Forbes S.J et al. (2004) відмічає, що під впливом різних факторів росту при цирозі відбувається інфільтрація печінки CD34+/CD38+ гемопоетичними стовбурними клітинами, які спроможні диференціюватися у фіброгенні зірчасті клітини Іто і фібробласти [96]. В той час як одні дослідники заперечують циркулюючі в крові фіброцити (похідні гемопоетичних стовбурних клітин) в якості джерела фіброгенних клітин печінки, інші автори, навпаки, наполягають на думці, що в пошкоджену печінку з крові потрапляють фіброцити з фенотипом (колаген I+/CD11b+/CD13+/CD34+/CD45RO+/ГКГС II класу+/CD86+) з їх наступним диференціюванням у фібробласти печінки [103].

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 ступеню 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 мікроангіоархітектоніки 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 також Садовникова И.И. (2003), Orfei E. (2009). [17,153].

Проведений нами клініко-патологоанатомічний аналіз показав, що 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+, CD5, CD8+, CD45R0+ 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 клінінгу 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 каріоцитолізісом (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. Перицелюлярний 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 тяжкого 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 тяжкий 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 тяжкому фіброзі печінки F3. Площа портально-перипортальної зони з α -SMA+ фібробластами при тяжкому 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 імуноклітинних інфільтратів та вогнищ імуноклітинного 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 імуноклітинних «ступінчастих некрозах» числа α -SMA+ активованих фібробластів. На місці великих внутрішньодолькових осередків цитолізу гепатоцитів та їх імуноклітинної 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 низкому рівні експресії ними апоптотичної каспази-3, а також виражена експресія α -SMA значним числом перисинусоїдальних зірчастих клітин на тлі слабого фіброзу і колагенізації внутрішньодолькових синусоїдів. До посилення перицелюлярного фіброзу веде прогресування значної дрібно-крупновакуольної дистрофії гепатоцитів та утворення стеатокіст при стеатозі печінки.

8. Ознаками активного цирозу є імунцитарна інфільтрація прошарків сполучної тканини і фіброзно потовщених портально-перипортальних зон, а також імуноклітинна деструкція дольок і псевдодольок з наявністю CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів з домішкою CD45R0+ Т-лімфоцитів і CD20+ В-лімфоцитів в портально-перипортальних інфільтратах і у розширених внутрішньодолькових синусоїдах. Декомпенсація 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 імуногістохімічному визначенні рівня експресії α -SMA і колагену IV типу, у хворих на ХВГ С діагностується портально-септальний, перисинусоїдально-центролобулярний 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 фіброзних септах, а також у фіброзних 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 імуногістохімічного 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 СІТО-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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kisseleva T. Mechanisms of fibrogenesis / T. Kisseleva, D. A. Brenner // Experiment. Biol. and Med. – 2008. – № 233. – P. 109–122.
2. Gressner O. A. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options / O. A. Gressner, R. Weiskirchen, A. M. Gressner // Compar. Hepatol. – 2007. – Vol. 6, № 7. – P. 46–62.
3. Ferrell L. D. Liver Pathology / L. D. Ferrell, S. Kakar. – New York : Demos Medical Publishing, 2011. – 537 p.
4. Friedman S. L. Liver fibrosis – from bench to bedside / S. L. Friedman // J. of Hepatology. – 2003. – Vol. 38, issue 1. – P. 38–53.
5. Ismail M. H. Reversal of liver fibrosis / M. H. Ismail, M. Pinzani // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 15, issue 1. – P. 72–79.
6. Guidotti L. G. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis / Guidotti L.G., Chisari F.V. // Ann. Rev. Pathol. – 2006. – № 1. – P. 23–61.
7. Yun H. Clinical study on treatment of liver fibrosis of chronic hepatitis B patients with ginkgo leaf / H. Yun, Z. W. Lang, G. B. Yao // Chin. J. of Integr. Trad. and West. Med. – 2002. – № 2. – P. 95–99.
8. AASLD Practice Guideline. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C / D. B. Strader, T. Wright, D. L. Thomas [et al.] // Hepatology. – 2004. – Vol. 39. – P. 1147–1171.
9. Bedossa P. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C / P. Bedossa, D. Dargere, V. Paradis // Hepatology. – 2003. – № 38. – P. 1449–1457.
10. Bertolani C. The role of adipokines in liver fibrosis / C. Bertolani, F. Marra // Pathophysiology. – 2008. – № 15. – P. 91–101.
11. O'Shea R. S. Alcoholic Liver Disease / R. S. O'Shea, Sr. Dasarathy, A. J. McCullough // Am. J. Gastroenterology. – 2010. – № 105. – P. 14–32.
12. Brunt E. M. Nonalcoholic steatohepatitis / E. M. Brunt // Semin. Liver Dis. – 2004. – № 24. – P. 3–20.

13. Буеверов А. О. Некоторые патогенетические и клинические вопросы неалкогольного стеатогепатита / А. О. Буеверов, М. В. Маевская // Клинические перспективы в гастроэнтерологии, гепатологии. – 2003. – № 3. – С. 2–7.
14. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease / J. Medina, A. G. Arroyo, F. Sanchez-Madrid, R. Moreno-Otero // Hepatology. – 2004. – № 39. – P. 1185–1195.
15. Management of cirrhosis and ascites / P. Gines, A. Cardenas, V. Arroyo, J. Rodes // N. Engl. J. Med. – 2004. – № 350. – P. 1646–1654.
16. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells / E. Novo, S. Cannito, E. Zamara [et al.] // Am. J. Pathology. – 2007. – № 170. – P. 1942–1953.
17. Садовникова И. И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения / И. И. Садовникова // Рос. мед. журн. – 2003. – Т. 5, № 2. – Реф. 37.
18. Angiogenesis in liver disease / M. Fernandez, D. Semela, J. Bruix [et al.] // J. Hepatology. – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 604–620.
19. Specific development and course of portal hypertension complication in patients with hepatic cirrhosis of HBV and HCV etiology / F. G. Nazyrov, A. V. Deviatov, A. Kh. Babadzhanov, S. A. Sultanov // Vestn. Khir Im. I. I. Grek. – 2011. – Vol. 170, iss.1. – P. 22–29.
20. Bosch J. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension / J. Bosch, J. C. García-Pagán // J. Hepatology. – 2000. – Vol. 32, suppl. 1. – P. 141–156.
21. Villanueva C. Variceal bleeding : pharmacological treatment and prophylactic strategies / C. Villanueva, J. Balanzó // Drugs. – 2008. – Vol. 68, № 16. – P. 2303–2324.
22. Burak K. W. Prognosis in the early stages of hepatocellular carcinoma: Predicting outcomes and properly selecting patients for curative options / K. W. Burak // Can. J. Gastroenterology. – 2011. – Vol. 25, № 9. – P. 482–484.

23. Вірусні гепатити і рак печінки / [М. А. Андрейчин, В. І. Дрижак, О. В. Рябоконь, В. С. Копча]. – Тернопіль : ТДМУ, 2010. – 188 с.
24. Duvnjak L. The metabolic syndrome – an ongoing story / L. Duvnjak, M. Duvnjak // J. Physiol. Pharmacol. – 2009. – Vol. 60, suppl. 7. – P. 19–24.
25. Вирусные гепатиты: эпидемиология и стратегии скрининга / И. А. Зайцев, В. А. Мирошниченко, В. Т. Кириенко, В. Н. Жидких // Вестн. гигиены и эпидемиологии. – 2006. – Режим доступа до журн. : http://hepatit-inform.com.ua/?action=pg_view_article&article_id=65&id=8 &menu_level=2.
26. Епідеміологічна характеристика гепатиту В в Україні і шляхи підвищення ефективності його профілактики / А. Л. Гураль, В. Ф. Марієвський, Т. А. Сергеева [та ін.] // Інфекційні хвороби. – 2003. – № 2. – С. 35–42.
27. Сергеева Т. А. Характеристика епідемічного процесу гепатитів В і С в Україні в сучасних умовах і система епідеміологічного нагляду: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук : спец. 14.02.02 «Епідеміологія» / Т. А. Сергеева. – К., 2008. – 35 с.
28. Гепатит С в Украине: эпидемиологические аспекты проблемы / А. Л. Гураль, В.Ф. Мариевский, Т. А. Сергеева [и др.] // Сучасні інфекції. – 2008. – № 1. – С. 53–63.
29. Современные аспекты течения хронических вирусных гепатитов / Е. В. Белобородова, Э. И. Белобородова, И. О. Гибадулина, А. С. Алексеева [и др.] // Кох-Мечников журнал. – 2008. – № 1. – С. 56–57.
30. Popper H. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations / H. Popper, S. Uenfriend // Am. J. Med. – 1970. – № 49. – P. 707–721.
31. Schaffner F. Chronic hepatitis / F. Schaffner, F. M. Klion, // Annu. Rev. Med. – 1968. – № 19. – P. 25–38.
32. Soyer M. T. Reversibility of severe hepatic damage caused by jejunoileal bypass after re-establishment of normal intestinal continuity / M. T. Soyer, R. Ceballos, J. S. Aldrete // Surgery. – 1976. – № 79. – P. 601–604.

33. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver / S. L. Friedman, F. J. Roll, J. Boyles, D. M. Bissell // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1985. – № 82. – P. 8681–8685.
34. Robbins S. L. *Pathologic Basis of Disease* / S. L. Robbins, R. S. Cotran. – 9th ed. – Philadelphia : Saunders Elsevier, 2010. – 1525 p.
35. Stevens A. *Core Pathology* / A. Stevens, J. Lowe, I. Scott. – 3rd ed. – [S.I.]; MOSBY Elsevier, 2009. – 632 p.
36. *General and Systemic Pathology* / eds. : J. C. E. Underwood, S. S. Cross. – 5th ed. – [S.I.] : Churchill Livingstone, 2010. – 857 p.
37. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells / A. Geerts // *Semin. Liver Dis.* – 2001. – № 21. – P. 311–335.
38. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture / S. L. Friedman [et al.] // *Hepatology*. – 1992. – № 15. – P. 234–243.
39. Otto D. A. Isolation of a lipocyte-rich fraction from rat liver nonparenchymal cells / D. A. Otto, R. L. Veech // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1980. – № 132. – P. 509–517.
40. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fatstoring cells / M. Pinzani, L. Gesualdo, G. M. Sabbah, H. E. Abboud // *J. Clin. Invest.* – 1989. – № 84. – P. 1786–1793.
41. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture / D. C. Rockey, J. K. Boyles, G. Gabbiani, S. L. Friedman // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* – 1992. – № 24. – P. 193–203.
42. Casu A. Perisinusoidal stellate cells or Ito cells and their role in hepatic fibrosis / A. Casu, M. Canepa, G. Nanni // *Pathologica*. – 1994. – Vol. 86, № 5. – P.467–499.
43. Wasser S. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat / S. Wasser, C. E. Tan // *Ann. Acad. Med. Singapore*. – 1999. – № 28. – P. 109–111.

44. Gressner A. M. Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules / A. M. Gressner // *Z. Gastroenterol.* – 1992. – Vol. 30, suppl. 1. – P. 5–16.
45. Gressner A. M. Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook / A. M. Gressner // *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* – 1991. – Vol. 29, № 5. – P. 293–311.
46. Histological changes in HCV antibody-positive, HCV RNA-negative subjects suggest persistent virus infection / M. Hoare, W. T. Gelson, S. M. Rushbrook [et al.] // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 48, № 6. – P. 1737–1745.
47. Immunohistochemical comparative study of fibrosis and biliary ductular reaction in alcoholic and viral chronic hepatitis / I. Egyed-Zsigmond, I. Jung, G. Marton [et al.] // *Rom. J. Morphol. Embryol.* – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. 265–269.
48. Hohenester S. Primary biliary cirrhosis / S. Hohenester // *Semin Immunopathol.* – 2009. – Vol. 31, № 3. – P. 283–307
49. Straub B. K. Pathology and biopsy assessment of non-alcoholic fatty liver disease / B. K. Straub, P. Schirmacher // *Dig Dis.* – 2010. – Vol. 28, № 1. – P. 197–202.
50. Pathological mechanisms of alcohol-induced hepatic portal hypertension in early stage fibrosis rat model / J. Li, J. Z. Niu, J. F. Wang [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11, № 41. – P. 6483–6488.
51. Gabele E. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell / E. Gabele, D. A. Brenner, R. A. Rippe // *Front. Biosci.* – 2003. – № 8. – P. 69–77.
52. Anty R. Liver fibrogenesis and metabolic factors / R. Anty, M. Lemoine // *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 35, suppl. 1. – P. 10–20.
53. Hayashi H. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models / H. Hayashi, T. Sakai // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2011. – Vol. 300, № 5. – P. 729–738.
54. Weiler-Normann C. Mouse models of liver fibrosis / C. Weiler-Normann, J. Herkel, A. W. Lohse // *Z Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 45, № 1. – P. 43–50.

55. Gressner A. M. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets / A. M. Gressner, R. Weiskirchen // *J. Cell. Mol. Med.* – 2006. – Vol. 10, № 1. – P. 76–99.
56. Siegmund S. V. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis / S. V. Siegmund, S. Dooley, D. A. Brenner // *Dig. Dis.* – 2005. – Vol. 23, № 3 – 4. – P. 264–274.
57. Pinzani M. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets / M. Pinzani, K. Rombouts // *Dig. Liver Dis.* – 2004. – Vol. 36, № 4. – P. 231–242.
58. Hui A. Y. Molecular basis of hepatic fibrosis / A. Y. Hui, S. L. Friedman // *Expert. Rev. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 14, № 5. – P. 1–23.
59. Urtasun R. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response / R. Urtasun, L. Conde de la Rosa, N. Nieto // *Clin. Liver Dis.* – 2008. – Vol. 12, № 4. – P. 769–790.
60. Hepatic steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C in Taiwan / M. H. Hsieh, L. P. Lee, M. Y. Hsieh. [et al.] // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 60, № 6. – P. 377–381.
61. Pinzani M. Cytokine receptors and signaling during stellate cell activation / M. Pinzani, F. Marra // *Semin. Liver Dis.* – 2001. – Vol. 21. – P. 397–416.
62. Lindquist J. N. Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen / J. N. Lindquist, W. F. Marzluft, B. Stefanovic // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2000. – № 279. – P. 471–476.
63. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells / S. De Minicis, E. Seki, C. Oesterreicher [et al.] // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 48, № 6. – P. 2016–2026.
64. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans / H. E. Wasmuth, F. Lammert, M. M. Zaldivar [et al.] // *Gastroenterology.* – 2009. – Vol. 137, № 1. – P. 309–319.
65. Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells / M. Pinzani // *Front. Biosci.* – 2002. – № 7. – P. 1720–1726.

66. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies / J. T. Li, Z. X. Liao, J. Ping [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 43, № 6. – P. 419–428.
67. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease / Z. Kmiec // *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 161, issue III-XIII. – P. 1–151.
68. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice / E. Seki, S. De Minicis, G. Y. Gwak [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, № 7. – P. 1858–1870.
69. Hepatitis C virus infection and apoptosis/ R. Fischer, T. Baumert, H. E. Blum // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, № 36. – P. 4865–72.
70. Schwabe R. F. Differential requirement for c-Jun NH2-terminal kinase in TNFalpha- and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes / R. F. Schwabe // *FASEB J.* – 2004. – № 18. – P. 720–722.
71. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells / R. F. Schwabe, B. Schnabl, Y. O. Kweon, D. A. Brenner // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – P. 6812–6819.
72. Galli A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro / A. Galli // *Gastroenterology.* – 2002. – №. 122. – P. 1924–1940.
73. Cheng Y. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells / Y. Cheng, J. Ping, L. M. Xu // *Chin. Med. J. (Engl.).* – 2007. – Vol. 120, № 9. – P. 794–801.
74. Gieling R. G. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms / R. G. Gieling, A. D. Burt, D. A. Mann // *Clin. Liver Dis.* – 2008. – Vol. 12, Iss. 4. – P. 915–937.
75. Sun B. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents / B. Sun, M. Karin // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27, № 48. – P. 6228–6244.

76. Robinson S. M. Role of nuclear factor kappaB in liver health and disease / S. M. Robinson, D. A. Mann // *Clin. Sci.* – Lond., 2010. – Vol. 118, № 12. – P. 691–705.
77. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / T. A. Wynn // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 214, № 2. – P. 199–210.
78. Brenner D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis / D. A. Brenner // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2009. – № 120. – P. 361–368.
79. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses / J. Guo, J. Loke, F. Zheng [et al.] // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49, № 3. – P. 960–968.
80. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis / J. P. Pradere, J. S. Troeger, D. H. Dapito [et al.] // *Semin. Liver Dis.* – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 232–244.
81. Sato M. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype / M. Sato, S. Suzuki, H. Senoo // *Cell. Struct. Funct.* – 2003. – № 28. – P. 105–112.
82. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells / J. A. Oben, S. Yang, H. Lin [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – № 302. – P. 685–690.
83. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo / S. De Minicis, C. Candelaresi, M. Marzioni [et al.] // *Gut.* – 2008. – Vol. 57, № 3. – P. 352–364.
84. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver / T. Roskams, D. Cassiman, R. De Vos, L. Libbrecht // *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* – 2004. – Vol. 280, № 1. – P. 910–923.
85. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic rat liver / A. Jiroutová, L. Majdiaková, M. Cermáková [et al.] // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2005. – Vol. 48, № 3–4. – P. 137–144.

86. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology / X. Ding, N. K. Saxena, S. Lin [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 166, № 6. – P. 1655–1669.
87. Chu C. M. Comparative studies on expression of alpha-smooth muscle actin in hepatic stellate cells in chronic hepatitis B and C / C. M. Chu, W.C. Shyu, Y. F. Liaw // *Dig. Dis. Sci.* – 2008. – Vol. 53, № 5. – P. 1364–1369.
88. Activated hepatic stellate cells in liver cirrhosis. A morphologic and morphometrical study / G. Carpino, A. Franchitto, S. Morini [et al.] // *Ital. J. Anat. Embryol.* – 2004. – Vol. 109, № 4. – P. 225–238.
89. Henderson N. C. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith / N. C. Henderson, S. J. Forbes // *Toxicology.* – 2008. – Vol. 254, № 3. – P. 130–135.
90. Ramadori G. Portal tract fibrogenesis in the liver / G. Ramadori, B. Saile // *Lab Invest.* – 2004. – Vol. 84, № 2. – P. 153–159.
91. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers / D. Cassiman, L. Libbrecht, V. Desmet [et al.] // *J. Hepatol.* – 2002. – Vol. 36, № 2. – P. 200–209.
92. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved / C. Guyot, S. Lepreux, C. Combe [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 38, № 2. – P. 135–151.
93. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway / S. S. Choi, W. K. Syn, G. F. Karaca [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 47. – P. 36551–36560.
94. Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats / M. N. Chobert, D. Couchie, A. Fourcot [et al.] // *Lab Invest.* – 2011. – Режим доступа до журн. : <http://www.nature.com/labinvest/journal/vaop/ncurrent/full/labinvest2011143a.html>
95. Hemopoietic progenitor cells and bone marrow stromal cells in patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis / D. S. Kyriakou, M. G.

- Alexandrakis, K. Zachou [et al.] // J. Hepatol. – 2003. – Vol. 39, № 5. – P. 679–685.
96. Forbes S. J. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis / S. L. Forbes // Gastroenterology. – 2004. – № 126. – P. 955–963.
 97. Xia J. - L. Hepatocyte Growth Factor Attenuates Liver Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation / J.-L. Xia, Ch. Dai, K. George // Am. J. of Pathol. – 2006. – Vol.168. – P. 1500–1512.
 98. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition / M. Zeisberg, C. Yang, M. Martino [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 23337–23347.
 99. Hepatic stellate cells produce vascular endothelial growth factor via phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 pathway / Y. Zhao, Y. Wang, Q. Wang [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 2011. – Vol. 359, № 1-2. – P. 217–223.
 100. Prognostic value of TNF α mRNA and VEGF mRNA expression in patients with chronic hepatitis C genotype-4, with and without cirrhosis and hepatocellular carcinoma to predict disease outcome / S. A. Kishta, A. A. Abd-Alhade, O. Hamam [et al.] // J. Egypt. Soc. Parasitol. – 2010. – Vol. 40, № 2. – P. 515–530.
 101. Kinnman N. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis / N. Kinnman, C. Housset // Front. Biosci. – 2002. – № 7. – P. 496–503.
 102. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations / S. T. Magness, R. Bataller, L. Yang, D. A. Brenner // Hepatology. – 2004. – № 40. – P. 1151–1159.
 103. Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites / R. Abe, S. C. Donnelly, T. Peng [et al.] // J. Immunology. – 2001, – Vol. 166. – P. 7556–7562.

104. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver / L. Garcíade, I. Montfort, E. Montes [et al.] // *Exp. Mol. Pathol.* – 2006. – Vol. 80, № 1. – P. 97–108
105. Bataller R. Liver Fibrosis / R. Bataller, D. A. Brenner // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115, № 2. – P. 209–218.
106. Epithelial-mesenchymal transition of biliary epithelial cells in advanced liver fibrosis / F. Schulze, K. Schardt, I. Wedemeyer [et al.] // *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* – 2007. – Vol. 91. – P. 250–256.
107. Guo J. Hepatic fibrogenesis / J. Guo, S. L. Friedman // *Semin Liver Dis.* 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 413–426.
108. HGF, MET, and matrix-related proteases in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar variant, cirrhotic and normal liver / K. E. Schoedel, V. Z. Tyner, T. H. Kim [et al.] // *Mod Pathol.* – 2003. – Vol. 16, № 1. – P. 14-21.
109. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies / S. Hemmann, J. Graf, M. Roderfeld [et al.] // *J. Hepatol.* – 2007. – Vol. 45, № 5. – P. 955–975.
110. Matrix Metalloproteases (MMPs) In Chronic Hepatitis C Infection // Conatus Pharmaceuticals. – 2009. – Режим доступа: <http://www.conatuspharma.com/liverfacts/chronic-hcv.htm>.
111. Canbay A. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis / A. Canbay, S. Friedman, G. T. Gores // *Hepatology.* – 2004. – №. 39. – P. 273–278.
112. Vinas O. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation / O. Vinas // *Hepatology.* – 2003. – № 38. – P. 919–929.
113. Maher. J. J. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system / J. J. Maher // *Semin. Liver Dis.* – 2001. – № 21. – P. 417–426.
114. Kennedy N. J. Liver Damage by Infiltrating CD8⁺ T Cells Is Fas Dependent / N. J. Kennedy, J. Q. Russell. // *The Journal of Immunology.* – 2001. – Vol. 167. – P. 6654–6662.

115. Liver injury is associated with enhanced regulatory T-cell activity in patients with chronic hepatitis B / C. Y. Lin, M. C. Tsai, C. T. Huang [et al.] // J. Viral. Hepat. – 2007. – Vol. 14, №7. – P. 503–511.
116. Lymphocyte-hepatic stellate cell proximity suggests a direct interaction / N. Muhanna, A. Horani, S. Doron, R. Safadi // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Vol. 148, № 2. – P. 338–347.
117. Kolios G. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease / G. Kolios, V. Valatas, E. Kouroumalis // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 46, №12. – P. 7413–7420.
118. Kawada N. Role of oxidative stress and Kupffer cells in hepatic fibrosis / N. Kawada, K. Otagawa // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 22, suppl. 1. – P. 85–86.
119. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases / P. Muriel // Hepatol. Int. – 2009. – Vol. 3, № 4. – P. 526–536.
120. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis / A. M. Gressner, R. Weiskirchen, K. Breitkopf, S. Dooley // Front. Biosci – 2002. – № 7. – P. 793–807.
121. Olaso E. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells / E. Olaso // J. Clin. Invest. – 2001. – № 108. – P. 1369–1378.
122. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis / F. Marra // Front. Biosci. – 2002. – № 7. – P. 1899–1914.
123. Schwabe R. F. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration / Schwabe R. F., Bataller R., Brenner D. A. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2003. – Vol. 285. – P. G949–G958.
124. Michalopoulos G. K. Liver regeneration / Michalopoulos G. K., DeFrances M. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2005. – Vol. 93. – P. 101–134.
125. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice / S. Ghatak , A. Biswas, G. K. Dhali [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2010. – Vol. 251, № 1. – P. 59-69.

126. Shek F. W. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? / F. W. Shek, R. C. Benyon // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – № 16. – P. 123–126.
127. El-Bassiouny A. E. Expression of cyclooxygenase-2 and transforming growth factor-beta1 in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma / A. E. El-Bassiouny // *Med. Gen. Med.* – 2007. – Vol. 9, № 3. – P. 45.
128. Фадеев Г. Д. Патогенетические механизмы фиброза печени. Инновационные диагностические и прогностические критерии / Г. Д. Фадеев, Н. А. Кравченко // *Укр. терапевт. журн.* – 2010. – № 1. – С. 19–26.
129. Bonner J. C. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases / J. C. Bonner // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2004. – Vol. 15, № 4. – P. 255–273.
130. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury / E. Borkham-Kamphorst, E. Kovalenko, C. R. van Roeyene [et al.] // *Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 88, № 10. – P. 1090–1100.
131. Williams E. J. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo / E. J. Williams // *Gut.* – 2001. – № 49. – P. 577–583.
132. Oben J. A. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters / J. A. Oben // *Gut.* – 2004. – № 53. – P. 438–445.
133. Cho J. J. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis / J. J. Cho // *Gastroenterology.* – № 118. – P. 1169–1178.
134. Paizis G. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile ductligated rat liver / G. Paizis // *Gastroenterology.* – 2002. – № 123. – P. 1667–1676.

135. Munshi M. K. The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis / M. K. Munshi, M. N. Uddin, S. S. Glaser // *Exp. Biol Med* (Maywood). – 2011. – Vol. 236, № 5. – P. 557–566.
136. Bataller R. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis / R. Bataller // *J. Clin. Invest.* – 2003. – № 112. – P. 1383–1394.
137. Bataller R. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver / R. Bataller // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2003. – № 285. – P. 642–651.
138. Wheeler M. D. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease / M. D. Wheeler // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – № 31. – P. 1544–1549.
139. Wang J. Roles of adipokines in liver injury and fibrosis / J. Wang, J. Brymora, J. George // *Expert Rev. Gastroenterol Hepatol.* – 2008. – Vol. 2, № 1. – P. 47–57.
140. Tacke F. High adiponectin in chronic liver disease and cholestasis suggests biliary route of adiponectin excretion in vivo / F. Tacke // *J. Hepatol.* – 2005. – Vol. 42, № 5. – P. 666–673.
141. Neumeier M. Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis / M. Neumeier // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12, № 34. – P. 5490–5494.
142. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression / V. Ortiz, M. Berenguer, J. M. Rayon [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – № 97. – P. 2408–2414.
143. Hepatitis C and liver fibrosis / D. Schuppan, A. Krebs, M. Bauer, E. G. Hahn // *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10, suppl. 1. – P. 59–67.
144. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells / R. Bataller, Y. H. Paik, J. N. Lindquist [et al.] // *Gastroenterology.* – 2004. – № 126. – P. 529–540.

145. Wanless I. R. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis / I. R. Wanless, K. Shiota // *Semin. Liver Dis.* – 2004. – № 24. – P.99–106.
146. Hammel P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct / P. Hammel // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – № 344. – P. 418–423.
147. Tacke F. Liver fibrosis – pathogenesis and novel therapeutic approaches / F. Tacke, R. Weiskirchen // *Internist.* – Berl., 2010. – Vol. 51, № 1. – P. 21–29.
148. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis / W. H. Kim, K. Matsumoto, K. Bessho, T. Nakamura // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 166, № 4. – P. 1017–1028.
149. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition / J. Kluwe, J. P. Pradere, G. Y. Gwak [et al.] // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138, № 1 – P. 347–359.
150. Ghiassi-Nejad Z. Advances in antifibrotic therapy / Z. Ghiassi-Nejad, S. L. Friedman // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2008. – Vol. 2, № 6. – P. 803–816.
151. Terminology of chronic hepatitis, hepatic allograft rejection, and nodular lesions of the liver: Summary of recommendations developed by an international working party, supported by the WGG, Los Angeles 1994 // *Am. J. Gastroenterol.* – 1994. – Vol. 89, suppl. 8. – P. 177–181.
152. The morphology of cirrhosis: Working group sponsored by the World Health Organization / P. P. Anthony, K. G. Ishak, N. C. Nayak [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 1978. – Vol. 31. – P. 395–414.
153. Orfei E. Liver cirrhosis / Orfei E. // *Review of pathology of the liver* / ed. by E. Orfei. ; Loyola University Stritch school of Medicine Chicago Illinois. USA. – 2009. – Режим доступа : <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/orfpath/pthcntnt.htm>

154. Millward-Sadler G. H. Cirrhosis / Millward-Sadler G. H. // Pathology of the liver / eds. : P. P. Anthony, P. J. Scheuer, A. D. Burt, B. C. Portmann. – 3rd ed. – London : Churchill Livingstone, 1994. – P. 397–424.
155. Popper H. Pathologic aspects of cirrhosis / H. Popper // Am. J. Pathol. – 1977. – Vol. 87. – P. 228–264.
156. Rappaport A. M. The scarring of the liver acini (cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations / A. M. Rappaport // Virchows Arch. [A]. – 1983. – Vol.402. – P. 107–137.
157. Geller S. A. Biopsy Interpretation of the Liver / S. A. Geller, L. M. Petrovic. – 2nd ed. – [S.I.] : Lippincott Williams & Wilkins, 2009. – 435 p.
158. Longerich T. Pathogenesis and pathomorphology of chronic viral hepatitis / T. Longerich , R. Bartenschlager, P. Schirmacher // Verh. Dtsch. Ges. Pathol. – 2005. – Vol.89. – P. 144–154.
159. Scoazec J. Y. Liver biopsy: Which role in patient management? / J. Y. Scoazec // Ann. Pathol. – 2010. – Vol. 30, № 6. – P.464–469.
160. Desmet V. Классификация хронического гепатита: диагностика, определение степени тяжести и стадии течения / V. Desmet, M. Gerber, J. M. Hoofnagle. // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1995. – Т. 5, № 2. – С. 38–45.
161. Knodell R. G. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis / R. G. Knodell, K. G. Ishak, W. C. Black // Hepatology. – 1981. – Vol. 1. – P. 431–435.
162. Scheuer P. J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment / P. J. Scheuer // Hepatology. – 1991. – Vol. 13. – P. 372–374.
163. Ishak K. G. Chronic hepatitis: morphology and nomenclature / K. G. Ishak // Modern pathology. – 1994. – Vol. 7, № 6. – P. 690–713.
164. Batts K. P. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting / K. P. Batts, J. Ludwig // Am. J. Surg. Pathol. – 1996. – Vol. 19, № 12. – P. 1409–1417.

165. METAVIR. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C / The French METAVIR Cooperative Study Group // *Hepatology*. – 1994. – Vol. 20. – P. 15–20.
166. Poynard T. Biomarkers of liver fibrosis / T. Poynard // *Adv. Clin. Chem.* – 2008. – Vol. 46. – P. 131–160.
167. Performance of noninvasive markers for liver fibrosis is reduced in chronic hepatitis C with normal transaminases / G. Sebastiani, A. Vario, M. Guido, A. Alberti // *J. Viral. Hepat.* – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 212–218.
168. Patel K. An independent and prospective comparison of two commercial fibrosis marker panels (HCV FibroSURE and FIBROSpect II) during albinterferon alfa-2b combination therapy for chronic hepatitis C / K. Patel // *J. Viral Hepat.* – 2009. – Vol. 16, № 3. – P. 178–186.
169. Poynard T. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C / T. Poynard // *Comparative Hepatology*. – 2004. – Vol. 3. – P. 8–12.
170. Павлов Ч. С. Современные возможности эластометрии, фибро- и акти-теста в диагностике фиброза печени / Ч. С. Павлов, Д. В. Глушенко, В. Т. Ивашкин // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 43–52.
171. Poynard T. Natural history of HCV infection / T. Poynard // *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 200. – № 14. – P. 211–228.
172. Шипов О. Ю. Диагностика портальной гипертензии при ультразвуковой ангиографии печени: дис. ... кандидата мед. наук : 14.00.19 «Лучевая диагностика, лучевая терапия» / Шипов О.Ю. – М., 2002. – 110 с.
173. Патологическая анатомия : национальное руководство / гл. ред. М. А. Пальцев, Л. В. Кактурский, О. В. Зайратьянц. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 1264 с.

174. Fink S. A. Managing patients with hepatitis B-related or hepatitis C-related decompensated cirrhosis / S. A. Fink, I. M. Jacobson // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – Vol. 8, № 5. – P. 285–295.
175. Alves de Mattos A. Treatment of HCV infection in patients with cirrhosis / A. Alves de Mattos, A. Zambam de Mattos // *Ann. Hepatol.* – 2010. – Vol. 9, suppl. – P.80–83.
176. Голубовская О. А. Интерпретация данных лабораторных и инструментальных исследований при хронических вирусных гепатитах / О. А. Голубовская // *Клинич. иммунология. Аллергология. Инфектология.* – 2008. – Т. 14, №3. – С. 28–35.
177. Roccia F. Intrahepatic natural immunity and HCV immunopathogenesis / F. Roccia, C. Agrati // *Cell Death and Differentiation* – 2003. – Vol. 10. – P. 9–12.
178. Возианова Ж. И. Экспресс-определение некоторых маркеров вирусных гепатитов В и С / Ж. И. Возианова, О. А. Голубовская, Н. Ч. Корчинский // *Лаб. диагностика.* – 2005. – Т. 34, № 4. – С. 57–59.
179. Застосування швидких тестів у лабораторній діагностиці інфекційних хвороб : метод. рекомендації / НМАПО ім. П. Л. Шупика. – К. : МОЗ України. 2004. – 31 с.
180. Шебеко Ю. О. Характеристика експресії MMP-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.
181. Туманский В. А. Интраоперационная иммунохроматографическая экспресс-диагностика вирусного гепатита С в ткани трепанобиоптатов печени / В. А. Туманский, Ю. А. Шебеко // *Патология.* – 2010. – Т. 7, № 2. – С. 107–109.
182. 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.

183. 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.
184. 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.
185. Шебеко Ю. О. Імуногістохімічна характеристика експресії маркерів проліферації при фіброзі та цирозі печінки / Ю. О. Шебеко // Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. – Запоріжжя, 2009. – Вип. 22, т. 1 (клінічна медицина). – С. 166–167.
186. 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.
187. Туманский В. А. Иммуноклеточный киллинг: морфогенез и последствия для больных хроническим вирусным гепатитом / В. А. Туманский, М. А. Шишкін, Ю. А. Шебеко // Патологія. – 2008. – Т. 5, № 3 – С. 110–112.
188. 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 : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю та III конф. Укр. дівізіону інтернаціональної академії патології, 12-13 травня 2011 р. – Х., 2011. – С. 119.
189. Шебеко Ю. О. Спосіб інтраопераційної експрес-діагностики вірусного гепатиту С / Ю. О. Шебеко // Хист. Всеукр. мед. журн. молодих вчених. – 2010. – Вип. 12. – С. 197.
190. Шебеко Ю. О. Імуногістохімічні та комп'ютерно-морфометричні особливості фіброзу різного ступеню та цирозу печінки / Ю. О. Шебеко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Укр. мед. стомат. академії. – 2009. – Т. 9, вип. 4 (28), ч. 3. – С. 235.

191. Туманский В. А. Фиброз печени: источники развития, морфогенез и градация интенсивности / В. А. Туманский, Ю. А. Шебеко // 100-летие Рос. о-ва патологоанатомов. – СПб. : Biovitrum, 2009. – С. 315–317.
192. Пат. № 47598 UA, МПК7 G01N 33/00. Спосіб експрес-діагностики вірусного гепатиту С / Туманський В. О., Шебеко Ю. О., Живиця С. Г. – № u 200909572 ; заявл. 18.09.09 ; опубл. 10.02.10, Бюл. № 3.
193. Посмертна імунохроматографічна діагностика ВІЛ-інфекції і вірусних гепатитів : метод. рекомендації / В. О. Туманський, С. Г. Тимошенко, А. В. Куртєв, Ю. А. Шебеко. – К. : МОЗ України, 2009. – 23 с.
194. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex / D. Egger, B. Wölk, R Gosert [et al.] // J. Virol. – 2002. – Vol.76, № 12. – P. 5974–5984.
195. Серов В. В. Морфологическая оценка хронического поражения печени, обусловленного вирусами гепатита / В. В. Серов, Е. Л. Танашук // Практическая гепатология / под ред. Н. А. Мухина. – М., 2004. – С. 40–43.
196. Мороз Л. В. Морфологічна верифікація гепатиту С за даними біопсійного дослідження / Л. В. Мороз // Інфекційні хвороби. – 2001. – № 3. – С. 18–21.
197. Lefkowitz J. H. Liver Biopsy Interpretation / J. H. Lefkowitz. – 8th ed. – [S.I.] : SAUNDERS Elsevier, 2010. – 400 p.
198. Young B. Whether's Basic Pathology / B. Young, W. Stewart, O. Dowd. – 5th ed. – [S.I.] : Churchill Livingstone, 2011. – 337 p.
199. Caetano J. Differences in Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8 T-Cell Phenotype during Pegylated Alpha Interferon and Ribavirin Treatment Are Related to Response to Antiviral Therapy in Patients Chronically Infected with HCV/ J. Caetano, A. Martinho, A. Paiva // J. Virol. – 2008. – Vol. 82, № 15. – P. 7567–7577.
200. Willberg Ch. B. Protection of Hepatocytes from Cytotoxic T Cell Mediated Killing by Interferon-Alpha/ Ch. B. Willberg, M. S. Ward, F. Reginald // Published online. – 2007. – Vol. 8, № 2. – Режим доступу : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1949144/?tool=pubmed>

201. Fischer R. Hepatitis C virus infection and apoptosis / R. Fischer, T. Baumert, H. E. Blum // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol.13, No.36. – P. 4865–4872.
202. Шишкін М. А. Патогістологічні і імуногістохімічні особливості прогресії хронічних вірусних гепатитів В та С за даними трепанобіопсій печінки : дис. ... канд. мед. наук : 14.02.03 «Патологічна анатомія» / М. А. Шишкін. – Запоріжжя, 2008. – 160 с.
203. Зубов А. Д. Диагностическое значение пункционной биопсии печени при хроническом вирусном гепатите С / А. Д. Зубов // *Гастроэнтерология.* – 2009. – Вып. 279. – С. 27–30.
204. Novobrantseva T. I. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells / T. I. Novobrantseva // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 3072–3082.
205. Zhou X. Autoantibodies to fibrillin-1 activate normal human fibroblasts in culture through the TGF- β pathway to recapitulate the 'scleroderma phenotype / X. Zhou // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 4555–4560.
206. Safadi R. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 lymphocytes and its attenuation by transgenic interleukin 10 from hepatocytes / R. Safadi, M. Ohta // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127. – P. 870–882.
207. Bhogal R. K. B cells: no longer bystanders in liver fibrosis / R. K. Bhogal, C. A. Bona. // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 1. – P. 115
208. Ahmad A. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis / A. Ahmad, F. Alvarez // *J. of Leukocyte Biology.* – 2004. – Vol. 6. – P. 743–759.
209. Antony S-Y Leong. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology* / Antony S-Y Leong. – London : Greenwich medical Media LTD, 1999. – 4 p.
210. Marinosci F. Interferon and Cytokine Research / F. Marinosci, C. Bergamini, E. Fransvea // *Gastroenterol. J.* – 2005. – Vol. 25. – P. 453–458.
211. Melhem A. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC / A. Melhem, N. Muhanna, A. Bishara // *J. Hepatol.* – 2006. – Vol. 45. – P. 60–75.

212. Kemeny N. E. Hepatic arterial infusion after liver resection / N. E. Kemeny, M. Gonen // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 352, № 7. – P. 734–735.
213. Thoracoabdominal approach for right-sided hepatic resection for hepatocellular carcinoma / F. Xia, R. T. Poon, S. T. Fan, J. Wong // J. Am. Coll. Surg. – 2003. – Vol. 196, № 3. – P. 418–427.