

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ФЕНЬ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ



УДК: 616.36-003.826-002-036.8-091.8

**ХРОНІЧНИЙ СТЕАТОГЕПАТИТ: ПАТОМОРФОЛОГІЧНА
ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРЕБІГУ ТА НЕСПРИЯТЛИВИХ НАСЛІДКІВ**

14.03.02 – патологічна анатомія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **Туманський Валерій Олексійович**, проректор з наукової роботи, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Заслужений діяч науки і техніки України, професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Дядик Олена Олександрівна**, завідувач кафедри патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. Шупика МОЗ України.

доктор медичних наук, професор **Гаврилюк Алла Олександрівна**, завідувач кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України.

Захист відбудеться «21» березня 2019 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

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

Автореферат розісланий «15» лютого 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Т.В. Іваненко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Через нечітку визначеність жирової хвороби печінки, неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) і алкогольного стеатогепатиту (АСГ) дані стосовно їх поширеності значно відрізняються. Розповсюдженість НАСГ серед населення планети коливається від 2,8 % до 46 % [Williams C.D. et al., 2011], за даними ВООЗ у 2015 році НАСГ охоплює приблизно 25 % дорослого населення світу [Агаџо А.Р. et al., 2018]. Зловживання алкоголем та АСГ у 2012 році став причиною 48 % всіх випадків смерті від цироза печінки (ЦП) [Rehm J. et al., 2013] і причиною смерті 5,9 % населення світу [WHO, 2015], частота розвитку гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) при ЦП у хворих на АСГ становить 2,4 – 12,8 % [White D.L. et al., 2012]. Серед чинників розвитку НАСГ і АСГ важливу роль відіграє накопичення в печінці насичених жирних кислот [Lonardo A. et al., 2017; Stickel F. et al., 2017] і заліза [Aigner E. et al., 2015]; проте, особливості їх вмісту в печінці у хворих на АСГ і НАСГ поки не деталізовані. За рекомендаціями Американської, Європейської та Латиноамериканської асоціацій з вивчення печінки 2012-2015 років [Chalassi N. et al., 2012; Castera L. et al., 2015] важливе значення в діагностиці НАСГ і АСГ мають як неінвазивні методи, так і трепанобіопсія печінки, яка визначає патоморфологічні (ПМ) ознаки активності стеатогепатиту (СГ), градацію фіброзу печінки і рано виявляє ГЦК. Незважаючи на велику кількість публікацій з патоморфології НАСГ і АСГ, викладених в аналітичних оглядах останніх років [Kleiner D.E., Makhlouf H.R., 2016; Wong V. W.-S. et al., 2016], до теперішнього часу не визначені достовірні ПМ відмінності НАСГ і АСГ [Sakhuja P., 2014] в трепанобіоптатах печінки. Неоднозначна кількісна диференційна оцінка активності НАСГ і АСГ в гепатобіоптатах незалежними експертними групами патоморфологів [Bedossa P., 2014; Brunt E.M., 2016] визначила актуальність подальшого пошуку додаткових ПМ параметрів активності цих хвороб. В останні роки предметом інтенсивних досліджень і дискусій стали особливості репаративних процесів в печінці при НАСГ і АСГ, серед яких найменш вивчена регенерація гепатоцитів. Не сформувалося єдиного розуміння ролі так званої дуктулярної реакції печінки (ДРП), яка розцінюється як прояв репаративного процесу при хронічних захворюваннях печінки [Fabris L. et al., 2017], диференціювання прогеніторних клітин печінки в холангіоцити [Kim K.H. et al., 2015], предиктор біліарного фіброзу і прогресування СГ [Zhao L. et al., 2017]. Чітко не визначені ПМ параметри прогресування основних типів фіброзу та ЦП, не вивчені особливості патоморфології ГЦК у хворих на НАСГ і АСГ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом НДР кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету «Морфогенез хронічного стеатогепатиту та його несприятливих наслідків» 2016-2018 рр (№ державної реєстрації 0116U005832), в якій автор був відповідальним виконавцем.

Мета дослідження: удосконалення біопсійної діагностики хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту на підставі визначення патоморфологічних параметрів їх активності, регенерації і фіброзу печінки та несприятливих наслідків цих хвороб.

Завдання дослідження:

1. Дослідити методом високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії (ВЕР-ХМС) в печінці померлих хворих на НАСГ рівні вмісту холестерину, пальмітинової і стеаринової кислот при тяжкому S_3 СГ та їх взаємозв'язок з рівнями холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові за життя цих хворих.

2. Уточнити основні мікроскопічні види загибелі гепатоцитів, а також особливості і ступінь депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки при НАСГ і АСГ.

3. Визначити гістохімічними (ГХ), імуногістохімічними (ІГХ) і електронно-мікроскопічними (ЕМ) методами в трепанобіоптатах і секційному матеріалі печінки ПМ параметри активності та тяжкості перебігу НАСГ і АСГ.

4. Вивчити ГХ, ІГХ та морфометричним (МФМ) методами джерела і основні типи фіброзу печінки та накопичення в позаклітинному матриксі (ПКМ) колагену I, III і IV типу в динаміці його прогресування.

5. З'ясувати ПМ прояви активації репаративного комплексу прогеніторних клітин печінки та його внесок у відновлення гепатоцитів і холангіол печінки у хворих на НАСГ і АСГ.

6. Визначити ПМ особливості несприятливих наслідків НАСГ і АСГ.

Об'єкт дослідження: хронічний неалкогольний і алкогольний стеатогепатит.

Предмет дослідження: морфогенез і ПМ особливості деструктивних і компенсаторних змін гепатоцитів, регенерації гепатоцитів та репаративного фіброзу печінки, цирозу і раку печінки у хворих на НАСГ і АСГ.

Методи дослідження: патогістологічні (ПГ), ЕМ, ВЕР-ХМС, ГХ, ІГХ, МФМ дослідження біопсійного і секційного матеріалу НАСГ і АСГ для ПМ діагностики їх перебігу та несприятливих наслідків; статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше методом ВЕР-ХМС встановлено, що при важкому S_3 стеатогепатиті у померлих хворих на НАСГ в печінці значно підвищений вміст ліпотоксичних стеаринової і пальмітинової кислот та холестерину, який позитивно корелює з підвищеним рівнем загального холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові за життя цих хворих.

Уточнені дані щодо основних мікроскопічних видів загибелі гепатоцитів (стеатонекрозу, апоптозу, балонного цитолізу, фероптозу) при НАСГ і АСГ. Отримані нові ЕМ і ІГХ дані стосовно того, що балонні гепатоцити є клітинами, які руйнуються шляхом балонного цитолізу. Встановлено, що надмірне накопичення заліза веде до фероптозу гепатоцитів: вони втрачають типову форму, зменшуються і закругляються, мають пікнотичне ядро і перенасичену залізом цитоплазму. Отримані нові дані стосовно особливостей накопичення тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки у хворих на НАСГ і

АСГ, та уточнені дані стосовно молекулярного складу ПКМ, джерел і динаміки розвитку основних типів фіброзу печінки та депонування різних типів колагену при їх прогресуванні.

Розширені наукові поняття щодо ПМ показників активності хронічного СГ, про яку свідчить комплекс мікроскопічних ознак (S_1 - S_2 - S_3 ступень стеатозу печінки; збільшення кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; інтенсифікація стеатонекрозу, балонного цитолізису, апоптозу і фероптозу гепатоцитів; зростання кількості та розширення вогнищ стеатонекрозу в печінці; зростання імуноцитарної та запально-клітинної інфільтрації печінки), в той час як показником тяжкості хвороби є перисинусоїдально-periцелюлярний і портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки, який прогресує через легкий F_1 , помірний F_2 , тяжкий F_3 фіброз до ЦП.

Подальшого розвитку набуло положення про особливості репаративних процесів в печінці при НАСГ і АСГ. Доказано, що відновлення популяції гепатоцитів відбувається переважно через активацію репаративного комплексу прогеніторних клітин печінки та диференціювання в гепатоцити гепатобіліарних і гепатоцитоподібних SK7+ клітин, якому сприяє поява ламініну в ПКМ. Встановлено, що при репарації СГ мають місце два фіброзні шляхи: ранній periцелюлярний фіброз, обумовлений активацією перисинусоїдальних міофібробластів (МФБ), а також відстрочений портальний і мостоподібний портально-портальний фіброз через активацію перидуктальних МФБ при ДРП. Отримані нові дані щодо активної ролі репаративного комплексу прогеніторних клітин в формуванні псевдодольок при ЦП.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі ПГ, ГХ, ІГХ і ЕМ досліджень встановлена відсутність суттєвих ПМ відмінностей між АСГ і НАСГ, достатніх для їх диференційної діагностики в трепанобіоптатах печінки без наявності відповідних клініко-лабораторних даних хворих. НАСГ відрізняється від АСГ переважанням крупновезикулярного стеатозу гепатоцитів, меншим числом гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, меншою виразністю та розповсюдженістю запальної клітинної інфільтрації дольок печінки, а також відсутністю локального перивенулярного та ізольованого перибіліарного фіброзу. Для використання в біопсійній діагностиці запропоновані ПМ ознаки активації НАСГ і АСГ, а також відновлення гепатоцитів та біліарних дуктул при цирозі печінки. Визначено, що ПМ особливостями прогресування мікронодулярного ЦП у хворих на НАСГ і АСГ є надмірне накопичення порожніх дуктул в портальних трактах, асоційоване з тяжким портальним і мостоподібним портально-портальним фіброзом, а також розвиток в псевдодольках вкрай тяжкого periцелюлярного фіброзу, який ізолює гепатоцити та веде до їх стеатонекрозу. Описані характерні патерни ГЦК, яка розвивається у хворих на НАСГ і АСГ.

Результати дисертаційного дослідження з позитивним ефектом впроваджені в практичну роботу Одеського і Запорізького обласних патологоанатомічних бюро та Запорізького обласного бюро судово-медичної експертизи. Нові теоретичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі

патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України, кафедрах патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, кафедрі патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, кафедрі патоморфології з курсом судової медицини Медичного інституту Сумського державного університету МОН України, кафедрі патологічної анатомії і судової медицини та на кафедрі фізикоїдної хімії Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

Особистий внесок дисертанта. Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим керівником визначені тема і складена програма дослідження. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук і аналіз літератури, а також ПГ, ГХ, ІГХ, ЕМ та МФМ дослідження печінки хворих; провів статистичний аналіз отриманих даних, систематизував і інтерпретував отримані результати; написав всі розділи дисертації; сформулював висновки і рекомендації. ВЕР-ХМС аналіз печінки виконаний в ХМС лабораторії Запорізького державного медичного університету при консультативній допомозі доц. Варинського Б.О.

Апробація результатів дисертації відбулась на засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини; анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; гістології, цитології та ембріології; патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України 13.11.2018р.

Основні положення роботи були представлені та обговорені на 4-х Всеукраїнських науково-практичних конференціях молодих вчених та студентів з міжнародною участю: «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2013» (Запоріжжя, 2013), «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2015), «Сучасні аспекти медицини і фармації-2016» (Запоріжжя, 2016), «Сучасні аспекти медицини і фармації-2017» (Запоріжжя, 2017); на 4-х міжнародних науково-практичних конференціях: «Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки» (Львів, 2016), «Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення» (Дніпро, 2017), «Актуальні проблеми сучасної патологічної анатомії» (Київ, 2017), «Актуальні питання сучасної медицини та фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ)» (Запоріжжя, 2018); на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2018) та на X Конгресі Асоціації патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології» (Івано-Франківськ, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць: 6 статей у наукових фахових виданнях України, які індексуються міжнародними наукометричними базами (з них 1 стаття – без співавторів) і 1 стаття у матеріалах міжнародної науково-практичної конференції; 9 тез в матеріалах міжнародних і Всеукраїнських науково-практичних конференцій, 1 теза в матеріалах X Конгресу Асоціації патологів України. Отримано патент України на винахід №116968 та 2 патенти на корисну модель №108321 і №112148.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 284 сторінках машинопису і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 154 рисунками та 13 таблицями. Список літератури містить 278 джерел (36 кирилицею та 242 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Досліджено 305 хворих на НАСГ і АСГ: І групу спостережень склали 107 хворих на АСГ 25-63 років (печінка 67 померлих хворих і 40 трепанобіоптатів печінки), ІІ групу спостережень склали 198 хворих на НАСГ 25-74 років (печінка 25 померлих хворих і 173 трепанобіоптата печінки). ІІІ групу умовного контролю (ГУК) склали гепатобіоптати 30 пацієнтів 25-65 років, що не страждали на стеатогепатит. Також проаналізована частота ГЦК у 359 хворих зі стеатозом печінки з архіву кафедри.

Для ПГ, ГХ, ІГХ досліджень матеріал печінки фіксували в 10 % забуференому формаліні, заливали в парафін. Серійні зрізи для ПГ діагностики забарвлювали гематоксиліном і еозином, методом Ван-Гізона і Масона-триколом. Ретикулярні волокна печінки виявляли імпрегнацією сріблом за Гоморі, еластичні волокна - методом Унни-Тенцера. Тривалентне залізо Fe^{3+} виявляли в парафінових зрізах методом Перлса, двовалентне залізо Fe^{2+} - методами Тірмана-Шмельцера і Хьюкіла-Пути з батофенантроліном за власною модифікацією [Пат. на корисну модель № 108321 Україна, 2016]. Ліпіди в гепатоцитах виявляли в заморожених зрізах, забарвлених Суданом ІІІ методом Герксгеймера. Визначення рівня холестерину, стеаринової і пальмітинової кислот в печінці 25 померлих хворих на НАСГ проводили методом ВЕР-ХМС аналізу на приладі Agilent 1260 Infinity HPLC System (США) за розробленою методикою [Пат. на винахід № 116968 Україна, 2017].

Для ЕМ дрібні шматочки трепанобіоптатів печінки 5 хворих на АСГ і печінки 5 хворих на НАСГ через годину після їх смерті фіксували в 2,5% глутаральдегіді на 0,1 М фосфатному буфері, контрастували в 1% OsO_4 , зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, контрастували 2,5% ураніацетатом на 70⁰ спирті і заливали в епон-аралдит. Ультратонкі зрізи, отимані на ультратомі Reichert Om43 (Австрія) вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01 (Україна).

Відповідно до завдань дослідження в парафінових зрізах виконували ІГХ дослідження із застосуванням системи детекції UltraVision Quanto HRP + DAB System («Thermo Scientific», США) та таких антитіл: для ідентифікації прогеніторних клітин печінки – Polyclonal Ra a-Hu CD 117, c-kit («ДАКО», Данія), Мо a-Hu CD34, Clone QBEnd/10 («Thermo Scientific», США), Мо a-Hu CD44 Std./HCAM Ab-4, Clone 156-3C11 («Thermo Scientific», США), Мо a-Hu CD56, Clone T199 («NeoMarkers» США); для визначення гепатоцитів - HepPar-1 Мо a-Hu Hepatocyte, Clone QBEnd/10 («Thermo Scientific», США), Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein («Thermo Scientific», США); для виявлення біліарних клітин - Мо a-Hu Keratin 7,

Clone OV-TL 12/30 («Thermo Scientific», США), Мо a-Hu Cytokeratine 19, *Clone RCK 108* («DAKO», США); для виявлення клітин Купфера і макрофагів - Мо a-Hu CD68, *Clone PG-M1* («DAKO», Данія) і Rb a-Hu S100, *Clone A4* («NeoMarkers», США); для ідентифікації фіброгенних клітин печінки - Мо a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA), *Clone 1A4* («DAKO», Данія), Мо a-Hu Vimentin, *Clone V9, RTU* («DAKO», Данія), Мо a-Hu Desmin, *Clone D33, RTU* («DAKO», Данія); для визначення складу ПКМ - Rb Fibronectin, RTU («DAKO», Данія), Мо a-Hu Fascin Ab1, *Clone FCN01* («NeoMarkers», США), Rb Laminin Ab-1 («Thermo Scientific», США), Rb a-Hu Collagen type I, *clone RAN C11-0,1* («Имтек», Росія), Rb a-Hu Collagen type III, *clone RAN C33* («Имтек», Росія), Мо a-Hu Collagen type IV Ab-3, *clone CIV 22 + PHM 12* («Thermo Scientific», США); для ідентифікації імунноцитів - Мо a-Hu CD4, *Clone MT310* («DAKO», Данія), Мо a-Hu CD8, *Clone C8 / 144B* («DAKO», Данія), Мо a-Hu Plasma Cell Ab-1, *Clone LIV3G11* («NeoMarkers», США); для визначення проліферації клітин - Мо a-Hu Ki-67 Antigen, *Clone SP6* («NeoMarkers», США) та апоптозу клітин - Мо a-Hu Caspase 3 Ab-3, *Clone 3CSP* («NeoMarkers», США).

Ступінь стеатозу печінки визначали ФЦММ в препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, в стандартизованій площі гістологічного зрізу печінки (СПГЗП), якою було його цифрове зображення в фотокамері Camedia C5060WZ «Olympus 3040» (Японія), зняте на мікроскопі AxioPlan 2 «Carl Zeiss» (Німеччина) при збільшенні $\times 400$. За градацією Е.М. Brunt, D.E. Kleiner (2005) визначали легкий S_1 , помірний S_2 та важкий S_3 ступінь стеатозу печінки. Ступінь накопичення заліза в печінці (мінімальний G_1 , легкий G_2 , помірний G_3 і важкий G_4) оцінювали за відсотком залізовмісних клітин за G.D. LeSage (1983) - М. Torbenson (2009).

У парафінових зрізах, забарвлених за Ван-Гізон і Масон-триколом, згідно модифікованої градації Е.М. Brunt, D.E. Kleiner, L.A. Wilson et al. (2011) визначали перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний тип фіброзу печінки, а також ступінь його тяжкості: легкий - F_1 , помірний - F_2 , важкий F_3 фіброз і F_4 цироз печінки. В СПГЗ при збільшенні $\times 200$ у відповідно забарвлених препаратах печінки ФЦММ в програмі ImageJ визначали площі депонування Масон-триколом-позитивного ПКМ, α -SMA+ клітин та колагену I, III і IV типу.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмі «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлка. Для даних, розподілених за нормальним законом, обчислювали середнє значення (M), середнє квадратичне відхилення (σ), стандартну помилку репрезентативності середнього значення (m), розраховували 95 % довірчий інтервал. Проводили також кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта кореляції Спірмена (r), значення якого від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак, від 0,3 до 0,69 – про середній зв'язок ознак, від 0,7 і вище – про сильний зв'язок ознак. Достовірність відмінностей визначали за допомогою t-критерію Стьюдента. Дані, розподіл яких відрізнявся від нормального, представляли за допомогою медіани і межквартільного розмаху Me (Q_1 ; Q_3);

порівняння даних, отриманих у 2 групах проводили за U-критерієм Манна-Уїтні; даних, отриманих у 3 групах – за H критерієм Краскела-Уоліса (кКУ). Зв'язки між лабораторними і ПГ показниками оцінювали непараметричним аналізом з обчисленням коефіцієнта гамма (γ), значення γ від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак, від 0,3 до 0,69 - підтверджувало середній ступінь зв'язку ознак, від 0,7 і вище – свідчило про наявність сильного зв'язку. Для всіх видів аналізу відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. За результатами ПГ, ЕМ, ГХ, ІГХ досліджень встановлено, що патогномонічними для АСГ і НАСГ змінами в печінці є стеатоз гепатоцитів, наявність різної кількості балонних гепатоцитів і гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; а також стеатонекрозу, апоптозу та фероптозу гепатоцитів. В перипортальних Z_1 і в проміжних Z_2 зонах дольок печінки у хворих на АСГ переважає мікровезикулярний стеатоз гепатоцитів, у хворих на НАСГ – крупновезикулярний стеатоз гепатоцитів; при обох хворобах визначається мікромакровезикулярний стеатоз. Стеатоз переважно перипортальних гепатоцитів D.G. Tiniakos et al. (2010) пов'язують з їх кращою оксигенацією та з підвищеним тиском крові на периферії дольки, внаслідок чого перипортальні гепатоцити більш уразливі до дії ацетальдегіду при АСГ та до β -окислення жирних кислот при НАСГ. За даними ЕМ ліпідні краплі в гепатоцитах при АСГ і НАСГ мають гомогенний матрикс з тригліцеридів низької електронної щільності та тонкий шар білків на зовнішній поверхні з множинними дрібними кавеолами, які забезпечують транспорт ліпідів з краплі в цитозоль і навпаки. В цитоплазмі гепатоцитів є гігантські мегамітохондрії з короткими кристами та центральними електронно-щільними, паралельними паракристалічними структурами. Мегамітохондрії появляються при пошкодженні гепатоцитів окисленими фосфоліпідами або ліпопротеїнами (Brown G. T., Kleiner D. E., 2016), їх появу в гепатоцитах визначають також S. Jayakumar et al. (2011).

Методом ВЕР-ХМС встановлено, що при тяжкому S_3 стеатозі у померлих хворих на НАСГ в печінці значно підвищений вміст стеаринової кислоти (від 0,26 до 2,15 мг/г), пальмітинової кислоти (від 0,18 до 2,17 мг/г) та холестерину. Медіана рівня вмісту холестерину в печінці з легким S_1 стеатозом становила 0,22 (0,08; 0,57) мг/г, що достовірно менше, ніж при тяжкому S_3 стеатозі - 7,10 (5,03; 8,25) мг/г ($U = 1,000$; $p = 0,005$). Парний регресійний аналіз підтвердив високу значущу залежність між ступенем тяжкості стеатозу печінки при НАСГ (y) і рівнем пальмітинової (x_1) і стеаринової (x_2) кислот в печінці, де $y = 0,83x_1$; $R^2 = 0,33$ і $y = 1,13x_2$; $R^2 = 0,37$. Підвищений вміст холестерину, стеаринової і пальмітинової кислот в печінці померлих хворих позитивно корелює з підвищеним рівнем загального холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові за життя цих хворих. В дослідях на мишах показано, що пальмітинова і стеаринова кислоти та холестерин є головними молекулами ліпотоксичності при трансформації простого стеатоза печінки в НАСГ (Subramania S. et al., 2011; Schuppan D., Schattenberg J. M., 2013).

ГХ і МФМ методами визначено, що у хворих на АСГ і НАСГ має місце достовірне накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах переважно централобулярних Z_3 і проміжних Z_2 зон дольок печінки, в той час як накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза при НАСГ переважає в перипортальній Z_1 зоні, а при АСГ – в централобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зонах дольок печінки. З урахуванням даних D. D. Harrison-Findik (2010), накопичення при АСГ Fe^{3+} переважно в централобулярних гепатоцитах найбільш ймовірно відображає окислення в них Fe^{2+} заліза в Fe^{3+} залізо і з'єднання Fe^{2+} заліза з білками цитоплазми.

Нами визначено, що у хворих на НАСГ і АСГ гепатоцити гинуть шляхом стеатонекроза, апоптоза, балонного цитолізіса та фероптоза. Методами ІГХ і ЕМ нами визначено, що балонні гепатоцити, є клітинами в стані балонного цитолізісу, про що свідчить втрата ними мікрофіламентів, набухання цитозолу і спустошення їх цитоплазми через різке зменшення кількості цистерн гранулярної і гладкої ЕС, структур комплексу Гольджі, мітохондрій та експресії Hepar – маркеру мітохондріального ферменту карбаміл-фосфатсинтази-1 циклу сечовини. P. Hirsova et al. (2018) підтвердили, що ці клітини є проявом ліпотоксичності і знаходяться в стані «нежиттєздатності» (Hirsova P., Gores G. J., 2015) або незворотнього набухання (Crawford J. M., Burt A. D., 2012). Нами встановлено, що перевантаження залізом веде до фероптозу гепатоцитів: вони зменшуються і округляються, мають пікнотичне або фрагментоване ядро без ядерця, їх цитоплазма щільно заповнена тривалентним Fe^{3+} і двовалентним Fe^{2+} залізом. Сьогодні визначені молекулярні шляхи розвитку фероптозу клітин (Xie Y. al., 2016), а його ПМ прояви не описані.

При АСГ і НАСГ також виявляються вогнища некрозу дольок печінки з перифокальною лейкоцитарно-лімфоцитарною інфільтрацією; перисинусоїдальна інфільтрація CD68+ макрофагами, плазмоцитами, CD4+ і CD8+ Т-лімфоцитами; вогнищева портально-долькова інфільтрація нечисленними нейтрофілами, еозинофілами, лімфоцитами і макрофагами; та перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- $Z_{1,3}$ перисинусоїдальний фіброз печінки різного ступеню. НАСГ відрізняється від АСГ переважанням крупновезикулярного стеатозу гепатоцитів, меншим числом гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, меншою виразністю та розповсюдженістю запальної клітинної інфільтрації дольок печінки, відсутністю ізольованого перивенулярного та перибіліарного фіброзу. Але ПМ зміни в трепанобіоптатах печінки недостатні для диференційної діагностики АСГ і НАСГ, яка можлива лише за наявності необхідних анамнестичних і клініко-лабораторних даних хворих. До такого ж висновку прийшли також й інші спеціалісти (Takahashi Y., Fukusato T., 2014; Sakhuja P., 2014; Дядик О.О. і співавт., 2018).

З урахуванням лабораторних даних про дисфункцію печінки (підвищення в сироватці крові значень тимол-вероналової проби більш ніж в 2-4 рази; значень АЛТ більше ніж в 10 разів і АСТ більше ніж в 5 разів; зниження коефіцієнта де Рітіса менше 0,5), появи множинних гіперехогенних вогнищ в збільшеній печінці при УЗД у хворих на НАСГ і АСГ на момент біопсії та результатів ПМ, ЕМ, ГХ і ІГХ досліджень визначено, що S_1 - S_2 - S_3 ступінь тяжкості стеатозу печінки відзеркалює

лише ступінь розповсюдженості стеатозу гепатоцитів на момент ПМ дослідження трепанобіоптата, в той час як активність хронічного СГ, визначає комплекс ПГ ознак, таких як зростання тяжкості стеатозу печінки від S_1 до S_3 ступеня та його поширення до панлобулярного; збільшення числа гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і балонних гепатоцитів та зростання навколо них лейкоцитарного сателітоза; інтенсифікація стеатонекрозу і апоптозу гепатоцитів; зростання кількості та розширення вогнищ стеатонекроза в печінці; поява локусів імуноклітинного кілінгу гепатоцитів зі стеатозом; поширення вогнищевої та дифузної лейкоцитарно-лімфоцитарної інфільтрації дольок печінки. Аналіз повторних біопсій печінки підтвердив, що стеатоз гепатоцитів при НАСГ є транзиторним зворотнім процесом, який зменшується після усунення у пацієнтів тяжких метаболічних порушень.

Визначені також рідкі ознаки активації хронічного СГ: розвиток біліостазу у хворих на АСГ, поява стеатогранульом (частіше при АСГ), зростання інтенсивності аутофагії в гепатоцитах зі стеатозом (частіше при НАСГ), збільшення депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах (при НАСГ і АСГ), яке веде до ферроптозу гепатоцитів (частіше при АСГ). Значна активація аутофагії в стеатотично змінених гепатоцитах визначалася поширеним накопиченням в їх цитоплазмі гранул ліпофусцину, що при ЕМ представляли собою величезну кількість аутофаголізосом, в яких, за даними Т. М. Hung et al. (2015), відбувається деградація пошкоджених компонентів цитозолу. Нами також визначено, що депонування заліза може сприяти прогресуванню АСГ: по мірі збільшення від S_1 до S_3 тяжкості стеатозу печінки депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки достовірно зростає від G2 до G4 ступеня (табл. 1). За даними P. Sorrentino et al. (2010) надмірне накопичення заліза в гепатоцитах є тригерним механізмом прогресування простого стеатозу в НАСГ та в цироз печінки.

Таблиця 1 – Рівні депонування двовалентного Fe^{2+} і тривалентного Fe^{3+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки при різному ступені тяжкості стеатоза печінки у померлих хворих на АСГ

Ступінь стеатозу печінки	Тяжкий S_3 стеатоз печінки		Помірний S_2 стеатоз печінки		Легкий S_1 стеатоз печінки	
	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
Рівні депонування заліза в клітинах (в %)	29,57±0,90*	1,43±0,72*	6,27±1,51 [#]	2,67±0,78 [#]	6,33±0,67 ^{&}	0,67±0,33 ^{&}

Примітки: 1 - дані проаналізовані за допомогою t-критерію Стьюдента;

2 - достовірна різниця ($p < 0,05$) депонування Fe^{3+} між $S_1^{\&}$ і S_3^* , між $S_2^{\#}$ і S_3^* ;

3 - достовірна різниця ($p < 0,05$) депонування Fe^{2+} між $S_1^{\&}$ і $S_2^{\#}$.

ПГ, ГХ, ІГХ та ЕМ дослідження показали, що загибель гепатоцитів при НАСГ і АСГ рано активує перичелюлярний фіброгенез; у хворих розвивається або перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз, джерелами розвитку яких є нові покоління активованих перисинусоїдальних і

портальних МФБ фіброгенного імунофенотипу з коекспресією ними α SMA, фасцину, віментину і відсутністю експресії десміна. МФБ, як джерела фіброзу печінки, також визначали D.E.Kleiner, H.R.Makhlouf (2016), R. G.Wells (2014), T. Kisseleva, D. A.Brenner (2008). Нами встановлено, що при зростанні стеатозу печінки в локусах балонного цитоліза і стеатонекроза гепатоцитів збільшується число CD68+ макрофагів, що фагоцитують клітинний детрит та, за даними J. P. Pradere et al. (2013), активують фіброгенез, а також S100+ (клон A4) макрофагів, що виділяють білок S100A4, який за даними L. Chen et al. (2015) активує перисинусоїдальні МФБ.

За даними ФЦММ при прогресуванні перисинусоїдально-перичелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від легкого до важкого ступеня і до ЦП в печінці достовірно зростає площа α SMA+ МФБ, Масон+ ПКМ та колагену I, III і IV типу (статистична значущість визначена за кКУ), тому фіброз печінки різного ступеня є ПМ показником тяжкості НАСГ і АСГ. У хворих на НАСГ при прогресуванні перисинусоїдально-перичелюлярного гепатофіброзу достовірно зростає медіана площі Масон+ ПКМ, яка становить 12,05 (11,01; 13,97) % СПГЗП при F_1 фіброзі, дорівнює 17,50 (16,00; 20,65) % СПГЗП при F_2 фіброзі, складає 23,54 (19,12; 26,47) % СПГЗП при F_3 фіброзі і сягає 29,18 (26,93; 30,65) % СПГЗП при ЦП ($p \leq 0,05$). При F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки медіана площі Масон+ ПКМ зростає до 20,27 (18,49; 21,44) % СПГЗП і більш ніж на 60% перевищує нормативи пацієнтів ГУК; дорівнює 22,31 (20,13; 23,47) % СПГЗП при F_2 фіброзі, складає 23,93 (20,96; 27,70) % СПГЗП при F_3 фіброзі і сягає 29,38 (27,12; 30,89) % СПГЗП при ЦП ($p \leq 0,05$). При прогресуванні фіброзу в перисинусоїдально-перичелюлярних зонах також достовірно зростає медіана площі α SMA+ ПМФБ, яка становить 8,39 (7,96; 9,40) % СПГЗП при F_1 фіброзі, дорівнює 11,40 (10,44; 12,42) % СПГЗП при F_2 фіброзі, зростає до 18,46 (17,53; 19,22) і до 19,79 (18,20; 21,07) % СПГЗП при F_3 фіброзі і ЦП (відповідно); ($p \leq 0,05$). Прогресування портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки від F_1 до F_3 ступеня і до ЦП у хворих НАСГ відбувається за рахунок активованих α SMA+ портальних МФБ і ПМФБ Z_1 зон печінкових дольок, які займають в печінці достовірно більшу площу ($p \leq 0,05$): при легкому F_1 фіброзі медіана площі α SMA+ портальних МФБ і ПМФБ становить 10,95 (10,09; 11,81) % СПГЗП, при помірному F_2 фіброзі – підвищується до 12,22 (11,41; 14,58) % СПГЗП, при важкому F_3 фіброзі – збільшується до 19,79 (18,44; 21,05) % СПГЗП, а при ЦП досягає 20,24 (18,64; 22,48) % СПГЗП.

Визначено, що у пацієнтів ГУК в перисинусоїдальних просторах печінки колаген I типу займає невелику площу, що складає 0,87 (0,80; 0,98) % СПГЗП, колаген III типу – 1,05 (0,87; 1,40) % СПГЗП, колаген IV типу - 1,06 (0,86; 1,72;) % СПГЗП (рис.1). У хворих на НАСГ при слабкому F_1 фіброзі печінки медіана площі депонованого перисинусоїдально-перичелюлярного колагену I типу становить 10,47 (9,68; 11,09) % СПГЗП, при помірному F_2 фіброзі підвищується до 17,34 (10,88; 21,80) % СПГЗП, при важкому F_3 фіброзі складає 20,62 (20,00; 20,97) % СПГЗП, а при ЦП сягає 24,03 (23,34; 24,49) % СПГЗП ($p \leq 0,05$) (рис. 1).

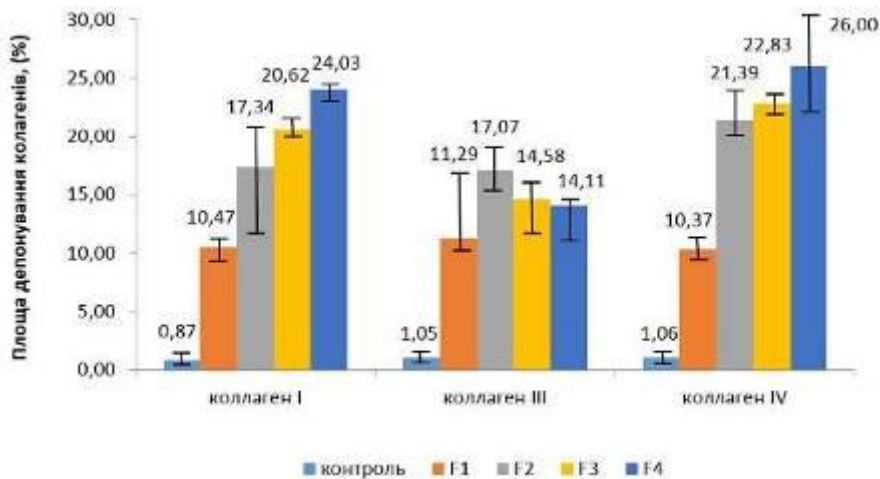


Рисунок 1 – Медіана площі депонування колагену I, III і IV типу в залежності від ступеня тяжкості перисинусоїдально-periцелюлярного фіброзу печінки при НАСГ

Медіана площі депонованого колагену III типу аналогічної локалізації при слабкому F₁ фіброзі становить 11,29 (9,59; 19,71) % СПГЗП, що більш ніж в 10 разів вище показників пацієнтів ГУК; при помірному F₂ фіброзі зростає до 17,07 (15,22; 18,58) % СПГЗП, при F₃ перисинусоїдально-periцелюлярному фіброзі знижується до 14,58 (13,57; 16,60) % СПГЗП, при ЦП складає 14,11 (13,35; 14,54) % СПГЗП, (p < 0,05) (рис. 1). Незважаючи на відносне зниження і стабілізацію депонування колагену III типу при ЦП на рівні 14,11 (13,35; 14,54) % СПГЗП, він в 14 раз вище, ніж у пацієнтів ГУК. Медіана площі депонування колагену IV типу перисинусоїдально-periцелюлярної локалізації при слабкому F₁ фіброзі складає 10,37 (9,52; 10,74) % СПГЗП, що в 10 разів вище таких параметрів пацієнтів ГУК; при помірному F₂ фіброзі вона збільшується до 21,39 (20,13; 23,35) % СПГЗП, при тяжкому F₃ фіброзі – зростає до 22,83 (22,20; 23,66) % СПГЗП, а при ЦП сягає максимуму до 26,00 (22,20; 29,92) % СПГЗП (p < 0,05) (рис. 1).

ІГХ і ФЦММ аналіз показав, що в порталних трактах печінки пацієнтів ГУК колаген I типу займає площу, що складає 8,17 (7,16; 9,52) % СПГЗП, колаген III типу – 11,90 (10,37; 13,30) % СПГЗП, колаген IV типу – 10,94 (10,72; 11,45) % СПГЗП (рис.2). У хворих на НАСГ при слабкому F₁ портално- Z₁₋₃перисинусоїдальному фіброзі печінки площа депонованого колагену I типу складає 17,39 (16,32; 18,60) % СПГЗП, що більш ніж в 2 рази вище, ніж у пацієнтів ГУК; при помірному F₂ фіброзі – дорівнює 20,53 (19,41; 21,88) % СПГЗП; при тяжкому F₃ фіброзі - складає 22,06 (20,66; 28,75) % СПГЗП; при ЦП – сягає 25,36 (24,27; 26,05) % СПГЗП (рис. 2). Зростання площі депонування колагену I типу є достовірним (p < 0,05).

При F₁ портално-Z₁₋₃перисинусоїдальному фіброзі печінки площа колагену III типу в порталних трактах і в перипортальних Z₁ перисинусоїдальних просторах складає 20,28 (19,12; 21,61) % СПГЗП і майже в 2 рази перевищує параметри пацієнтів ГУК. При подальшому зростанні фіброзу площа депонування колагену III типу достовірно сповільнюється, але на 30 % перевищує нормальні величини: при F₂ фіброзі вона становить 18,95 (17,98; 20,55) % СПГЗП, при F₃ фіброзі – дорівнює

15,62 (14,75; 16,54) % СПГЗП, а при ЦП складає 15,40 (14,54; 16,04) % СПГЗП ($p < 0,05$) (рис. 2). При зростанні портально-З1-3перисинусоїдального фіброзу печінки в цих зонах достовірно ($p < 0,05$) збільшується медіана площі депонування колагену IV типу: при слабкому F1 фіброзі вона становить 17,79 (16,72; 18,89) % СПГЗП, при помірному F2 фіброзі – збільшується до 21,94 (13,64; 23,95) % СПГЗП, при важкому F3 фіброзі - зростає до 24,73 (21,62; 29,92) % СПГЗП, а при ЦП стабілізується на рівні 24,00 (22,17; 27,79) % СПГЗП (рис. 2).

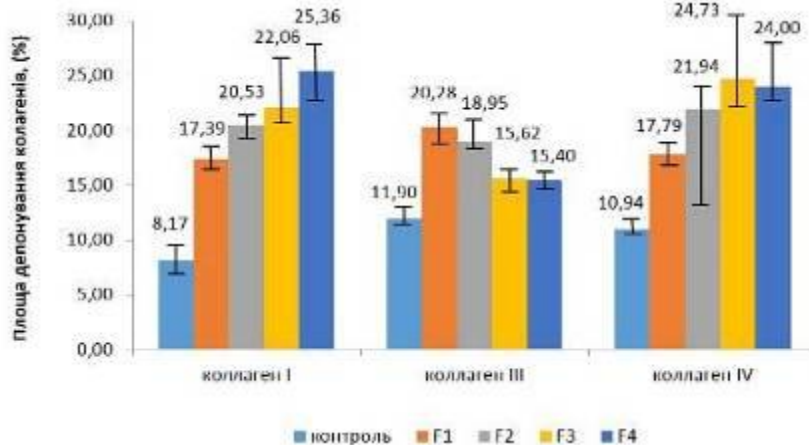


Рисунок 2 – Медіана площі депонування колагену I, III і IV типу в залежності від ступеня тяжкості портально-З1-3перисинусоїдального фіброзу печінки при НАСГ

За результатами ПГ і ІГХ аналізу в печінці хворих на НАСГ і АСГ визначені певні особливості репаративного процесу. В гепатобіоптатах пацієнтів ГУК експресія маркера клітинної проліферації Ki-67 визначається лише в 1-3 % гепатоцитів. При хронічному СГ незворотні пошкодження гепатоцитів в умовах раннього periцелюлярного фіброзу стимулюють не мітотичний розподіл гепатоцитів, а компенсаторні процеси (збільшення числа двох-трьох-шестиядерних гепатоцитів, великих одноядерних гепатоцитів з кількома ядрями, гепатоцитів з гіперхромними ядрами) та активують прогеніторні клітини печінки з розвитком слабкої, помірної і максимальної репаративної ДРП. Помірні або слабкі ПМ прояви ДРП виявлені у деяких хворих на НАСГ і АСГ при помірному F₂ і тяжкому F₃ фіброзі печінки. Максимальні прояви ДРП виявлені при цирозі печінки у 12 % хворих на НАСГ і АСГ. В активній фазі ДРП на межі печінкових дольок і портальних трактів в проекції каналців Герінга визначаються клітинні скупчення, розгалужені клітинні ланцюжки і реактивні дуктули, які містять нечисленні клітини з імунофенотипом прогеніторних клітин (c-kit CD117 +, CD34 +, CD56 +, CD44 Std./NCAM+, α -FTP +, СК7 -, СК19-, Нерар-) і клітин проміжного гепато-біліарного диференціювання (СК7 +, СК19 +, Нерар +, α -FTP +), а також поодинокі клітини біліарного (СК7 +, СК19 +) і гепатоцитарного диференціювання (Нерар + і α -FTP +). В клітинних скупченнях і ланцюжках в активній фазі ДРП має місце проліферація прогеніторних клітин (за експресією Ki-67). Ще в 2004 році T.Roskams et al. звернули увагу на здатність прогеніторних клітин печінки диференціюватися в клітини гепатоцелюлярної або гепатобіліарної лінії, але в подальшому досліджено в

основному холангіо-дуктулярний компонент ДРП (Cardinale V. et al., 2011; 2; Fabris L. et al., 2017).

ІГХ методиками нами встановлено, що активація репаративної ДРП спрямована на поповнення дефіциту гепатоцитів і біліарних структур. В активній фазі ДРП клітинні ланцюжки і дуктули з проміжними гепато-біліарними (СК7+, СК19+, Нераг+, α -FTP+) і гепатоцитоподібними СК7+ клітинами проникають вглиб печінкових дольок, де ці клітини диференціюються в гепатоцити. ІГХ аналіз показав, що гепатоцитарному диференціюванню прогеніторних клітин сприяє наявність ламініну в їх нішах та експресія ламініну ПЗК навколо клітинних ланцюжків і реактивних дуктул в дольках печінки. L.K. Kanninen et al. (2016) встановили, що ламінін підтримує гепатоцитарну спеціалізацію в культурі стовбурових клітин людини. За даними G. Carpio et al. (2013) прогеніторні клітини диференціюються в гепатоцити при зниженні Notch сигналів в прогеніторних клітинах і активації секреції Wnt3a макрофагами печінки. Важливим проявом ДРП при цирозі печінки є утворення нових псевдодольок, які містять на периферії нечисленні проміжні СК-7+ гепатоцити і не мають централобулярних вен та упорядкованих синусоїдів. Тільки коли площа дольок і псевдодольок при тяжкому мікронодулярному ЦП стає рівною або меншою площі прилеглого до них фіброзу, має місце зростання числа Ki-67 + гепатоцитів в дольках і псевдодольках та числа Ki-67 + клітин в портально-долькових дуктулах і ланцюжках. При ЦП реактивні дуктули і клітинні ланцюжки визначаються також в фіброзно змінених портальних трактах, субкапсулярній тканини і в фіброзних септах, в яких вони формують порожні дуктули без жовчі.

Мікронодулярний ЦП перисинусоїдально-перичелюлярного або портально-Z₁-зперисинусоїдального типу ускладнює НАСГ і АСГ у 10,48 % хворих. Наслідками прогресування ЦП у хворих на НАСГ і АСГ є надмірне накопичення порожніх дуктул в портальних трактах, асоційоване з надмірним портальним фіброзом і з мостоподібним портально-портальним фіброзом, а також зростання вкрай тяжкого перичелюлярного фіброзу, який ізолює гепатоцити та сприяє їх стеатонекрозу.

Несприятливим наслідком ЦП при НАСГ і АСГ є ГЦК печінки, яка була виявлена у 1,80 % хворих на НАСГ і АСГ та у 0,84 % померлих від ЦП зі стеатозом гепатоцитів неуточненого генезу. Ці цифри менше, ніж визначений іншими авторами ризик виникнення ГЦК при НАСГ (Reeves H. L. et al., 2016) та при хронічних вірусних гепатитах (Гаврилюк А.О., 2015). Нами встановлено, що ГЦК при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ має класичні гістоархітектонічні патерни: трабекулярний, солідно-клітинний, ацинарний, фіброзний; найбільш поширеними є трабекулярний, ацинарний і солідно-клітинний патерни. За результатами ІГХ досліджень в ГЦК у хворих на НАСГ і АСГ виявляється інтенсивна цитоплазматична гранулярна експресія Нераг в 45-100 % пухлинних клітин та менш інтенсивна експресія α -фетопротейну у 20-35 % клітин.

ВИСНОВКИ

Незважаючи на широку розповсюдженість НАСГ і АСГ на сьогодні недостатньо розроблені ПМ критерії їх диференційної діагностики та несприятливого перебігу в біоптатах печінки. В дисертації вирішується актуальне питання патологічної анатомії щодо ПМ порівняльних характеристик НАСГ і АСГ, показників їх активності і тяжкості, репаративних процесів і несприятливих наслідків для оптимізації біопсійної діагностики цих хвороб.

1. За даними ВЕР-ХМС аналізу при тяжкому S_3 стеатозі у померлих хворих на НАСГ в печінці значно підвищений вміст ліпотоксичних стеаринової і пальмітинової кислот та холестерину, що позитивно корелює з підвищеним рівнем холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові за життя цих хворих. Між ступенем тяжкості стеатозу печінки (y) і підвищеним рівнем пальмітинової (x_1) та стеаринової (x_2) кислот в печінці має місце достовірною залежність ($y = 0,83x_1$; $R^2 = 0,33$ і $y = 1,13x_2$; $R^2 = 0,37$). НАСГ відрізняється від АСГ переважанням крупновезикулярного стеатозу гепатоцитів, меншим числом гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і менш виразною запальною клітинною інфільтрацією печінки, та відсутністю локального перивенулярного і ізольованого перибіліарного фіброзу.

2. Гепатоцити при НАСГ і АСГ гинуть шляхом стеатонекрозу, балонного цитолізу, апоптозу і фероптозу. При балонному цитолізісі в гепатоцитах визначається набухання цитозолу, втрата мікрофіламентів, цистерн гранулярної і гладкої ЕС, структур комплексу Гольджі, а також мітохондрій та мітохондріальної карбаміл-фосфатсинтази-1 циклу сечовини. При зростанні стеатозу печінки від S_1 до S_3 ступеня в макрофагах і гепатоцитах печінки хворих на АСГ достовірно зростає депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза від легкого G2 до важкого G4 ступеня; надмірне накопичення заліза веде до фероптозу гепатоцитів.

3. Активність НАСГ і АСГ визначає комплекс мікроскопічних ознак (S_1 - S_2 - S_3 ступінь стеатозу печінки; значна кількість гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; інтенсифікація стеатонекрозу, балонного цитолізу, апоптозу і фероптозу гепатоцитів; збільшення кількості та розширення вогнищ стеатонекрозу в печінці; зростання імунітарної та запально-клітинної інфільтрації печінки), в той час як показником тяжкості хвороби є перисинусоїдально-перичелюлярний і портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки, який прогресує від легкого F_1 до важкого F_3 ступеню і до цирозу печінки.

4. Основними джерелами перисинусоїдально-перичелюлярного та портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки є нові покоління активованих перисинусоїдальних та портальних МФБ з імунофенотипом: α SMA+, фасцин+, виментин+, десмін-. Ранній перичелюлярний фіброз навколо пошкоджених гепатоцитів активують перисинусоїдальні МФБ, в ньому важливу роль відіграють CD68+ і S100(A4)+ макрофаги; відстрочений портальний і мостоподібний портально-портальний фіброз обумовлений активацією перидуктальних МФБ при ДРП.

5. При прогресуванні гепатофіброзу від легкого F_1 до важкого F_3 ступеня та до цирозу печінки в перисинусоїдально-перичелюлярних зонах достовірно зростають площі α SMA+ перисинусоїдальних МФБ ($p \leq 0,05$), Массон+ ПКМ ($p \leq 0,05$), колагену I і IV типу (в 20 разів) та колагену III типу (в 10 разів); в портально- Z_{1-3} перисинусоїдальних зонах печінки достовірно зростають площі α SMA+ портальних МФБ і Z_1 перисинусоїдальних МФБ ($p \leq 0,05$), Массон+ ПКМ ($p \leq 0,05$), колагену III типу (на 30 %), колагену I і IV типу (більш ніж в 2 рази). Статистична значущість визначалась за критерієм Краскела-Уоліса.

6. Загибель гепатоцитів в умовах перичелюлярного фіброзу тривалий час компенсується пристосувальними змінами в інших гепатоцитах. На стадії $F_2 - F_3$ фіброза та цироза печінки активується репаративний комплекс прогеніторних клітин печінки з розвитком дуктулярної реакції, в активній фазі якої в проекції каналців Герінга печінки визначаються клітинні скупчення, ланцюжки і реактивні дуктули, що містять клітини з імунофенотипом прогеніторних клітин печінки, клітини проміжного гепато-біліарного, біліарного і гепатоцитарного диференціювання. Результатом активації прогеніторних клітин печінки є поповнення популяції гепатоцитів через проміжні гепато-біліарні і СК7+ гепатоцитоподібні клітини за умов появи ламініну в позаклітинному матриксі, а також утворення псевдодольок та накопичення дуктул без жовчі в портальних трактах при цирозі печінки.

7. Ускладненнями НАСГ і АСГ є мікронодулярний перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний цироз печінки, визначений у 10,48% хворих, а також гепатоцелюлярна карцинома печінки з солідноклітинними, трабекулярними й ацинарними патернами, діагностована у 0,57 % випадків. При прогресуванні мікронодулярного цирозу печінки через накопичення порожніх дуктул зростає портальний і мостоподібний портально-портальний фіброз, а також зростає тяжкий перичелюлярний фіброз в псевдодольках, який ізолює гепатоцити та сприяє їх стеатонекрозу.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. В зрізах трепанобіоптатів печінки, забарвлених гематоксиліном та еозином, за Ван Гізон і Массон-триколом, можуть бути визначені активність і тяжкість перебігу НАСГ і АСГ, репаративні процеси в печінці, а також цироз або рак печінки.

2. Для виявлення репаративних процесів в печінці доцільним є ІГХ визначення СК7+ гепатоцитоподібних клітин, що свідчать про відновлення пулу гепатоцитів; для визначення інтенсивності ДРП доцільним є виявлення СК7+ дуктул в портальних трактах і печінкових дольках.

3. Для оцінки ступеню тяжкості перисинусоїдально-перичелюлярного і портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу та прогресування мікронодулярного ЦП у хворих на НАСГ і АСГ доцільним є забарвлення зрізів методом Массон-триколом, а також ІГХ визначення α SMA+ МФБ та депонування колагену I, III і IV типу.

4. Патоморфологічні зміни в трепанобіоптатах печінки при НАСГ і АСГ є недостатніми для доказової диференційної діагностики цих хвороб, яка можлива тільки за наявності переконливих клініко-лабораторних даних хворих.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Туманский В. А., Фень С. В. Особенности депонирования разновалентного железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите. *Патологія*. 2015. Т. 35, № 3. С. 41–48. (Дисертант виконав набір матеріалу, ГХ дослідження та статистичну обробку результатів).
2. Tumanskiy V. A., Fen' S. V., Varynskiy B. O. Cholesterol, stearic and palmitic acids in the liver in nonalcoholic steatohepatitis of different severity according to the data of highly effective liquid chromatography-mass spectrometry. *Патологія*. 2016. Т. 38, № 3. С. 35–42. (Дисертант виконав набір матеріалу, мікроскопічні і ВЕР-ХМС дослідження та статистичну обробку результатів).
3. Фень С. В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом. *Морфологія*. 2017. Т. 10, № 3. С. 29–37.
4. Туманский В. А., Фень С. В. Патоморфология фиброза печени в трепанобиоптатах больных стеатогепатитом: основные типы, источники развития, особенности прогрессирования. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 3 (41). С. 244–256. (Дисертант виконав набір матеріалу, ІГХ, ЕМ і МФМ дослідження та статистичну обробку результатів).
5. Туманский В. А., Фень С. В., Туманская Л. М. Патоморфологический анализ неблагоприятных последствий неалкогольного и алкогольного стеатогепатита. *Морфологія*. 2017. Т. 11, № 4. С. 59–74. (Дисертант виконав ГХ, ЕМ і ІГХ дослідження та аналіз біосійно-секційного матеріалу хворих на НАСГ і АСГ).
6. Туманский В. А., Фень С. В. Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 1 (42). С. 18–28. (Дисертант виконав ІГХ дослідження та аналіз їх результатів).
7. Туманский В. А., Фень С. В., Туманская Л. М. Алкогольный и неалкогольный стеатогепатит: имеются ли дифференциальные патоморфологические различия. *Вітчизняна та світова медицина в умовах сучасності* : зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. (м. Дніпро, 12-13 січ. 2018 р.). Дніпро : Організація наукових медичних досліджень «Salutem», 2018. С. 86–90. (Дисертант виконав аналіз біосійно-секційного матеріалу хворих на НАСГ і АСГ).
8. Фень С. В. Патоморфологическая оценка степени тяжести стеатоза и фиброза печени при алкогольном стеатогепатите. *Сучасні аспекти медицини і фармації - 2013* : зб. тез Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю. Запоріжжя : ЗДМУ, 2013. С. 169-170.
9. Фень С. В. Патоморфологическая характеристика стеатогепатита по результатам судебно-микроскопических исследований. *Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я* : зб. тез доп. Всеукр. науко.-практ. конф. молодих вчених та студентів. Запоріжжя : ЗДМУ, 2015. С. 38.

10. Туманский В. А., Фень С. В. Патоморфологические особенности депонирования разновалентного железа в печени при неалкогольном стеатогепатите. *Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки* : зб. тез наук. робіт учасників міжнар. наук.-практ. конф. Львів, 2016. С. 106–108. (Дисертант виконав ГХ дослідження на їх аналіз).

11. Фень С. В. Морфологические особенности депонирования железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном стеатогепатите. *Сучасні аспекти медицини і фармації - 2016* : зб. тез Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвяч. Дню науки. Запоріжжя : ЗДМУ, 2016. С. 48-49.

12. Фень С. В. Выявление стеариновой и пальмитиновой кислот в печени при неалкогольном стеатогепатите по данным высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. *Сучасні аспекти медицини і фармації - 2017* : зб. тез Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвяч. Дню науки. Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. С. 42–43.

13. Туманский В. А., Фень С. В. Характеристика содержания холестерина в печени по данным высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии и уровня холестерина в плазме крови при неалкогольном стеатогепатите разной степени тяжести. *Актуальні проблеми сучасної патологічної анатомії* : матеріали наук.-практ. конф. К.: НМУ ім. О.О. Богомольця, 2017. С. 82–84. (Дисертант виконав ВЕР-ХМС дослідження та аналіз їх результатів).

14. Фень С. В. Динамика депонирования коллагенов I, III и IV типа при прогрессировании перисинусоидально-перицеллюлярного фиброза печени у больных неалкогольным и алкогольным стеатогепатитом. *Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення* : зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. (м. Дніпро, 13-14 жовт. 2017 р.). Дніпро, 2017. С. 71–72.

15. Фень С. В. Патоморфологические маркеры активности и неблагоприятных последствий неалкогольного стеатогепатита. *Актуальні питання сучасної медицини та фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ)* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Запоріжжя, 18-20 квіт., 30 трав. 2018 р.). Запоріжжя, 2018. С. 130–131.

16. Туманский В. А., Фень С. В., Туманская Л. М. Особенности регенерации и фиброза печени в динамике развития неалкогольного и алкогольного стеатогепатита. *Перспективи розвитку сучасної патології* : матеріали X Конгресу Асоціації патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вер. 2018 р.). Івано-Франківськ : Сімфонія форте, 2018. С. 198–199. (Дисертант виконав ІГХ дослідження біосійно-секційного матеріалу хворих на НАСГ і АСГ та аналіз їх результатів).

17. Туманський В. О., Фень С. В., Туманська Л. М. Хронічний неалкогольний і алкогольний стеатогепатит: патоморфологія репаративних процесів в печінці та їх наслідків. *Теорія та практика сучасної морфології* : матеріали 2-ї Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Дніпро, 10-12 жовт. 2018 р.). Дніпро, 2018. С. 162–164. (Дисертант виконав ІГХ дослідження біосійно-секційного матеріалу хворих на НАСГ і АСГ та аналіз їх результатів).

18. Пат. на корисну модель 108321 Україна, МПК⁷(2016.01) G01N21/00, G01N1/00. Спосіб визначення двовалентного заліза в біопсійному матеріалі / Туманський В. О., Фень С. В. ; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. № u201600602 ; заявл. 25.01.16 ; опубл. 11.07.16, Бюл. № 13. *(Дисертант виконав набір матеріалу, мікроскопічні і ГХ дослідження та статистичну обробку результатів).*

19. Пат. на корисну модель 112148 Україна, МПК⁷(2016.01) G01N21/00, A61B1/00. Спосіб визначення ступеня стеатоза в біоптатах печінки / Туманський В. О., Фень С. В. ; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. № u201604674 ; заявл. 26.04.16 ; опубл. 12.12.16, Бюл. № 23. *(Дисертант виконав набір матеріалу, мікроскопічні і ГХ дослідження та статистичну обробку результатів).*

20. Пат. на винахід 116968 Україна, МПК⁷(2006.01) G01N 30/02, G01N 30/00, G01N 30/04, G01N 30/72, G01N 33/483. Спосіб хромато-мас-спектрометричного визначення холестеролу, стеаринової та пальмітинової кислот в біологічному матеріалі / Туманський В. О., Варинський Б. О, Фень С. В. ; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. № u201610030 ; заявл. 03.10.16 ; опубл. 10.08.17, Бюл. № 15. *(Дисертант виконав набір матеріалу, мікроскопічні і ВЕХР-МС дослідження та статистичну обробку результатів).*

АНОТАЦІЯ

Фень С.В. Хронічний стеатогепатит: патоморфологічна характеристика перебігу та несприятливих наслідків. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2019.

У дисертації не встановлено суттєвих ПМ відмінностей між АСГ і НАСГ. Активність НАСГ і АСГ визначає зростання тяжкості стеатозу печінки; збільшення кількості балонних гепатоцитів і гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; інтенсифікація стеатонекрозу і апоптозу гепатоцитів; зростання кількості та розширення вогнищ стеатонекрозу в печінці, а також імуноцитарної та запально-клітинної інфільтрації печінки, в той час як показником тяжкості хвороби є перисинусоїдально-перичелюлярний і портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки, джерелами якого є перисинусоїдальні і портальні α SMA+, фасцин+, виментин+, десмін- МФБ. При зростанні стеатозу печінки в макрофагах і гепатоцитах хворих на АСГ достовірно зростає депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза. При тяжкому S_3 стеатозі у померлих хворих на НАСГ в печінці значно підвищений вміст ліпотоксичних стеаринової і пальмітинової кислот та холестерину. Гепатоцити при НАСГ і АСГ гинуть шляхом стеатонекрозу, балонного цитолізу, апоптозу і ферроптозу, загибель гепатоцитів рано активує перичелюлярний фіброгенез. При прогресуванні гепатофіброзу в печінці достовірно зростає площа α SMA+ перисинусоїдальних МФБ, площа Масон+ ПКМ, площа депонування колагену I III і IV типу. На стадії $F_2 - F_3$ фіброза та цироза печінки

активується репаративний комплекс прогеніторних клітин печінки з розвитком дуктулярної репаративної реакції, в результаті яких поповнюється популяція гепатоцитів через проміжні гепато-біліарні і гепатоцитоподібні клітини, чому сприяє поява позаклітинного ламініну, а також утворюються псевдодольки та накопичуються дуктули без жовчі в портальних трактах при цирозі печінки. У 10,48% хворих на НАСГ і АСГ розвивається мікронодулярний перисинусоїдально-періцелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний цироз печінки, у 0,57 % розвивається гепатоцелюлярна карцинома печінки.

Ключові слова: неалкогольний стеатогепатит, алкогольний стеатогепатит, дуктулярна реакція, фіброз печінки, цироз печінки, рак печінки.

АННОТАЦІЯ

Фень С.В. Хронический стеатогепатит: патоморфологическая характеристика течения и неблагоприятных последствий. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия. – Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2019.

В диссертации не установлено существенных ПМ отличий между АСГ и НАСГ. Активность НАСГ и АСГ определяет возрастание тяжести стеатоза печени; увеличение количества балонных гепатоцитов и гепатоцитов с тельцами Малори-Денка; интенсификация стеатонекроза и апоптоза гепатоцитов; возрастание числа и расширение очагов стеатонекроза в печени, а также иммуноцитарной и воспалительно-клеточной инфильтрации печени, в то время как показателем тяжести болезни является перисинусоидально-періцелюлярний и портально- Z_{1-3} перисинусоидальний фиброз печени, источниками которых являются перисинусоидальные и портальные α SMA+, фасцин+, виментин+, десмин- МФБ. При возрастании стеатоза печени в макрофагах и гепатоцитах больных АСГ достоверно возрастает депонирование трехвалентного Fe^{3+} и двухвалентного Fe^{2+} железа. При тяжелом S_3 стеатозе у умерших больных НАСГ в печени значительно повышено содержание липотоксических стеариновой и пальмитиновой кислот и холестерина. Гепатоциты при НАСГ и АСГ погибают путем стеатонекроза, балонного цитолизиса, апоптоза и ферроптоза, гибель гепатоцитов рано активизирует періцелюлярний фиброгенез. При прогрессировании фиброза в печени достоверно возрастает площадь α SMA+ перисинусоидальных МФБ, площадь Массон+ внеклеточного матрикса и депонирования коллагена I, III и IV типа. На стадии $F_2 - F_3$ фиброза и цирроза печени активизируется репаративный комплекс прогеніторних клеток печени с развитием дуктулярной репаративной реакции, в результате чего пополняется популяция гепатоцитов через промежуточные гепато-билиарные и гепатоцитоподобные клетки, чему способствует появление внеклеточного ламинина, а также образуются псевдодольки и накапливаются дуктулы без желчи в портальных трактах при циррозе печени. У 10,48% больных НАСГ и АСГ развивается микронодулярный перисинусоидально-

перипортальный или портально-Z₁₋₃ перисинусоидальный цирроз печени, у 0,57 % больных развивается гепатоцеллюлярная карцинома печени.

Ключевые слова: неалкогольный стеатогепатит, алкогольный стеатогепатит, дуктулярная реакция, фиброз печени, цирроз печени, рак печени.

ANNOTATION

Fen' S. Chronic steatohepatitis: pathomorphological characteristics of the course and adverse effects. – As manuscript.

Candidate's of Medical Science dissertation in specialty 14.03.02 – pathologic anatomy. – Zaporizhia State Medical University of the Health Care Ministry of Ukraine, Zaporizhia, 2019.

In dissertation didn't establish significant pathomorphological differences between the ASH and NASH. The activity of NASH and ASH determines the increase in the severity of liver steatosis; an increase in the number of balloon hepatocytes and hepatocytes with Malori-Denk bodies; intensification of steatonecrosis and hepatocyte apoptosis; an increase in the number and expansion of foci of steatonecrosis in the liver, as well as immunocyte and inflammatory cell infiltration of the liver, while an indicator of the severity of the disease is perisinusoidal-pericellular and portal-Z₁₋₃perisinusoidal fibrosis of the liver, sources of which are perisinusoidal and portal α SMA+, vimentin +, desmin- MFB. With an increase in liver steatosis in macrophages and hepatocytes in patients with ASH, the deposition of trivalent Fe³⁺ and divalent Fe²⁺ iron increases significantly. In severe S₃ steatosis, the content of lipotoxic stearic and palmitic acids and cholesterol is significantly increased in patients with NASH in the liver. Hepatocytes in NASH and ASH die by steatonecrosis, balloon cytolysis, apoptosis and ferroptosis, the death of hepatocytes early activates pericellular fibrogenesis. With the progression of fibrosis in the liver, the area of α SMA + perisinusoidal MFB, the area of Masson + extracellular matrix and deposition of type I, III and IV collagen significantly increases. At stage F2 - F3 of liver fibrosis and cirrhosis, the reparative complex of progenitor liver cells is activated with the development of a ductular reparative reaction, as a result of which the population of hepatocytes is replenished through intermediate hepatobiliary and hepatocyte-like cells, which is facilitated by the appearance of extracellular laminin, as well as pseudolobules are formed and ductules without bile accumulate in the portal tracts in case of liver cirrhosis. In 10.48% of patients with NASH and ASH develop micronodular perisinusoidal-pericellular or portal-Z₁₋₃perisinusoidal cirrhosis, 0,57% of patients develop hepatocellular carcinoma of the liver with solid cell, trabecular and acinar patterns. With the progression of micronodular cirrhosis due to the accumulation of empty ductules, portal and bridge-like portal-portal fibrosis increases, and severe pericellular fibrosis increases in pseudolobules, which isolates hepatocytes and contributes to their steatonecrosis.

Key words: non-alcoholic steatohepatitis, alcoholic steatohepatitis, ductular reaction, liver fibrosis, liver cirrhosis, liver cancer.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АСГ	– алкогольний стеатогепатит
ВЕР-ХМС	– вискоєфективний рідинний хромато-мас-спектрометричний аналіз
ГХ	– гістохімічне (дослідження)
ГЦК	– гепатоцелюлярна карцинома
ДРП	– дуктулярна реакція печінки
ЕМ	– електронно-мікроскопічне (дослідження)
ЕС	–ендоплазматична сітка
ІГХ	– імуногістохімічне (дослідження)
кКУ	– критерій Крассела-Уоліса
МФМ	– морфометричне (дослідження)
МФБ	– міофібробласт
НАСГ	– неалкогольний стеатогепатит
ПГ	– патогістологічне (дослідження)
ПЗК	– перисинусоїдальна зірчаста клітина
ПКМ	– позаклітинний матрикс
ПМ	– патоморфологічне (дослідження)
ПМФБ	– перисинусоїдальний міофібробласт
СГ	– стеатогепатит
СПГЗП	– стандартизована площа гістологічного зрізу печінки
S ₁ , S ₂ , S ₃	– ступінь стеатозу печінки
ФЦММ	– фотоцифрова морфометрія
F ₁ , F ₂ , F ₃	– ступінь фіброзу печінки
Fe ²⁺ , Fe ³⁺	– двовалентне, тривалентне залізо
ЦП	– цироз печінки
Z ₁ , Z ₂ , Z ₃	– зони печінкової дольки
αSMA	– α гладенькомязовий актин

Підписано до друку 13.02.2019. Гарнітура Times New Roman
Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,9
Наклад – 100 прим. Замовлення № 8185.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.