

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

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ФЕНЬ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК: 616.36-003.826-002-036.8-091.8

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.03.02 – патологічна анатомія

22 Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ С.В. Фень

Науковий керівник – **Туманський Валерій Олексійович**, заслужений діяч
науки і техніки України, доктор медичних наук, професор

Запоріжжя – 2018

АНОТАЦІЯ

Фень С.В. Хронічний стеатогепатит: патоморфологічна характеристика перебігу та несприятливих наслідків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 «Патологічна анатомія» (22 Охорона здоров'я). – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2018.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2018.

У дисертації для використання в біопсійній діагностиці визначені патоморфологічні (ПМ) параметри активності неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) і алкогольного стеатогепатиту (АСГ), особливості репаративних процесів в печінці та несприятливих наслідків цих хвороб.

За результатами гістологічних, гістохімічних (ГХ), імуногістохімічних (ІГХ) досліджень біопсійно-секційного матеріалу встановлено, що зміни в печінці хворих на АСГ і НАСГ мають несуттєві ПМ відмінності. В перипортальних Z_1 і в проміжних Z_2 зонах дольок печінки у хворих на АСГ переважає мікроезикалярний стеатоз гепатоцитів, у хворих на НАСГ - макроезикалярний стеатоз гепатоцитів; при цьому може визначатись змішаний мікро-макроезикалярний стеатоз. За даними електронної мікроскопії (ЕМ) ліпідні краплі в гепатоцитах 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. ГХ і морфометричними (МФМ) методами визначено, що у хворих на АСГ і НАСГ

в гепатоцитах і макрофагах печінки має місце накопичення тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза різного ступеня. Патогномонічними для АСГ і НАСГ змінами, крім стеатозу гепатоцитів, є наявність в печінці різної кількості балонних гепатоцитів, гепатоцитів в стані стеатонекрозу, апоптозу та фероптозу; гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; вогнищ некрозу дольок печінки з перифокальною інфільтрацією лейкоцитами, лімфоцитами, CD68+ макрофагами; перисинусоїдальної інфільтрації поодинокими CD68+ макрофагами, плазмоцитами, CD4+ і CD8+ Т-лімфоцитами; вогнищевої портально-долькової інфільтрації нечисленними нейтрофілами, еозинофілами, лімфоцитами і макрофагами, а також перисинусоїдально-перичелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки.

З урахуванням клініко-лабораторних даних про дисфункцію печінки встановлено, що активність НАСГ і АСГ визначає комплекс мікроскопічних ознак (зростання тяжкості стеатозу печінки від S_1 до S_3 ступеня; 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, що прогресує через легку F_1 , помірну F_2 і важку F_3 ступінь до цирозу печінки (ЦП). Рідкими ознаками активації хронічного стеатогепатиту (СГ) може бути зростання депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах, розвиток холеостазу і поява стеатогранульом (частіше при АСГ), зростання аутофагії в гепатоцитах зі стеатозом (частіше при НАСГ).

ГХ, ІГХ та ЕМ дослідження показали, що у хворих на НАСГ і АСГ основними джерелами фіброзу печінки є нові покоління активованих перисинусоїдальних міофібробластів (ПМФБ) та портальних фібробластів (ПФБ) з імунофенотипом: α SMA+, фасцин+, виментин+, десмін-. У феномені

раннього перицелюлярного фіброзу печінки важливу роль відіграють CD68+ і S100+ макрофаги, які активують ПМФБ в локусах стеатонекрозу, балонного лізису і апоптозу гепатоцитів. При прогресуванні перисинусоїдально-перицелюлярного фіброзу від легкого F₁, помірного F₂ до важкого F₃ ступеня і ЦП в зонах фіброзу достовірно зростає площа Масон+ молекулярно-волокнутого матриксу (критерій Крассела-Уоліса Н = 88,70 p < 0,05) і площа αSMA+ ПМФБ (критерій Крассела-Уоліса Н = 45,12; p < 0,05), а також зростає площа депонування колагену I і IV типу (в 20 разів) та колагену III типу (в 10 разів). При зростанні тяжкості портально-Z₁₋₃перисинусоїдального фіброзу від легкого F₁ ступеня до ЦП в зонах фіброзу достовірно зростає площа Масон+ молекулярно-волокнутого матриксу (критерій Крассела-Уоліса Н = 76,56; p < 0,05) та площа αSMA+ ПМФБ і Z₁-ПМФБ (критерій Крассела-Уолліса Н = 43,18; p < 0,05), а також зростає площа депонування колагену III типу (на 30 %) та колагену I і IV типу (більш ніж в 2 рази).

Встановлено, що у хворих на НАСГ і АСГ загибель пошкоджених гепатоцитів тривалий час компенсується появою двох-трьох-шестиядерних гепатоцитів, великих одноядерних гепатоцитів з кількома ядерцями та гепатоцитів з крупними гіперхромними ядрами. На стадії F₂ помірного-важкого F₃ фіброза та ЦП активується репаративний комплекс прогеніторних клітин печінки з розвитком дуктулярної реакції. В її активній фазі, при мікроскопії, в проекції каналців Герінга печінки визначаються клітинні скупчення і ланцюжки та дрібні дуктули, що містять клітини з імунофенотипом прогеніторних клітин печінки (c-kit CD117+, CD34 +, CD56 +, CD44 Std./NCAM+, α-FTP +, CK7 -, CK19-, Нераг-), клітини проміжного гепато-біліарного диференціювання (CK7+, CK19+, Нераг+, α-FTP+), а також клітини біліарного (CK7+, CK19+) і гепатоцитарного диференціювання (Нераг+ і α-FTP+). Активація прогеніторних клітин печінки призводить до поповнення популяції гепатоцитів через проміжні гепато-біліарні і CK7+ гепатоцитоподібні клітини, чому сприяє поява в міжклітинному матриксі

ламiніну, та до новоутворення печiнкових псевдодольок при ЦП, а також до накопичення дуктул без жовчi в портальних трактах з фiброзом.

Несприятливими ускладненнями НАСГ i АСГ є мiкронодулярний ЦП перисинусoidalно-перичелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусoidalного типу, зареєстрований у 10,48 % випадкiв, а також гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК) печiнки з солiдноклiтинними, трабекулярними й ацинарними патернами, дiагностована у 0,57 % випадкiв.

Наукова новизна. Вперше методом високоефективної рiдинної хромато-мас-спектрометрiї встановлено, що при тяжкому S_3 стеатогепатитi у померлих хворих на НАСГ в печiнцi значно підвищений вміст ліпотоксичних стеаринової i пальмiтинової кислот та холестерину, який позитивно корелює з підвищеним рiвнем загального холестерину i ліпопротеїнів високої щiльностi в плазмі кровi та свiдчить про тяжке спотворення лiпiдного обміну в гепатоцитах. Уточненi данi щодо основних мiкроскопiчних видiв загибелi гепатоцитiв (стеатонекрозу, апоптозу, балонного цитолiзису, фероптозу) у хворих на НАСГ i АСГ. Отриманi новi ЕМ i ПГХ данi стосовно того, що балоннi гепатоцити є клiтинами, якi руйнуються шляхом балонного цитолiзису. Встановлено, що надмірне накопичення залiза веде до фероптозу гепатоцитiв: вони втрачають типову форму, зменшуються i закругляються, мають пікнотичне ядро i перенасичену залiзом цитоплазму. Отриманi новi данi стосовно особливостей депонування тривалентного Fe^{3+} i двовалентного Fe^{2+} залiза в гепатоцитах i макрофагах печiнки у хворих на НАСГ i АСГ. Уточненi данi стосовно молекулярного складу позаклітинного матриксу та джерел розвитку основних рiзновидiв фiброзу печiнки, а також про динамiку депонування рiзних типiв колагену при їх прогресуваннi. Розширенi науковi поняття щодо патоморфологiчних показникiв активностi i тяжкостi СГ у хворих на НАСГ i АСГ. Подальшого розвитку набуло уявлення про особливостi репаративних процесiв в печiнцi при НАСГ i АСГ. Доказано, що вiдновлення популяцiї гепатоцитiв вiдбувається переважно через активацiю

репаративного комплексу прогеніторних клітин печінки та диференціювання в гепатоцити гепатобіліарних і гепатоцитоподібних СК7+ клітин, якому сприяє поява ламініну в позаклітинному молекулярному матриксі. Встановлено, що при репарації СГ мають місце два фіброзні шляхи: ранній перицелюлярний фіброз, обумовлений активацією ПМФБ, а також відстрочений портальний і мостоподібний портально-портальний фіброз через активацію ПФБ при дуктулярній реакції. Отримані нові дані щодо активної ролі комплексу прогеніторних клітин в формуванні псевдодольок при цирозі печінки.

Практичне значення. На підставі гістологічних, ГХ, ІГХ і ЕМ досліджень встановлена відсутність суттєвих ПМФ відмінностей між АСГ і НАСГ, достатніх для їх доказової диференційної діагностики в трепанобіоптатах печінки без наявності відповідних клініко-лабораторних даних хворих. НАСГ відрізняється від АСГ переважанням макровезикулярного 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 ПМФ ознаки активації НАСГ і АСГ, а також відновлення гепатоцитів та біліарних дуктул при цирозі печінки. Визначено, що ПМ особливостями прогресування мікронодулярного цирозу печінки у хворих на НАСГ і АСГ є надмірне накопичення порожніх дуктул в портальних трактах, асоційоване із зростанням портального і мостоподібного портально-портального фіброзу, а також розвиток вкрай тяжкого перицелюлярного фіброзу, який ізольовує гепатоцити та веде до їх стеатонекрозу. Описані найбільш характерні патерни ГЦК при НАСГ і АСГ.

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

ANNOTATION

Fen' S. Chronic steatohepatitis: pathomorphological characteristics of the course and adverse effects. – Qualifying scientific work as a manuscript copyright.

Thesis for a candidate's degree (PhD) in specialty 14.03.02 «Pathological anatomy» (22 – The Ministry of Health). – Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2018.

Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2018.

The pathomorphological (PM) parameters of the activity of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and alcoholic steatohepatitis (ASH), peculiarities of reparative processes in the liver and the adverse effects of these diseases are determined in the dissertation for use in biopsy diagnostics.

According to the results of histological, histochemical (HC), immunohistochemical (IHC) studies of biopsy-sectional material, it has been established that there are minor PM differences in the liver of patients with ASH and NASH. In periportal Z_1 and in the intermediate Z_2 zones of liver lobes in patients with ASH predominates microvesicular steatosis of hepatocytes, in patients with NASH - macrovesicular steatosis of hepatocytes; In both cases, mixed micro-macrovesicular steatosis may be detected. According to electronic microscopy (EM), lipid drops in hepatocytes have a homogeneous matrix of low-density triglycerides and a thin layer of proteins on the outer surface with multiple small caveols that provide transport of lipids from drop to cytosol and vice versa. In the cytoplasm of hepatocytes there are giant megamitochondria with short crystals and central electron-dense, parallel paracrystalline structures. HC and morphometric (MFM) methods have determined that in patients with ASH and NASH in hepatocytes and macrophages of the liver, the accumulation of trivalent Fe^{3+} iron and divalent Fe^{2+} iron of varying degrees is determined. Pathognomonic changes for ASH and NASH, except for steatosis of hepatocytes, are the presence

in the liver of different amounts of balloon hepatocytes, hepatocytes in the state of steatonecrosis, apoptosis and ferroptosis; hepatocytes with the bodies of Malory-Denk; foci of liver necrosis with perifocal infiltration of leukocytes, lymphocytes, macrophages; moderate perisinusoidal infiltration with CD68+ macrophages, single plasmacytes, CD4+ and CD8+ T-lymphocytes; focal portal-limb infiltration with a few neutrophils, eosinophils, lymphocytes and macrophages, as well as perisinusoidal-pericellular or portal-Z₁₋₃perisinusoidal fibrosis of the liver.

Taking into account the clinical and laboratory data on liver dysfunction, it has been established that the activity of NASH and ASH determines the complex of microscopic signs (increase in the severity of liver steatosis from S₁ to S₃ degree; increase in the number of balloon hepatocytes and hepatocytes with the bodies of Malory-Denk; intensification of steatonecrosis and apoptosis of hepatocytes; number and expansion of foci of steatonecrosis in the liver, as well as immunocyte and inflammatory cell infiltration of the liver), while the severity and duration of the disease is perisinusoidal-pericellular or portal-Z₁₋₃perisinusoidal liver fibrosis that progresses through a mild F₁, moderate F₂ and severe F₃ degree of the liver cirrhosis (LC). Rare signs of activation of chronic steatohepatitis (SH) may be the growth of deposition of iron in hepatocytes and macrophages, the development of biliostasis and the appearance of steatogranulom (more often with ASH), an increase in autophagy in hepatocytes with steatosis (more often in NASH).

HC, IHC, and EM studies have shown that in the patients with NASH and ASH, the main sources of perisinusoidal-pericellular or portal-Z₁₋₃perisinusoidal fibrosis of the liver are new generations of activated perisinusoidal myofibroblasts (PMFB) and portal fibroblasts (PFB) with immunophenotype: α SMA +, fascine +, vimentin +, desmine-. An important role in the phenomenon of early pericellular fibrosis of the liver is played by CD68+ and S100+ macrophages, which activate PMFB in steatonecrosis, balloon lysis and apoptosis of hepatocytes. With the progression of perisinusoidal-pericellular fibrosis from the mild F₁, moderate F₂ to

severe F₃, and LC in the fibrosis regions, the Mason+ molecular-fibrous matrix (the Kruskala-Wallis criterion H = 88.70 p < 0.05) and the area αSMA+ PMFB (the Kraskela-Wallis criterion is H = 45.12; p < 0.05), as well as the area of deposit of collagen I and type IV (20 times) and type III collagen (10 times) is increasing. With the increase in the severity of portal-Z₁₋₃perisinusoidal fibrosis from the mild F₁ degree to LC in the fibrous regions, the Mason+ molecular-fiber matrix area (the Kraskela-Wallis criterion H = 76.56; p < 0.05) and the area αSMA+ PFB increases significantly and Z1-PMFB (the Kraskela-Wallis criterion is H = 43.18; p < 0.05), as well as the area of deposit of type III collagen (30%) and collagen I and type IV (more than 2 times) is increasing.

It has been established that in patients with NASH and ASH, the death of damaged hepatocytes is compensated for a long time by the appearance of two-three-six-nuclear hepatocytes, large mononuclear hepatocytes with several nucleoli and hepatocytes with large hyperchromic nuclei. At stage F₂ of moderate to severe F₃ fibrosis and LC, a reparative complex of progenitor cells of the liver with the development of ductular reaction is activated. In its active phase in the projection of the Hering tubules in the microscopy, cellular clusters and chains and small ductules containing small cells with the immunophenotype of progenitor cell liver (c-kit CD117 +, CD34 +, CD56 +, CD44 Std./HCAM +, α-FTP CK7 +, CK19 +, α-FTP +), as well as biliary cells (CK7 +, CK19 +) and hepatocyte differentiation (Hepar + and α-FTP +), cells of the intermediate hepatobiliary differentiation (CK7 +, CK19 +, Hepar +, α-FTP +). Activation of progenitor cells of the liver leads to the replenishment of hepatocytes through intermediate hepatocytes and CK7 + hepatocyte-like cells, which is facilitated by the appearance in the intercellular matrix of laminin, and to the neoplasm of the liver pseudolobules in LC, as well as to the accumulation of the ductules without bile in fibrously altered portal tracts.

Adverse complications of NASH and ASH are micronodular LC of the perisinusoidal-pericellular or portal-Z₁₋₃ perisinusoidal type, registered in 10,48 %

of patients, as well as hepatocellular carcinoma (HCC) of the liver with solid-cellular, trabecular and acinar patterns, diagnosed at 0,57 % of cases.

Scientific novelty. For the first time, the method of high-performance liquid chromatographic mass-spectrometry revealed that in severe S₃ steatohepatitis in the dead patients with NASH in the liver a significantly increased content of lipoprotein stearic and palmitinic acids and cholesterol, which positively correlated with elevated levels of total cholesterol and high density lipoprotein in blood plasma for the life of these patients and indicates a severe distortion of lipid metabolism in hepatocytes.

Specified data on the main microscopic types of death of hepatocytes (steatonecrosis, apoptosis, balloon cytolysis, and ferroptosis) in patients with NASH and ASH. New EM and IHC data have been obtained that cylindrical hepatocytes are cells that are destroyed by balloon cytolysis. It has been established that excessive accumulation of iron leads to ferroptosis of hepatocytes: they lose the typical form, decrease, have a picnotic nucleus and an over-saturated iron of the cytoplasm. New data on the features of deposit of trivalent Fe³⁺ and divalent Fe²⁺ iron in hepatocytes and macrophages of the liver in patients with NASH and ASH were obtained. Revised data on the composition of the molecular extracellular matrix and sources of development of major varieties of liver fibrosis, as well as on the dynamics of deposition of different types of collagen in their progression.

Extended scientific concepts concerning morphological indicators of activity and severity of HC in patients with NASH and ASH. Further development of the peculiarities of reparative processes in the liver under NASH and ASH has been made. It is proved that the recovery of the hepatocyte population is mainly due to the activation of the reparative complex of progenitor cells of the liver and the differentiation in hepatocytes of hepatobiliary and hepatocyte-like CK7 + cells, which is promoted by the appearance of laminin in the extracellular molecular matrix. It was established that during the repair of SH there are two fibrous pathways: early pericellular fibrosis due to activation of PMFB, as well as

postponed portal and bridge-like porto-portal fibrosis due to activation of PFB with ductular reaction. New data on the active role of the progenitor cell complex in the formation of pseudolobules in cirrhosis of the liver were obtained.

Practical meaning. On the basis of histological, HC, IHC and EM studies, the absence of significant PM differences between ASH and NASH, sufficient for their evidence-based differential diagnosis in trepanobiopsates of the liver, was established without the presence of appropriate clinical and laboratory data of the patients. NASH differs from ASH by the predominance of macrovesicular steatosis of hepatocytes, a smaller number of hepatocytes with the bodies of Malory-Denk, less pronounced and prevalent inflammatory cellular infiltration of liver lobes, and also the absence of local perivenular and isolated peribilar fibrosis. For use in biopsy diagnostics, PM signs of activation of NASH and ASH, as well as recovery of hepatocytes and biliary ductules with LC are suggested. It is determined that the PM features of the progression of micronodular cirrhosis of the liver in patients with NASH and ASH are excessive accumulation of empty ductules in portal tracts, associated with the growth of portal and bridge-like porto-portal fibrosis, as well as the development of extremely severe pericellular fibrosis, which isolates and leads to hepatocytes steatonecrosis. Described are the most characteristic patterns of the hepatothocellular carcinomas in patients with NASH and ASH.

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ 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. doi: 10.14739/2310-1237.2015.3.55589 (Дисертант виконав набір матеріалу, ГХ дослідження та статистичну обробку результатів).
2. Tumanskiy V. A., Fen' S. V., Varynskyi 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. DOI: 10.14739/2310-1237.2016.3.87485 (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. DOI: 10.14739/2310-1237. 2017.3.118299. (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. DOI: 10.14739/2310-1237. 2018.1.129316. (*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.

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 та 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. 56.

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 ВЕР-ХМС дослідження та статистичну обробку результатів).*

ЗМІСТ

| | |
|---|-----|
| Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів | 18 |
| Вступ | 19 |
| Розділ 1 Патоморфологічні особливості хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту, їх перебігу та несприятливих наслідків (огляд літератури)..... | 26 |
| 1.1 Сучасні уявлення про хронічний неалкогольний стеатогепатит та його патоморфологічні прояви..... | 33 |
| 1.2 Сучасна характеристика хронічного алкогольного стеатогепатиту та його патоморфологічних проявів..... | 40 |
| 1.3 Патоморфологічні особливості несприятливого перебігу неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту та їх наслідків..... | 44 |
| 1.4 Патоморфологічні критерії та класифікація цирозу печінки при неалкогольному і алкогольному стеатогепатиті..... | 50 |
| 1.5 Гепатоцелюлярна карцинома печінки у хворих на хронічний неалкогольний і алкогольний стеатогепатит..... | 54 |
| Розділ 2 Матеріали та методи дослідження..... | 55 |
| 2.1 Матеріали дослідження..... | 55 |
| 2.2 Методи та методики досліджень..... | 57 |
| Розділ 3 Загальна патоморфологія алкогольного і неалкогольного стеатогепатиту та простого стеатозу печінки | 65 |
| 3.1 Мікроскопічна, електронно-мікроскопічна, гістохімічна, імуногістохімічна характеристика алкольного стеатогепатиту | 71 |
| 3.2 Мікроскопічна, електронно-мікроскопічна, хромато-мас- спектрометрична , гістохімічна і імуногістохімічна характеристика неалкогольного стеатогепатиту | 86 |
| 3.3 Морфологічні особливості стеатозу і фіброзних змін печінки в біоптатах хворих на гемангіому та на камені жовчного міхура..... | 100 |

| | |
|--|-----|
| Розділ 4 Патоморфологічні прояви активності неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту..... | 105 |
| 4.1 Патоморфологічні прояви інтенсифікації метаболічних процесів, деструктивних і компенсаторних змін гепатоцитів при активації хронічного неалкогольного та алкогольного стеатогепатиту..... | 106 |
| 4.2 Морфологічна характеристика імуноцитарних та запально- клітинних змін у печінці при активації хронічного неалкогольного та алкогольного стеатогепатиту | 127 |
| 4.3 Рідкі морфологічні прояви активності хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту | 134 |
| Розділ 5 Патоморфологічна характеристика репаративних процесів в печінці та несприятливих наслідків хронічного неалкогольного та алкогольного стеатогепатиту..... | 147 |
| 5.1 Гістохімічна і імуногістохімічна характеристика розвитку і прогресування фіброзу печінки при неалкогольному та алкогольному стеатогепатиті | 147 |
| 5.2 Патоморфологічні особливості активації репаративної дуктулярної реакції в печінці при хронічному неалкогольному і алкогольному стеатогепатиті | 176 |
| 5.3 Патоморфологічні особливості цирозу і раку печінки при хронічному неалкогольному та алкогольному стеатогепатиті..... | 191 |
| Розділ 6 Аналіз та узагальнення результатів дослідження..... | 209 |
| Висновки..... | 238 |
| Практичні рекомендації | 241 |
| Список використаних джерел | 242 |
| Додаток А Акти впровадження..... | 270 |
| Додаток Б Наукові праці, опубліковані за темою дисертації | 280 |
| Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації | 284 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АСГ – алкогольний стеатогепатит
ВЕР-ХМС – високоефективна рідинна хромато-мас-спектрометрія
ГХ – гістохімічне (дослідження)
ГЦК – гепатоцелюлярна карцинома печінки
ЕМ – електронно-мікроскопічне (дослідження)
ЕС – ендоплазматична сітка
ЖХП – жирова хвороба печінки
ІГХ – імуногістохімічне (дослідження)
ІМПЗ – імунопозитивний матеріал (клітини, волокна)
МФМ – морфометричне (дослідження)
МФБ – міофібробласт
НАСГ – неалкогольний стеатогепатит
ПГ – патогістологічне (дослідження)
ПЗК – перисинусоїдальна зірчаста клітина
ПКМ – позаклітинний матрикс
ПМ – патоморфологічні (дослідження)
ПМФБ – перисинусоїдальний міофібробласт
СГ – стеатогепатит
СПГЗП – стандартизована площа гістологічного зрізу печінки
 S_1, S_2, S_3 – ступінь стеатозу печінки
УООЩ – умовні одиниці оптичної щільності
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
 α SMA – α гладеньком'язовий актин

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Через нечітку визначеність жирової хвороби печінки (ЖХП), неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) і алкогольного стеатогепатиту (АСГ) дані стосовно їх поширеності значно відрізняються. Розповсюдженість НАСГ серед населення планети коливається від 2,8 % до 46 % [1], за даними ВООЗ у 2015 році НАСГ охоплює приблизно 25 % дорослого населення світу [2]. Зловживання алкоголем та АСГ у 2012 році став причиною 48 % всіх випадків смерті від цирозу печінки (ЦП) [3] і причиною смерті 5,9 % населення світу [4], частота розвитку гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) при ЦП у хворих на АСГ становить 2,4 – 12,8 % [5]. Серед чинників розвитку НАСГ і АСГ важливу роль відіграє накопичення в печінці насичених жирних кислот [6-9] і заліза [10]; 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 [11-12] 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 [13-16], до теперішнього часу не визначені достовірні ПМ відмінності НАСГ і АСГ [17-18] в трепанобіоптатах печінки. Неоднозначна кількісна диференційна оцінка активності НАСГ і АСГ в гепатобіоптатах незалежними експертними групами патоморфологів [19-21] 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, яка розцінюється як прояв репаративного процесу при хронічних захворюваннях печінки [22], диференціювання прогеніторних клітин печінки в холангіоцити [23], предиктор біліарного фіброзу і прогресування СГ [24]. 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 науково-дослідної роботи 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 і завдання дослідження. Мета – удосконалення біопсійної діагностики хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту на підставі визначення патоморфологічних параметрів їх активності, регенерації і фіброзу печінки та несприятливих наслідків цих хвороб.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити методом вискоєфективної рідинної хромато-мас-спектрометрії (ВЕР-ХМС) в печінці померлих хворих на НАСГ рівні вмісту холестерину, пальмітинової і стеаринової кислот при тяжкому S_3 стеатогепатиті 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 неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту.

4. Вивчити ГХ, ІГХ та морфометричними (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 патоморфологічні прояви активації репаративного комплексу прогеніторних клітин печінки та його внесок у відновлення гепатоцитів і холангіол печінки у хворих на НАСГ і АСГ.

6. Визначити патоморфологічні 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 високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії встановлено, що при тяжкому S₃ 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 та свідчить про важке спотворення ліпідного обміну в гепатоцитах.

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 депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки у хворих на НАСГ і АСГ. Уточнені дані стосовно молекулярного складу позаклітинного матриксу (ПКМ), джерел і динаміки розвитку основних типів фіброзу печінки та депонування різних типів колагену при їх прогресуванні.

Розширені наукові поняття щодо ПМ показників активності СГ, про яку свідчить комплекс мікроскопічних ознак (S_1 - S_2 - S_3 ступінь стеатозу печінки; збільшення кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; інтенсифікація стеатонекрозу, балонного цитолізу, 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-перичелюлярний 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 гепатобілярних і гепатоцитоподібних СК7+ клітин, якому сприяє поява ламініну в позаклітинному матриксі. Встановлено, що при репарації СГ мають місце два фіброзні шляхи: ранній перичелюлярний фіброз, обумовлений активацією перисинусоїдальних міофіброblastів, а також відстрочений портальний і мостоподібний портально-портальний фіброз через активацію перидуктальних міофіброblastів при дуктулярній реакції.

Отримані нові дані щодо активної ролі репаративного комплексу прогеніторних клітин в формуванні псевдодольок при цирозі печінки.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі ПГ, ГХ, ІГХ і ЕМ досліджень встановлена відсутність суттєвих патоморфологічних 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 макровезикулярного 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 патоморфологічні ознаки активації НАСГ і АСГ, а також відновлення гепатоцитів та біліарних дуктул при цирозі печінки. Визначено, що ПМ особливостями прогресування мікронодулярного цирозу печінки 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 перицелюлярного 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, кафедри

патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, кафедри 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 патогістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, електронно-мікроскопічні та морфометричні 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 автором в ХМС лабораторії Запорізького державного медичного університету при консультативній допомозі доц. Варинського Б.О.

Апробація результатів дисертації. Апробація 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 13.11.2018 р.

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 та 1 теза в матеріалах X Конгресу Асоціації патологів України. Отримано патент України на винахід №116968 та 2 патенти на корисну модель №108321 і №112148.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 284 сторінках машинопису, 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).

РОЗДІЛ 1

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХРОНІЧНОГО
НЕАЛКОГОЛЬНОГО І АЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТУ,
ЇХ ПЕРЕБІГУ ТА НЕСПРИЯТЛИВИХ НАСЛІДКІВ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

В останні роки серед лікарів гастроентерологів, гепатологів і патоморфологів особливий інтерес сконцентрований на діагностиці проблем невірусних дифузних уражень печінки, які мають алкогольну та неалкогольну етіологію і супроводжуються розвитком стеатогепатиту з латентним перебігом.

Термін жирова хвороба печінки (ЖХП) за пропозицією ВООЗ з 2012 року використовується для позначення широкого діапазону змін від неускладненого стеатозу до стеатогепатиту і цирозу печінки; хвороба, яка пов'язана з надлишковим накопиченням ліпідів (тригліцеридів) більше ніж у 5% гепатоцитів, супроводжується ушкодженням гепатоцитів у вигляді некрозу або апоптозу, запальною інфільтрацією портальних трактів або печінкових дольок та наявністю фіброзу або цирозу печінки [25].

Неалкогольна ЖХП є складовою метаболічного синдрому, що включає ожиріння, інсулінорезистентність з розвитком цукрового діабету 2 типу, дисліпопротеїнемію та артеріальну гіпертензію [26-27].

Алкогольна ЖХП обумовлена систематичним зловживанням алкоголю, який з 1960 року визнаний ВООЗ прямим гепатотоксином [28].

Перше згадування уражень печінки при цукровому діабеті зробив німецький клініцист і патолог F.T. von Frerichs у 1884 році, назвавши дану патологію, як діабетичний жировий гепатоз. У 1949 р. з'явилися роботи А.Л. Мясникова про гепатодистрофію при цукровому діабеті, S. Zelman у 1952 році [29] описав зміни печінки у пацієнтів з ожирінням, а Н. Thaler у 1957 році досліджував патологію печінки при цукровому діабеті, яку

охарактеризував як стеатоз з запальною реакцією, J. Westwater та D. Fainer у 1958 році [30] підтвердили, що у багатьох пацієнтів з ожирінням виявляються відхилення печінкових тестів і морфологічні зміни, які нормалізуються після зниження ваги. В період 1960-1970 р.р. С.Д. Подимова виділила групу хворих, у яких в біоптатах печінки було виявлено стеатоз з мезенхимальною запальною реакцією, згодом ретроспективно оцінений як стеатогепатит.

Термін неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) вперше запропонував у 1980 році J. Ludwig [31], який описав його, як самостійне захворювання і позначив основні діагностичні критерії у вигляді стеатозу печінки з лобулярним гепатитом та відсутності зловживання алкоголем в анамнезі.

На сьогоднішній день в розвитку неалкогольної і алкогольної ЖХП виділяють простий стеатоз з доброякісним перебігом, який є зворотнім процесом після припинення дії етіологічних факторів і стеатогепатит, що вважається передвісником можливого розвитку цирозу печінки та трансформації його у рак печінки [32-35].

За Міжнародною класифікацією хвороб 10 перегляду (МКХ-10) [36] із змінами і доповненнями ВООЗ, опублікованими в 1996-2017 рр. алкогольна жирова хвороба печінки входить в розділ «Хвороби органів травлення» до рубрики «Хвороби печінки» під кодом К 70, що включає в себе всі послідовні стадії розвитку захворювання від простого стеатозу до цирозу печінки і застосовується для позначення гострих дегенеративних і запальних уражень печінки, обумовлених зловживанням алкоголем (табл. 1.1).

Неалкогольна жирова хвороба печінки в МКХ-10 також входить в розділ «Хвороби органів травлення», але не має чіткої рубрики і позначається кодом К 76.0 (жирова дегенерація печінки не класифікована в інших рубриках). Американська версія МКХ-10, оновлена в 2017 році, визначає НАСГ, як окрему нозологічну одиницю з кодом К 75.8 (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 – Кодування алкогольної і неалкогольної жирової хвороби печінки згідно з МКХ -10 із змінами і доповненнями ВООЗ 1996-2017 рр.

| Нозологія | Код по МКХ-10 |
|--|---------------|
| Алкогольна хвороба печінки | К 70 |
| Алкогольна жирова хвороба печінки | К 70.0 |
| Алкогольний гепатит | К 70.1 |
| Алкогольний фіброз печінки | К 70.2 |
| Алкогольний цироз печінки | К 70.3 |
| Алкогольна печінкова недостатність (гостра, підгостра, хронічна, з наявністю або без коми) | К 70.4 |
| Алкогольна хвороба печінки неуточнена | К 70.9 |
| Інші захворювання печінки | К 76 |
| Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) не класифікована в інших рубриках | К 76.0 |
| Інші запальні захворювання печінки | К 75 |
| Неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) | К 75.8 |
| Фіброз і цироз печінки | К 74 |
| Фіброз печінки | К 74.0 |
| Інший або неуточнений цироз печінки (криптогенний, макронодулярний, мікронодулярний, змішаний, порталний, постнекротичний) | К 74.6 |
| Наслідки інших та неуточнених інфекційних і паразитарних захворювань | В 94 |
| Наслідки вірусного гепатиту | В 94.2 |

Серед комбінованих уражень печінки найчастіше виділяють вірусний гепатит асоційований зі стеатогепатитом, який в МКХ - 10 занесений в розділ «Деякі інфекційні та паразитарні хвороби» в рубрику «Наслідки інфекційних та паразитарних хвороб» з кодом В 94.2, як віддалені наслідки вірусного гепатиту, за умов підтвердження наявності вірусу у хворого (табл. 1.1).

В клініко-патологічній діагностиці стеатогепатиту діагностично цінною вважається біопсія печінки, яка, за даними С. Р. Strassburg, М. Р. Manns [37], вперше була проведена Р. Ehrlich у 1883 році для оцінки вмісту глікогену в

гепатоцитах у хворих на цукровий діабет. Згодом L. Lucatello у 1895 році провів біопсію печінки для аналізу тропічного (амебного) абсцесу печінки, а F. Schuper у 1907 році опублікував біопсії печінки у людей і щурів, виконаних для діагностики цирозу та пухлин печінки. Лише у 1923 році P. Nyuag та A. Binge застосували біопсії печінки з метою діагностики вірусного гепатиту, а вже в 1958 році G. Menghini запропонував перший протокол та ввів у широке використання біопсію печінки в клінічній практиці, що згодом перетворилась на просту процедуру з низьким ризиком ускладнень.

Черезшкірна трепанбіопсія з наступним морфологічним дослідженням стала «золотим стандартом» діагностики захворювань печінки, в тому числі - стеатогепатитів різної етіології [38-39]. Спеціальне вивчення оптимізації процедури пункційної біопсії печінки на прикладі біопсій хворих з хронічними вірусними гепатитами, АСГ та НАСГ показало [40-41], що стандартом зразка тканини трепанбіоптата є діаметр стовпчика біопсії від 1,4 до 1,6 мм та довжина зразка не менше 2-3см або наявність 11 повних порталних трактів у всьому об'ємі досліджуваного матеріалу. Збільшення довжини біопсії печінки знижує ризик недооцінки рівня і стадії патологічного процесу, при таких параметрах морфологічна діагностика є правомірною, а встановлення діагнозу вважається адекватним [42-43].

В інтерпритації результатів біопсії печінки використовують три морфологічні моделі печінкової дольки: класичну, порталну і ацинарну, які не виключають одна іншу, а відображають різні сторони будови і функції печінки. Патоморфологи звертають увагу на те, що в біопсійному матеріалі печінки для оцінки некрозів або стеатозу гепатоцитів зручніше використовувати модель «класичної» гексагональної дольки, орієнтуючись на розташування центральних вен і порталних тріад, модель «ацинуса» запропонована А.М. Rappaport (1950), дозволяє більш повно оцінити архітектоніку печінки та метаболічну організацію гепатоцитів. Дані

концепції дозволяють більш конкретно описувати та аналізувати біоптати печінки, вказуючи точну локалізацію патологічного процесу.

Діагностика ЖХП та стеатогепатиту ґрунтується на конкретних гістологічних критеріях і повинна враховувати не тільки наявність стеатозу, його локалізацію, та ступінь вираженості в гепатоцитах, але також оцінювати гепатоцелюлярне пошкодження у вигляді балонної дегенерації гепатоцитів, локалізацію запальної інфільтрації, наявність або відсутність сидерозу гепатоцитів, тип та ступінь фіброзу печінки.

Однією з перших градацій ЖХП, яка була запропонована С.А. Matteoni et.al. (1999) [44], базувалася на визначенні ступеня тяжкості неалкогольної ЖХП чотирьох підтипів:

- підтип I (простий стеатоз);
- підтип II (стеатоз з порушенням);
- підтип III (стеатоз з балонною дегенерацією гепатоцитів);
- підтип IV (неалкогольний стеатогепатит).

Зараз III і IV підтипи об'єднані та визначаються як НАСГ [45]. Також градація була доповнена бальною системою, яка оцінювала стеатоз (від 0 до 3 балів), запальну інфільтрацію (від 0 до 2 балів) і балонну дегенерацію гепатоцитів (від 0 до 2 балів), якщо набиралося більше 5 балів - це відповідало діагнозу НАСГ, якщо менше 3 балів - «не НАСГ», але ця система не урахувала ступінь та гістотопографічний вид фіброзу печінки.

Аналогічна система оцінки була запропонована для АСГ та використовувала схожі гістологічні параметри: ступінь стеатозу, ступінь нейтрофільної інфільтрації, тип холестазу і наявність мегамітохондрій [46].

Простий стеатоз печінки, його види та класифікація. Початком розвитку ЖХП та стеатогепатиту будь-якої етіології є простий стеатоз який передбачає накопичення ліпідів у гепатоцитах (більше 50 %), відсутність запальної інфільтрації портальних трактів та печінкових дольок і відсутність фіброзу [25].

На сьогоднішній день виділяють три гістологічні варіанти стеатозу печінки: макровезикулярний, коли одна велика ліпідна вакуоль або кілька менших займають більшу частину цитоплазми гепатоцита з ексцентричним ядром. Менш поширеним є мікроевезикулярний стеатоз, коли ліпіди у вигляді безлічі дрібних вакуолей займають всю цитоплазму гепатоцита з центрально розташованим ядром. Третій тип: змішаний стеатоз являє собою комбінацію мікро- і макровезикулярного стеатозу. Також існує поняття гіперплазії клітин Іто та є одним із різновидів стеатозу, при цьому перисинусоїдальні зірчасті клітини (ПЗК) накопичують ліпіди в цитоплазмі завдяки чому їх ядра стискаються в формі півкола, але в гепатоцитах ліпідні вакуолі відсутні [47].

Макровезикулярний стеатоз найчастіше є мультифокальним ураженням печінки, що підтверджується неінвазивним ультразвуковим дослідженням (УЗД) та комп'ютерною томографією (КТ). При гістологічному виявленні такий стеатоз є непрямим показником ураження печінки алкогольної і неалкогольної етіології, лабораторні дослідження печінкових проб можуть бути в нормі або спостерігається незначне підвищення амінотрансфераз (АЛТ, АСТ), лужної фосфатази (ЛФ) і γ -глутамілтранспептидази [48].

При патогістологічному дослідженні макровезикулярний стеатоз більшою мірою вражає центролобулярну (перивенулярну) Z_3 зону печінкових дольок з поступовим поширенням на проміжну Z_2 і перипортальну Z_1 зони. При збільшенні кількості ліпідних вакуолей, іноді зустрічаються кластери гепатоцитів з мікроевезикулярним стеатозом, що відображає злиття дрібних вакуолей у великі ліпідні вакуолі [49-50]. Ліпіди при макровезикулярному стеатозі накопичуються в гепатоцитах через збільшення синтезу або зниження екскреції тригліцеридів. Збільшення синтезу відбувається через наявність надлишкової кількості вільних жирних кислот та їх окислення. Зниження екскреції є результатом зменшення синтезу апопротейнів, що частіше пов'язано з недостатнім споживанням білків або зі зловживанням алкоголю [51]. Макровезикулярний стеатоз визнається важливим фактором

ризикі гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК), навіть без розвитку фіброзу або цирозу печінки, особливо – при метаболічному синдромі [52-53].

З прогресуванням макровезикулярного стеатозу від локального до тотального у зонах найбільшого пошкодження гепатоцитів утворюються ліпогранульоми, локалізовані в дольках поблизу термінальних венул, а також зони ліпопеліозу з утворенням великих синусоїдальних ліпідних кіст, що формуються після вивільнення ліпідів з гепатоцитів [54].

При мікроевезикулярному стеатозі гепатоцити можуть мати вигляд «роздутих» клітин у випадках, коли в цитоплазмі накопичуються дрібнодисперсні вакуолі діаметром менше 1 мкм, невидимі при світловій мікроскопії. Центральне розташування ядра в гепатоциті допомагає диференціювати істинний мікроевезикулярний стеатоз від кластерів формування макровезикулярного стеатозу гепатоцитів [54-55].

В залежності від ураження тієї чи іншої зони печінкових дольок, стеатоз поділяють на локальний (в певних зонах печінкових дольок) і тотальний, який визначається в усіх зонах печінкових дольок. За ступенем тяжкості стеатоз печінки поділяють на легкий (S_1), помірний (S_2) і тяжкий (S_3) [56] (табл. 1.2).

Таблиця 1.2 – Градація стеатозу печінки за D.E. Kleiner, E.M.Brunt (2005)

| Ступінь стеатозу | Гістологічна характеристика змін у печінці |
|-----------------------------|--|
| S_1 (легкий ступінь) | Стеатоз: від 5 % до 33 % гепатоцитів в полі зору, переважно макровезикулярний. |
| S_2 (помірний ступінь) | Стеатоз: від 34 % до 66 % гепатоцитів в полі зору, макровезикулярний або змішаний. |
| S_3 (тяжкий ступінь) | Стеатоз: більш ніж 66 % гепатоцитів в полі зору, змішаний. |

Незважаючи на те, що простий стеатоз у хворих на ЖХП певний час вважався клінічно доброякісним, сучасні дослідження вказують на прогресування хвороби в стеатогепатит, що може ускладнюватися цирозом

печінки і ГЦК [61]. Стеатогепатит є найбільш важкою формою ЖХП, для нього характерним є накопичення ліпідів в печінці, що перевищує 5% її ваги. Ключовими гістологічними компонентами стеатогепатиту є стеатоз, балонна дегенерація гепатоцитів, запальна клітинна інфільтрація і фіброз печінки; проте ступінь фіброзу в біопсії печінки (стадія) являє собою прогностичний фактор, але прогностичного значення ступеня запальної інфільтрації і некрозу гепатоцитів в біоптаті печінки невизначено [25].

1.1 Сучасні уявлення про хронічний неалкогольний стеатогепатит та його патоморфологічні прояви

За останні 15 років поширеність неалкогольної АЖХП в загальній популяції коливається від 9 % до 37 % [58] (рис. 1.1).

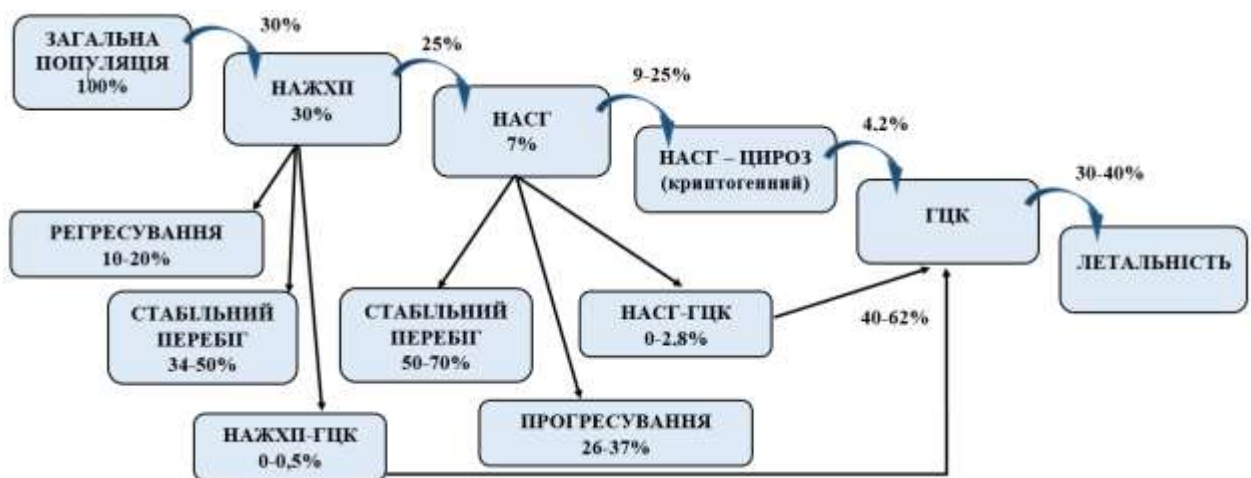


Рисунок 1.1 – Розповсюдження НАЖХП і НАСГ в загальній світовій популяції. Схема взята із К.Pereira, J.Salsamendi, J.Casillas [66].

За даними сучасних досліджень на частку неалкогольної ЖХП в популяції припадає близько 20-40 % [59], хворобою в цілому страждає близько 30 % населення, 58 % людей, які мають надмірну вагу і 90 % яких страждають ожирінням [60]. Прогресування неалкогольної ЖХП в НАСГ в загальній популяції спостерігається в 5-7 % випадків і у 34-40 % пацієнтів з

ферментативною дисфункцією печінки [61-66]. У більшості пацієнтів не спостерігається прогресування неалкогольної ЖХП, тільки у 25 % пацієнтів вона переходить в НАСГ [65].

В США до 25 % американців страждають на неалкогольну ЖХП і приблизно 6 мільйонів осіб страждає на НАСГ [67-68]. В країнах Європи на неалкогольну ЖХП страждає від 43 % до 70 % дорослих хворих на цукровий діабет 2 типу. Поширеність неалкогольної ЖХП серед населення в Європі коливається від 26 % до 33 % [69], поширеність НАСГ – близько 5 % [70]; поширеність неалкогольної ЖХП становить від 20 % до 30 % на Близькому Сході [71] від 20 % до 33 % дорослого населення – в країнах СНД [72-73]. У Російській Федерації частота виявлення неалкогольної ЖХП в 2014 році склала 37,1 %, вона посіла перше місце серед захворювань печінки - 71,6 %. Згідно за результатами епідеміологічного дослідження «DIREG» в Росії серед 31 тис. хворих неалкогольну ЖХП виявлено у 26,1 % пацієнтів, стеатоз печінки - у 80,3 % пацієнтів, НАСГ - у 16,8 %, цироз - у 2,9 % хворих [74].

Висока варіабельність статистичної інформації про поширеність неалкогольної ЖХП в різних країнах пояснюється значними соціально-економічними відмінностями вивчених популяцій населення і різними методами збору інформації. В Україні за даними посмертного гістологічного дослідження печінки неалкогольна ЖХП виявлена у 3,6 % - 37,3 % померлих; серед досліджених пацієнтів простий стеатоз виявлений у 24,6 %, НАСГ - у 37,3 %, фіброз печінки у 3,6 % випадків [75]. Саме через відсутність точних показників не зафіксовані статистичні дані про неалкогольну ЖХП в Україні [76].

Однією з гіпотез патогенезу НАСГ є «гіпотеза багатократних ударів» (рис. 1.2), в якій головну роль грає метаболічний синдром, за рахунок інсулінорезистентності і порушення процесу, викликаного різними білками та імунними компонентами. Ідентичність багатократних «ударів» для кожного пацієнта відрізняється і на даний час остаточно не визначена [25].



Рисунок 1.2 – Схема багаторазових «ударів» в розвитку НАСГ (оксЛНЩ – окисований ліпопротеїн низької щільності; TTR – Toll-подібний рецептор).

Гістологічні зміни печінки при НАСГ мало чим відрізняються від АСГ, для них характерна поява поодиноких апоптотично змінених гепатоцитів та збільшених гепатоцитів в стані балонної дегенерації з еозинофільними тільцями Малорі-Денка, які мають водянисту або розріджену цитоплазму. Одним із доказів того, що НАСГ виникає у хворих на цукровий діабет, є гістологічна ідентифікація в гепатоцитах дірчастих (глікогенових) ядер, в вакуолях яких PAS-реакцією виявляють глікоген [77-80].

НАСГ в більшості випадків не пов'язаний зі значною запальною інфільтрацією, іноді характерними є поодинокі лімфоцити та макрофаги Купфера у портальних трактах. Характерним для прогресування стеатозу в НАСГ є поява фокальної портальної або лобулярної запальної інфільтрації, що пов'язано з підвищенням рівня цитокінів MCP-1 (CCL2) у відповідь на окислення ліпопротеїнів, які активують CD68⁺ резидентні макрофаги Купфера [81-82], та поява кластерів Т-лімфоцитів CD4⁺ і CD8⁺ фенотипу, які знаходяться в зонах найбільшого пошкодження гепатоцитів стеатозом та дифузно інфільтрують портальні тракти [83].

Такі гістологічні ознаки як стеатоз, балонна дегенерація гепатоцитів і запальна інфільтрація були покладені в основу однієї з перших систем оцінювання ступеня тяжкості неалкогольної ЖХП і НАСГ, запропонованої Е.М. Brunt et.al. у 1999 році [84], яка полягала в комбінованому оцінюванні

ступеня тяжкості стеатозу (від 0 до 3 балів), балонної дегенерації гепатоцитів (від 0 до 2 балів) і локалізації клітинно-запальної інфільтрації в печінці (від 0 до 3 балів). Показник ступеня тяжкості НАЖХП і НАСГ міг коливатися від 0 до 8 балів (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 – Оцінка ступеня тяжкості неалкогольної ЖХП та НАСГ за Е.М.Вrunt (1999 р.)

| Ступінь стеато-гепатита | Гістологічна характеристика змін у печінці | Гістологічна ознака | Ступінь тяжкості | Б а л |
|----------------------------|---|---------------------------------|------------------|-------|
| Grade 1 (легкий ступінь) | Стеатоз (S ₁) – легкий Балонна дегенерація гепатоцитів: одиничні в Z ₃ зонах печінкових дольок. Долькове запалення: представлено одиничними клітинами. Портальне запалення: немає або маловиразне. | стеатоз | < 5% | 0 |
| | | | 6-33% | 1 |
| | | | 34-66% | 2 |
| | | | > 66% | 3 |
| Grade 2 (помірний ступінь) | Стеатоз (S ₂) – помірний Балонна дегенерація гепатоцитів: спостерігається в Z ₃ зонах печінкових дольок. Долькове запалення: розсіяне, переважно по всій поверхні дольки. Портальне запалення: помірне, рівномірно розподілено по портальних трактах. | балонна дегенерація гепатоцитів | немає | 0 |
| | | | мало | 1 |
| | | | багато | 2 |
| Grade 3 (тяжкий ступінь) | Стеатоз (S ₃) – тяжкий Балонна дегенерація гепатоцитів: переважають в Z ₃ зонах печінкових дольок. Долькове запалення: змішане, виражене в Z ₃ зонах печінкових дольок. Портальне запалення яскраво виражене у всіх портальних трактах, з великим скупченням запальних клітин. | запальний інфільтрат* | немає | 0 |
| | | | < 2 вог. | 1 |
| | | | 2-4 вог. | 2 |
| | | | > 4 вог. | 3 |

Примітка. * кількість вогнищ в полі зору на збільшенні x200.

Запропонована система створює певні проблеми при оцінці ступеня тяжкості НАСГ, оскільки не завжди спостерігається поєднання всіх трьох

гістологічних параметрів, нерідко у хворих НАСГ визначається прогресування лише однієї з ознак. Тому в сучасній діагностиці кожен з цих трьох показників враховується окремо для оцінки лише загальних гістологічних змін.

Одним із критеріїв прогресування стеатогепатиту є поява в макрофагах Купфера і гепатоцитах пігменту гемосидерину [85-86], який виявляється гістохімічним методом Перлса та менш використованим методом Тірмана – Шмельцера. Серед третини хворих неалкогольну ЖХП та НАСГ з оксидативним стресом, зростаючою мітохондріальною дисфункцією і підвищеною активністю прооксидантного цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) спостерігається синдром дисметаболічного перевантаження залізом (DIOS-синдром) [87-89]. Значущість накопичення заліза в печінці обумовлене тим, що навіть низькі рівні вмісту та депонування заліза в тканині печінки можуть сприяти формуванню фіброзу [90-91].

При порушенні метаболізму заліза та його депонування внутрішньоклітинно тільки в гепатоцитах використовують термін «гемохроматоз печінки», що підтверджується порушенням синтезу і мутацією HFE-білку (HFE-C282Y та HFE-H63D) [92-93]; поняття «сидероз печінки» вказує на набуту патологію без наявності генетичних мутацій, яка характеризується накопиченням заліза, як внутрішньоклітинно (в гепатоцитах та макрофагах Купфера), так і позаклітинно [94].

Діагностика сидерозу печінки при АСГ і НАСГ полягає в урахуванні гістотопографічного розподілу заліза в печінкових дольках і клітинному депонуванні заліза в гепатоцитах, перисинусоїдальних і портальних макрофагах, ПЗК і портальних міофібробластах (ПМФ,) холангіоцитах з метою диференціювання сидерозу печінки на внутрішньоклітинний, позаклітинний і змішаний.

Внутрішньоклітинний сидероз печінки пов'язаний з гіперабсорбцією заліза в тонкій кишці, в останні роки встановлена важлива роль гепсідина –

25-амінокислотного пептиду, який синтезується в печінці [95] і є негативним гуморальним регулятором захоплення заліза в тонкій кишці і його звільнення з макрофагів в тканинах органів [96]. Доведено, що надлишок заліза індукує синтез гепсідина гепатоцитами, при порушеннях метаболізму надлишок заліза депонується не тільки в печінці, але й в селезінці та кістковому мозку і, підсилюючи утворення вільних радикалів, веде до локального пошкодження тканин [89]. В печінці депонування заліза відбувається лише в гепатоцитах у вигляді дрібних гранул (переважно на жовчному полюсі гепатоцитів), гепатоцити з депонованим залізом розподіляються по всій печінковій доліці зі зменшенням градієнту депонування від перипортальних (Z_1) до централобулярних (Z_3) зон [94].

Позаклітинний сидероз печінки, пов'язаний з перевантаженням гепатоцитів залізом та з їх окислювально-некротичним руйнуванням в результаті залізо-залежного перекисного окислення ліпідів. Запрограмована загибель клітин внаслідок залізо-залежного перекисного окислення ліпідів отримала назву фероптоз [97]. За морфологічними особливостями фероптоз відрізняється від апоптозу і аутофагії та інших форм програмованої гибелі. Для нього характерні морфологічні зміни у вигляді зменшення розмірів мітохондрій з конденсованими щільними внутрішніми мембранами, сплюснення і зникнення мітохондріальних крист, а також розриви зовнішньої мітохондріальної мембрани [98]. Вважається, що ключовим для розвитку фероптозу є зростання перекисного окислення ліпідів та формування активних форм кисню [99], внаслідок чого гепатоцит перевантажується залізом і руйнується шляхом фероптозу, а гранули заліза вивільнюються у міжклітинний простір по всій площі печінкових дольок та фагоцитуються макрофагами Купфера і портальними макрофагами.

Змішаний тип сидероза гістологічно являє собою суміш внутрішньо- та позаклітинного сидероза печінки.

Дослідження Т. Yamauchi у 2008 році [102] вперше показали, що до 50% хворих на НАСГ мають гепатоцелюлярне залізо. Як правило, іони заліза можуть бути виявлені в гепатоцитах або в ПЗК перипортальних зон, що скоріше всього пов'язано з будовою печінкової дольки і процесами оксигенації та метаболізму [100-102]. Але як ознака стеатогепатиту, сидероз печінки використовується нерегулярно.

Існує багато напівкількісних систем оцінювання заліза в печінці, які були запропоновані протягом багатьох років. За своєю концепцією одні з напівкількісних систем засновані на зональності розподілу заліза, інші - на виявленні найнижчого катіона заліза, що помітний при мікроскопії [103], інші - на відсотковому вмісту заліза в гепатоцитах [104].

На сьогоднішній день більш застосованою є класифікація запропонована LeSage (1983) в модифікації М. Torbenson (2009) [105] (табл. 1.4), в якій визначається відсоток гепатоцитів і макрофагів, які містять залізо, та ураховується їх локалізація. Класифікаційна система визначає вміст катіонів заліза в клітинах печінки і забезпечує достатню морфологічну інформативність.

Таблиця 1.4 - Система підрахунку вмісту заліза в тканині печінки в модифікації за М. Torbenson (2009)

| | Ступінь виразності відкладень заліза при забарвленні за Перлсом | Кількість гепатоцитів, в яких є залізо (%) | Кількість макрофагів, в яких є залізо (%) |
|----------------|---|--|---|
| G ₀ | – | – | – |
| G ₁ | мінімальний | < 5 | < 5 |
| G ₂ | легкий | 5 – 30 | 5 – 30 |
| G ₃ | помірний | 31– 60 | 31– 60 |
| G ₄ | тяжкий | > 60 | > 60 |

1.2 Сучасна характеристика хронічного алкогольного стеатогепатиту та його патоморфологічних проявів

За даними медичних досліджень в США близько 60 % населення в цілому повідомляють про споживання алкоголю, від 8 % до 10 % населення хронічно зловживають більше двох алкогольних напоїв в день. Згідно зі статистичними даними 4,6 % американців відповідають критеріям зловживання алкоголю, а 3,8 % - критеріям алкогольної залежності. Серед населення США в 2003 році 44 % всіх смертей від захворювань печінки були пов'язані зі зловживанням алкоголю. У 10-35% пацієнтів, госпіталізованих з приводу алкоголізму, діагностують АСГ, який характеризується широким спектром морфологічних змін в печінці і, відповідно, варіацією ступеня тяжкості від середнього до тяжкого [106-107].

За даними європейських досліджень, споживання алкоголю є причиною летальності 3,8 % європейського населення (11,0 % чоловіків і 1,8 % жінок) і інвалідності 4,6 % пацієнтів [108]. В Європі, найбільш високий рівень споживання алкоголю на душу населення реєструється в Південній, Східній Європі і в деяких районах Північної Європи (включаючи Ірландію та Сполучене Королівство). В країнах Європи протягом останніх десятиліть відзначається високе споживання алкоголю на душу населення (11 л чистого етанолу на рік), це становить більш 40 г в день – серед чоловіків і більше 20 г серед жінок [109]. У Російській Федерації, за офіційними даними, налічується понад 10 млн хворих на алкоголізм, це 10 % популяції, і 30 млн "п'яниць", тобто 40 % населення мають ризик розвитку АСГ [110].

Надлишкове накопичення вільних жирних кислот у гепатоцитах, перекисне окислення ліпідів та окислювальний стрес є спільними патогенетичними процесами розвитку НАСГ та АСГ і допомагають пояснити їх схожість.

Алкогольний стеатоз розвивається в ранню стадію хронічного алкоголізму і має клінічно безсимптомний перебіг, хоча іноді може розвиватися холестази і спостерігатися синдром Ціве (поєднання гострої жовтяниці з гемолітичною анемією та гіперхолестеринемією).

Морфологічно АСГ характеризується накопиченням в гепатоцитах нейтральних ліпідів, в біоптатах це найбільш часта гістологічна знахідка у 60-75 % хворих. Дуже часто змішаний мікро-макроезичулярний стеатоз поєднується з білковою і гідропічною дистрофією гепатоцитів, що супроводжується порушенням білкового обміну і наростанням гідратації клітин. Стеатоз гепатоцитів спостерігається в центролобулярних Z_3 і проміжних Z_2 зонах печінкових дольок з ураженням одного полюса гепатоциту (так звана «алкогольна пінна дегенерація» гепатоцитів), в іншому полюсі без стеатозу в обідку цитоплазми часто визначається великий вміст глікогену, РНК та висока активність ферментів гліколізу. При вираженому стеатозі у хворих на АСГ гепатоцити можуть зливатися і утворювати стеатокісти, які оточуються макрофагами і лімфоцитами, рідше - нейтрофілами з формуванням ліпогранульом. Основними ознаками АСГ є стеатоз гепатоцитів, наявність тілець Малорі-Денка, переважання в запальному інфільтраті поліморфноядерних лейкоцитів. В окремих випадках спостерігається поєднання стеатозу гепатоцитів з їх сидерозом і ліпофусцинозом, наявність центролобулярних некрозів.

Алкогольний гіалін (тільця Малорі), вперше морфологічно був описаний в 1911 році F. Mallory в гепатоцитах, більш детально досліджений Н. Denk в 1975 році і з 2007 року такі тільця отримали назву «тілець Малорі-Денка» [111]. Довгий час тільця Малорі-Денка вважалися характерною ознакою тільки захворювань печінки алкогольної етіології, але останнім часом цей факт спростовується: тільця Малорі-Денка можуть бути виявлені при токсичному гепатиті неалкогольної етіології, при хворобі Вільсона – Коновалова, хронічному холестазі і в рідкісних випадках холангіоцелюлярної

карциноми. Вони являють собою агрегати пошкоджених цитоплазматичних кератинів СК8 - I типу і СК18 - II типу з проміжними цитоплазматичними філаментами та білками теплового шоку (HSP) 70 і 25 [112]. Якщо гепатоцити з тільцями Малорі-Денка втрачають проміжні цитоплазматичні філаменти, то вони трансформуються у велетенські гепатоцити з тільцями Малорі-Денка внаслідок втрати енергодефіцитного контролю клітини через плазматичну мембрану.

Для АСГ характерна центролобулярна локалізація алкогольного гіаліну, який гістологічно складається з грудок і мотків щільного еозинофільного матеріалу, який іноді утворює кільце навколо ядра. Тільця Малорі-Денка ідентифікують при забарвленні методом Массон-трикопур, який виявляє відмінності тинкторіальних властивостей гіаліну в залежності від стадії його «старіння»: забарвлення варіює від рожево-червоного до темно синього. Коли тільця Малорі-Денка важко ідентифікувати гістологічно, для їх виявлення використовують ІГХ маркери: аутофагічний білок р62 та білок еукаріот убіквітин [113]. Такий метод може використовуватися для диференційної діагностики звичайного стеатогепатиту від пошкодження гепатоцитів при вірусному гепатиті, при якому зберігається експресія цитокератинів 8 і 18 [114].

При ЕМ дослідженні ультраструктурно тільця Малорі-Денка при АСГ та НАСГ поділяють на три типи, залежно від будови і орієнтації в них філаментів: в тільцях Малорі-Денка I-го типу волокна діаметром від 10 нм до 20 нм на поперечних зрізах розташовані паралельно один одному, мають вигляд «видбитків пальців», тоді як в тільцях II-го типу фібрили орієнтовані хаотично та мають рівномірну електронну щільність, в тільцях III-го типу філаменти складаються з електронно-щільного гранульованого аморфного матеріалу, який виглядає як масивне скупчення дрібногранулярних або крупногранулярних зерен [115]. Фібрилярний гіалін являє собою більш молодий гіалін, при старінні його структура стає гранулярною.

Характерною ознакою АСГ є наявність в гепатоцитах мегамітохондрій - велетенських мітохондрій від 2 мкм до 10 мкм, які в гепатоцитах перипортальних Z_1 зон мають вигляд сферично розширених мітохондрій, а в гепатоцитах централобулярних Z_3 зон - вигляд подовжених мітохондрій. При трансмісійній ЕМ в мегамітохондріях, особливо при НАСГ, виявляються кристалічні включення. Асоціація мітохондріального розширення з кристалічними включеннями зазвичай вважається патологічним, що відображає захисну або дегенеративну відповідь на пошкодження [116].

Запальний інфільтрат, характерний для АСГ, переважно багатий макрофагами Купфера та нейтрофілами, які оточують або навіть інфільтрують гепатоцити з тільцями Малорі-Денка в зонах найбільшого пошкодження гепатоцитів стеатозом, а також виявляються в портальних трактах.

У хворих на АСГ сидероз печінки зустрічається у 5 – 20 % випадків у поєднанні зі стеатозом, та в 12 % випадків - при формуванні алкогольного ЦП. На ранніх етапах залізо більшою мірою депонується в гепатоцитах, ніж в макрофагах Купфера, з прогресуванням стеатогепатиту і розвитком фіброзу, який супроводжується руйнуванням гепатоцитів, залізо з клітин переходить в позаклітинний простір, де воно депонується в макрофагах для його утилізації, і водночас - прискорює процес фіброзу печінки [89].

Перевантаження залізом при АСГ безпосередньо залежить від токсичного впливу ацетальдегіду на білки, які беруть участь у метаболізмі заліза. У своїх дослідженнях D. Harrison-Findik et al. (2007) показали, що етанол пригнічує дію гепсидіну та активує DMT-1 білки і феропортін в ентероцитах дванадцятипалої кишки [117]; хронічний вплив етанолу, в свою чергу, призводить до гіпоксії гепатоцитів централобулярних Z_3 зон печінкових дольок, активуючи HIF1 α -білки і транскрипційний фактор C/EBP α , що знижує синтез гепсидіну [118-119].

1.3 Патоморфологічні особливості несприятливого перебігу хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту та їх наслідків

До несприятливих наслідків НАСГ і АСГ відносять прогресуючий фіброз і цироз печінки, що розвиваються, головним чином, через активацію і зміни фенотипу нових поколінь перисинусоїдальних зірчастих клітин (ПЗК) і порталних фібробластів [120-122].

Фіброз печінки – активний біосинтетичний процес, відмінною рисою якого є проліферація і трансформація перибіліарних фібробластів в порталні міофібробласти (МФБ), трансформація нових поколінь ПЗК в перисинусоїдальні міофібробласти (ПМФБ), значне (майже в 10 разів) збільшення та накопичення компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ), гістологічною перебудовою перипортальних і центролобулярних зон печінкових дольок з формуванням неповноцінної субендотеліальної базальної мембрани, що розвивається внаслідок хронічного пошкодження печінки, характерного для більшості хронічних хвороб печінки [123-125]. З розвитком фіброзу печінки істотно ремоделюється міжклітинний матрикс і синтезується надлишок колагену, який депонується перисинусоїдально і перицелюлярно в печінкових дольках, а також в порталних трактах і в фіброзних септах, стійко порушуючи гістоархітекtonіку печінки [126].

Раніше вважалося, що фіброз печінки – це пасивний, незворотній процес, який розвивається в результаті деградації паренхіми печінки і її заміщення сполучною тканиною, багатою на колаген. У ранніх роботах 70-х років вважали, що фіброз печінки потенційно зворотній [127], але на нього звертали мало уваги, доки в 1985 році S. L. Friedman et al., не ідентифікували ПЗК або клітини Іто печінки – в якості основних печінкових клітин-продуцентів колагену.

Ще в середині XIX ст. ПЗК були описані К. Kupffer, але помилково прийняті за фагоцити через велику кількість включень в цитоплазмі при

фарбуванні цих клітин оксидом золота. Японському досліднику Т. Ito в 1952 році вдалося виявити в перисинусоїдальному просторі печінки людини клітини, що містять вкраплення ліпідів, які в подальшому були названі клітинами Ito; К. Wake в 1971 році довів ідентичність клітин, відкритих Купфером, і клітин Ito, що запасують ліпіди та виконують важливу роль в депонуванні вітаміну А. Незабаром після цього, Н. Popper продемонстрував тісний зв'язок клітин Ito з фіброзом печінки [128-129].

В 1980-х роках була стандартизована методика отримання ПЗК у людини та гризунів [130-131], при їх довготривалому культивуванні на пластівках *in vitro* була визначена їх фіброгенна роль [132-133]. 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 [134-135]. Згідно сучасної концепції, фіброз печінки при хронічних захворюваннях є наслідком циклічних деструктивно-репаративних змін в органі.

В непошкодженій печінці ПЗК становлять 5-8 % від чисельності всіх клітин печінки, вони знаходяться в стані спокою і мають невелику кількість відростків: перисинусоїдальних (субендотеліальних), які охоплюють синусоїдні капіляри, та інтергепатоцелюлярних, які досягають сусіднього синусоїду. Іншою відмінною рисою клітин є присутність в їх цитоплазмі більше 85 % запасів ретиноїдів в формі ліпідних крапель [136-137].

При пошкодженні печінки клітини Ito переходять в активований стан і змінюють свій фенотип, який характеризується проліферацією, хемотаксисом, скорочуванням, втратою запасів ретиноїдів і утворенням клітин, що нагадують МФБ [138].

Головною відмінністю активованих перисинусоїдальних міофібробластів (ПМФБ) від класичних МФБ є експресія білка риліну. Активовані ПМФБ печінки також демонструють підвищену експресію білків α -гладеньком'язового актину (α -SMA), десміну, молекул клітинної адгезії 1

(ICAM-1/CD54), гелсоліну, зниженну експресію гліального фібрилярного кислотоутворюючого протеїну (GFAP) та посилення контрактильності з експресією і секрецією матриксних компонентів [139].

Процес активації та фенотипічної трансформації ПЗК в ПМФБ вважається центральним механізмом у розвитку фіброзу печінки. Трансформовані ПМФБ мають здатність не тільки до синтезу молекул і компонентів ПКМ, а й до експресії і секреції багатьох про- і протизапальних цитокінів. Сучасні дослідження також показують, що ПЗК можуть виступати в якості антиген презентуючих CD133+ клітин, клітин, що грають важливу роль в регенерації і репарації печінки, а також залучаються до процесів ендоцитозу та секреції матриксних металопротеїназ і їх тканинних інгібіторів [140-141].

НАСГ і АСГ разом з вірусними гепатитами В і С, є основними хронічними захворюваннями, які ускладнюються фіброзом печінки [142]. Результати досліджень останніх років, підсумовані в оглядах Ch. Trautwein et al., A. Takaki et al., F. Stickel et al. [7,143-144], показали, що розвиток в гепатоцитах окисного стресу, дисфункції мітохондрій, стресу ендоплазматичної сітки з внутрішньоклітинним накопиченням ліпідів викликають трансформацію ПЗК і портальних фібробластів в фіброгенні МФБ печінки, що синтезують надлишок колагенів, нековалентних глікопротеїнів, протеогліканів і глікозаміногліканів.

Головними компонентами фіброзу печінки є надлишкове депонування колагенів I, III, IV, V типу [145], які разом з іншими молекулами позаклітинного матриксу формують властиві для стеатогепатиту кілька основних різновидів фіброзу печінки: перисинусоїдально-periцелюлярний, портально-перисинусоїдальний і портально-септальний [146].

Найбільш характерним для НАСГ є periцелюлярний фіброз, при якому формуються тонкі колагенові волокна навколо пошкоджених гепатоцитів, які виявляються забарвленням Масон-триколом та імпрегнацією сріблом за

Гоморі. Формування фіброзу портальних трактів, фіброзу перипортальних Z_1 зон і рідше центрлобулярних Z_3 зон печінкових дольок, супроводжується проліферацією активованих ПЗК та ПМФБ та лімфо-макрофагальною запальною інфільтрацією дольок печінки [147], а також може супроводжуватися активною проліферацією жовчних дуктул по краях фіброзних септ. Виявлення перицелюлярного фіброзу без будь-яких інших змін у печінці, є характерним проявом раніше перенесеного стеатогепатиту [148].

Однією з перших патогістологічних градацій фіброзу печінки при НАСГ була градація D.E. Kleiner та E.M. Brunt (1999, 2005), що враховувала зональну локалізацію фіброзу в дольках печінки [56] (табл. 1.5).

Таблиця 1.5 - Патогістологічна градація фіброзу печінки при НАСГ D.E. Kleiner та E.M.Brunt (2005)

| Стадії фіброзу | Характеристика фіброзу печінки |
|--------------------|---|
| 0 | фіброз відсутній |
| F ₁ | наявність перивенулярного або перицелюлярного фіброзу (локального або тотального) |
| F _{1a} * | тонкий фіброз «фіброз дротяної нитки» |
| F _{1b} ** | щільний фіброз |
| F _{1c} | тільки перисинусоїдальний фіброз (Z_3) зони печінкових дольок |
| F ₂ | 1 (a, b, c) стадія + портальний фіброз (локальний або тотальний) |
| F ₃ | мостоподібний фіброз |
| F ₄ | цироз |

Примітка 1. *- даний тип фіброзу діагностується лише при забарвленні трихром-Масон;

Примітка 2. **- зазвичай встановлюється при забарвленні гематоксиліном та еозином.

Американські патоморфологи E.Orfei et al. розробили гістотопографічну класифікацію основних видів фіброзу печінки в залежності від топографічного ураження печінкових дольок [150] (табл. 1.6)

Таблиця 1.6 - Гістотопографічні види фіброзу печінки та їх гістологічні прояви за E.Orfei et al. (2009)

| Види фіброзу печінки | Гістологічні прояви фіброзу |
|-------------------------------------|---|
| Центральний фіброз (перивенулярний) | пошкоджується центральна вена (зона 3) ацинуса. |
| легкий | складається з тонких волокон колагену в синусоїдах перивенулярної області. |
| тяжкий | "склерозуючий гіаліновий некроз", складається з товстих, грубих волокон колагену в синусоїдах перивенулярної області. |
| Портальний та перипортальний фіброз | волокнисте розширення портальних трактів. |
| Перицелюлярний фіброз | фіброз "тонкої дротяної нитки", може поширюватися тотально по всій площині дольки між гепатоцитами. |
| Мостоподібний фіброз | |
| центро-центральний | з'єднання фіброзом двох центральних вен сусідніх печінкових дольок. |
| порто-портальний | з'єднання фіброзом двох портальних вен сусідніх печінкових дольок. |
| порто-центральний | з'єднання центральної вени однієї печінкової дольки з портальним трактом іншої печінкової дольки. |
| Ізольований біліарний | фіброзування окремих біліарних протоків, що не входять до складу тріад. |
| Субкапсулярний фіброз | утворення фіброзної тканини під капсулою печінки. |
| Капсулярний фіброз | безпосередньо фіброзування капсули печінки. |

На сьогоднішній день використовують напівкількісне оцінювання НАСГ і АСГ в балах за алгоритмом FLIP (табл. 1.7), який був запропонований Р. Bedossa (2014) в комбінації з показниками SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) оцінювання стеатозу, активності стеатогепатиту та фіброзу печінки [6,19-20]. Оцінювання НАСГ коливається від 0 до 8 балів, виводиться з суми стеатозу (0-3 бали), балонної дегенерації (0-2 бали) і долькової запальної інфільтрації (0-3 бали) [45,151-153].

Таблиця 1.7 – Алгоритм FLIP бальної оцінки стеатогепатиту [20]

| | НАСГ | SAF |
|----------------------|--|---|
| Система оцінювання | стеатоз+запальна інфільтрація+балонна дегенерація | активність стеатозу (запальна інфільтрація+балонна дегенерація), фіброз S ₀₋₃ , A ₀₋₄ , F ₀₋₄ |
| Параметри активності | стеатоз | стеатоз |
| | S ₀ : < 5% | S ₀ : < 5% |
| | S ₁ : 5%-33% | S ₁ : 5%-33% |
| | S ₂ : 34%-66% | S ₂ : 34%-66% |
| | S ₃ : > 67% | S ₃ : > 67% |
| | запальна інфільтрація (лобулярна) | запальна інфільтрація (лобулярна) |
| | 0:00 | 0:00 |
| | 1: < 2/200x | 1: < 2/200x |
| | 2: 2-4/200x | 2: ≥ 2/200x |
| | 3: > 4/200x | |
| | балонна дегенерація (кількість змінених гепатоцитів) | балонна дегенерація (розмір та форма гепатоцитів) |
| | 0: немає | 0: незмінені гепатоцити |
| | 1: мало | 1: кластери, сітчаста цитоплазма |
| | 2: багато | 2: збільшені гепатоцити |
| | фіброз | фіброз |
| | F0: немає | F0: немає |
| | F1a: Z ₁₋₃ перисинусоїдальний, легкий | F1: Z ₁₋₃ перисинусоїдальний або тільки портальний |
| | F1b: перисинусоїдальний, тяжкий | F2: Z ₁₋₃ перисинусоїдальний + тільки портальний |
| | F1c: тільки портальний | F3: мостоподібний |
| | F2: 1a або 1b+портальний | F4: цироз |
| | F3: мостоподібний | |
| | F4: цироз | |

Оцінка SAF окремо оцінює стеатоз, активність стеатогепатиту та фіброзу, яка коливається від 0 до 4 балів, походить від комбінації значень балонної дегенерації гепатоцитів (0-2 бали) та долькової запальної інфільтрації (0-2 бали). Головна невідповідність між НАСГ і SAF полягає в

тому, що SAF не включає стеатоз у показник активності СГ через його сумнівний внесок у прогресування НАСГ: з практичної точки зору лише фотоцифровий морфометричний аналіз є альтернативним методом градації стеатозу [19-20, 154].

Формування фіброзу при АСГ найчастіше обмежується ураженням порталних трактів, це пов'язано з активацією перипортальних фіброblastів і їх трансформацією в МФБ при токсичній дії ацетальдегіду, з подальшим формуванням септ в яких спостерігається активна дуктулярная проліферація. Перичелюлярний компонент фіброзу також спостерігається при АСГ, що пов'язано з однаковими механізмами гепатоцелюлярного пошкодження. Перивенулярний фіброз зустрічається в 40 % біоптатів печінки вже на ранніх стадіях АСГ і вважається важливим показником розвитку цирозу печінки.

Розроблені ПМ класифікації і градації фіброзу печінки при СГ в операційному і аутопсійному матеріалі, які базуються лише на урахуванні зональної локалізації фіброзу в печінкових дольках, не завжди можуть бути застосованими для ПМ діагностики трепанобіоптатів печінки, які відрізняються обмеженим числом неупорядкованих дольок в зрізах біоптату. Тому деякі патологи [149] градуують фіброз печінки при стеатогепатиті на 4 ступеня тяжкості (F1 - мінімальний, F2 - помірний, F3 - тяжкий і F4 - цироз печінки), за аналогією з давно застосованою в патоморфологічній практиці градацією гепатофіброза за METAVIR для хронічного вірусного гепатиту.

1.4 Патоморфологічні критерії та класифікації цирозу печінки при неалкогольному і алкогольному стеатогепатиті

У пацієнтів з НАСГ хвороба залишається стабільною в 34-50 %, поліпшення стану і регресування відбувається лише в 18-29 %, прогресування з формуванням фіброзу відбувається в 26-37 %, а фіброз прогресує в ЦП в 9-25 % [155], за іншими даними ЦП виявляється серед 15-

20 % пацієнтів [59,156]. Формуванню алкогольного ЦП сприяє щоденне вживання алкоголю в дозі більше 60 г на добу, що спочатку призводить до формування стеатозу печінки, який у 5-15 % випадків прогресує в фіброз і ЦП, щороку летальність від АСГ становить до 20 тис. людей.

У США летальність від алкогольного ЦП у 1994-2004 рр. мала досить високий рівень (13,6 %) і у 46 % пацієнтів була пов'язана з продовженням зловживання спиртними напоями [106-107]. Алкоголь залишається другою причиною захворювань печінки у США після зараження вірусом гепатиту С, що становить приблизно 20-25 % випадків ЦП і близько половини всіх госпіталізацій серед пацієнтів з ЦП. У 10 - 15 % людей реєструється ЦП на тлі тяжкого алкоголізму. Алкоголь залишається третьою найбільш поширеною причиною смерті після паління і гіпертонії в Світі [157].

Показники летальності від алкогольного ЦП варіюють з 15-кратною різницею між європейськими країнами. В Австрії, Франції, Німеччині, Італії, Португалії, Іспанії, Угорщині та Румунії зареєстровано зниження летальності від цирозу печінки [158], тоді як в Фінляндії, Ірландії, Естонії, Литві та Польщі, зберігається стійка тенденція до зростання алкогольного ЦП. Епідеміологічні особливості обумовлені як генетичними чинниками, так і доступністю алкоголю та поширеністю супутніх захворювань печінки [159]. Смертність від алкогольного ЦП в Росії в 1993-2005 рр. зросла в порівнянні з 1980-1992 рр. в 2,2 рази, у Білорусі у 2000-2005 рр. - збільшилась майже вдвічі [110]. В Україні протягом 1991 - 2002 рр. смертність від ЦП серед чоловіків зросла в 3 рази. Абсолютний показник зареєстрований в 2004 році (18063 смертей від ЦП) був найвищим за всю історію України [160]. На сьогоднішній день достовірні дані про поширеність АСГ в Україні відсутні.

Цироз печінки - дифузний процес, при якому порушується долькова структура і ангіоархітектоніка печінки, в результаті чого формуються «псевдодольки», розділені волокнистою тканиною, які є результатом регенеративної гіперплазії після гепатоцелюлярного пошкодження [161].

Цироз печінки був вперше анатомічно описаний G.V.Morgagni в 1761 році та, завдяки жовтувато-коричневому кольору печінки, був названий R. Laënnec в 1826 році як «цироз». Лише у 1930 році Ressler визначив цироз як процес паренхіматозного переродження, регенерації і рубцювання печінки. На міжнародному Конгресі гастроентерологів у Лос-Анджелесі [162] у 1994 році була підтверджена морфологічна класифікація цирозу печінки, раніше прийнята XX Всесвітньою асоціацією гепатологів (Акапулько, 1974) та ВООЗ (1978), згідно якої виділяють [163]:

- мікронодулярний цироз печінки (діаметр вузлів 1–3 мм),
- макронодулярний цироз печінки (діаметр вузлів більш за 3 мм),
- неповний септальний цироз печінки,
- змішаний цироз (вузли різні за розмірами).

За останні 30 років змінились уявлення про сутність цирозу печінки. На теперішній час відомо 5 морфогенетичних критеріїв цирозу печінки: некомпенсована 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 [150].

Стійкі зміни в печінці, які мікроскопічно проявляються феноменом капіляризації внутрішньодолькових синусоїдів, надмірним артеріокапілярним ангиогенезом, відсутністю синусоїдального ремоделювання в регенераторних вузлах, а також атрофією печінкових дольок в результаті редукції портального кровотоку є основними відмінностями цирозу від важкого фіброзу печінки та критичними критеріями сформованого цирозу [164]. Роль синусоїдальних клітин в морфогенезі алкогольного цирозу печінки була визначена Т.П. Бекетовою (1991 р.), яка при ультраструктурних дослідженнях взаємодій гепатоцита з синусоїдальними клітинами довела, що в морфогенезі алкогольного цирозу печінки відіграють два види клітинних кооперацій: гепатоцит – ПЗК –

ендотеліоцит та ПЗК – ліпоцит – ендотеліоцит, для яких характерна активація колагенсинтетичної функції перисинусоїдальних клітин печінки.

Дані про морфологічні зміни в печінці при прогресуванні цирозу майже відсутні. П'ятий Панамериканський конгрес гастроентерологів (Гавана, 1956р.) рекомендував оцінювати прогресування цирозу печінки в повторних пункційних біопсіях за рецидивами «мостоподібних» або «ступінчастих» некрозів печінки. В національному керівництві Росії з патологічної анатомії 2011 року [165] 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.

На сьогоднішній день найбільш прийнятою є градація цирозу печінки за Laennec) [151], в якій за гістологічними критеріями в балах визначається стадія цирозу печінки (табл. 1.8.).

Таблиця 1.8 - Градація цирозу за Laennec (2012)

| Стадія | Градація | Гістологічні критерії | Бал |
|--------|--------------------|---|-----|
| 0 | Фіброз відсутній | немає | 0 |
| 1 | Мінімальний фіброз | Септи відсутні або зустрічаються поодинокі тонкі септи; може бути присутній порталний фіброз або слабкий синусоїдальний фіброз. | 1 |
| 2 | Слабкий фіброз | Наявність тонких септ; може бути присутній порталний фіброз або слабкий синусоїдальний фіброз. | 2 |
| 3 | Помірний фіброз | Наявність помірних неповних тонких септ (мостоподібний фіброз) | 3 |
| 4А | Цироз (слабкий) | Визначаються контури округлих септ або наявність вузликів. Більшість септ тонкі (присутня 1 широка септа) | 4 |
| 4В | Цироз (помірний) | Мінімум 2 широкі септи або <1/2 площі біопсії складається з мікровузликів | 5 |
| 4С | Цироз (тяжкий) | Мінімум 1 широка септа або > 1/2 площі біопсії складається з мікровузликів | 6 |

1.5 Гепатоцелюлярна карцинома печінки у хворих на хронічний неалкогольний і алкогольний стеатогепатит

За даними ВООЗ за 2012 рік ГЦК складає 70 % - 85 % всіх випадків карцином печінки та посідає шосте місце за частотою злоякісних новоутворень в світі, четверте місце по частоті серед чоловіків і сьоме - серед жінок, та третє місце - за частотою причин смерті від раку [166-169]. Близько 80 % випадків ГЦК зустрічаються в менш розвинених країнах і зазвичай пов'язані зі зловживанням алкоголю, хронічними вірусними гепатитами В та С [170-171]. Ризик розвитку ГЦК від зловживання алкоголю складає 1,1 %, при захворюванні ХВГС - 2,9 %, при неалкогольній ЖХП - 3,1 % [172]. У зв'язку зі зростанням ожиріння та діабету прогнозується зростання ГЦК на тлі неалкогольної ЖХП [65,173-174].

НАСГ є визнаною причиною цирозу і пов'язаний з розвитком ГЦК; серед хворих на НАСГ з цирозом печінки летальність складає 30-40 %, але частка ГЦК в летальності хворих не визначна. Експериментальні дослідження і ретроспективний аналіз показав, що ризик прогресування НАЖХП в ГЦК складає на стадії простого стеатозу печінки 0-0,5 %, на стадії НАСГ - 0-2,8 % і на стадії цирозу печінки - 40-62 % [66,175]. Патоморфологічні дослідження ГЦК у хворих на НАСГ і АСГ відсутні.

Таким чином, аналіз літературних даних свідчить, що до теперішнього часу дискусійними залишаються питання достовірних патоморфологічних відмінностей НАСГ і АСГ та повноцінної ПМ оцінки їх активності в трепанобіоптатах печінки хворих. Вкрай недостатньо вивчені особливості регенерації гепатоцитів при цих хворобах. Чітко не визначені морфологічні параметри розвитку основних типів фіброзу та прогресування цирозу печінки при НАСГ і АСГ. Поступово накопичуються дані стосовно раку печінки, який може розвиватися у хворих на НАСГ і АСГ, але дані з патоморфології ГЦК у цієї категорії хворих відсутні.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали дослідження

Досліджена печінка 305 хворих на НАСГ і АСГ (213 біоптатів печінки і 92 секційних спостереження), а також трепанобіоптати печінки 30 пацієнтів групи умовного контролю. Патоморфологічні дослідження біоптатів печінки 213 хворих на НАСГ і АСГ, трепанобіоптатів печінки 30 пацієнтів умовного контролю, аутопсійного матеріалу печінки 92 померлих хворих на НАСГ і АСГ виконані в патологоанатомічному відділенні Університетської клініки Запорізького державного медичного університету (ЗДМУ). Проведено ретроспективний аналіз клініко-лабораторних даних всіх пацієнтів з їх історій хвороби, а також ПГ аналіз частоти ГЦК серед 359 померлих зі стеатозом печінки з архіву Запорізького обласного бюро судово-медичної експертизи (ЗОБСМЕ)

Черезшкірні пункційні трепанобіопсії печінки виконувалися після отримання інформованої згоди пацієнтів хірургом 3-ої клінічної лікарні м. Запоріжжя голками Uni-Cut і BioCut 14-16G під контролем апарату УЗД Conbizon-320-5 Ultima-Pro-30. При пункції одержували 2-3 стовпчики тканини печінки, завдовжки 2 см, що відповідало стандарту для подальшого патоморфологічного дослідження [176]. Інтраопераційні лапароскопічні біопсії печінки після отримання інформованої згоди пацієнтів виконувалися хірургами Запорізької обласної клінічної лікарні.

Відповідно до укладених угод між ЗДМУ, Запорізьким обласним патологоанатомічним бюро (ЗОПАБ) та ЗОБСМЕ розтини померлих хворих на НАСГ і АСГ виконувалися дисертантом-патологоанатомом у відділенні НДЦ ЗОПАБ, матеріал печінки померлих хворих на АСГ також забирався дисертантом при розтинах в танатологічному відділенні ЗОБСМЕ. Весь біопсійно-секційний матеріал був розділений за віком відповідно до вікової

періодизації ВООЗ (2016) [177] на пацієнтів молодого віку (18-44 років), середнього віку (45-59 років), похилого віку (60-74 років), а також за статтю (чоловіки/жінки).

Печінка хворих на АСГ і НАСГ була досліджена в 2-х основних групах спостережень. І групу спостережень склали 107 хворих на АСГ віком від 25 до 63 років (55 чоловіків – 51 %, та 52 жінки – 49 %), з яких було 46 осіб молодого віку (жінок – 19, чоловіків - 27), 51 особа середнього віку (жінок – 23, чоловіків - 28) та 10 осіб похилого віку (жінок – 3, чоловіків - 7). В І групі досліджена печінка 67 померлих хворих, які за життя зловживали алкоголем і мали при розтині ознаки стеатогепатиту, а також трепанобіоптати печінки 40 хворих на АСГ.

ІІ групу спостережень склали 198 хворих на НАСГ віком від 25 до 74 років (107 чоловіків – 54 %, та 91 жінка – 46 %), у яких за ретроспективним аналізом історій хвороби визначена відсутність зловживання алкоголем, наявність надлишкової маси тіла ($IMT > 25$), цукрового діабету 2 типу тривалістю не менше 1 року (рівень глюкози більше 5,5 ммоль/л по глікемічному профілю або за рівнем глікогемоглобіна $> 5,7\%$), а також підвищений рівень ліпідів в плазмі крові. В ІІ групі досліджена печінка 25 померлих хворих на НАСГ, а також трепанобіоптати печінки 173 хворих на НАСГ. У ІІ групі хворих на НАСГ було 77 осіб молодого віку (жінок – 34, чоловіків - 43), 78 осіб середнього віку (жінок – 34, чоловіків - 44) та 43 особи похилого віку (жінок – 18, чоловіків - 25).

ІІІ групу умовного контролю склали біоптати печінки 30 пацієнтів віком 25-65 років (12 жінок, 18 чоловіків), що не страждали на стеатогепатит та не мали гістологічних ознак фіброзу печінки (10 трепанобіоптатів на віддаленні від дрібної гемангіоми печінки і 20 лапароскопічних біоптатів печінки, отриманих при лапароскопічній холецистектомії з приводу каменів жовчного міхура).

Дизайн досліджень відображено на рисунку 2.1.



Рисунок 2.1 – Дизайн дослідження.

2.2 Методи та методики досліджень

Для ПГ, ГХ і ІГХ досліджень аутопсійний і пункційно-біопсійний матеріал печінки фіксували в нейтральному 10% забуференому формаліні (рН 7,0) і заливали в парафін. На прецизійному ротаційному мікротомі НМ 3600 («MICROM Laborgerate GmbH» - Німеччина) виготовляли серійні стандартні зрізи завтовшки 4 μ m, які розміщували на звичайні предметні скельця (для оглядового патогістологічного забарвлення) або на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» фірми «DAKO» (Данія) - для імуногістохімічних досліджень. Мікрофотографії гістологічних і ІГХ препаратів печінки виконувалися в мікроскопі AxioPlan 2 (фірми «Carl Zeiss» - Німеччина) за допомогою цифрової фотокамери Camedia C5060WZ Olympus (Японія).

Гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні та морфометричні методи досліджень. Наявність стеатозу гепатоцитів печінки оцінювали в серійних парафінових зрізах, забарвлених гематоксиліном і еозином, а також

в певних випадках в заморожених зрізах, забарвлених Суданом III методом Герксгеймера. Ступінь стеатозу печінки визначали методом фотоцифрової МФМ в мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, з використанням медичної програми обробки цифрових зображень ImageJ [Rasband WS (1997-2012)] із застосуванням власно розробленої методики [Пат. №112148 Україна, 2016]. В мікроскопі AxioPlan 2 («CarlZeiss», Німеччина) цифровою фотокамерою Camedia C5060WZ «Olympus 3040» (Японія) фотографували в кожному мікропрепараті печінки по 5 стандартизованих полів зору мікроскопа (СПЗМ) при збільшенні $\times 400$. Далі в плагіні Colour Deconvolution програми ImageJ у вбудованій схемі аналізу отримане зображення сегментували, переводили в бінарне і підраховували у % число пікселів, які відповідали площі стеатозу в печінковій дольці. За градацією E.M. Brunt, D.E. Kleiner (2005) [56] визначали легкий S_1 ступінь стеатозу печінки (наявність в СПЗМ печінки від 5 до 33 % гепатоцитів з переважно мікро- або з макровезикулярним стеатозом), помірний S_2 ступінь стеатозу печінки (наявність в СПЗМ печінки від 34 до 66 % клітин з переважно макровезикулярним або змішаним стеатозом), тяжкий S_3 ступінь стеатозу печінки (наявність в СПЗМ печінки більше 66 % гепатоцитів зі змішаним стеатозом).

У парафінових зрізах, забарвлених методом Ван-Гізона і Масон-триколор, відповідно до модифікованої градації E.M. Brunt, D.E. Kleiner, L.A. Wilson et al. (2011) [146] визначали перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний тип фіброзу печінки, а також ступінь його тяжкості: легкий - F_1 , помірний - F_2 , тяжкий F_3 фіброз і F_4 цироз печінки. Ретикулярні волокна в зрізах печінки виявляли імпрегнацією сріблом за Гоморі, еластичні волокна виявляли методом Унни-Тенцера.

Гістохімічні дослідження з виявлення тривалентного Fe^{3+} заліза та двовалентного Fe^{2+} заліза були проведені у 35 хворих на АСГ (в 15 трепанобіоптатах печінки і в 20 секційних спостереженнях) і у 15 хворих

НАСГ в трепанобіоптатах печінки. Наявність тривалентного заліза (Fe^{3+}) виявляли методом Перлса, а наявність двовалентного заліза (Fe^{2+}) визначали паралельним забарвленням серійних парафінових зрізів печінки за методом Тірмана-Шмельцера [176,178] і методом Хьюкіла-Пути з батофенантроліном [179] за власною модифікацією [Пат. № 108321 Україна, 2016]. Мікроскопічно визначали розподіл Fe^{3+} і Fe^{2+} в гепатоцитах і макрофагах, а також у ПЗК матриці печінки. Для оцінки вмісту і ступеня внутрішньоклітинного депонування різновалентного заліза підраховували відсоток залізовмісних гепатоцитів і макрофагів Купфера в центролобулярних Z_3 , проміжних Z_2 і перипортальних Z_1 зонах печінкових дольок в 5 СПГЗ печінки. Ступінь накопичення (депонування) заліза в клітинах печінки оцінювали у відсотках (%) за градацією G.D. LeSage (1983) в модифікації М. Torbenson (2009) [105], відповідно до якої виділяли мінімальний G1 ступінь депонування (<5 % залізовмісних клітин в СПГЗ печінки), легкий G2 ступінь (наявність 5-30 % залізовмісних клітин в СПГЗ печінки), помірний G3 ступінь (наявність від 31 до 60 % залізовмісних клітин в СПГЗ печінки) і тяжкий G4 ступінь накопичення заліза (наявність > 60 % залізовмісних клітин в СПГЗ печінки). Відсутність заліза в гепатоцитах і макрофагах відповідало G0 ступеню.

ІГХ дослідження виконували в парафінових зрізах з використанням моноклональних і поліклональних антитіл. Депарафінізацію і регідrataцію з одночасним високотемпературним демаскуванням антигенів здійснювали шляхом нагріванням в автостейнері з РТ-модулем (фірми «Thermo Fisher Scientific», США) в Dewax & HIER буфері Н фірми «Thermo Fisher Scientific», США (рН = 9,0), пригнічували активність ендогенної пероксидази 3% розчином H_2O_2 і наносили протеїновий блок. Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників, візуалізацію ІГХ-реакції виконували з використанням системи детекції UltraVision Quanto HRP

+ DAB System («Thermo Scientific», США). Зрізи дозобарвлювали гематоксиліном Майєра та заключали в канадський бальзам.

Для ідентифікації прогеніторних клітин печінки використовували антитіла: Polyclonal Rb a-Hu CD 117, c-kit («ДАКО», Данія), Мо a-Hu CD34, *Clone QBEnd/10* («Thermo Scientific», США), Мо a-Hu CD44 Std./НСАМ Ab-4, *Clone 156-3C11* («Thermo Scientific», США), Мо a-Hu CD56, *Clone T199* («NeoMarkers» США).

Біліарні клітини печінки ідентифікували антитілами: Мо a-Hu Cytokeratine 7, *Clone OV-TL 12/30* («Thermo Scientific», США), Мо a-Hu Cytokeratine 19, *Clone RCK 108* («ДАКО», США). Для ідентифікації гепатоцитів застосовували HepPar-1 Мо a-Hu Hepatocyte, *Clone QBEnd/10* («Thermo Scientific», США), Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein («Thermo Scientific», США).

Виявлення клітин Купфера і моноцитарних макрофагів здійснювали за допомогою Мо a-Hu CD68, *Clone PG-M1* («ДАКО», Данія) і Rb a-Hu S100, *Clone A4* («NeoMarkers», США); склад імуноклітинних інфільтратів в дольках і в порталних трактах печінки визначався антитілами: Мо a-Hu CD4, *Clone MT310* («ДАКО», Данія), Мо a-Hu CD8, *Clone C8 / 144B* («ДАКО», Данія), Мо a-Hu Plasma Cell Ab-1, *Clone LIV3G11* («NeoMarkers», США).

Для ідентифікації фіброгенних клітин печінки застосовували: Мо a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA), *Clone 1A4* («ДАКО», Данія), Мо a-Hu Vimentin, *Clone V9, RTU* («ДАКО», Данія), Мо a-Hu Desmin, *Clone D33, RTU* («ДАКО», Данія). Склад молекулярного позаклітинного матриксу ідентифікували антитілами: Rb Fibronectin, RTU («ДАКО», Данія), Мо a-Hu Fascin Ab1, *Clone FCN01* («NeoMarkers», США), Rb Laminin Ab-1 («Thermo Scientific», США). Типи колагену ідентифікували антитілами: 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 Seientific», США).

Для визначення проліферації клітин печінки застосовували Мо а-Ну Ki-67 Antigen, *Clone SP6* («NeoMarkers», США); апоптоз в клітинах печінки визначався з використанням антитіл Мо а-Ну Caspase 3 Ab-3, *Clone 3CSP* («NeoMarkers», США).

У біоптатах печінки 80 хворих на НАСГ з перисинусоїдально-перицелюлярним фіброзом печінки (40 випадків) і з портально- Z_{1-3} перисинусоїдальним фіброзом (40 випадків) легкого - F_1 ступеню тяжкості, помірного - F_2 , важкого F_3 фіброзу і F_4 фіброзу/мікронодулярного цирозу печінки (по 20 випадків) виконана порівняльна фотоцифрова морфометрія (ФЦММ) площі накопичення сполучної тканини, забарвленої методом Масон-трикоколор, а також ФЦММ площі розповсюдження α -SMA-позитивних клітин та площі депонування колагену I, III і IV типу у відповідних ІГХ мікропрепаратах. ФЦММ виконувалася у стандартизованій площі гістологічного зрізу печінки (СПГЗП), яким було фотоцифрове зображення зрізу печінки в фотокамері Camedia C5060WZ (Olympus, Японія), зняте на мікроскопі AxioPlan 2 «Carl Zeiss» (Німеччина) при збільшенні $\times 200$. У кожному випадку в 5 СПГЗП мікропрепарату фотографували печінкові дольки і портальні тракти з відповідним фіброзом, що виявляється методом Масон-трикоколор або ІГХ маркерами. В отриманих цифрових ГХ або ІГХ зображеннях відповідного фіброзу печінки в програмі Image J [130] визначали інтенсивність експресії ГХ або ІГХ маркерів і градуювали її в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ) на 4 рівня: негативна реакція – 0-20 УООЩ; низький рівень експресії – 21-50 УООЩ; помірний рівень експресії – 51-100 УООЩ; високий рівень експресії – більше 100 УООЩ. Відносні площі, займані ГХ або ІГХ імунопозитивним матеріалом, визначали в програмі Image J як відсоткове співвідношення числа пікселів відповідного ГХ або ІГХ імунопозитивного матеріалу до загального числа пікселів у цифровому ГХ або ІГХ зображенні перисинусоїдально-перицелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки.

Високоєфективний рідинний хромато-мас-спектрометричний метод дослідження. Дослідження, згідно укладеного договору, проведені на кафедрі фізколоїдної хімії разом з доцентом Б.О. Варинським. В експериментальній моделі на свинячій печінці розробили оптимальні параметри селективної екстракції холестерину, стеаринової і пальмітинової кислот, пісоя чого були проведені дослідження аутопсійного матеріалу печінки 25 хворих НАСГ [Пат. на винахід № 116968 Україна, 2017].

У померлих хворих брали по 2 зразки тканини печінки, один з яких фіксували в 10% забуференому формаліні для патоморфологічного дослідження, а другий без фіксації в формаліні використовували для ВЕР-ХМС. Для ВЕР-ХМС аналізу з нефіксованого зразка тканини печінки, який попередньо зважували на аналітичних вагах АВТ 100-5М («Kern», Німеччина) відбирали навіску тканини (200мг), яку гомогенізували 1 хвилину в епандорфі, додаючи ізопропанол до початку гомогенізації і після її закінчення. Потім гомогенат печінки інкубували 15 хв. в ультразвуковій ванні Хуба 3 («GrantLtd», Великобританія) при температурі 77⁰С, після чого - центрифугували протягом 10 хвилин при 15000 об/хв на центрифuzі (ULAB UC-1512, Китай). Отриманий супернатанат фільтрували через мембранний нейлоновий фільтр (розмір пор 0,2 мкм) і переміщали в віали. Дослідження холестерину, стеаринової і пальмітинової кислот проводили рідинно-рідинною екстракцією зразків печінки з подальшим ВЕР-ХМС аналізом отриманих екстрактів на приладі Agilent 1260 Infinity HPLC System (США) і на одноквадрупольному мас-спектрометрі Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї (ESI) OpenLAB CDS Software із застосуванням внутрішніх стандартів: холестерину - fill. code (507363) C7509-STD концентрація 200mg/dl (5,18 mmol/l) фірми Pointe Scientific (США), пальмітинової кислоти - fill. code (15104054) фірми Fluka (США), puriss. p.a. standart for GC \geq 98,5% і стеаринової кислоти - fill. code (22303079) фірми Fluka (США), puriss. p.a. standart for GC \geq 99,5 %. При проведенні ВЕР-ХМС бінарний градієнт

становив - елюент А: 60 % деіонізованої H_2O , 40 % CH_3CN , 0.1% $HCOOH$, 10mM $HCOONH_4$; елюент В: 10 % CH_3CN , 90 % ізопропілового спирту, 0.1 % $HCOOH$, 10mM $HCOONH_4$ (0 хв. – 32 % елюенту В, 5 хв. – 100 % елюенту В, 10 хв. – 100 % елюенту В); швидкість елюенту 0,4 мл/хв, час хроматографування 10 хв. в колонці Zorbax SB - C18; 30 мм x 4,6 мм; 1,8 мкм з предколонкою при температурі колонки $55^{\circ}C$, з джерелом іонів електроспрею, в режимі селективного моніторингу іонів для холестерину, стеаринової і пальмітинової кислот (SIM) m/z 369, 283, 255 згідно моноізотопним масам протонуваних молекул, при напрузі на фрагментаторі 100, 150 і 150В. Дослідження холестерину проводили при позитивній полярності, дослідження стеаринової і пальмітинової кислот - при негативній полярності. Температура азоту становила $300^{\circ}C$. Тиск на небулайзері 60 psig. Швидкість газоосушувача азоту - 10 л/хв. Всі дані фіксувалися на хроматограмах.

Електронно-мікроскопічний метод дослідження. ЕМ дослідження проведено в трепанобіоптатах печінки 5 хворих на АСГ і в аутопсійному матеріалі печінки 5 хворих на НАСГ, взятому через годину після смерті хворих. Дрібні шматочки печінки $1 \times 1 \times 2$ мм фіксували в 2,5 % глутаральдегіді на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,3) при $t +4^{\circ}C$ з подальшим контрастуванням в 1 % OsO_4 протягом 2 год., зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації (35, 50, 60, 70, 80, 95, 100 %), далі в ацетоні і пропіленоксиді з додатковим контрастуванням протягом години в 2,5 % спиртовим розчином ураніацетату і 1% розчином фосфорно-вольфрамової кислоти в 100 % ацетоні за Хемптоном, поступово просочували пропіленоксидом з епон-аралдитним компаундом (3:1; 1:1; 1:3) і заливали в епон-аралдит. Полімеризацію смол проводили при $t +37^{\circ}C$ і $+60^{\circ}C$. На ультратомі Reichert Om43 отримували напівтонкі (1-2 μm) зрізи, які забарвлювали метиленовим синім, та ультратонкі (45-60 nm) зрізи. Ультратонкі зрізи контрастували спиртовим розчином ураніацетату (10

хвилин при 56⁰C) та цитратом свинцю за Рейнольдсом (30 хвилин при кімнатній температурі) і вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01 при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Статистична обробка результатів досліджень. Статистичну обробку отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері в програмі «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія 46 № AXXR712D833214FAN5). Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли з використанням критерію Шапіро-Уїлка. Для кількісних даних, розподілених за нормальним законом розподілу, обчислювали середнє значення (M), середнє квадратичне відхилення (σ), стандартну помилку репрезентативності середнього значення (m), розраховували 95% довірчий інтервал середнього значення. 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 - середній ступінь поєднання ознак; від 0,7 і вище - сильний зв'язок між ознаками які вивчаються. Достовірність відмінностей порівнюваних величин визначали за допомогою t-критерію Стьюдента.

Дані, розподіл яких відрізняється від нормального, представляли за допомогою медіани і міжквартильного розмаху Me (Q1; Q3), порівняння отриманих даних у 2 групах проводили за допомогою непараметричного U-критерія Манна-Уїтні для двох незалежних груп. Для порівняння даних в 3-х групах спостережень використовувався непараметричний однофакторний дисперсійний аналіз Краскела-Уоліса (H-критерій).

Для оцінки зв'язків між лабораторними і патогістологічними маркерами використовували непараметричний аналіз з обчисленням коефіцієнта гамма (γ), значення якого від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак, від 0,3 до 0,69 - підтверджувало середній ступінь зв'язку ознак, значення γ від 0,7 і вище свідчило про наявність сильного зв'язку між ознаками. Для всіх видів аналізу відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ЗАГАЛЬНА ПАТОМОРФОЛОГІЯ АЛКОГОЛЬНОГО І НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТУ ТА ПРОСТОГО СТЕАТОЗУ ПЕЧІНКИ

При ПГ, ГХ і ЕМ дослідженнях біопсійно-секційного матеріалу встановлено, що у хворих на НАСГ і АСГ в печінці визначаються своєрідні, неспецифічні ПМФ зміни, які проявляються стеатозом гепатоцитів, запально-клітинною інфільтрацією і фіброзом печінки різного ступеня виразності.

За результатами мікроскопічного аналізу біопсійно-аутопсійного матеріалу печінки визначено, що у хворих на НАСГ і АСГ в гепатоцитах може спостерігатися мікроевезикулярний стеатоз (рис. 3.1), макроевезикулярний стеатоз (рис. 3.2), середньоевезикулярний стеатоз (рис. 3.3), або їх комбінація в одному й тому ж гепатоциті, чи їх комбінація в межах печінкової дольки з переважанням одного з визначених видів стеатозу. При будь-якому з перелічених різновидів стеатозу в цитоплазмі гепатоцитів визначаються ліпідні краплі відповідного розміру, які забарвлюються в заморожених зрізах суданом III у жовто-помаранчевий колір або у жовтий колір з помаранчевою облямівкою, ліпідні краплі також визначаються як цитоплазматичні оптично порожні вакуолі відповідного розміру при забарвленні парафінових зрізів гематоксиліном та еозином. При мікроевезикулярному стеатозі в цитоплазмі гепатоцитів з центрально розташованим ядром визначається багато дрібних ліпідних крапель, діаметром від 4-5 μm до 20 μm (рис. 3.1), при макроевезикулярному стеатозі в цитоплазмі гепатоцитів визначається декілька крупних ліпідних крапель діаметром понад 30 μm , які зміщують ядро на периферію клітини (рис. 3.2). Відносно рідким різновидом мікроевезикулярного стеатозу є так звані «пінясті гепатоцити» (рис. 3.4), цитоплазма яких заповнена безліччю дрібних ліпідних крапель, діаметром 4-5 μm , що надають цитоплазмі пінястий вигляд.

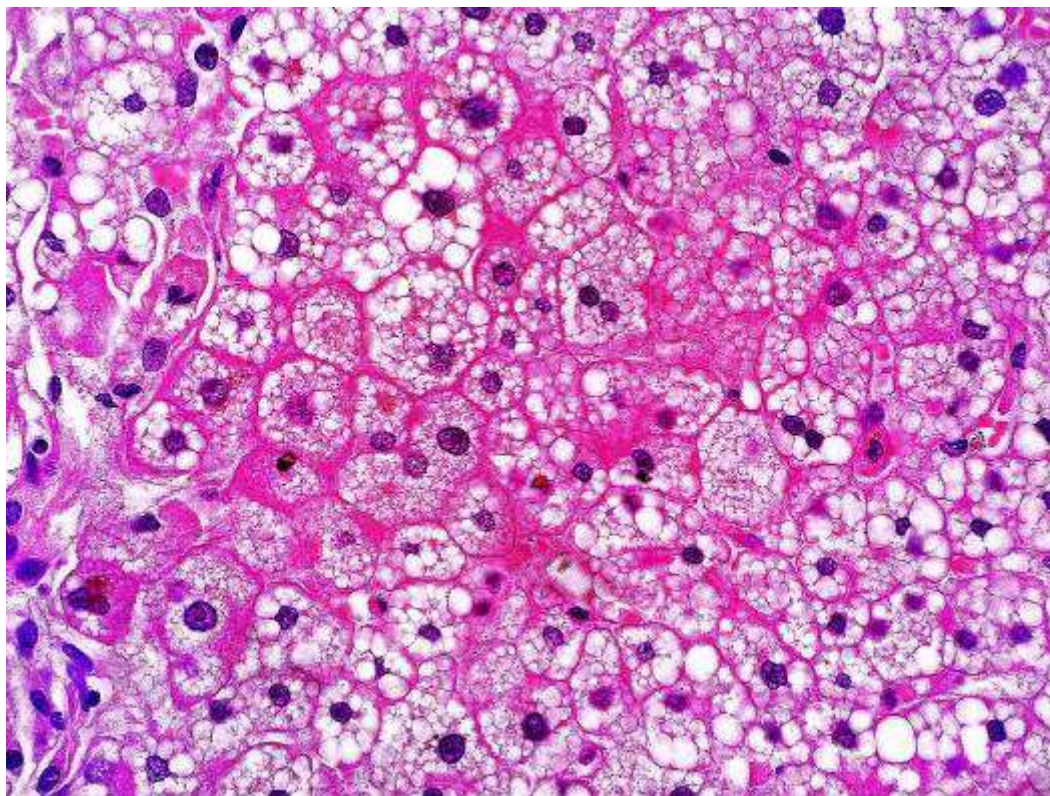


Рисунок 3.1 – Мікроевезикулярний стеатоз гепатоцитів при АСГ.
Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 600.

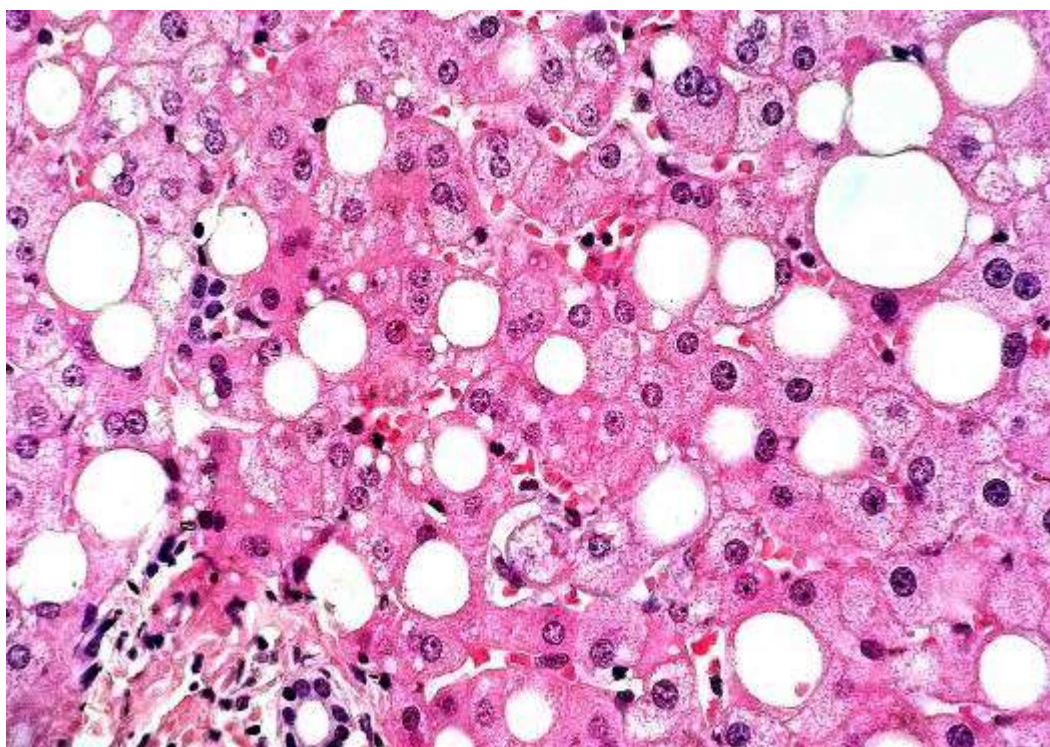


Рисунок 3.2 – Макроевезикулярний стеатоз гепатоцитів при НАСГ.
Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 600.

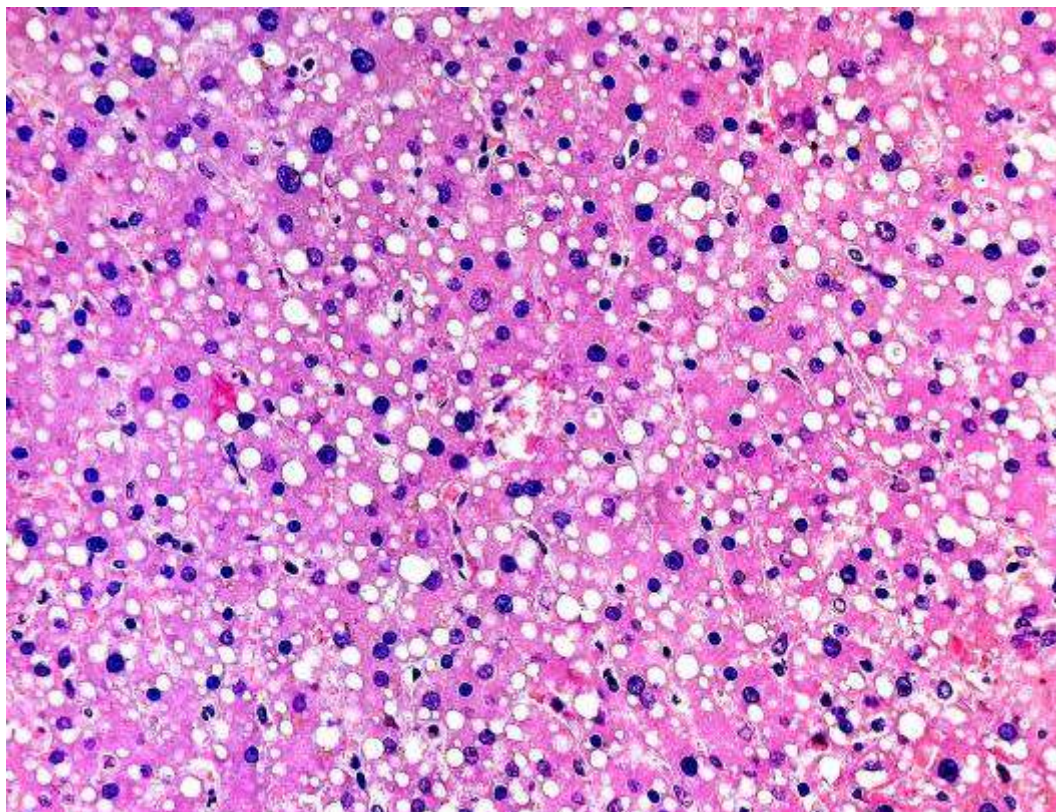


Рисунок 3.3 – Середньовезикулярний стеатоз гепатоцитів при НАСГ.
Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

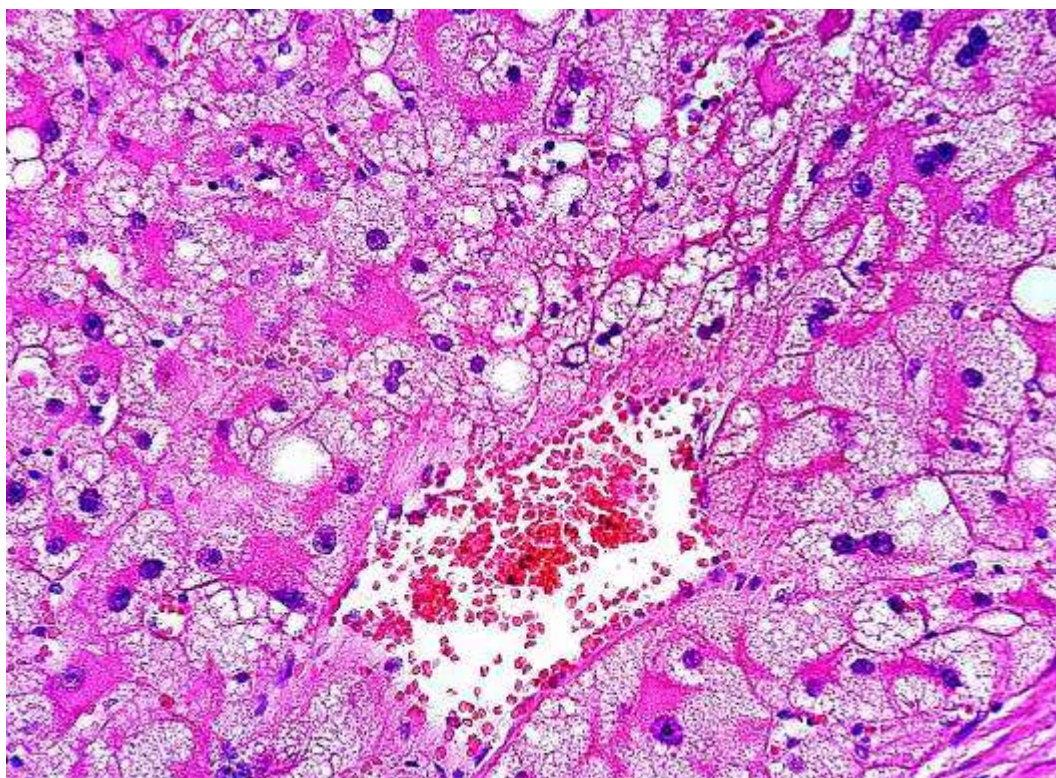


Рисунок 3.4 – «Пінясті» гепатоцити при АСГ. Забарвлення
гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

За даними ЕМ дрібні ліпідні краплі за розмірами порівнянні з дрібними і середніми мітохондріями, розміри великих ліпідних крапель перевищували розміри великих мітохондрій і розміри ядер гепатоцитів (рис. 3.5). Дрібні ліпідні краплі локалізовані або в розширених цистернах гладкої ендоплазматичної сітки (ЕС), або в цитозолі поряд з цистернами гладкої ЕС звичайної ультраструктури (рис. 3.5). Крупні ліпідні краплі і ліпідні краплі середнього розміру не мають зв'язку з цистернами гладкої ЕС і найчастіше локалізуються відокремлено в цитозолі гепатоцита (рис. 3.6). Ліпідні краплі мають гомогенну ультраструктуру низької електронної щільності, яку надають їй тригліцериди, і не мають зовнішньої мембрани. Зовнішня поверхня ліпідних крапель вкрита тонким моношаром з функціональних білків і ферментів, які здатні змінювати розміри ліпідних крапель, а також склад їх ліпідів. Всередині і на периферії ліпідних крапель визначаються гомогенні білкові включення середньої електронної щільності. Інколи дрібні, середні і крупні ліпідні краплі з'єднані між собою вузькими ліпідними перемичками. Про активний стан ліпідних крапель свідчать множинні дрібні кавеоли на межі крапель і цитозоля гепатоцита, які забезпечують транспорт ліпідів з краплі в цитозоль, або з цитозолю гепатоцита в ліпідну краплю. При важкому стеатозі гепатоцитів перинуклеарно розташовані ліпідні краплі поглиблюються в ядро клітини в інвагінаціях каріолеми і на поперечних зрізах можуть імітувати ліпідні включення в каріоплазмі (рис. 3.6).

Характерною мікроскопічною особливістю стеатозу гепатоцитів при НАСГ і АСГ є певна зональність розташування гепатоцитів зі стеатозом в різних за кисневим та субстратним забезпеченням метаболічних зонах печінкових дольок: в перипортальних Z_1 зонах, в проміжних Z_2 зонах, або в централобулярних Z_3 зонах. В багатьох випадках гепатоцити зі стеатозом охоплювали одночасно перипортальні Z_1 , проміжні Z_2 і централобулярні Z_3 зони дольок печінки (рис. 3.7), або розташовувалися в централобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зонах печінкових дольок (рис. 3.8).

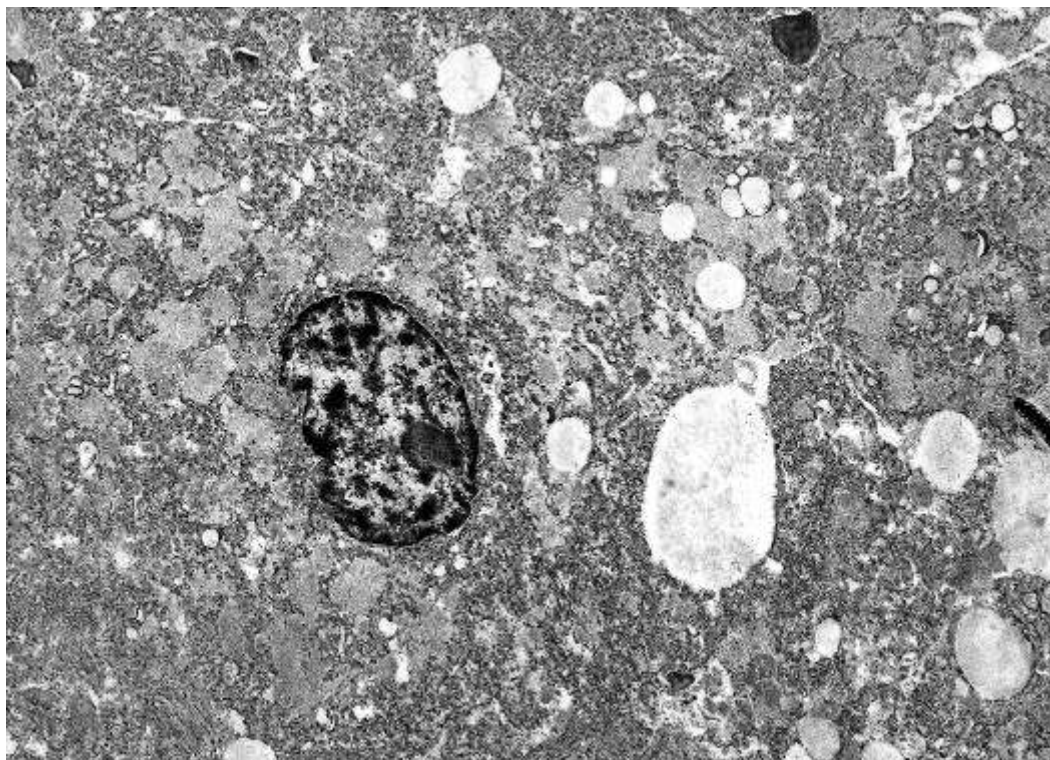


Рисунок 3.5 – Мікро-макроевезикулярний стеатоз гепатоцитів при АСГ.
Електронограма. Зб.: x 1200.

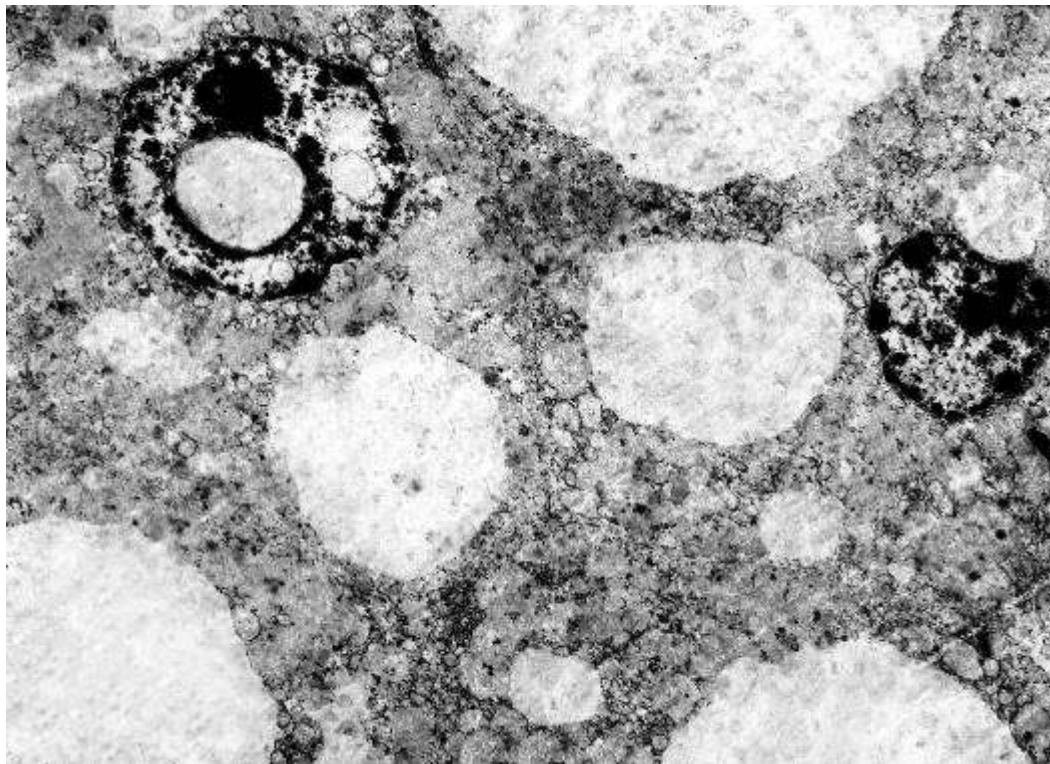


Рисунок 3.6 – Макроевезикулярний стеатоз гепатоцита при НАСГ.
Електронограма. Зб.: x 2400.

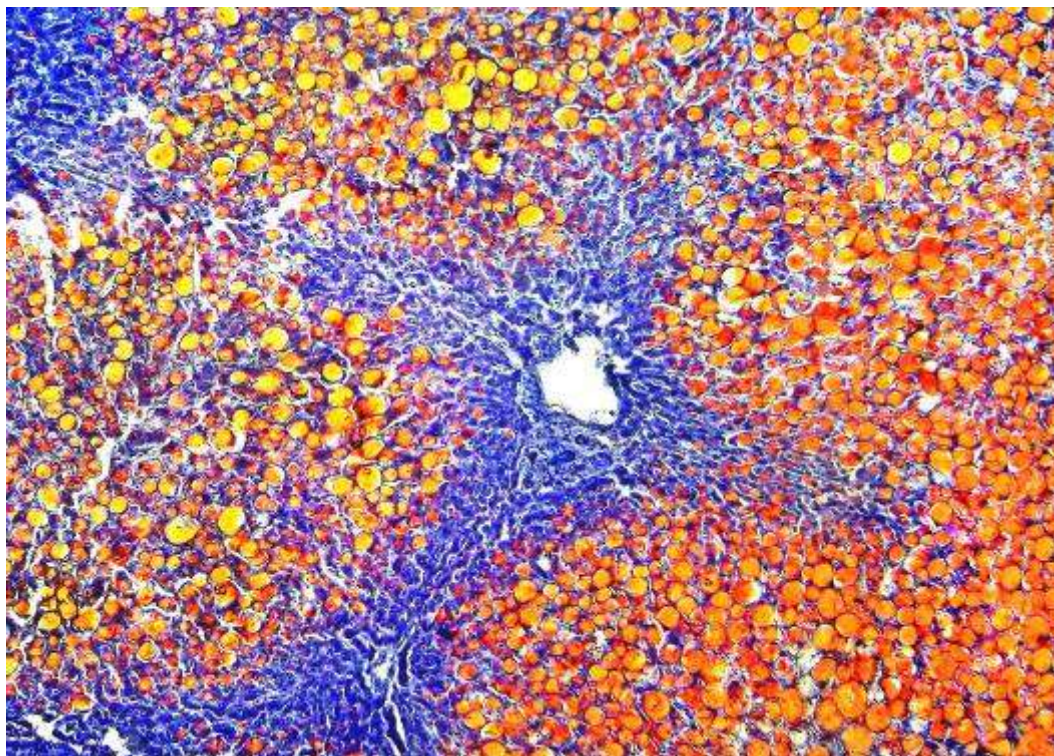


Рисунок 3.7 – Тяжкий S3 макро-мікроевулярний стеатоз гепатоцитів проміжних Z_2 і перипортальних Z_1 зон печінкових дольок при НАСГ. Забарвлення судан III. Зб.: х 200.

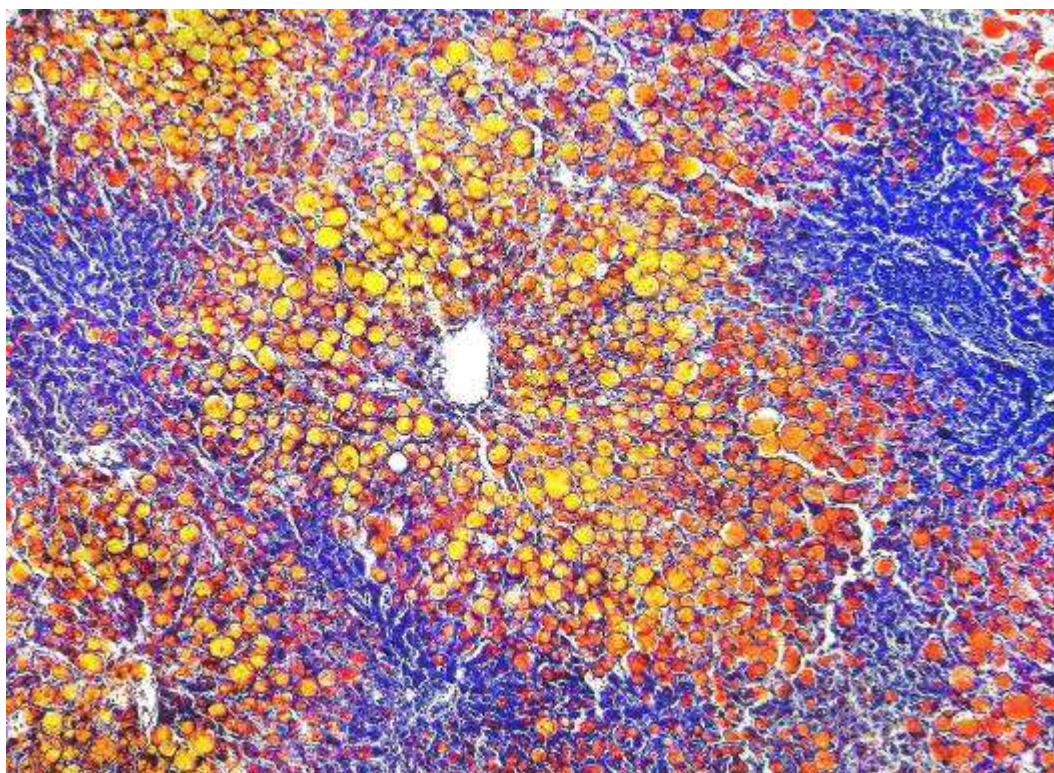


Рисунок 3.8 – Тяжкий S3 міко-макроезукулярний стеатоз гепатоцитів центролобулярних Z_3 і проміжних Z_2 зон печінкових дольок при НАСГ. Забарвлення судан III. Зб.: х 200.

3.1 Мікроскопічна, електронно-мікроскопічна, гістохімічна і імуногістохімічна характеристика алкогольного стеатогепатиту.

В результаті проведених досліджень встановлено, що в печінці хворих на АСГ розвиваються неспецифічні ПМФ ушкодження гепатоцитів, запально-клітинна інфільтрація і фіброз печінки різної інтенсивності, які виявляються в трепанобіоптатах і в секційному матеріалі печінки померлих хворих на АСГ. При мікроскопічному дослідженні встановлено, що в печінці більшості хворих на АСГ переважає змішаний мікро-макроемулярний стеатоз гепатоцитів перипортальних Z_1 та проміжних Z_2 зон печінкових дольок (рис. 3.9), у деяких хворих визначається поєднання макросередньоемулярного і мікроемулярно-пінястого стеатозу гепатоцитів (рис. 3.10). Ізольований мікроемулярно-пінястий стеатоз або «алкогольна пінна дегенерація» гепатоцитів без наявності в них тілець Малорі-Денка частіше виявляється в центролобулярних Z_3 зонах печінкових дольок.

За даними ЕМ дрібні ліпідні краплі локалізовані в розширених цистернах гладкої ендоплазматичної сітки ЕС, великі ліпідні краплі розташовані поза цистернами ЕС в цитозолі серед мітохондрій (див. рис. 3.5). Важливою субмікроскопічною особливістю гепатоцитів є наявність в їх цитоплазмі значної кількості гігантських мегамітохондрій, розмірами більш ніж 10 μm . Виявляються витягнуті, циліндричні або загнуті гігантські мегамітохондрії з короткими кристами та наявністю в їх центральній частині електронно-щільних, витягнутих, голчастих паралельних паракристалічних структур (рис. 3.11). Кожна мегамітохондрія і мітохондрія оточена по периметру цистерною гранулярної ЕС. В цитоплазмі гепатоцитів визначаються прості та складні ліполізосоми, асоційовані з ліпідами, значна кількість пероксисом, а також визначаються багаті ліпідами аутофагосоми (рис. 3.12) – субмікроскопічні аналоги жовто-коричневих цитоплазматичних гранул ліпофусцину світлової мікроскопії. Базальна плазмолема гепатоцитів

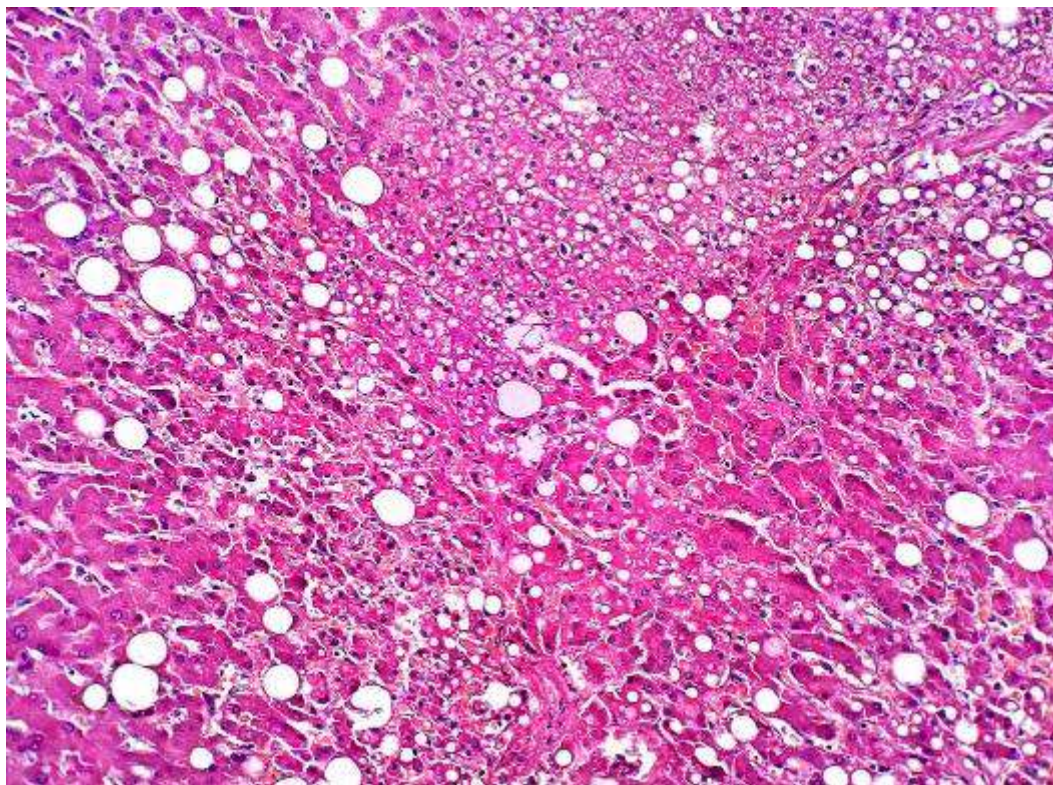


Рисунок 3.9 – Мікро-макровезикулярний стеатоз гепатоцитів при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

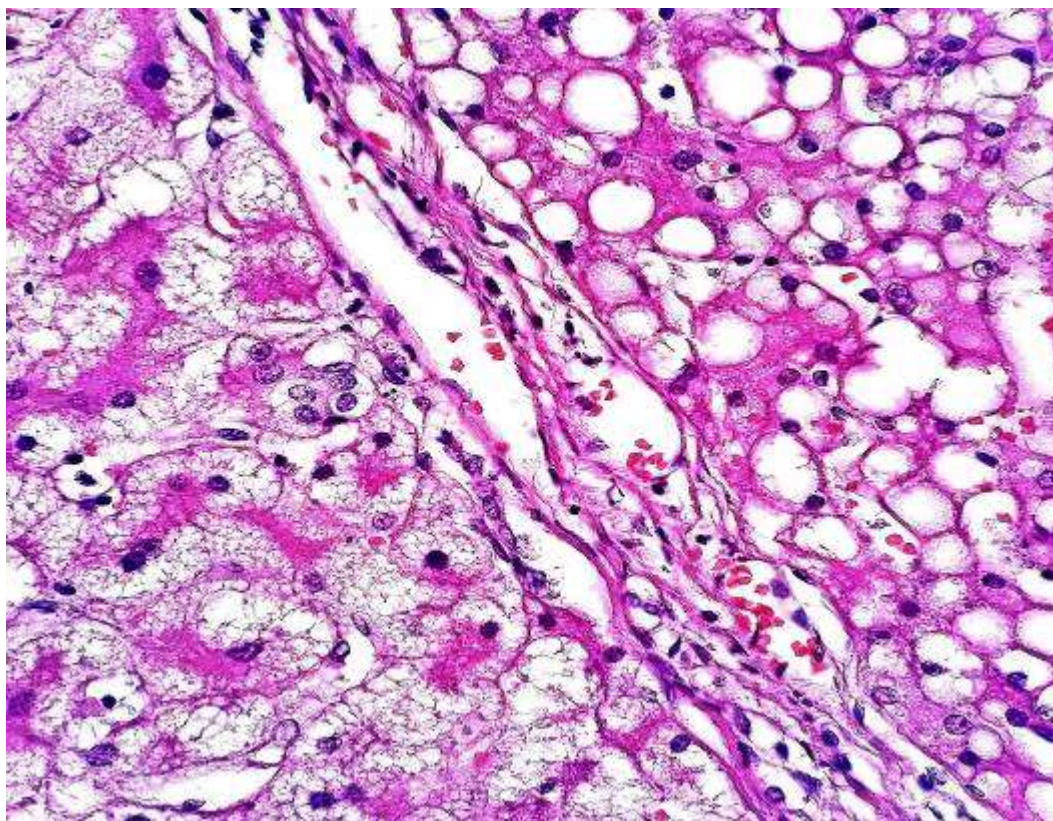


Рисунок 3.10 – Мікроевезикулярно-пінястий стеатоз гепатоцитів (зліва внизу) при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

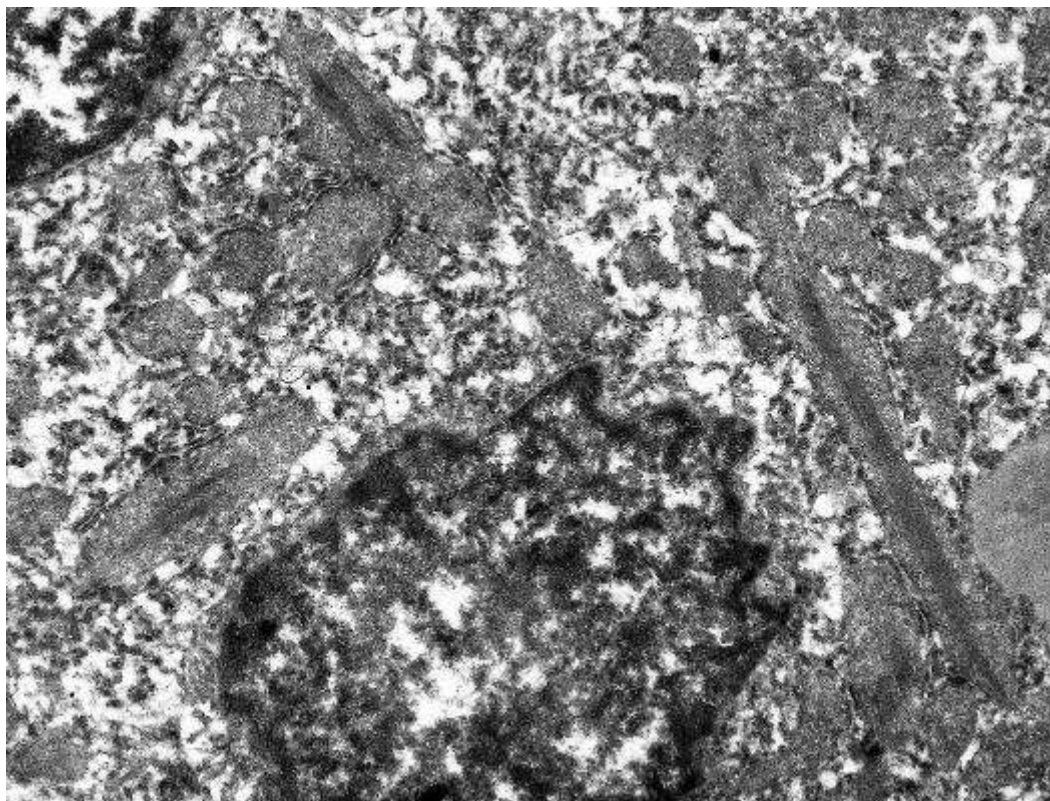


Рисунок 3.11 – Мегамітохондрії в цитоплазмі гепатоцитів при АСГ.
Електронограма. Зб.: x 4800.

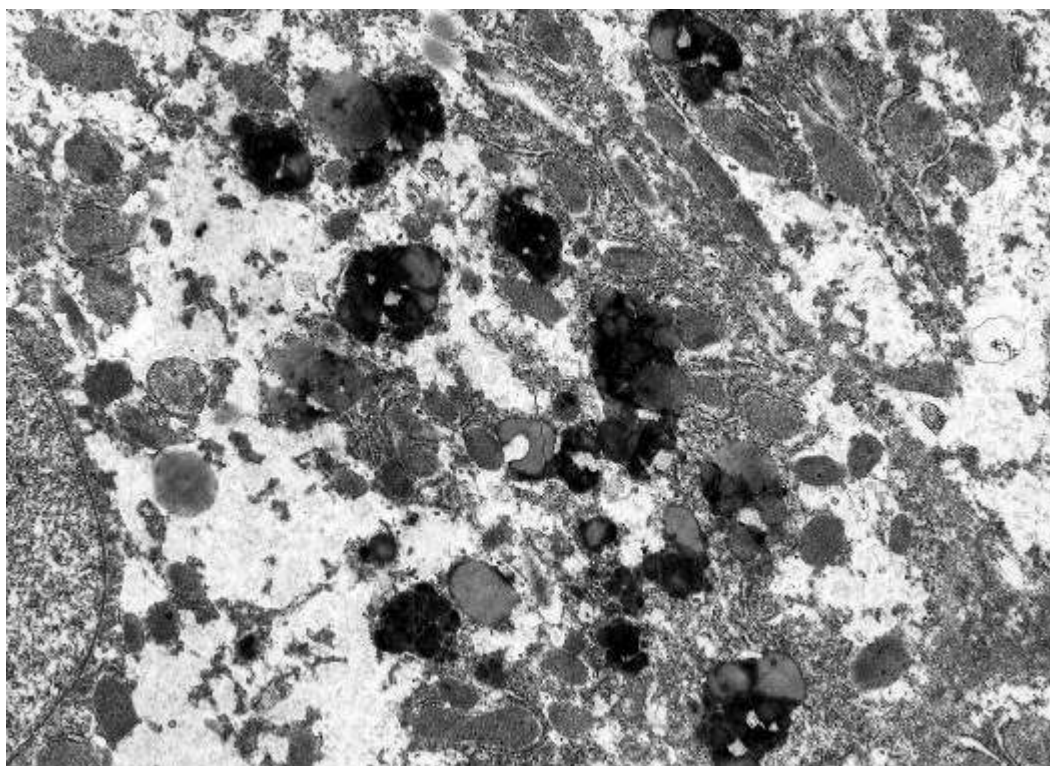


Рисунок 3.12 Багаті ліпідами аутофагосоми в цитоплазмі гепатоцита при АСГ. Електронограма. Зб.: x 4800.

містить багато мікрворсинок, які випинаються в перисинусоїдально-периендотеліальний простір.

Патогістологічні дослідження довели, що патогномонічним для АСГ, крім стеатозу гепатоцитів, є наявність різної кількості балонних гепатоцитів, гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, гепатоцитів в стані апоптозу і стеатонекрозу, поодиноких дрібних вогнищ синусоїдального ліпопеліозу та вогнищ запально-клітинної інфільтрації печінкових дольок різної інтенсивності, депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах, а також наявність в печінці перисинусоїдально-перицелюлярного і портально- Z_1 -зперисинусоїдального фіброзу різного ступеня виразності.

Тільця Малорі-Денка представляють собою аморфно-гомогенні білкові маси в цитоплазмі гепатоцитів зі стеатозом і в цитоплазмі балонних гепатоцитів, які забарвлюються в рожево-фіолетовий колір еозином (рис.3.13, 3.14), або в фіолетово-синій колір методом Масон-трихром.

Балонні гепатоцити зазвичай значно більші оточуючих гепатоцитів. Вони мають круглу, шароподібну форму, центрально розташоване, невелике гіперхромне ядро з ядрцем і відрізняються дуже розрідженою, спустошеною, прозорою цитоплазмою з поодинокими тонкими еозинофільними нитками або з дрібними розпливчастими залишками еозинофільного матеріалу (рис.3.14). Балонні гепатоцити розташовуються між гепатоцитами зі стеатозом в любых зонах дольок печінки, але частіше – в перипортальній Z_1 зоні. Навколо гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і балонних гепатоцитів нерідко концентруються малочисельні лейкоцити, які створюють феномен так званого сателітозу (рис.3.13), або нечисленні нейтрофіли, еозинофіли і лімфоцити, що формують дрібновогнищеві запальні змішано-клітинні інфільтрати (рис.3.15).

Гепатоцити в стані апоптозу зменшені в розмірах, мають округло-овальну форму, еозинофільну цитоплазму і гіперхромне (інколи фрагментоване) ядро (рис.3.16). При мікроскопії навколо апоптотичного

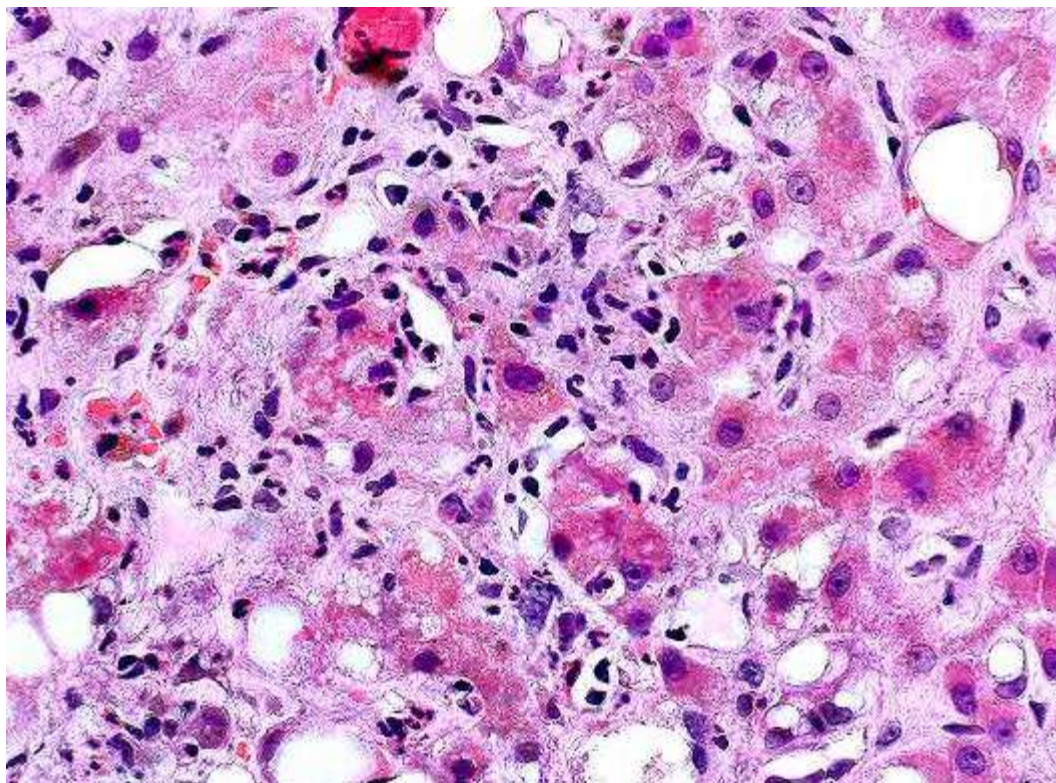


Рисунок 3.13 – Гепатоцити з тільцями Малорі-Денка та з нейтрофільним сателітозом при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 700.

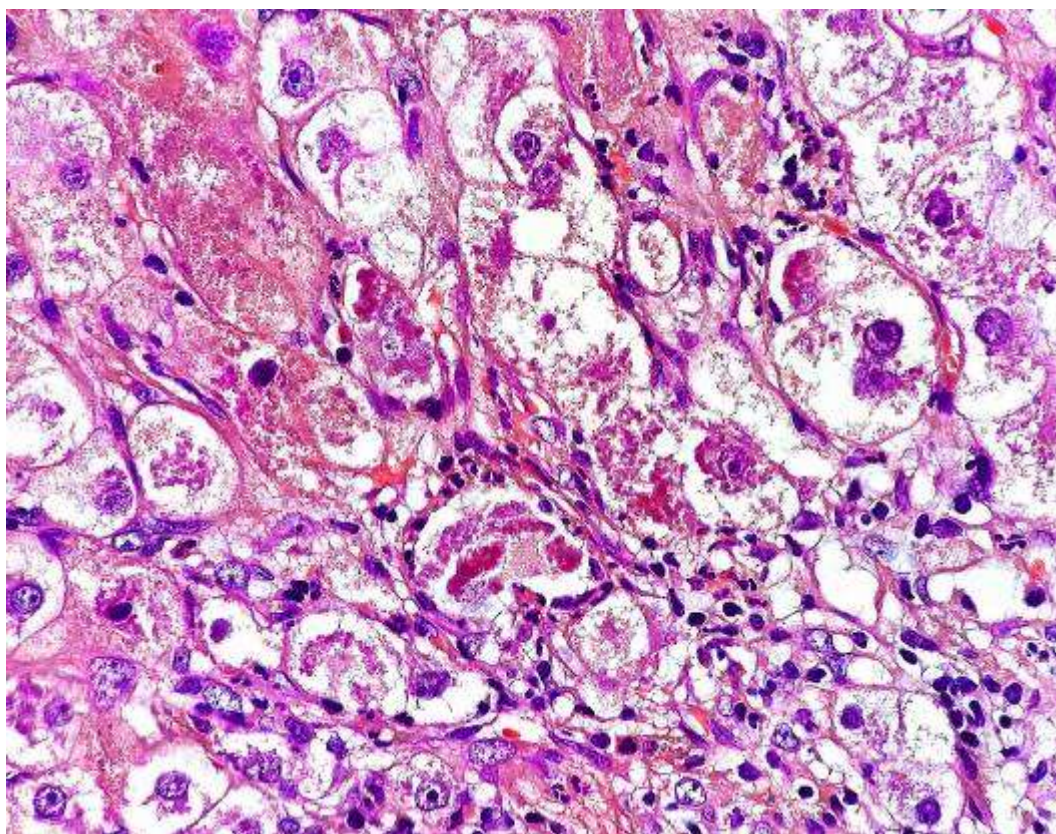


Рисунок 3.14 – Балонні гепатоцити з тільцями Малорі-Денка при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

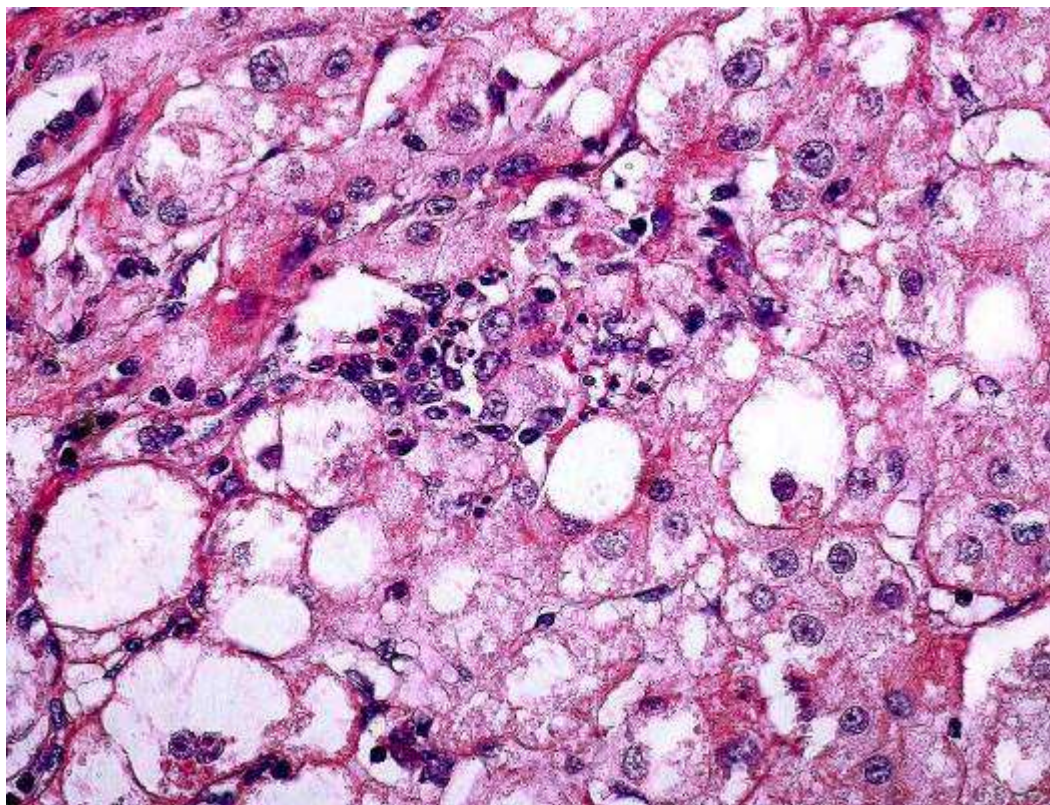


Рисунок 3.15 – Вогнище лімфоцитарно-лейкоцитарної інфільтрації поблизу балонних гепатоцитів при АСГ. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

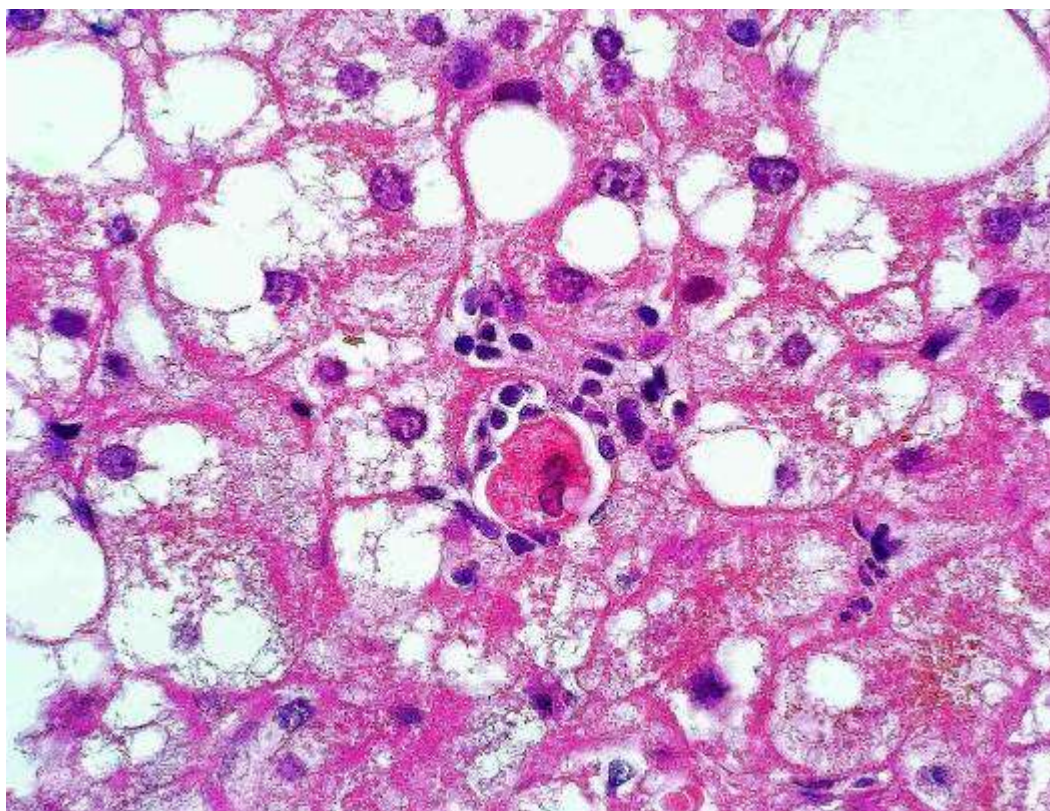


Рисунок 3.16 – Апоптоз гепатоцита при АСГ. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 1000.

гепатоциту спостерігається оптично прозора циркулярна щілина, яка представляє собою відростки CD 68+ макрофагів, та інколи – 1-3 лімфоцита.

У хворих на АСГ в біоптатах печінки виявляються дрібні вогнища некрозу певних ділянок печінкових дольок, в яких некроз охоплює не тільки гепатоцити зі стеатозом, а також клітини перисинусоїдальних просторів. Стеатотично змінені гепатоцити в таких вогнищах мають класичні морфологічні ознаки некрозу клітин: лізис цитоплазми, пікноз ядра або каріолізис, відокремлення некротично змінених клітин від інших гепатоцитів та їх дезінтеграція. У вогнищі некрозу печінкових дольок між некротично зміненими клітинами виявляються лейкоцити і лімфоцити, на межі вогнища некрозу і невраженої тканини печінки спостерігається зона перифокальної реактивної клітинної інфільтрації з лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів.

Крім цього, в печінці хворих на АСГ нерідко виявляються невеличкі утворення з без'ядерних гепатоцитів, цитоплазма яких має вигляд скупчень середніх і дрібних ліпідних везикул без наявності плазматичної мембрани. Зовнішній контур утворень нагадує тутову ягоду внаслідок випинання везикул по їх периметру, поряд з такими утвореннями відсутні реактивні лейкоцити і лімфоцити, але виявляються потовщені відростки CD 68+ макрофагів. Такі утворення виявляються серед гепатоцитів з тяжким стеатозом і серед гепатоцитів збереженої структури. Вони є проявом ареактивного синусоїдального ліпидозу – синусоїдальних скупчень ліпідних крапель, що вивільнилися при стеатонекрозі гепатоцитів (рис.3.17).

Проведені ПГ і ГХ дослідження показали, що в цитоплазмі гепатоцитів і макрофагів печінки хворих на АСГ накопичуються гранули заліза різної валентності. Тривалентне Fe^{3+} залізо ідентифікували методом Перлса (рис.3.18), а наявність двовалентного Fe^{2+} заліза визначали забарвленням серійних парафінових зрізів методом Хьюкіла-Пути та модифікованим нами методом Хьюкіла-Пути з батофенантроліном (рис. 3.19 і 3.20), а також гексаціанофератом (III) калію за Тірманом-Шмельцером.

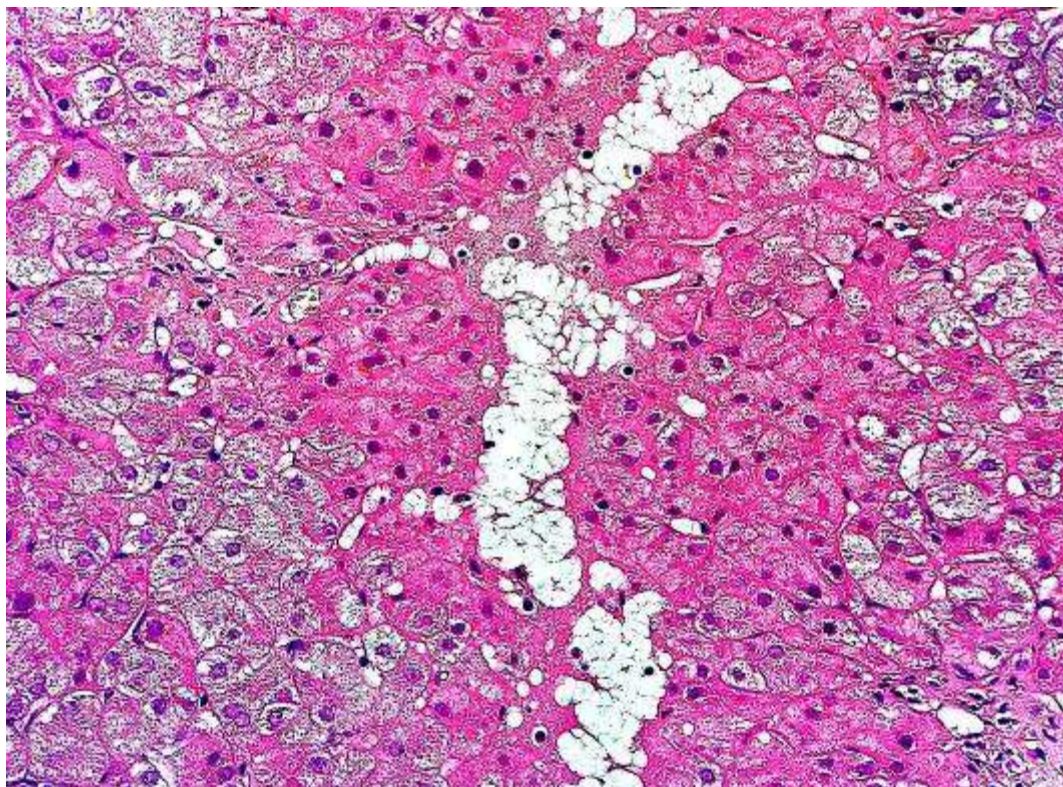


Рисунок 3.17 – Стеатонекроз гепатоцитів з еволюцією в синусоїдальний ліпопеліоз при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

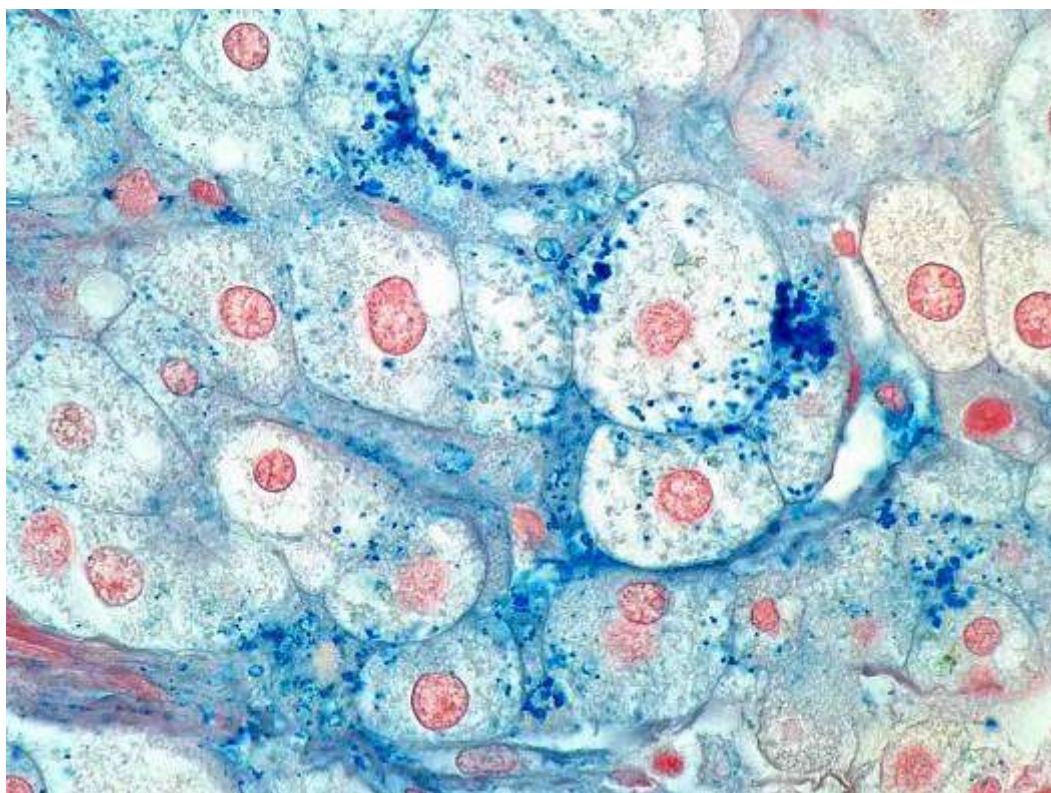


Рисунок 3.18 – Значне накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки при АСГ. Метод Перлса. Зб.: x 1000.

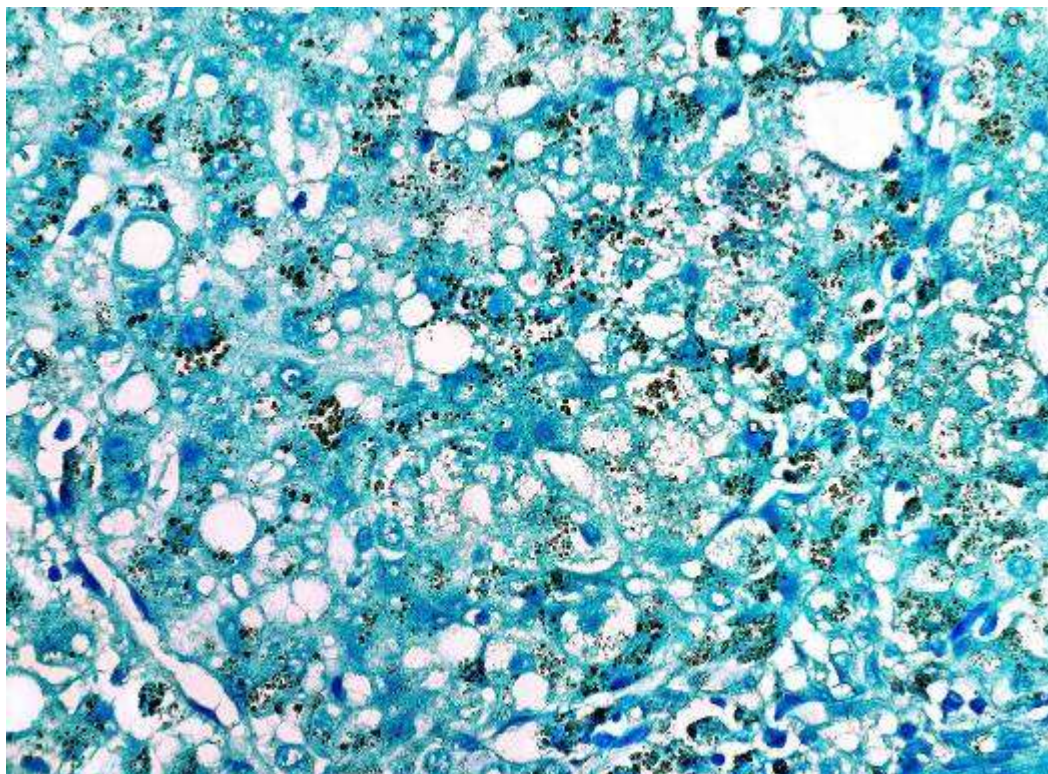


Рисунок 3.19 – Накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки при АСГ. Класичний метод Хьюкіла-Пута. Зб.: х 400.

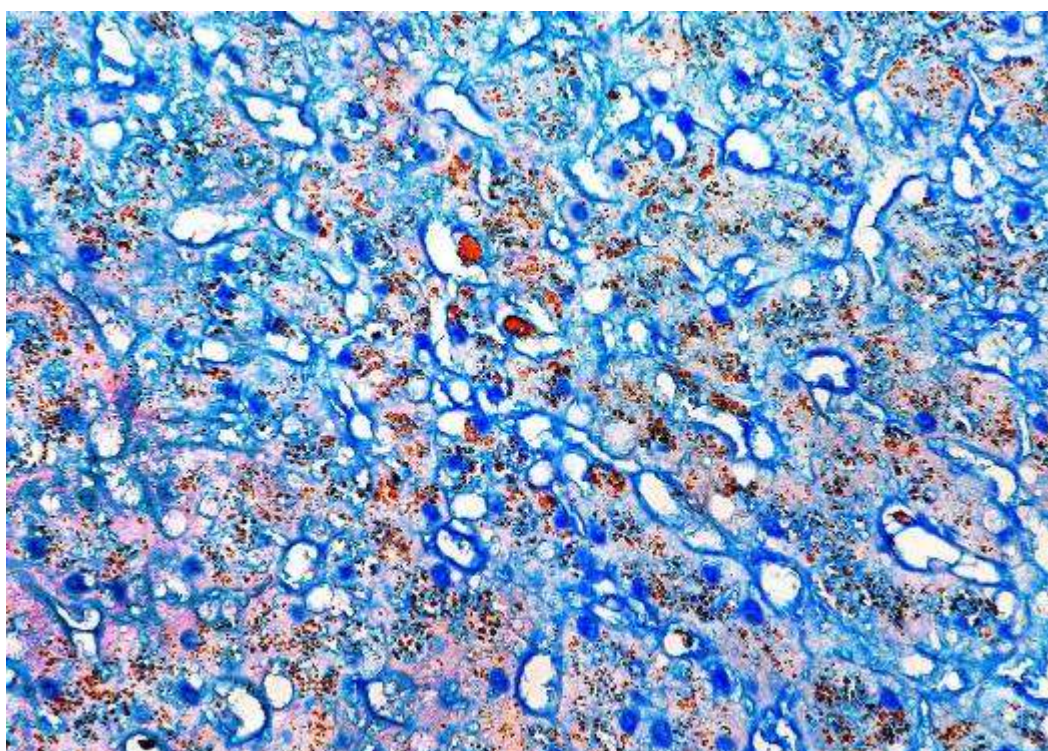


Рисунок 3.20 – Накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки при АСГ. Модифікований метод Хьюкіла-Пута. Зб.: х 400.

Встановлено, що в печінці померлих хворих на АСГ найбільший відсоток гепатоцитів і макрофагів з накопиченим тривалентним Fe^{3+} залізом знаходиться в центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зонах печінкових дольок ($8,9 \pm 2,81$ % і $9,9 \pm 2,73$ % відповідно), в той час як у клітинах перипортальних Z_1 зон тривалентне Fe^{3+} залізо виявляється лише в одиничних ($0,1 \pm 0,1$ %) клітинах ($p = 0,024$). Найбільший відсоток гепатоцитів і макрофагів з депонованим двовалентним Fe^{2+} залізом визначається в центролобулярних Z_3 і проміжних Z_2 зонах печінкових дольок ($4,0 \pm 1,79$ % і $4,0 \pm 1,33$ % відповідно), а в перипортальних Z_1 зонах клітини з двовалентним Fe^{2+} залізом не виявляються ($p = 0,028$) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Накопичення тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза ($M \pm m$) в гепатоцитах і макрофагах Z_1, Z_2, Z_3 зон печінкових дольок в аутопсійному і біопсійному матеріалі печінки хворих на АСГ

| Вид матер | % гепатоцитів і макрофагів з Fe^{3+} | | | % гепатоцитів і макрофагів з Fe^{2+} | | |
|-----------|--|-----------------------|------------------------|--|-------------------------|-----------------|
| | в Z_3 | в Z_2 | в Z_1 | в Z_3 | в Z_2 | в Z_1 |
| Аут | $8,9 \pm 2,81^*$ | $9,9 \pm 2,73^{**}$ | $0,1 \pm 0,1^{***}$ | $4,0 \pm 1,79^\mu$ | $4,0 \pm 1,33^{\mu\mu}$ | $0^{\mu\mu\mu}$ |
| Тр | $4,8 \pm 0,33^\#$ | $4,7 \pm 0,35^{\#\#}$ | $0,1 \pm 0,1^{\#\#\#}$ | $4,1 \pm 0,38'$ | $4,0 \pm 0,35''$ | $0'''$ |

Примітка 1. - (Аут) - аутопсійний матеріал печінки; (Тр) – трепанобіоптати печінки. Дані проаналізовані за допомогою (Н-критерію) Краскела-Уолліса.

Примітка 2.- достовірні різниця ($p < 0,05$) розподілу Fe^{3+} між Z_1^{***} і Z_3^* , між Z_1^{***} і Z_2^{**} ;

Примітка 3.- достовірні різниця ($p < 0,05$) розподілу Fe^{3+} між $Z_1^{\#\#\#}$ і $Z_3^\#$, між $Z_1^{\#\#\#}$ і $Z_2^{\#\#}$;

Примітка 4.- достовірні різниця ($p < 0,05$) розподілу Fe^{2+} між $Z_1^{\mu\mu\mu}$ і Z_3^μ , між $Z_1^{\mu\mu\mu}$ і $Z_2^{\mu\mu}$;

Примітка 5.- достовірні різниця ($p < 0,05$) розподілу Fe^{2+} між Z_1''' і Z_3' , між Z_1''' і Z_2'' ;

У трепанобіоптатах печінки хворих на АСГ найбільший відсоток гепатоцитів і макрофагів з накопиченим тривалентним Fe^{3+} залізом міститься в центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зонах печінкових дольок ($4,8 \pm 0,33$ % і $4,7 \pm 0,35$ % відповідно) (рис.3.21), в той час як у перипортальних Z_1 зонах визначаються поодинокі клітини ($0,1 \pm 0,1$ %) з Fe^{3+} залізом (табл. 3.1). Найбільший відсоток гепатоцитів і макрофагів з депонованим двовалентним Fe^{2+} залізом спостерігається в центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зонах печінкових дольок ($4,1 \pm 0,38$ % і $4,0 \pm 0,35$ % відповідно) (рис.3.22), в той

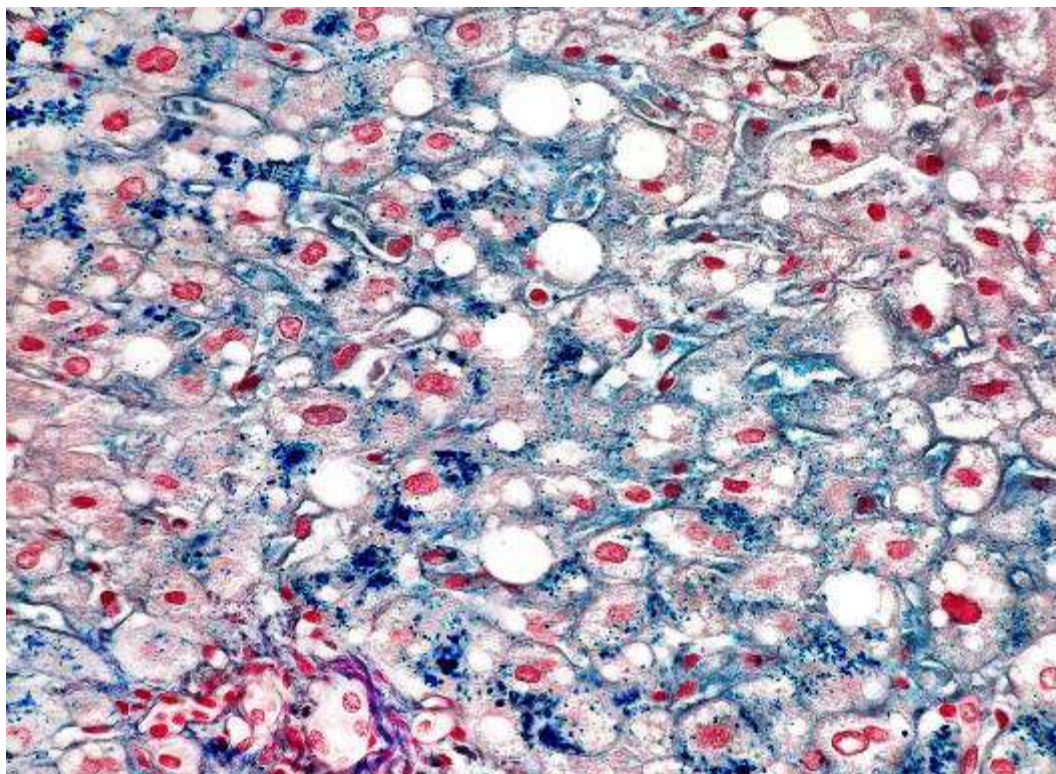


Рисунок 3.21 – Накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза в клітинах центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зон печінкових дольок при АСГ. Метод Перлса. Зб.: x 600.

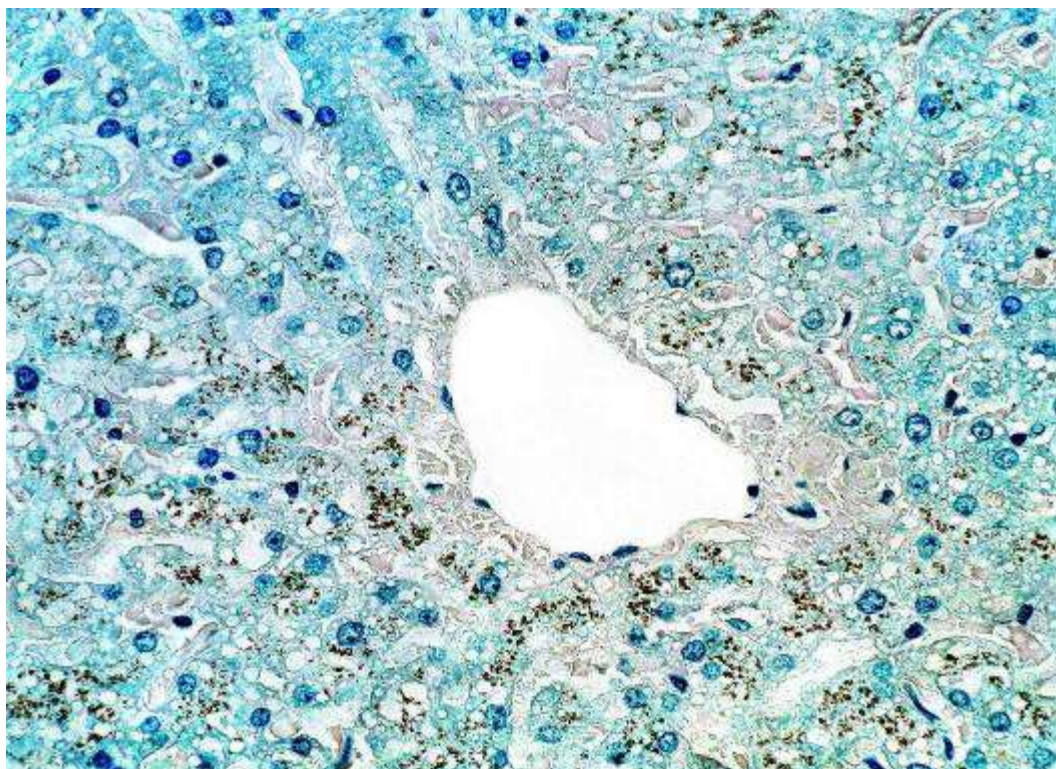


Рисунок 3.22 – Накопичення дивалентного Fe^{2+} заліза в клітинах центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зонах печінкових дольок при АСГ. Класичний метод Хьюкіла-Пуґа. Зб.: x600.

час як в перипортальних Z_1 зонах, клітини з накопиченим двовалентним Fe^{2+} залізом відсутні ($p < 0,05$) (див.табл. 3.1).

У хворих на АСГ також спостерігається помірна імуноцитарна інфільтрація дольок і портальних трактів печінки. Проведені ІГХ дослідження показали, що при АСГ в печінці серед імунокомпетентних клітин переважають CD68-позитивні макрофаги, а також виявляються CD4-позитивні лімфоцити, CD8-позитивні Т-лімфоцити (рис. 3.23) і поодинокі плазматичні клітини, які нерівномірно розподілені в дольках і в портальних трактах печінки. У портальних трактах печінки хворих на АСГ локалізовані нечисленні CD8-позитивні Т-лімфоцити, CD4-позитивні Т-лімфоцити і CD 68-позитивні макрофаги, які інколи формують в межах портальних трактів малоінтенсивні вогнищеві імуноцитарні інфільтрати.

У перисинусоїдальних просторах печінкових дольок у хворих на АСГ зазвичай виявляються поодинокі CD8-позитивні Т-лімфоцити, CD4-позитивні Т-лімфоцити, плазматичні клітини і CD68-позитивні макрофаги Купфера. Інколи ці клітини утворюють у перисинусоїдальних просторах печінки локальні імуноцитарні клітинні ланцюжки різної довжини. Крім того, CD68-позитивні макрофаги Купфера в підвищених кількостях концентруються в осередках вираженого стеатозу гепатоцитів та навколо вогнищ синусоїдального ліпопеліозу (рис. 3.24).

Встановлено, що у хворих на АСГ в парафінових зрізах печінки, забарвлених методом Ван-Гізона, Масон-трихром і за Гоморі, частіше за все виявляється один з двох основних типів фіброзу: або перисинусоїдально-перичелюлярний, або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки; рідкою знахідкою є локальний ізольований перебіліарний фіброз та локальний перивенулярний фіброз навколо централобулярної вени печінкової дольки.

На ранніх стадіях розвитку АСГ в перипортальній Z_1 зоні, або в централобулярній Z_3 зоні печінкових дольок, або в Z_3 і Z_2 зонах одночасно

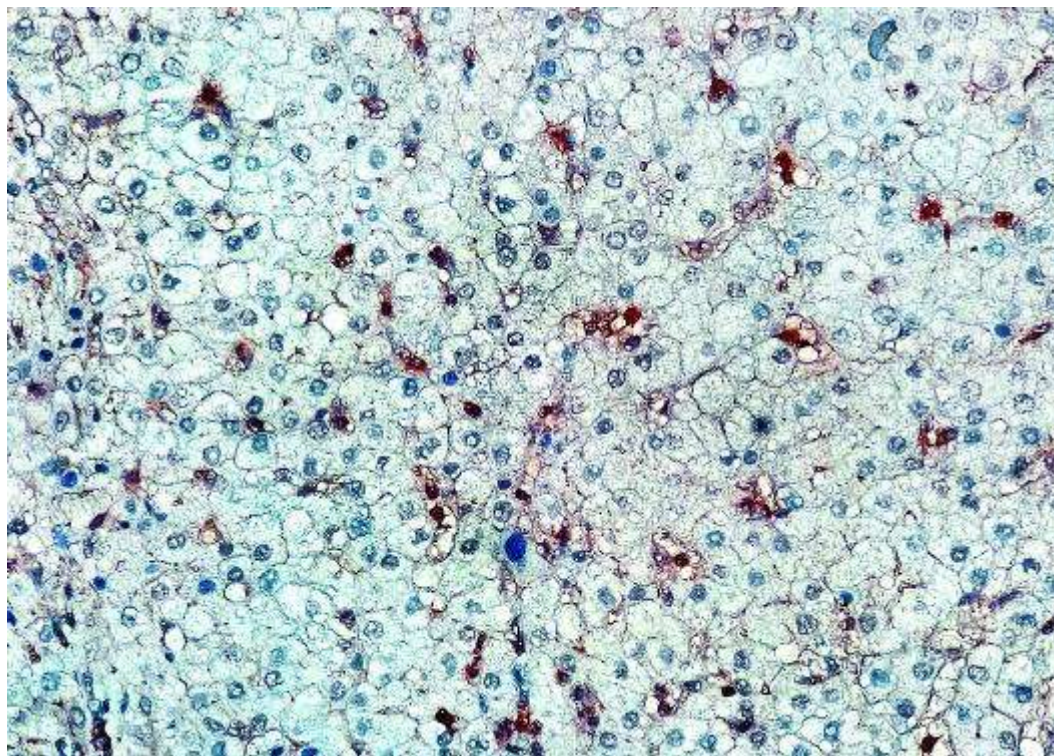


Рисунок 3.23 – CD 8+ лімфоцити у перисинусоїдальних просторах печінки при АСГ. Мо *a-Hu CD8, Clone C8 / 144B*. Зб.: x200.

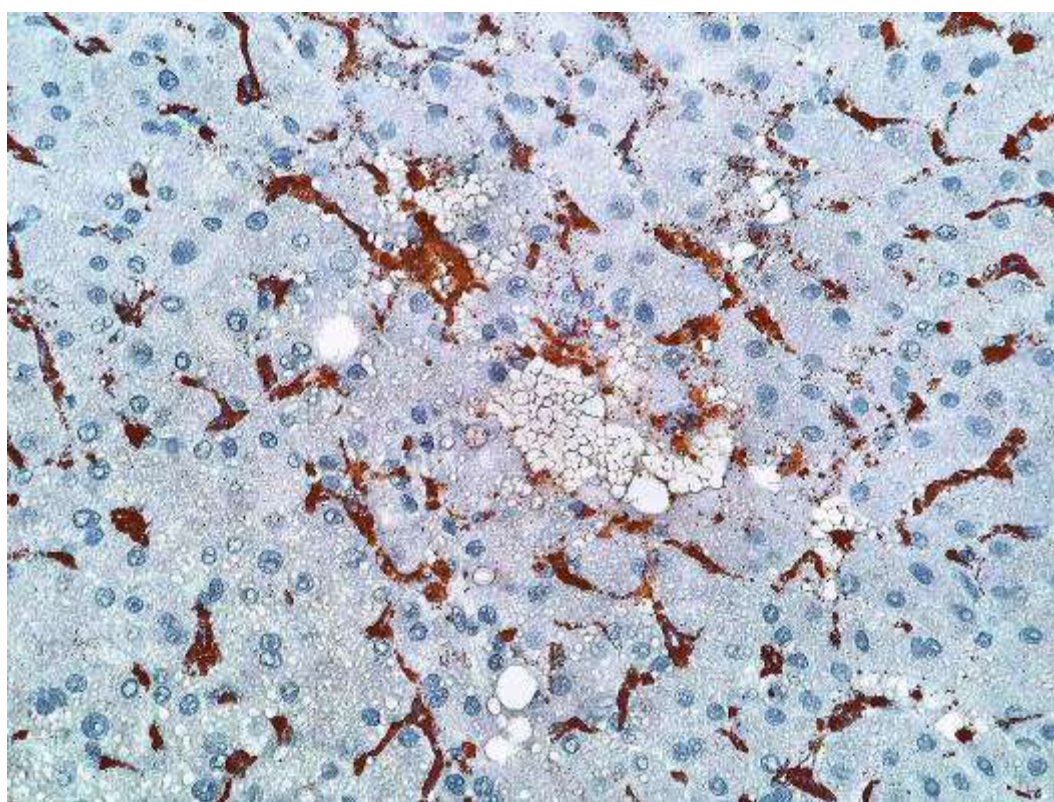


Рисунок 3.24 – CD 68+ макрофаги в перисинусоїдальних просторах і в осередках стеатонекрозу і синусоїдального ліпопеліозу при АСГ. Мо *a-Hu CD68, Clone PG-M1*. Зб.: x 400.

чи в Z_1 і Z_2 зонах одночасно в перисинусоїдальних просторах печінкових дольок при імпрегнації аргірофільних ретикулярних волокон за Гоморі (рис.3.25) навколо гепатоцитів зі стеатозом виявляються тонкі «дротяні нитки» перицелюлярного фіброзу, які охоплюють окремі гепатоцити або групи гепатоцитів зі стеатозом. В цих же місцях навколо гепатоцитів при забарвленні за Ван-Гізон виявляються тонкі нитки фіброзу малинового кольору, або нитки перицелюлярного фіброзу темно-синього кольору при забарвленні методом Масон-трихром.

У частки хворих на АСГ визначається розвиток портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки. При цьому виявляється помірний портальний фіброз, а також перицелюлярний фіброз різного ступеню в перисинусоїдальних просторах навколо гепатоцитів зі стеатозом перипортальної Z_1 зони печінкових дольок. В деяких випадках в перисинусоїдальних просторах перипортальної Z_1 зони визначаються короткі потовщені перипортальні фіброзні септи, орієнтовані до централобулярних вен, а перицелюлярний фіброз розповсюджується по перисинусоїдальних просторах в проміжній Z_2 зони печінкових дольок.

При перисинусоїдально-перицелюлярному фіброзі перицелюлярний фіброз зазвичай охоплює стеатотично змінені гепатоцити переважно централобулярної Z_3 зони, а також проміжної Z_2 зони печінкових дольок. У деяких хворих на АСГ на ранній стадії хвороби визначається значний циркулярний фіброз навколо централобулярної вени (перивенулярний фіброз), який у вигляді «дротяних ниток» частково розповсюджується в перисинусоїдальні простори централобулярної Z_3 зони дольки печінки (рис. 3.27).

У 5% хворих на АСГ виявляється локальний (ізолюваний) перебілярний фіброз (рис 3.28), при якому визначається значний циркулярний фіброз навколо дрібної жовчної протоки, локалізованої між печінковими дольками, яка не входить до складу портальних триад.

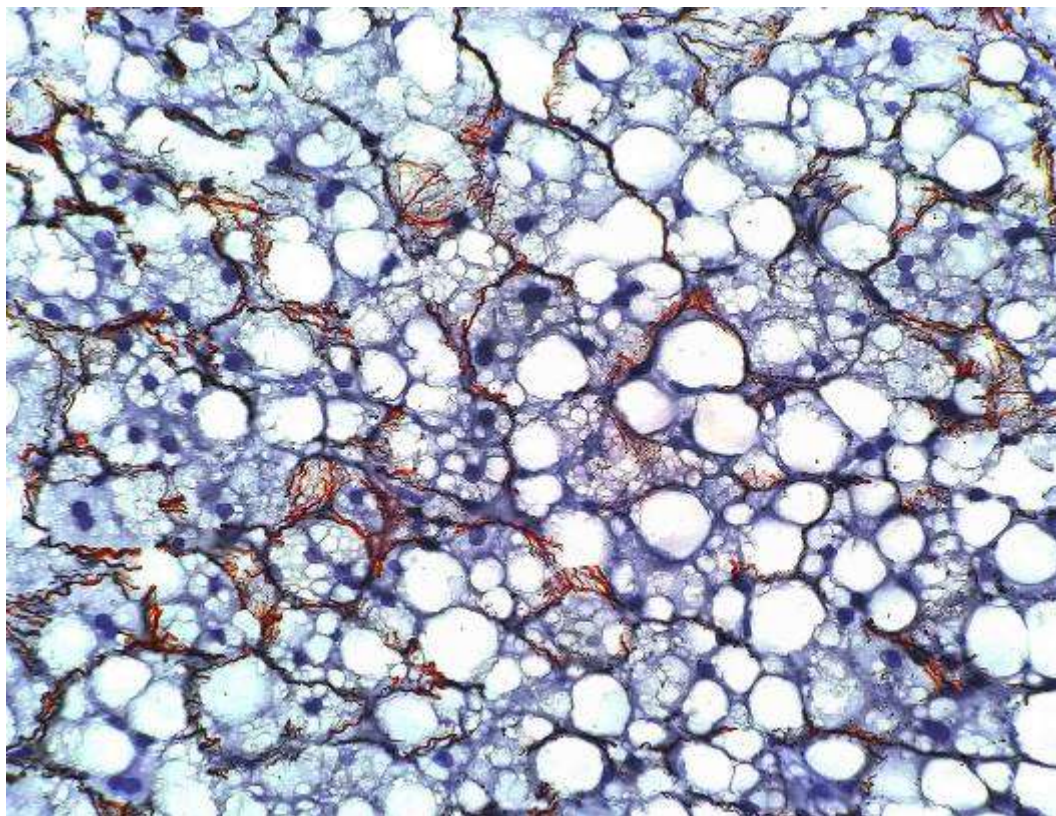


Рисунок 3.25 – Перичелюлярний фіброз печінки при АСГ. Імпрегнація аргірофільних ретикулярних волокон за Гоморі. Зб.: x 600.

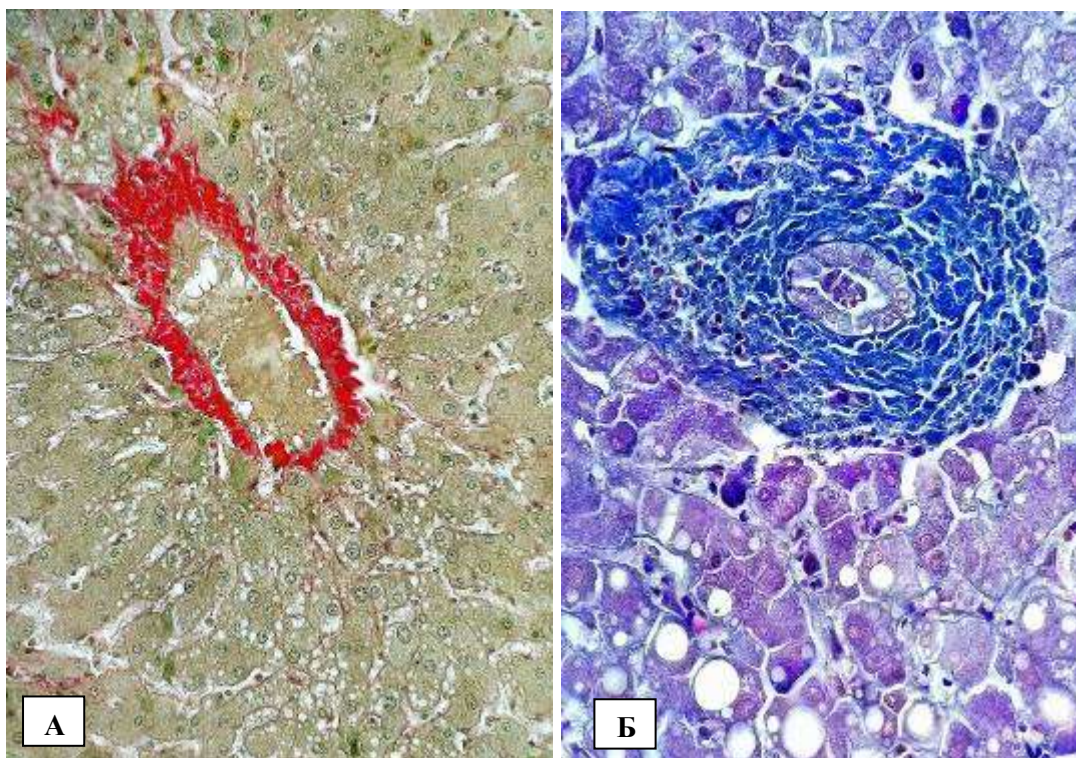


Рисунок 3.26 – АСГ: А Перивенулярний фіброз печінки, Б Ізольований перібілярний фіброз печінки. Забарвлення: А - за Ван Гізон, Б - Масон-трихром. Зб.: А x400, Б x 600.

3.2 Мікроскопічна, електронно-мікроскопічна, хромато-мас-спектрометрична, гістохімічна і імуногістохімічна характеристика неалкогольного стеатогепатиту.

При гістологічному дослідженні гепатобіоптатів хворих на НАСГ, які не зловживали алкоголем, але мали проблеми із зайвою вагою, цукровий діабет 2 типу та інші прояви метаболічного синдрому, в печінці виявлявся переважно крупновезикулярний або крупно-середньо-везикулярний стеатоз гепатоцитів, який зазвичай охоплював перипортальні Z_1 зони печінкових дольок (рис.3.27, 3.28) і розповсюджувався на проміжні Z_2 зони печінкових дольок, а також слабка і малопоширена запально-клітинна інфільтрація печінкових дольок та слабка вогнищева імуноцитарна інфільтрація портальних трактів. Крім цього, у хворих на НАСГ виявлявся також фіброз печінки різного ступіню виразності.

При ЕМ дослідженні печінки хворих на НАСГ в цитоплазмі гепатоцитів і клітин перисинусоїдальних просторів визначалися різні за розмірами ліпідні краплі. В гепатоцитах переважали крупні ліпідні краплі і ліпідні краплі середніх розмірів, округлої форми. Ліпідні краплі гомогенної ультраструктури низької електронної щільності локалізуються в цитозолі гепатоцита відокремлено від цистерн гладкої ендоплазматичної сітки (ЕС) (рис. 3.29) і не мають зовнішньої мембрани. В зовнішньому контурі ліпідних крапель визначаються дрібні кавеоли. У деяких випадках поодинокі ліпідні краплі поглиблюються в інвагінації каріолеми і на поперечних ультратонких зрізах ядра імітують внутрішньоядерні ліпідні вакуолі. Другою особливістю ультраструктури гепатоцитів при НАСГ була наявність значної кількості мегамітохондрій, розмірами більш ніж 10 μm . Витягнуті гігантські мегамітохондрії циліндричної або амебоїдної форми мають сплющені кристи і містять в центральній частині електронно-щільні голчасті паракристалічні структури, витягнуті уздовж подовженої осі органел (рис. 3.30).

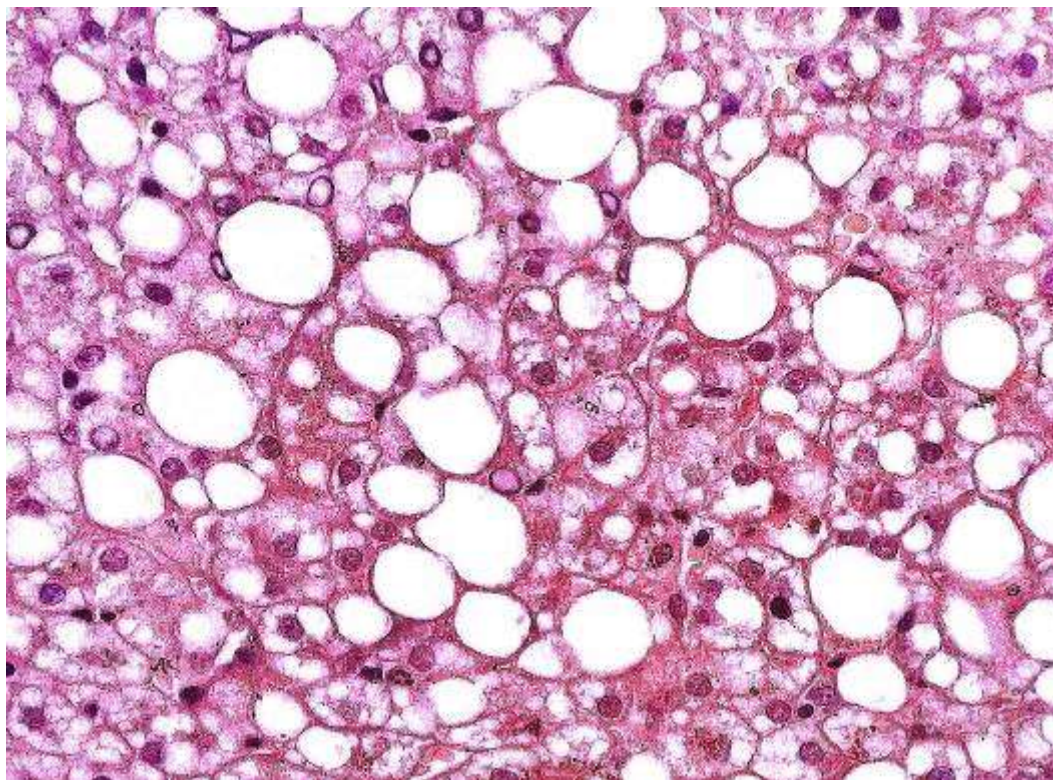


Рисунок 3.27 – Макровезикулярний стеатоз гепатоцитів перипортальної Z_1 зони печінкової дольки при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 800.

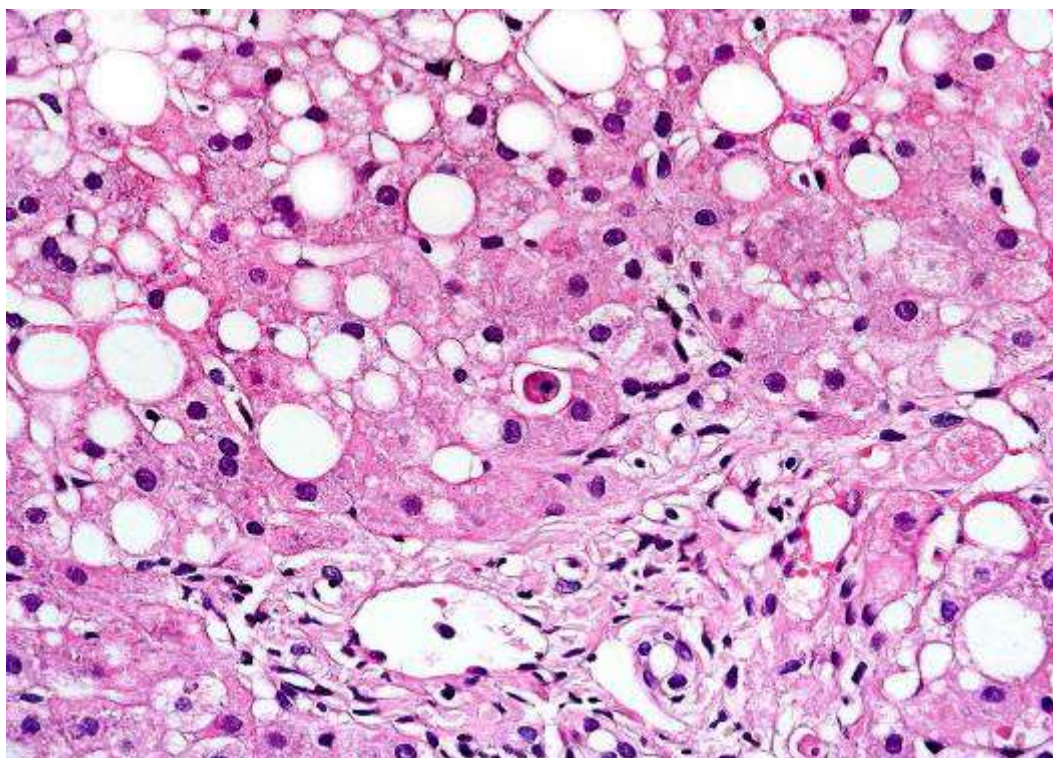


Рисунок 3.28 – Макровезикулярний стеатоз і апоптоз гепатоцитів перипортальної Z_1 зони печінкової дольки і портального тракту при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

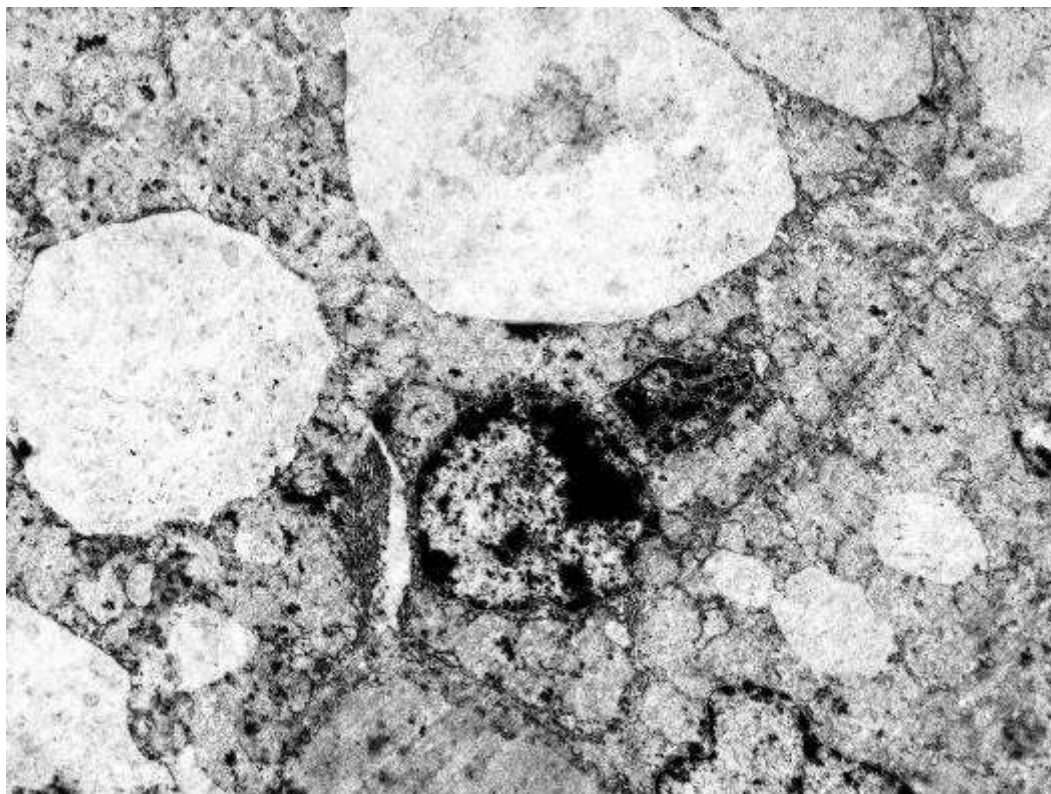


Рисунок 3.29 – Макровезикулярний стеатоз гепатоцита при НАСГ.
Електронограма. Зб.: x 2400.

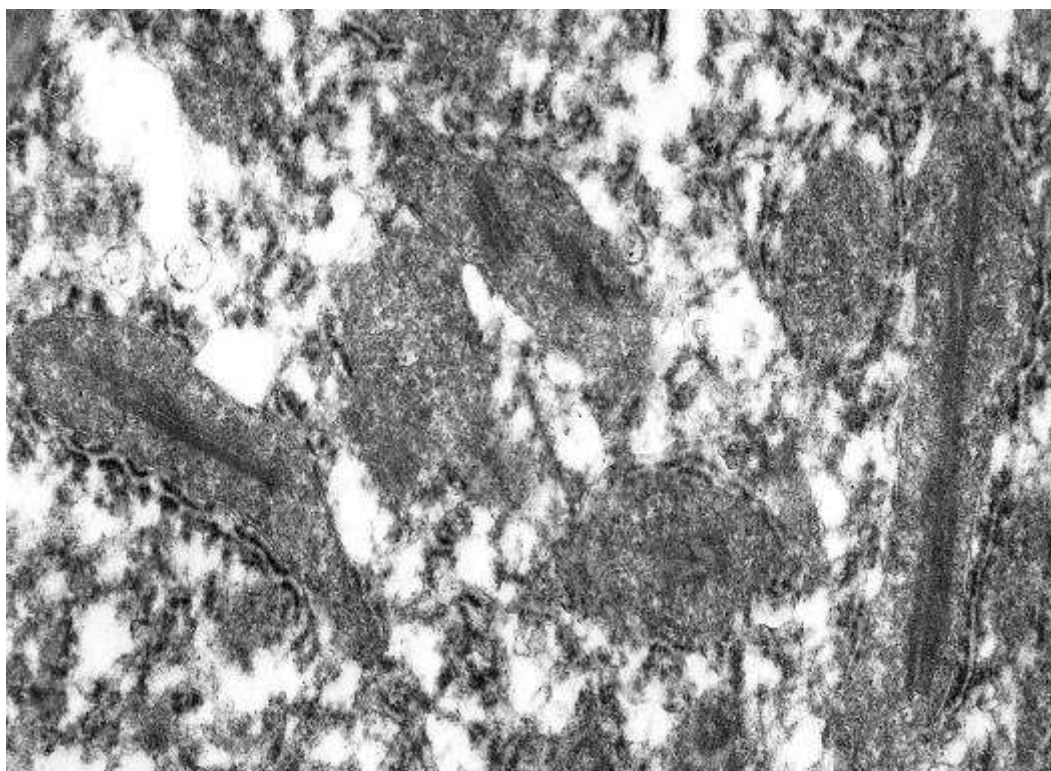


Рисунок 3.30 – Мегамітохондрії в цитоплазмі гепатоцитів при НАСГ.
Електронограма. Зб.: x 4800.

Важливою ультраструктурною особливістю гепатоцитів є тісний взаємозв'язок мітохондрій і мегамітохондрій з цистернами гранулярної ЕС, які тісно прилягають до зовнішньої мембрани кожної мітохондрії і мегамітохондрії по периметру (див. рис. 3.34). Слід відзначити, що такі субмікроскопічні взаємовідносини між цистернами гранулярної ЕС, мітохондріями і мегамітохондріями спостерігаються в гепатоцитах як при НАСГ так і при АСГ.

Електронна мікроскопія гепатоцитів при НАСГ надає можливість спостерігати наявність ліпопротеїнів дуже низької щільності, які на певних етапах синтезу можуть визначатися як електронно-щільні глобули в отворах цистерн гранулярної ЕС, комплексу Гольджі і в екзоцитозних мікровезикулах базальних відділів цитоплазми печінкових клітин перед їх виділенням у кров просторів Діссе. В цитоплазмі гепатоцитів при НАСГ визначаються прості та складні ліполізосоми, а також різна кількість багатих ліпідами вторинних аутофагосом. Базальна плазмолема гепатоцитів багата на мікрворсинки, які знаходяться в перисинусоїдально-періендотеліальному просторі.

Проведений ВЕР-ХМС аналіз показав, що в печінці хворих на НАСГ реєструються значно підвищені рівні вмісту холестерину і його ефірів, а також вмісту насичених вищих жирних кислот з високою ліпотоксичністю, зокрема стеаринової і пальмітинової кислот.

За результатами ВЕР-ХМС аналізу встановлено, що в печінці хворих на НАСГ зі стеатозом тяжкого S_3 ступеня медіана рівня холестерину дорівнювала 7,10 (5,03; 8,25) мг/г, в той час як в печінці без стеатоза (S_0) медіана рівня холестерину складала 0,42 (0,11; 4,49) мг/г. За даними ВЕР-ХМС аналізу виявлено, що в печінці хворих на НАСГ, паралельно з вільним холестерином, також визначається ефір холестерину (рис. 3.31), який при метаболічній деградації здатний підвищувати вміст холестерину в тканині печінки.

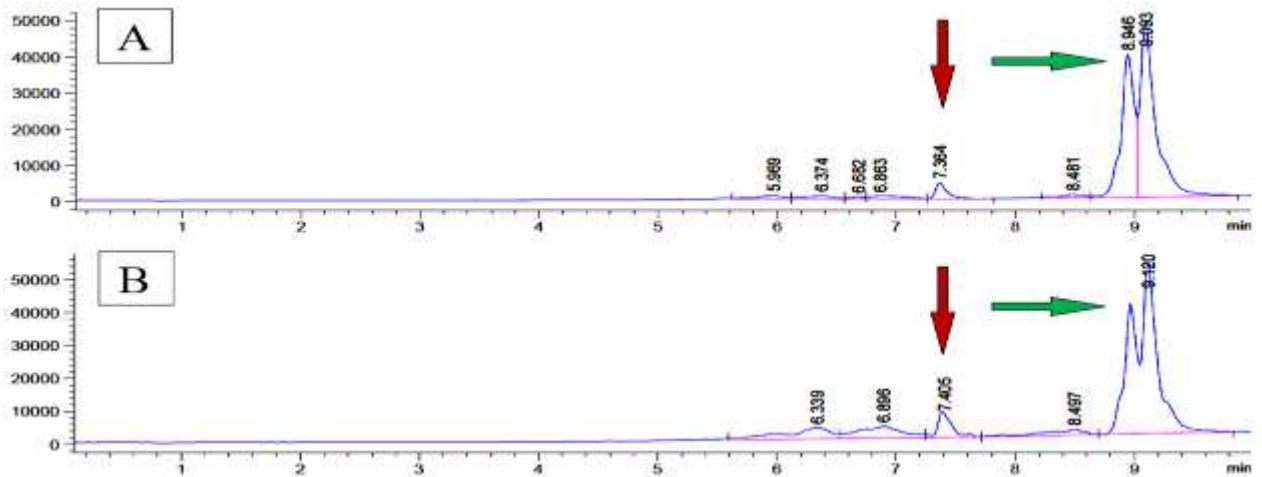


Рисунок 3.31 – Хроматограми холестерина при SIM m/z 369: А - в печінці контрольної групи без стеатоза S₀. В - в печінці хворих на НАСГ тяжкого S3 ступеня. Пік холестерина вказаний червоною стрілкою, пік ефіру холестерину вказаний зеленою стрілкою. Дані ВЕР-ХМС аналізу.

Як показали ВЕР-ХМС дослідження, в печінці хворих на НАСГ підвищений вміст стеаринової (C18:0) і пальмітинової кислот (C16:0), який для стеаринової кислоти дорівнював від 0,26 мг/г до 2,15 мг/г, а для пальмітинової кислоти - від 0,18 мг/г до 2,17 мг/г. Визначено, що у хворих НАСГ має місце статистично значущий зв'язок між вмістом в печінці стеаринової і пальмітинової кислот ($\gamma=0,681$; $p<0,001$).

За даними мікроскопічних досліджень визначено, що для НАСГ, крім стеатозу гепатоцитів, характерними є наявність різної кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, апоптотичною зміненних гепатоцитів, гепатоцитів в стані стеатонекроза і балонного цитолізису, поодиноких дрібних стеатокіст, вогнищ слабкої запально-клітинної інфільтрації печінкових дольок, а також депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах.

Балонні гепатоцити овальної, шароподібної форми значно більші оточуючих гепатоцитів. Вони мають дуже розріджену, спустошену, прозору цитоплазму, яка містить розпливчасті, еозинофільні, дрібні залишки цитоплазматичного матеріалу, а також центрально розташоване невелике, гіперхромне ядро без ядерця або з маленьким ядерцем (рис.3.32). Балонні гепатоцити частіше за все спостерігаються між гепатоцитам з

крупновезикулярним або середньовезикулярним стеатозом, а також між гепатоцитами з ознаками стеатонекрозу.

В цитоплазмі балонних гепатоцитів печінки і в цитоплазмі гепатоцитів зі стеатозом у хворих на НАСГ, значно рідше ніж у хворих на АСГ, виявляються тільця Малорі-Денка. Цитоплазматичні тільця Малорі-Денка мають вигляд аморфно-гомогенних білкових мас, які забарвлюються в рожево-фіолетовий колір еозином (рис.3.33), або в фіолетово-синій колір методом Масон-трихром. Навколо деяких стеатотично змінених гепатоцитів і балонних гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка визначаються дрібновогнищеві клітинні інфільтрати з поодинокими нейтрофілів, еозинофілів і лімфоцитів.

В печінці хворих на НАСГ також спостерігаються зменшені в розмірах, апоптотично змінені гепатоцити округло-овальної форми з еозинофільною цитоплазмою і гіперхромним ядром (рис.3.34А), оточені по периметру оптично пустою щілиною. Поряд з апоптотично зміненими гепатоцитами розташовані поодинокі CD 68+ макрофаги і лімфоцити.

Крім цього, в печінці хворих на НАСГ нерідко виявляється ареактивний стеатонекроз окремих гепатоцитів: визначаються окремі без'ядерні гепатоцити, цитоплазма яких має вигляд скупчень середніх і дрібних ліпідних везикул без наявності плазматичної мембрани (рис.3.34Б). Поряд з такими клітинами локалізовані гепатоцити з тяжким стеатозом і значним накопиченням ліпофусцину в цитоплазмі (рис.3.34Б), а також виявляються потовщені відростки CD 68+ макрофагів без наявності реактивних лейкоцитів і лімфоцитів. Невеличкі скупчення гепатоцитів в стані стеатонекрозу утворюють дрібні вогнища синусоїдального ліпопеліозу.

У хворих на НАСГ в біоптатах печінки також нерідко визначаються дрібні вогнища некрозу певних ділянок печінкових дольок, який одночасно охоплює гепатоцити зі стеатозом, а також клітини перисинусоїдальних просторів (рис.3.35). При некрозі стеатотично змінених гепатоцитів

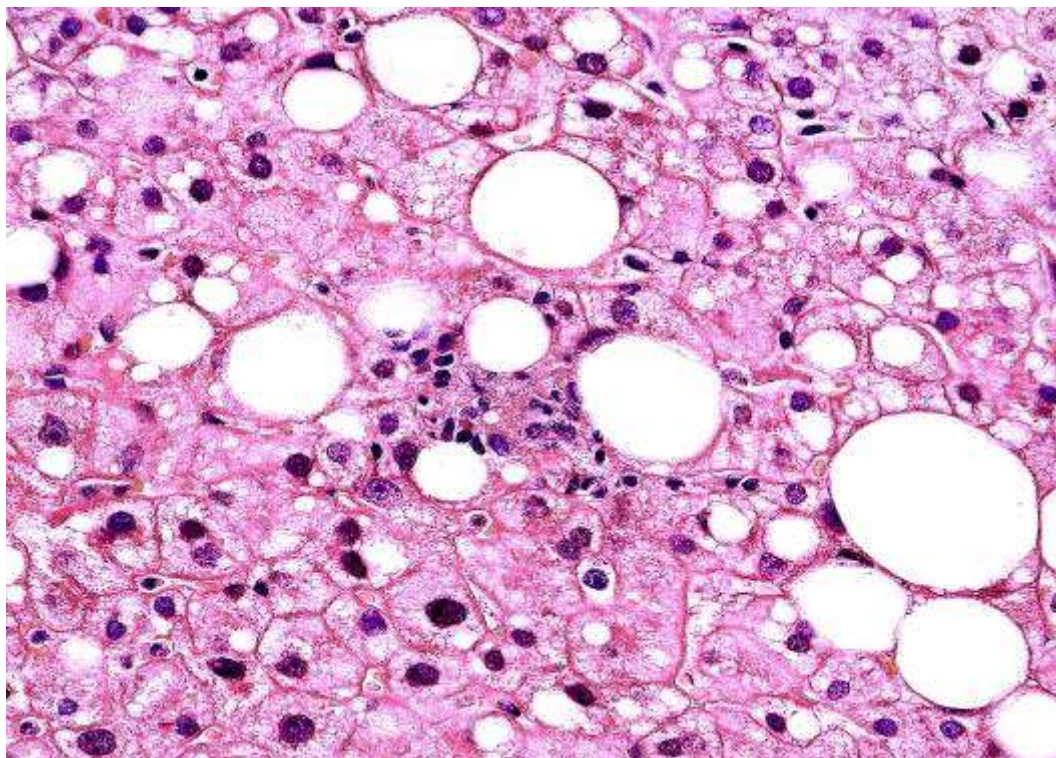


Рисунок 3.32 – Балонні гепатоцити при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x600.

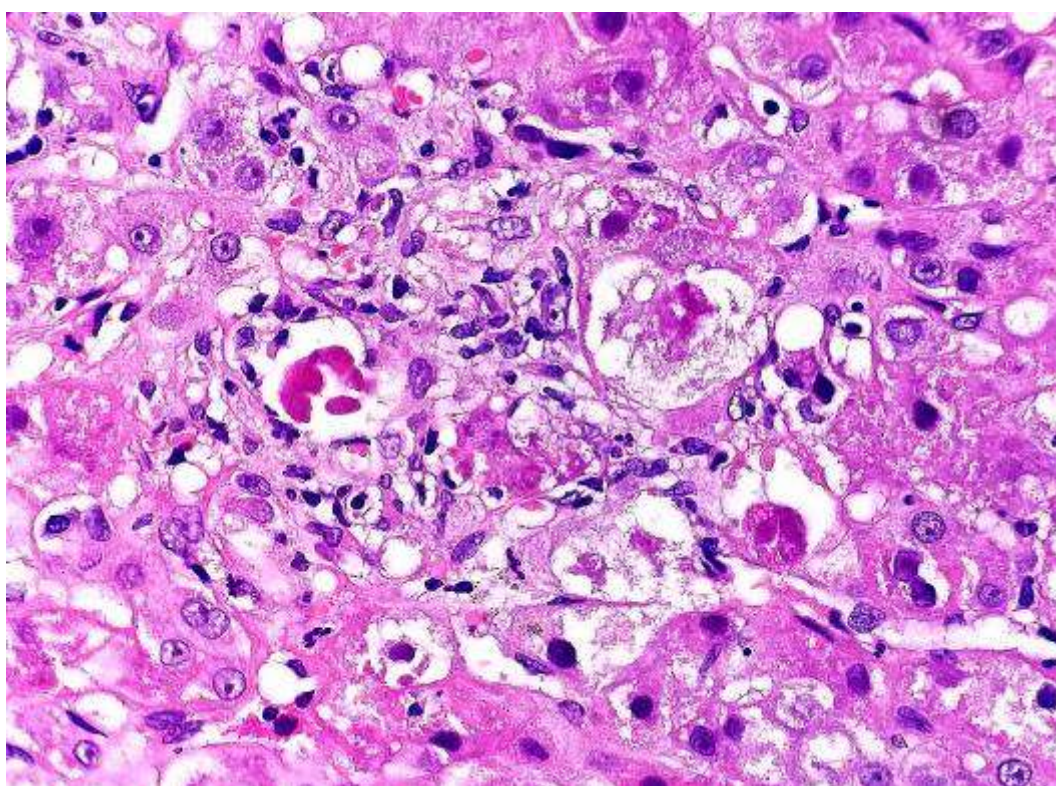


Рисунок 3.33 – Рожево-фіолетові тільця Малорі-Денка в балонних гепатоцитах з лейкоцитарним сателітозом при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x600.

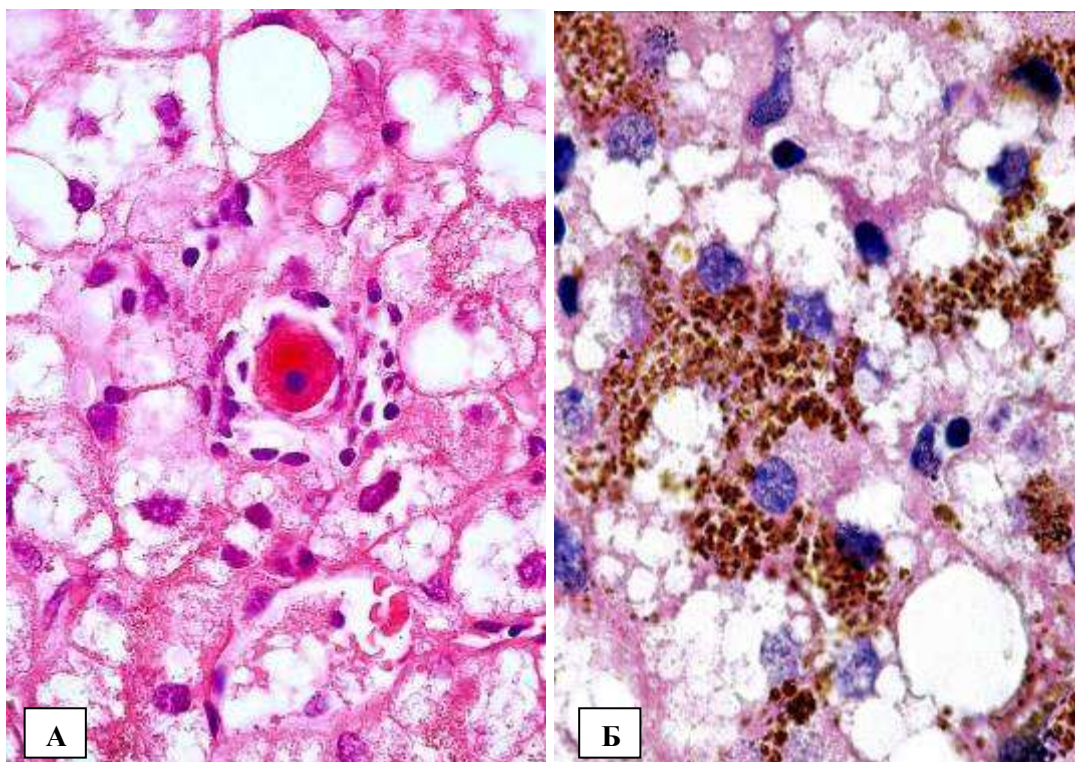


Рисунок 3.34 – НАСГ: А - апоптоз гепатоцита. Б - ареактивний стеатонекроз та накопичення ліпофусцину в гепатоцитах. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 1000.

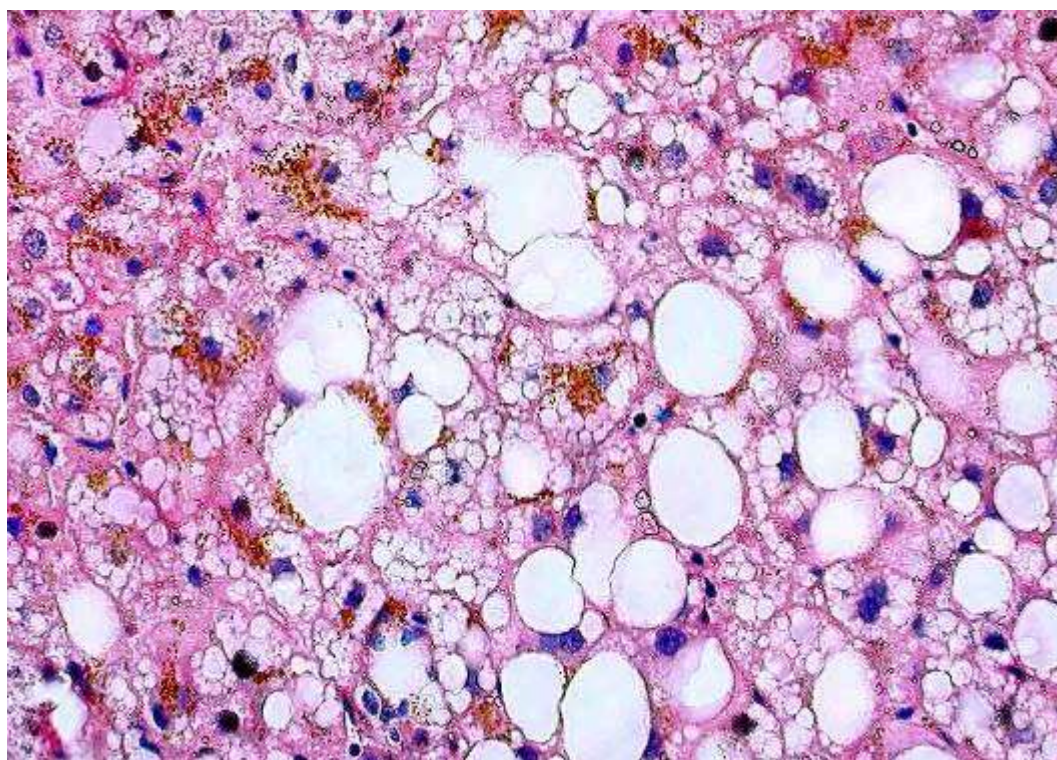


Рисунок 3.35 – Вогнище некрозу ділянки печінкової дольки, який одночасно охоплює гепатоцити зі стеатозом та перисинусоїдальні клітини при НАСГ. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

спостерігається лізис цитоплазми, пікноз ядра або каріолізис та структурна дезінтеграція клітин. У вогнищі некрозу виявляються нечисленні лейкоцити і лімфоцити, навколо вогнища некрозу спостерігається перифокальна реактивна запальна клітинна інфільтрація з лейкоцитів, лімфоцитів та макрофагів.

Гістохімічне вивчення гепатотрепанобіоптатів показало, що в печінці хворих на НАСГ має місце накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза (рис. 3.36) і двовалентного Fe^{2+} заліза (рис. 3.37) в гепатоцитах і макрофагах печінки різних зон печінкових дольок.

Аналіз накопичення тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в різних зонах дольок печінки у хворих на НАСГ показав, що відсоток гепатоцитів і макрофагів з накопиченим тривалентним Fe^{3+} залізом в центролобулярній Z_3 зоні ($1,07 \pm 0,32$ %) і в проміжній Z_2 зоні ($1,05 \pm 0,34$ %) дольок печінки статистично достовірно менший, ніж в перипортальній Z_1 зоні дольок печінки ($2,6 \pm 0,62$ %). Відсоток гепатоцитів і макрофагів з накопиченим двовалентним Fe^{2+} залізом достовірно ($p < 0,001$) більший в центролобулярній Z_3 зоні і в проміжній Z_2 зонах дольок печінки ($4,2 \pm 0,62$ % і $4,2 \pm 0,62$ % клітин відповідно), а в Z_1 зоні дольок печінки двовалентне Fe^{2+} залізо визначається в одиничних гепатоцитах ($1,0 \pm 0,37$ %) (табл. 3.2)

Таблиця 3.2 – Накопичення тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза ($M \pm m$) в гепатоцитах і макрофагах Z_1, Z_2, Z_3 зон печінкових дольок в трепанобіоптатах печінки хворих на НАСГ

| % гепатоцитів і макрофагів з Fe^{3+} | | | % гепатоцитів і макрофагів з Fe^{2+} | | |
|--|------------------------|-------------------------|--|----------------------|-----------------------|
| в Z_3 | в Z_2 | в Z_1 | в Z_3 | в Z_2 | в Z_1 |
| $1,07 \pm 0,32^{\&}$ | $1,05 \pm 0,34^{\&\&}$ | $2,6 \pm 0,62^{\&\&\&}$ | $4,2 \pm 0,62^{\@}$ | $4,2 \pm 0,62^{\@@}$ | $1,0 \pm 0,37^{\@@@}$ |

Примітка 1. - Дані проаналізовані за допомогою (H-критерію) Краскела-Уолліса.

Примітка 2.- достовірна різниця ($p < 0,05$) розподілу Fe^{3+} між $Z_1^{\&\&\&}$ і $Z_3^{\&}$, між $Z_1^{\&\&\&}$ і $Z_2^{\&\&}$;
Примітка 3.- достовірна різниця ($p < 0,05$) розподілу Fe^{2+} між $Z_1^{\@@@}$ і $Z_3^{\@}$, між $Z_1^{\@@@}$ і $Z_2^{\@@}$.

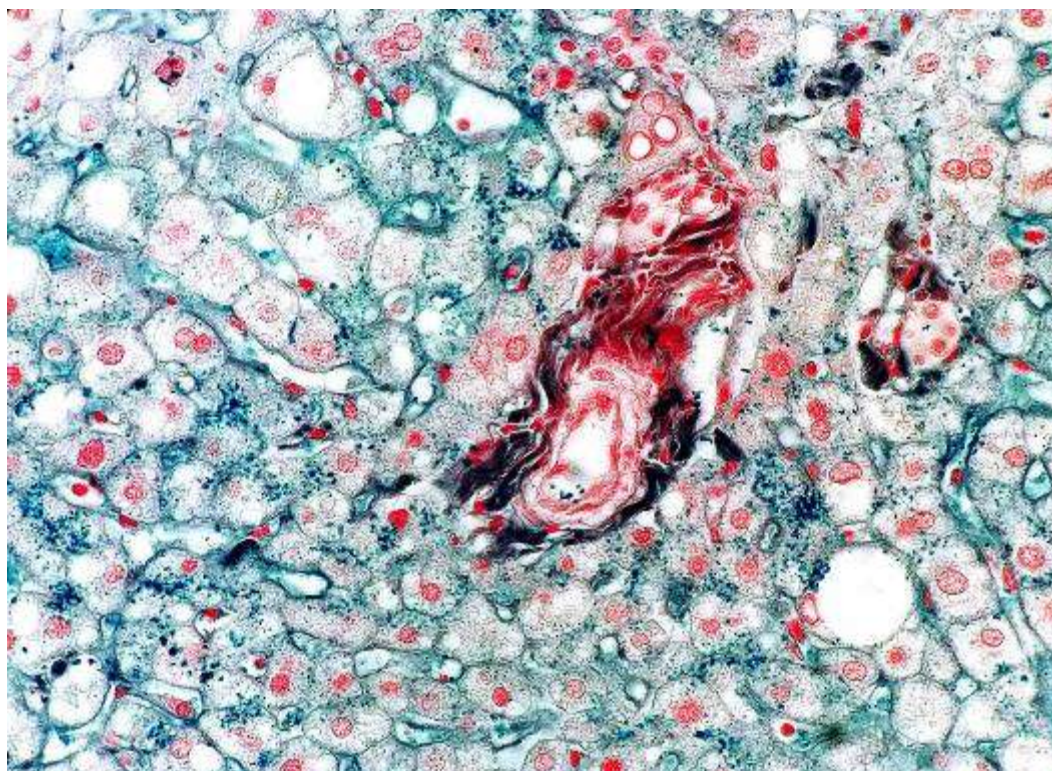


Рисунок 3.36 – Накопичення тривалентного Fe^{3+} + заліза G2 ступіння у гепатоцитах перипортальної Z_1 зони дольки печінки при НАСГ. Метод Перлса. Зб.: x 600.

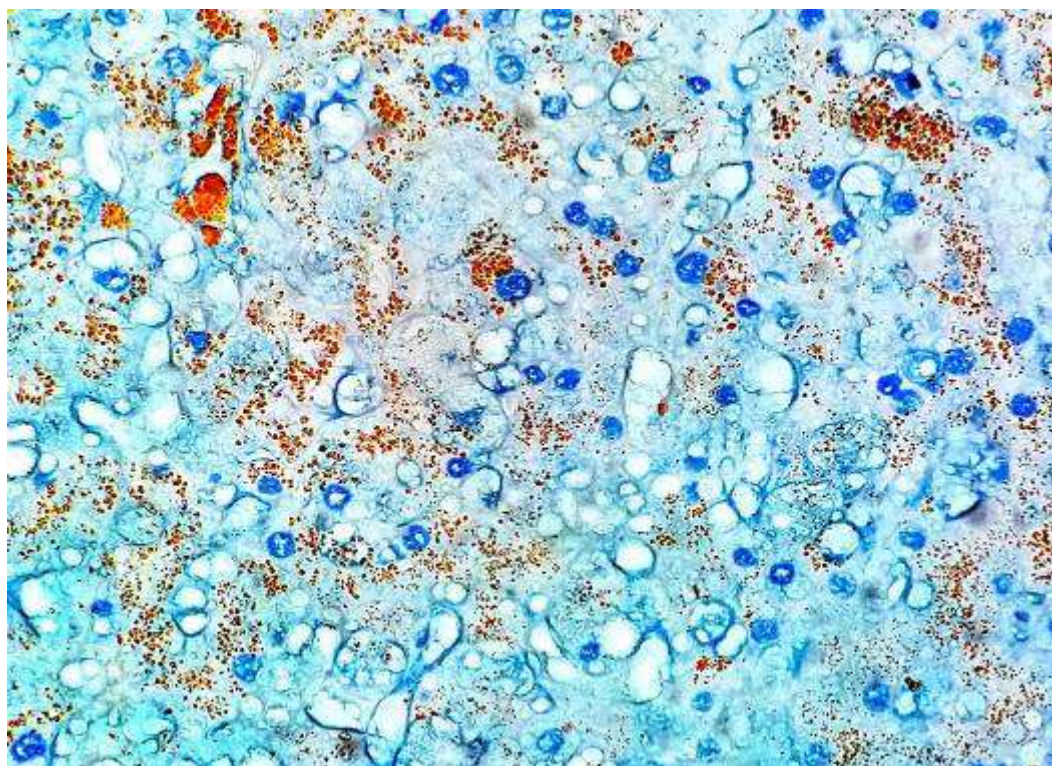


Рисунок 3.37 – Накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і макрофагах центролобулярної Z_3 і проміжної Z_2 зони дольки печінки при НАСГ. Модифікований метод Хьюкіла-Пула. Зб.: x 600.

Визначені певні відмінності в рівнях депонування двовалентного заліза в печінці при застосуванні різних гістохімічних методик для його виявлення. В зрізах трепанобіоптатів печінки, забарвлених методом Тірмана-Шмельцера з гексаціанофератом (III) калію, у 33,4% хворих на НАСГ виявлено накопичення двовалентного заліза легкого G2 ступеня в гепатоцитах централобулярних Z_3 і проміжних Z_2 зон дольок печінки. При паралельному проведенні в цих же трепанобіоптатах печінки реакції Хьюкіла-Пути виявлено накопичення двовалентного заліза мінімального G1 ступеня в гепатоцитах і макрофагах централобулярних Z_3 зон дольок печінки у 46,6 % хворих на НАСГ, а у 20 % хворих реакція на двовалентне залізо в печінці була негативною. Таким чином встановлено, що в печінці хворих на НАСГ підвищується вміст тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза, але між рівнями підвищеного депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах і в макрофагах печінки статистично достовірних відмінностей не виявлено.

У хворих на НАСГ також визначається незначна локальна, дрібновогнищева імуноклітинна інфільтрація дольок печінки, а також дрібновогнищева запальна змішано-клітинна інфільтрація порталних трактів і дольок печінки, яка в цілому, менш виражена і менш розповсюджена у порівнянні з запально-клітиною інфільтрацією печінки при АСГ. При мікроскопічному дослідженні в порталних трактах печінки спостерігаються малоклітинні лімфоцитарні інфільтрати без наявності лейкоцитів, а в печінкових дольках - поодинокі лімфоцити або короткі ланцюжки з лімфоцитів і макрофагів в перисинусоїдальних просторах, а також рідкі дрібні лімфоцитарні інфільтрати біля вогнищ стеатозу гепатоцитів. Поодинокі лейкоцити локалізовані навколо гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка. Проведені ІГХ дослідження показали, що при НАСГ в печінці виявляється значна кількість CD 68+ макрофагів, а також визначаються CD 4+ лімфоцити, CD 8+ Т-лімфоцити і поодинокі плазматичні клітини, які

нерівномірно розподілені в дольках і в портальних трактах печінки. У портальних трактах локалізовані нечисленні CD 68+ макрофаги, CD 8+ Т-лімфоцити і CD 4+ Т-лімфоцити; в печінкових дольках виявляються одиничні CD 8+ Т-лімфоцити, CD 4+ Т-лімфоцити (рис.3.38), плазматичні клітини (рис.3.39) і CD 68+ макрофаги Купфера, які локалізовані біля балонних гепатоцитів або інколи утворюють короткі клітинні ланцюжки у перисинусоїдальних просторах. Навколо пошкоджених гепатоцитів локалізовані дрібновогнищеві імуноцитарні інфільтрати з малочисельних лімфоцитів та CD 68+ макрофагів Купфера, або дрібновогнищеві запально-клітинні інфільтрати з лімфоцитів і поодиноких лейкоцитів (див. рис.3.32, 3.33).

Встановлено, що у хворих на НАСГ в парафінових зрізах печінки, забарвлених методом Ван-Гізона, Масон-трихром і Гоморі, виявляється перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз різного ступеня виразності. При перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі визначається фіброз перисинусоїдальних просторів навколо окремих гепатоцитів або груп гепатоцитів зі стеатозом централобулярної Z_3 і проміжної Z_2 зон печінкових дольок (рис.3.40А). При портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки виявляється помірний портальний фіброз з наявністю коротких портально-долькових фіброзних септ в Z_1 перисинусоїдальних зонах (рис. 3.40Б), а також перичелюлярний фіброз різного ступеня виразності навколо гепатоцитів зі стеатозом, локалізованих в перипортальній Z_1 зоні печінкових дольок. У деяких хворих перичелюлярний фіброз з перипортальної Z_1 зони розповсюджується по перисинусоїдальних просторах в проміжні Z_2 зони печінкових дольок. При обох типах фіброзу печінки перичелюлярний фіброз у вигляді «дротяних» або потовщених ниток найбільш виражений в осередках максимального стеатозу гепатоцитів (Рис. 3.41).

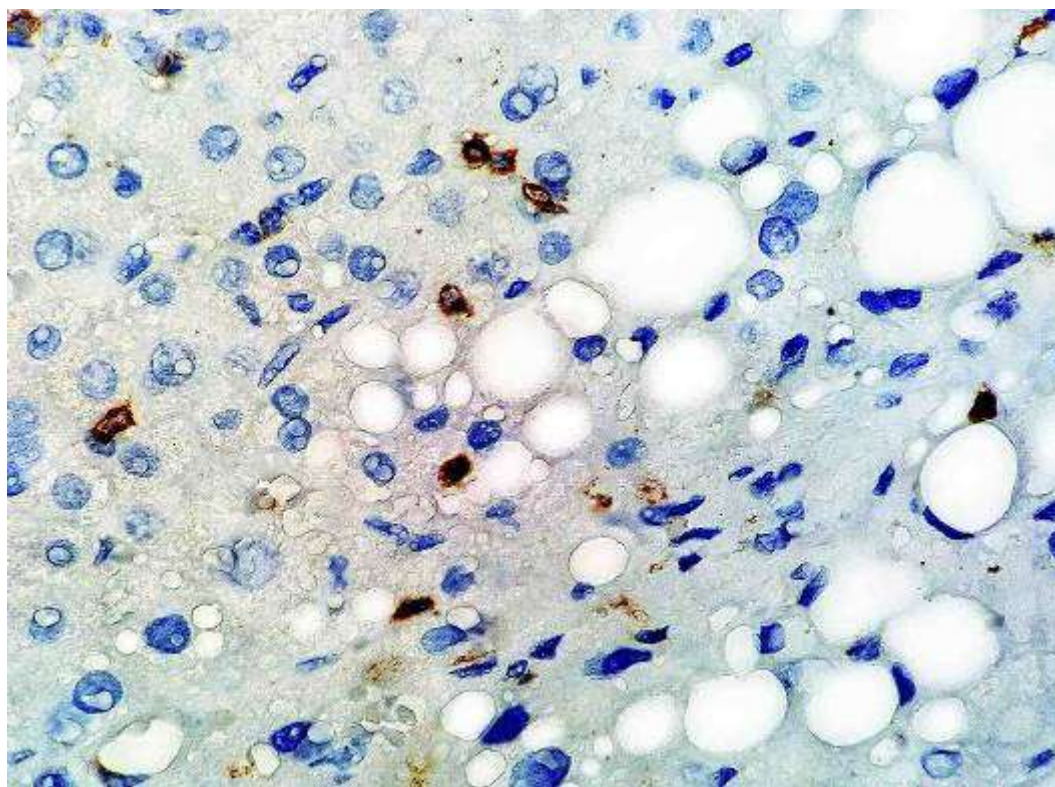


Рисунок 3.38 – CD4+ лімфоцити у перисинусоїдальних просторах поряд з балонними гепатоцитами при НАСГ. Мо *a-Hu CD4*, Clone *MT310*. Зб.: x600.

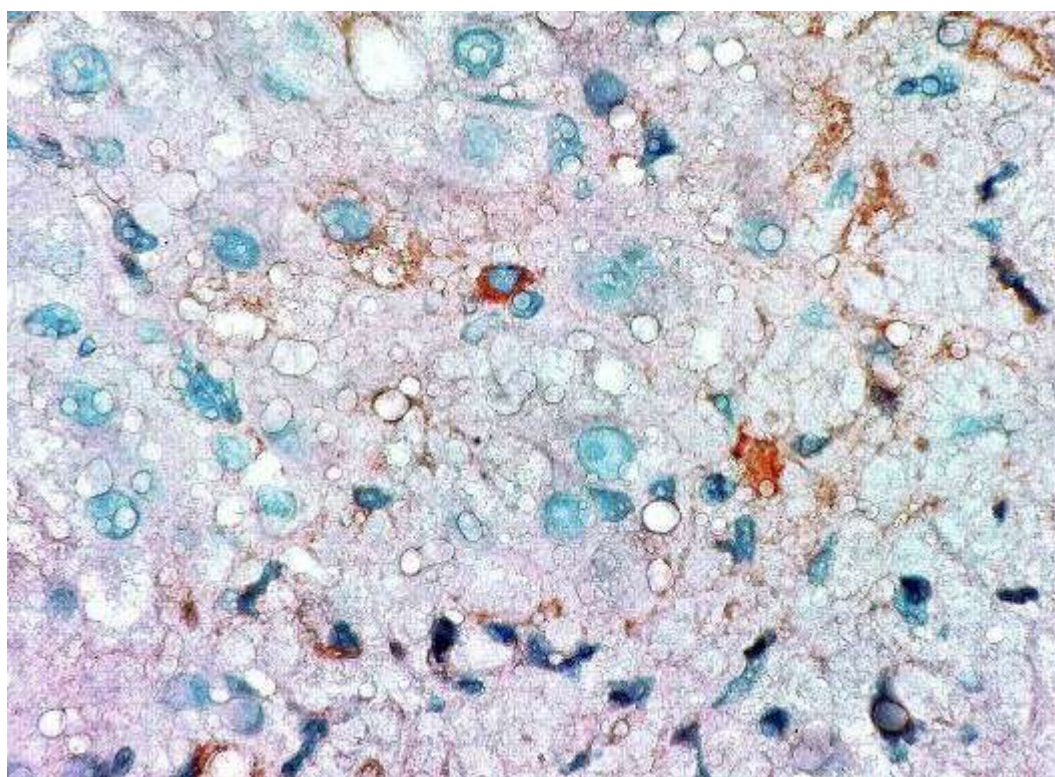


Рисунок 3.39 – Поодинокі плазматичні клітини у перисинусоїдальних просторах печінки при НАСГ. Мо *a-Hu Plasma Cell Ab-1*, Clone *LIV3G11*. Зб.: x600.

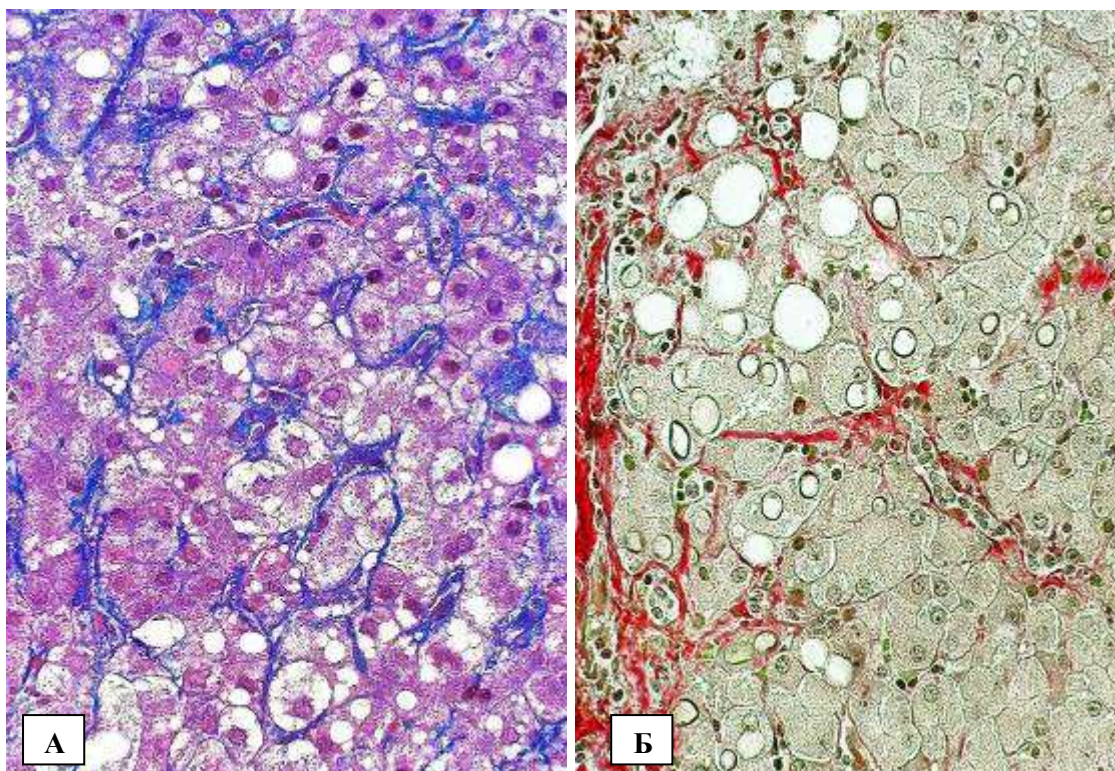


Рисунок 3.40 – НАСГ. А - Перисинусоїдально-перичелюлярний фіброз Z_3 і Z_2 зон дольки печінки. Б - Портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки з портально-дольковими фіброзними септами.. Забарвлення: А - Масон-трихром, Б- за Ван Гізон. Зб.: А і Б х600.

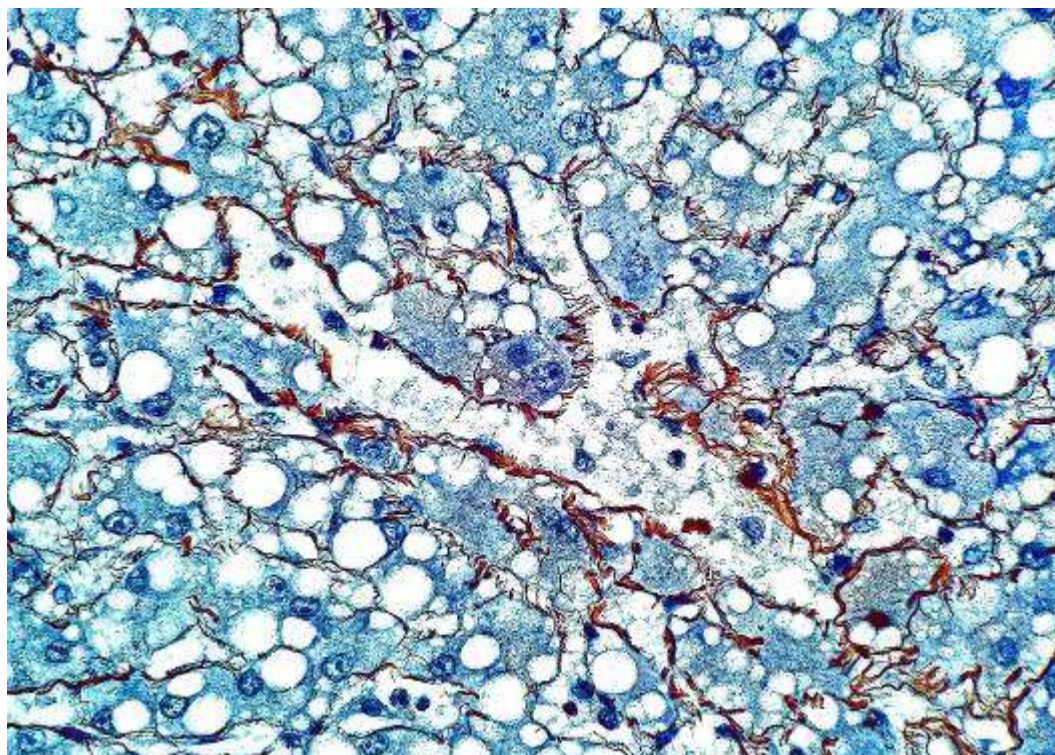


Рисунок 3.41 – Перисинусоїдально-перичелюлярний фіброз печінки при НАСГ. Імпрегнація ретикулярних волокон за Гоморі. Зб.: х 400.

3.3 Морфологічні особливості стеатозу і фіброзних змін печінки в гепатобіоптатах хворих на гемангіому та на камені жовчного міхура

При патоморфологічному дослідженні стеатозу, запальних і фіброзних змін печінки у хворих двох груп порівняння: в трепанобіоптатах печінки на віддаленні від дрібної гемангіоми печінки (10 пацієнтів) і в лапароскопічних біоптатах печінки, отриманих у 20 пацієнтів при лапароскопічній холецистектомії з приводу каменів жовчного міхура, отримані наступні дані. В дольках печінки дуже рідко спостерігаються гепатоцити з фігурами мітозу, а при ІГХ дослідженні Ki-67 позитивні гепатоцити складають 1–2 %.

Серед 30 хворих цих двох груп порівняння в печінці 5-ти пацієнтів стеатоз гепатоцитів не виявлено, в печінці 15-ти хворих (10-ти хворих на камені жовчного міхура і 5-ти хворих на дрібну гемангіому печінки) виявлено простий макровезикулярний стеатоз ніж 5 % поодиноких гепатоцитів.. Характерною мікроскопічною особливістю виявленого простого стеатозу печінки була відсутність певного зонального розташування гепатоцитів зі стеатозом в різних за кисневим та субстратним забезпеченням Z_1 , Z_2 і Z_3 метаболічних зонах печінкових дольок, а також відсутність балонних гепатоцитів та гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка.

В трепанобіоптатах печінки, отриманих у 10-ти хворих на відстані від дрібної гемангіоми, не виявлено імуноклітинної та запальної змішанно-клітинної інфільтрації портальних трактів та дольок печінки. В парафінових зрізах печінки, забарвлених методом Ван-Гізон і Масон-трихром, не виявлено перицелюлярного або портально-септального фіброзу печінки. При імпрегнації за Гоморі визначено упорядкований ретикуліновий каркас печінки з ніжних, дуже тонких ретикулінових волокон в перисинусоїдальних просторах та навколо гепатоцитів (рис.3.42). ІГХ методиками в перисинусоїдальних просторах подекуди визначалися ніжні, тонкі фрагменти колагенових волокон IV типу, колагенові волокна I і III типу не виявлялися.

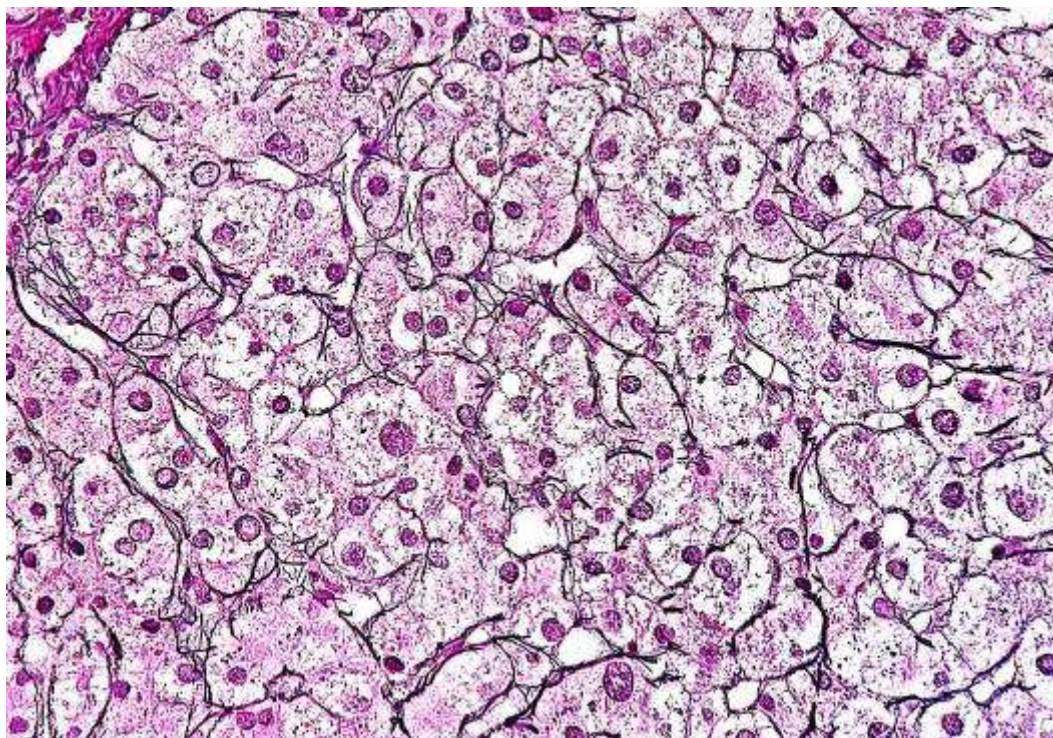


Рисунок 3.42 – Ретикуліновий каркас з тонких ретикулінових волокон в перисинусоїдальних просторах та навколо гепатоцитів на відстані від дрібної гемангіоми печінки. Імпрегнація ретикулярних волокон за Гоморі. Зб.: x 400.

В лапароскопічних біоптатах країв печінки 20 пацієнтів, отриманих при лапароскопічній холецистектомії з приводу каменів жовчного міхура, в дольках печінки не виявлено імуноклітинної та запальної змішанно-клітинної інфільтрації. У 7 пацієнтів, при забарвленні парафінових зрізів за Ван-Гізон і Масон-трихром, в дольках печінки спостерігалися короткі фрагменти вогнищевого фіброзу легкого ступеня з наявністю в них активованих α SMA+ перисинусоїдальних зірчастих клітин та локальних відкладень колагенових волокон IV типу. При забарвленні парафінових зрізів печінки за Ван-Гізон і Масон-трихром у 10 пацієнтів виявлявся легкий F1 фіброз менш ніж 50 % портальних трактів з наявністю малочисельних тонких, коротких портально-долькових фіброзних септ (рис.3.43) в Z_1 зонах печінкових дольок. В деяких портальних трактах визначалися поодинокі лімфоцити, які не утворювали клітинних інфільтратів. При ІГХ дослідженні в портальних трактах виявляли поодинокі α SMA+ портальні міофібробласти та фрагменти колагенових волокон IV і III типу.

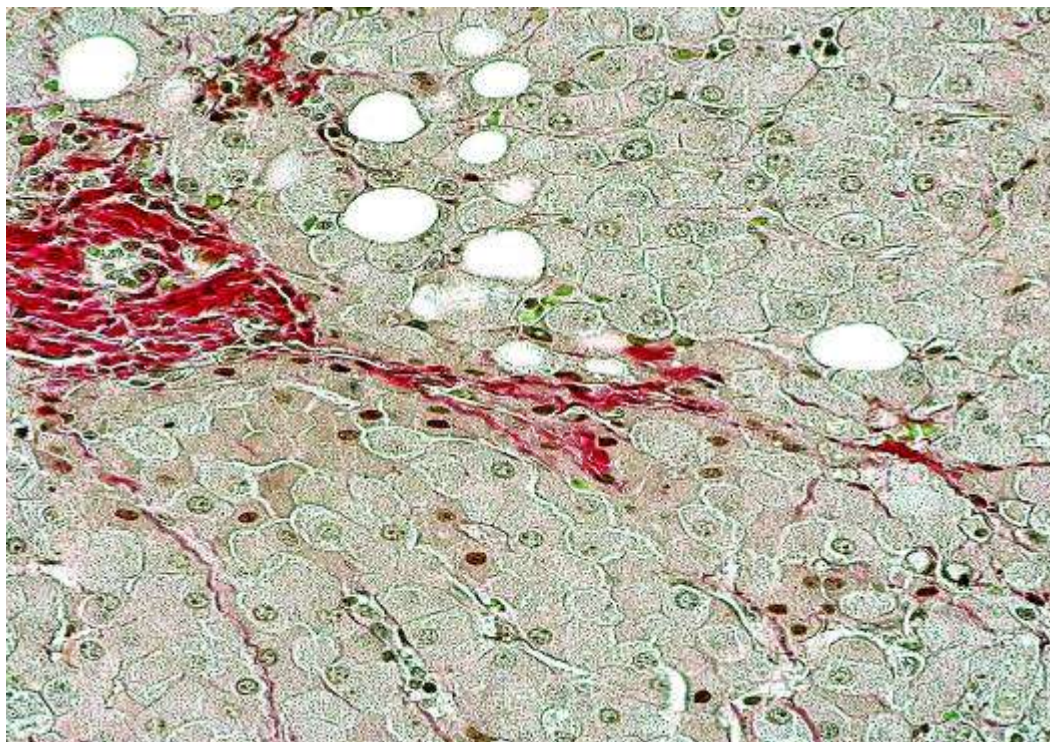


Рисунок 3.43 – Простий макровезикулярний стеатоз поодиноких гепатоцитів, легкий F1 портальний фіброз з тонкими, короткими фіброзними септами при каменях жовчного міхура. Забарвлення за Ван Гізон. Зб.: x600.

Резюме. Виконані ПГ, ГХ, ЕМ і ІГХ дослідження показали, що АСГ і НАСГ характеризують схожі патоморфологічні зміни. У хворих на АСГ і НАСГ визначається стеатоз печінки легкого S_1 ступеня, помірного S_2 і тяжкого S_3 ступеня. У хворих на АСГ переважає змішаний мікро-макровезикулярний стеатоз гепатоцитів перипортальних Z_1 та проміжних Z_2 зон печінкових дольок, у деяких хворих визначається поєднання макро-середньовезикулярного і мікровезикулярно-пінястого стеатозу гепатоцитів, розповсюдженого у всіх зонах печінкових дольок. В печінці хворих на НАСГ переважає макровезикулярний або макро-середньовезикулярний стеатоз гепатоцитів, який охоплює гепатоцити перипортальних Z_1 зон печінкових дольок і може розповсюджуватися на проміжні Z_2 зони печінкових дольок.

За даними ЕМ досліджень ліпідні краплі в гепатоцитах хворих на АСГ і на НАСГ мають гомогенну ультраструктуру низької електронної щільності, яку надають їй тригліцериди. Зовнішня поверхня ліпідних крапель вкрита тонким шаром з білків помірної електронної щільності і має

множинні дрібні кавеоли на межі з цитозолем гепатоцита, які свідчать про активний стан ліпідних крапель. Важливою субмікроскопічною особливістю гепатоцитів у хворих на АСГ і НАСГ є наявність в їх цитоплазмі значної кількості витягнутих або загнутих, циліндричних гігантських мегамітохондрій з короткими кристами та центрально локалізованими електронно-щільними, голчастими паралельними паракристалічними структурами, а також тісний взаємозв'язок мітохондрій і мегамітохондрій з цистернами гранулярної ЕС. Базальна плазмолема гепатоцитів багата на мікроворсинки, які випинаються в перисинусоїдально-периендотеліальний простір.

Проведений ВЕР-ХМС аналіз показав, що в печінці померлих хворих на НАСГ реєструється значно підвищений рівень вмісту холестерину і його ефірів, а також насичених вищих жирних кислот з високою ліпотоксичністю, зокрема стеаринової і пальмітинової кислот. ГХ та МФМ методами визначено, що у хворих на АСГ і НАСГ в гепатоцитах і макрофагах виявляється накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза в центролобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зонах печінки, в той час як накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза у хворих на НАСГ переважає в перипортальній Z_1 зоні, а у хворих на АСГ – в центролобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зонах дольок печінки.

ПГ дослідження довели, що патогномонічними для АСГ і НАСГ змінами печінки, крім стеатозу гепатоцитів, є наявність різної кількості балонних гепатоцитів, гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, апоптотично змінених гепатоцитів, гепатоцитів в стані стеатонекрозу та дрібних вогнищ синусоїдального ліпопелозу; дрібновогнищеві запальні інфільтрати з нечисленних нейтрофілів, еозинофілів, лімфоцитів і макрофагів локалізовані навколо балонних гепатоцитів і гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка. У хворих на АСГ і АСГ в біоптатах печінки також виявляються дрібні вогнища некрозу певних ділянок печінкових дольок, оточені перифокальною реактивною клітинною інфільтрацією з лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів.

Проведені ІГХ дослідження показали, що в перисинусоїдальних просторах дольок печінки переважають CD 68+ макрофаги, які концентруються в осередках вираженого стеатозу гепатоцитів і синусоїдального ліпопеліозу, а також виявляються CD 4+ лімфоцити, CD 8+ Т-лімфоцити і поодинокі плазматичні клітини, які інколи утворюють короткі клітинні ланцюжки. В портальних трактах локалізовані нечисленні CD 68+ макрофаги, CD 8+ Т-лімфоцити і CD 4+ Т-лімфоцити, які інколи формують малоінтенсивні дрібновогнищеві імуноцитарні інфільтрати.

Проведені ГХ і ІГХ дослідження показали, що у хворих на АСГ і НАСГ виявляються мікроскопічні ознаки перисинусоїдально-перичелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки різного ступеня виразності. При обох різновидах фіброзу печінки перичелюлярний фіброз найбільш виражений в осередках максимального стеатозу гепатоцитів. У деяких хворих на АСГ в печінці визначається локальний перивенулярний фіброз та ізольований перибіліарний фіброз.

ПМ зміни в печінці при НАСГ, на відмінність від АСГ, відрізняються переважанням крупно-середньовезикулярного стеатозу гепатоцитів, нижчою кількістю гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, меншою виразністю та меншою розповсюдженістю дрібновогнищевої запальної змішано-клітинної інфільтрації дольок печінки, а також відсутністю локального перивенулярно-перичелюлярного та ізольованого перибіліарного фіброзу. Але виявлені несуттєві відмінності ПМ змін печінки є недостатніми для доказової диференційної діагностики АСГ і НАСГ в трепанобіоптатах печінки без наявності відповідних клініко-лабораторні даних хворих.

Основні положення цього розділу опубліковані в 4-х статтях [179-181, 187], 5-и тезах [182-186], в 1-му патенті України на винахід (Пат. № 116968 Україна, МПК⁷(2006.01)) та в 1-му патенті України на корисну модель (Пат. № 108321 Україна, МПК⁷(2016.01)).

РОЗДІЛ 4

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ПРОЯВИ АКТИВНОСТІ НЕАЛКОГОЛЬНОГО І АЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТУ

Слід зазначити, що приводом для проведення пункційної трепанобіопсії або лапароскопічної біопсії печінки, як правило, було виявлення у пацієнтів лабораторних ознак дисфункції печінки за даними рутинних досліджень сироватки крові, а також наявність гіперехогенних вогнищ при скринінговому ультразвуковому дослідженні (УЗД) печінки, що викликали підозру на розвиток пухлинного процесу в печінці.

Дисфункція печінки у морфологічно обстежених нами хворих на НАСГ і АСГ виявлялася підвищенням в сироватці крові значень АЛТ більше ніж в 10 разів і АСТ більше ніж в 5 разів, при цьому коефіцієнт де Рітіса був зниженим і становив менше 0,5. Значення фракцій загального, некон'югованого і кон'югованого білірубіну варіювали в межах фізіологічних коливань. Про порушення білково-синтетичної функції печінки у хворих на хронічний стеатогепатит свідчило підвищення значень тимол-вероналової проби більш ніж в 2 рази при НАСГ і в 4-5 разів - при АСГ.

Для хворих НАСГ, що страждали на цукровий діабет 2 типу та інсулінорезистентність, характерною була дисліпідемія з підвищенням рівня ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) і ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ).

У більшості пацієнтів, які страждали на НАСГ і АСГ, за даними УЗД і комп'ютерної томографії (КТ) печінки визначалася збільшена печінка гетерогенної структури, у багатьох випадках в печінці виявлялися множинні гіперехогенні вогнища. У всіх морфологічно обстежених нами хворих на НАСГ і АСГ були негативними сироваткові маркери хронічного вірусного гепатиту В і С.

Виконаний патоморфологічний аналіз біопсійно-секційного матеріалу печінки пацієнтів з НАСГ і АСГ дає підставу розрізнити морфологічні прояви транзиторної активності гепатиту і несприятливі ускладнення НАСГ і АСГ. З урахуванням клініко-лабораторних даних про дисфункцію печінки у хворих на момент біопсії печінки нами виділені морфологічні ознаки активності АСГ і НАСГ, які свідчать про інтенсифікацію метаболічних і деструктивно-апоптотичних змін гепатоцитів, а також про реактивні зміни імуноклітинної та запально-клітинної інфільтрації печінки незалежно від наявності/відсутності фіброза або цироза печінки.

4.1 Патоморфологічні прояви інтенсифікації метаболічних процесів, деструктивно-апоптотичних і компенсаторних змін гепатоцитів при активації неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту

Патоморфологічні ознаки активності НАСГ і АСГ доцільно розділити на найбільш поширені, які виявляються в біоптатах печінки практично всіх хворих на хронічний стеатогепатит з клініко-лабораторними ознаками дисфункції печінки, і на рідкі ознаки активності хронічного стеатогепатиту, рецидивні тільки у деяких пацієнтів.

За результатами мікроскопічних досліджень загальною ознакою активності хронічного стеатогепатиту, характерною для хворих на НАСГ і АСГ, є зростання тяжкості стеатозу печінки від S_1 до S_3 ступеня. При дослідженні біопсійно-секційного матеріалу 198 хворих на НАСГ макровезикулярний стеатоз гепатоцитів перипортальних і проміжних зон печінкових дольок легкого S_1 ступеня виявлено у 63 пацієнтів (31,81 % хворих на НАСГ), змішаний макро-мікровезикулярний стеатоз гепатоцитів помірного S_2 ступеня виявлено у 95 (47,99 %) хворих, субтотальний змішаний стеатоз гепатоцитів тяжкого S_3 ступеня виявлено у 40 (20,20 %)

хворих на НАСГ. При дослідженні біопсійно-аутопсійного матеріалу 107 хворих на АСГ переважно мікроезизикулярний стеатоз перипортальних гепатоцитів легкого S_1 ступеня було виявлено у 30 (28,03 %) хворих, змішаний макро-мікроезизикулярний стеатоз печінки помірного S_2 ступеня виявлено у 32 (29,91 %) хворих, субтотальний змішаний тяжкий S_3 стеатоз печінки виявлено у 45 (42,06 %) хворих на АСГ.

Мікроскопічний аналіз біоптатів печінки хворих на НАСГ показує, що по мірі зростання стеатозу печінки від легкого S_1 до помірного S_2 і тяжкого S_3 ступеня переважно макроезизикулярний стеатоз охоплює всі зони печінкових дольок і стає панлобулярним (рис.4.1). В печінці хворих на НАСГ нерідко спостерігається поширення макро-середньоезизикулярного стеатозу гепатоцитів, рідко – макро-мікроезизикулярного стеатозу печінкових клітин. Поширення гепатоцитів з відповідним стеатозом виявляється при забарвленні гістологічних зрізів гематоксиліном та еозином, Суданом III.

У хворих на АСГ по мірі зростання стеатозу печінки від легкого S_1 до помірного S_2 і тяжкого S_3 ступеня спостерігається інтенсифікація переважно мікроезизикулярного стеатозу гепатоцитів, який нерідко комбінується з домішкою макроезизикулярного стеатозу або вогнищами пінястого стеатозу гепатоцитів. У деяких хворих на АСГ при зростанні стеатозу печінки спостерігається поширення одночасно мікроезизикулярного, середньо- і крупноезизикулярного стеатозу гепатоцитів. Слід відзначити, що у хворих на НАСГ і на АСГ зростання стеатозу печінки до помірного S_2 і тяжкого S_3 ступеня завжди супроводжується не тільки інтенсифікацією і поширенням відповідного стеатозу гепатоцитів, але також значним збільшенням кількості балонних гепатоцитів в дольках печінки

Щоб перевірити, чи дійсно при зростанні тяжкості стеатогепатиту, що визначається патоморфологічними дослідженнями, в печінці також підвищується вміст ліпідів, нами виконано поглиблений ВЕР-ХМС аналіз ліпідів в печінці померлих хворих на НАСГ з різним ступенем тяжкості

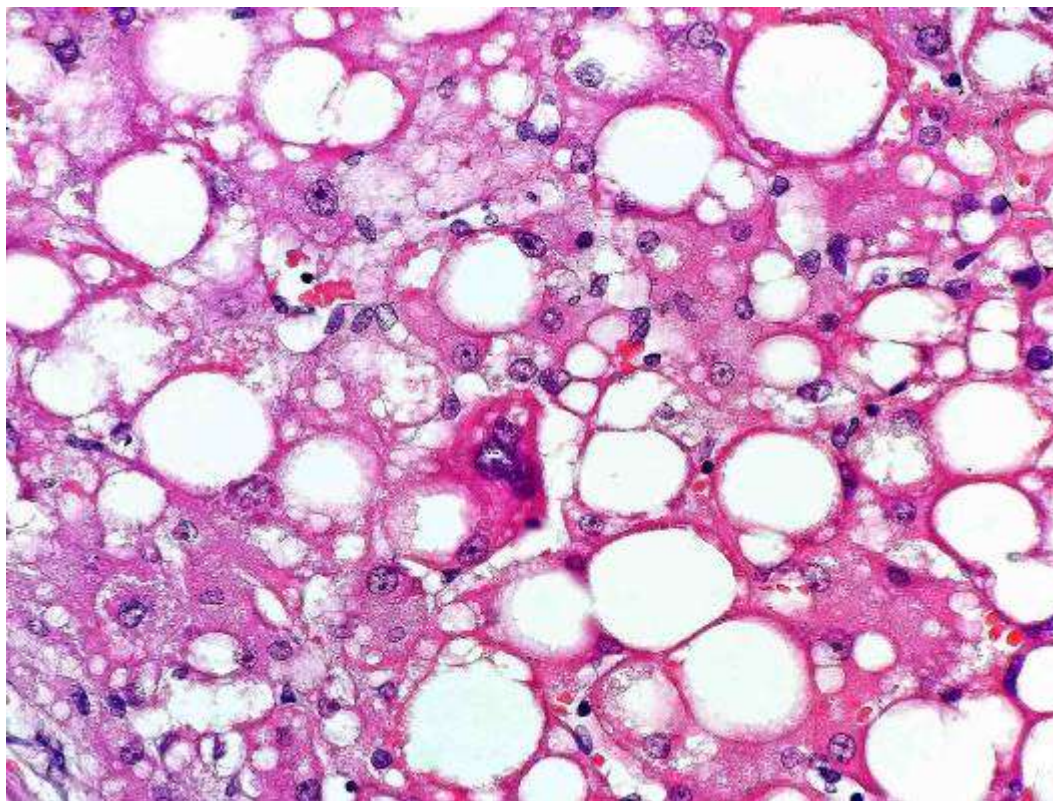


Рисунок 4.1 – Інтенсифікація макровезикулярного стеатозу гепатоцитів і поява балонних гепатоцитів при активації НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

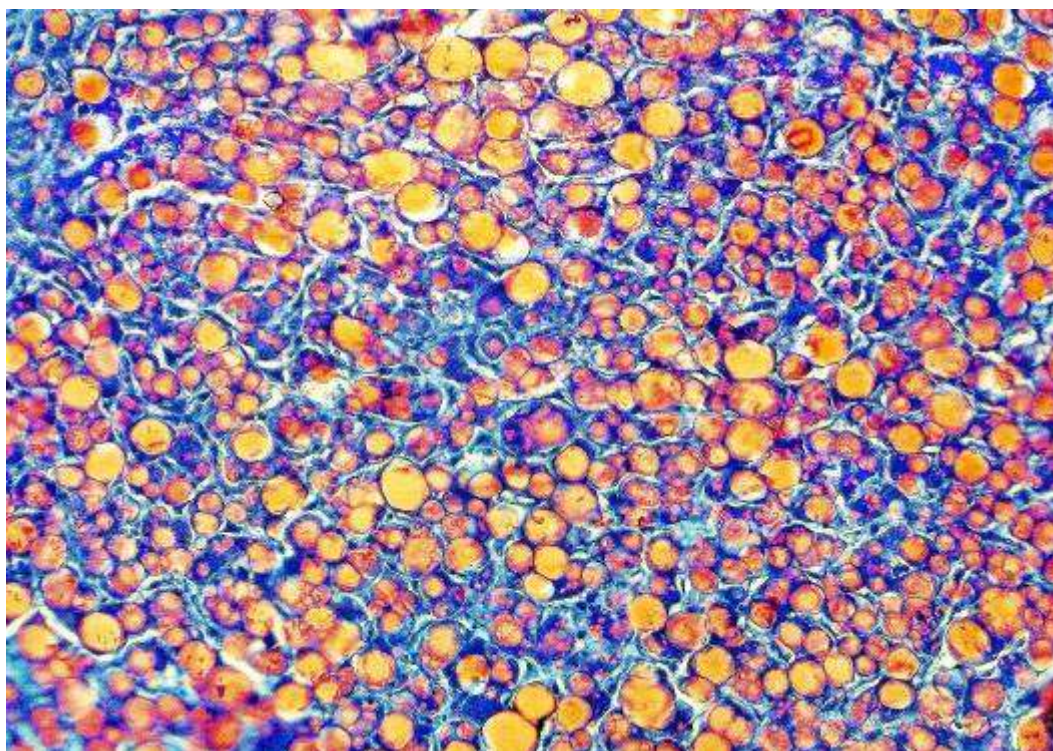


Рисунок 4.2 – Розповсюдження макровезикулярного стеатозу гепатоцитів до панлобулярного при активації НАСГ. Забарвлення Судан III. Зб.: x 400.

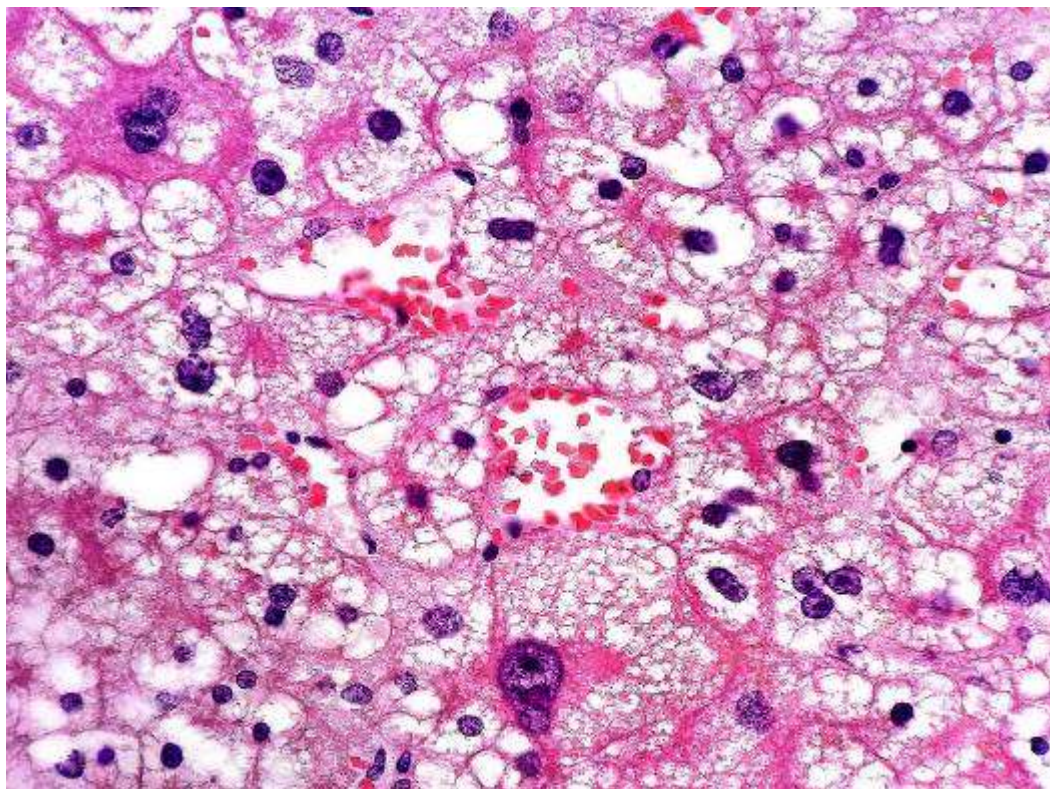


Рисунок 4.3 – Інтенсифікація мікроевезикулярного стеатозу гепатоцитів при активації АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

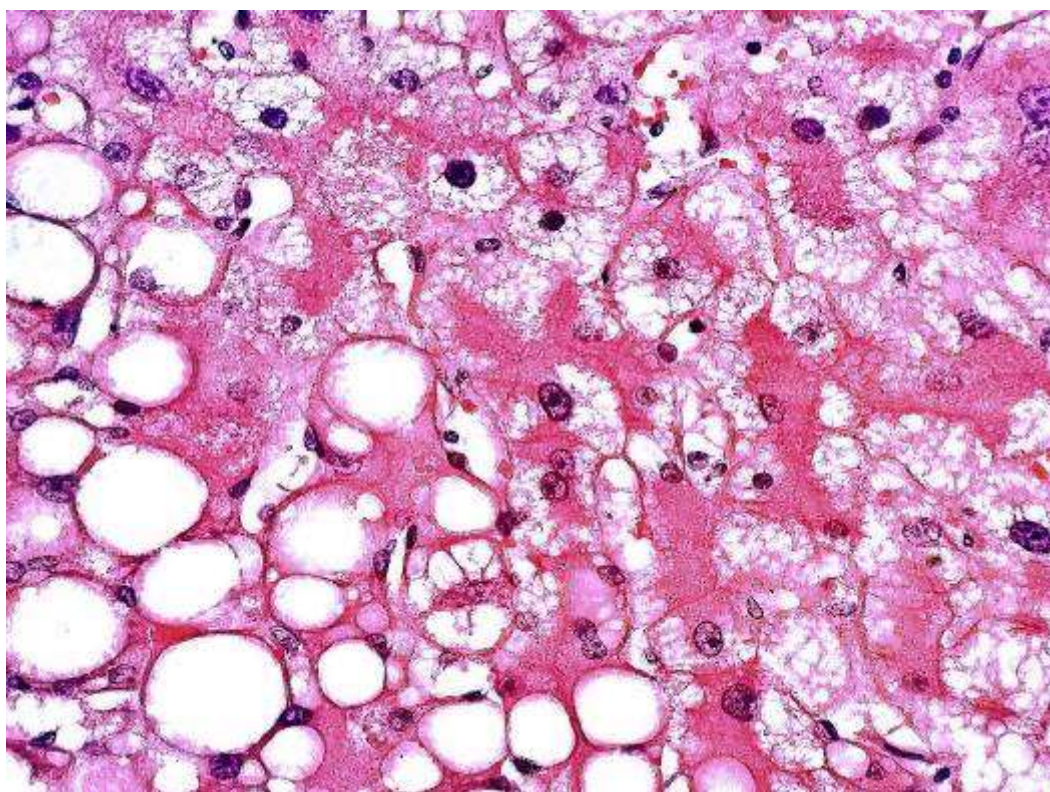


Рисунок 4.4 – Інтенсифікація мікро- і макроевезикулярного стеатозу гепатоцитів при активації АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

стеатозу. Результати проведених ВЕР-ХМС досліджень показали, що по мірі зростання тяжкості стеатозу печінки в печінці достовірно підвищується вміст холестерину, а також вміст гепатотоксичних пальмітинової і стеаринової кислот. При ВЕР-ХМС аналізі ліпідів печінки у померлих хворих на НАСГ і печінки померлих хворих без стеатозу виявлено, що рівень вмісту холестерину в печінці без стеатозу достовірно нижчий, ніж в печінці з тяжким S₃ ступенем стеатозу (рис. 4.5).

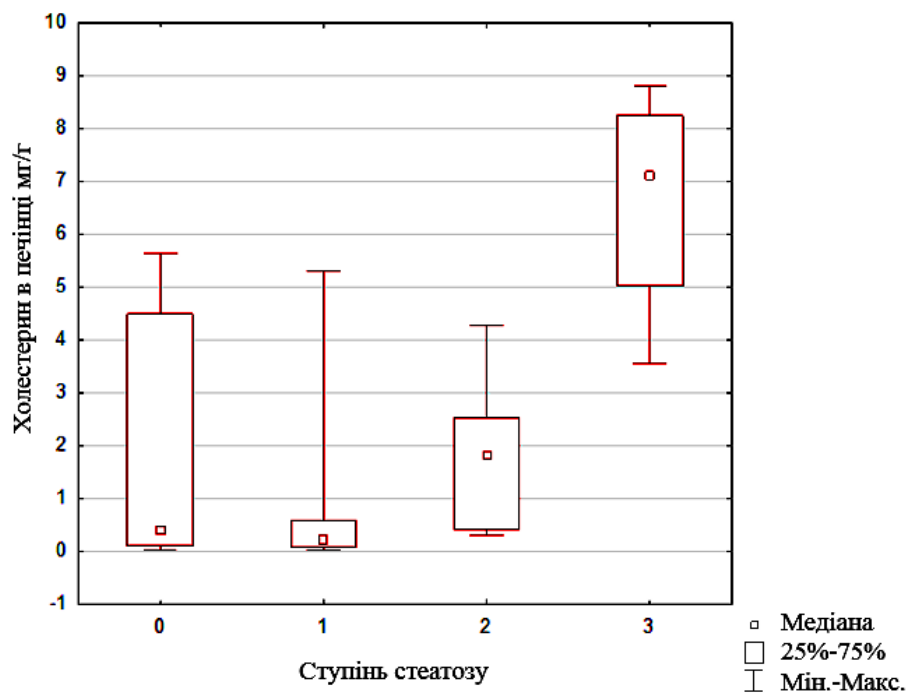


Рисунок 4.5 – Показники медіани вмісту холестерину в печінці померлих хворих на НАСГ в залежності від ступеня тяжкості стеатозу за даними ВЕР-ХМС аналізу.

За даними ВЕР-ХМС аналізу медіана рівня вмісту холестерину в печінці з легким S₁ ступенем стеатозу становила 0,22 (0,08; 0,57) мг/г, що достовірно менше, ніж при тяжкому S₃ ступеню стеатозу 7,10 (5,03; 8,25) мг/г ($U = 1,000$; $p < 0,005$). Медіана рівня вмісту холестерину в печінці при помірному S₂ ступеню стеатозу 1,83 (0,41; 2,52) мг/г була достовірно меншою, ніж при тяжкому S₃ ступеню стеатозу 7,10 (5,03; 8,25) мг/г ($U = 2,000$; $p < 0,014$). Медіани рівня вмісту холестерину в печінці достовірно не відрізнялися при порівнянні контрольної групи з S₀ стеатозом з групами стеатозу легкого S₁

ступеня ($U = 41,000$; $p < 0,744$) і помірного S_2 ступеня ($U = 45,000$; $p < 0,323$), а також при порівнянні між собою груп з легким S_1 і помірним S_2 ступенем стеатозу ($U = 27,000$; $p < 0,055$). Таким чином, доведено, що рівень холестерину в печінці без стеатозу був достовірно меншим, ніж в печінці з тяжким S_3 ступенем стеатозу ($U = 3,000$; $p < 0,016$).

Ретроспективний аналіз лабораторних даних померлих хворих на НАСГ показав, що у них за життя в плазмі крові реєструвався підвищений вміст загального холестерину, ЛПНЩ, ЛПВЩ і тригліцеридів (ТГ) (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Показники ліпідогам (ммоль / л) плазми крові померлих хворих на неалкогольний стеатогепатит з різним ступенем стеатозу печінки

| Ступінь тяжкості стеатозу печінки | Загальний холестерин | | | ЛПНЩ | | | ЛПВЩ | | | Тг | | |
|-----------------------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Me | Q1 | Q3 | Me | Q1 | Q3 | Me | Q1 | Q3 | Me | Q1 | Q3 |
| S0 | 4,19 | 3,79 | 5,30 | 3,67 | 2,92 | 4 | 1,11 | 0,78 | 1,75 | 1,12 | 0,77 | 1,7 |
| S1 | 4,47 | 4,18 | 4,18 | 2,85 | 2,27 | 4,65 | 1,01 | 0,82 | 2,2 | 2 | 1,22 | 2,2 |
| S2 | 5,25 | 3,93 | 5,82 | 3,71 | 2,59 | 4,81 | 1 | 0,77 | 1,56 | 1,18 | 0,75 | 1,56 |
| S3 | 4,44 | 3,79 | 6,21 | 2,77 | 1,97 | 6,09 | 0,93 | 0,63 | 1,13 | 1,70 | 0,93 | 2,30 |

Примітка - ЛПНЩ-ліпопротеїни низької щільності, ЛПВЩ-ліпопротеїни високої щільності; Тг-тригліцериди, Me -медіана, Q1-верхній кватиль, Q3-нижній кватиль.

При аналізі взаємозв'язків ступеня тяжкості стеатозу печінки у померлих хворих на НАСГ з даними їх прижиттєвих ліпідогам виявлена статистично значуща позитивна залежність між вмістом загального холестерину і ЛПВЩ в плазмі крові, між підвищенням ступеня тяжкості стеатозу печінки при НАСГ і підвищенням рівня загального холестерину і ЛПВЩ в плазмі крові (табл. 4.2). При порівнянні ступеня тяжкості стеатозу печінки тільки з показниками рівня ЛПВЩ спостерігалася негативна залежність: зростанню ступеня тяжкості стеатозу печінки відповідало зниження рівня холестерину в плазмі крові (табл. 4.2).

Таблиця 4.2 –Залежність ступеня тяжкості стеатозу печінки у померлих хворих на НАСГ від рівня загального холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові за їх життя

| Параметри | Загальний холестерин плазми крові (ммоль/л) | ЛПВЩ (ммоль/л) | Гістологічна ступінь тяжкості стеатозу печінки при НАСГ |
|---|---|----------------|---|
| Загальний холестерин плазми крові (ммоль/л) | 1 | - | - |
| ЛПВЩ плазми крові (ммоль/л) | 0,54* | 1 | - |
| Гістологічна ступінь тяжкості стеатозу печінки при НАСГ | 0,18* | - 0,23** | 1 |

Примітка 1. - дані проаналізовані з застосуванням регресійного аналізу.

Примітка 2. - * позитивна залежність між ступенем стеатозу печінки і показниками загального холестерину з ліпопротеїнами високої щільності плазми крові;

Примітка 3. - ** негативна залежність між ступенем стеатозу печінки і показниками ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові.

Виконані ВЕР-ХМС дослідження показали, що у померлих хворих на НАСГ з тяжким ступінем стеатозу печінки в печінці підвищений рівень пальмітинової і стеаринової кислот, в порівнянні з вмістом таких кислот в печінці померлих пацієнтів, які не страждали на НАСГ (рис. 4.6, 4.7).

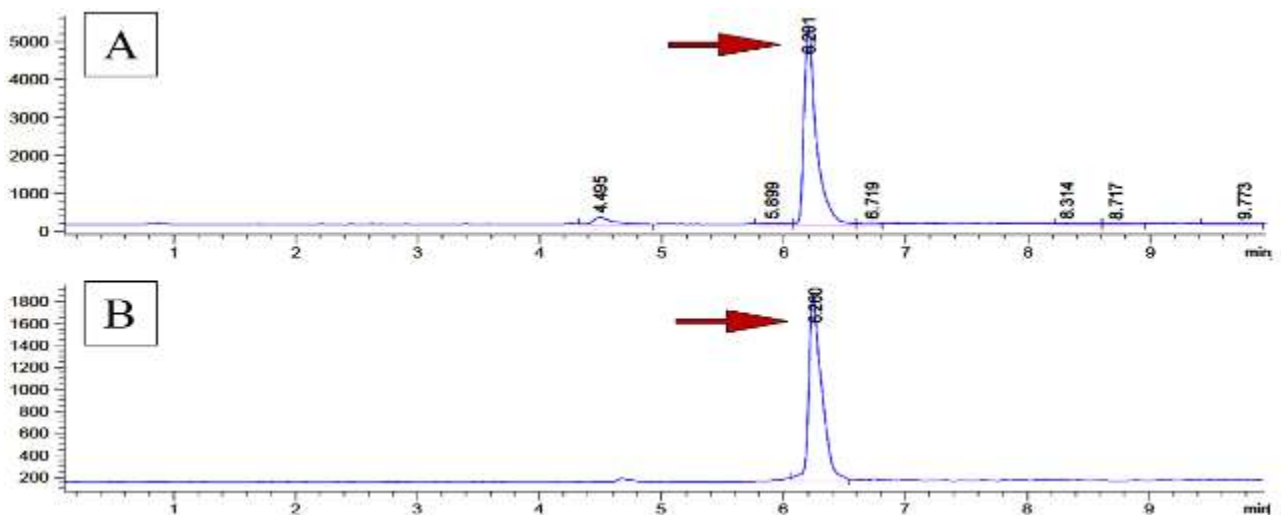


Рисунок 4.6 – Хроматограми пальмітинової кислоти при SIM m/z 255: **A** - в печінці хворих на НАСГ з тяжким S_3 ступенем стеатозу печінки. **B** - в печінці пацієнтів без НАСГ і стеатозу (S_0). Пік пальмітинової кислоти вказано червоною стрілкою. Метод ВЕР-ХМС аналізу.

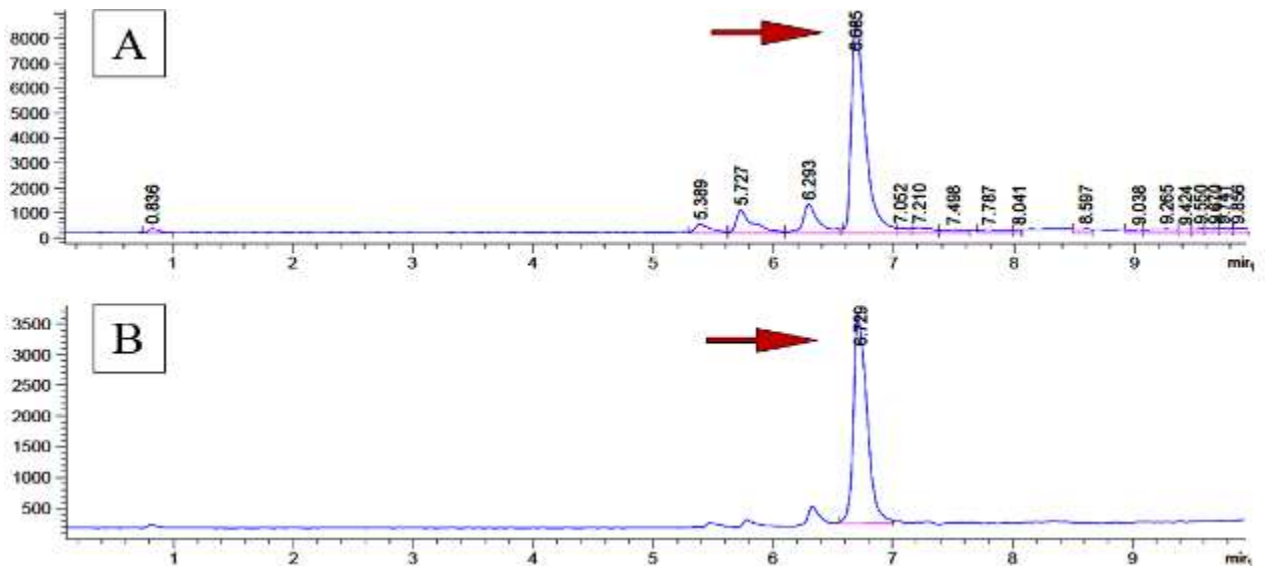


Рисунок 4.7 – Хроматограми стеаринової кислоти при SIM m/z 283: **A** - в печінці хворих на НАСГ з тяжким S_3 ступенем стеатозу печінки. **B** - в печінці пацієнтів без НАСГ і стеатозу (S_0). Пік пальмітинової кислоти вказано червоною стрілкою. Метод ВЕР-ХМС аналізу.

Зокрема, за результатами ВЕР-ХМС аналізу підвищений вміст стеаринової ($C_{18:0}$) кислоти колювався в межах від 0,26 мг/г до 2,15 мг/г, а пальмітинової ($C_{16:0}$) кислоти – колювався від 0,18 мг/г до 2,17 мг/г. 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 $y = 1,13x_2$; $R^2 = 0,37$.

При багатофакторному регресійному аналізі між хроматографічними показниками вмісту холестерину, стеаринової і пальмітинової кислот в печінці померлих хворих і показниками загального холестерину, ЛПНЩ, ЛПВЩ, ТГ в плазмі крові, визначено, що у хворих на НАСГ і пацієнтів без НАСГ статистично найбільш значимою була залежність між ступенем стеатозу печінки (y), рівнем вмісту холестерину в печінці (x_1) і рівнем загального холестерину (x_2) в плазмі крові, де $y = 0,36x_1 + 0,10x_2$; $R^2 = 0,91$.

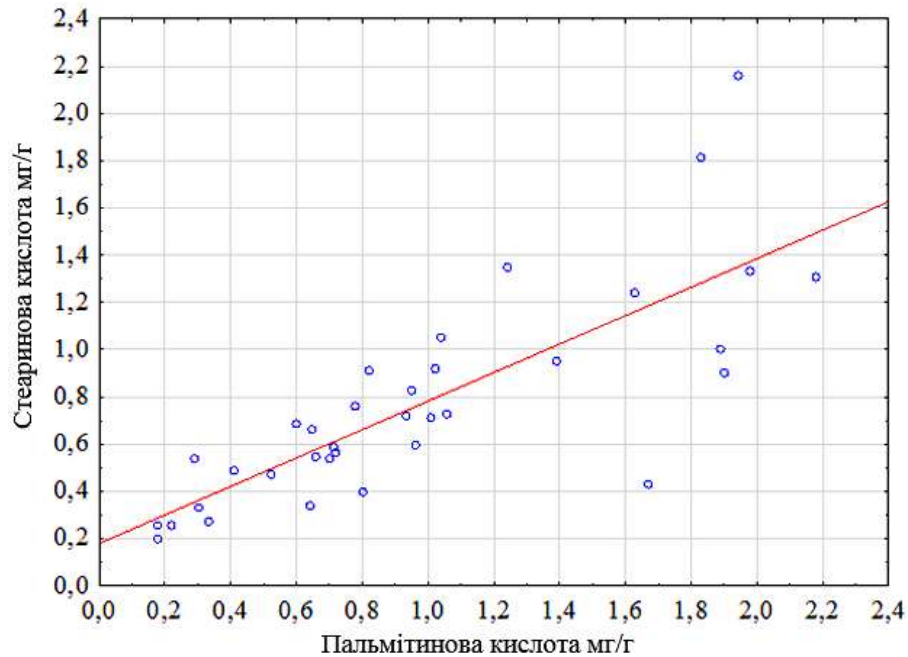


Рисунок 4.8 – Кореляційний зв'язок між вмістом пальмітинової і стеаринової кислот в печінці померлих хворих на НАСГ за даними ВЕР-ХМС аналізу.

При статистичному аналізі цієї моделі її чутливість склала 88% для порівняння контрольної групи і групи НАСГ (незалежно від його ступеня), а при розмежуванні НАСГ на групи за ступенем стеатозу печінки - становила 68%. Специфічність моделі склала 70%. Таким чином, дані паралельних патогістологічних і ВЕР-ХМС досліджень доказали, що зростання поширеності в печінці гепатоцитів зі стеатозом відповідає збільшеному вмісту в печінці холестерину і ліпотоксичних ненасичених вищих жирних кислот, тобто дійсно відзеркалює тяжкість S_1 - S_3 стеатозу печінки.

В той же час, зміни клініко-лабораторних даних хворих та патоморфологічної картини в 10 повторних біоптатах печінки свідчать про те, що стеатоз гепатоцитів при НАСГ є транзиторним процесом: він може зростати і зменшуватися. Про динамічність стеатозу гепатоцитів свідчать дані ЕМ про множинні дрібні кавеоли на межі ліпідних крапель і цитозоля гепатоцита, які забезпечують транспорт ліпідів з краплі в цитозоль, або в зворотньому напрямку, а також статистично значуща позитивна залежність між підвищеним ступенем стеатозу печінки при НАСГ та вмістом загального

холестерину і ЛПВЩ в плазмі крові. Яскравим прикладом транзиторності і зворотності навіть тяжкого стеатозу печінки є спостереження хворої на НАСГ, 36 років, яка поступила в хірургічний стаціонар з гострою печінковою недостатністю і попереднім діагнозом печінково–механічна жовтяниця. В трепанобіоптаті печінки, наведеному на рис. 4.9, діагностовано тяжкий S_3 панлобулярний крупновезикулярний стеатоз гепатоцитів, який, як з'ясувалося після клінічного обстеження хворої, виник після невдалого домашнього медикаментозного самолікування зайвої ваги. Через 3 тижні коригуючої терапії тотального панлобулярного стеатозу печінки пацієнтка виписана зі стаціонару у задовільному стані.

Зворотність і транзиторність стеатозу гепатоцитів пояснюється нормалізацією структури гепатоцитів після усунення у пацієнтів важких метаболічних порушень, а тривала відсутність незворотніх структурних змін в стеатотично зміненій печінці пояснюється своєчасним розвитком в ній компенсаторно-приспосувальних і репаративних процесів. Мікроскопічний аналіз біоптатів печінки хворих на НАСГ і АСГ показує, що розвиток стеатозу печінки помірного S_2 і тяжкого S_3 ступеня супроводжується паралельними компенсаторно-приспосувальними змінами гепатоцитів як у зонах стеатозу, так і в неуражених стеатозом зонах: появою поряд з гепатоцитами зі стеатозом двох-трьох-шестиядерних гепатоцитів (рис. 4.10), великих одноядерних гепатоцитів з кількома ядерцями, гепатоцитів з гіперхромними ядрами, збільшення кількості двоядерних гепатоцитів з мікро-макроевезикулярним стеатозом (рис.4.11) та збільшення кількості двоядерних гепатоцитів поряд з зонами стеатозу гепатоцитів (рис. 4.12).

Патоморфологічний аналіз біоптатів печінки показав, що ступінь тяжкості НАСГ і АСГ з патоморфологічної точки зору визначають не тільки ступінь тяжкості стеатозу печінки, але й ще інші мікроскопічні ознаки активності стеатогепатиту, до яких відносяться: збільшення кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; підвищення кількості балонних

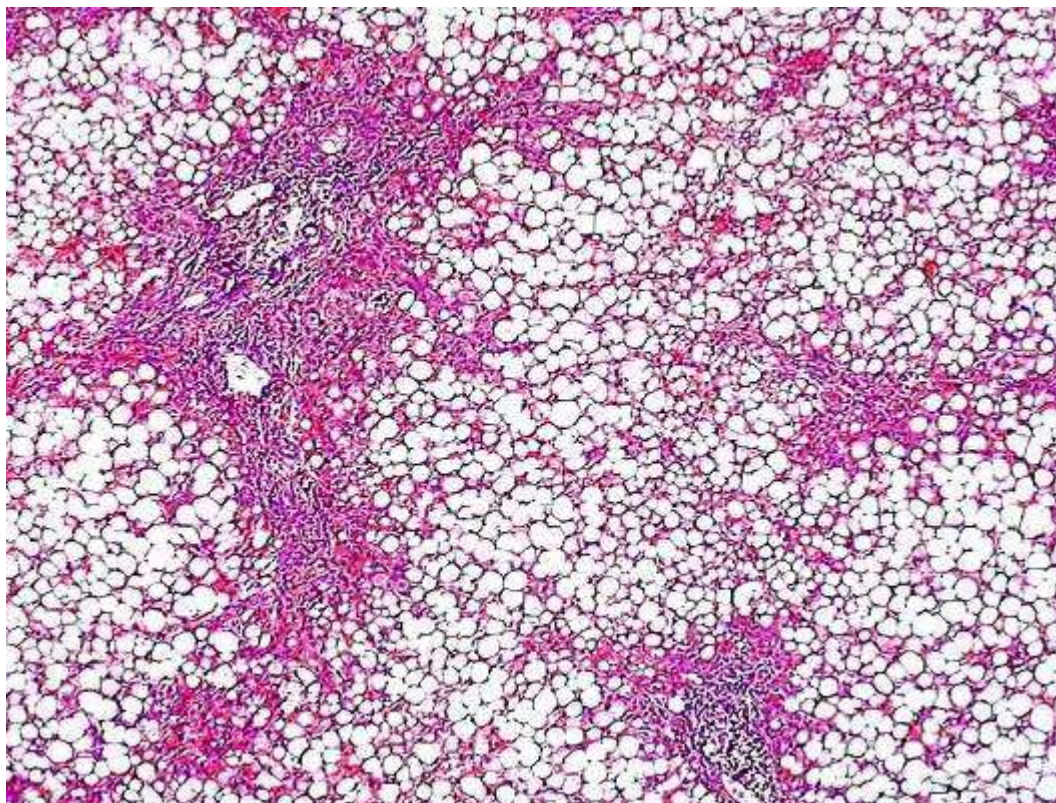


Рисунок 4.9 – Тяжкий S₃ панлобулярний крупновезикулярний стеатоз гепатоцитів в біоптаті печінки хворої М. при активації НАСГ. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 200.

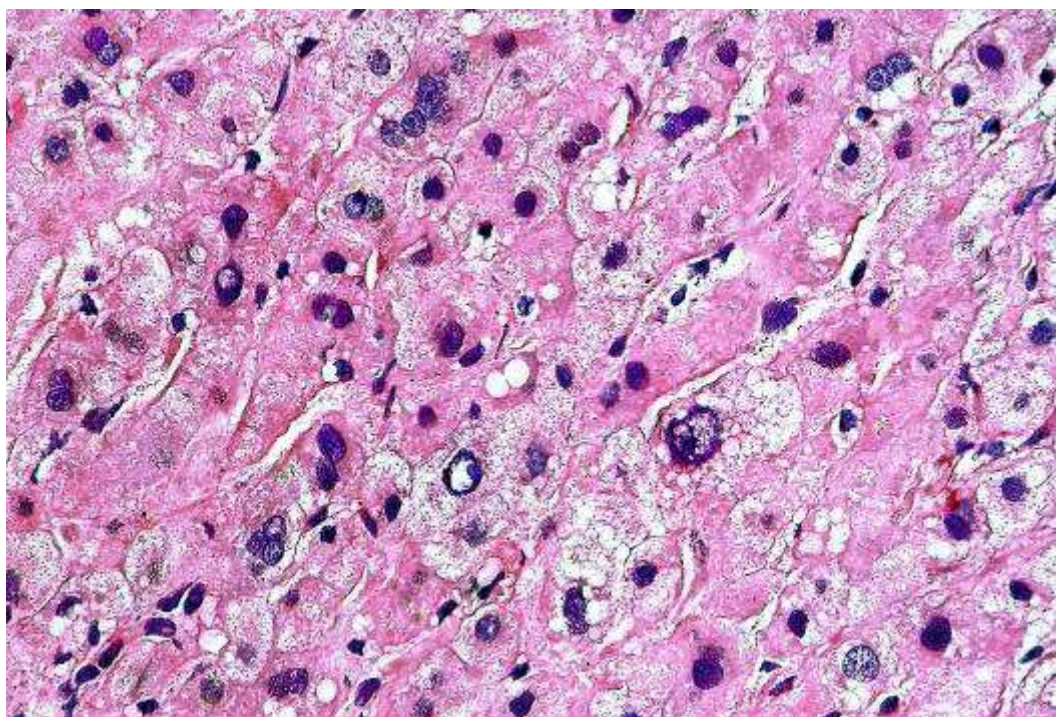


Рисунок 4.10 – Двох-трьох-шестиядерні гепатоцити при активації АСГ. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 600.

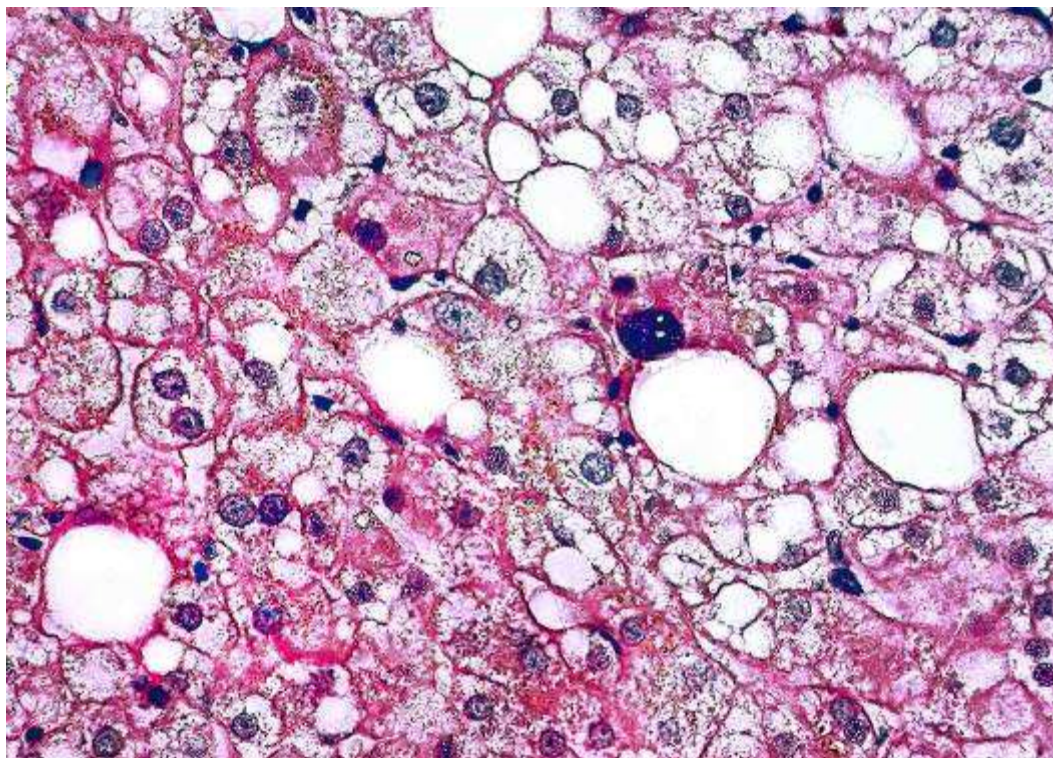


Рисунок 4.11 – Збільшення кількості гепатоцитів з мікромакровезикулярним стеатозом та двома ядрами при активації АСГ. Забарвлення гематоксином та еозином. Зб.: x 600.

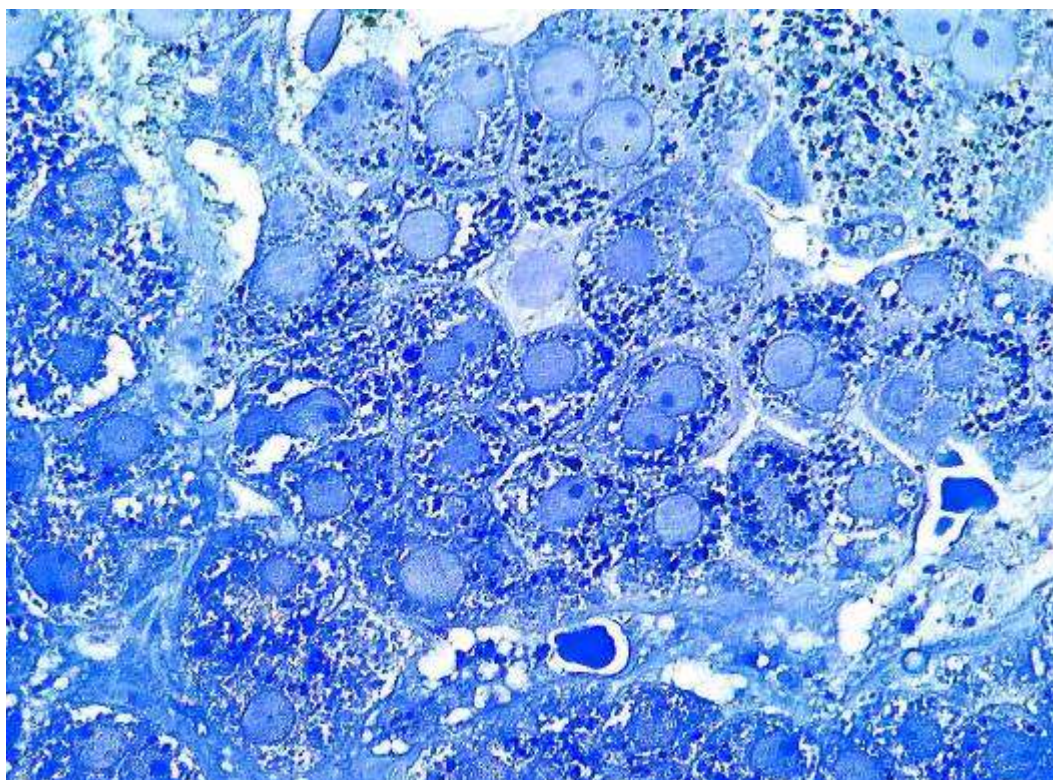


Рисунок 4.12 – В напівтонкому епоновому зрізі печінки при НАСГ визначається вісім двоядерних гепатоцитів та класична зірчаста клітина (вище центру). Забарвлення толуїдиновим синім. Зб.: x 1200.

гепатоцитів; інтенсифікація стеатонекрозу, апоптозу і фероптозу гепатоцитів; зростання кількості та розширення вогнищ стеатонекрозу в печінці та збільшення в ній кількості стеатокіст.

При порівняльному мікроскопічному аналізі трепанобіоптатів печінки хворих на АСГ і на НАСГ визначено, тільця Малорі-Денка в гепатоцитах, які раніше вважалися морфологічним маркером АСГ, частіше виявляються в печінці хворих на АСГ, але також визначаються і у хворих на НАСГ. Тільця Малорі-Денка представляють собою гомогенні білкові маси в цитоплазмі гепатоцитів, стеатотично змінених гепатоцитів і балонних гепатоцитів, які забарвлюються еозином в рожево-фіолетовий колір і в фіолетовий колір - методом Масон триколор (рис. 4.13). У хворих на АСГ гепатоцити з тільцями Малорі-Денка є патогномонічними для S_1 стеатозу печінки, при S_2 - S_3 стеатозі печінки збільшується кількість не тільки гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка, але й зростає чисельність стеатотично змінених гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка (рис. 4.13) і балонних гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка. Гепатоцити з тільцями Малорі-Денка є рідкісною знахідкою у хворих на НАСГ з легким S_1 макровезикулярним стеатозом печінки, але вони з'являються при S_2 - S_3 стеатозі печінки. Проведені патогістологічні дослідження доказали, що зростання тяжкості стеатозу печінки завжди супроводжуються збільшенням кількості балонних гепатоцитів як у хворих на НАСГ (див.рис.4.1), так і у хворих на АСГ (рис. 4.14). Балонні гепатоцити виявляються не тільки в зонах стеатозу гепатоцитів, але й серед неушкоджених гепатоцитів. Гепатоцити з тільцями Малорі-Денка завжди оточені ореолом сателітів з нечисленних нейтрофілів, еозинофілів і лімфоцитів (рис. 4.15). Збільшення чисельності гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка (в тому числі – стеатотично змінених і балонних гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка) значно підвищує інтенсивність вогнищевої запально-клітинної інфільтрації печінки як у хворих на АСГ, так і у хворих на НАСГ (рис. 4.16). При тісному розташуванні стеатотично змінених і

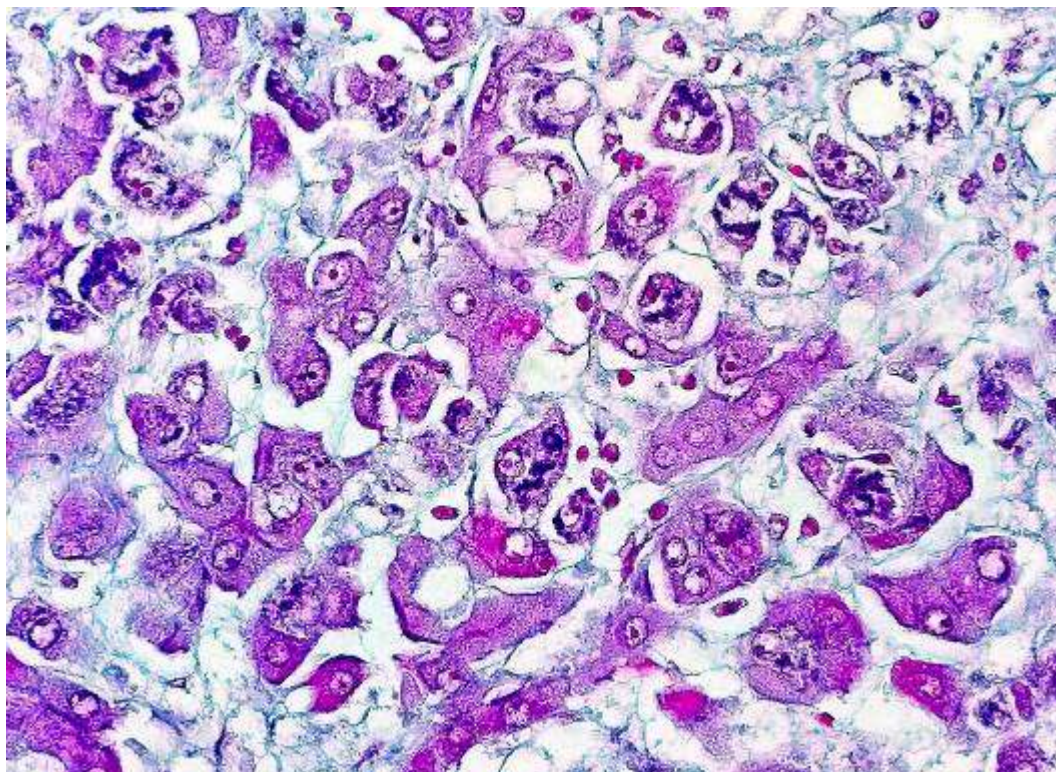


Рисунок 4.13 – Збільшення чисельності гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка при S₂ стеатозі печінки при активації АСГ. Забарвлення Масон-триколог. Зб.: x 600.

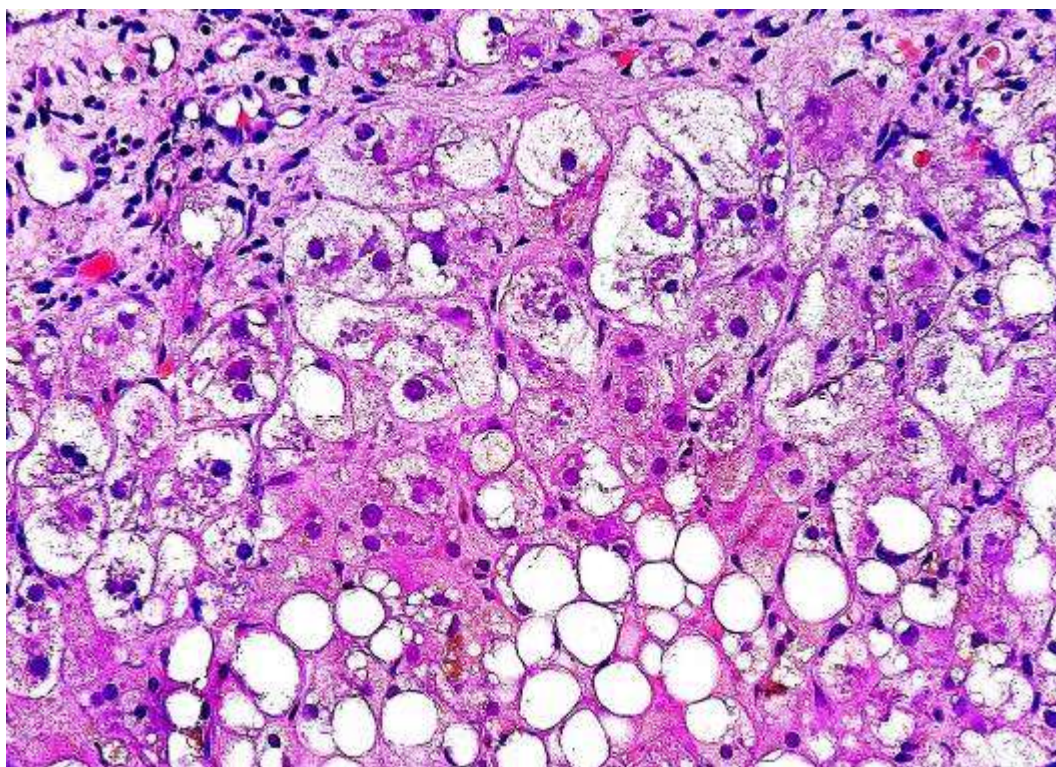


Рисунок 4.14 – Збільшення чисельності балонних гепатоцитів при S₃ стеатозі печінки при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

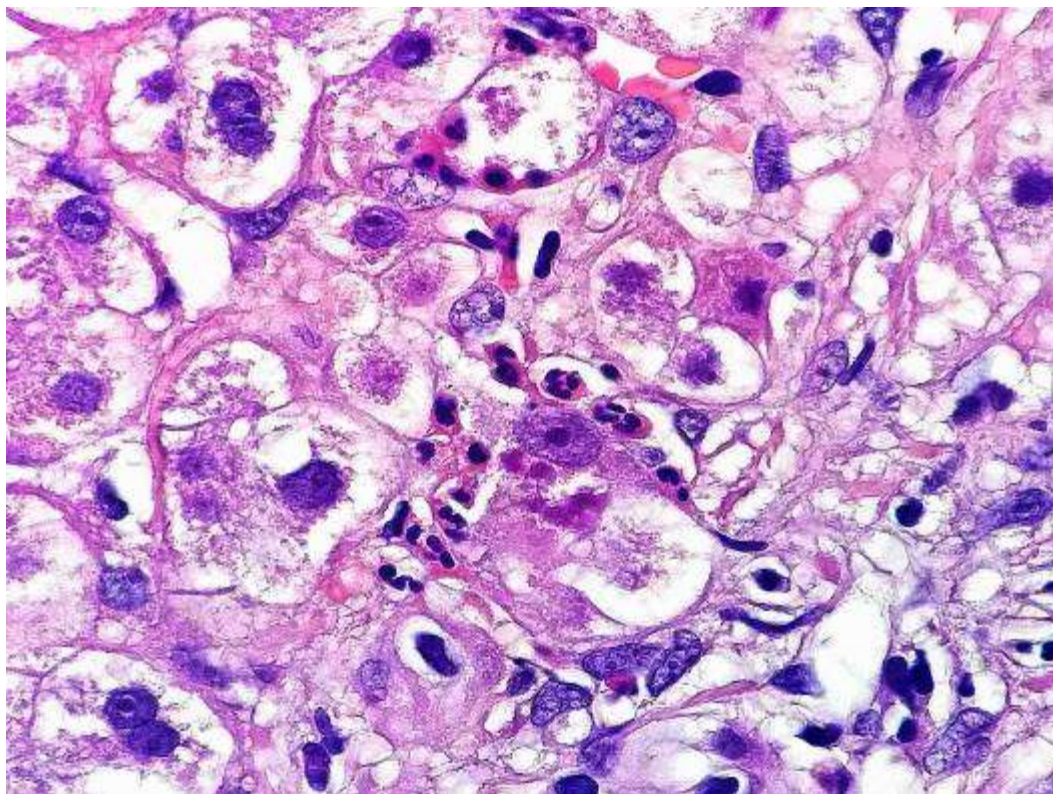


Рисунок 4.15 – Сателіти з нечисленних нейтрофілів, еозинофілів і лімфоцитів навколо гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка при активації АСГ. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 1000.

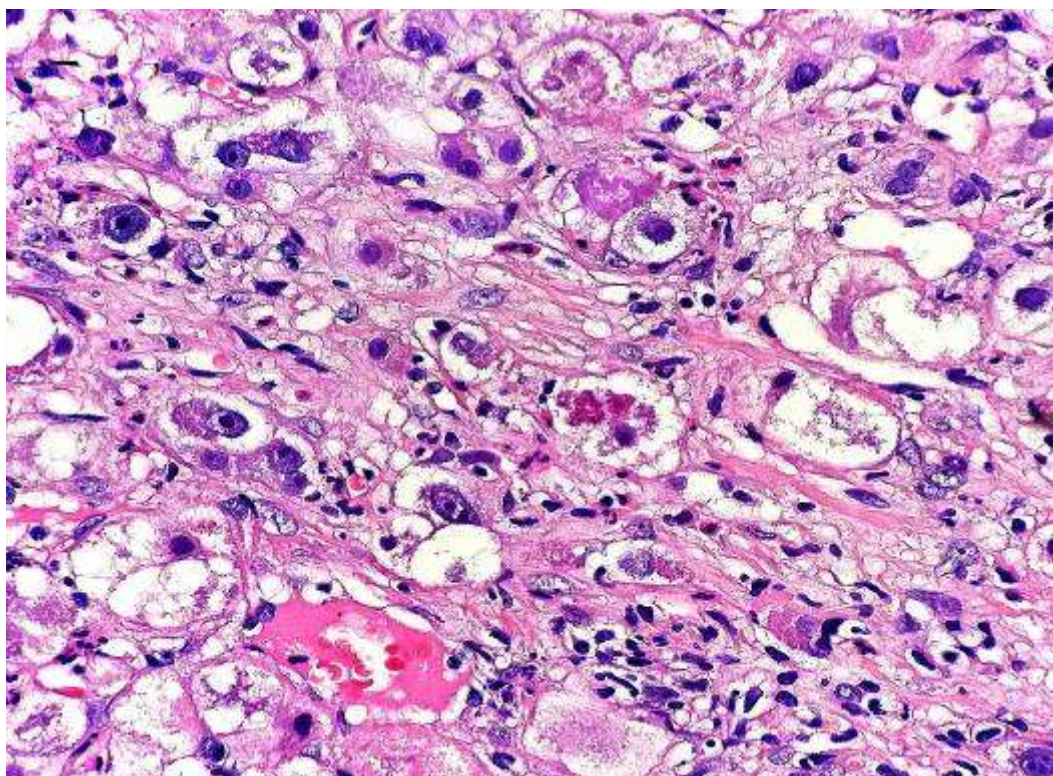


Рисунок 4.16 – Збільшення чисельності гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і запально-клітинної інфільтрації при S₃ стеатозі печінки при НАСГ. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 600.

балонних гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка в печінці хворих на НАСГ між стеатотично зміненими гепатоцитами визначаються поширені зони інтенсивної запально-клітинної і імуноцитарної інфільтрації, не характерні для НАСГ (див. рис. 4.16).

Балонні гепатоцити значно більші, ніж оточуючі гепатоцити; вони мають дуже розріджену, прозору цитоплазму з тонкими або розпливчастими еозинофільними нитками, а також сплюснене, маленьке, ексцентричне гіперхромне ядро, що інколи містить ядереце (див. рис. 4.1, 4.16); біля таких клітин нерідко локалізуються нечисленні лімфоцити і поліморфноядерні лейкоцити. За даними ЕМ і ІГХ досліджень визначено, що балонні гепатоцити мають доказові ознаки цитолізу. При ЕМ в балонній клітині визначається втрата цитокератинових мікрофіламентів цитозолу, а також різке зменшення в цитоплазмі кількості мітохондрій, цистерн ГрЕС і ГЕС, а також структур комплексу Гольджі (рис. 4.17). При світловій і електронній мікроскопії в балонній клітині визначається спустошення цитоплазми та значне збільшення її об'єму за рахунок набухання цитозолу клітини, яка набуває округло-овальну форму і дійсно нагадує пустий балон. При ІГХ аналізі в цитоплазмі балонних гепатоцитів зовсім відсутня гранулярна експресія Нераг – антитіла, яке реагує з ферментом карбаміл-фосфатсинтазою-1 циклу сечовини в мітохондріях печінки (рис. 4.18), яке зазвичай дає рясну гранулярну експресію в неушкоджених гепатоцитах. Таким чином, мікроскопічні, електронно мікроскопічні і імуногістохімічні особливості балонних гепатоцитів свідчать про те, що такі клітини найбільш імовірно руйнуються шляхом балонного цитолізу.

Мікроскопічними ознаками активності НАСГ і АСГ, поряд з іншими морфологічними ознаками, є збільшення кількості гепатоцитів в стані апоптозу і стеатонекрозу. Гепатоцити в стані апоптозу зменшені в розмірах, з еозинофільною цитоплазмою і гіперхромним, часто фрагментованим ядром (див.рис.4.1). У процесі подальшої еволюції апоптотично змінені гепатоцити

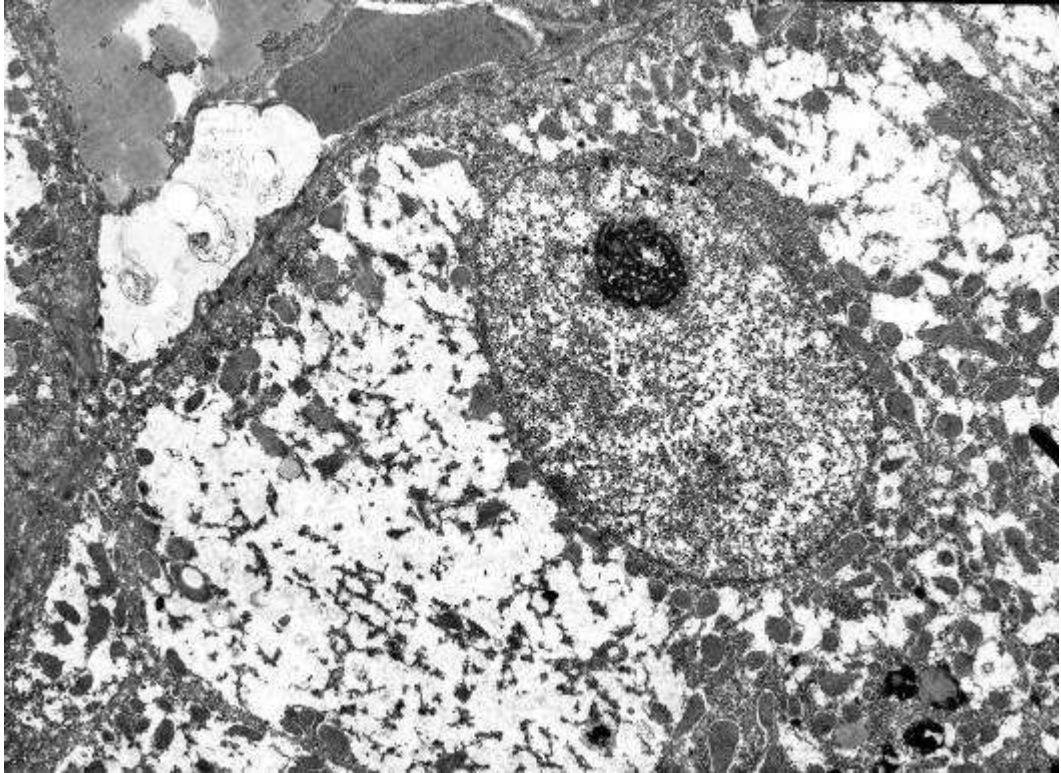


Рисунок 4.17 – Втрата цитокератинових мікрофіламентів цитозолі, мітохондрій, цистерн ГрЕС і ГЕС, структур комплексу Гольджі в балонному гепатоциті при АСГ. Електронограма. Зб.: x 2400.

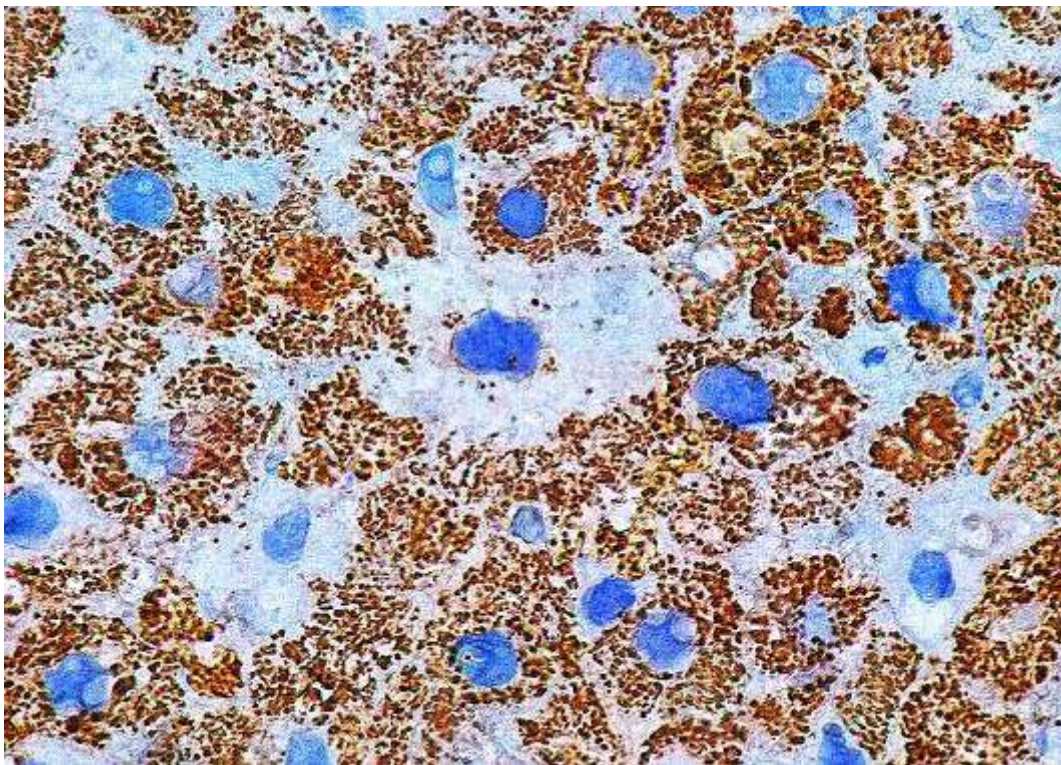


Рисунок 4.18 – Втрата гранулярної цитоплазматичної експресії Нераг балонними гепатоцитами при НАСГ. *Mo a-Hu Hepatocyte, Clone OCH1E5*. Зб.: x 600.

трансформуються в дрібні еозинофільні тільця Каунсілмена.

По мірі збільшення тяжкості стеатоза печінки від S_2 до S_3 ступеня у хворих на НАСГ і на АСГ частіше виявляються гепатоцити в стані ареактивного стеатонекрозу. При ареактивному стеатонекрозі визначаються поодинокі без'ядерні гепатоцити або невеличкі групи з двох-трьох без'ядерних гепатоцитів, які мають цитоплазму у вигляді скупчень середніх і дрібних ліпідних везикул без наявності плазматичної мембрани. Навколо таких клітин виявляються потовщені відростки CD 68+ макрофагів, поряд з такими клітинами відсутні реактивні лейкоцити і лімфоцити. Тобто за визначенням в таких клітинах поєднуються ознаки некрозу (відсутність ядра, цитолізис і відсутність плазматичної мембрани) і апоптозу (ареактивність з відсутністю поряд з такими клітинами лейкоцитів і лімфоцитів, але наявність поряд з ними відростків CD 68+ макрофагів).

Результати патоморфологічних досліджень трепанобіоптатів і секційного матеріалу печінки довели, що зростання тяжкості стеатозу печінки від S_2 до S_3 ступеня часто супроводжується у хворих на НАСГ і на АСГ збільшенням поширених вогнищ стеатонекрозу в печінкових дольках. У вогнищах стеатонекроза дольок печінки визначається максимальне збільшення стеатозу в гепатоцитах, руйнування і зникнення ядра, а також плазматичної мембрани печінкових клітин. Внаслідок цього, в мікропрепаратах в центрі стеатонекроза печінки на місці зруйнованих гепатоцитів визначаються поширені ділянки з ліпідних крапель різного діаметру (від гігантських до дрібних) (рис. 4.19). Перисинусоїдальні клітини в таких ділянках не виявляються. Але на периферії ділянок стеатонекроза і перифокально визначається різної інтенсивності реактивна інфільтрація лейкоцитами з домішкою лімфоцитів (рис. 4.20). Вогнища стеатонекрозу в печінкових дольках при активації стеатогепатита виявляються в біоптатах печінки як у хворих на НАСГ, так і у хворих на АСГ (рис. 4.19, 4.20).

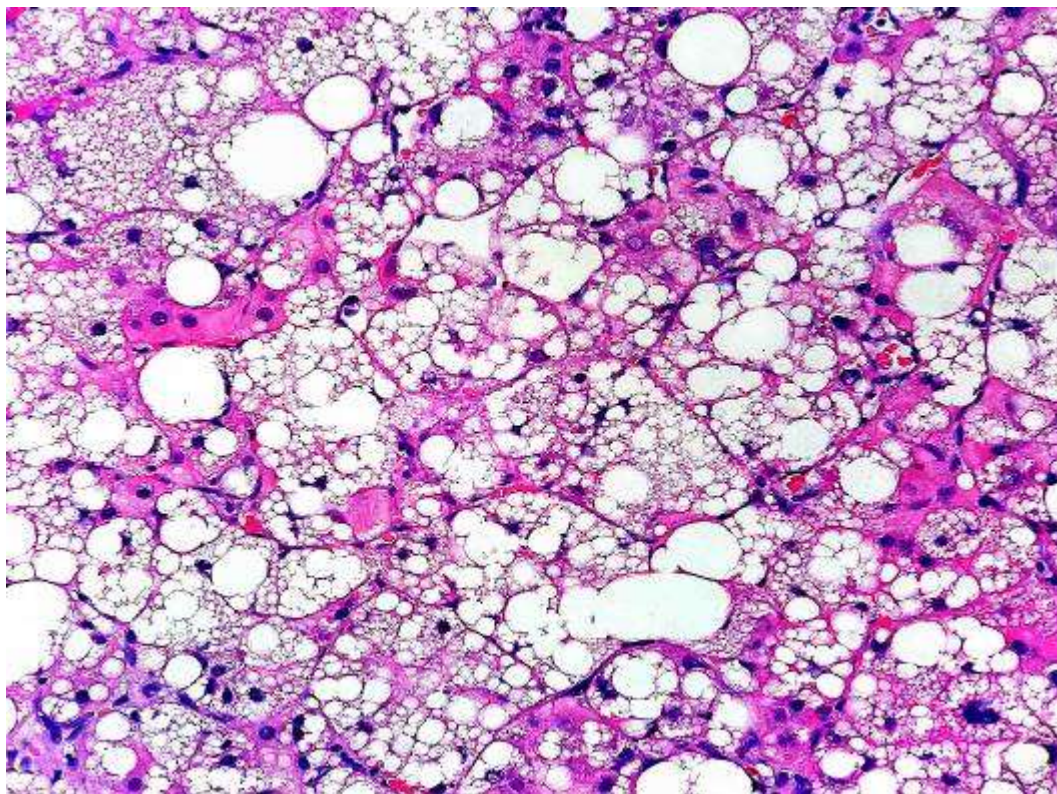


Рисунок 4.19 – Центр вогнища стеатонекрозу дольки печінки при активації НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

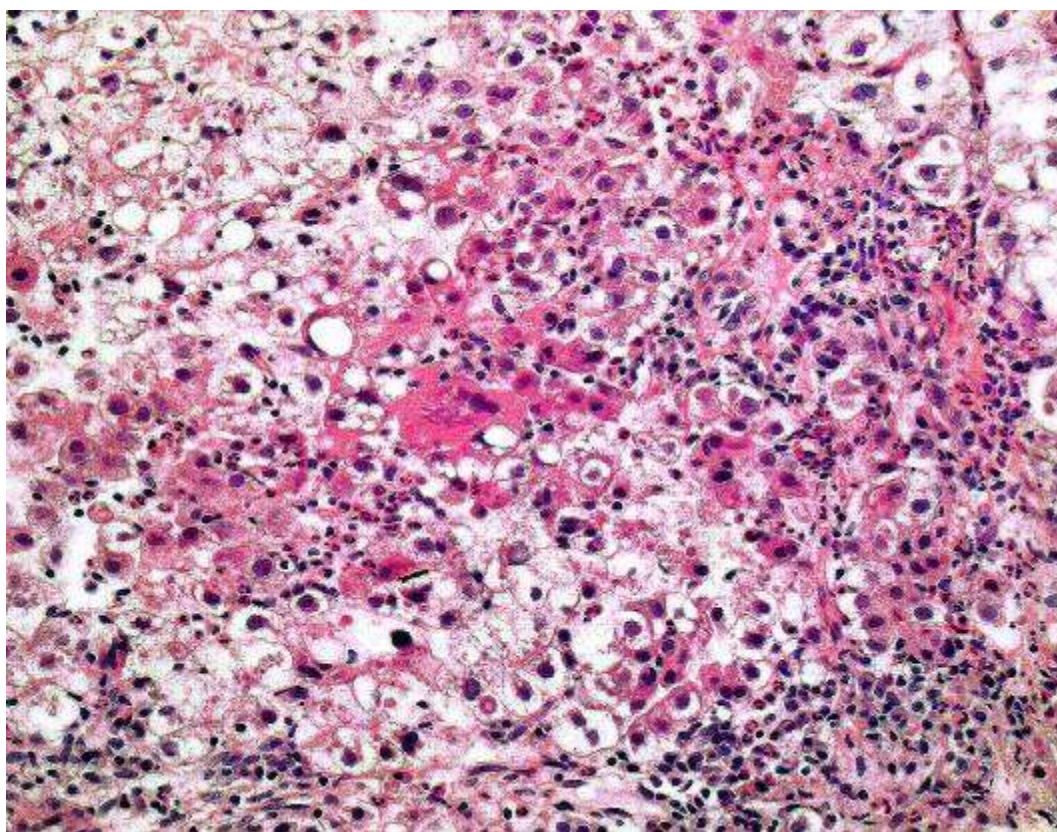


Рисунок 4.20 – Вогнище стеатонекрозу дольки печінки при активації АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

У хворих на НАСГ і на АСГ при мікроскопічному дослідженні трепанобіоптатів в печінці нерідко виявляються вогнища так званого ареактивного синусоїдального стеатопеліозу, а також інкапсульовані стеатокісти. Вони виявляються при будь-якому ступеню стеатозу печінки (і при S_1 стеатозі, і при S_2 і при S_3 стеатозі) і, найімовірніше, свідчать про раніше перенесену активацію стеатогепатиту у вигляді дрібновогнищцевого стеатонекроза печінки. Найменш зрозумілим залишається морфогенез вогнищ так званого ареактивного синусоїдального стеатопеліозу. При мікроскопії вогнище ареактивного синусоїдального стеатопеліозу має вигляд відносно крупного скупчення везикулярно-крапельного ліпідного матеріалу, який займає певну площу печінкової дольки. Зовнішній контур такого везикулярно-крапельного скупчення не закруглений, а зірчастоподібний; в прилеглий тканині печінкової дольки відсутні будь-які клітини реактивного запального інфільтрату і відсутні будь-які фібробластичні клітини (рис. 4.21). У хворих на НАСГ і на АСГ з тяжким S_3 стеатозом в печінкових дольках печінки частіше виявляються поширені вогнища ареактивного синусоїдального стеатопеліозу, при легкому-помірному S_1 - S_2 стеатозі печінки в дольках виявляються дрібні вогнища синусоїдального стеатопеліозу.

Крім цього, у хворих на НАСГ і на АСГ в трепанобіоптатах печінки також виявляються дрібні і середніх розмірів інкапсульовані стеатокісти. Інкапсульовані стеатокісти мають вигляд крупновезикулярного ліпідного матеріалу, заключеного в фіброзну капсулу різної товщини (рис. 4.22). Частіше за все інкапсульовані стеатокісти виявляються в зонах долькового і Z_1 перипортально-долькового фіброзу. Не викликає сумніву, що інкапсульовані стеатокісти локалізовані на місці раніше перенесеного вогнищцевого стеатонекроза печінки і їх наявність свідчить про раніше перенесену хворим активацію хронічного стеатогепатиту у вигляді вогнищцевого стеатонекрозу печінки.

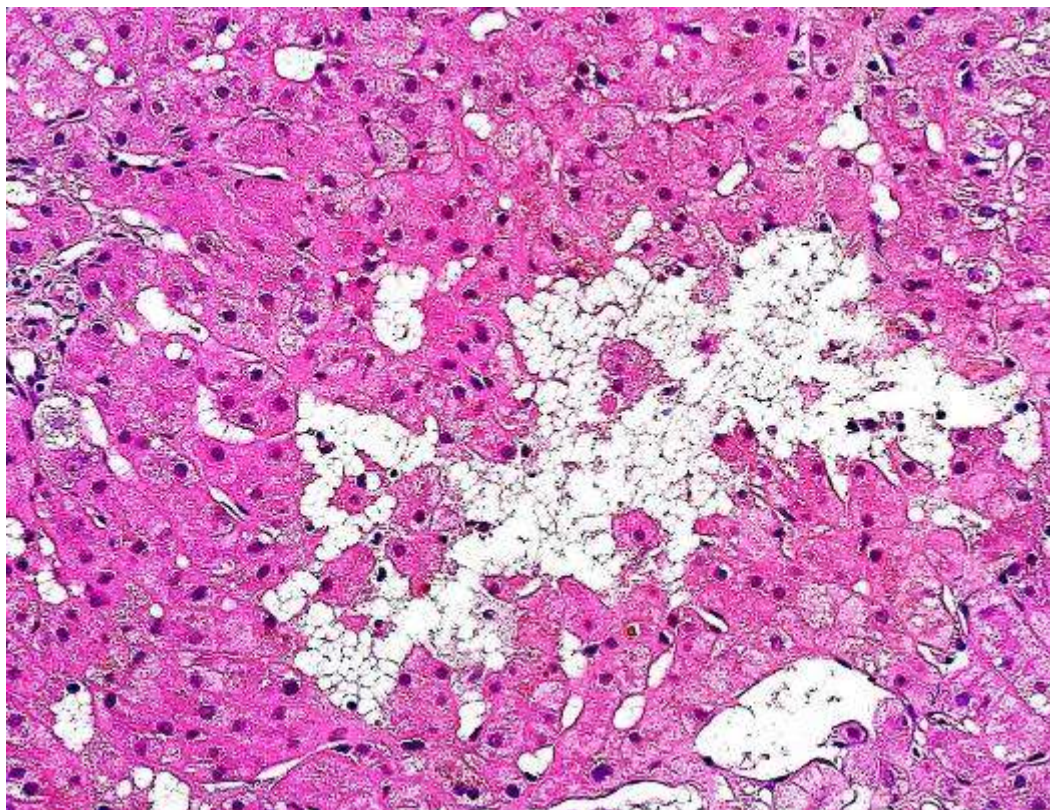


Рисунок 4.21 – Вогнище ареактивного синусоїдального стеатонекрозу в дольці печінки при активації АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

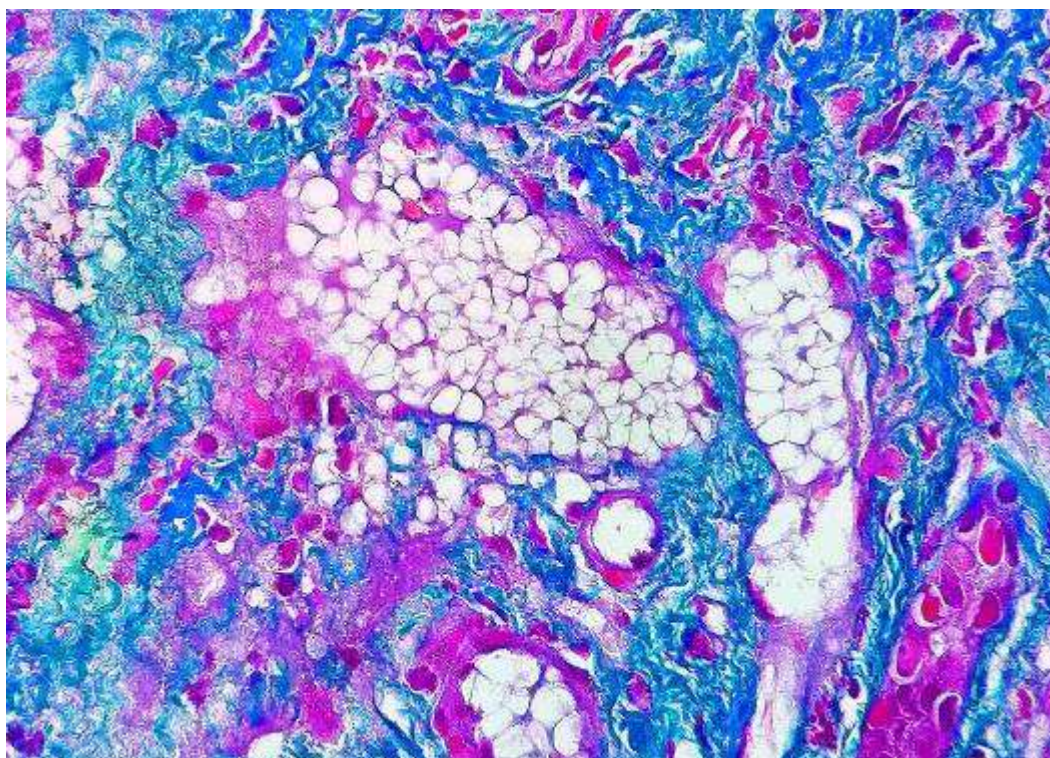


Рисунок 4.22 – Інкапсульовані стеатокісти в Z_1 зоні перипортально-долькового фіброзу печінки при активному НАСГ. Забарвлення Масон триколом. Зб.: x 600.

4.2 Морфологічна характеристика імуноцитарних і запально-клітинних змін у печінці при активації хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту.

ПГ і ПХ аналіз динаміки імуноцитарної і запально-клітинної інфільтрації печінки у хворих на НАСГ і на АСГ по мірі зростання стеатозу печінки від легкого S_1 до помірного S_2 і до важкого S_3 ступеня дав наступні результати. Серед імунокомпетентних клітин в дольках печінки при будь-якому ступеню стеатозу домінують макрофаги, але також визначаються CD 4+ лімфоцити, CD 8+ Т-лімфоцити і поодинокі плазматичні клітини. Суттєво змінюється склад макрофагів печінки.

По-перше, при активації стеатогепатиту у хворих на НАСГ і на АСГ в дольках печінки з'являється значна кількість активованих S100 (клон A4) позитивних макрофагів (рис. 4.23), що виділяють білок S100A4, який, за літературними даними, активує перисинусоїдальні зірчасті клітини. Крім того, активовані S100 (клон A4) макрофаги також секретують інші профіброгенні цитокіни.

По-друге, по мірі зростання стеатозу печінки і при НАСГ і при АСГ в дольках печінки збільшується кількість активованих CD68+ макрофагів (рис.4.24), які накопичуються в локусах максимального стеатозугепатоцитів, балонного цитозісису і стеатонекрозу гепатоцитів (рис.4.24). При цьому міняється мікроструктура CD68+ макрофагів: якщо в неушкодженій печінці вони мають вигляд сплосчених клітин зі сплосченим ядром, вузькою цитоплазмою і декількома тонкими короткими відростками, то в зонах стеатозу цитоплазма активованих CD68+ макрофагів потовщується, збільшується кількість і товщина відростків, які охоплюють гепатоцити в стані стеатонекрозу і балонного цитолісису (рис.4.24). Тобто за структурними перетвореннями активовані CD68+ макрофаги трансформуються в клітини фагоцитарного типу.

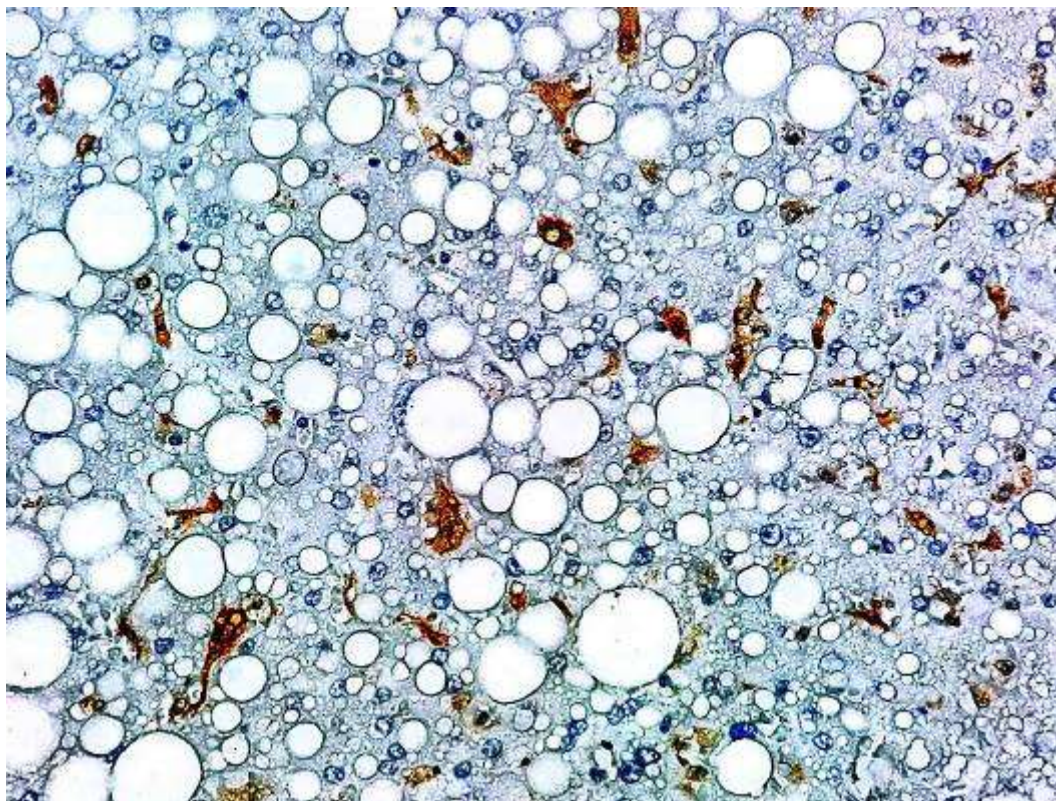


Рисунок 4.23 – S100(клон А4) позитивні макрофаги в зоні стеатозу дольки печінки у хворого на НАСГ. *Rb a-Hu S100, Clone A4*. Зб.: x 200.

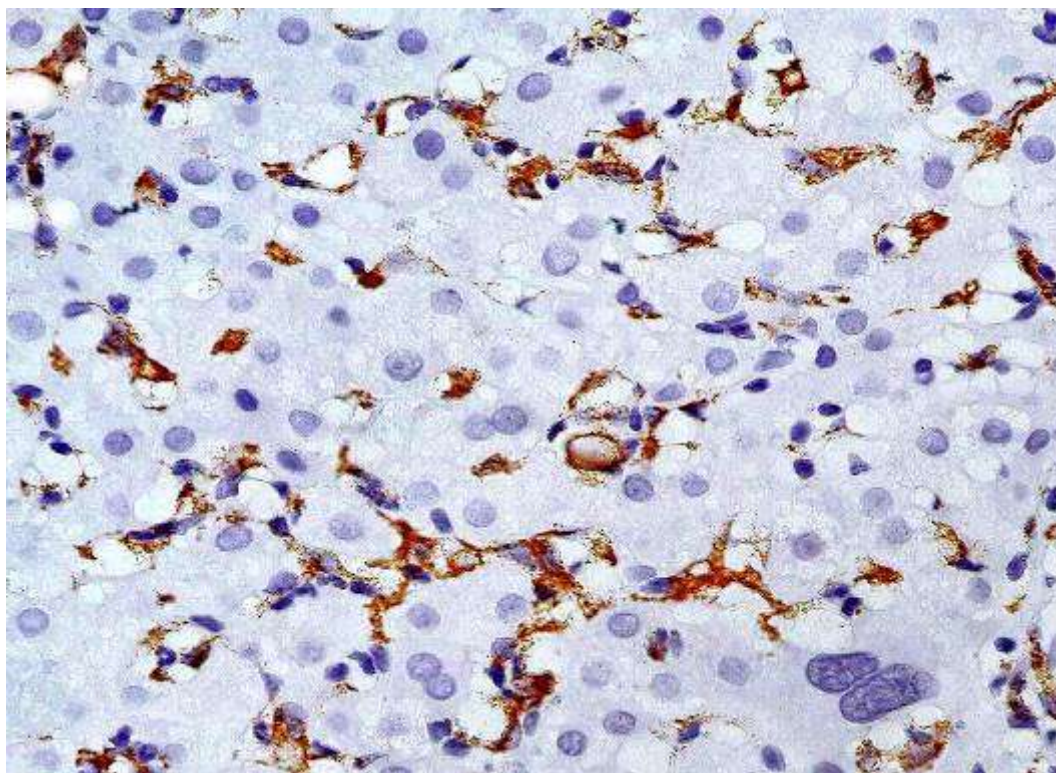


Рисунок 4.24 – Значна кількість активованих CD-68 позитивних макрофагів навколо гепатоцитів зі значним стеатозом у хворого на НАСГ. *Mo a-Hu CD68, Clone PG-M1*. Зб.: А – x 400.

Дані ІГХ аналізу і світлової мікроскопії про активацію фагоцитарної активності макрофагів в зонах стеатозу печінки підтверджуються даними електронної мікроскопії. При ЕМ в перисинусоїдальних просторах дольок печінки в зонах стеатозу і балонного цитолізису гепатоцитів визначаються великі за розмірами макрофаги з накопиченням в збільшеній цитоплазмі великої кількості ліпоаутофагосом, що містять фагоцитований матеріал різної електронної щільності (рис.4.25). До гепатоцитів зі значним стеатозом тісно прилягають потовщені відростки макрофагів, що містять різні за розмірами аутофагосоми з наявністю в них фагоцитованого матеріалу високої і дуже низької електронної щільності (рис.4.26).

За результатами ІГХ аналізу встановлено, що при активації стеатозу печінки у хворих на НАСГ і на АСГ в дольках печінки виявляються локуси імуноклітинного кілінгу пошкоджених і стеатотично змінених гепатоцитів (рис.4.27). За даними ІГХ досліджень у локусах імуноклітинного кілінгу пошкоджених гепатоцитів локалізовані CD8+ лімфоцити (рис.4.28) та одиничні CD4+ лімфоцити і CD68+ макрофаги. Крім цього, у перисинусоїдальних просторах печінкових дольок виявляються одиничні CD 8+ Т-лімфоцити, CD 4+ Т-лімфоцити і плазматичні клітини.

В період активації АСГ і НАСГ в портальних трактах печінки тільки у деяких хворих реєструється незначне збільшення інфільтрації CD8+ лімфоцитами (рис.4.28) і CD4+ лімфоцитами. Частіше за все, у портальних трактах виявляються нечисленні CD 8+ Т-лімфоцити, CD 4+ Т-лімфоцити і CD 68+ макрофаги. Виконані нами порівняльні мікроскопічні і ІГХ дослідження показали, що саме незначна імунітарна інфільтрація портальних трактів відрізняє активацію стеатогепатиту у хворих на НАСГ і АСГ від активації вірусного гепатиту В і С, при яких у трепанобіоптатах печінки хворих завжди визначається значна лімфоцитарна інфільтрація як портальних трактів, так і печінкових дольок.

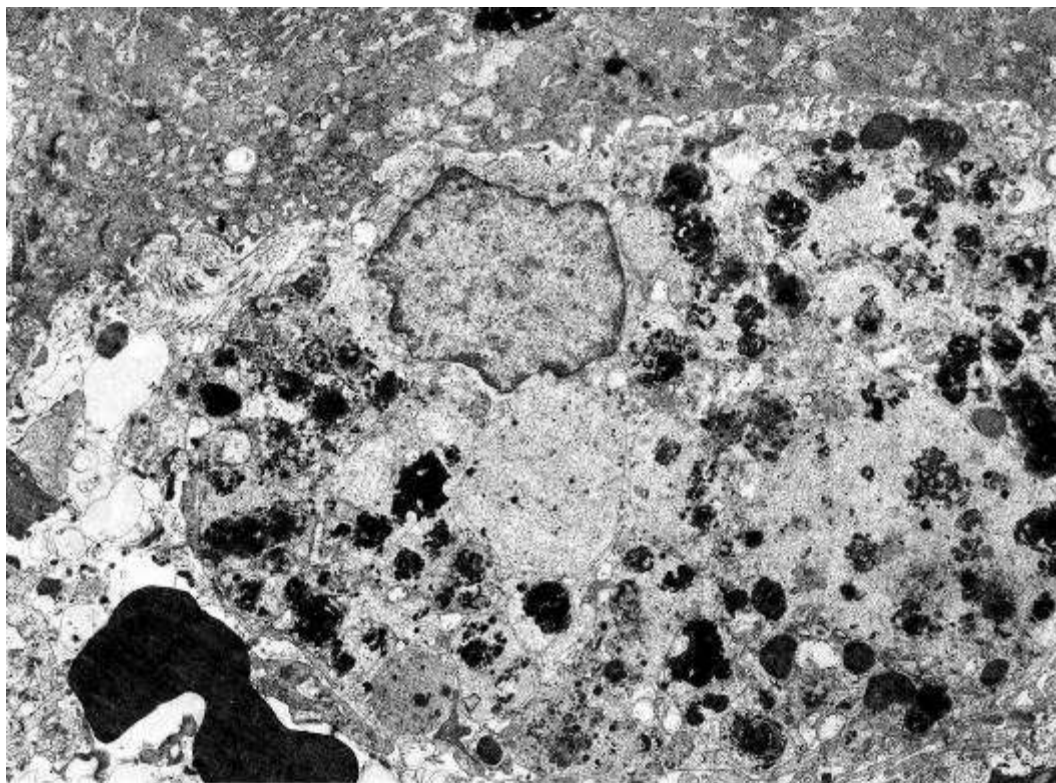


Рисунок 4.25 – Макрофаг з накопиченням в збільшеній цитоплазмі великої кількості ліпоаутофагосом в перисинусоїдальному просторі печінки при АСГ. Електронограма. Зб.: x 3200.

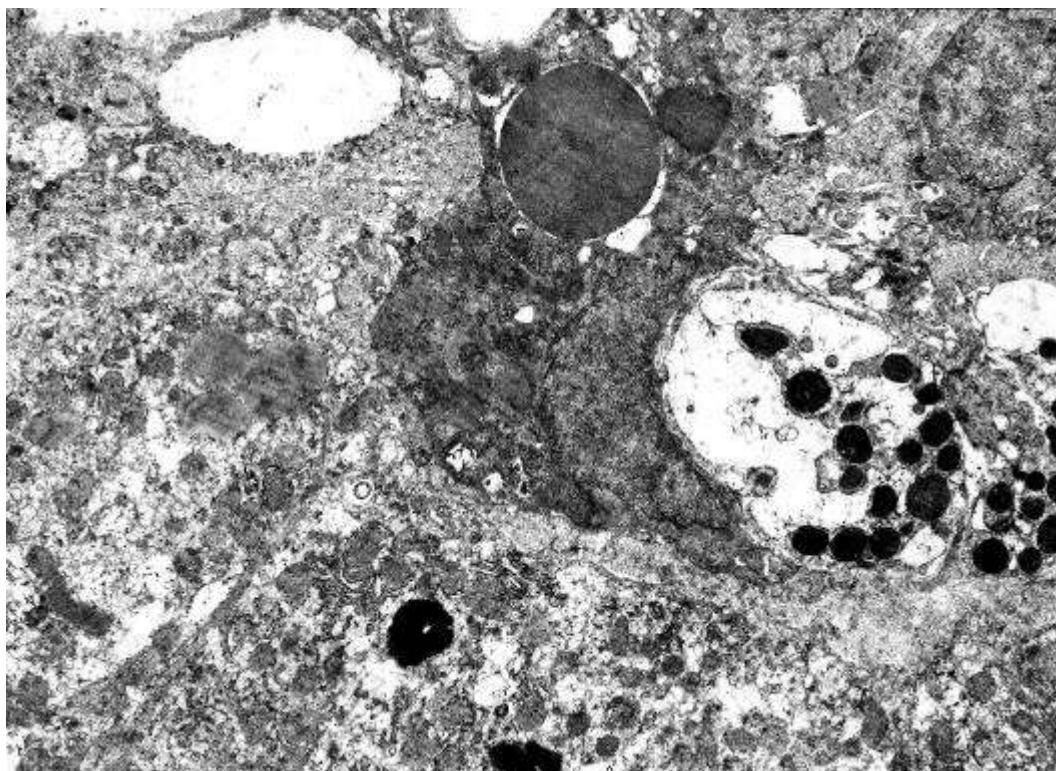


Рисунок 4.26 – До гепатоцита зі стеатозом (зліва зверху) прилягають відростки макрофага з різними за розмірами аутофагосоми, НАСГ. Електронограма. Зб.: x 3200.

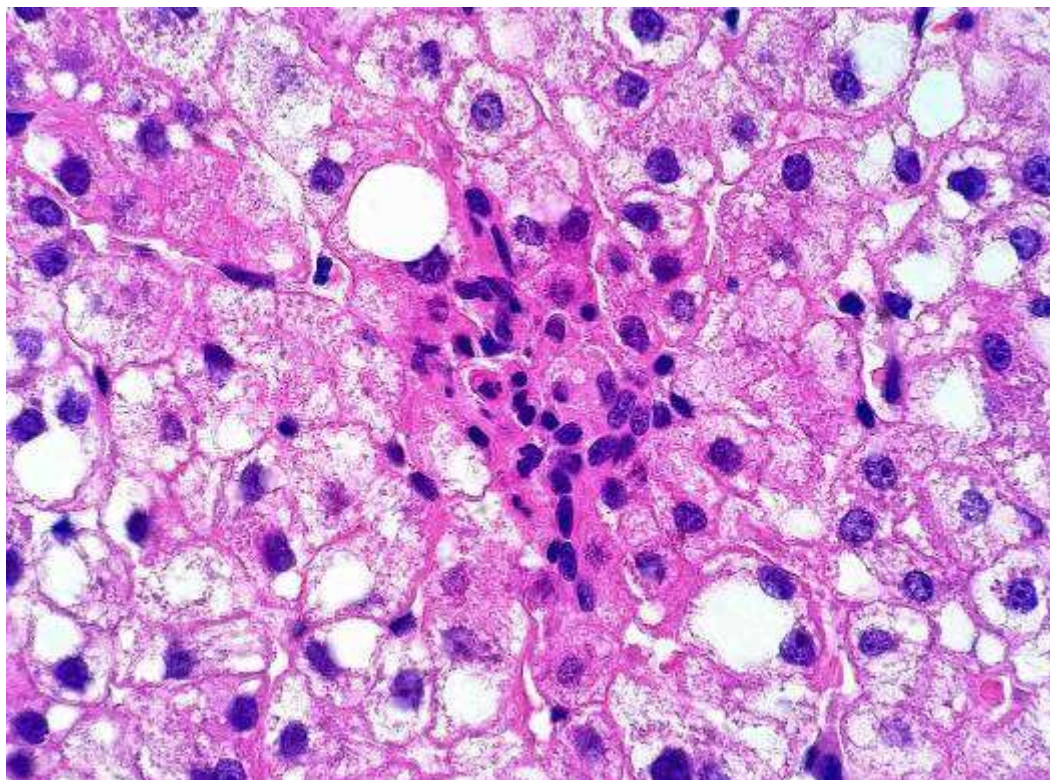


Рисунок 4.27 – Локус імуноклітинного кілінгу пошкодженого гепатоцита при активації НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 1000.

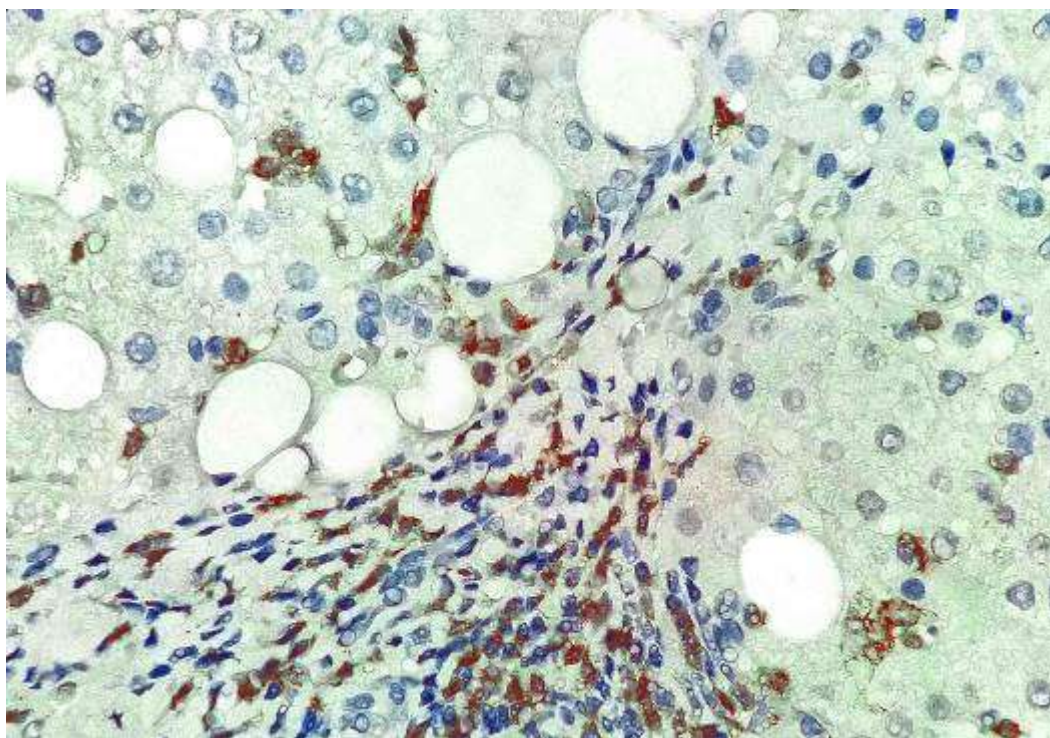


Рисунок 4.28 – Вогнищева лімфоцитарна інфільтрація портального тракту з наявністю CD 8+ лімфоцитів та CD 8+ лімфоцити у локусах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів при активації АСГ. *Mo a-Hu CD8, Clone C8/144B*. Зб.: x 600.

Порівняльний мікроскопічний аналіз динаміки запально-клітинної інфільтрації печінки у хворих на НАСГ і на АСГ по мірі зростання стеатозу від легкого S_1 ступеня до помірного S_2 і до важкого S_3 ступеня показав наступне.

При активації стеатозу печінки у хворих на НАСГ дрібновогнищева запальна змішано-клітинна інфільтрація дольок печінки має локальний, дрібновогнищевий характер, вона менш виражена і менш розповсюджена ніж у хворих на АСГ. При активації стеатозу печінки у хворих на НАСГ в печінці виявляється збільшення вогнищ лейкоцитарного сателітозу навколо збільшеної кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка та біля збільшеної кількості балонних гепатоцитів, а біля пошкоджених і балонних гепатоцитів визначаються дрібновогнищеві запально-клітинні інфільтрати з лімфоцитів і поодиноких лейкоцитів (рис.4.29).

При активації стеатозу печінки у хворих на АСГ в печінці спостерігається зростання поширеності вогнищевої лейкоцитарно-лімфоцитарної інфільтрації дольок печінки (рис.4.30). При великій кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і балонних гепатоцитів в печінці хворих на АСГ визначається значна і розповсюджена дифузно-вогнищева лейкоцитарна інфільтрація або лейкоцитарно-лімфоцитарна інфільтрація дольок печінки.

Таким чином, при активації НАСГ і АСГ має місце зростання запально-клітинної інфільтрації дольок печінки, в якій переважають або складають суттєву частку лейкоцити. Таке зростання запально-клітинної інфільтрації дольок печінки тісно пов'язане зі збільшенням кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і балонних гепатоцитів. При активації НАСГ і АСГ клітинний склад інфільтратів в дольках печінки суттєво відрізняється від складу долькових інфільтратів печінки при активації вірусного гепатиту С і В, в яких домінують лімфоцити і вкрай рідко визначаються лейкоцити.

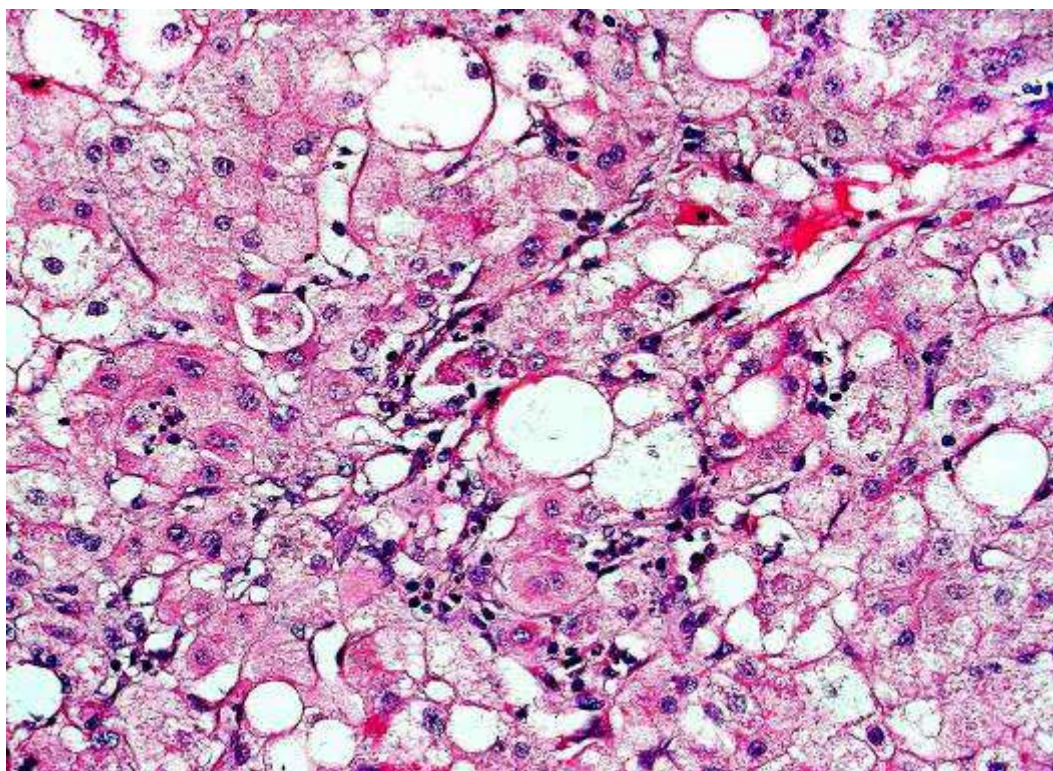


Рисунок 4.29 – Дрібновогнищеві запально-клітинні інфільтрати з лімфоцитів і поодиноких лейкоцитів біля пошкоджених і балонних гепатоцитів при активації НАСГ. Забарвлення гематоксином та еозином. Зб.: x600.

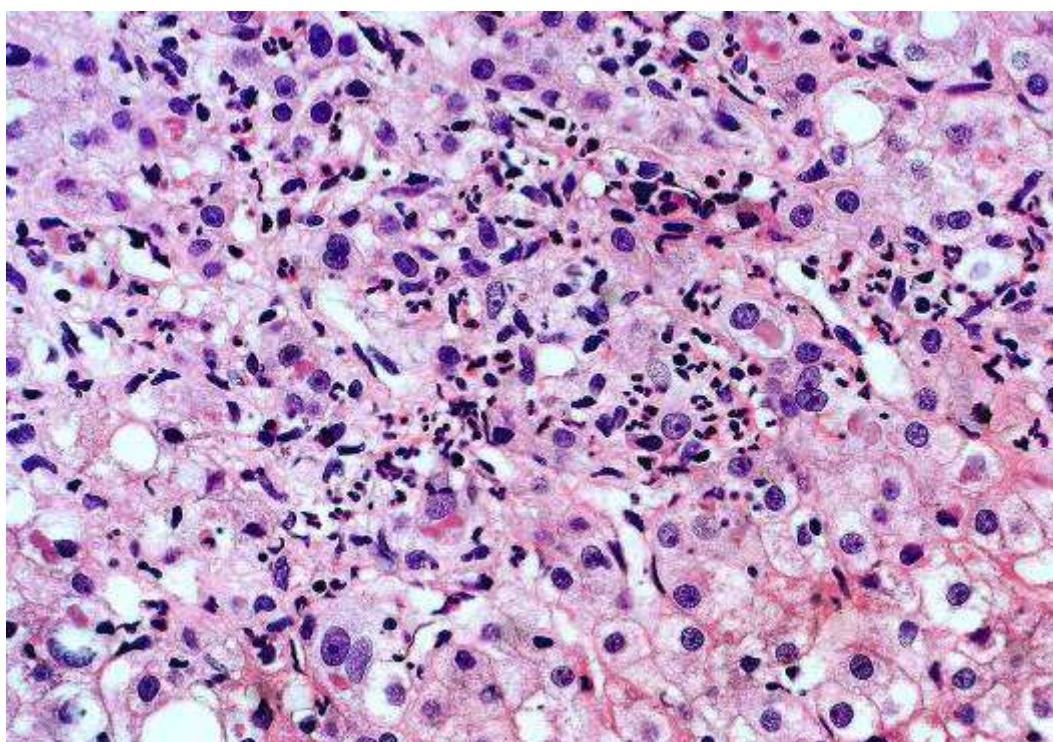


Рисунок 4.30 – Зростання поширеності вогнищевої лейкоцитарно-лімфоцитарної інфільтрації дольки печінки при активації АСГ. Забарвлення гематоксином та еозином. Зб.: x 600.

4.3 Рідкі морфологічні прояви активності неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту.

За результатами проведених досліджень визначені рідкі ознаки активності хронічного стеатогепатиту, які визначаються тільки у деяких хворих на АСГ і НАСГ. Необов'язковими, рідкісними ознаками активності АСГ є розвиток у деяких хворих внутрішньодуктальних біліостазів і внутрішньоклітинних холестазів, які імітують позапечінкову жовчну обструкцію, тому що в крові у хворих підвищується рівень білірубіну і рівні печінкових трансаміназ. При мікроскопії в трепанобіоптатах печінки визначається розповсюджений стаз жовчі у дрібних дуктулах між гепатоцитами зі стеатозом, наявність гранул жовчних пігментів в цитоплазмі гепатоцитів і в цитоплазмі макрофагів, локалізованих в перисинусоїдальних просторах (рис.4.31). При цьому відсутня підвищена інфільтрація печінкових дольок і портальних трактів лейкоцитами або лімфоцитами.

Відносно рідко в печінці визначаються стеатогранульоми різних розмірів, частіше - при активному стеатогепатиті у хворих на АСГ, рідше – у хворих на НАСГ. В печінці хворих на АСГ стеатогранульоми визначаються у вогнищах біліо-стеато-некрозу. При мікроскопії в центральній частині такої гранульоми спостерігається дуктула, заповнена жовч'ю, навколо якої локалізовані некротизовані гепатоцити із залишками в цитоплазмі жовчних пігментів і ліпідних крапель, оточені перифокальною інфільтрацією з лейкоцитів і лімфоцитів. У деяких хворих на АСГ стеатогранульоми спостерігаються в дрібних осередках стеатонекрозу гепатоцитів, не пов'язаного з біліостазом. В печінці деяких хворих на НАСГ малочисельні стеатогранульоми спостерігаються в дрібних осередках стеатонекрозу гепатоцитів, оточених перифокальною запально-клітинною інфільтрацією з лейкоцитів і лімфоцитів. Навколо конгломератних вогнищ стеатонекрозу гепатоцитів визначаються стеатогранульоми значних розмірів (рис.4.35).

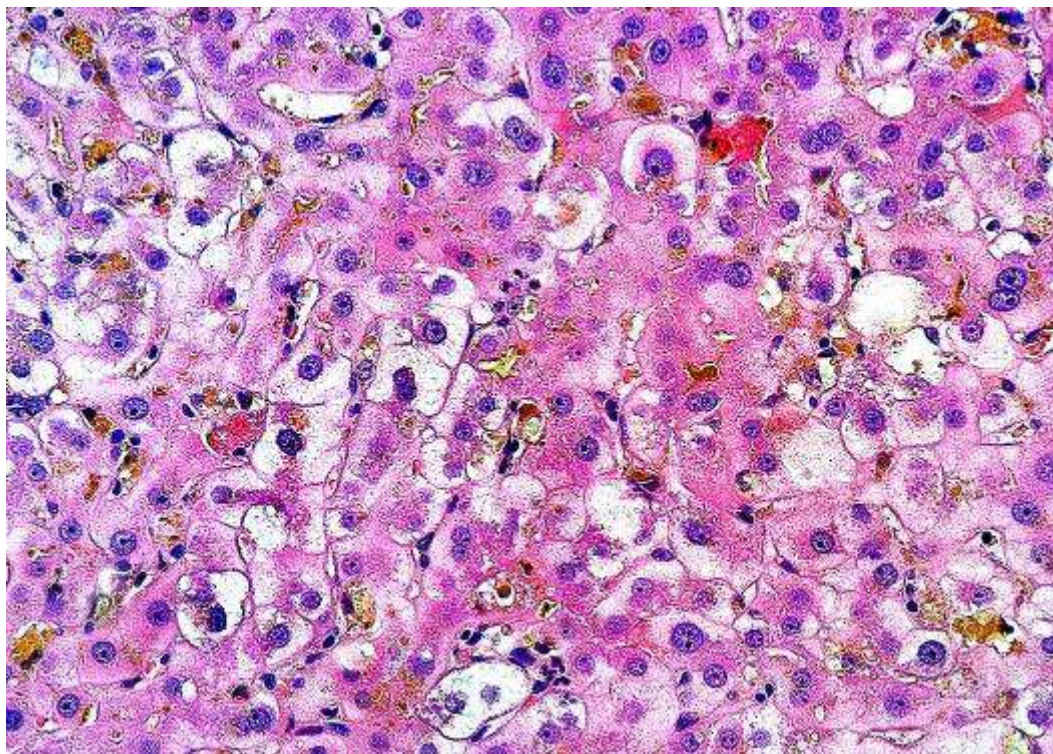


Рисунок 4.31 – Внутрішньодуктальні біліостазі і внутрішньоклітинні холестази в печінці при активації АСГ. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 1000.

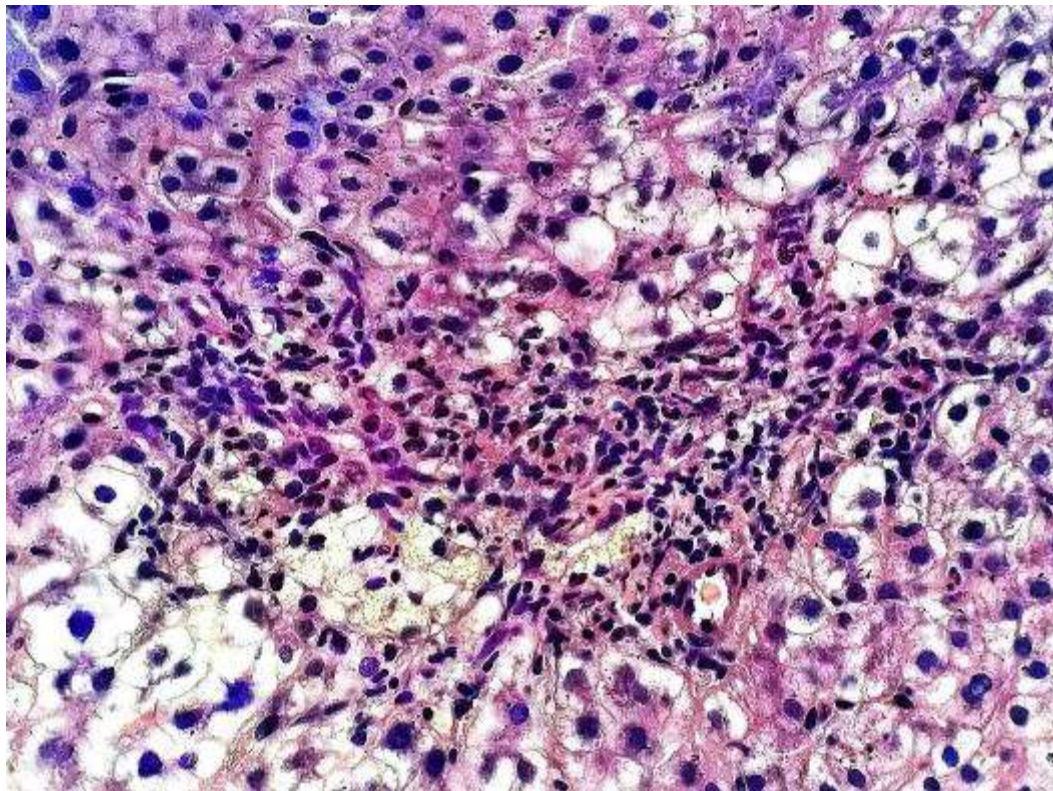


Рисунок 4.32 – Велика стеатогранульома навколо дрібних вогнищ стеатонекрозу гепатоцитів при активації НАСГ. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: x 600.

До відносно рідких проявів активності хронічного стеатогепатиту слід віднести інтенсифікацію аутофагії в гепатоцитах зі значним стеатозом. Значна активація аутофагії в стеатотично змінених гепатоцитах частіше виявляється в трепанобіоптатах печінки хворих на НАСГ. При світловій мікроскопії в печінці таких хворих спостерігаються вогнища тяжкого стеатозу гепатоцитів з наявністю серед них значної кількості гепатоцитів, які містять в цитоплазмі, крім ліпідних крапель, також значні і поширені накопичення гранул ліпофусцину (рис. 4.33). При електронній мікроскопії в цитоплазмі таких стеатотично змінених гепатоцитів виявляється величезна кількість аутофаголізосом. Аутофагія являє собою процес внутрішньоклітинної деградації, при якому білково-ліпідні агрегати і фрагменти пошкоджених органел оточуються подвійною мембраною, яка зливається з лізосоною, утворюючи аутофаголізосому для деградації цих пошкоджених компонентів цитозолу клітини. При інтенсифікації аутофагії у хворих на НАСГ при ІГХ дослідженні трепанобіоптатів печінки в цитоплазмі гепатоцитів зі значним стеатозом серед ліпідних крапель виявляються дрібні локальні вогнища експресії каспази-3, які маркують великі аутофагосоми (рис. 4.34). При активації стеатогепатиту у хворих на АСГ інтенсифікація аутофагії в стеатотично змінених гепатоцитах печінки спостерігається значно рідше.

До необов'язкових, відносно рідких ознак активності НАСГ і АСГ слід також віднести значне депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах, холангіоцитах і макрофагах печінки. Ретроспективний аналіз клініко-лабораторних даних у таких хворих на АСГ і на НАСГ показав, що при УЗД у них виявлялася наявність гіперехогенних вогнищ в тканині печінки, а при лабораторному обстеженні визначалися підвищені рівні сироваткового заліза (понад 30,43 мкмоль/л) і феритину (понад 250 мкг/л).

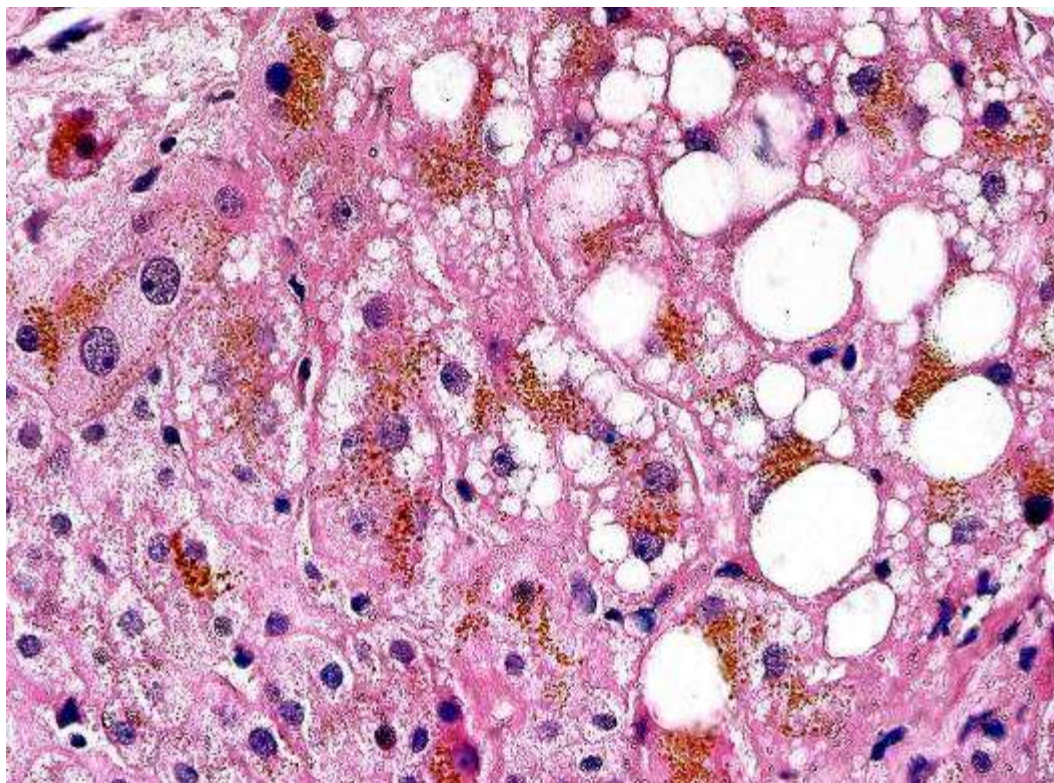


Рисунок 4.33 – Вогнище тяжкого стеатозу гепатоцитів з наявністю в цитоплазмі клітин значних і поширених накопичень гранул ліпофусцину при активації НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

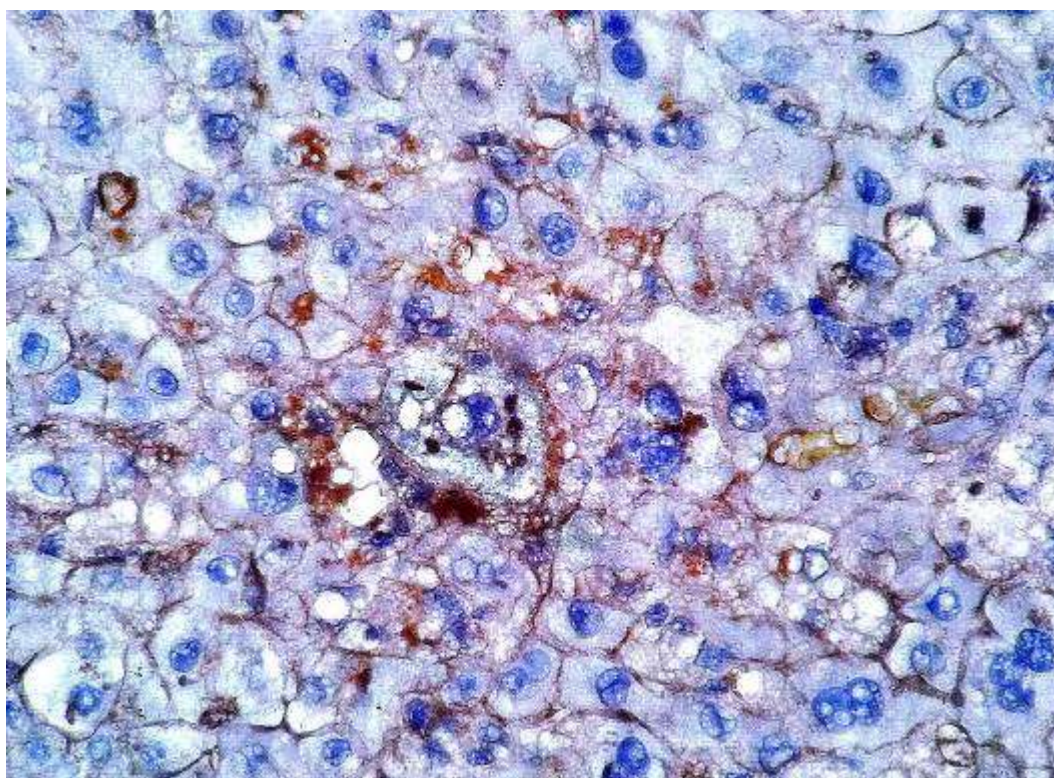


Рисунок 4.34 – Локальні вогнища експресії каспази-3 в аутофагосомах в цитоплазмі гепатоцитів зі значним стеатозом при активації НАСГ. Мо *a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP*. Зб.: x 1000.

При забарвленні гепато-трепанобіоптатів за Перлсом при активації стеатогепатиту у хворих на НАСГ в дольках печінки виявлялося значне депонування заліза в гепатоцитах і в макрофагах Купфера, а у хворих на АСГ - значне депонування заліза в гепатоцитах і в макрофагах Купфера, а також в деяких холангіоцитах жовчних проток порталних трактів. Визначено, що в печінці хворих на НАСГ при активації стеатогепатиту в гепатоцитах і макрофагах має місце більш значне депонування тривалентного Fe^{3+} заліза до помірного G3 ступеня (рис.4.35), ніж депонування двовалентного Fe^{2+} заліза (частіше до легкого G2 ступеня) (рис.4.36).

ГХ і МФМ аналіз особливостей депонування тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза у померлих хворих на АСГ з різним S_1 - S_2 - S_3 ступенем стеатозу печінки, показав наступне. У 35 % померлих хворих на АСГ з тяжким S_3 мікро-макроезичулярним стеатозом печінки у всіх трьох зонах печінкових дольок виявлялося значне депонування тривалентного Fe^{3+} заліза тяжкого G4 ступеню в значній кількості макрофагів Купфера і гепатоцитів (рис. 4.37), та мінімальне накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза лише в одиничних макрофагах і гепатоцитах (рис. 4.38). У 30 % померлих хворих на АСГ з помірним S_2 мікро-макроезичулярним стеатозом печінки спостерігалось помірне G3 депонування тривалентного Fe^{3+} заліза в гепатоцитах і в макрофагах централобулярних Z_3 та проміжних Z_2 зон печінкових дольок; а у 20 % померлих хворих - в цих же клітинах централобулярних Z_3 зон печінкових дольок. Таким чином, в половині спостережень виявлено накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза переважно в гепатоцитах централобулярних Z_3 зон дольок печінки, в яких, найбільш активно протікають процеси окислення двовалентного заліза в тривалентне і з'єднання двовалентного заліза з цитоплазматичними білками.

У 15 % померлих хворих на АСГ з легким S_1 мікроезичулярним стеатозом печінки визначалося депонування тривалентного Fe^{3+} заліза легкого G2 ступеня в гепатоцитах і макрофагах проміжних Z_2 і

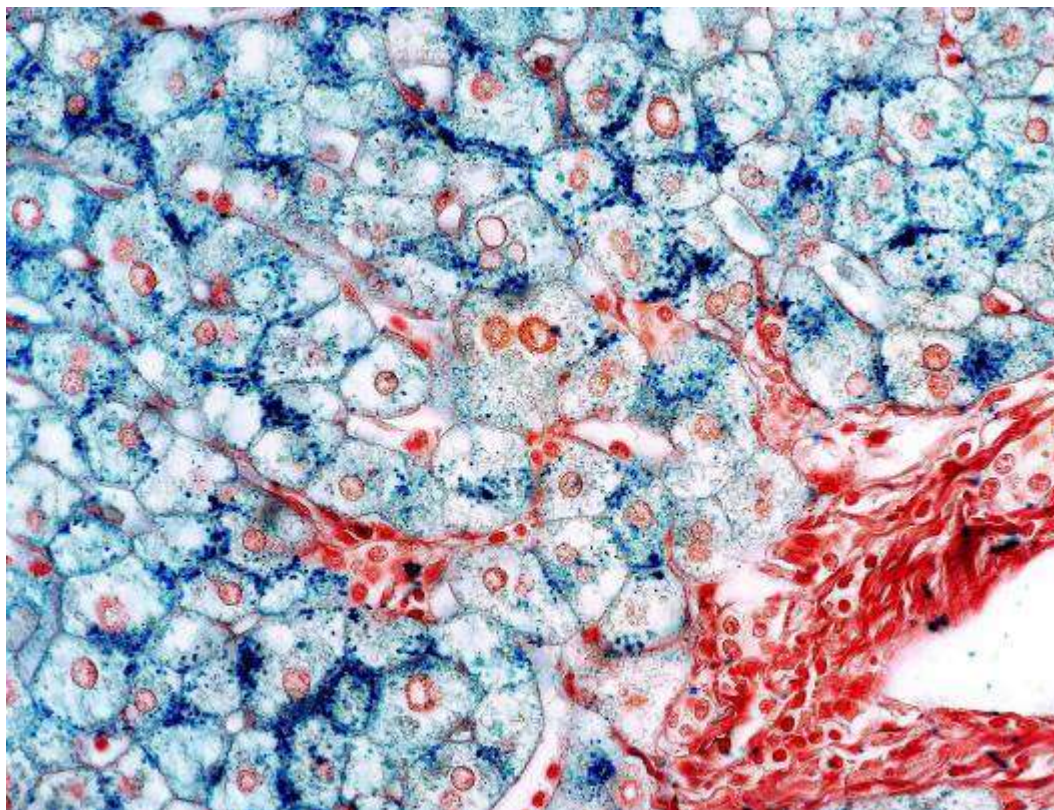


Рисунок 4.35 – Значно збільшене до помірного G3 ступеня депонування тривалентного Fe³⁺ заліза в гепатоцитах при активації НАСГ. Метод Перлса. Зб.: x 600.

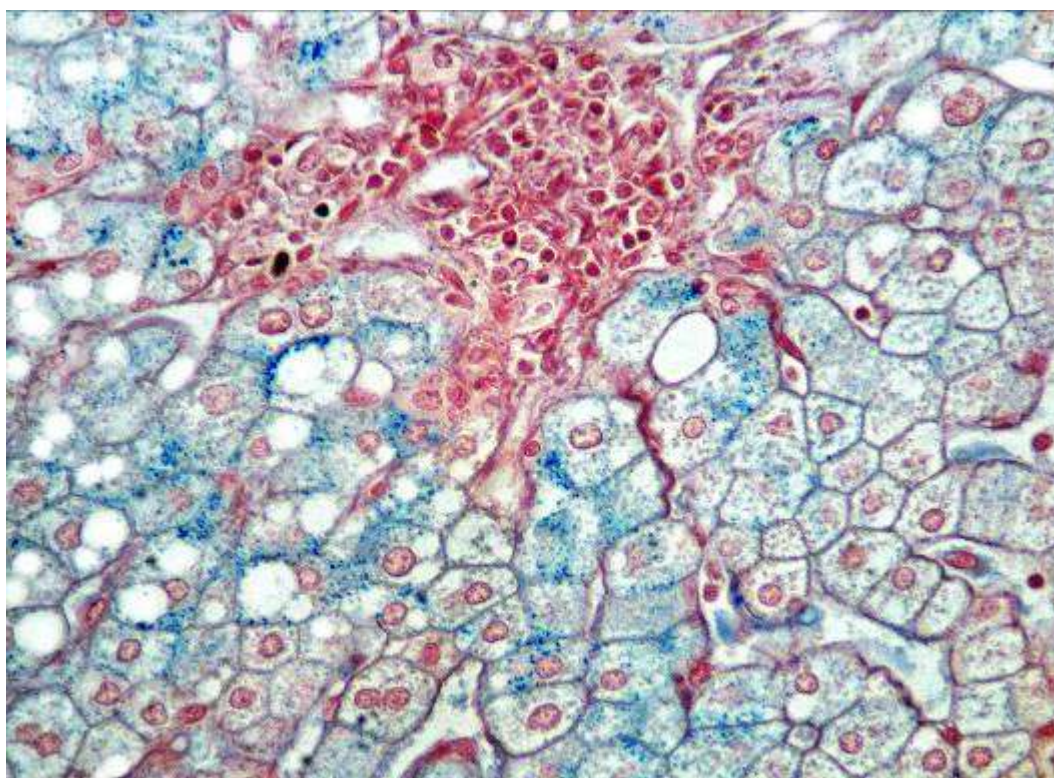


Рисунок 4.36 – Накопичення двовалентного Fe²⁺ заліза легкого G2 ступеня в гепатоцитах при НАСГ. Метод Тірмана-Шмельцера. Зб.: x 600.

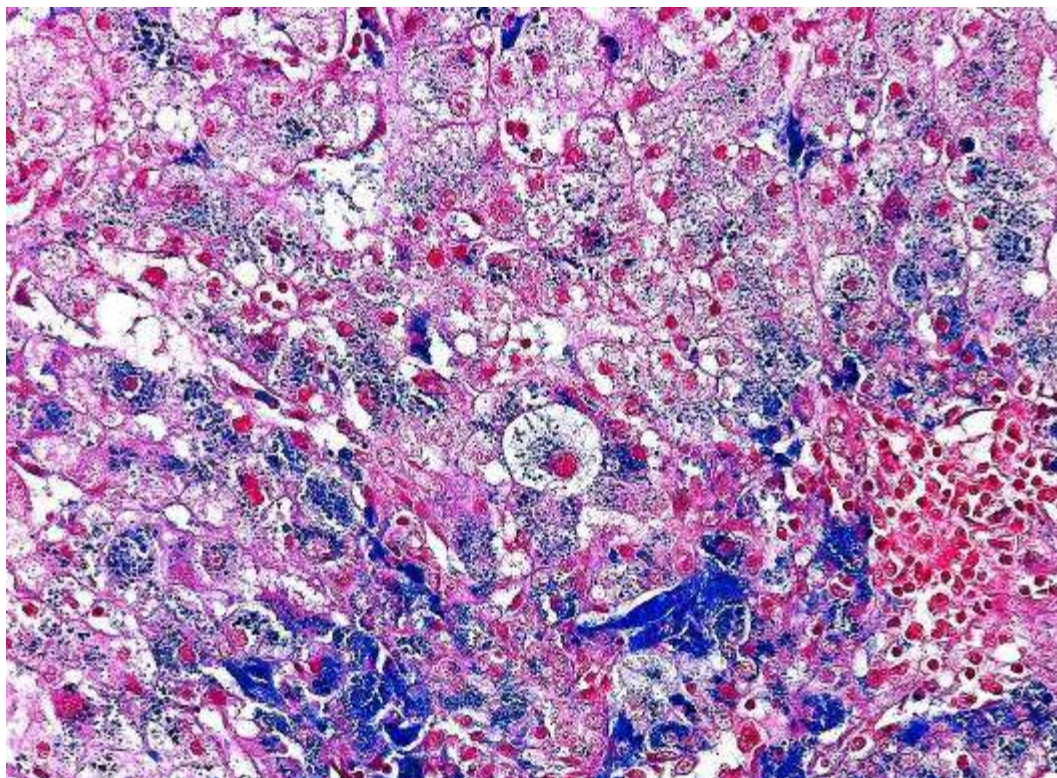


Рисунок 4.37 – Значне депонування тривалентного Fe^{3+} заліза в гепатоцитах від тяжкого G4 ступеня до помірного G3 ступеня при активному АСГ. Метод Перлса. Зб.: x 400.

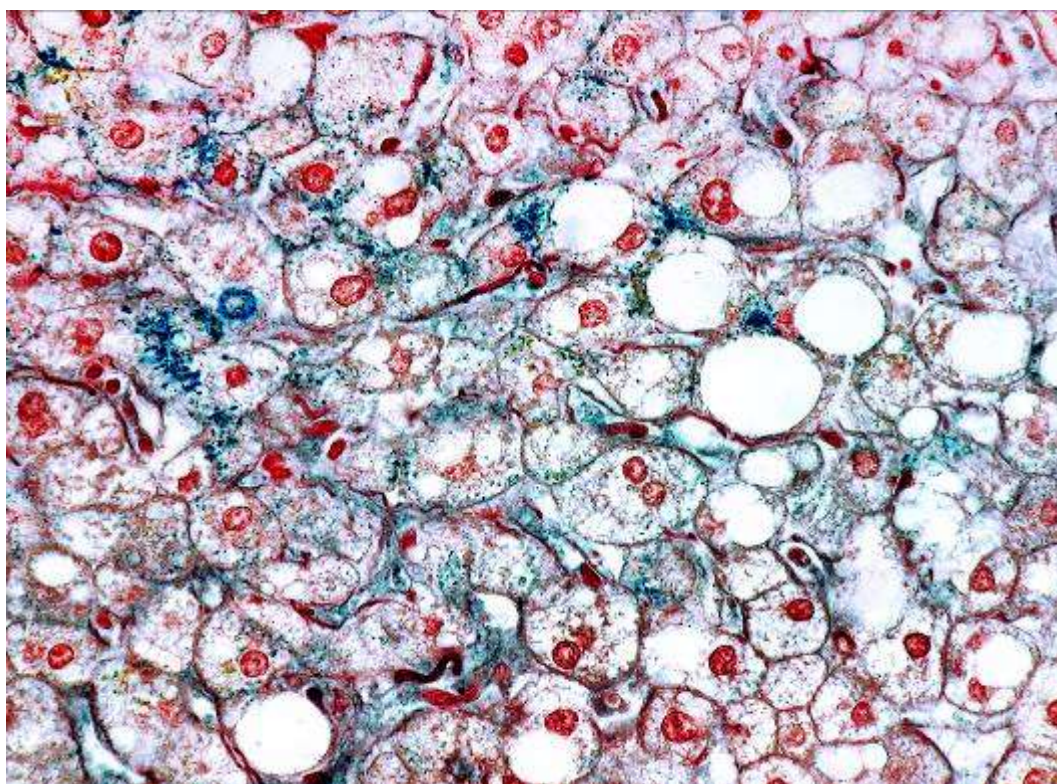


Рисунок 4.38 – Мінімальне накопичення дивалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах при активному АСГ. Метод з гексаціанофератом (III) калію за Тірманом-Шмельцером. Зб.: x 600.

перипортальних Z_1 зон печінкових дольок, а в центролобулярних Z_3 зонах печінкових дольок реакція Перлса була негативною. Накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза легкого G2 ступеня виявлялося в нечисленних гепатоцитах центролобулярних Z_3 зон печінкових дольок.

При порівняльному МФМ аналізі встановлено, що в печінці померлих хворих на АСГ з тяжким S_3 мікро-макроезичулярним стеатозом печінки накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза визначалося в $29,57 \pm 0,90$ % макрофагів і гепатоцитів всіх 3-х зон печінкових дольок, а накопичення двовалентного Fe^{2+} заліза - тільки в $1,43 \pm 0,72$ % цих же клітин, тобто розповсюдженість депонування тривалентного Fe^{3+} заліза в макрофагах і гепатоцитах більш ніж в 20 разів перевищувала розповсюдженість депонування в цих клітинах двовалентного Fe^{2+} заліза ($p < 0,05$) (табл. 4.3).

У померлих хворих на АСГ з помірним S_2 мікро-макроезичулярним стеатозом печінки депонування тривалентного Fe^{3+} заліза виявлялося в $6,27 \pm 1,51$ % гепатоцитів і макрофагів центролобулярних Z_3 і проміжних Z_2 зон печінкових дольок, а депонування двовалентного Fe^{2+} заліза - в $2,67 \pm 0,78$ % цих же клітин; тобто, розповсюдженість клітин з накопиченим тривалентним Fe^{3+} залізом більш ніж в 2 рази перевищувала розповсюдженість клітин з накопиченим двовалентним Fe^{2+} залізом ($p = 0,038$) (табл. 4.3). У померлих хворих на АСГ з легким S_1 мікроезичулярним стеатозом печінки депонування Fe^{3+} визначалося в $6,33 \pm 0,67$ % гепатоцитів і макрофагів проміжних Z_2 та перипортальних Z_1 зон печінкових дольок, а депонування Fe^{2+} виявлялося в одиничних гепатоцитах ($0,67 \pm 0,33$ %) всіх трьох зон печінкових дольок ($p < 0,05$). Таким чином, проведені дослідження показали, що при АСГ депонування в печінці тривалентного і двовалентного заліза зростає від G2 до G4 ступеня по мірі збільшення від S_1 до S_3 тяжкості стеатозу печінки (табл. 4.3). Отримані результати дають підставу припустити, що депонування в печінці тривалентного і двовалентного заліза сприяють прогресуванню АСГ.

Таблиця 4.3 –Рівні депонування двовалентного Fe^{2+} і тривалентного Fe^{3+} заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки (в%) при різному ступеню тяжкості стеатозу печінки у померлих хворих на алкогольний стеатогепатит

| Ступінь стеатозу печінки | Тяжкий (S_3) мікро-макроевезикулярний стеатоз печінки | | Помірний (S_2) мікро-макроевезикулярний стеатоз печінки | | Легкий (S_1) мікроевезикулярний стеатоз печінки | |
|--------------------------------|---|------------|---|------------|---|------------|
| | Fe^{3+} | Fe^{2+} | Fe^{3+} | Fe^{2+} | Fe^{3+} | Fe^{2+} |
| Рівні депонування заліза (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 ($p < 0,05$) між депонуванням Fe^{3+} і Fe^{2+} в гепатоцитах і макрофагах;

3 - # достовірна різниця ($p < 0,05$) між депонуванням Fe^{3+} і Fe^{2+} в гепатоцитах і макрофагах;

4 - & достовірна різниця ($p < 0,05$) між депонуванням Fe^{3+} і Fe^{2+} в гепатоцитах і макрофагах;

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

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

Встановлено, що при активному стеатогепатиті у хворих на АСГ в печінці визначаються вогнищеві скупчення крупних макрофагів і зменшених у розмірах округлих гепатоцитів з пікнотичними ядрами, цитоплазма яких щільно заповнена тривалентним Fe^{3+} залізом (рис.4.39).

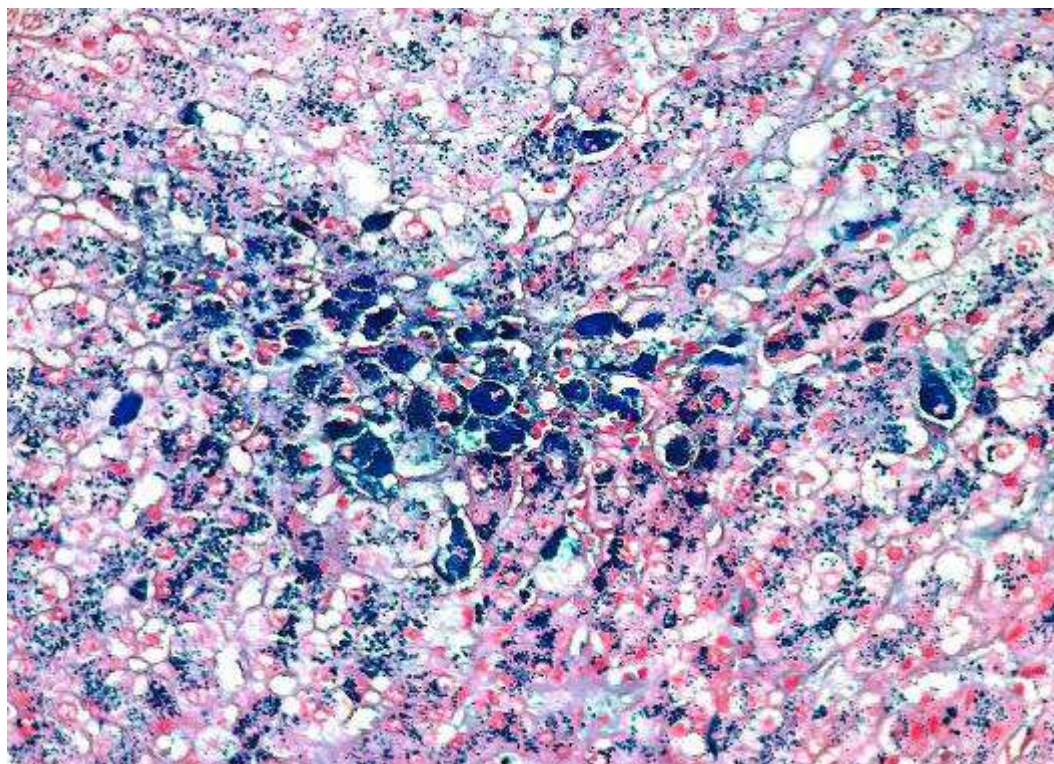


Рисунок 4.39 – Вогнищеве скупчення макрофагів і гепатоцитів, цитоплазма яких переповнена тривалентним Fe^{3+} залізом при активному АСГ. Метод Перлса. Зб.: х 400.

Зважаючи на високу інтенсивність і щільність переповнення цитоплазми окремих гепатоцитів і макрофагів тривалентним Fe^{3+} залізом, при якому цитоплазма клітин повністю заповнюється тривалентним Fe^{3+} залізом, і в клітинах визначається тільки зменшене пікнотичне ядро без ядерця, встас питання стосовно функціональних можливостей і життєздатності таких клітин. Якщо фагоцитоз і тимчасове депонування в фаголізосомах цитоплазми молекулярно-мембранного детриту та заліза з гепатоцитів і з позаклітинного матриксу печінки є функціональним призначенням фагоцитуючих макрофагів Купфера, то переповнення залізом гепатоцитів є кроком до їх загибелі. Тому крупні округлі макрофаги з ядром звичайної структури, цитоплазма яких переповнена залізом, можливо вважати проявом максимальної фагоцитарної активності цих клітин. В той же час, крупні округлі, переповнені залізом макрофаги зі зменшеним, пікнотичним або фрагментованим ядром, найімовірніше є клітинами в стані апоптотичного розпаду.

З урахуванням мікроскопічних і гістохімічних ознак, зменшені округлі гепатоцити, що втратили типову клітинну форму, мають зменшене, пікнотичне або фрагментоване ядро без ядерця, цитоплазма яких повністю заповнена щільними накопиченнями заліза, найімовірніше, є гепатоцитами в стані апоптозу (рис.4.40, 4.41). В препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, такі клітини оточені начебто оптично пустою щільною, яка насправді являє собою відростки CD 68-позитивних макрофагів. За результатами гістохімічних досліджень в цитоплазмі таких апоптотичних гепатоцитів визначаються щільні відкладення як тривалентного Fe^{3+} заліза (рис.4.40), так і двовалентного Fe^{2+} заліза (рис.4.41). Численні публікації молекулярних біологів останніх років стосовно можливості і наявності фероптозу клітин, а також структурно-гістохімічні особливості таких гепатоцитів, які виявляються при активації АСГ, дають підставу вважати їх гепатоцитами в стані фероптозу.

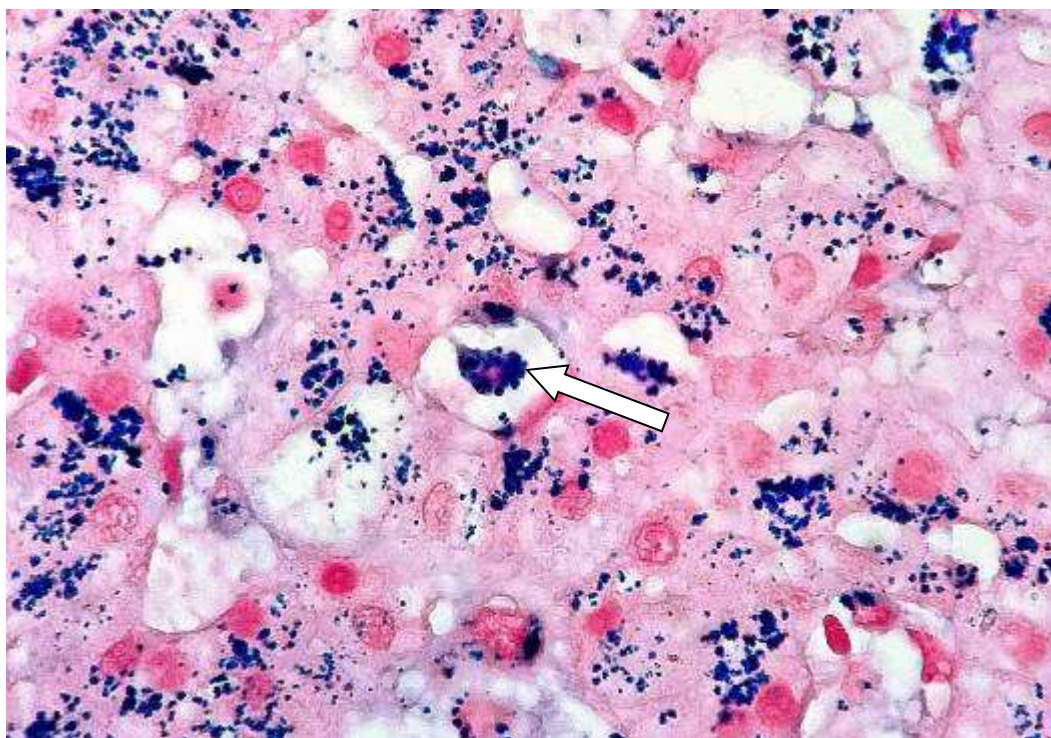


Рисунок 4.40 – Фероптоз гепатоцита (стрілка), переповненого тривалентним Fe^{3+} залізом, при активному АСГ. Метод Перлса. Зб.: x 1000.

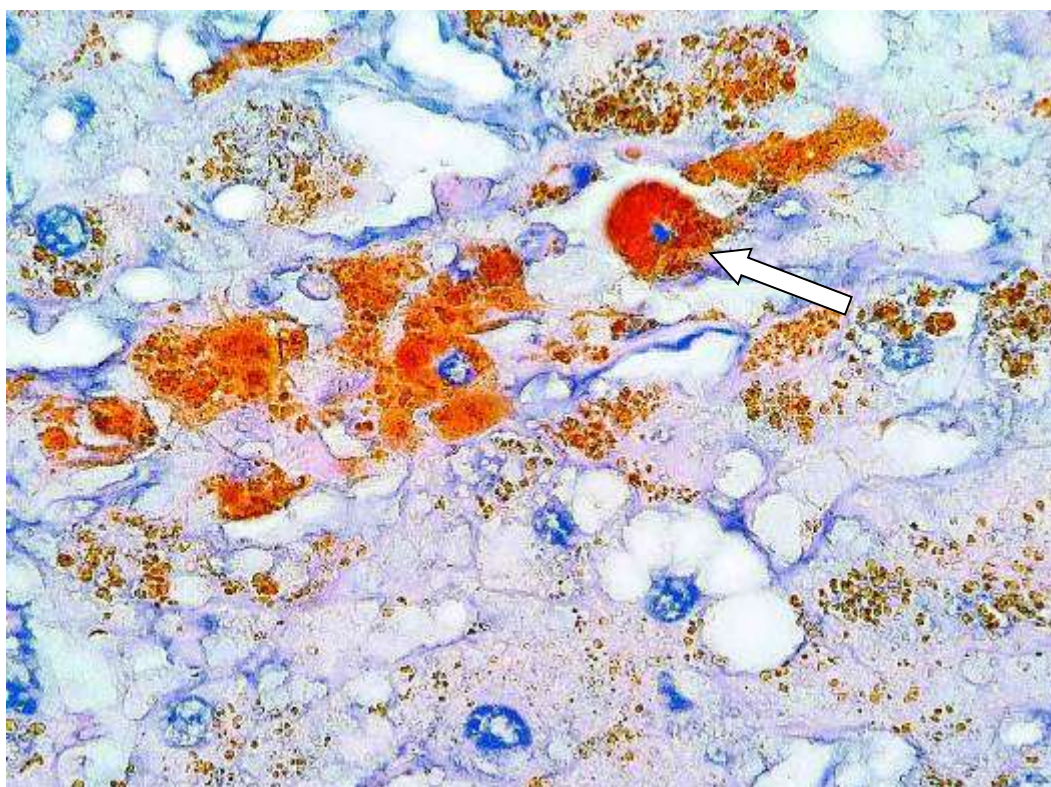


Рисунок 4.41 – Фероптоз гепатоцита (стрілка), переповненого двовалентним Fe^{2+} залізом, при активному АСГ. Модифікований метод Хьюкіла-Пула. Зб.: x 1000.

Резюме. У померлих хворих на НАСГ з тяжким S_3 панлобулярним стеатозом гепатоцитів, у яких за життя був підвищеним рівень загального холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові, при ВЕР-ХМС аналізі в печінці визначено значно підвищений вміст стеаринової і пальмітинової кислот та холестерину. Між ступенем стеатозу печінки (y), а також вмістом холестерину в печінці (x_1) і прижиттєвим рівнем холестерину (x_2) в плазмі крові має місце статистично значуща залежність ($y = 0,36x_1 + 0,10x_2$; $R^2 = 0,91$). У померлих хворих на НАСГ з тяжким S_3 стеатозом між ступенем тяжкості стеатозу печінки (y) та підвищеним вмістом в ній пальмітинової (x_1) і стеаринової (x_2) кислот має місце достовірні залежність ($y = 0,83x_1$; $R^2 = 0,33$ і $y = 1,13x_2$; $R^2 = 0,37$).

ІГХ та МФМ методами у померлих хворих на АСГ визначено, що при тяжкому S_3 мікро-макроевезикулярному стеатозі має місце найбільш значне депонування тривалентного заліза в макрофагах і в гепатоцитах тяжкого $G4$ ступеня, яке більш ніж в 20 разів перевищує депонування в цих клітинах двовалентного заліза. Перевантаження тривалентним залізом веде до фероптозу гепатоцитів. Отримані нові ЕМ і ІГХ дані, що балонні гепатоцити є клітинами, які руйнуються шляхом балонного цитолізу.

Зміни клініко-лабораторних даних хворих та ПМ картини їх повторних гепатобіоптатів підтвердив, що стеатоз гепатоцитів при НАСГ є транзиторним зворотнім процесом, який зменшується після усунення у пацієнтів важких метаболічних порушень. Встановлено, що у хворих на НАСГ і АСГ розвиток стеатозу печінки помірного S_2 і тяжкого S_3 ступеня супроводжується паралельними компенсаторними змінами гепатоцитів: появою двох-трьох-шестиядерних гепатоцитів, великих одноядерних гепатоцитів з кількома ядерцями, гепатоцитів з гіперхромними ядрами, збільшенням кількості двоядерних гепатоцитів поряд з зонами стеатозу. За результатами ПГ, ІГХ і ЕМ досліджень визначено, що по мірі зростання стеатозу печінки від легкого S_1 ступеня до помірного S_2 і до тяжкого S_3

ступеня у хворих на НАСГ і на АСГ в дольках печінки з'являється значна кількість активованих S100+ (клон A4) макрофагів, що виділяють білок S100A4, а також збільшується кількість активованих CD68+ макрофагів, які накопичуються в локусах балонного цитолізису, стеатонекрозу гепатоцитів і активують фагоцитоз мембранно-молекулярного клітинного детриту.

З урахуванням клініко-лабораторних даних про дисфункцію печінки у пацієнтів на момент біопсії та результатів ПМ, ЕМ, ГХ, ІГХ і ВЕР-ХМС досліджень визначено, що у хворих на НАСГ і АСГ ступінь тяжкості стеатозу печінки S₁-S₂-S₃ в гепато-трепанобіоптатах відзеркалює ступінь розповсюдженості стеатозу гепатоцитів на момент патоморфологічного дослідження біоптату, в той час як активність хронічного СГ, визначає цілий комплекс мікроскопічних ознак. ПМ ознаками активності АСГ і НАСГ є зростання тяжкості стеатозу печінки від S₁ до S₃ ступеня і його поширення до панлобулярного, збільшення кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; підвищення кількості балонних гепатоцитів; інтенсифікація стеатонекрозу, апоптозу і фероптозу гепатоцитів; зростання кількості та розширення вогнищ стеатонекрозу в печінці; інтенсифікація лейкоцитарного сателітоза навколо збільшеної кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка; поява локусів імуноклітинного кілінгу пошкоджених і стеатотично змінених гепатоцитів; поширення вогнищевої та дифузної лейкоцитарно-лімфоцитарної інфільтрації дольок печінки.

За даними ПГ, ГХ, ІГХ і МФМ досліджень визначені рідкі ознаки активації хронічного стеатогепатиту: розвиток біліостазу у хворих на АСГ, поява стеатогранульом (частіше при АСГ), зростання інтенсивності та розповсюдженості аутофагії в гепатоцитах зі стеатозом (частіше при НАСГ), а також збільшення депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах (при НАСГ і АСГ), яке веде до фероптозу гепатоцитів (частіше при АСГ).

Основні положення цього розділу опубліковані в 3-х статтях [180-181, 187] та 5-ти тезах [182, 185-186, 188-189].

РОЗДІЛ 5

ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕПАРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В ПЕЧІНЦІ ТА НЕСПРИЯТЛИВИХ НАСЛІДКІВ ХРОНІЧНОГО НЕАЛКОГОЛЬНОГО ТА АЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТУ

Патоморфологічний аналіз біопсійно-секційного матеріалу печінки хворих на НАСГ і АСГ показав, що репаративний процес в печінці при цих захворюваннях має значні особливості. Загибель гепатоцитів шляхом стеатонекрозу, балонного цитолізу, апоптозу і фероптозу дуже рано активує перицелюлярний фіброгенез. Незворотні пошкодження гепатоцитів, які виникають в умовах перицелюлярного фіброза, стимулюють не стільки мітотичний розподіл гепатоцитів, скільки активацію прогеніторних клітин печінки з розвитком репаративної дуктулярної реакції.

5.1 Гістохімічна і імуногістохімічна характеристика розвитку і прогресування фіброзу печінки при неалкогольному та алкогольному стеатогепатиті.

Проведені мікроскопічні і ІГХ дослідження показали, що при розвитку стеатозу гепатоцитів у хворих на НАСГ і АСГ в дольках печінки реєструється збільшення кількості активованих α -SMA-позитивних перисинусоїдальних зірчастих клітин фіброгенного типу (рис. 5.1) та збільшення чисельності активованих α -SMA-позитивних фіброblastів в порталних трактах. Нові покоління активованих перисинусоїдальних клітин втрачають класичну зірчасту форму, сплющуються, набувають значну кількість подовжених відростків, в цитоплазмі і відростках виявляється експресія α -гладком'язового актину - α -SMA (рис. 5.2). Такі клітини

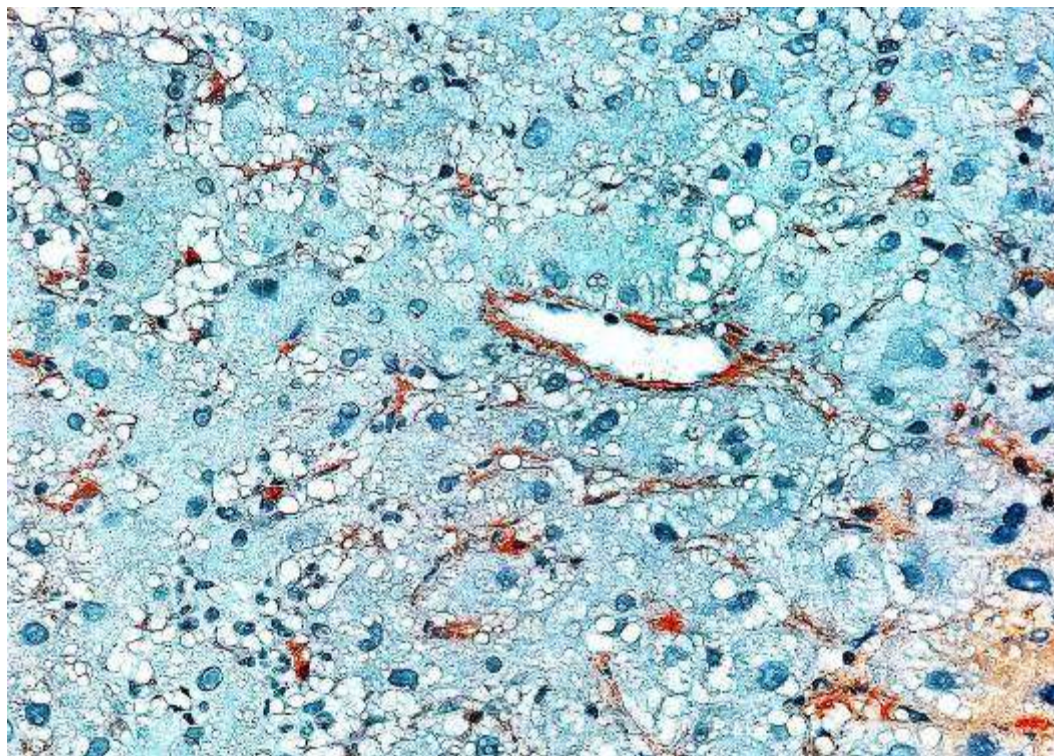


Рисунок 5.1 – Збільшення кількості α -SMA-позитивних перисинусоїдальних зірчастих клітин в дольці печінки при НАСГ. Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. Зб.: x 400.

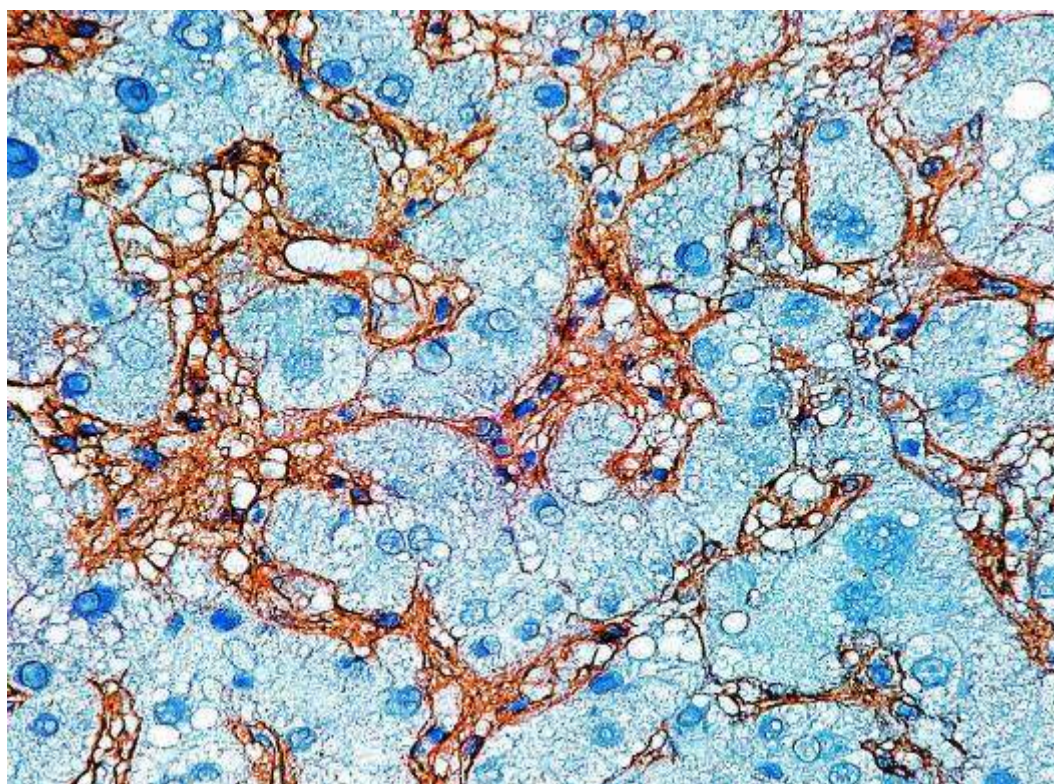


Рисунок 5.2 – Експресія α -SMA в цитоплазмі і відростках збільшеної кількості перисинусоїдальних міофібробластів при НАСГ. Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. Зб.: x 800.

отримали назву перисинусоїдальних міофіброblastів у зв'язку з синтезом ними колагену і інших молекул позаклітинного матриксу. Підвищена кількість α -SMA-позитивних перисинусоїдальних міофіброblastів насамперед з'являється в перисинусоїдальних просторах печінки біля гепатоцитів зі стеатозом.

При прискіпливому мікроскопічному аналізі збільшення кількості перисинусоїдальних зірчастих клітин в зонах стеатозу печінки у хворих на НАСГ і АСГ виявляється також в мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, за Ван Гізон і методом Масон-трихром. Але визнаним у світі маркером активованих перисинусоїдальних зірчастих клітин є експресія цими клітинами α -гладком'язового актину - α -SMA.

При електронній мікроскопії в перисинусоїдальних просторах печінки хворих на НАСГ і АСГ спостерігаються сплющені присинусоїдальні міофіброblastи з подовженими відростками та сплющеним ядром, яке містить хроматин середньої електронної щільності. В цитоплазмі таких клітин визначається значна кількість органел внутрішньоклітинного синтезу: полірибосом, цистерн ГрЕС і ГЕС та структур комплексу Гольджі, а також мітохондрій. В перисинусоїдальному просторі поряд з присинусоїдальними міофіброblastами визначаються рясні пучки колагенових волокон (рис.5.3), які заповнюють простір з аморфним молекулярним матриксом між ендотеліальними клітинами синусоїдів та гепатоцитами. З цього моменту перисинусоїдальний простір, заповнений колагеновими волокнами, не визначається. Ендотеліальні клітини втрачають притаманні цим клітинам фенестри. Гепатоцити, що прилягають до зон перисинусоїдального депонування колагену, втрачають мікрворсинки (рис. 5.4). Такі суттєві патологічні зміни в ультраструктурі перисинусоїдального простору, що межує між кров'ю і гепатоцитами, значно погіршують метаболічні процеси в гепатоцитах.

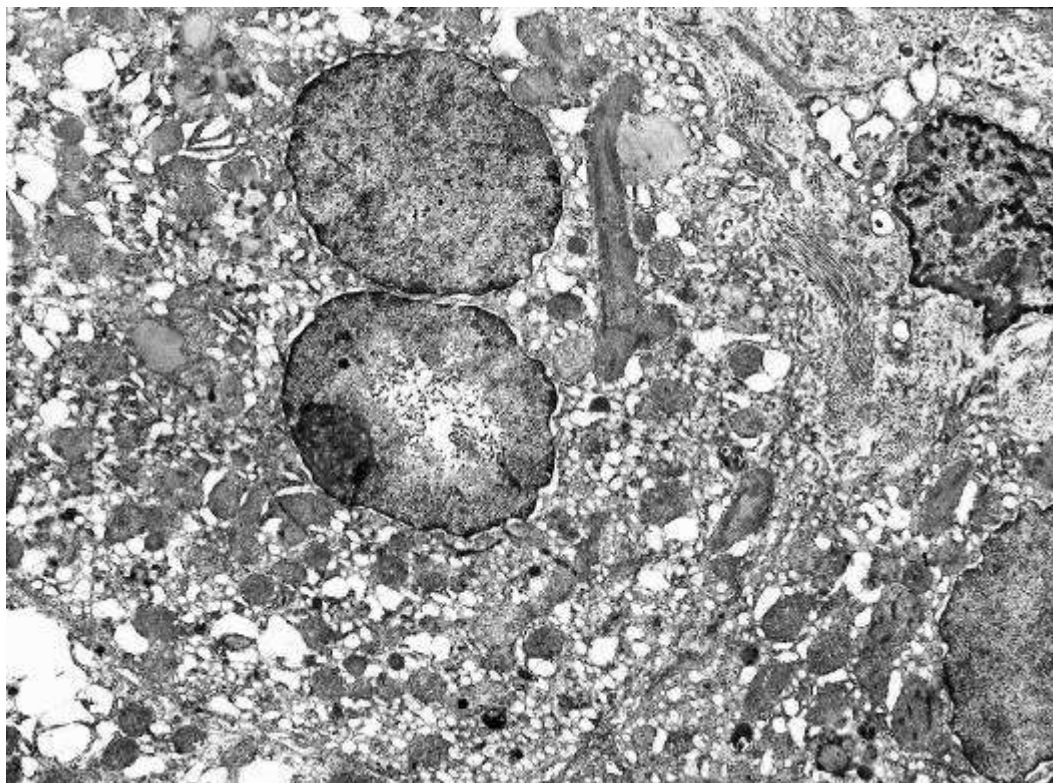


Рисунок 5.3 – Перисинусоїдальний міофібробласт (справа зверху) поряд з яким, в перисинусоїдальному просторі визначаються рясні пучки колагенових волокон при НАСГ. Електроннограма. Зб.: x 3200.

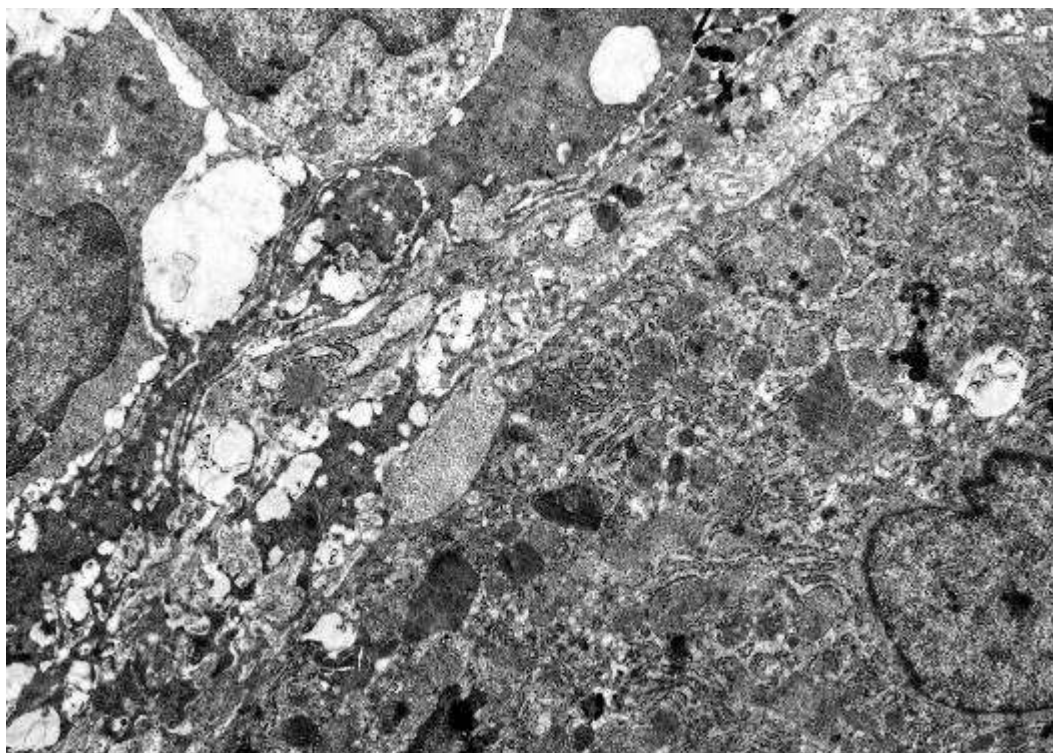


Рисунок 5.4 – Локуси втрати гепатоцитом мікрворсинок над перисинусоїдальною зоною депонування колагену при АСГ. Електроннограма. Зб.: x 1400.

Виконані ІГХ дослідження показали, що активовані перисинусоїдальні міофібробласти міняють типовий для зірчастих клітин фенотип регуляторів ретиноїдів на фенотип фіброгенних клітин. В цитоплазмі перисинусоїдальних міофібробластів визначається експресія віментину (рис.5.5А), фасцину (рис.5.5Б), а також крупномолекулярного фібронектину (рис.5.6А), який продукують не тільки перисинусоїдальні зірчасті клітини, але й гепатоцити і синусоїдальний ендотелій. Незважаючи на те, що перисинусоїдальні зірчасті клітини і синусоїдальні ендотеліоцити в нормі продукують в невеликих кількостях крупномолекулярний ламінін, в активованих перисинусоїдальних міофібробластах і в перисинусоїдальних просторах при фіброзі печінки експресія ламініну не визначається. В активованих перисинусоїдальних міофібробластах також не визначається експресія маркера проміжних філаментів десміну.

Але в зонах навіть слабкого фіброзу біля гепатоцитів зі стеатозом в розширених перисинусоїдальних просторах поряд з активованими перисинусоїдальними міофібробластами завжди визначаються потовщені смуги експресії колагену IV типу (рис.5.6Б). В нормі в перисинусоїдальних просторах печінки виявляються дуже тонкі фрагменти нитчастої експресії колагену IV типу, який є складовою частиною розріджених перисинусоїдальних базальних мембран. При зростанні перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу навколо гепатоцитів зі стеатозом в розширених перисинусоїдальних просторах визначається експресія не тільки колагену IV типу, але й потовщені смуги експресії колагену I і III типу. Зони потовщеного перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу в дольках печінки гарно також визначаються в мікропрепаратах, забарвлених методами Масон-трихром і за Ван Гізон, а також при імпрегнації ретикулінових волокон за Гоморі. Таким чином, за результатами ІГХ досліджень встановлено, що при НАСГ і АСГ типовим для перисинусоїдальних міофібробластів печінки є імунофенотип: α -SMA +, віментин +, фібронектин +, фасцин +, ламінін -, десмін -.

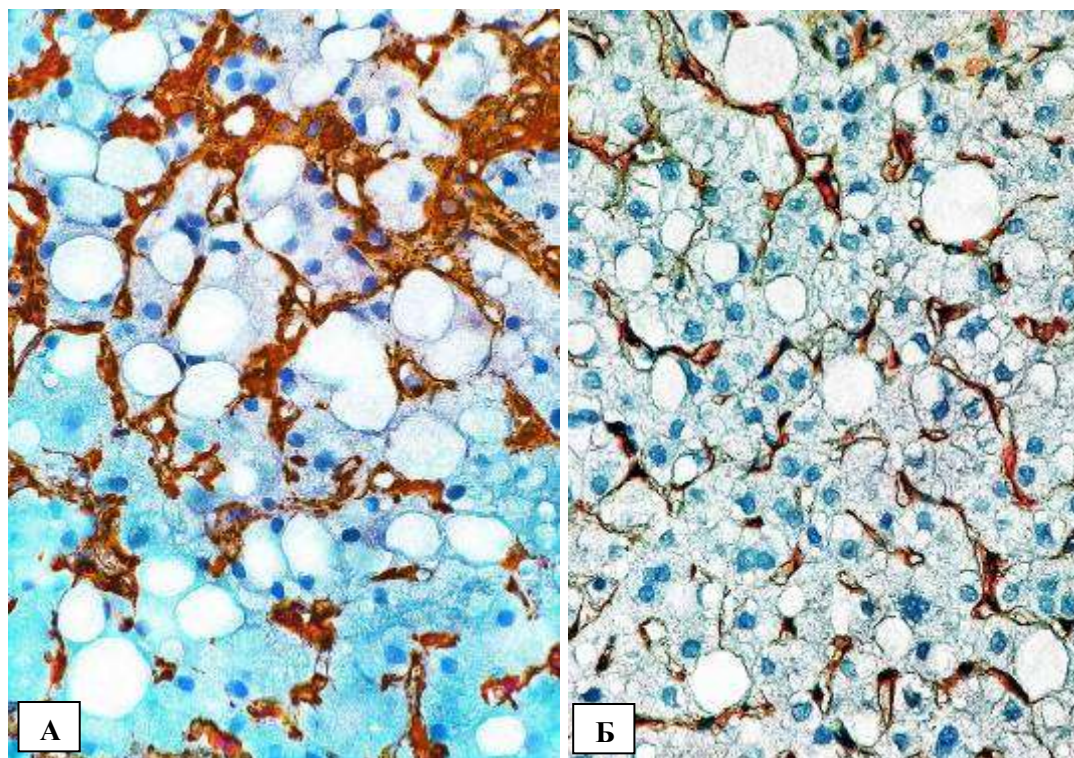


Рисунок 5.5 – Експресія віментину (А) і фасцину (Б) в збільшеній кількості перисинусоїдальних міофібробластів при НАСГ. А-*Mo a-Hu Vimentin, Clone V9*. Б - *Mo a-Hu Fascin Ab.3б.*: А x 600, Б x 800.

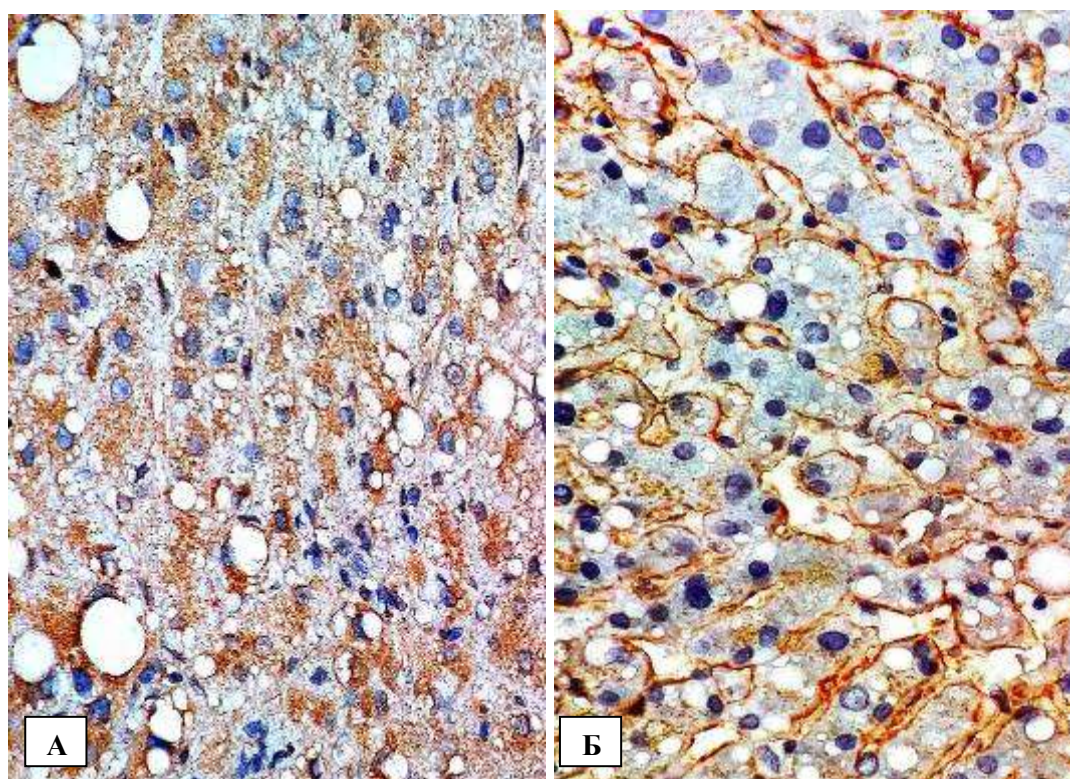


Рисунок 5.6 – Експресія фібронектину в перисинусоїдальних міофібробластах і гепатоцитах (А) та колагену IV типу в перисинусоїдальних просторах поряд з міофібробластами при НАСГ. А- *Rb Fibronectin*. Б- *Mo a-Hu Collagen type IV Ab-3, clone CIV 22 + PHM 12*. 3б.: А і Б x 800.

За даними виконаного нами ІГХ і ФЦММ аналізу, у хворих контрольної групи, які не страждали стеатогепатитом і фіброзом печінки, поодинокі α SMA+ перисинусоїдальні зірчасті клітини займали в печінкових дольках невелику площу, медіана якої склала 1,16 (0,92; 1,54) % СПГЗП.

Встановлено, що у певного відсотка хворих на НАСГ і АСГ при стеатозі печінки реєструється також активація портальних фібробластів, які в нормі в невеликих кількостях присутні в портальних трактах. За результатами ІГХ досліджень визначено, що при активації стеатогепатиту у хворих на НАСГ і АСГ визначається збільшення кількості α SMA+ портальних міофібробластів, а також інтенсифікація їх фіброгенної активності. В активованих портальних міофібробластах визначається значна експресія α -SMA (рис.5.7), віментину (рис.5.8), ламініну, слабка експресія фібронектину, але не визначається експресія фасцину (рис.5.9). Розвиток портального фіброзу при мікроскопічному аналізі діагностується як потовщення портальних трактів з відкладенням в них надлишку сполучної тканини в мікропрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, за Ван Гізон, а також методом Масон-трихром. В потовщених при портальному фіброзі портальних трактах спостерігається значна експресія колагену I, III і IV типу. При електронній мікроскопії між значною кількістю фібробластів в портальних трактах спостерігаються рясні накопичення колагенових волокон (рис.5.10). Таким чином, за результатами ІГХ досліджень встановлено, що при НАСГ і АСГ типовим для активованих портальних міофібробластів печінки є імунофенотип: α -SMA +, віментин +, ламінін +, фібронектин +/-, фасцин -, десмін -.

За результатами ІГХ і ФЦММ аналізу хворих контрольної групи, які не страждали стеатогепатитом і фіброзом печінки, нечисленні портальні α SMA+ фібробласти займали в портальних трактах печінки невелику площу, медіана якої склала 6,78 (5,99; 7,54) % СПГЗП.

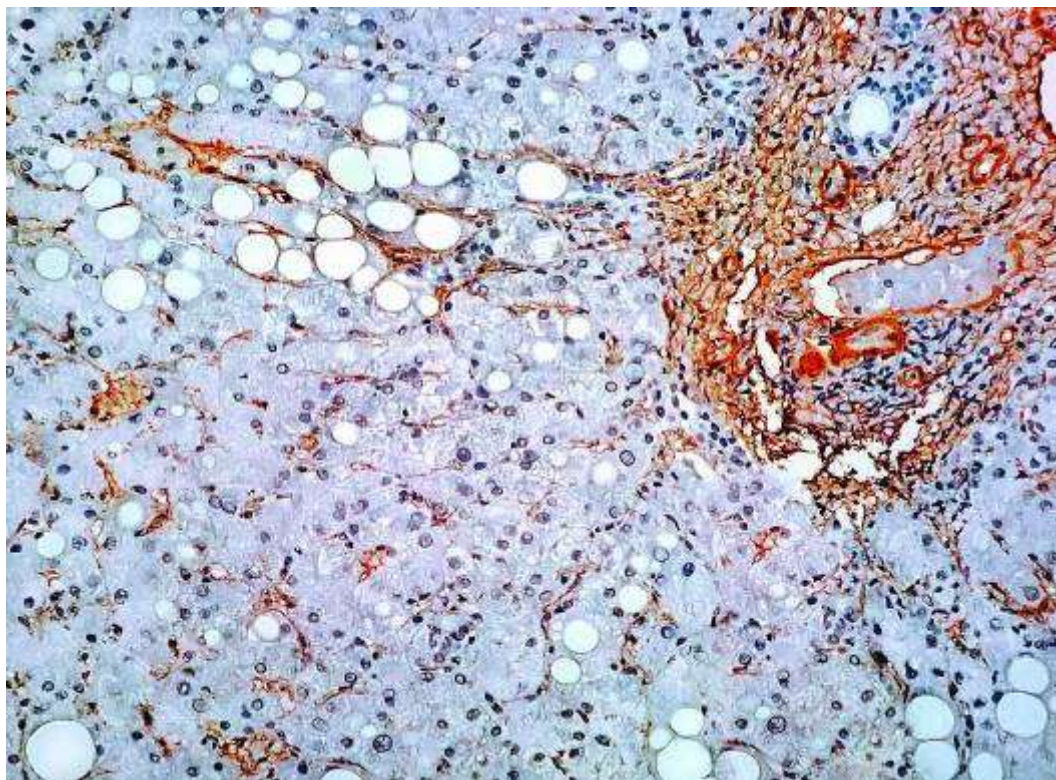


Рисунок 5.7 – Збільшення кількості α -SMA-позитивних міофібробластів в портальному тракті при НАСГ. Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. Зб.: x 200.

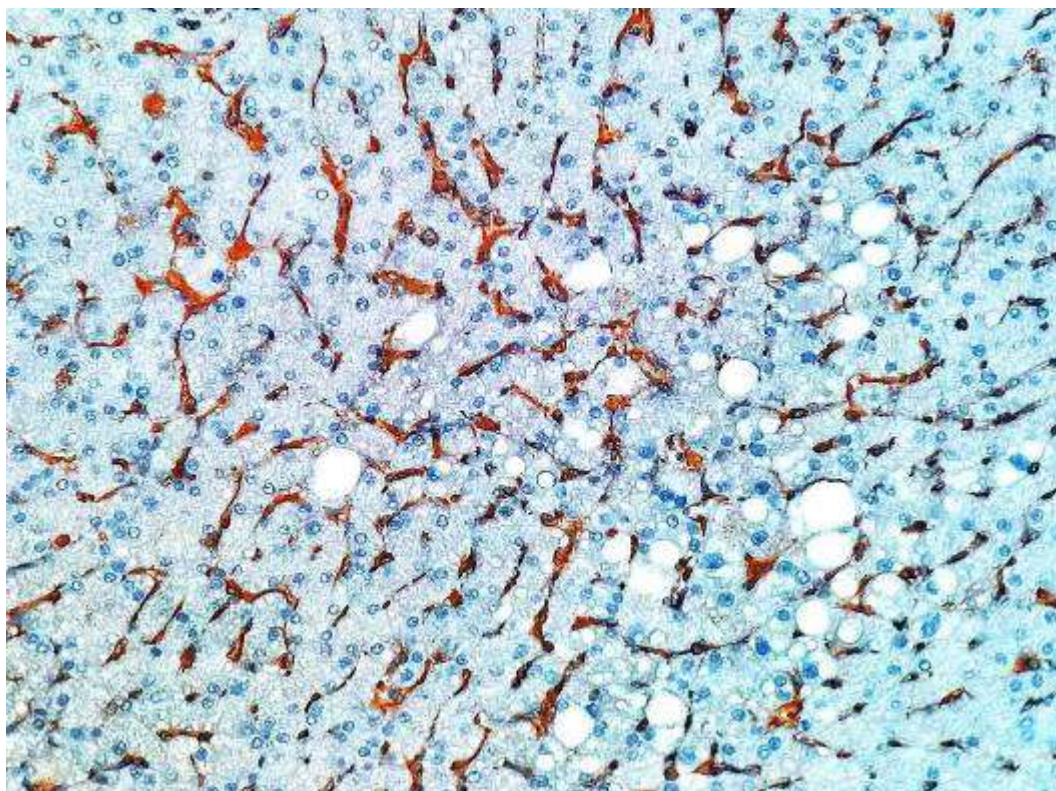


Рисунок 5.8 – Експресія віментину в збільшеній кількості перисинусоїдальних міофібробластів при АСГ. Мо *a-Hu Vimentin, Clone V9*. Зб.: x 200.

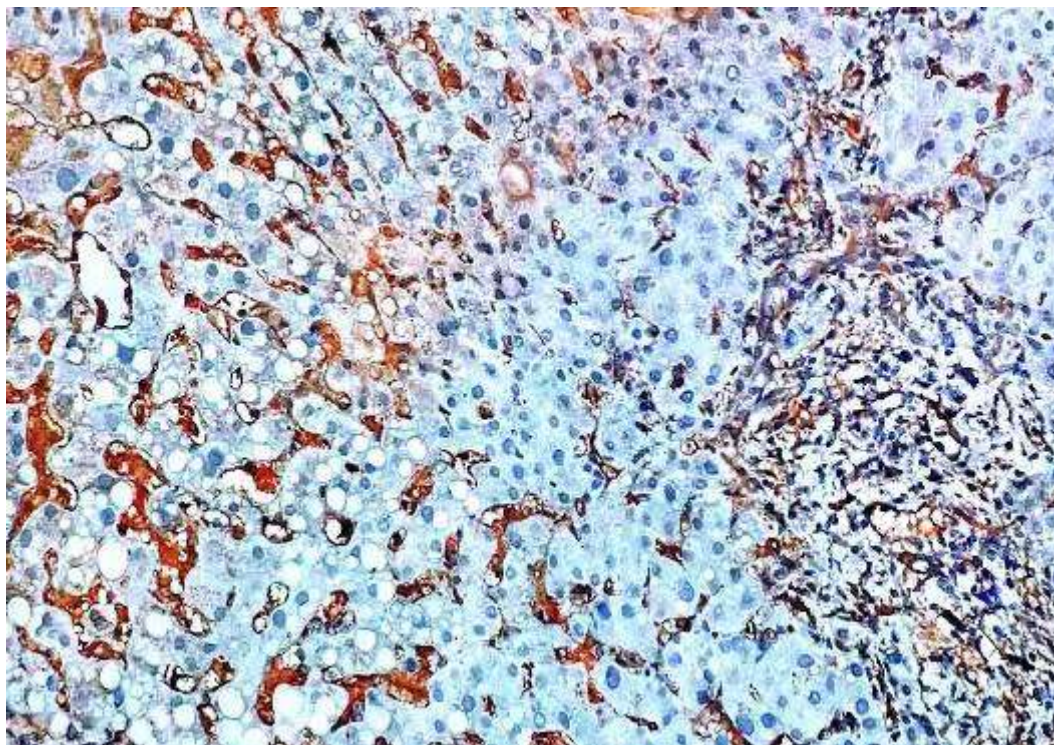


Рисунок 5.9 – Відсутність експресії фасцину в портальних фіброблестах та її наявність в перисинусоїдальних міофіброблестах при НАСГ. Мо *α-Hu Fascin* Ab. Зб.: x 200.

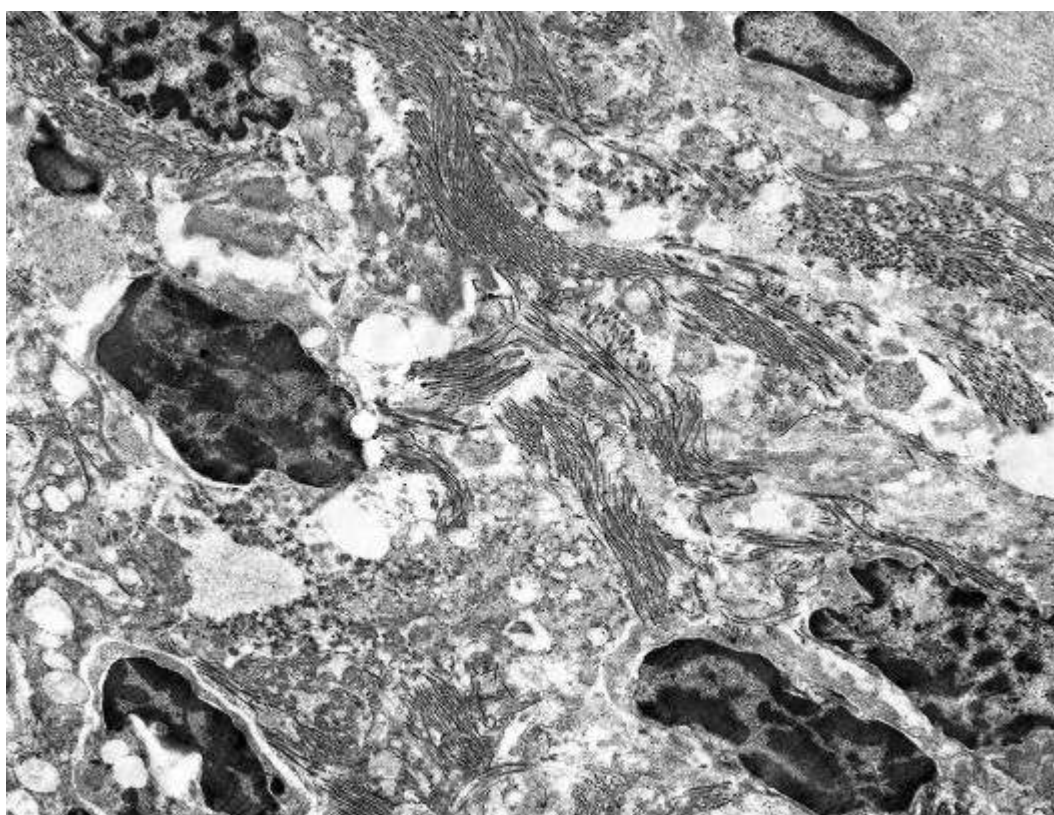


Рисунок 5.10 – Рясні накопичення колагенових волокон між значною кількістю фіброblastів в портальному тракті при АСГ. Електроннограма. Зб.: x 3200.

Патоморфологічний аналіз біопсійно-секційного матеріалу печінки хворих на НАСГ і АСГ показав, що при цих захворюваннях внаслідок ранньої активації нових поколінь фіброгенних клітин печінки розвивається або перисинусоїдально-periцелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз, які прогресують через слабкий F_1 , помірний F_2 і тяжкий F_3 фіброз до F_4 цирозу печінки. Стандартними методиками виявлення фіброзу печінки є забарвлення парафінових зрізів за Ван Гізон і Масон-триколом, для визначення типів колагену, який накопичується в зонах фіброзу, застосовуються ІГХ методики.

Необхідно відзначити, що у хворих на АСГ і на НАСГ при легкому F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки визначається слабе потовщення деяких портальних трактів внаслідок їх фіброзу, а в перипортальній Z_1 зоні в перисинусоїдальних просторах навколо гепатоцитів зі стеатозом виявляються тонкі фрагменти «дротяних ниток» periцелюлярного фіброзу (рис. 5.11). Ці зміни визначаються при забарвленні зрізів за Ван Гізон і Масон-триколом, а також при імпрегнації ретикулінових волокон за Гоморі.

При легкому F_1 перисинусоїдально-periцелюлярному фіброзі печінки у хворих на АСГ і на НАСГ в центролобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зонах печінкових дольок в перисинусоїдальних просторах печінкових дольок зростає кількість активованих перисинусоїдальних зірчастих клітин, що визначаються в препаратах забарвлених методом Масон-триколом, а навколо гепатоцитів зі стеатозом виявляються тонкі фрагменти «дротяних ниток» periцелюлярного фіброзу без суттєвого потовщення і фіброзу портальних трактів (рис. 5.12 А, Б).

За даними ІГХ досліджень у хворих на АСГ і на НАСГ при легкому F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки виявляється помірно підвищена кількість α -SMA-позитивних ФБ в слабо потовщених портальних трактах, а також підвищена чисельність α -SMA-позитивних МФБ в

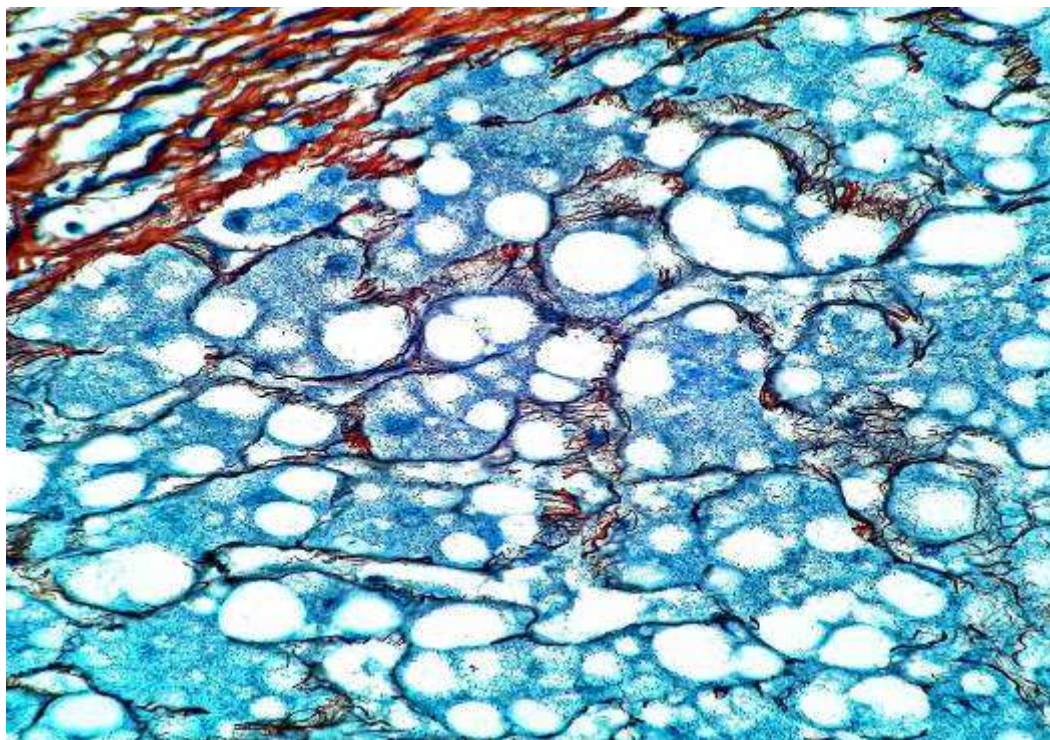


Рисунок 5.11 – Потовщення портального тракту та фрагменти «дротяних ниток» перичелюлярного фіброзу в перипортальній Z_1 зоні при F1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки при НАСГ. Імпрегнація аргірофільних ретикулярних волокон за Гоморі. Зб.: x 400.

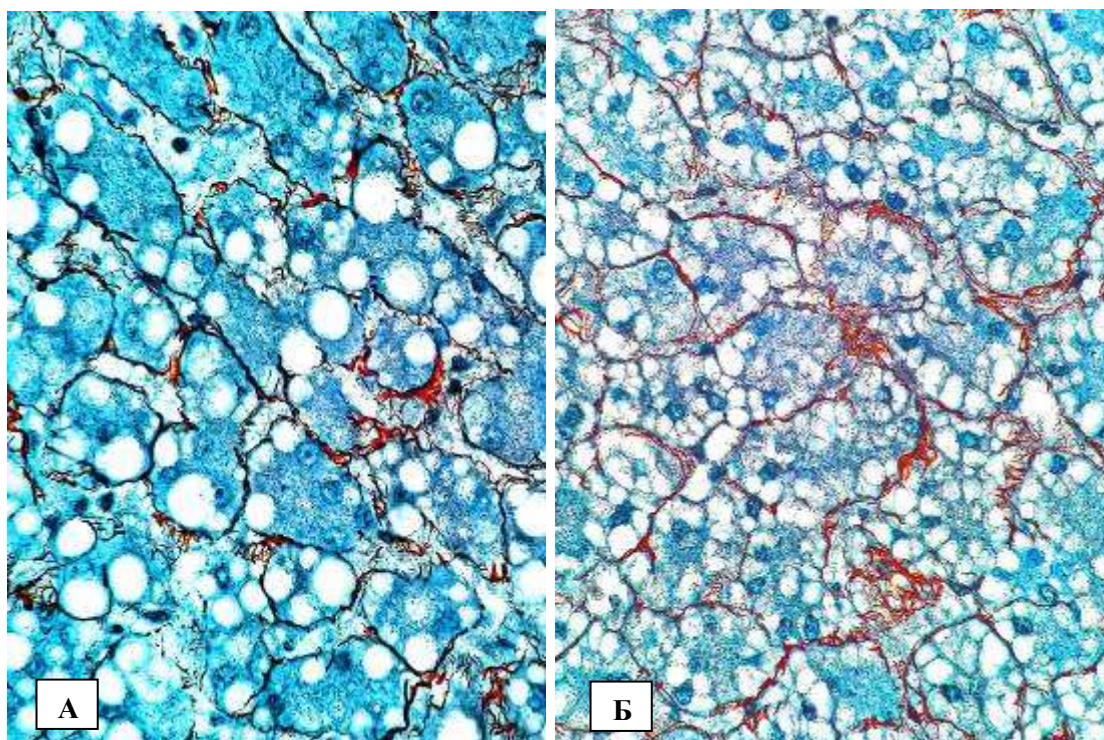


Рисунок 5.12 – Тонкі фрагменти «дротяних ниток» перичелюлярного фіброзу при легкому F1 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі при НАСГ (А) і при АСГ (Б). Імпрегнація аргірофільних ретикулярних волокон за Гоморі. Зб.: x 400.

перисинусоїдальних просторах біля гепатоцитів зі стеатозом в Z_1 зонах печінкових дольок (рис. 5.13); а при легкому F1 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі – помірно підвищена кількість α -SMA-позитивних МФБ в перисинусоїдальних просторах біля гепатоцитів зі стеатозом в централобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зонах печінкових дольок (рис. 5.14).

ІГХ аналіз різних типів колагену показав, що навіть при легкому F1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки у хворих на АСГ і на НАСГ в портальних трактах печінки і в перисинусоїдальних просторах біля гепатоцитів зі стеатозом в Z_1 зонах печінкових дольок визначаються фрагментарні депозити колагену I типу (рис. 5.15), III і IV типу. При легкому F1 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки в перисинусоїдальних просторах Z_1 і Z_2 зон печінкових дольок навколо гепатоцитів зі стеатозом виявляються фрагментарні відкладення колагену I типу (рис. 5.16), III і IV типу, локалізація яких відповідає сегментам перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки.

При помірному F2 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі визначається помірне потовщення портальних трактів внаслідок їх фіброзу, а в перипортальній Z_1 зоні печінкових дольок в перисинусоїдальних просторах навколо гепатоцитів зі стеатозом виявляється тонкі нитки і помірної товщини смуги перичелюлярного фіброзу легкого і помірного ступеню. В деяких випадках виявляються короткі тонкі перипортальні фіброзні септи, спрямовані від портальних трактів в Z_3 зони печінкових дольок.

При помірному F2 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі переважно в централобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зоні печінкових дольок в 20-30 % перисинусоїдальних просторів біля окремих гепатоцитів або навколо груп гепатоцитів зі стеатозом визначаються помірно потовщені смуги перичелюлярного фіброзу, які мають велику довжину. Інколи помірний перичелюлярний фіброз охоплює групи гепатоцитів зі стеатозом, створюючи і феномен вогнищевого помірного перичелюлярного фіброзу.

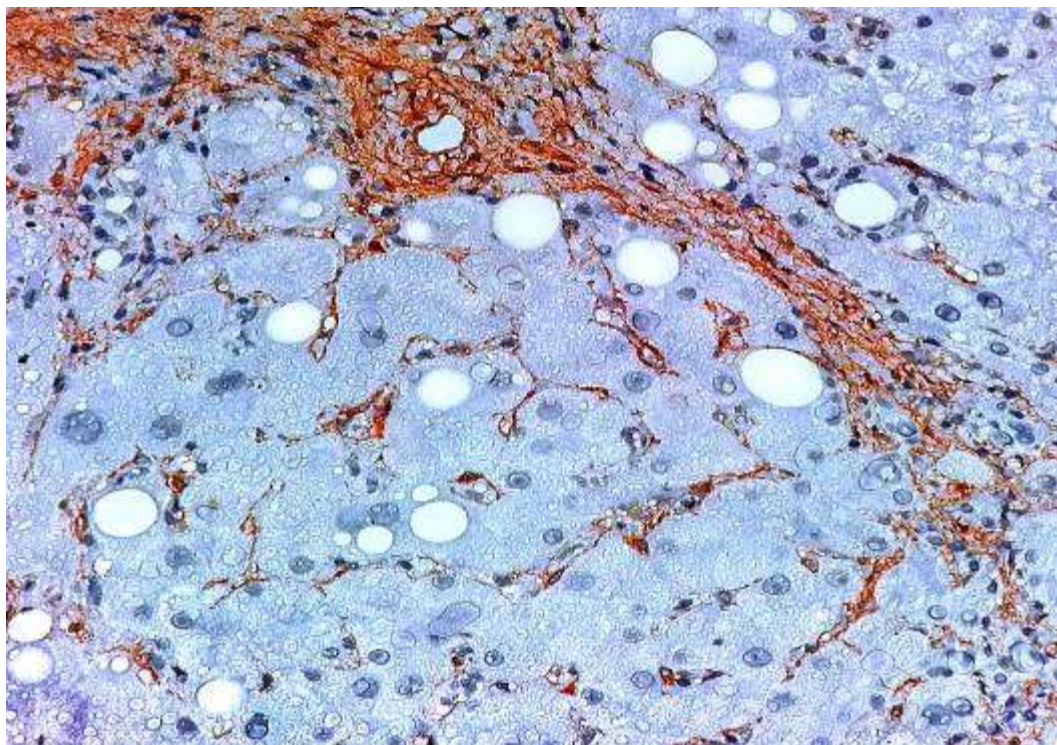


Рисунок 5.13 – Помірно підвищена кількість α -SMA+ ФБ в порталному тракті і α -SMA+ МФБ в перисинусоїдальних просторах Z_1 зони дольки печінки при легкому F1 портално- Z_3 перисинусоїдальному фіброзі при НАСГ. *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. Зб.: x 400.

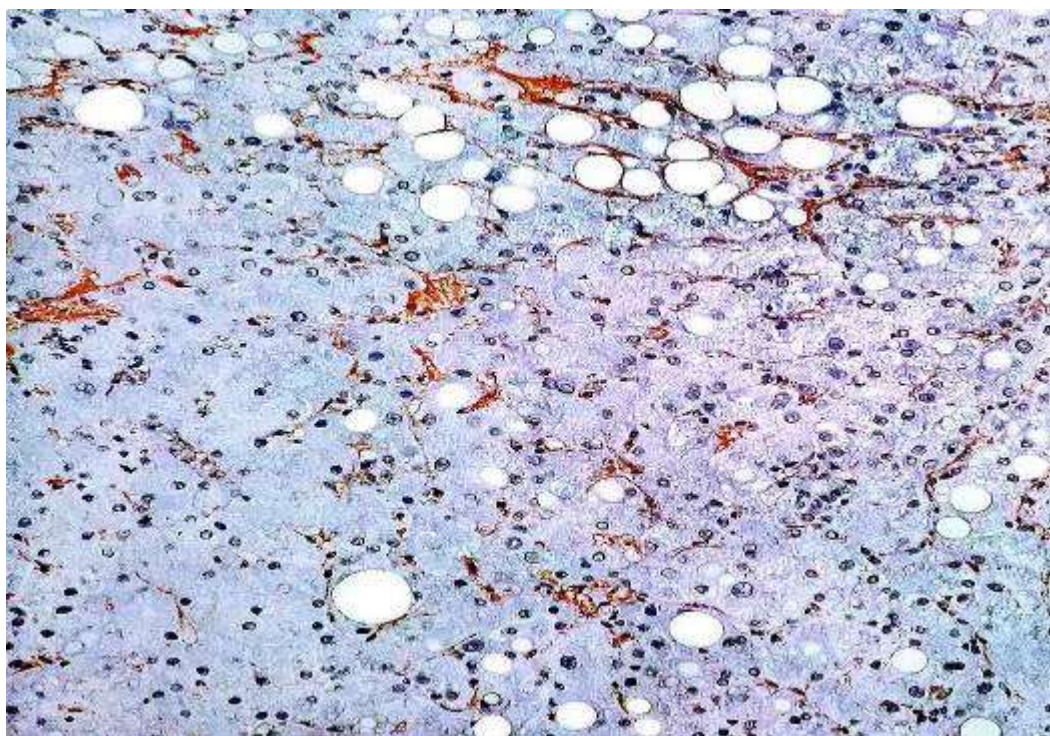


Рисунок 5.14 – Помірно підвищена кількість α -SMA+ МФБ в перисинусоїдальних просторах Z_2 зони печінкової дольки при легкому F1 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі при НАСГ. *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. Зб.: x 200.

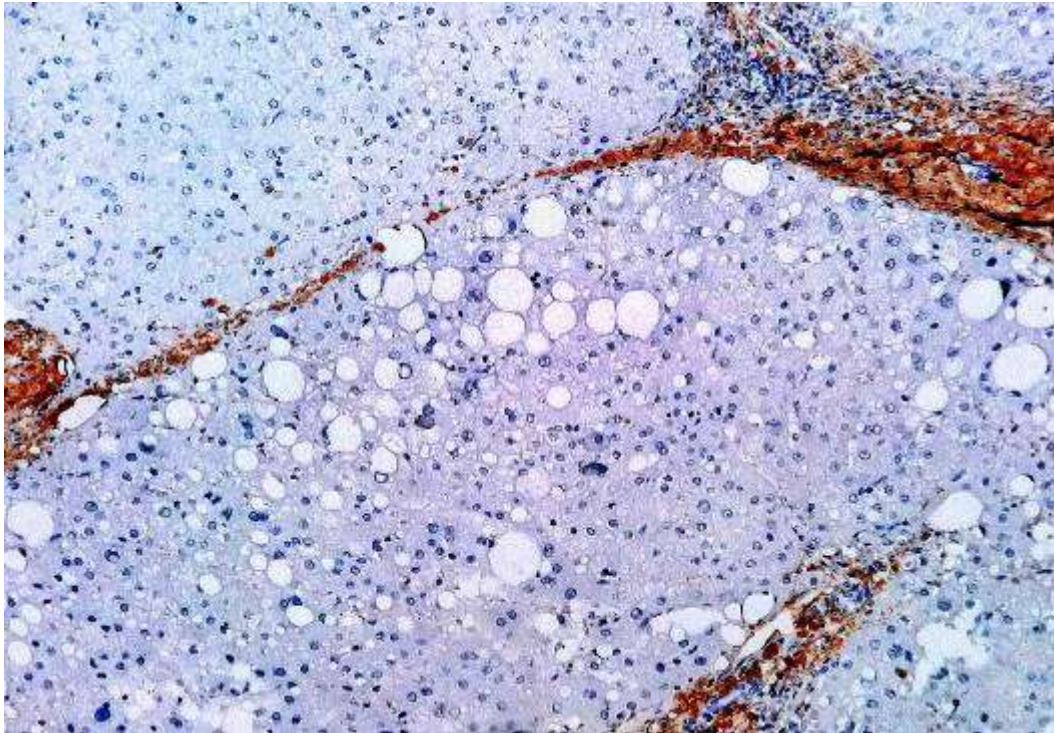


Рисунок 5.15 – Фрагментарні депозити колагену I типу в портальному тракті і в Z_1 перисинусоїдальних просторах печінки при легкому F1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі при АСГ. *Rb α -Hu Collagen type I, clone RAH C11-0,1*. Зб.: x 200.

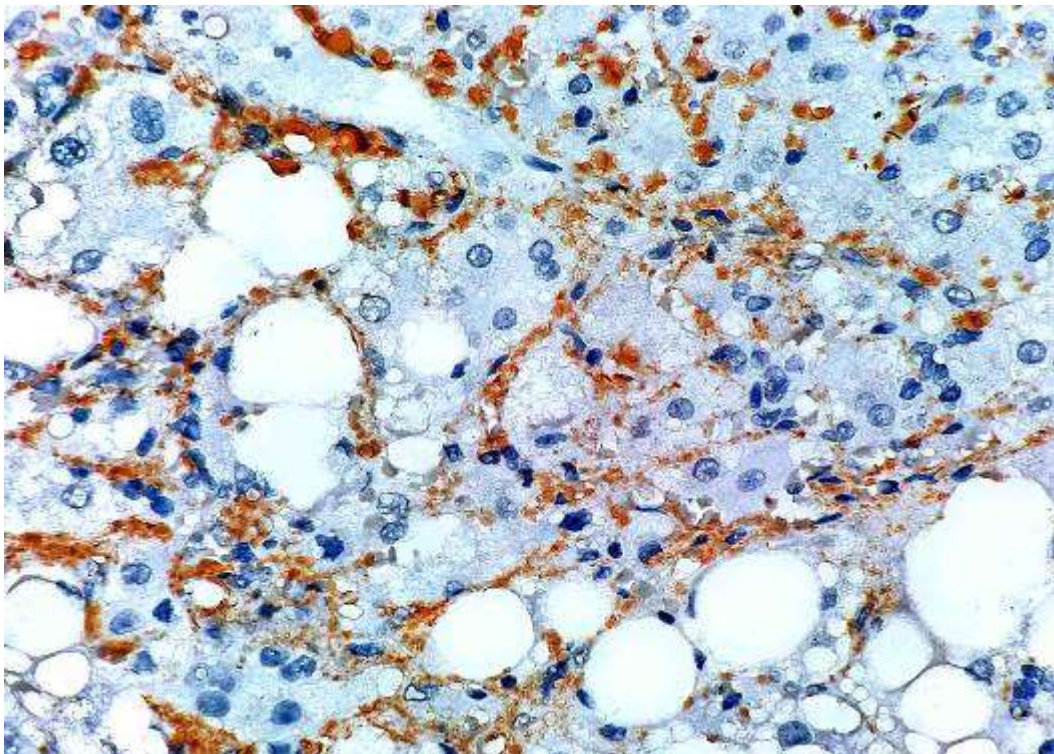


Рисунок 5.16 – Фрагментарні депозити колагену I типу в Z_3 перисинусоїдальних просторах печінки при легкому F1 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі при НАСГ. *Rb α -Hu Collagen type I, clone RAH C11-0,1*. Зб.: x 500.

При тяжкому F3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі у хворих на АСГ і на НАСГ в парафінових зрізах печінки, забарвлених методом Масон-трикоколор, визначається значне потовщення фіброзно змінених портальних трактів, а також потовщені смуги перицелюлярного фіброзу навколо гепатоцитів зі стеатозом в перипортальній Z_1 зоні печінкових дольок (рис. 5.17А). Нерідко визначається наявність помірно потовщених портально-портальних фіброзних септ (рис. 5.17Б), а також потовщених перипортальних фіброзних септ, які зливаються з перицелюлярним фіброзом в Z_1 зоні печінкових дольок (рис. 5.18А), а перицелюлярний фіброз розповсюджується по перисинусоїдальних просторах в проміжній Z_2 зони печінкових дольок.

При тяжкому F3 перисинусоїдально-перицелюлярному фіброзі у хворих на АСГ і на НАСГ в централобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зоні печінкових дольок значно потовщені смуги фіброзу охоплюють майже всі одиничні гепатоцити зі стеатозом або групи гепатоцитів зі стеатозом (рис. 5.18Б). Такі зміни визначаються в парафіновій зрізах печінки, забавлених за Ван Гізон і методом Масон-трикоколор. Нерідко потовщені смуги тяжкого перицелюлярного фіброзу розповсюджуються по перисинусоїдальних просторах в перипортальну Z_1 зону дольок печінки.

За даними ІГХ досліджень у хворих на АСГ і на НАСГ при тяжкому F3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки в значно потовщених портальних трактах спостерігається значно підвищена чисельність α -SMA-позитивних фібробластів, а також значно підвищена чисельність α -SMA-позитивних міофібробластів в перисинусоїдальних просторах в Z_1 зонах печінкових дольок (рис. 5.19А). При ІГХ аналізі при тяжкому F3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки у хворих на АСГ і на НАСГ виявляється дуже значне депонування колагену IV типу (рис.5.19Б), III типу (рис. 5.20А) і I типу (рис. 5.20Б) в потовщених портальних трактах і в перисинусоїдальних просторах Z_1 зон дольок печінки.

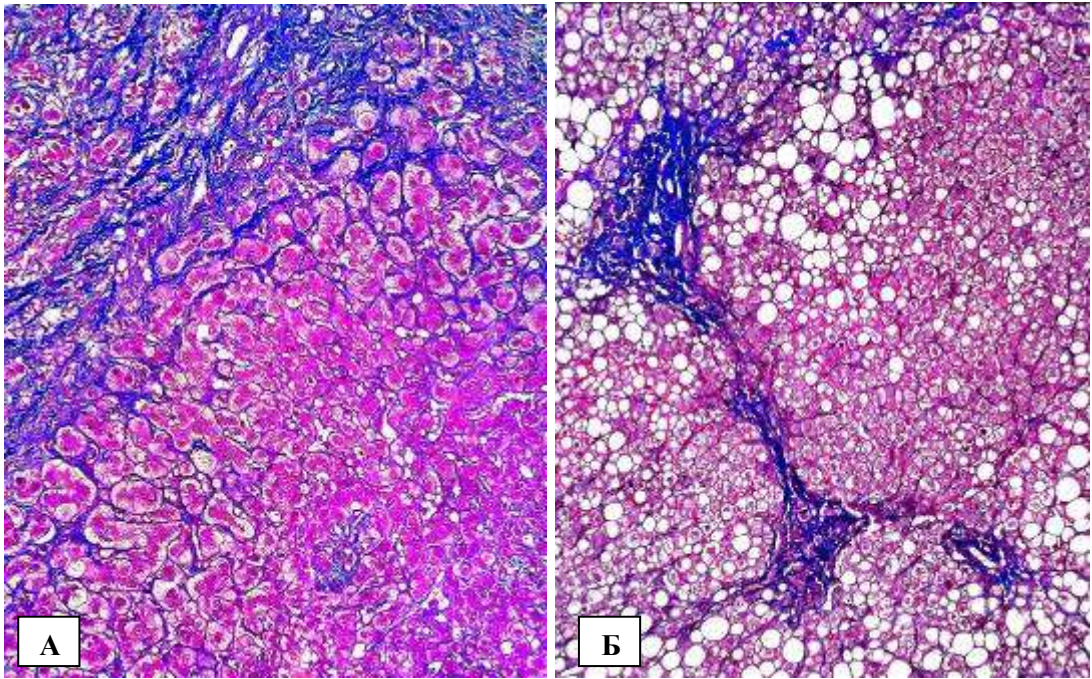


Рисунок 5.17 – Тяжкий F_3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз при АСГ. Значний фіброз і потовщення портального тракту та перицелюлярний фіброз в перипортальній Z_1 зоні (А). Потовщена портально-портальна фіброзна септа. Забарвлення Масон-трихром. Зб.: А і Б x 200.

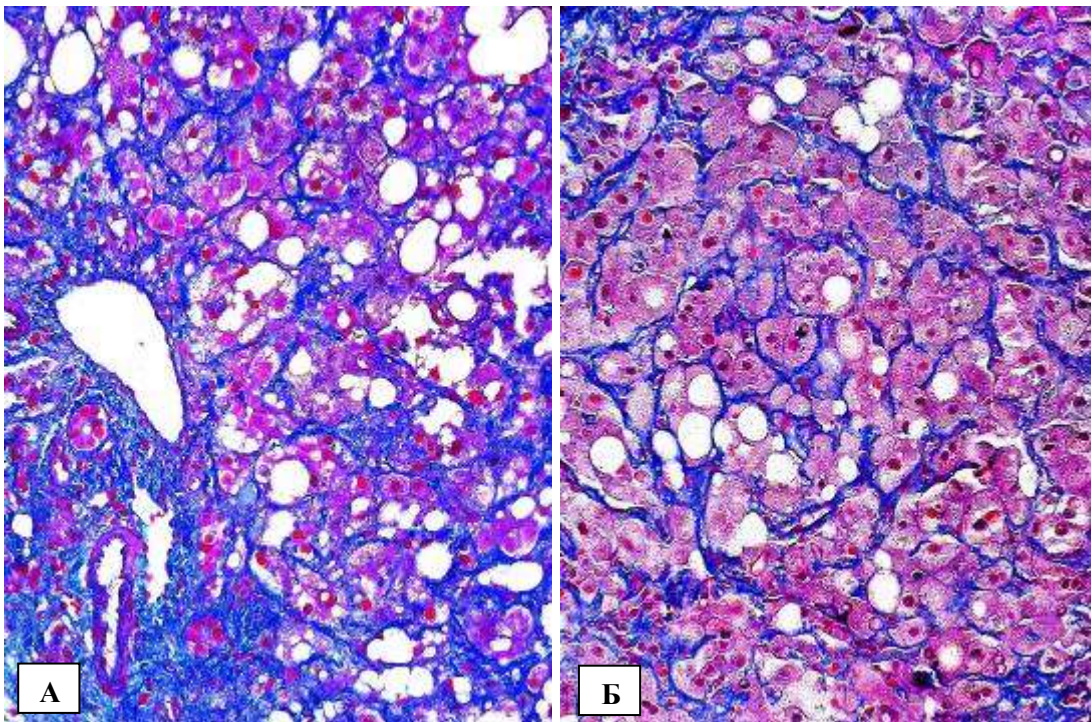


Рисунок 5.18 – Тяжкий F_3 фіброз при НАСГ. Потовщені перипортальні фіброзні септи, які зливаються з перицелюлярним фіброзом в Z_1 зоні при портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі (А). Потовщені смуги перисинусоїдально-перицелюлярного фіброзу (Б) Забарвлення Масон-трихром. Зб.: А і Б x 400.

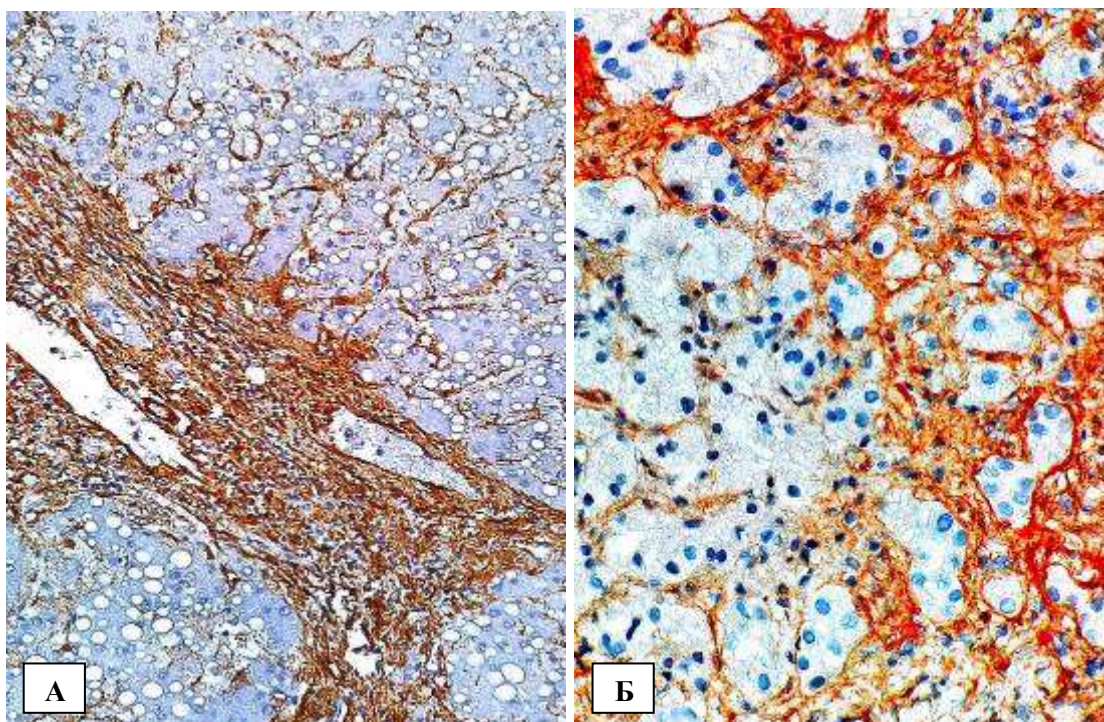


Рисунок 5.19 – Тяжкий F_3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз при АСГ. Значно підвищена кількість α -SMA+ ФБ в портальному тракті і α -SMA+ МФБ в Z_1 зоні печінки (А). Значне депонування колагену IV типу в Z_1 зоні печінки. А- Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. Б- Мо *a-Hu Collagen type IV Ab-3, clone CIV 22 + PHM 12. 3б*.: А x 200, Б - x 400.

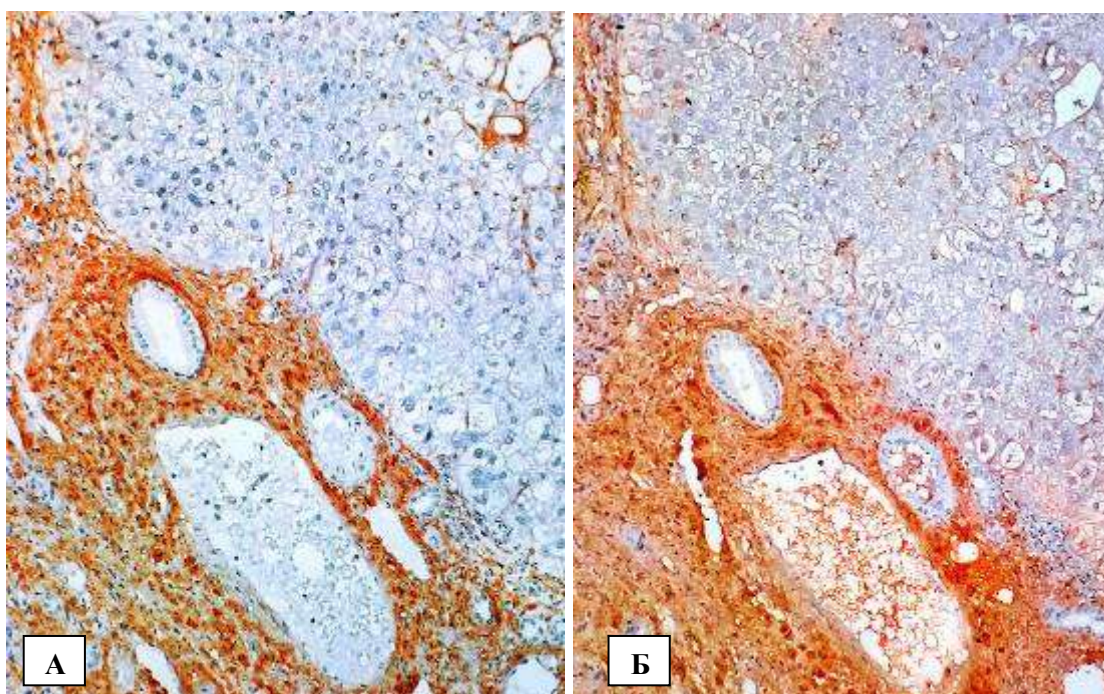


Рисунок 5.20 – Тяжкий F_3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз при АСГ. Значне депонування колагену III типу (А) і I типу (Б) в потовщеному портальному тракті печінки. А-*Rb a-Hu Collagen type III, Clone RAH C33*. Б - *Rb a-Hu Collagen type I, clone RAH C11-0,1. 3б*.: А і Б x 200.

При тяжкому F3 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі в потовщених перисинусоїдальних просторах Z_3 і Z_2 зон печінкових дольок навколо гепатоцитів зі стеатозом або груп гепатоцитів зі стеатозом реєструється збільшена кількість α -SMA-позитивних міофібробластів. При тяжкому F3 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки у хворих на НАСГ і АСГ в потовщених і розширених перисинусоїдальних просторах навколо гепатоцитів зі стеатозом в Z_1 , в Z_2 і в Z_3 зонах печінкових дольок виявляється дуже значне депонування колагену I типу, III типу (рис. 5.21А) і IV типу (рис. 5.21Б).

Крім цього, у хворих на НАСГ і АСГ при тяжкому F3 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки в потовщених і розширених перисинусоїдальних просторах печінки навколо гепатоцитів зі стеатозом у всіх зонах печінкових дольок визначається підвищена експресія віментину (рис. 5.22А) і фасцину (рис. 5.22Б), а при тяжкому F3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі печінки в значно потовщених портальних трактах виявляється підвищена експресія віментину в міжклітинному матриксі трактів (рис. 5.23), а також підвищена кількість еластину (рис. 5.24).

Подальший розвиток фіброзу печінки у хворих на НАСГ і АСГ може мати два паралельні шляхи – це поширення перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу в напрямку портального тракту з одночасним значним фіброзом портальних трактів, а також прогресування портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу у вигляді перичелюлярного фіброзу в напрямку централобулярних вен. При тяжкому F4 гепатофіброзі у хворих на НАСГ і АСГ, крім наявності перичелюлярного фіброзу, прогресує портальний фіброз, а потовщені портально-портальні фіброзні септи формують псевдодольки мікронодулярного цирозу печінки, який завжди комбінується з тяжким перичелюлярним фіброзом.

Серед 198 хворих на НАСГ в трепанобіоптатах печінки легкий F₁ фіброз виявлено у 25 (12,62 %) пацієнтів, помірний F₂ фіброз - у 49 (24,74 %)

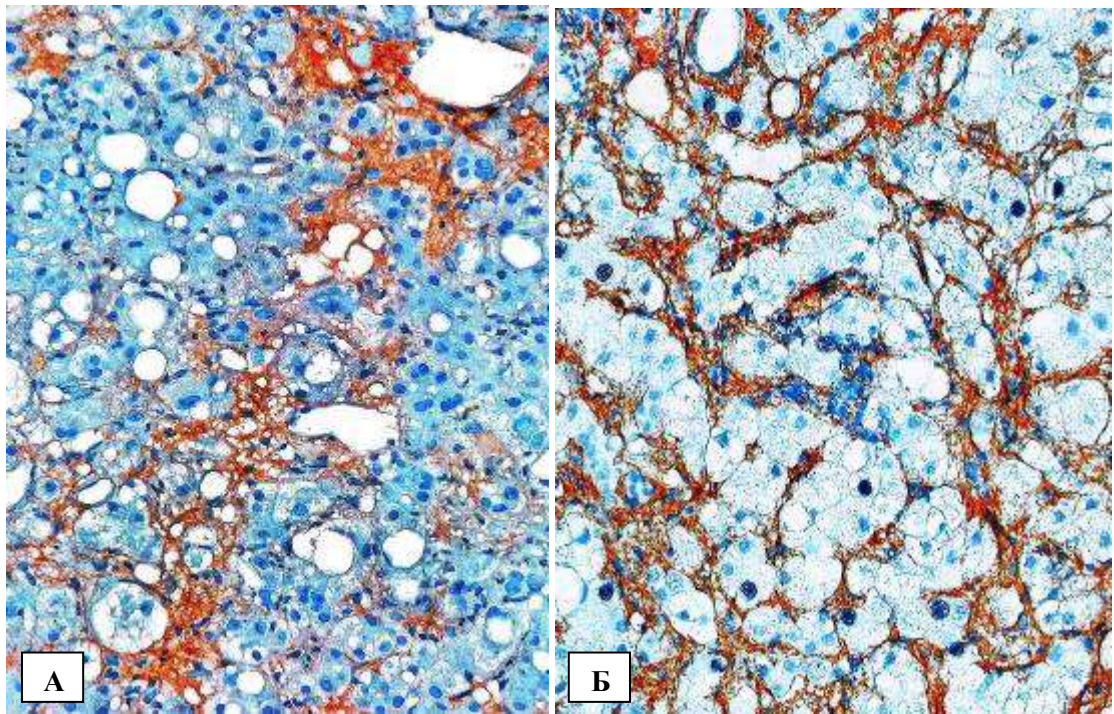


Рисунок 5.21 – Значне депонування колагену III типу при НАСГ (А) і IV типу при АСГ (Б) в потовщених і розширених Z_3 перисинусоїдальних просторах при важкому F3 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки. А- *Rb α -Hu Collagen type III, Clone RAH C33*. Б- *Mo α -Hu Collagen type IV Ab-3, clone CIV 22 + PHM 12*. 36.: А і Б: x 200.

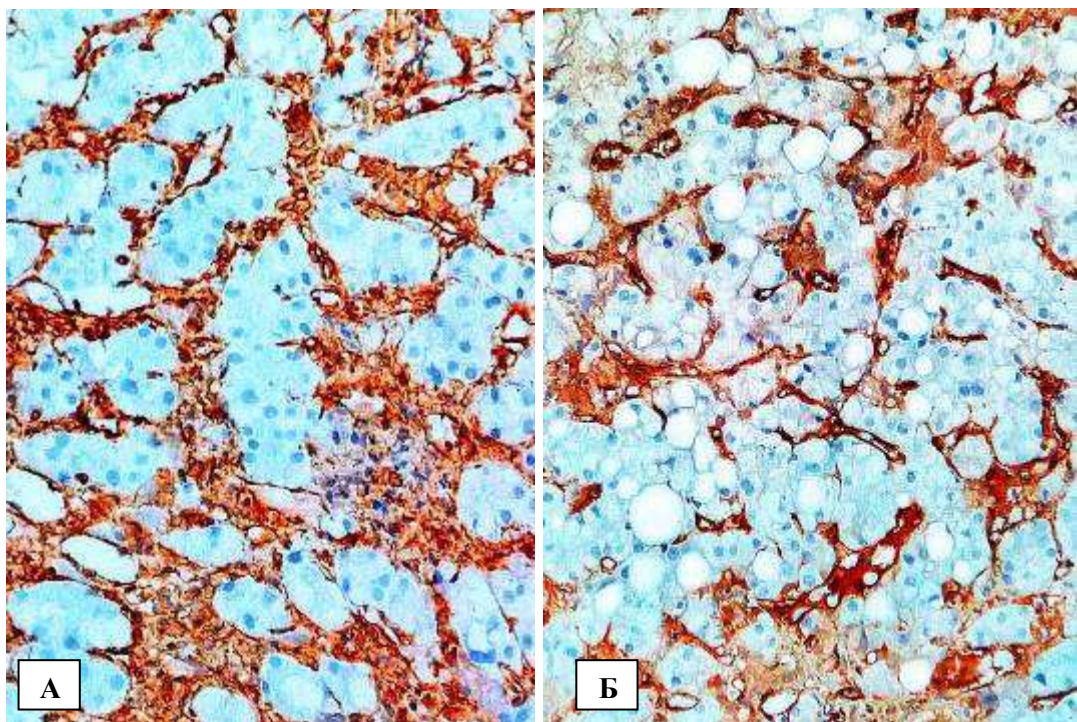


Рисунок 5.22 – Значна експресія віментину (А) і фасцину (Б) в перисинусоїдальних просторах при тяжкому F3 перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки при НАСГ. А-*Mo α -Hu Vimentin, Clone V9*. Б- *Mo α -Hu Fascin Ab 36*.: А і Б x 200.

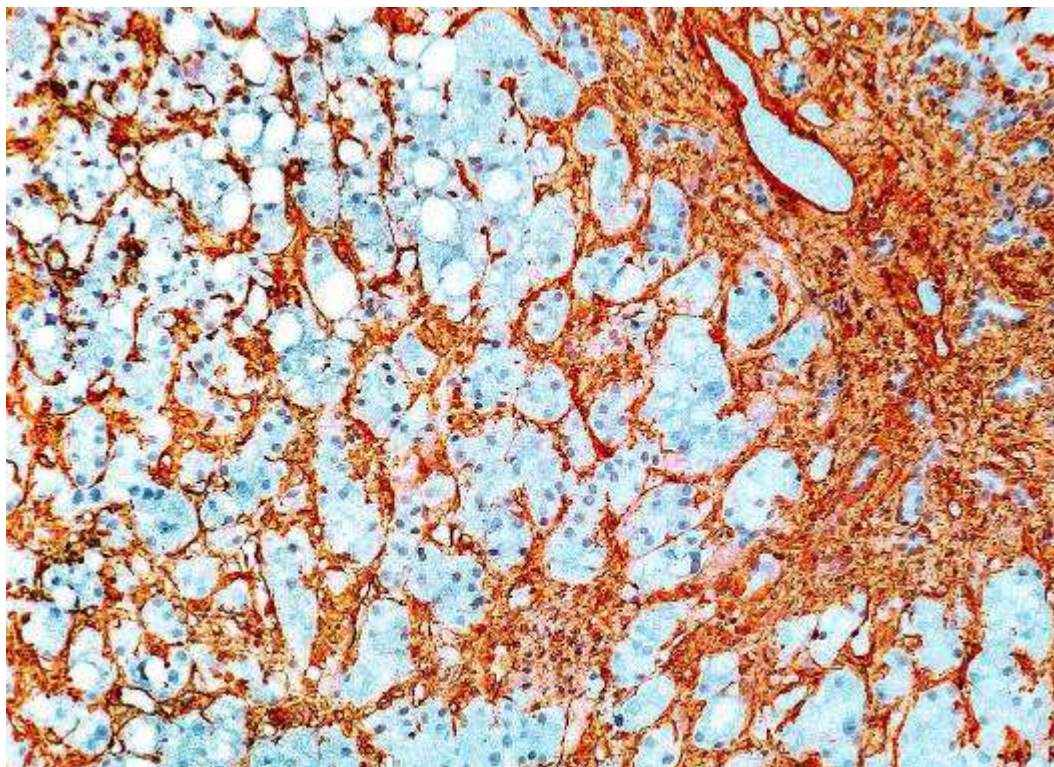


Рисунок 5.23 – Значна експресія віментину в портальному тракті і в перисинусоїдальних просторах при F3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі при НАСГ. Мо *a-Hu Vimentin, Clone V9*. Зб.: x 200.

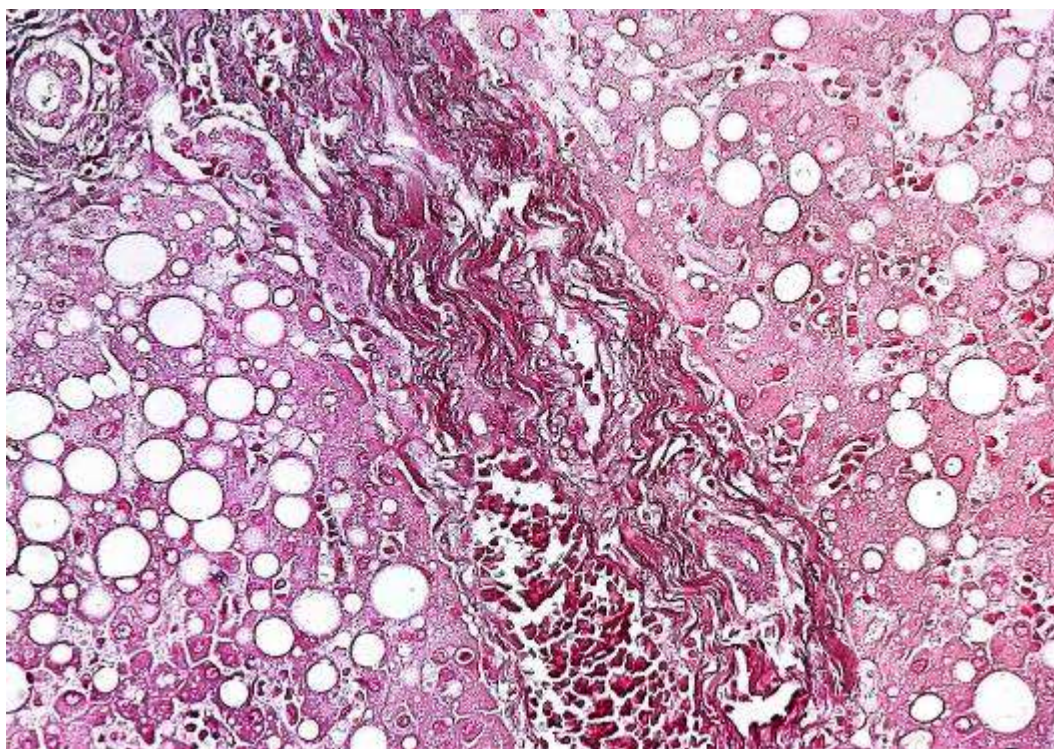


Рисунок 5.24 – Підвищена кількість еластину в потовщеному портальному тракті при F3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі при НАСГ. Метод Унна-Тенцера. Зб.: x 400.

хворих, тяжкий F₃ фіброз - у 22 (11, 12 %) хворих, мікронодулярний цироз печінки перисинусоїдально-перичелюлярного типу виявлено у 23 (11,61 %) хворих, а мікронодулярний цироз портально-Z₁₋₃перисинусоїдального типу - у 30 (15,17 %) хворих. У 49 (24,74 %) хворих на НАСГ в трепанобіоптатах печінки діагностовано стеатоз гепатоцитів різного ступеня тяжкості, без наявності фіброзу F₀ печінки. В біопсійно-секційному матеріалі 79 хворих на АСГ легкий F₁ фіброз печінки був виявлений в 19 (24,05 %) спостереженнях, помірний F₂ фіброз - в 20 (25,31 %) спостереженнях, тяжкий F₃ фіброз - в 9 (11,39 %) спостереженнях, мікронодулярний цироз печінки перисинусоїдально-перичелюлярного типу виявлено в 10 (12,65 %) випадках, а мікронодулярний цироз печінки портально-Z₁₋₃перисинусоїдального типу - у 21 (26,60 %) спостереженні.

Важливо відмітити, що у хворих на НАСГ і АСГ ступінь тяжкості фіброзу печінки не корелює зі ступенем тяжкості стеатозу печінки. Більш лабільним показником активації хвороби в біоптатах печінки є стеатоз печінки різного ступеня, тому що стеатоз печінки від S₁ до S₃ ступеня спостерігається у хворих зі слабким F₁ фіброзом, з помірним F₂ фіброзом і з тяжким F₃ фіброзом печінки. Найбільш стабільним показником тривалості і тяжкості стеатогепатиту у хворих на НАСГ і АСГ є динамічне прогресування фіброзу печінки через слабкий F₁, помірний F₂ і тяжкий F₃ фіброз до F₄ цирозу печінки. Для кількісного визначення динаміки накопичення сполучної тканини та депонування різного колагену в печінці при перисинусоїдально-перичелюлярному і портально-Z₁₋₃перисинусоїдальному фіброзі в біоптатах печінки хворих на НАСГ з F₁, F₂ F₃ фіброзом і F₄ цирозом печінки виконана порівняльна ФЦММ накопичення Масон-триколор-позитивної сполучної тканини, а також площі розповсюдження α-SMA-позитивних клітин та площі депонування колагену I, III і IV типу у відповідних ІГХ мікропрепаратах.

Кількісний аналіз динаміки накопичення Масон-триколот-позитивної сполучної тканини при фіброзі в печінки показав наступні результати. За даними ФЦММ у хворих на НАСГ медіана площі перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу легкого F_1 ступеня становить 12,05 (11,01; 13,97) % СПГЗП, що більш ніж в 10 разів перевищує площу фрагментарного фіброзу в перисинусоїдальних просторах печінки у пацієнтів, які не страждали на стеатогепатит. Медіана площі помірного F_2 перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки дорівнює 17,50 (16,00; 20,65) % СПГЗП, медіана площі важкого F_3 перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки становить 23,54 (19,12; 26,47) % СПГЗП, а медіана площі вкрай важкого F_4 перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки складає 29,18 (26,93; 30,65) % СПГЗП (рис. 5.25А). Збільшення площі перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки по мірі зростання ступеня його тяжкості є статистично достовірним ($H = 88,70$ $p < 0,05$).

Еволюція портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки і хворих на НАСГ має наступну динаміку. При легкому F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі медіана площі фіброзно змінених, незначно потовщених портальних трактів і перисинусоїдальних просторів Z_1 зон печінкових дольок становить 20,27 (18,49; 21,44) % СПГЗП, що більш ніж на 60% перевищує аналогічні параметри у пацієнтів контрольної групи. Медіана площі помірного F_2 портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу становить 22,31 (20,13; 23,47) % СПГЗП, важкого F_3 аналогічного фіброзу - 23,93 (20,96; 27,70) % СПГЗП; при F_4 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі / цирозі печінки медіана площі портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу зростає і дорівнює 29,38 (27,12; 30,89) % СПГЗП (рис. 5.25Б). За даними ФЦММ збільшення площі портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки при зростанні ступеня його тяжкості від F_1 до F_4 є статистично достовірним ($H = 76,56$ $p < 0,05$), але різниця між медіанами помірного F_2 і важкого F_3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки не достовірна.

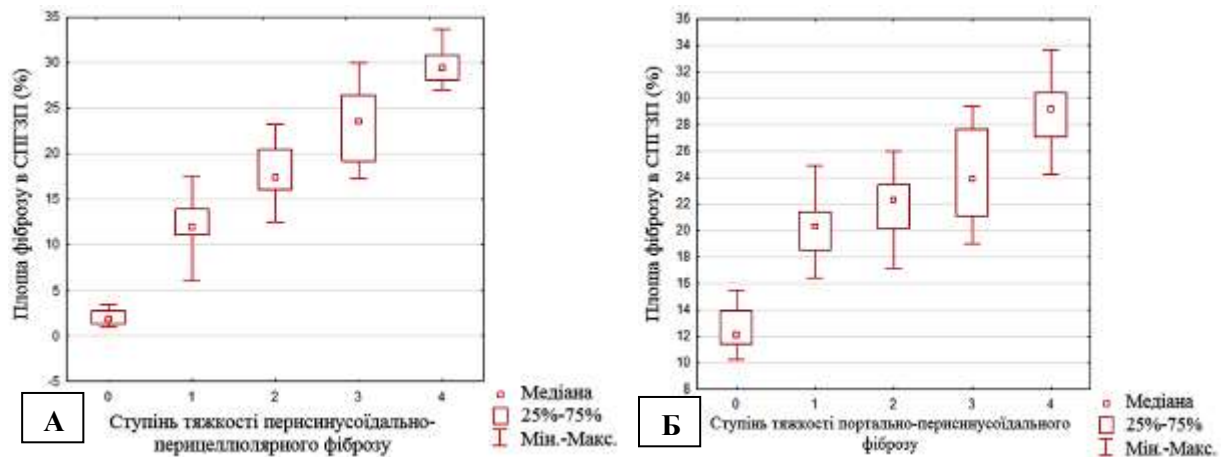


Рисунок 5.25 – Порівняння площі перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки (А) і площі портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки (Б), що визначається методом Массон-триколов в % СПГЗП, при легкому F_1 фіброзі, помірному F_2 , тяжкому F_3 фіброзі і вкрай тяжкому F_4 фіброзі / цирозі печінки у хворих на неалкогольний стеатогепатит.

Проведені ФЦММ і ІГХ дослідження показали, що по мірі зростання ступеня тяжкості гепатофіброзу від F_1 до F_4 в печінці хворих стеатогепатитом визначається також зростання площі поширення α SMA-позитивних міофібробластів. У хворих на НАСГ з перисинусоїдально-перичелюлярним фіброзом печінки легкого F_1 ступеня медіана площі α SMA+ МФБ становить 8,39 (7,96; 9,40) % СПГЗП, при перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі помірного F_2 ступеня медіана площі α SMA+ ПЗК дорівнює 11,40 (10,44; 12,42) % СПГЗП, при тяжкому F_3 фіброзі вона зростає до 18,46 (17,53; 19,22) % СПГЗП, а в групі F_4 фіброз / цироз печінки перисинусоїдального типу медіана площі α SMA+ ПЗК сягає 19,79 (18,20; 21,07) % СПГЗП (рис.5.26А). Збільшення площі, займаній в дольках α SMA+ МФБ, по мірі прогресування перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу від F_1 до F_4 є достовірним ($N = 45,12$; $p < 0,05$).

У хворих на НАСГ з портально- Z_{1-3} перисинусоїдальним фіброзом печінки легкого F_1 ступеня медіана площі портальних МФБ і α SMA+ ПЗК Z_1 зон печінкових дольок становить 10,95 (10,09; 11,81) % СПГЗП, при помітному F_2 ступеню - підвищується до 12,22 (11,41; 14,58) % СПГЗП, при

тяжкому F₃ аналогічному фіброзі печінки - збільшується до 19,79 (18,44; 21,05) % СПГЗП, а при вкрай тяжкому F₄ фіброзі /цирозі печінки досягає 20,24 (18,64; 22,48) % СПГЗП (рис.5.26Б).

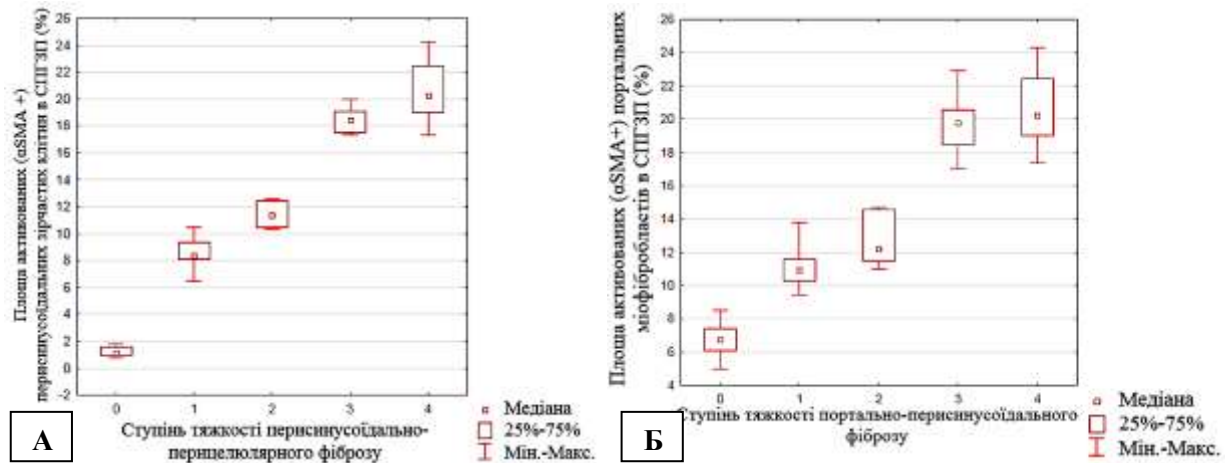


Рисунок 5.26 – Порівняння площі перисинусоїдальних αSMA+ міофібробластів печінки при перисинусоїдально-періцелюлярному фіброзі (А) та αSMA+ портальних фібробластів і перисинусоїдальних αSMA+ міофібробластів Z₁₋₃ зонах при портально Z₁₋₃ перисинусоїдальному фіброзі (Б) в % СПГЗП при легкому F₁, помірному F₂, тяжкому F₃ і вкрай тяжкому F₄ фіброзі у хворих на неалкогольний стеатогепатит.

Прогресування портально-Z₁₋₃перисинусоїдального фіброзу печінки від F₁ до F₄ ступеня у хворих НАСГ відбувається за рахунок активованих портальних ФБ і перисинусоїдальних МФБ Z₁ зон печінкових дольок, що займають в цих структурах печінки достовірно більшу площу (N = 43,18; p < 0,05). В той же час, достовірна різниця між площами, займаними αSMA-позитивними фіброгенними клітинами при F₁ і F₂ портально-Z₁₋₃перисинусоїдальному фіброзі печінки, відсутня. Це може свідчити про те, що при зростанні тяжкості портально-Z₁₋₃перисинусоїдального фіброзу від F₁ до F₂ відбувається не стільки збільшення числа активованих αSMA-позитивних клітин, а, найімовірніше, посилення синтезу ними колагену і інших молекул позаклітинного матриксу в зонах фіброзу.

За результатами ФЦММ досліджень встановлено, що по мірі зростання площі фіброзу, що виявляється методом Массон-триколом, в печінці зростає

не тільки площа поширення α SMA-позитивних фіброгенних клітин, але також зростає площа колагену I, III і IV типу, депонованого в зонах фіброзу.

При ІГХ і ФЦММ аналізі гепатобіоптатів пацієнтів контрольної групи, які не страждали на НАСГ і не мали фіброзу печінки, фрагменти фібрилярного колагену I і III типа виявляються в інтерстиції портальних трактів, а також в стінках централобулярних вен печінки; точкова експресія колагену III типу визначається в перисинусоїдальних просторах. Експресія колагену IV типу спостерігається в стінках вен, артерій і жовчних протоках в портальних трактах, точково-лінійна експресія цього колагену облямовує перисинусоїдальні простори печінкових дольок. В перисинусоїдальних просторах печінкових дольок 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. У портальних трактах печінки пацієнтів контрольної групи, що не страждали НАСГ і не мали фіброзу печінки, 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.

У хворих на НАСГ при слабкому F₁ перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки депонований в перисинусоїдальних просторах колаген I типу займає площу, що становить 10,47 (9,68; 11,09) % СПГЗП, при помірному F₂ перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі печінки депонований колаген I типу займає площу, що дорівнює 17,34 (10,88; 21,80) % СПГЗП, при тяжкому F₃ фіброзі колаген I типу займає площу, що складає 20,62 (20,00; 20,97) % СПГЗП, а в групі з F₄ фіброз / цироз печінки перичелюлярного типу колаген I типу займає площу, що сягає 24,03 (23,34; 24,49) % СПГЗП (рис. 5.27). Встановлено, що при прогресуванні тяжкості перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу від F₁ до F₄ в дольках печінки хворих на НАСГ достовірно збільшується площа депонування колагену I типу перисинусоїдально-перичелюлярної локалізації (H = 42,60; p < 0,05).

У хворих на НАСГ з легким F₁ перисинусоїдально-перичелюлярним фіброзом печінки, депонований в перисинусоїдальних просторах колаген III типу займає площу, яка становить 11,29 (9,59; 19,71) % СПГЗП, що більш ніж в 10 разів вище в порівнянні з аналогічними показниками пацієнтів контрольної групи. Але в подальшому, по мірі зростання ступеня тяжкості фіброзу від F₂ до F₄ депонування колагену III типу в перисинусоїдальних просторах печінкових дольок поступово знижується (N = 26,68; p < 0,05). Так у хворих з помірним F₂ перисинусоїдально-перичелюлярним фіброзом цей колаген в перисинусоїдальних просторах займає площу, рівну 17,07 (15,22; 18,58) % СПГЗП, а при важкому F₃ перисинусоїдально-перичелюлярному фіброзі – займає площу, що становить 14,58 (13,57; 16,60) % СПГЗП, в групі F₄ фіброз-цироз площа колагену III складає 14,11 (13,35; 14,54) % СПГЗП (рис. 5.27). Незважаючи на відносне зниження депонування колагену III типу і стабілізацію його депонування при цирозі печінки перисинусоїдального типу на рівні 14,11 (13,35; 14,54)% СПГЗП, площа депонування колагену III типу при цирозі печінки в 14 раз вище, ніж у пацієнтів групи контролю.

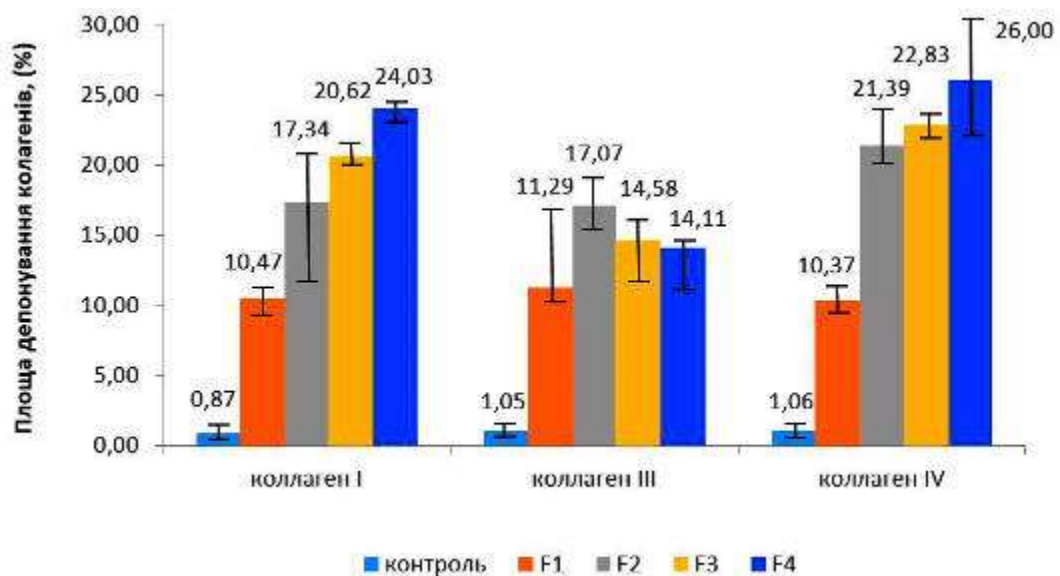


Рисунок 5.27 – Медіана площі депонування колагену I, III і IV типу в залежності від ступеня тяжкості перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки у хворих на неалкогольний стеатогепатит.

Результати виконаного ІГХ і ЦМФМ аналізу свідчать про те, що в печінці хворих на НАСГ по мірі прогресування перисинусоїдально-перицелюлярного фіброзу від легкого F_1 , до помірного F_2 і тяжкого F_3 фіброзу і F_4 фіброзу-цирозу в зонах фіброзу також зростає депонування колагену IV типу. Встановлено, що медіана площі депонування колагену IV типу в перисинусоїдальних просторах печінки у хворих НАСГ зі слабким F_1 фіброзом складає 10,37 (9,52; 10,74) % СПГЗП, що в 10 разів вище, ніж в печінці пацієнтів групи умовного контролю. При помірному F_2 фіброзі медіана площі депонування колагену IV типу перисинусоїдально-перицелюлярної локалізації збільшується до 21,39 (20,13; 23,35) % СПГЗП, при тяжкому F_3 фіброзі - зростає до 22,83 (22,20; 23,66) % СПГЗП, а в групі F_4 фіброз / цирозі досягає максимуму і складає 26,00 (22,20; 29,92) % СПГЗП (див. рис. 5.27). Збільшення площі депонування в печінці перисинусоїдально-перицелюлярного колагену IV типу по мірі зростання ступеня тяжкості фіброзу печінки від F_1 до F_4 є достовірним ($N = 40,29$; $p < 0,05$).

Виконаний ІГХ і ФЦММ аналіз показав, що у хворих на НАСГ по мірі прогресування портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу в печінці також зростає депонування колагену I, III, IV типу в портально- Z_1 перипортальних зонах. У хворих на НАСГ зі слабким F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальним фіброзом печінки депонований колаген I типу займає площу 17,39 (16,32; 18,60) % СПГЗП, що більш ніж в 2 рази вище, ніж у пацієнтів групи умовного контролю. При помірному F_2 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі депонований колаген I типу займає площу, що дорівнює 20,53 (19,41; 21,88) % СПГЗП, при тяжкому F_3 фіброзі депонований колаген I типу займає площу, що складає 22,06 (20,66; 28,75) % СПГЗП, в групі F_4 фіброз / мікронодулярний цироз печінки колаген I типу займає площу, що сягає 25,36 (24,27; 26,05) % СПГЗП (рис. 5.28.). Зростання площі депонування колагену I типу в портальних трактах і в Z_1 перисинусоїдальних просторах печінки при

прогресуванні портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від F_1 до F_3 і до F_4 цирозу печінки є статистично достовірним ($N = 41,55$; $p < 0,05$).

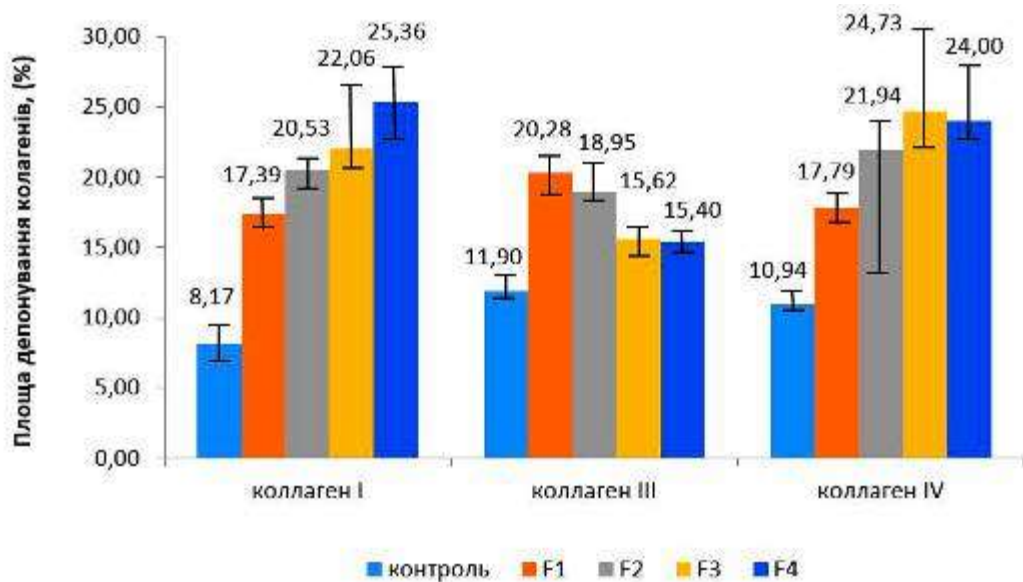


Рисунок 5.28 – Медіана площі депонування колагену I, III і IV типу в залежності від ступеня тяжкості портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки у хворих на неалкогольний стеатогепатит.

Депонування колагену III типу в портальних трактах і в перисинусоїдальних просторах перипортальних Z_1 зон печінкових дольок у хворих НАСГ має такі особливості. При F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі площа депонування колагену III типу в портальних трактах і в перипортальних Z_1 перисинусоїдальних просторах складає 20,28 (19,12; 21,61) % СПГЗП і майже в 2 рази перевищує аналогічні параметри пацієнтів групи умовного контролю. Однак надалі, по мірі зростання ступеня тяжкості портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від F_2 до F_4 , площа депонування колагену III типу в портальних трактах і в перипортальних Z_1 перисинусоїдальних просторах знижується. При F_2 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі площа депонування колагену III типу в портальних трактах і в перипортальних Z_1 перисинусоїдальних просторах печінки становить 18,95 (17,98; 20,55) % СПГЗП, при тяжкому F_3 аналогічному фіброзі площа депонування колагену III типу в портальних

трактах і в перипортальних Z_1 перисинусоїдальних просторах печінки дорівнює 15,62 (14,75; 16,54) % СПГЗП, а в групі F_4 фіброз / цироз мікронодулярного типу площа депонування колагену III типу складає 15,40 (14,54; 16,04) % СПГЗП (рис. 5.28). Зниження депонування колагену III типу в портальних трактах і в прилеглих перипортальних Z_1 перисинусоїдальних просторах печінки є статистично достовірними ($N = 42,15$; $p < 0,05$).

Виявлено, що в печінці хворих на НАСГ по мірі зростання ступеня тяжкості портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від F_1 до F_3 збільшується площа депонування колагену IV типу в інтерстиції портальних трактів і в прилеглих до них перисинусоїдальних просторах Z_1 зон печінкових дольок. Медіана площі депонування колагену IV типу при слабкому F_1 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі становить 17,79 (16,72; 18,89) % СПГЗП (а у пацієнтів групи умовного контролю - 10,94 (10,72; 11,45) % СПГЗП), при помірному F_2 аналогічному фіброзі – збільшується до 21,94 (13,64; 23,95) % СПГЗП, при тяжкому F_3 портально- Z_{1-3} перисинусоїдальному фіброзі зростає до 24,73 (21,62; 29,92) % СПГЗП, а у хворих з F_4 фіброзом / цирозом печінки мікронодулярного типу площа депонування колагену IV типу стабілізується і складає 24,00 (22,17; 27,79) % СПГЗП (див. рис. 5.28). Зростання депонування колагену IV типу портально-перисинусоїдальної локалізації по мірі прогресування портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки від F_1 до F_3 є статистично достовірним ($N = 35,05$; $p < 0,05$). Таким чином, визначено, що по мірі прогресування портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від слабкого F_1 , до помірного F_2 і тяжкого F_3 в зонах фіброзу печінки зростає депонування колагену I і IV типу, площа депонування яких більш ніж в 2 рази перевищує нормальні величини; при цьому зростання депонування колагену III типу сповільнюється, але залишається на 30% підвищеним в порівнянні з нормальними величинами.

5.2 Патоморфологічні особливості активації репаративної дуктулярної реакції в печінці при хронічному неалкогольному і алкогольному стеатогепатиті

Патоморфологічний аналіз біопсійно-секційного матеріалу показав, що, незважаючи на загибель гепатоцитів в печінці хворих на НАСГ і АСГ тривалий час не спостерігається активації мітотичного розподілу гепатоцитів. При мікроскопії в дольках печінки дуже рідко спостерігаються гепатоцити з фігурами мітозу, а при ІГХ дослідженні експресія маркеру клітинної проліферації Ki-67 визначається лише в 1-3 % гепатоцитів (у пацієнтів групи порівняння Ki-67 позитивні гепатоцити складають 1–2 %). При НАСГ і АСГ пошкодження і загибель гепатоцитів в умовах раннього перичелюлярного фіброзу стимулюють не стільки мітотичний розподіл гепатоцитів, скільки активацію прогеніторних клітин печінки з розвитком репаративної дуктулярної реакції, яка може мати виразні, помірні і слабкі мікроскопічні прояви. Слабкі та помірні прояви дуктулярної реакції виявляються при помірному F₂ і тяжкому F₃ перисинусоїдально-перичелюлярному і портально-Z₁₋₃ перисинусоїдальному фіброзу печінки, а максимальні прояви дуктулярної реакції спостерігаються при мікронодулярному цирозі печінки.

Слабка дуктулярна реакція в гепатобіоптатах з помірним або тяжким фіброзом діагностується за наявності на межі дольок і портальних трактів однієї-двох реактивних дуктул, або, як виключення, - однієї-двох реактивних дуктул в проміжній Z₂ чи в центролобулярній Z₃ зоні печінкової дольки (рис.5.29). Помірна дуктулярна реакція проявляється наявністю в проекції каналців Герінга на межі дольок і портальних трактів з помірним або слабким фіброзом поодиноких дрібних груп з 3-6 овальних клітин, невеликої кількості клітинних ланцюжків і реактивних дуктул, а також наявністю в печінкових дольках невеликого числа в одно-двохрядних клітинних ланцюжків і розрізнених одиничних реактивних дуктул (рис. 5.30).

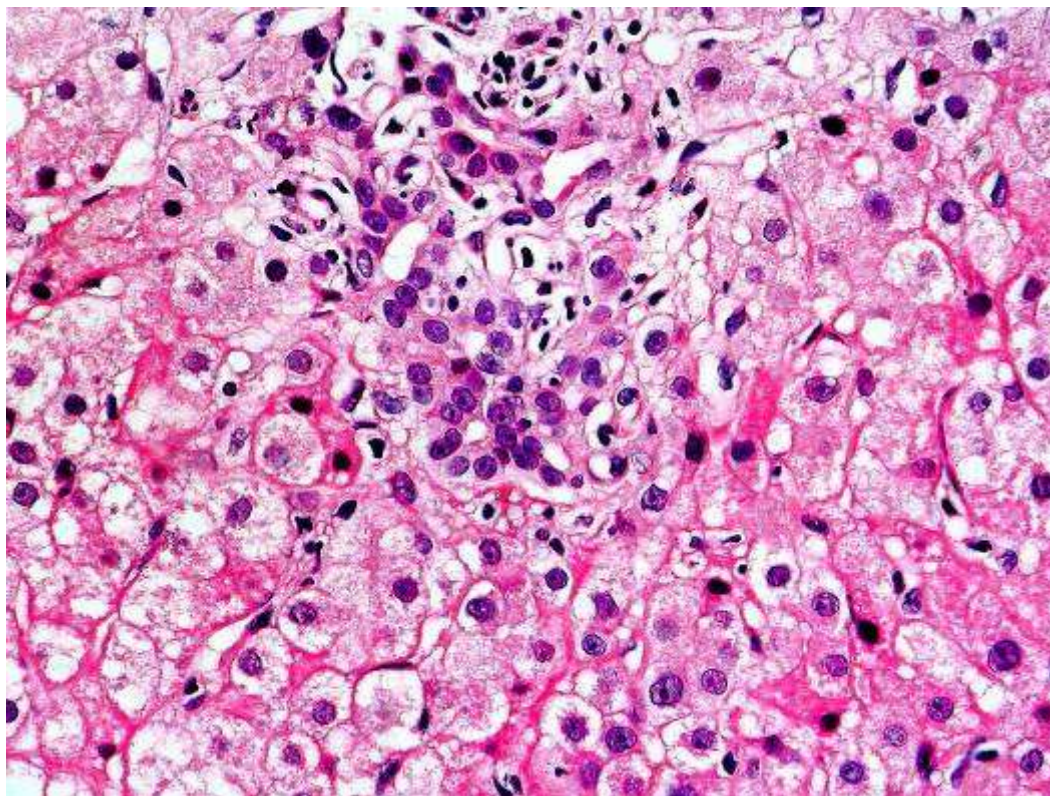


Рисунок 5.29 – Слабка репаративна дуктулярна реакція в печінці при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

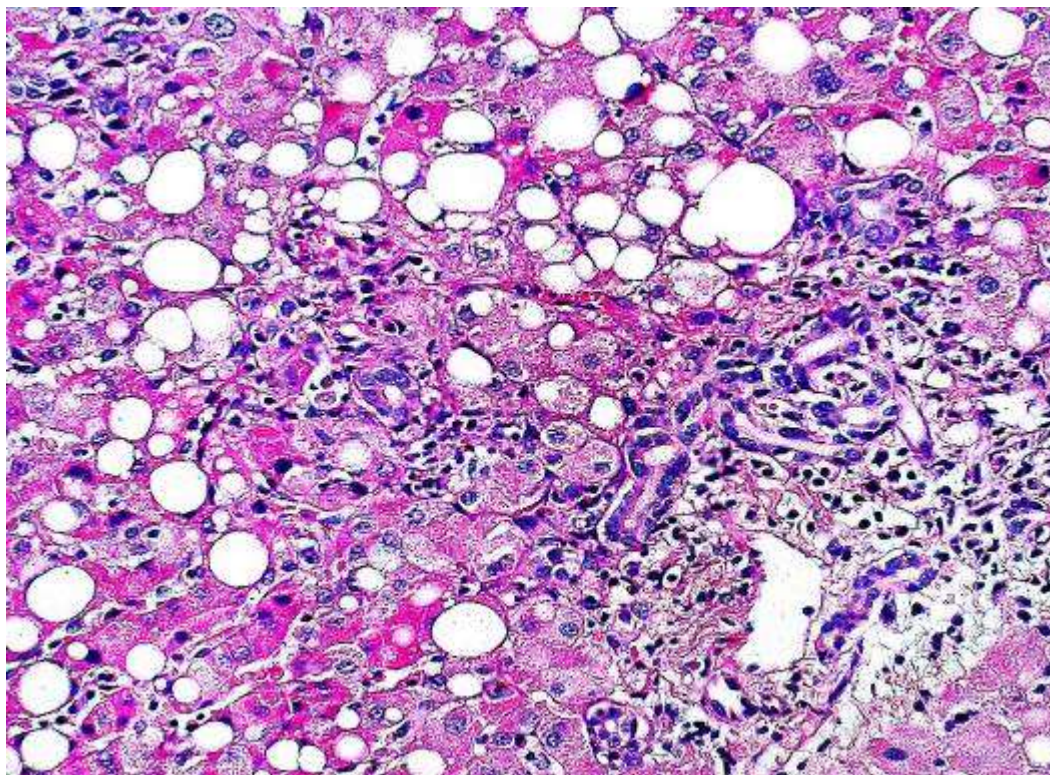


Рисунок 5.30 – Помірною репаративна дуктулярна реакція в печінці при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

При виразних проявах дуктулярної реакції на межі печінкових дольок і порталних трактів в проекції каналців Герінга спостерігається велика кількість дрібних дуктул та двох-однорядних клітинних ланцюжків з епітеліоподібних клітин розміром до 8 мкм з овальними ядрами (рис.5.31).

Максимально виражена дуктулярна реакція в активній фазі проявляється появою на межі печінкових дольок і порталних трактів в проекції каналців Герінга розгалужених ланцюжків з одного або двох рядів епітеліоподібних клітин розміром до 8 мкм з овальними ядрами, що переходять в дуктули з вузьким просвітом, які вистелені одним рядом аналогічних клітин. Поруч розташовуються поодинокі або групи з 4-6 (іноді - більш ніж з 10) дрібних епітеліоподібних клітин з овальними ядрами (рис.5.32). Епітеліоподібні клітини, клітинні одно-дворядні ланцюжки і дуктули з вузьким просвітом локалізовані в аморфно-ніжноволокнистому міжклітинному матриксі, що містить поодинокі макрофаги, лімфоцити та фібробласти (див. рис. 5.32), і, в сукупності, є мікроскопічним проявом репаративного комплексу печінки, або розкриття ніші прогеніторних клітин печінки.

Ретроспективний аналіз результатів гістологічних і ГХ досліджень біоптатів печінки 308 хворих з цирозом печінки, обумовленим хронічним алкогольним, неалкогольним і вірусним гепатитом, показав, що в гепатобіоптатах максимальна дуктулярна реакція печінки в активній фазі виявляється відносно рідко: вона діагностована у 36 хворих (тобто у 12 % хворих на цироз печінки, який виник на тлі хронічного гепатиту).

При слабкій дуктулярній реакції в клітинних ланцюжках і в реактивних дуктулах рідко виявляються клітини з ІГХ характеристиками прогеніторних клітин. Частіше за все в одно-двохрядних клітинних ланцюжках і у реактивних дуктулах, локалізованих на периферії і в проміжних зонах дольок печінки, клітини біліарного (СК7 +, СК19+) диференціювання чередуються з проміжними гепатоцитоподібними крупними СК7+ клітинами і з клітинами гепатоцитарного (Нераг +) диференціювання. Це дає підставу вважати

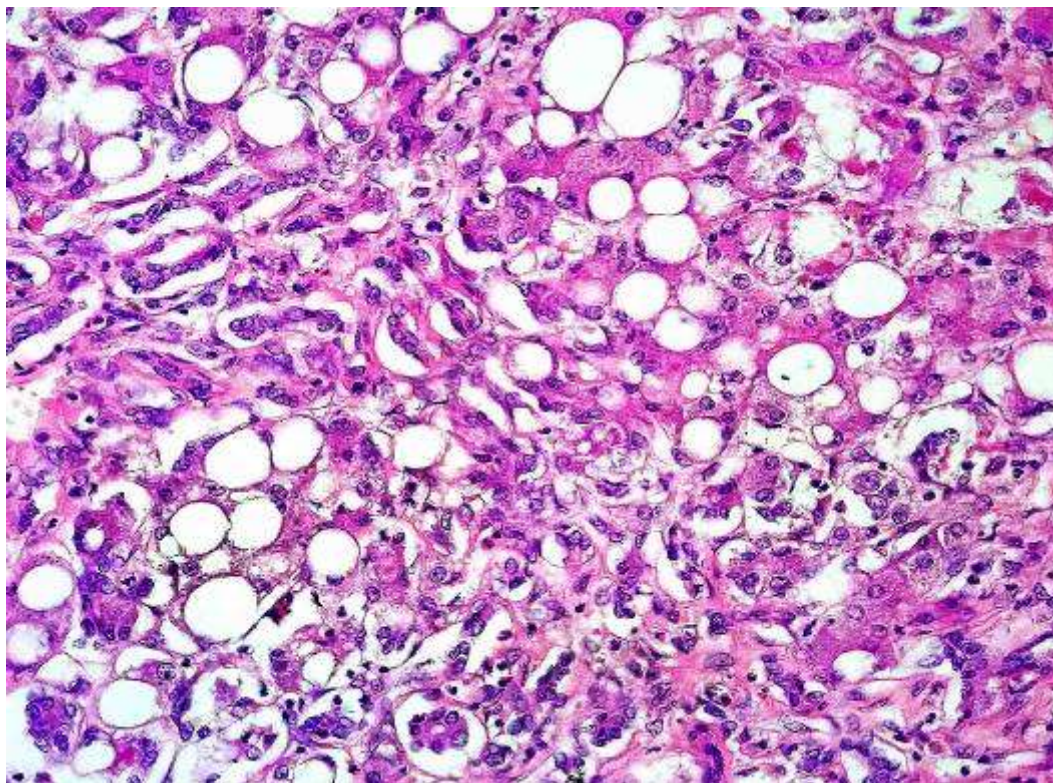


Рисунок 5.31 – Виразна репаративна дуктулярна реакція в печінці при АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

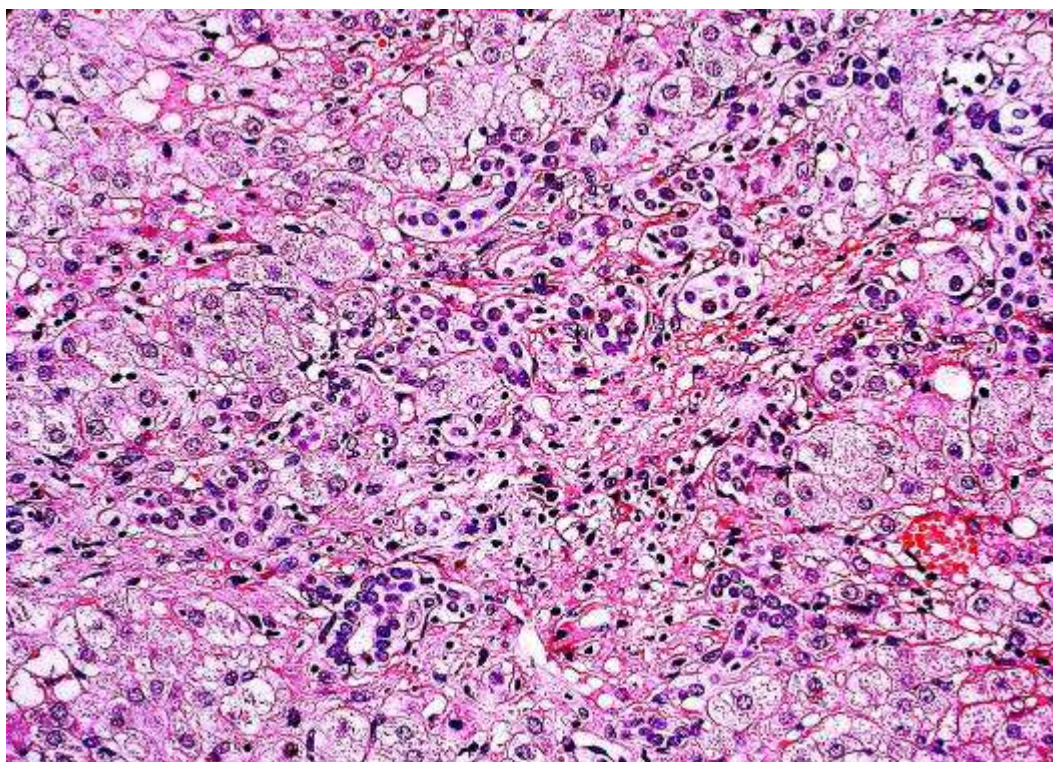


Рисунок 5.32 – Реактивні клітинні ланцюжки і дуктули в ніші прогеніторних клітин при цирозі печінки в активній фазі дуктулярної реакції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

клітинні ланцюжки печінкових дольок структурами репаративного комплексу печінки з потенційно біфазним клітинним диференціюванням. Подальшу долю гепатоцитарного диференціювання в значній мірі визначає склад міжклітинного матриксу, який оточує ланцюжки і дуктули.

При помірній дуктулярній реакції в дрібних скупченнях овальних клітин і в клітинних ланцюжках спостерігаються поодинокі c-kit CD117 імунопозитивні клітини і CD34 імунопозитивні клітини, дуже рідко – одна-дві СК7+ і СК19+ клітини. В клітинних ланцюжках і у реактивних дуктулах на периферії і в проміжних зонах дольок печінки, клітини біліарного (СК7 +, СК19+) диференціювання чередуються з проміжними гепатоцитоподібними крупними СК7+ клітинами і з клітинами гепатоцитарного (Hepar +) диференціювання.

За даними ІГХ досліджень, в активній фазі дуктулярної реакції реактивні дуктули, клітинні ланцюжки і скупчення містять нечисленні клітини с імунофенотипом прогеніторних клітин печінки. В прогеніторних клітинах печінки визначається цитоплазматична експресія c-kit CD117 (рис. 5.33А), CD56 (рис. 5.33Б), CD34 (рис. 5.34 А), CD44 Std./HCAM, (рис. 5.34 Б), α -FTP, але відсутня цитоплазматична експресія СК7 і СК19 - маркерів зрілого біліарного епітелію, а також відсутня цитоплазматична експресія Hepar – маркеру зрілих гепатоцитів. Водночас в дуктулах, клітинних ланцюжках і скупченнях визначаються поодинокі клітини діаметром 6-40 мікрон на різних стадіях гепато-біліарного диференціювання, які мають проміжний фенотип між холангіоцитами і гепатоцитами (в них відсутня експресія СК19 і має місце позитивна експресія СК7, якої не має в зрілих гепатоцитах), а також поодинокі клітини біліарного диференціювання (з цитоплазматичною експресією СК7 і СК19), поодинокі проміжні крупні гепатоцитоподібні клітини діаметром 8-30 мікрон з помірною цитоплазматичною експресією СК7 і поодинокі клітини гепатоцитарного диференціювання (з цитоплазматичною експресією Hepar і α -FTP).

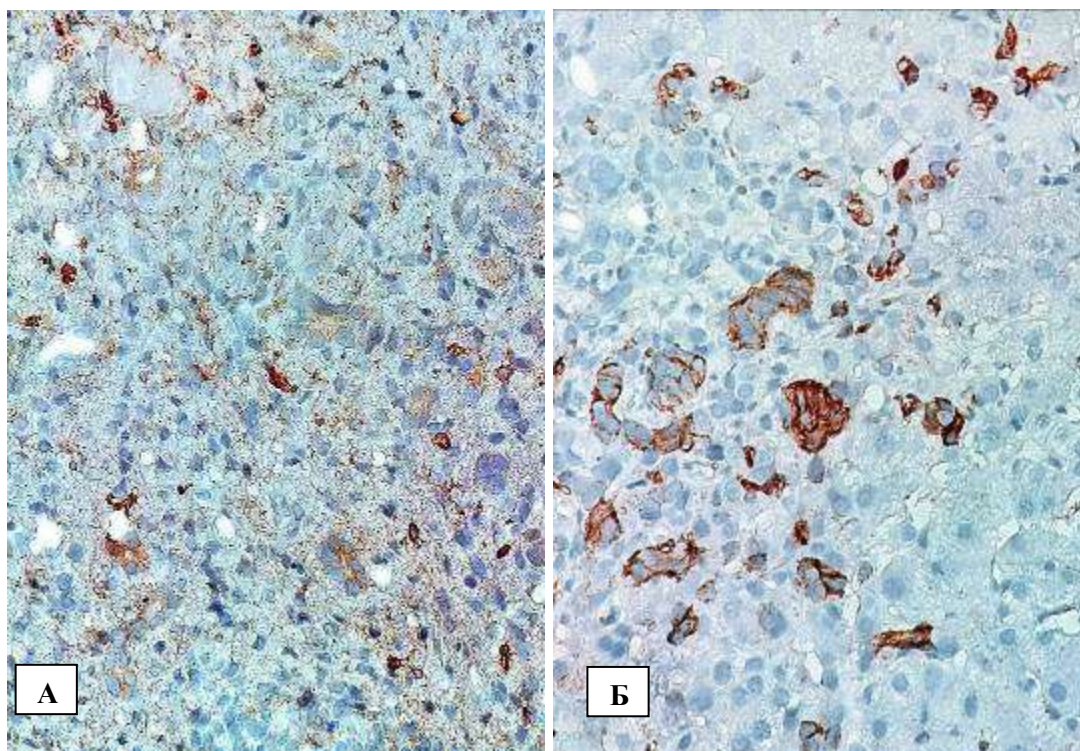


Рисунок 5.33 – А, Б, Експресія в клітинах реактивних дуктул і ланцюжків CD117_c-kit (А) і CD56 (Б) в активній фазі дуктулярної реакції печінки. А - Polyclonal Ra a-Human CD 117, c-kit. В- Мо a-Hu CD56, clone T199. Зб.: А, Б – х 300.

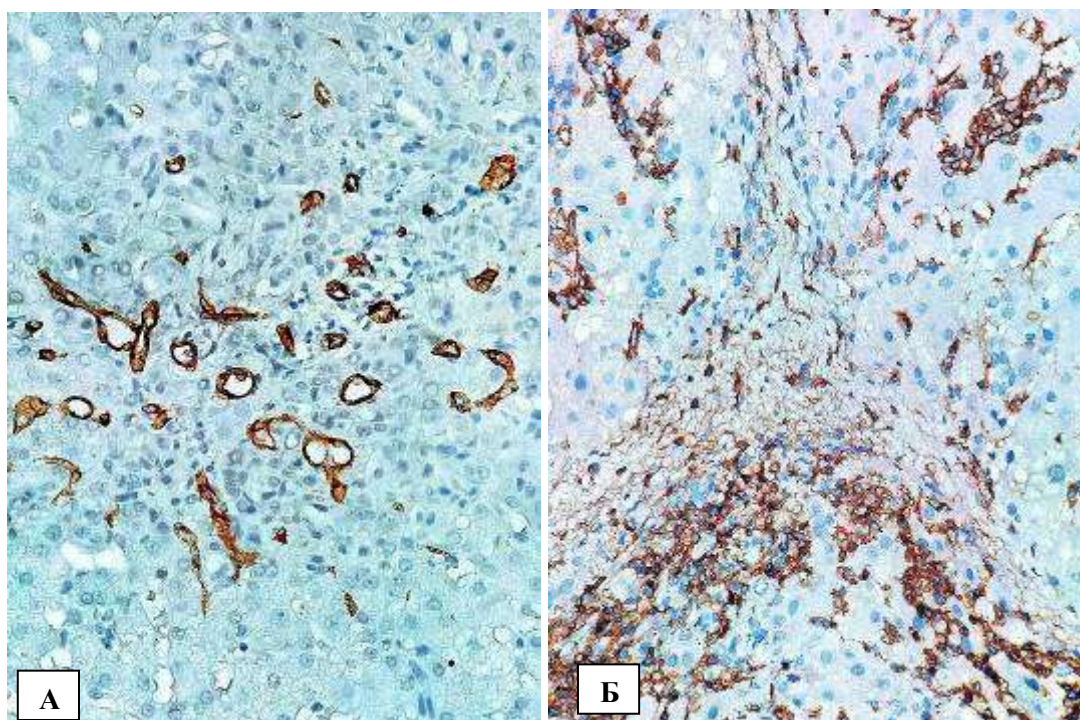


Рисунок 5.34 – А, Б. Експресія в клітинах реактивних дуктул і ланцюжків CD34 (А) і CD44 Std./HSCAM (Б) в активній фазі дуктулярної реакції печінки. А - Мо a-Hu CD34, clone QBEnd/10. Б - Мо a-Hu CD44 Std./HSCAM Ab-4, clone 156-3C11. Зб.: В, Г - х 200.

В активній фазі дуктулярної реакції розгалужені клітинні ланцюжки і дуктули проникають уздовж перисинусоїдальних просторів вглиб печінкових дольок, в яких вони радіально орієнтовані і інколи розповсюджуються навіть до централобулярних вен дольок печінки. У клітинах ланцюжків виявляється мембранна експресія маркера міжклітинної адгезії епітеліальних клітин CD44 Std./NCAM, яка свідчить про значну мобільність реактивних ланцюжкових структур. У реактивних клітинних ланцюжках і дуктулах проміжних Z_2 і централобулярних Z_3 зон печінкових дольок домінують СК7-позитивні клітини (рис.5.35), виявляються α -FTP-позитивні клітини (рис.5.36), клітини біфазного біліарного (СК7 +, СК19 +) і гепатоцитарного (Heparg +, α -FTP-) диференціювання (рис.5.37), а також виявляються поодинокі CD56-позитивні клітини.

Навколо реактивних дуктул і клітинних ланцюжків немає потовщених базальних мембран з колагеновими волокнами I, III і IV типу і з α -SMA-позитивними волокнами, однак в цитоплазмі і відростках зірчастих клітин біля дуктул, визначається експресія α -SMA.

На межі з порталними трактами в дольках печінки виявляються крупні проміжні гепатоцитоподібні клітини зі слабкою цитоплазматичної експресією СК7 (рис. 5.38), структура яких в більшій мірі відповідає гепатоцитам, а також крупні одно-двоядерні гепатоцити з величезною цитоплазмою (рис.5.39), в якій при ІГХ аналізі визначається інтенсивна гранулярна експресія Heparg, що свідчить про високу активність мітохондріальних ферментів циклу сечовини (рис.5.40).

При цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ при максимальній дуктулярній реакції реактивні дуктули, клітинні ланцюжки і скупчення епітеліоподібних клітин також спостерігаються в субкапсулярній зоні печінки та в фіброзно змінених порталних трактах і в потовщених фіброзних септах.

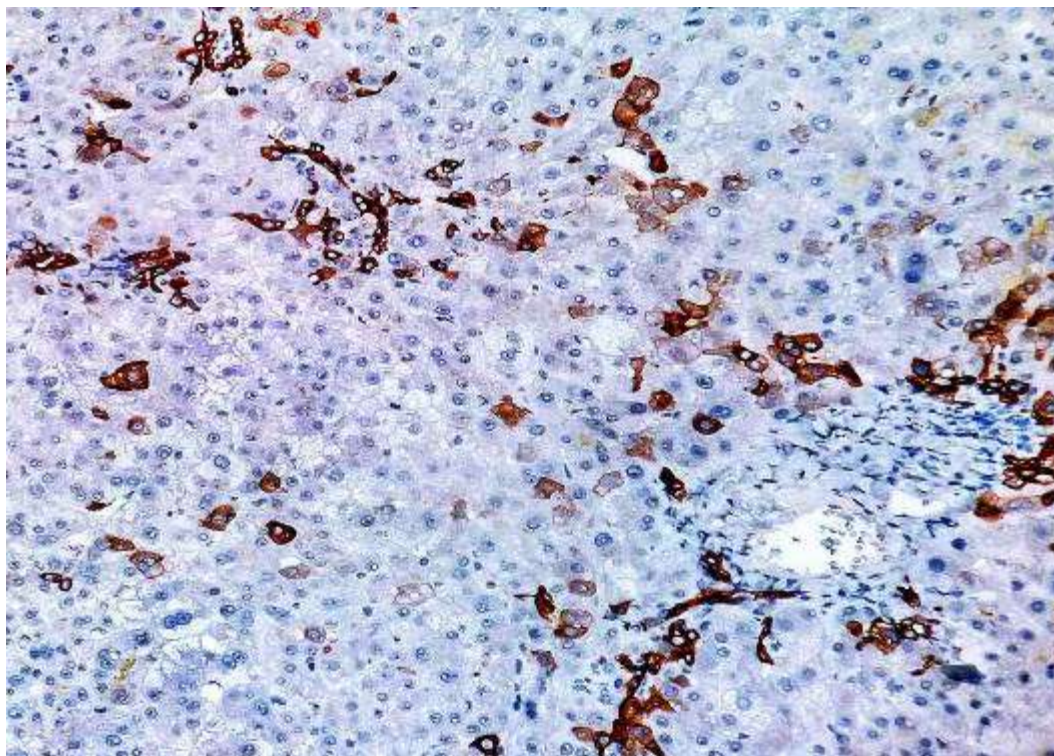


Рисунок 5.35 – СК7-позитивні клітини в значній кількості клітинних ланцюжків в дольці печінки, що глибоко проникають до центролобулярної вени в активній фазі дуктулярної реакції. *Mo a-Hu Cytokeratine 7, clone OV-TL 12/30. 36.: x 200.*

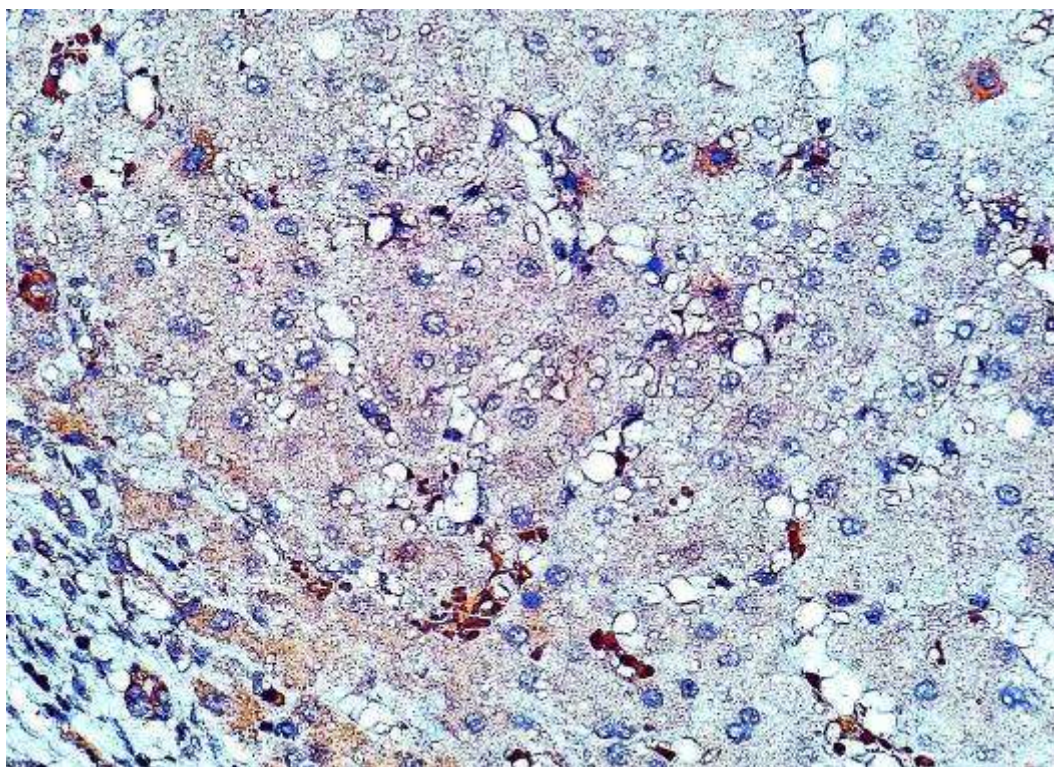


Рисунок 5.36 – α -FTP-позитивні клітини в клітинних ланцюжках в дольці печінки в активній фазі дуктулярної реакції. *Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein. 36.: x 400.*

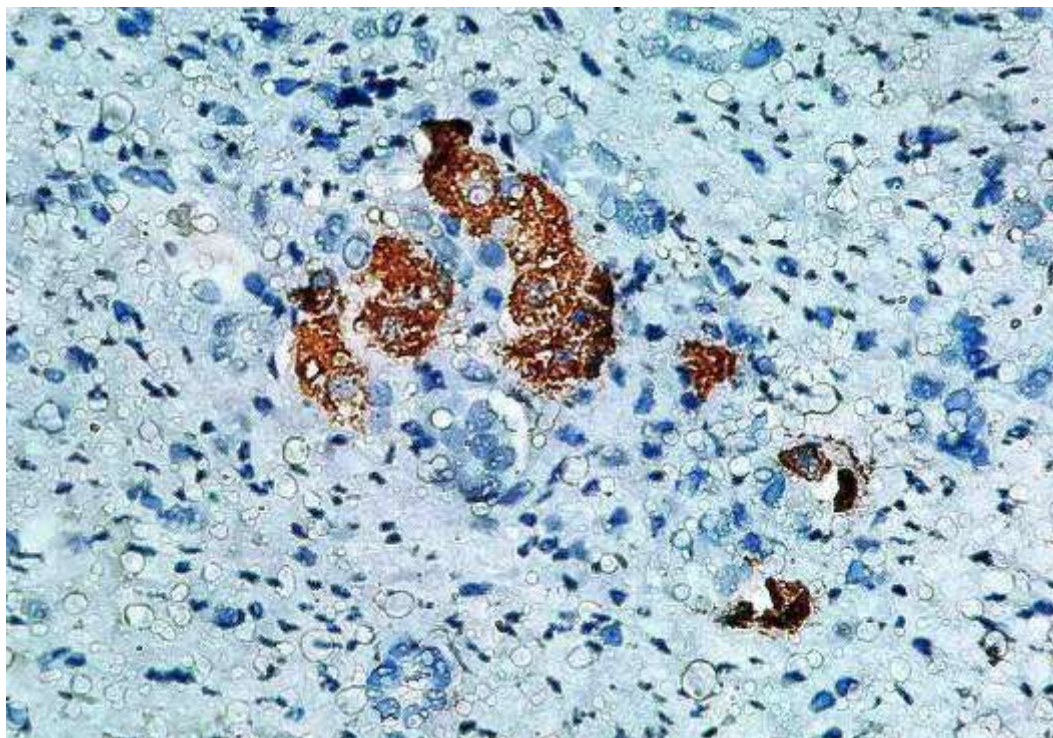


Рисунок 5.37 – Крупні Нерар + клітини гепатоцитарного диференціювання в реактивних дуктулах дольок печінки.. *HepPar-1 Мо a-Hu Hepatocyte, clone QBEnd/10*. Зб.: x 400.

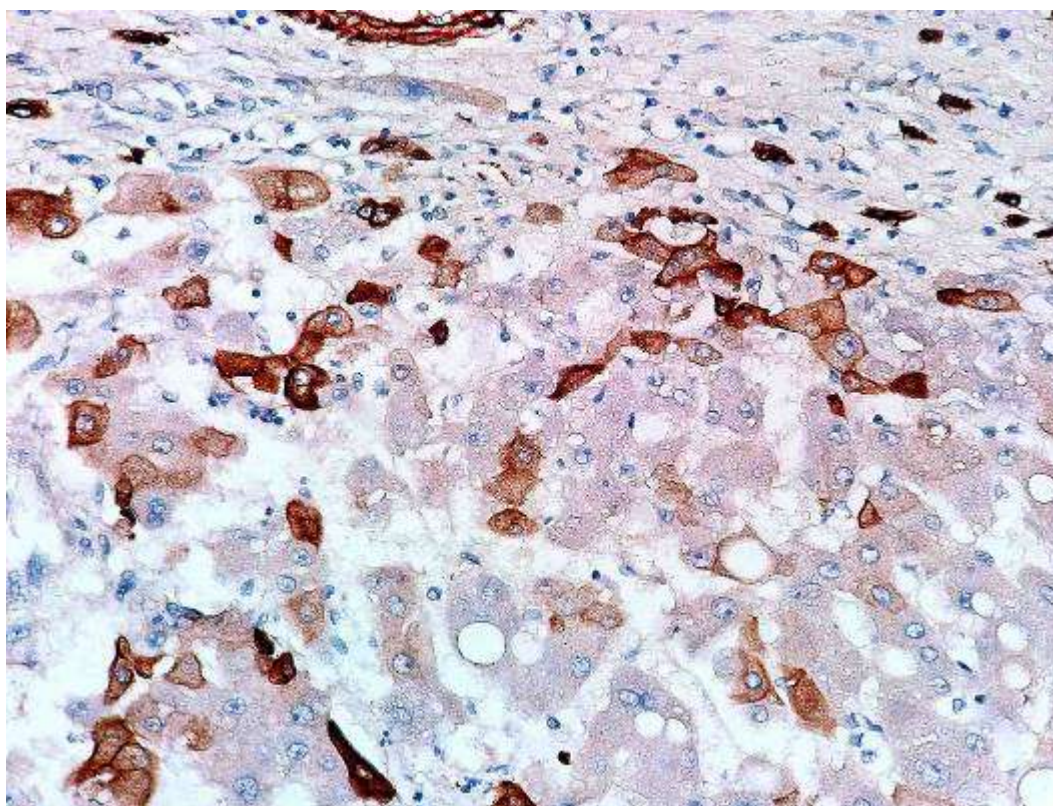


Рисунок 5.38 – Крупні проміжні СК7 позитивні гепатоцитоподібні клітини в перипортальній Z_1 зоні печінкової дольки. *Мо a-Hu Cytokeratine 7, clone OV-TL 12/30*. Зб.: x 400.

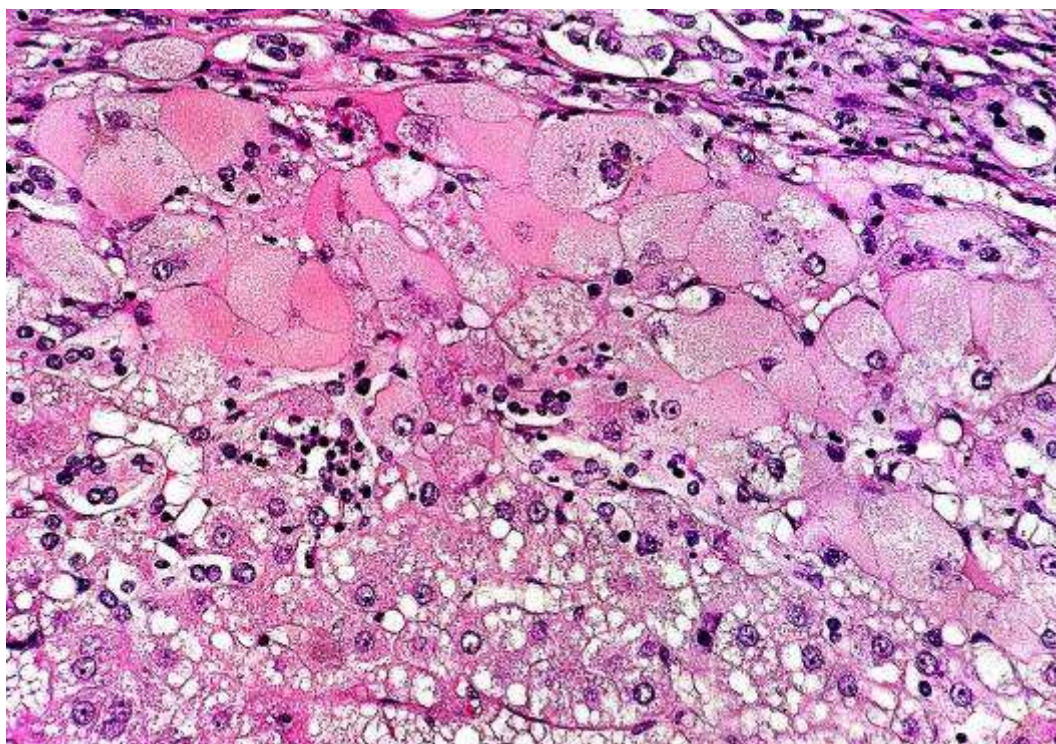


Рисунок 5.39 – Крупні одно-двоядерні гепатоцити з величезною цитоплазмою в перипортальній зоні дольки печінки при НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

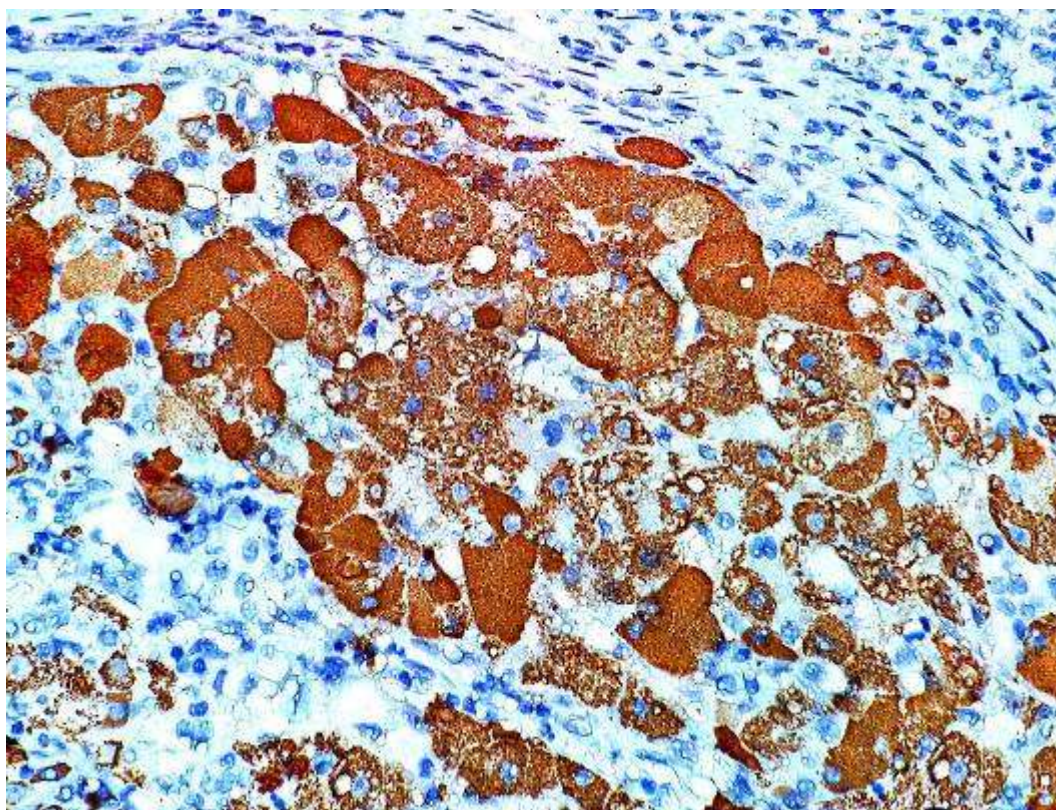


Рисунок 5.40 – Інтенсивна гранулярна експресія Нераг у величезній цитоплазмі крупних гепатоцитів перипортальної зони дольки печінки при НАСГ. Мо *a-Hu Hepatocyte*, Clone *ОСН1Е5*. Зб.: x 600.

Встановлено, що гепатоцитарному диференціюванню біфазних і проміжних гепатоцитоподібних клітини сприяє експресія ламініну, який зазвичай не виявляється в перисинусоїдальних просторах дольках печінки. При цирозі печінки в активній фазі дуктулярної реакції на периферії деяких дольок і псевдодольок в проекції каналів Герінга, в розкритих так званих нішах прогеніторних клітин печінки, визначаються поширені зони позаклітинної експресії ламініну (рис. 5.41А), в яких локалізована підвищена кількість α -FTR-позитивних округлих клітин середньої величини (рис. 5.41Б). У деяких ділянках ланцюжки з α -FTR-позитивними клітинами проникають в дольки і псевдодольки печінки.

Імуногістохімічний аналіз складу міжклітинного матриксу, який оточує клітинні ланцюжки і реактивні дуктули в дольках печінки, показав наступні результати. Навколо деяких клітинних ланцюжків, локалізованих в проекції каналців Герінга з клітинами біфазного диференціювання, виявляється фрагментарна експресія ламініну. Нерегулярна експресія ламініну виявляється у відростках зірчастих клітин, що супроводжують дуктули в дольках печінки, а також навколо деяких реактивних дуктул в печінкових дольках (рис.5.42).

В печінкових дольках навколо клітинних ланцюжків і реактивних дуктул не визначаються базальні мембрани із α -SMA-позитивних волокон, однак в цитоплазмі і відростках зірчастих клітин, що супроводжують дуктули, спостерігається експресія α -SMA. Тільки деякі дуктули в дольках печінки оточені вузькою мембраною з наявністю тонких колагенових волокон IV типу, колаген I і III типу навколо реактивних дуктул в дольках печінки не визначається.

Таким чином встановлено, що прогеніторні клітини печінки диференціюються в гепатоцити через проміжні гепатобілярні і гепатоцитоподібні клітини, цьому сприяє наявність ламініну в нішах прогеніторних клітин та експресія ламініну в ПЗК в печінкових дольках.

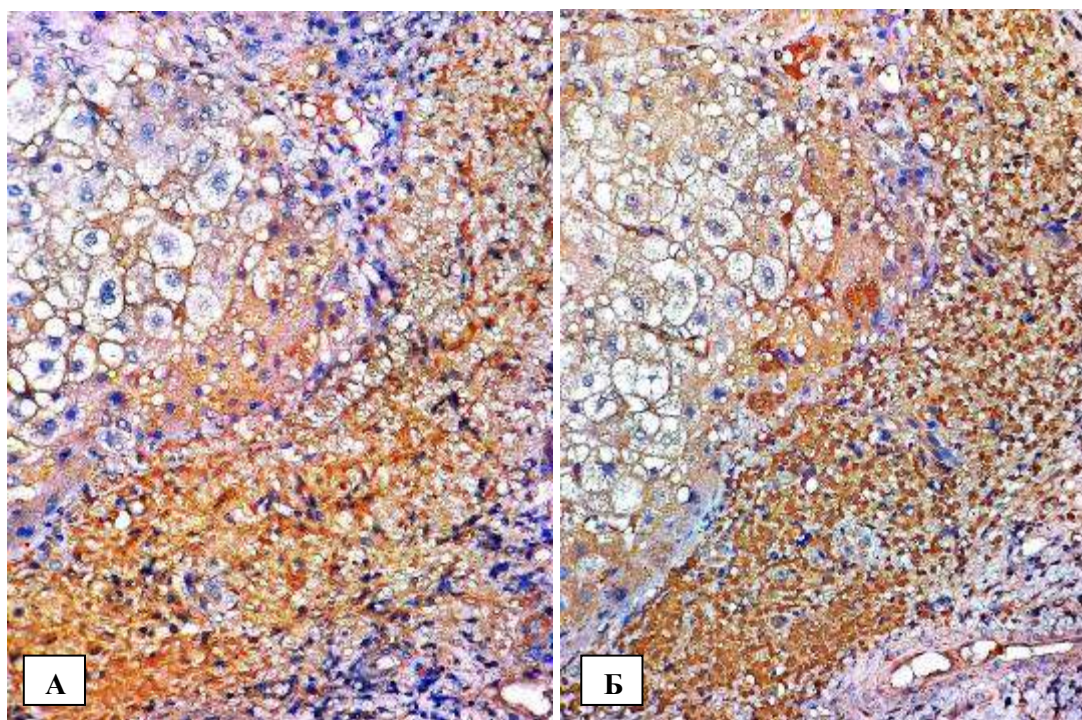


Рисунок 5.41 – А, Б. Експресія ламініну (А) і значна кількість α -ФТР-позитивних клітин (Б) в ніші прогеніторних клітин в активній фазі дуктулярної реакції при цирозі печінки. А - *Rb Laminin Ab-1*. Б - *Rb α -Hu Alpha-1-Fetoprotein*. Зб.: А, Б – х 400.

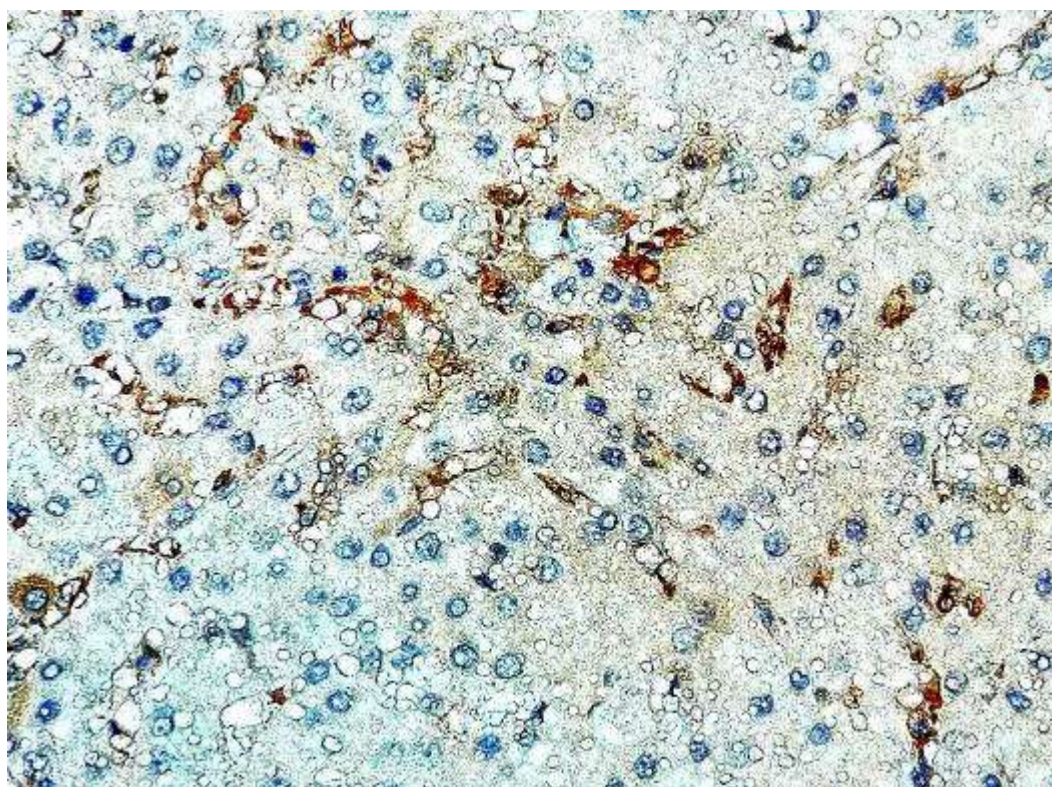


Рисунок 5.42 – Експресія ламініну в дольках печінки у відростках зірчастих клітин, що супроводжують дуктули, а також навколо деяких реактивних дуктул. *Rb Laminin Ab-1*. Зб.: х 400.

Важливим проявом активної фази дуктулярної реакції у хворих на НАСГ і АСГ є утворення нових псевдодольок при цирозі печінки. В колишніх дольках з перисинусоїдально-перичелюлярним фіброзом спостерігаються новостворені псевдодольки, які являють собою скупчення невідповідно розташованих, великих Нераг-позитивних і α -FTP-негативних гепатоцитів без наявності лінійно орієнтованих синусоїдальних просторів, централобулярних вен, а також перичелюлярного фіброзу (рис. 5.43). На периферії дрібних новостворених псевдодольок при цирозі печінки визначаються СК7-позитивні клітини проміжного гепато-біліарного диференціювання (рис. 5.44 А), а в центральних зонах псевдодольок печінки - Нераг+ клітини гепатоцитарного диференціювання (рис. 5.44 Б).

Проведені дослідження показали, що при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ в активній фазі репаративної дуктулярної реакції фігури мітозу в реактивних дуктулах і клітинних ланцюжках відсутні. Але на периферії печінкових дольок в проекції каналів Герінга в скупченнях дрібних клітин визначається значна кількість Ki-67-позитивних клітин (рис. 5.45), що свідчить про активну проліферацію прогеніторних клітин печінки. Якщо до розвитку цирозу печінки в гепатотрепанобіоптатах при мікроскопії в дольках печінки дуже рідко спостерігаються гепатоцити з фігурами мітозу, то з розвитком важкого цирозу печінки ситуація міняється. Встановлено, що при важкому мікронодулярному цирозі печінки, коли площа печінкових дольок і псевдодольок зменшується і стає рівною або меншою площі фіброзу, має місце паралельне зростання числа Ki-67-позитивних клітин в портально-долькових дуктулах і зростання числа Ki-67-позитивних гепатоцитів в дрібних печінкових дольках і псевдодольках (рис. 5.46). Але проліферація гепатоцитів і дуктулярних структур при важкому цирозі печінки є надто запізнілою, вона не спроможна ефективно і повноцінно відновити популяцію гепатоцитів через важке спотворення фіброзом специфічно упорядкованого міжклітинного молекулярно-волокнистого матриксу дольок печінки.

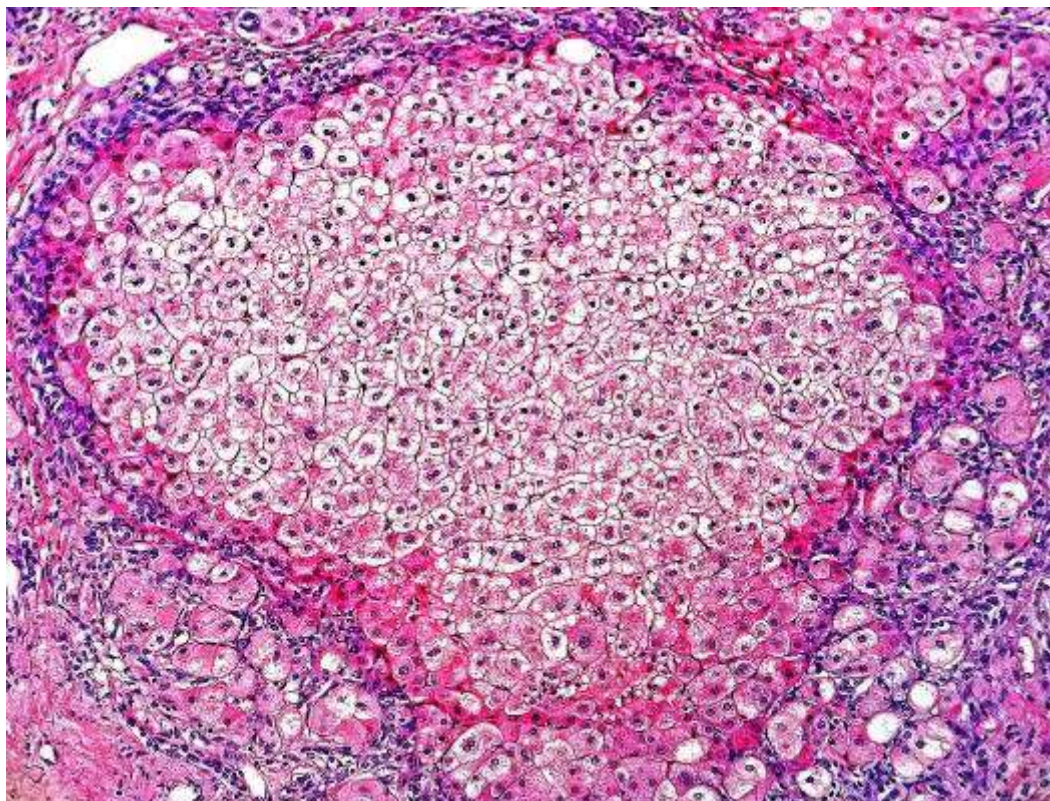


Рисунок 5.43 – Новоутворена псевдодолька без наявності упорядкованих синусоїдів і централобулярної вени. Забарвлення гематоксилином та еозином.
Зб.: x 200.

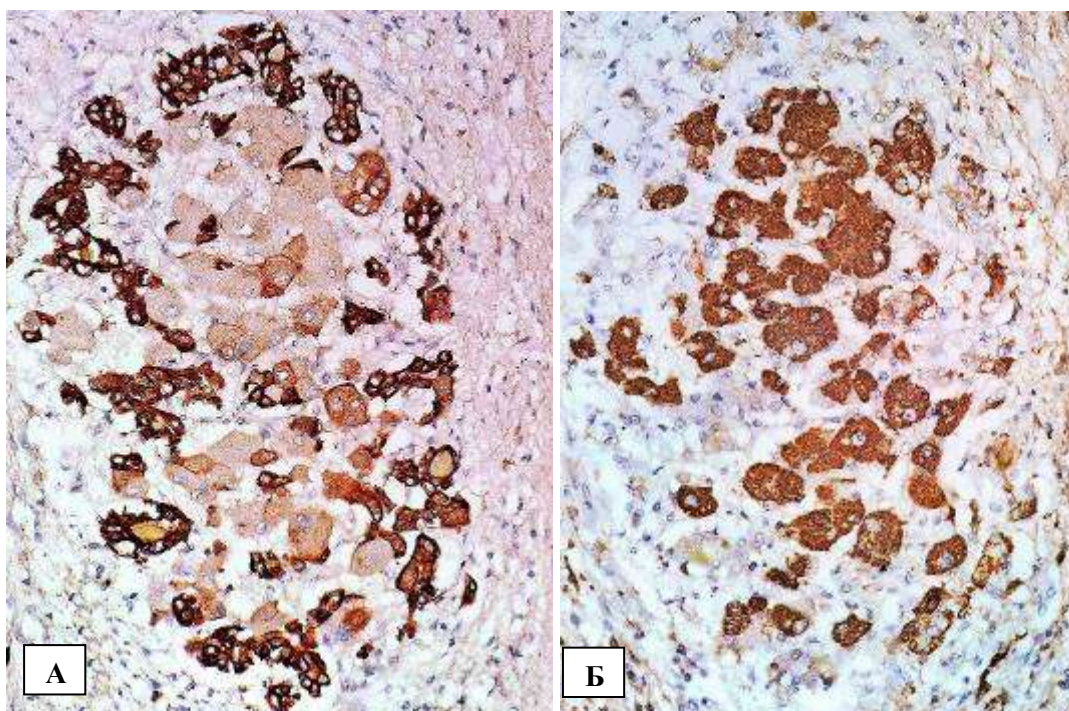


Рисунок 5.44 – А,Б. Експресія СК7 (А) і НерPar-1 (Б) в псевдодольках в активній фазі дуктулярної реакції при цирозі печінки. А - *Mo α-Hu Keratin 7, clone OV-TL 12/30*. Б - *HepPar-1 Мо α-Якщо Hu Hepatocyte, clone QBEnd/10*.
Зб.: А, Б – x 400.

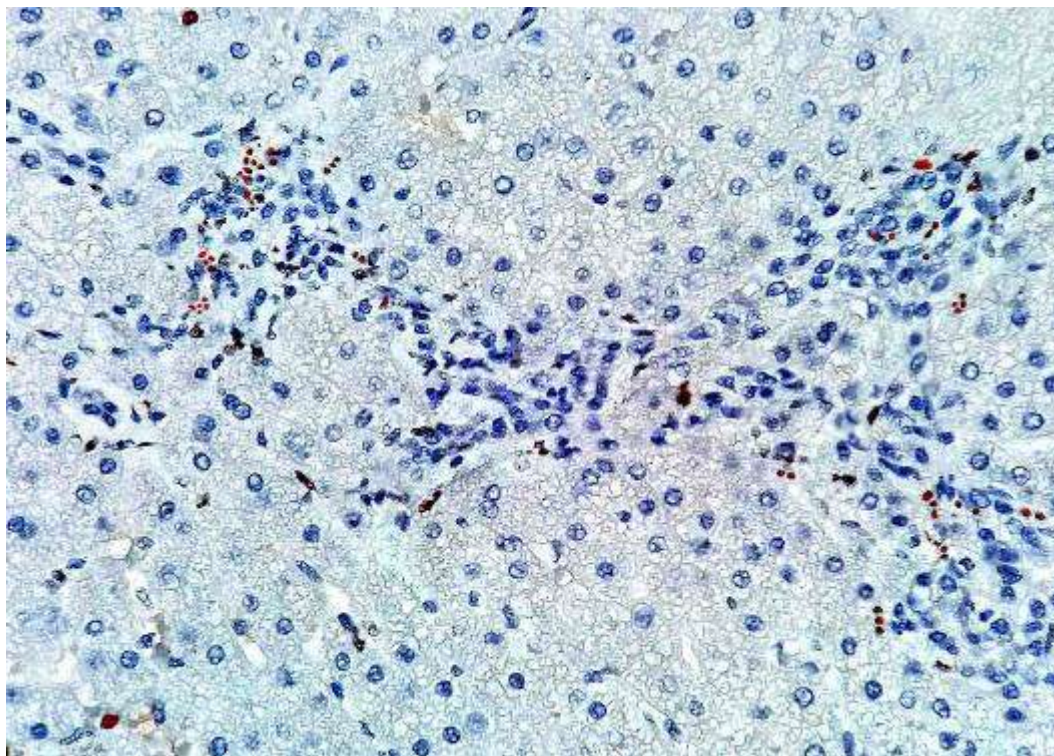


Рисунок 5.45 – Значна кількість дрібних Ki-67+ клітин в реактивних клітинних скупченнях репаративного комплексу печінки у хворого на НАСГ. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, clone SP6.3б.: x 400.*

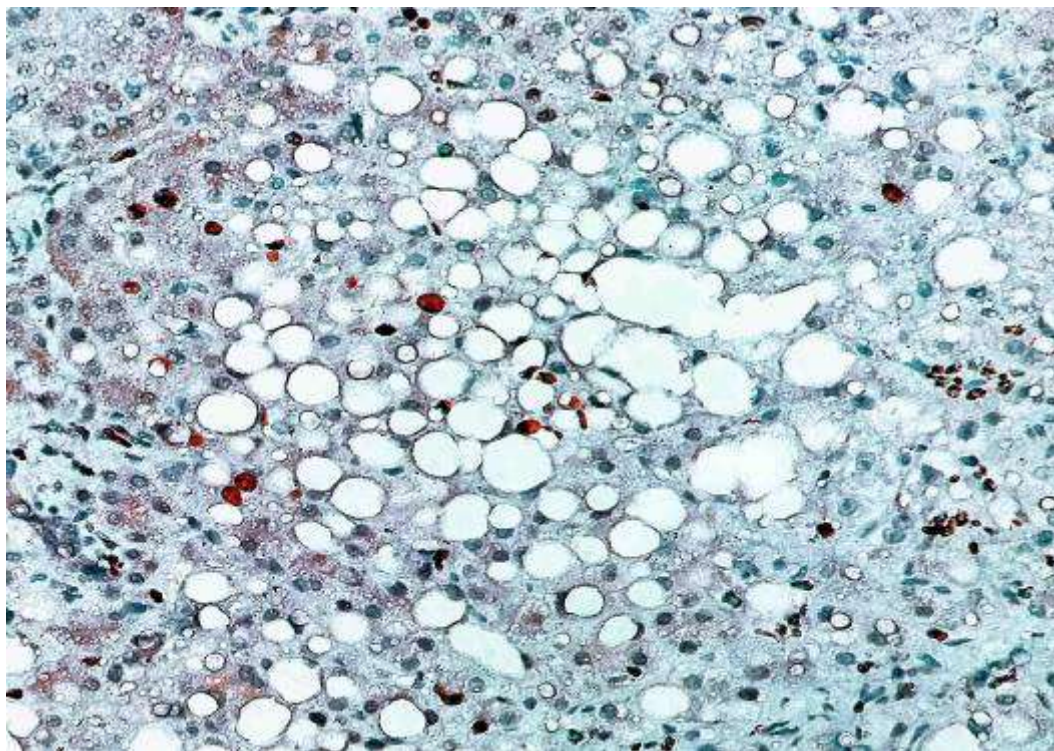


Рисунок 5.46 – Експресія Ki-67 епітелієм реактивних дуктул (праворуч) і гепатоцитами псевдодольки (в центрі і ліворуч) при тяжкому мікронодулярному цирозі печінки у хворого на НАСГ. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, clone SP6. 3б.: x 400.*

В фіброзно змінених портальних трактах, в фіброзно зміненій субкапсулярній зоні печінки і в фіброзних септах при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ визначаються нечисленні реактивні клітинні ланцюжки і дуктули з наявністю Нераг +, α -FTP позитивних і α -FTP-негативних клітин, а також численні давно сформовані клітинні ланцюжки і дуктули з СК7 +, СК19 + клітинами. Навколо дуктул в фіброзно змінених портальних трактах не виявляється ламінін. Поряд з великою кількістю сформованих дуктул в портальних трактах виявляються безліч відростків α -SMA позитивних фібробластів, а колагенові волокна I, III і IV типу оточують такі сформовані дуктули своєрідними муфтами різної ширини і щільності.

У фазі віддалених наслідків дуктулярної реакції при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ в фіброзно змінених портальних трактах і субкапсулярній зоні печінки, а також в потовщених портально-долькових септах спостерігається різна кількість дуктул з вузьким просвітом, що не містять жовчі. Дуктули вистелені одним рядом кубоподібного СК7-позитивного епітелію. На периферії дольок і псевдодольок печінки, що не містять реактивних клітинних ланцюжків або дуктул, можуть виявлятися нечітко окреслені вогнища гіперплазії гепатоцитів без впорядковано орієнтованих синусоїдів і печінково-клітинних балок. Число сформованих дуктул в фіброзно змінених портальних трактах печінки варіює від невеликого до дуже значного.

5.3 Патоморфологічні особливості цирозу і раку печінки при неалкогольному та алкогольному стеатогепатиті

За даними ретроспективного аналізу клініко-лабораторних даних у хворих на НАСГ і АСГ з цирозом печінки відмічалися ознаки печінкової недостатності: підвищені значення фракцій загального білірубину більш 50,6 мкмоль / л, зростання > 1 коефіцієнта де Рітіса, що вказує на активацію

цитолізу гепатоцитів. Крім цього, реєструвалися ознаки портальної гіпертензії: мало місце варикозне розширення вен стравоходу і спленомегалія різного ступеня тяжкості.

За даними патоморфологічних досліджень в біоптатах печінки таких хворих на НАСГ і АСГ визначається мікронодулярний цироз печінки переважно перисинусоїдально-periцелюлярного або портально- Z_{1-3} periцелюлярного типу. Від важкого F3 перисинусоїдально-periцелюлярного і портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу цироз печінки відрізняється наявністю мікронодулярних дольок і псевдодольок, оточених фіброзно зміненими портальними трактами і фіброзними прошарками та септами, які визначаються при забарвленні за Ван Гізон і методом Масон-триколов (рис.5.47А,Б). При ІГХ дослідженні в фіброзно змінених портальних трактах, в фіброзних прошарках і септах визначається дуже велика кількість α -SMA-позитивних фібробластів (рис.5.48А), а також колагенових волокон I типу (рис.5.48Б), III і IV типу (рис.5.48В).

Відмінністю мікронодулярного цирозу печінки при НАСГ і АСГ від класичного мікронодулярного цирозу є наявність портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу, а також перисинусоїдально-periцелюлярного фіброзу в дольках і псевдодольках. При мікроскопії визначається, що в мікродольках до потовщених через фіброз портальних трактів прилягають широкі ділянки Z_1 перисинусоїдально-долькового фіброзу, а в дольках і псевдодольках печінки також визначаються різної площі зони тяжкого перисинусоїдально-periцелюлярного фіброзу з замуrowаними групами гепатоцитів зі стеатозом (рис.5.49). В Z_1 перисинусоїдальних зонах дольок, а також в перисинусоїдально-periцелюлярних зонах дольок і псевдодольок печінки визначається підвищена кількість α -SMA-позитивних міофібробластів, а також колагенових волокон I, III і IV типу (рис.5.50А і Б).

За даними ФЦММ у хворих на НАСГ при цирозі печінки визначається максимальна площа розповсюдження α SMA-позитивних міофібробластів, яка

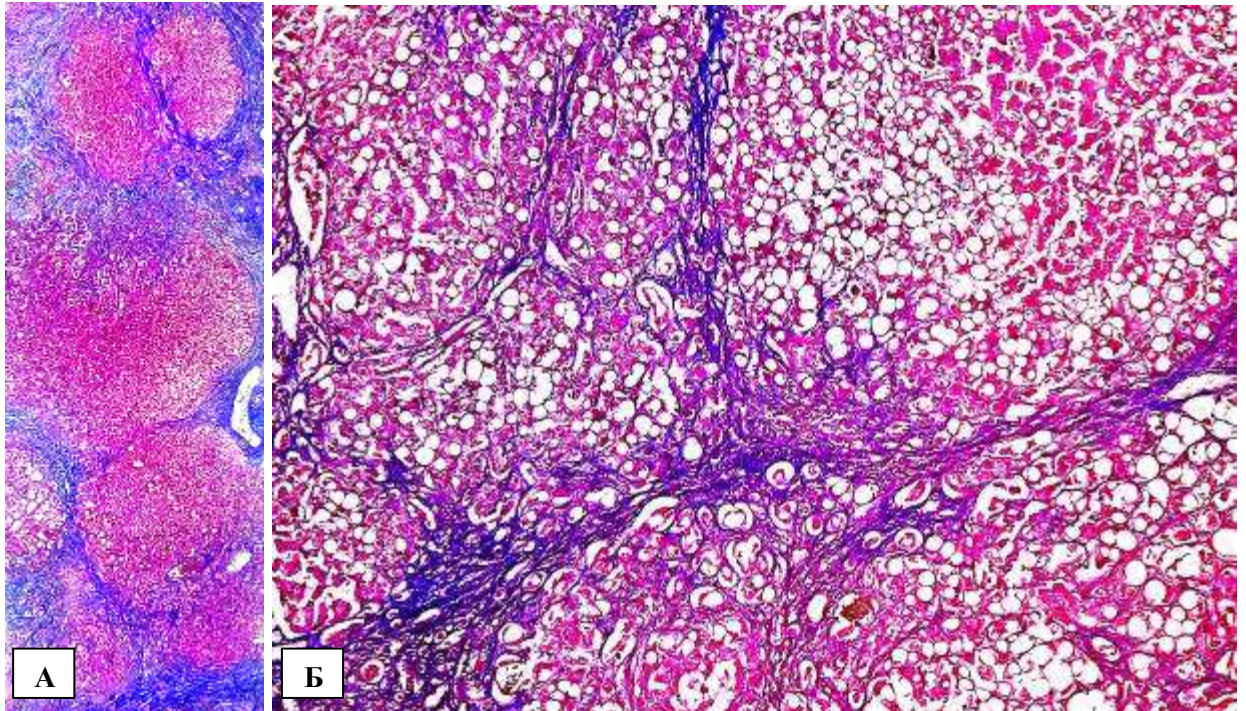


Рисунок 5.47 – А,Б Мікронодулярний цирроз печінки у хворого на НАСГ. Забарвлення Масон-трихром. Зб.: А: x10, Б: x100.

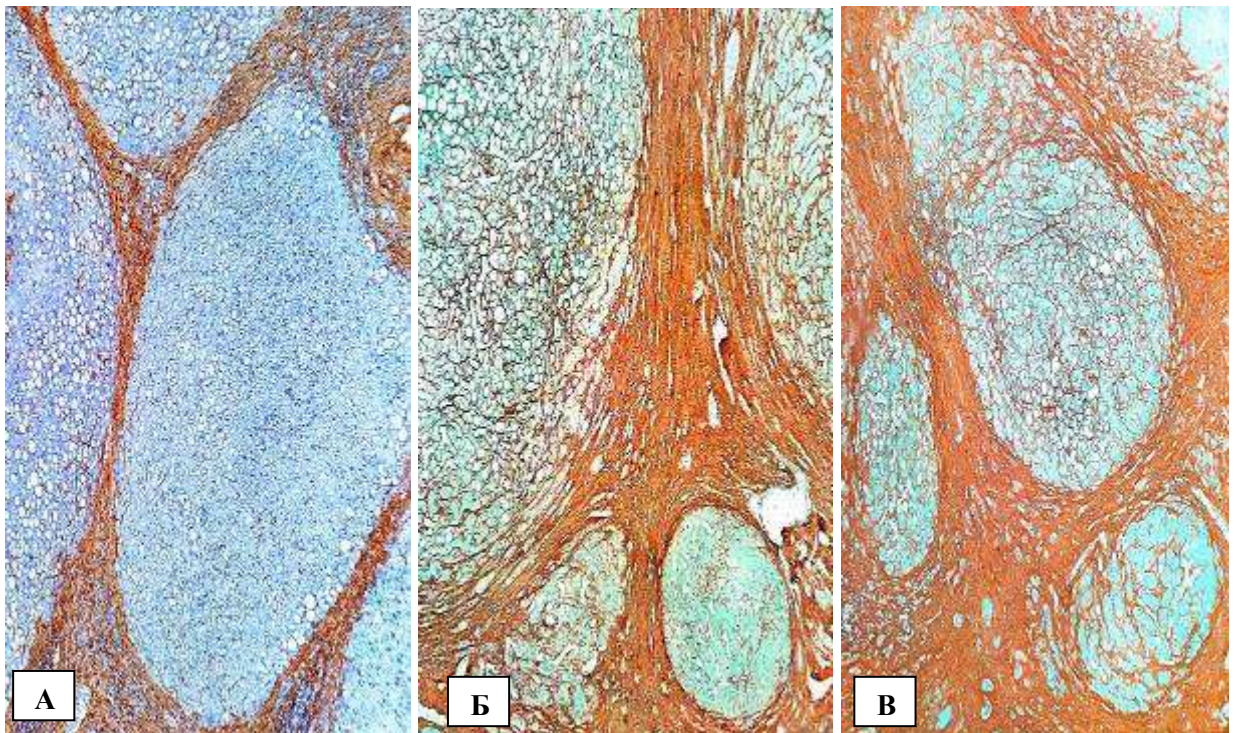


Рисунок 5.48 – Велика кількість α -SMA-позитивних фібробластів (А), колагенових волокон I типу (Б) і колагенових волокон IV типу (В) в фіброзно змінених портальних трактах і в фіброзних септах при мікронодулярному цирозі печінки у хворого на АСГ. А- Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, clone 1A4*. Б- Rb *a-Hu Collagen type I, clone RAH C11-0,1*. В- Мо *a-Hu Collagen type IV Ab-3, clone CIV 22 + PHM 12.36*.: А, Б і В x 100.

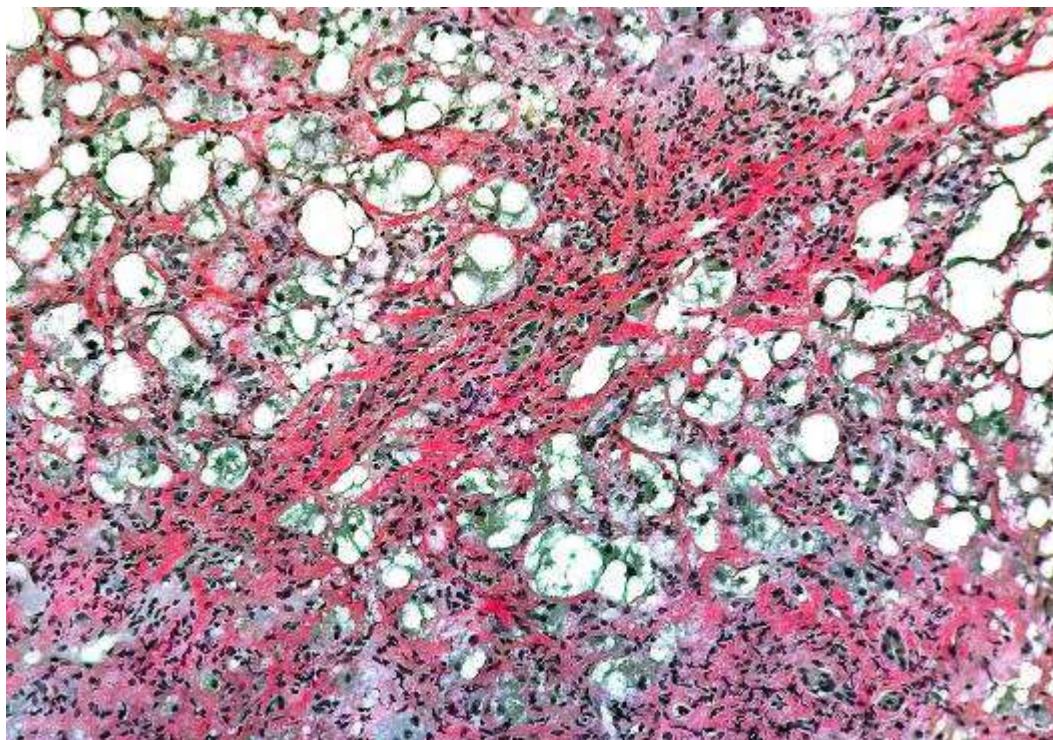


Рисунок 5.49 – Важкий перисинусоїдально-перичелюлярний фіброз з замукованими групами гепатоцитів зі стеатозом при цирозі печінки у хворого на НАСГ. Забарвлення за Ван Гізон. Зб.: x200.

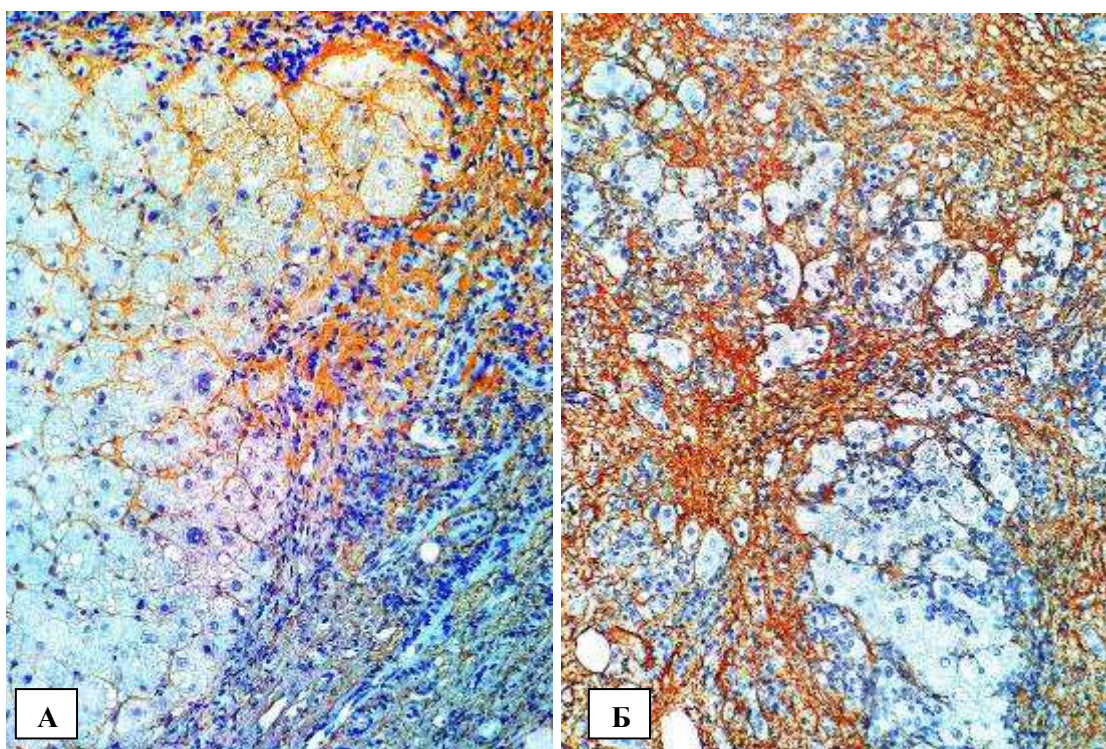


Рисунок 5.50 – Значно підвищена кількість колагенових волокон III типу (А) і IV типу (Б) в потовщеному портальному тракті печінки і в Z_1 перисинусоїдальній зоні при цирозі печінки у хворого на НАСГ (А) і АСГ (Б). А-*Rb a-Hu Collagen type III, Clone RAH C33*. Б- *Mo a-Hu Collagen type IV Ab-3, clone CIV 22 + PHM 12*. Зб.: А і Б x 200.

при мікронодулярному цирозі перисинусоїдально-перичелюлярного типу дорівнює 19,79 (18,20; 21,07) % СПГЗП, а при мікронодулярному цирозі портально- Z_{1-3} перисинусоїдального типу сягає 20,24 (18,64; 22,48) % СПГЗП. У хворих на НАСГ при мікронодулярному цирозі печінки площа депонування колагену I і IV типу досягає максимуму, при цьому площа депонування фібрилярного колагену I типу більш ніж на 50 % перевищує площу депонування фібрилярного колагену III типу.

У хворих на НАСГ при мікронодулярному цирозі печінки перисинусоїдально-перичелюлярного типу площа депонування колагену I і IV типу досягає максимуму [колаген I типу займає площу 24,03 (23,34; 24,49) % СПГЗП, а колаген IV типу - 26,00 (22,20; 29,92) % СПГЗП], при цьому площа депонування фібрилярного колагену I типу більш ніж на 50% перевищує площу депонування фібрилярного колагену III типу [24,03 (23,34; 24,49) % СПГЗП і 14,11 (13,35; 14,54) % СПГЗП, відповідно]. При мікронодулярному цирозі печінки портально- Z_{1-3} перисинусоїдального типу площа депонування колагену I типу також досягає максимуму і складає 25,36 (24,27; 26,05) % СПГЗП, в той час як площа депонування колагену III і IV типу стабілізується на рівні важкого F_3 фіброзу печінки і складає для колагену III типу 14,11 (13,35; 14,54) % СПГЗП, а для колагену IV типу - 24,00 (22,17; 27,79) % СПГЗП.

При мікронодулярному цирозі печінки перисинусоїдально-перичелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального типу завжди виявляється дуктулярна реакція різного ступеня виразності. По периферії сформованих мікродольок виявляються локуси проліферації овальних клітин з напластованими один на одного овальними ядрами, поруч з якими виявляються дрібні дуктули, вистелені одним рядом клітин з СК-7 позитивною цитоплазмою. Підвищене число дрібних дуктул з СК-7+ клітинами, виявляється також у потовщених через фіброз портальних трактах і невелике число - в фіброзних септах.

При ІГХ дослідженнях виявлено, що при мікронодулярному цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ в процесі дуктулярної репаративної реакції продовжується утворення нових псевдодольок в дольках, облямованих фіброзними прошарками і септами. СК7+ дуктули, поряд з якими локалізовані проміжні СК7+ гепатобіліарні клітини, глибоко занурюються в печінкові дольки, оточені фіброзно зміненими портальними трактами і фіброзними септами (рис. 5.51), і відокремлюють дрібні псевдодольки, в яких з проміжних СК7+ гепатобіліарних клітин диференціюються гепатоцити з цитоплазматичною експресією Нераг+ (рис. 5.52).

Водночас, за результатами ГХ і ІГХ досліджень встановлено, що у хворих на НАСГ і АСГ з цирозом печінки при прогресуванні дуктулярної реакції навколо дуктул активуються свої перидуктульні α SMA-позитивні фібробласти (рис.5.53), які синтезують надлишок колагенових волокон I, III і IV типу. Це сприяє посиленню портально-перипортального фіброзу, а також сприяє формуванню товстих портально-портальних септ при розповсюдженні реактивних дуктул по міждолькових межах від одного портального тракту до іншого (рис. 5.54).

В результаті мікроскопічних, ГХ і ІГХ досліджень встановлено, що несприятливими наслідками подальшого прогресування мікронодулярного цирозу у хворих на НАСГ і АСГ є занадто надмірне накопичення пустопорожніх дуктул в портальних трактах, що асоційоване з надмірним фіброзом портальних трактів, в яких визначається багато десятків пустопорожніх дуктул (рис.5.55). Другим несприятливим наслідком прогресування мікронодулярного цирозу є вкрай важкий перицелюлярний фіброз, який ізолює гепатоцити та веде до їх руйнування через стеатонекрози фрагментацію клітин (рис.5.56).

Таким чином, результати гістологічних, ГХ і ІГХ досліджень показали, що результатом репаративної дуктулярної реакції при стеатогепатиті у хворих на НАСГ і АСГ є поява нових поколінь гепатоцитів та формування

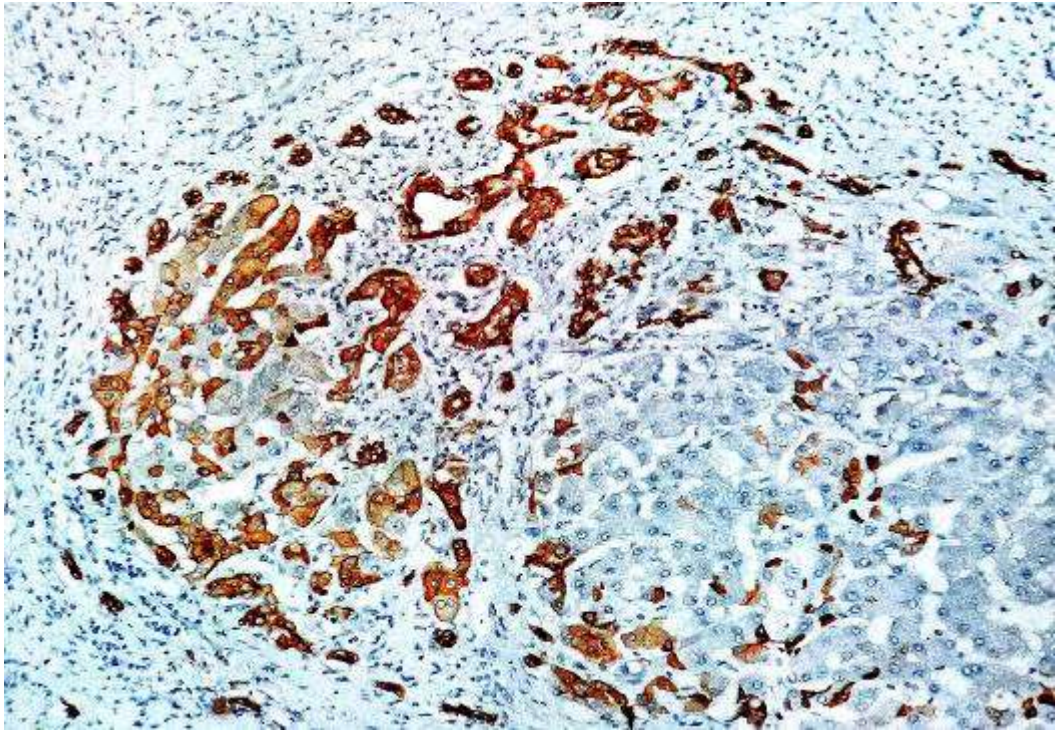


Рисунок 5.51 – Глибоке занурення в дольку СК7-позитивних дуктул разом з проміжними СК7+ гепатобілярними клітинами (ліворуч) при цирозі печінки при НАСГ. Мо *a-Hu Cytokeratine 7, clone OV-TL 12/30*. Зб.: x 200.

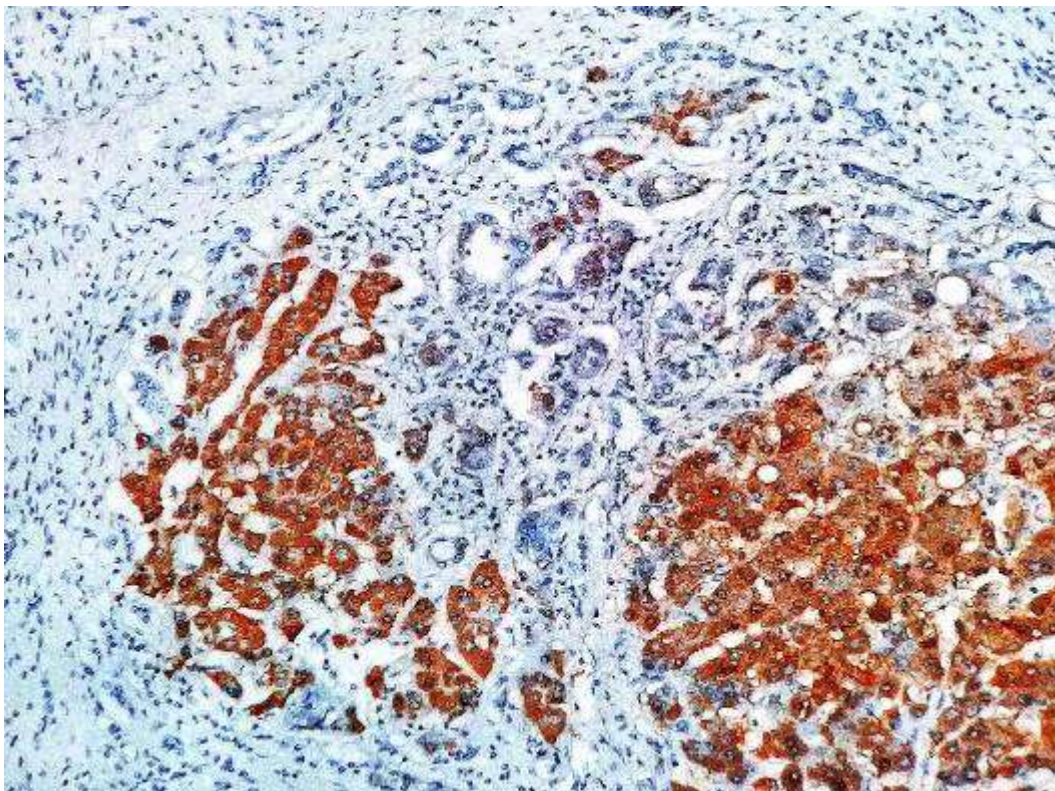


Рисунок 5.52 – Гепатоцити з цитоплазматичною експресією Нерар в новій псевдодольці (ліворуч) і в дольці (праворуч), з якої утворена нова псевдодолька при цирозі печінки у хворого на НАСГ. Мо *a-Hu Hepatocyte, Clone OCH1E5*. Зб.: x 200.

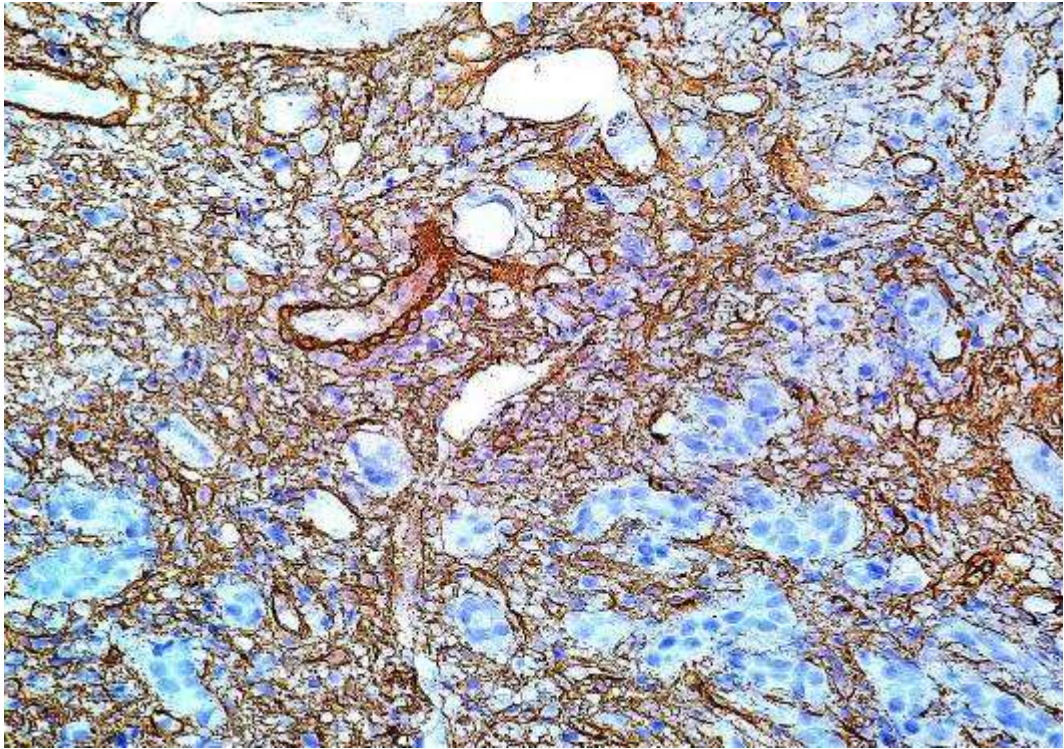


Рисунок 5.53 – Велика кількість перидуктальних α SMA-позитивних міофібробластів в потовщеному портальному тракті при цирозі печінки у хворого на АСГ. Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, clone 1A4*. Зб.: x 600.

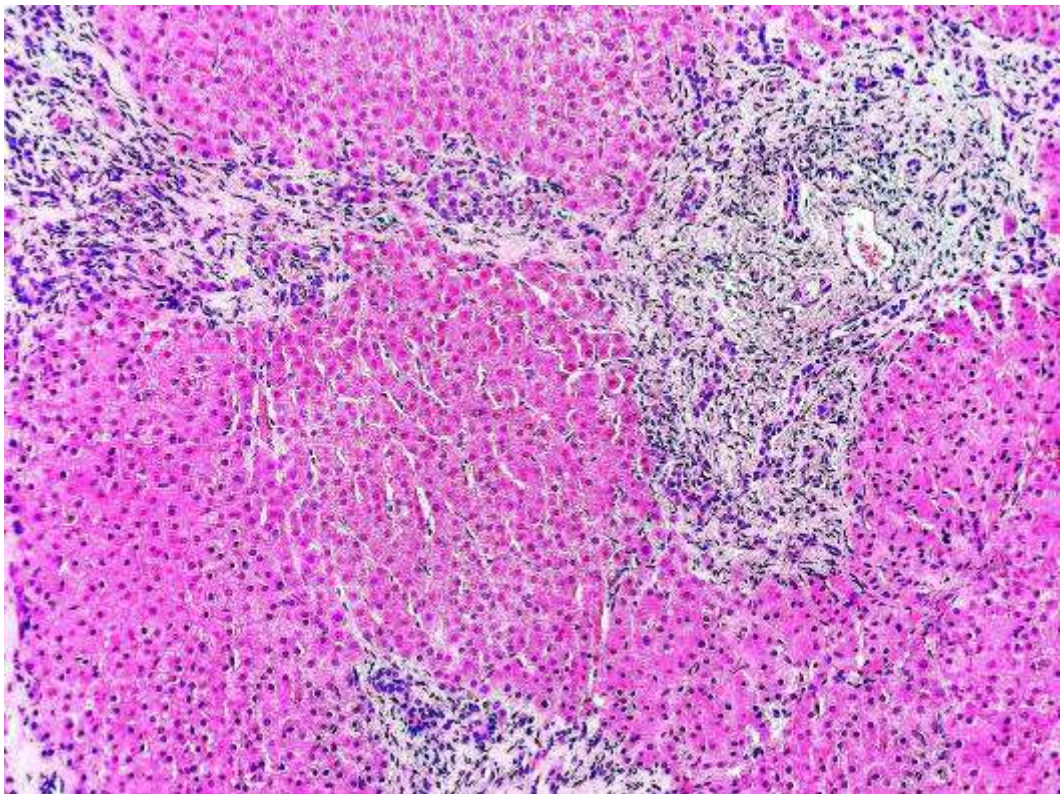


Рисунок 5.54 – Портально-портальна фіброзна септа, утворена навколо дуктул дуктулярної реакції при цирозі печінки у хворого на НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 100.

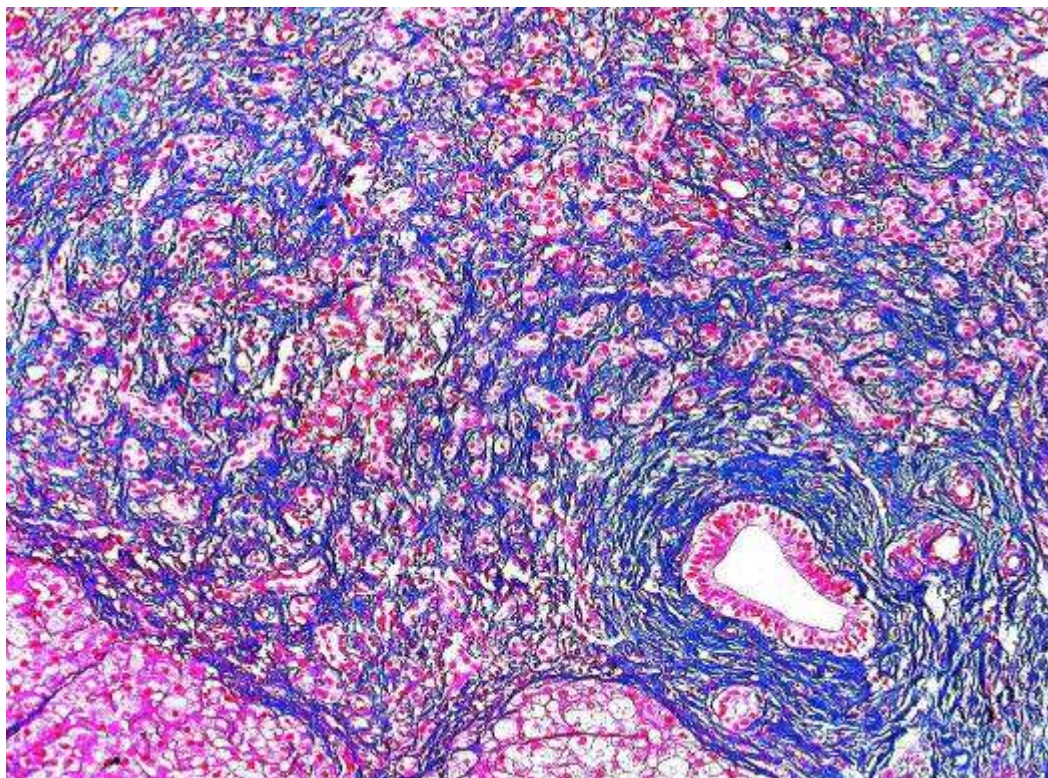


Рисунок 5.55 – Занадто надмірне накопичення пустопорожніх дуктул в потовщеному, фіброзно зміненому портальному тракті при цирозі печінки у хворого на НАСГ. Забарвлення Массон-трихром. Зб.: x100.

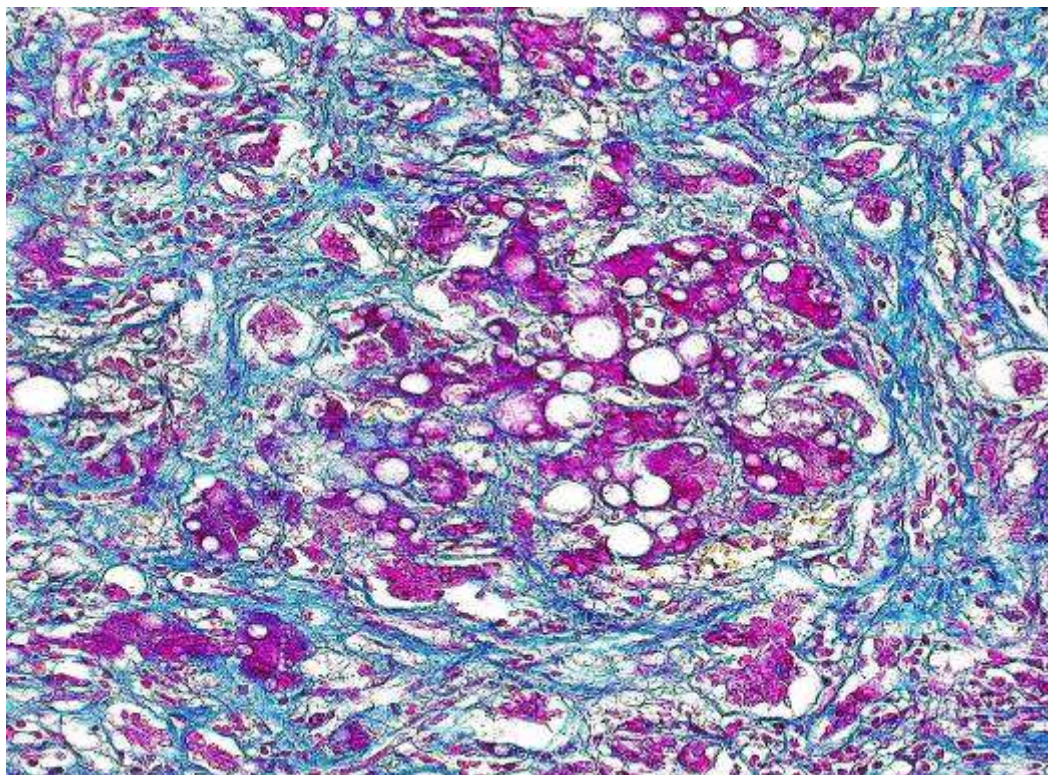


Рисунок 5.56 – Вкрай важкий перичелюлярний фіброз з ізоляцією і руйнуванням гепатоцитів при цирозі печінки у хворого на АСГ. Забарвлення за Ван Гізон. Зб.: x400.

нових дрібних холангіол. При мікроскопічному дослідженні біоптатів печінки, як правило, фіксується увага лише на холангіоцитарному компоненті репаративного процесу за участю прогеніторних клітин печінки. При рутинній мікроскопії трепанобіоптатів печінки без застосування спеціальних ІГХ методик поява нових поколінь гепатоцитів не виявляється, в той час як формування нових дуктул на периферії печінкових дольок і в портальних трактах чітко фіксується в світловому мікроскопі. Результати виконаних ІГХ досліджень показали, що при репарації стеатогепатиту важливу роль відіграє активація двох різних фіброзних шляхів: по-перше - перицелюлярний фіброгенез, пов'язаний з активацією пошкодженими гепатоцитами перисинусоїдальних зірчастих клітин; з іншого боку, пошкодження гепатоцитів стимулює активацію прогеніторних клітин печінки з розвитком дуктулярної реакції, в процесі якої активуються портальні міофібробласти, які посилюють портальний і портально-портальний фіброз. Репаративний процес при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ дискоординований в бік формування нових, функціонально малоцінних гепатоцелюлярних псевдодольок і накопичення пустопорожніх дуктул без жовчі в фіброзно змінених портальних трактах і фіброзних септах з надлишком депонованого колагену I, III і IV типу. Встановлено, що несприятливими наслідками подальшого прогресування мікронодулярного цирозу у хворих на НАСГ і АСГ є занадто надмірне накопичення пустопорожніх дуктул в портальних трактах, яке асоційоване з надмірним фіброзом портальних трактів, а також розвиток вкрай тяжкого перицелюлярного фіброзу, який ізолює гепатоцити та веде до їх руйнування через стеатонекроза і фрагментацію клітин.

Несприятливими ускладненнями НАСГ і АСГ є не тільки розвиток цирозу печінки, але й також розвиток раку печінки.

У біопсійно-секційному матеріалі 277 хворих АСГ і НАСГ гепатоцелюлярна карцинома печінки (ГЦК) нами була виявлена всього в 5-ти

(1,80 %) спостереженнях: у двох хворих на НАСГ і у трьох хворих на АСГ. При аналізі архівного матеріалу судово-гістологічних досліджень визначено, що стеатотичні зміни гепатоцитів печінки неуточненого генезу були виявлені у 359 померлих. Серед 359 померлих від цирозу печінки зі стеатотичними змінами гепатоцитів неуточненого генезу ГЦК була виявлена в 3-х випадках, що склали 0,84 % цієї групи померлих. Таким чином, з ретроспективно проаналізованих 636 біоптатів та секційного матеріалу АСГ, НАСГ і стеатоцирозу печінки неуточненого генезу гепатоцелюлярна карцинома на тлі цирозу печінки виявлена в 8 випадках.

При мікроскопчному дослідженні ГЦК пухлинні клітини заповнюють весь простір між фіброзними септами цирозу печінки, а також визначаються в прилеглий до септ тканині стеатогепатиту (рис. 5.57, 5.58). В різних частинах ГЦК зустрічаються пухлинні клітини різної структури, поліморфні за формою і розмірами. В переважній більшості пухлинні клітини мають щільну еозинофільну цитоплазму і відносно велике овальне базофільне ядро з щільним хроматином, в якому не диференціюється ядереце. Але в інших частинах однієї і тієї ж пухлини зустрічаються ракові клітини з везикулярною і світлою базофільною або прозорою цитоплазмою, а також вузькі веретеноподібні пухлинні клітини і вражаючі своїми розмірами гігантські ракові клітини. Кількість пухлинних клітин з фігурами мітозу та апоптотичних клітин варіює від невеликої до значної. Інколи в цитоплазмі пухлинних клітин виявляються внутрішньоклітинні холестази, тільця Малорі-Денка, дрібні і середні ліпідні везикули. При мікроскопії в ГЦК визначаються вогнищеві некрози і крововиливи, а також спостерігається інвазивне проникнення ракових клітин в перифокальну тканину печінки.

В різних частинах ГЦК, що розвивається при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ, пухлинні клітини формують різні, характерні для «класичного» гепатоцелюлярного раку, клітинно-гістоархітектонічні патерни. В одних місцях ГЦК поліморфні ракові клітини утворюють чотирьох або

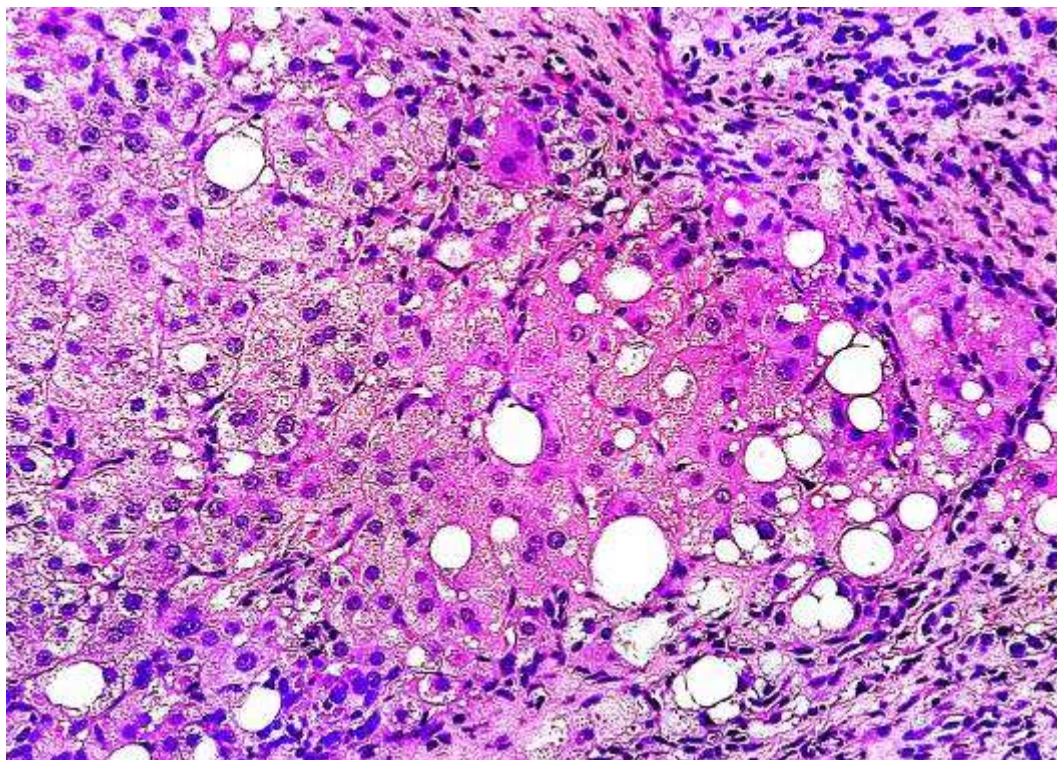


Рисунок 5.57 – Цироз печінки у хворого на НАСГ з гепатоцелюлярною карциною. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

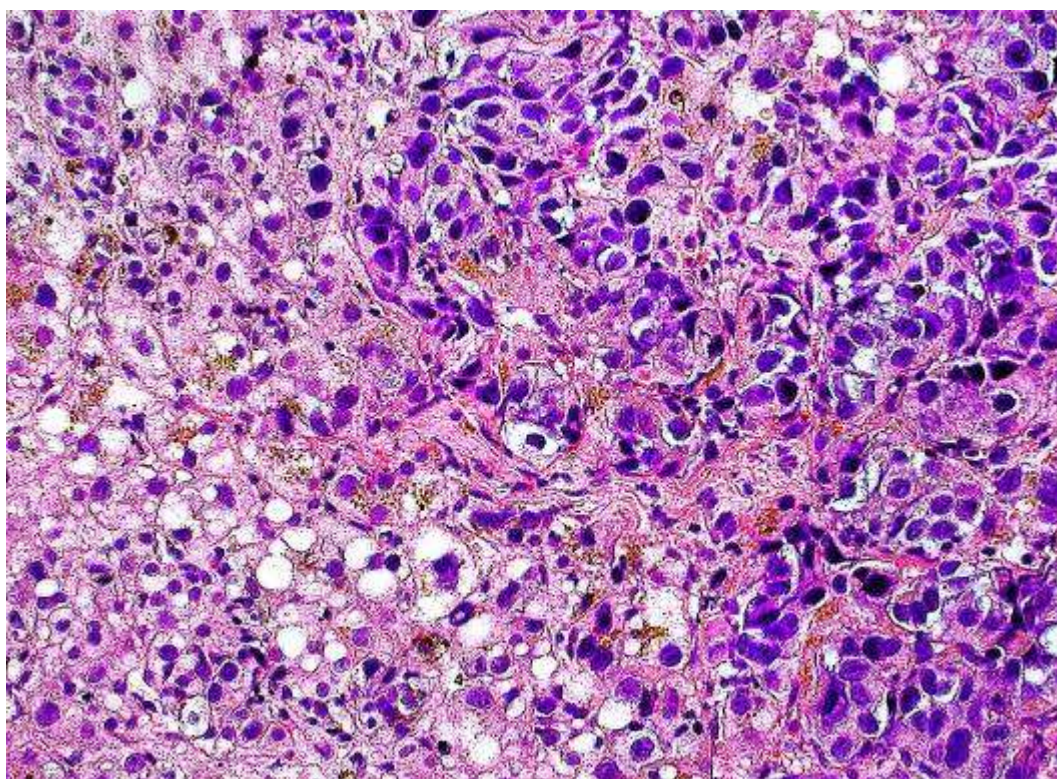


Рисунок 5.58 – Гепатоцелюлярна карцинома при цирозі печінки у хворого на НАСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

багатоклітинні трабекули, між якими локалізуються розширені атипові синусоїди, вистелені сплосченим ендотелієм (так званий трабекулярний патерн ГЦК).

В інших зонах ГЦК пухлинні клітини утворюють солідно-клітинний (компактний) патерн, який представляє собою поширені ділянки атипових, поліморфних пухлинних гепатоцитів з гіперхромними ядрами, між якими локалізовані вузькі і ледь помітні синусоїди (рис.5.59).

Ацинарний патерн гепатоцелюлярної карциноми формують значно розширені жовчні каналці з білковоподібним, еозинофільним матеріалом, навколо яких розташовуються пухлинні атипові гепатоцити (рис.5.60). Значно розширені жовчні каналці, які не містять жовчі, і розташовуються серед ракових гепатоцитоподібних клітин, віддалено нагадують залозисто-подібні структури, тому ацинарний патерн також інколи називається псевдозалозистим патерном ГЦК.

В ділянках ГЦК з наявністю значних прошарків фіброзної стромі різної конфігурації, товщини і довжини поміж скупченнями і рядами пухлинних клітин визначається так званий фіброзний патерн гепатоцелюлярної карциноми. У випадках переважання надмірно розвинутої фіброзної стромі над раковими клітинами діагностується так звана циротична гепатоцелюлярна карцинома.

Проведені нами дослідження показали, що при мікроскопії в гепатоцелюлярній карциномі, яка розвивається в цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ найбільш поширеними є трабекулярний, ацинарний і солідно-клітинний патерни.

Наявність значних прошарків фіброзу різної конфігурації, товщини і довжини поміж скупченнями і рядами пухлинних клітин дає підставу діагностувати в печінці з цирозом у хворих на НАСГ і АСГ так званий фіброзний патерн гепатоцелюлярної карциноми. Сполучнотканинні прошарки різної конфігурації і довжини, найбільш ймовірно, являють собою

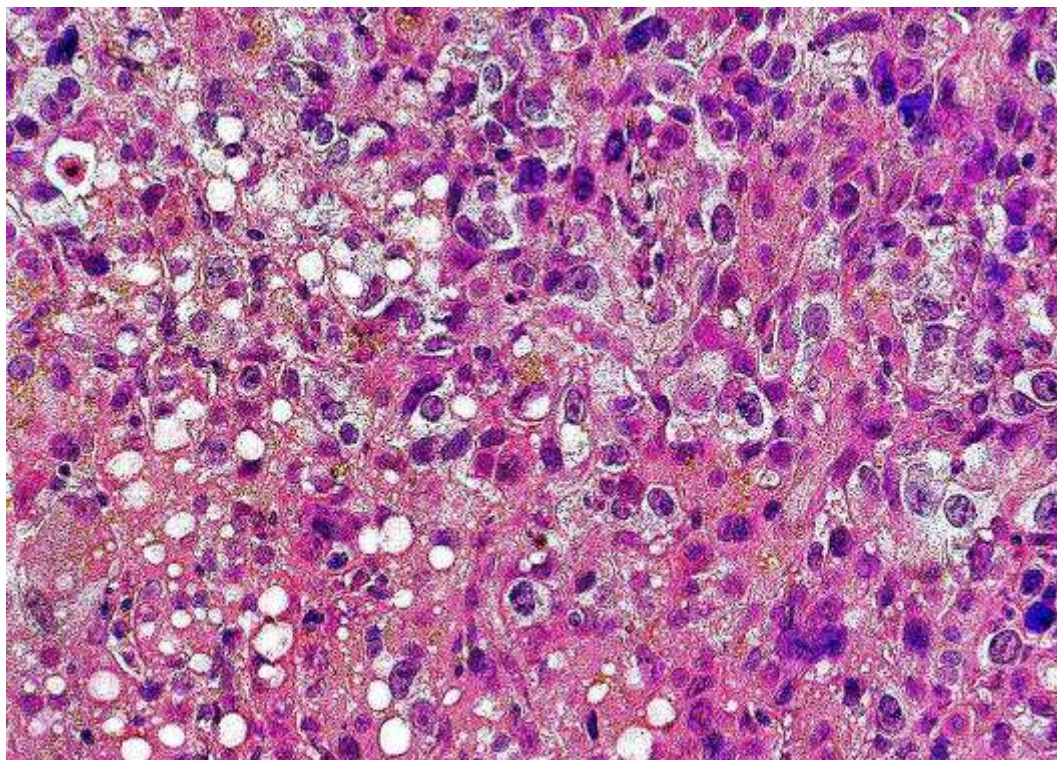


Рисунок 5.59 – Солідно-клітинний патерн гепатоцелюлярної карциноми при цирозі печінки у хворого на АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 600.

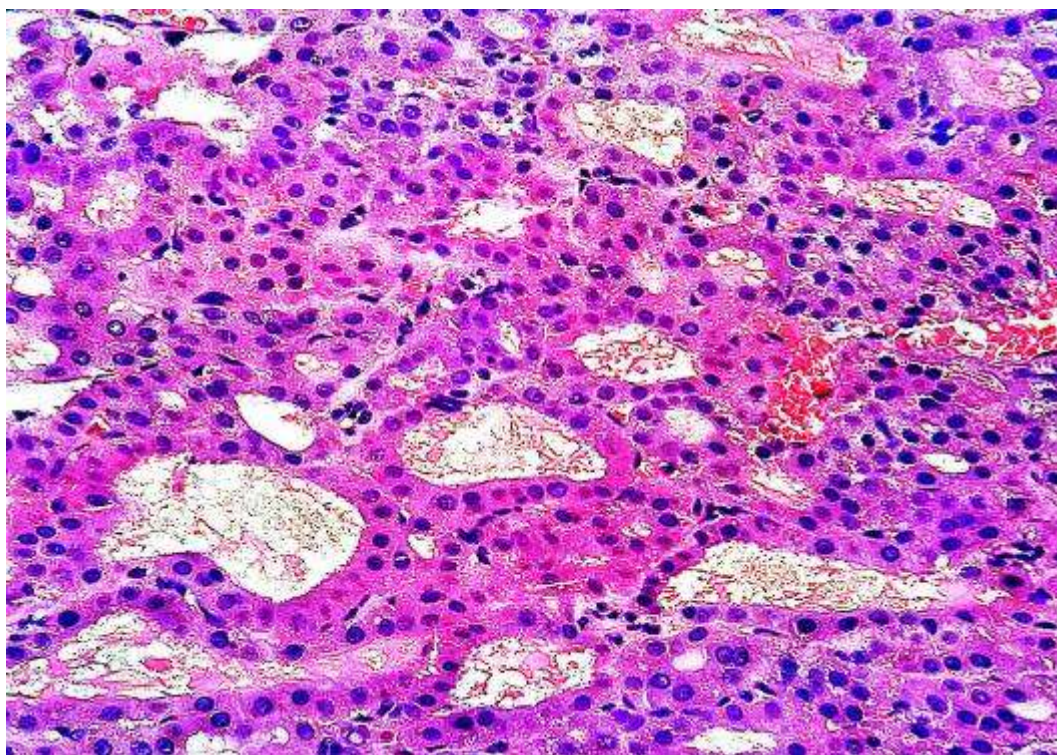


Рисунок 5.60 – Ацинарний патерн гепатоцелюлярної карциноми при цирозі печінки у хворого на АСГ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.: x 400.

фіброзну строму гепатоцелюлярної карциноми, розташовану поміж скупченнями пухлинних клітин, які оточені ледь помітними, атиповими, сплющеними пухлинними синусоїдами, вистеленими малочисленими ендотеліальними клітинами.

Між ступенем патоморфологічного диференціювання «класичного» гепатоцелюлярного раку і гепатоцелюлярної карциноми, що виникає при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ, різниці не встановлено. Типові для «класичного» гепатоцелюлярного раку солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни визначають високодиференційовану гепатоцелюлярну карциному у хворих на НАСГ і АСГ, в той час як скірозні, веретенноклітинні, поліморфноклітинні і гігантоклітинні патерни визначають низькодиференційовану гепатоцелюлярну карциному.

Проведені ІГХ дослідження показали, що у клітинах гепатоцелюлярної карциноми, що розвивається при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ, також як і у клітинах «класичного» гепатоцелюлярного рака виявляється цитоплазматична гранулярна експресія Нераг, а також варіабельна цитоплазматична експресія α -фетопроतेїну. Інтенсивна цитоплазматична гранулярна експресія Нераг визначається в 45-100 % пухлинних клітин трабекулярного, ацинарного і солідно-клітинного патернів гепатоцелюлярної карциноми (рис.5.61, 5.62). Експресія α -фетопроतेїну клітинами гепатоцелюлярної карциноми при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ спостерігається в меншій кількості пухлинних клітин (у 20-35 % клітин) і відрізняється значно меншою інтенсивністю. Такі ж особливості експресії α -фетопроतेїну притаманні клітинам «класичного» гепатоцелюлярного рака, який виникає при цирозі печінки у пацієнтів, які не хворіли на НАСГ і АСГ.

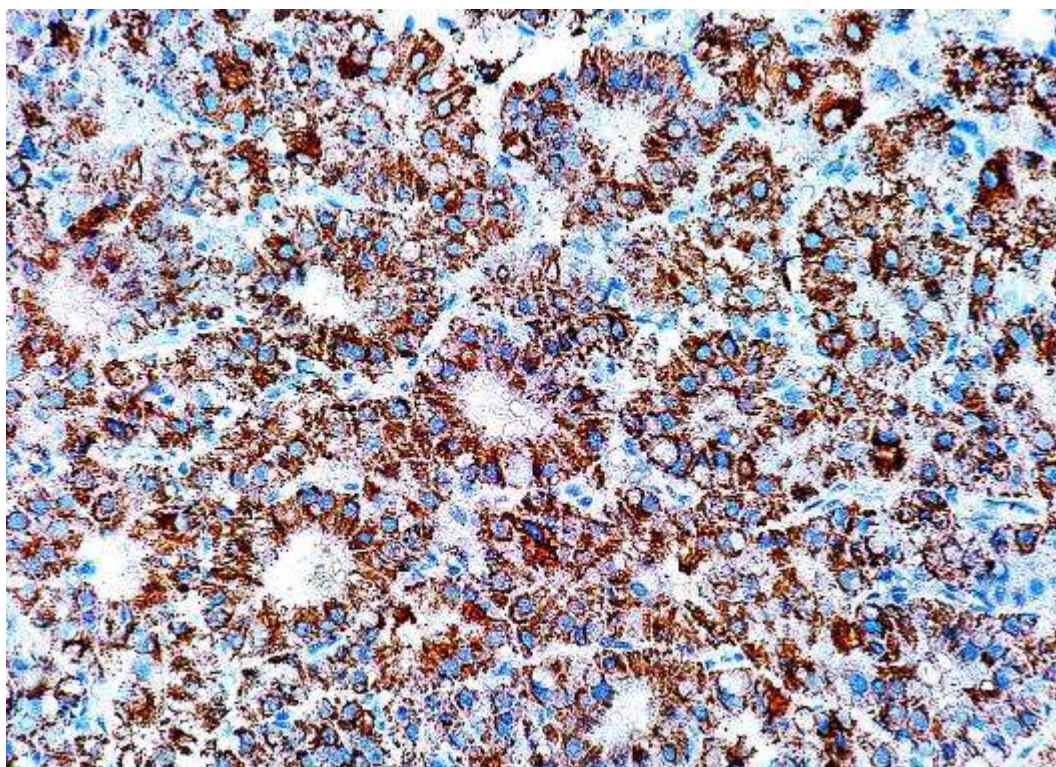


Рисунок 5.61 – Значна цитоплазматична гранулярна експресія Нераг практично всіма клітинами ацинарного патерну гепатоцелюлярної карциноми. *Mo α-Ну Hepatocyte, Clone OCH1E5. Зб. x400*

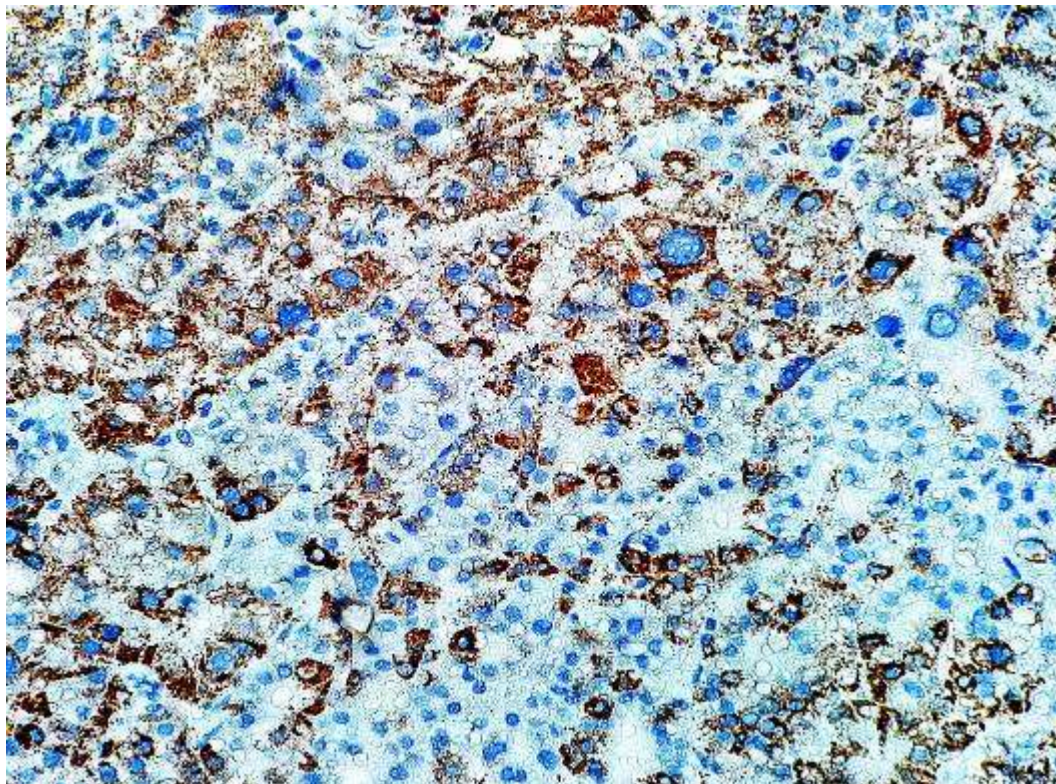


Рисунок 5.62 – Цитоплазматична гранулярна експресія Нераг половиною клітин солідно-клітинного патерну гепатоцелюлярної карциноми. *Mo α-Ну Hepatocyte, Clone OCH1E5. Зб. x400*

Резюме. ПГ, ГХ, ІГХ та ЕМ дослідження показали, що при НАСГ і АСГ розвивається або перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз, джерелами яких є нові покоління активованих перисинусоїдальних і портальних МФБ фіброгенного імунофенотипу з коекспресією ними α SMA, фасцину, віментину і відсутністю експресії десміна. За даними ФЦММ, при прогресуванні фіброзу від легкого F_1 ступеня до важкого F_3 фіброзу і до ЦП в печінці достовірно зростає площа α SMA+ МФБ, Масон+ молекулярно-волокнистого ПКМ та колагену I, III і IV типу портально- Z_{1-3} перисинусоїдальної або перисинусоїдально-перичелюлярної локалізації. ПГ, ГХ, ІГХ і ФЦММ методами показано, що перисинусоїдально-перичелюлярний і портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки різного ступеня є ПМ показником тяжкості НАСГ і АСГ.

Загибель гепатоцитів при СГ дуже рано активує перичелюлярний фіброгенез, у розвитку якого важливу роль відіграють CD68+ і S100+ макрофаги, які активують перисинусоїдальні МФБ в локусах максимального руйнування гепатоцитів. Незворотні пошкодження гепатоцитів в умовах перичелюлярного фіброзу також активують прогеніторні клітини печінки і репаративну дуктулярну реакцію. Максимальні прояви дуктулярної реакції виявлені при ЦП в гепатобіоптатах у 12 % хворих на НАСГ і АСГ. В активній фазі дуктулярної реакції на межі периферії печінкових дольок і портальних трактів в проекції каналців Герінга появляються клітинні скупчення, розгалужені клітинні ланцюжки і реактивні дуктули, які містять клітини з імунофенотипом прогеніторних клітин печінки, клітини проміжного гепато-біліарного диференціювання, біліарного і гепатоцитарного диференціювання. В клітинних скупченнях визначається проліферація прогеніторних клітин (за експресією Ki-67). Розгалужені клітинні ланцюжки і дуктули з клітинами біліарного диференціювання, гепатоцитоподібними CK7+ проміжними клітинами і з клітинами гепатоцитарного диференціювання проникають вглиб печінкових дольок, а

також в портальні тракти. Встановлено, що прогеніторні клітини печінки диференціюються в гепатоцити через проміжні гепатобіліарні і гепатоцитоподібні клітини, цьому сприяє наявність ламініну в нішах прогеніторних клітин та поява ламініну в ПЗМ печінкових дольок.

Ускладненням НАСГ і АСГ є мікронодулярний ЦП перисинусоїдально-перичелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального типу, визначений у 10,48% хворих. Активація репаративної дуктулярної реакції при ЦП спрямована на поповнення дефіциту гепатоцитів і біліарних структур. Одним з проявів дуктулярної реакції при ЦП є утворення гепатоцелюлярних псевдодольок печінки, які містять на периферії нечисленні проміжні СК-7+ гепатоцити і не мають центролобулярних вен та упорядкованих синусоїдів. Коли площа дольок і псевдодольок при тяжкому мікронодулярному ЦП стає рівною або меншою площі прилеглого до них фіброзу, має місце паралельне зростання числа Ki-67 + гепатоцитів в псевдодольках та числа Ki-67 + клітин в портально-долькових дуктулах і ланцюжках. Другим наслідком репаративного процесу при ЦП є формування нових порожніх дуктул без жовчі в портальних трактах з фіброзом і в фіброзних септах. Встановлено, що несприятливими наслідками прогресування ЦП у хворих на НАСГ і АСГ є надмірне накопичення порожніх дуктул в портальних трактах, яке асоційоване з надмірним портальним фіброзом і з мостоподібним портально-портальним фіброзом, а також зростання вкрай важкого 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. ГЦК у хворих на НАСГ і АСГ, має характерні патерни: трабекулярний, солідно-клітинний і ацинарний. В клітинах ГЦК виявляється експресія Нераг та варіабельна експресія α -фетопротеїну.

Основні положення цього розділу опубліковані в 4-х статтях [181, 190-192] т 5-ти тезах [182, 189, 193-195].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведені дослідження дозволили визначити основні ПГ, ГХ, ІГХ та ЕМ мікроскопічні характеристики алкогольного і неалкогольного стеатогепатиту, особливості репаративних процесів в печінці, морфологічні параметри активації стеатогепатиту та його прогресування в цироз печінки.

За даними ретроспективного аналізу клініко-лабораторних даних дисфункція печінки у обстежених нами хворих НАСГ і АСГ проявлялася підвищенням в сироватці крові значень АЛТ більше ніж в 10 разів і АСТ більше ніж в 5 разів, при цьому коефіцієнт де Рітиса знижувався і становив менше 0,5. За літературними даними у хворих на хронічний стеатогепатит у сироватці крові визначається підвищення рівня АСТ у 2–8 разів та АЛТ у 2–10 разів, порівняно з нормою; при цьому зазначається, що співвідношення АСТ/АЛТ не дозволяє знайти відмінності між АСГ та НАСГ. Співвідношення АСТ/АЛТ, що перевищує 3, виявляють приблизно у 32 % пацієнтів з НАСГ, значення більше 1 — у 40 %. Гіпербілірубінемію (у межах 30–60 мкмоль/л) виявляють у 12–17 % випадків, значно частіше вміст білірубину зберігається в межах норми, активність ЛФ та γ -ГТ підвищена у 40–70 % пацієнтів [196-198].

За результатами лабораторних аналізів у пацієнтів, включених у патоморфологічне дослідження, значення фракцій загального, некон'югованого і кон'югованого білірубину варіювали в межах фізіологічних коливань. Про порушення білково-синтетичної функції печінки у хворих на хронічний стеатогепатит свідчило підвищення значень тимол-вероналової проби більш ніж в 2 рази при НАСГ і в 4-5 разів - при АСГ, що узгоджується з літературними даними, за якими такі зміни визначаються у 25 - 30 % хворих на хронічний стеатогепатит [199].

За лабораторними даними хворих на НАСГ, що страждали на цукровий діабет 2 типу та інсулінорезистентність, характерною була дисліпідемія, з підвищенням рівнів ліпопротеїнів високої і низькою щільності. За даними УЗД і КТ печінки у більшості пацієнтів, які страждали НАСГ і АСГ, визначалася гетерогенна структура збільшеної печінки, у багатьох випадках виявляли множинні гіперехогені вогнища. Згідно з даними літератури серед важливих діагностичних маркерів НАСГ, що розвинувся на фоні інсулінорезистентності, є показники порушення вуглеводного обміну та відносної інсулінової недостатності, зокрема гіперглікемія натщесерце, яку виявляють у 55–70% хворих, порушення толерантності до глюкози — у 85–100% хворих [200-201].

Важливими показниками серед проаналізованих нами лабораторних даних були підвищені у пацієнтів рівні сироваткового заліза (понад 30,43 мкмоль / л) і феритину (понад 250 мкг / л), що узгоджується зі світовими дослідженнями, які свідчать про підвищення рівня сироваткового феритину, тісно пов'язаного з відкладенням заліза в печінці хворих на НАСГ та АСГ і корелює з інсулінорезистентністю, більш розвиненим фіброзом і підвищеною смертністю пацієнтів [202-203]. Причиною вище зазначених розладів автори вважають істотну гіперінсулінемію, гіперлептинемію та явища інсуліно- та лептинорезистентності. Підвищення вмісту лептину в крові та насичення трансферину залізом у хворих на НАСГ позитивно корелюють з вираженістю фіброзу печінки [198,204].

За результатами досліджень біопсійно-секційного матеріалу печінки хворих на АСГ та НАСГ нами був виявлений стеатоз гепатоцитів переважно проміжних Z_2 та перипортальних Z_1 зон печінкових дольок, що інші дослідники [205] пов'язують з гістофізіологічними особливостями перипортальних Z_1 зон печінкових дольок, кращою оксигенацією перипортальних гепатоцитів в порівнянні з гепатоцитами перивенулярних зон та більш підвищеним тиском на периферії дольки і зниженням цих

градієнтів до її центру. Внаслідок таких особливостей перипортальні гепатоцити є більш уразливими до дії ацетальдегіду при АСГ та до процесів β -окислення жирних кислот при НАСГ [205].

За результатами проведених мікроскопічних досліджень загальною ознакою активації хронічного стеатогепатиту, характерною для хворих на НАСГ і АСГ, є зростання тяжкості стеатозу печінки від S_1 до S_3 ступеня. За нашими даними серед хворих на АСГ тяжкий S_3 стеатоз печінки діагностовано у 42 % пацієнтів, помірний S_2 стеатоз печінки – у 30 % хворих, легкий S_1 стеатоз печінки діагностовано 28 % пацієнтів. У хворих на АСГ по мірі зростання стеатозу печінки від легкого S_1 до помірного S_2 і важкого S_3 ступеня спостерігалася інтенсифікація і поширення до панлобулярного переважно мікроезичулярного стеатозу гепатоцитів, який нерідко комбінувався з домішком макроезичулярного стеатозу. Деякі автори в своїх дослідженнях визначають, що формування макроезичулярного стеатозу при АСГ є наслідком дії та метаболізму спиртової дегідрогенази і цитохрому P450 2E1 (CYP2E1), які генерують відновлену форму нікотинамідаденіндинуклеотида (NADH), що стимулює синтез і окислення жирних кислот, знижуючи екскрецію тригліцеридів у кров, та є результатом зменшення синтезу апопротеїнів; формування патерна мікроезичулярного стеатозу є також наслідком токсичної дії ацетальдегіду та результатом пошкодження мітохондрій гепатоцитів, що приводить до β -окислення жирних кислот, які в надлишку мають ліпотоксичні властивості та пошкоджують гепатоцити [206].

Серед морфологічно обстежених хворих на НАСГ тяжкий S_3 стеатоз печінки діагностувався у 20 % пацієнтів, помірний S_2 стеатоз печінки – у 48 % хворих, легкий S_1 стеатоз печінки у 32 % пацієнтів. У хворих на НАСГ поширюється переважно макроезичулярний стеатоз, або макро-середньоезичулярний стеатоз гепатоцитів, який охоплює всі зони печінкових дольок і стає панлобулярним. Формування змішаного патерну

стеатозу при НАСГ в літературі пов'язують зі зниженням рівня адипонектина, який відіграє важливу роль у підтриманні толерантності до інсуліну, оскільки безпосередньо активізує 5'-аденозинмонофосфат-активовану протеїнкіназу (АМРК), інтенсифікує окислення жирних кислот, що сприяє появі вільних радикалів, які викликають окислювальний стрес, пошкоджуючи мембрани гепатоцитів [207]. Нашими дослідженнями доведено, що ступінь тяжкості стеатозу печінки S_1 - S_2 - S_3 в гепато-трепанобіоптатах серед хворих на НАСГ і АСГ відзеркалює ступінь розповсюдженості стеатозу гепатоцитів на момент біопсії печінки. Стеатоз гепатоцитів є лабільним і зворотнім процесом.

За даними ЕМ гепатоцитів у хворих на НАСГ та АСГ було виявлено, що зовнішня поверхня ліпідних крапель в гепатоцитах вкрита тонким шаром з білків помірної електронної щільності і має множинні дрібні кавеоли на межі з цитозолем гепатоцитів, які свідчать про активний стан ліпідних крапель і забезпечують транспорт ліпідів з краплі в цитозоль, або з цитозолу гепатоцита в ліпідну краплю. Відомо що кавеоли гепатоцитів містять структурний білок кавеолін-1 (CAV1), який виконує регуляторні функції печінки, контролює проліферацію гепатоцитів. Порушення структурних властивостей кавеолінів призводить до нерегульованого і неконтрольованого накопичення ліпідів у печінці при стеатозі, гепатиті і цирозі [208].

Субмікроскопічною особливістю гепатоцитів у хворих на АСГ і НАСГ була наявність в їх цитоплазмі значної кількості витягнутих та загнутих, циліндричних гігантських мегамітохондрій з короткими кристами та електронно-щільними, голчастими паралельними паракристалічними структурами в їх центральній частині. Поява мегамітохондрій при АСГ і НАСГ пояснюється пошкодженням гепатоцитів окисленими фосфоліпідами або ліпопротеїнами [15] і підтверджується багатьма дослідниками [209-210].

Проведений нами ВЕР-ХМС аналіз показав, що в печінці померлих хворих на НАСГ по мірі зростання тяжкості стеатозу, в печінці достовірно підвищується вміст холестерину і його ефірів. При ретроспективному аналізі лабораторних даних визначено, що у померлих пацієнтів з тяжким S_3 неалкогольним стеатогепатитом має місце позитивна кореляційна залежність між підвищеним рівнем загального холестерину і ліпопротеїнів високої щільності в плазмі крові за життя цих хворих. Згідно з даними літератури гіпер- та дисліпідемія виявляється у 50–60 % хворих на НАСГ, вона обумовлена підвищенням вмісту загального холестерину, триацилгліцеролів, ЛПНЩ та ЛПДНЩ [34]. За даними P. Puriet et al. (2009) рівень вільного холестерину в печінці був підвищеним у хворих на НАСГ і залишався без змін у групі здорових пацієнтів [211], A. E. Feldstein [212] в своїх дослідженнях вказує на позитивну кореляцію між підвищеним рівнем ТГ, ЛПВЩ, АЛТ і АСТ в плазмі крові пацієнтів, що страждали на НАСГ. Відомо, що процес дисрегуляції метаболізму вільного холестерину у хворих на НАСГ обумовлений наявністю цукрового діабету 2 типу та інсулінорезистентністю, при яких підвищується синтез холестерину і знижується його виведення з печінки через ефлюксні шляхи [213-214]. За даними Y. Takeshita et.al. [215] надмірна концентрація вільного холестерину і насичених вищих жирних кислот (НВЖК) в печінці призводить до порушення функції мітохондрій і ендоплазматичної сітки, активує накопичення внутрішньоклітинних оксистеринів, які мають ліпотоксичну дію і призводять до стеатоза гепатоцитів [216].

Проведені нами ВЕР-ХМС дослідження показали, що при тяжкому S_3 стеатозі в печінці померлих хворих на НАСГ реєструється значно підвищений вміст насичених НВЖК: стеаринової та пальмітинової кислот.

Встановлено, що у померлих хворих важким НАСГ між ступенем тяжкості стеатозу печінки і підвищеним рівнем пальмітинової і стеаринової кислот в печінці має місце достовірна залежність. У померлих хворих на

НАСГ з патогістологічно діагностованим тяжким S₃ стеатозом печінки при ВЕР-ХМС аналізі було встановлено підвищений рівень холестерину в печінці, який корелював з підвищеним рівнем загального холестерину і ЛПВЩ в плазмі крові за життя цих хворих. Експериментальні дослідження S. Subramania et al. (2011). показали, що НВЖК (зокрема, пальмітинова і стеринова кислоти) і вільний холестерин є центральними молекулами ліпотоксичності при НАСГ [217-218]. Інші автори також пов'язують трансформацію простого стеатоза в НАСГ з феноменом ліпотоксичності, обумовленим накопиченням в гепатоцитах НВЖК, які є складовими компонентами тригліцеридів [34]. При пошкодженні гепатоцитів активується фермент елонгаза, що запускає процес елонгації пальмітинової кислоти в стеаринову кислоту, тобто при надмірному підвищенні рівня пальмітинової кислоти в печінці з неї синтезується стеаринова кислота, яка має більшу ліпотоксичну дію в печінці.

Підвищення рівня НВЖК в плазмі крові призводить до зниження секреції інсуліну β-клітинами підшлункової залози [219] та до активації термінальної кінази (JNK) і білка FoxO3a [213, 220], які беруть участь в інтенсифікації ліпоаптозу гепатоцитів. В останні роки з'ясовані деякі молекулярні шляхи ліпотоксичності НВЖК, які є більш ліпотоксичними для гепатоцитів, ніж ненасичені жирні кислоти. Зокрема, пальмітинова кислота і її ефіри активують через термінальну кіназу-1 (JNK1) в культивованих гепатоцитах про-апоптотичний протеїн PUMA із сімейства Bcl-2, а експресія PUMA індукує ліпоаптоз гепатоцитів. Крім цього, пальмітат і інші насичені вільні жирні кислоти прямо активують Toll-подібні рецептори в макрофагах печінки [9]. Показано, що в розвитку НАСГ значну роль також відіграють ω-6 ейкозаноїди, а саме метаболіти арахідонової кислоти: 12-гідрокси-гептатрієноєва кислота і 11,12-дигідрокси-ейкозатрієноєва кислота та простагландини E2 і D2, рівень яких підвищується при тяжких стадіях стеатозу і при його трансформації в стеатогепатит, тому їх визначення в

плазмі крові запропоновано використовувати як біомаркер неінвазивної диференційної діагностики НАЖХП і НАСГ [221].

При ПГ дослідженнях нами було визначено, що НАСГ і АСГ характеризуються неспецифічними, патоморфологічними змінами печінки, які з різною частотою та інтенсивністю виявляються як у хворих НАСГ, так і у хворих АСГ. До сукупності патоморфологічних ознак НАСГ і АСГ відноситься зональний стеатоз гепатоцитів різного ступеня виразності; наявність мегамітохондрій в стеатотично змінених гепатоцитах; наявність стеатонекрозу, апоптозу і балонного цитолізу гепатоцитів, гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і нейтрофільно-клітинним сателітозом; наявність осередкової запально-клітинної інфільтрації переважно печінкових дольок; поява локусів килінгу пошкоджених гепатоцитів, іноді - стеатогранульом; в деяких випадках - посилення аутофагії в стеатотично змінених гепатоцитах з накопиченням в них ліпофусцину, депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах печінки; наявність фіброзу печінки різної тяжкості або мікронодулярного цирозу печінки перисинусоїдально-періцелюлярного або портально- Z_{1-3} перисинусоїдального типу, низька ймовірність розвитку гепатоцелюлярного раку. Встановлено, що зміни в печінці хворих на АСГ і НАСГ мають несуттєві патоморфологічні відмінності (НАСГ відрізняється від АСГ переважанням крупно-середньовезикулярного 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). До аналогічних висновків про відсутність достовірних диференційних патогістологічних відмінностей між НАСГ і АСГ в останні роки прийшли також і інші патоморфологи, що спеціалізуються в гепатології [17,222]. Нами визначено, що патоморфологічні зміни, які виявляються в трепанобіоптатах печінки, є недостатніми для диференційної діагностики АСГ і НАСГ, встановити

відповідний діагноз в трепанобіпнаті печінки можливо лише при наявності необхідних анамнестичних і клініко-лабораторних даних хворих.

Складовими морфологічними компонентами ураження гепатоцитів печінки при НАСГ та АСГ є тілець Малорі-Денка. Згідно досліджень різних авторів тілець Малорі-Денка виявляються в печінці імуногістохімічними методами орієнтовно у 71 % хворих стеатогепатитом різного генезу, а при забарвленні гематоксиліном та еозином - виявляються лише у 40 % хворих [223]. Збільшення кількості тілець Малорі-Денка в гепатоцитах вважається маркером тяжкості або прогресування НАСГ і АСГ [223]. Н.С.Pinto et al. [224] вказує, що лейкоцитарний сателітоз та моноклеарна інфільтрація навколо балонних гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і стеатонекрозу гепатоцитів незалежно пов'язані з формуванням перицелюлярного і портального фіброзу. Поява тілець Малорі-Денка в культивованих клітинах не порушує життєздатність гепатоцитів [225].

До теперішнього часу продовжується вивчення морфогенезу загибелі спеціалізованих клітин. В наших дослідженнях визначено, що в печінці хворих на НАСГ і АСГ спостерігається загибель гепатоцитів шляхом стеатонекрозу, апоптозу, балонного цитолізу та фероптозу. Результати досліджень останніх років, підсумовані в оглядах Ch. Trautwein et al., A. Takaki et al., F. Stickel et al. [7,143-144], показали, що при НАСГ і АСГ до некроптозу і апоптозу гепатоцитів ведуть окислювальний стрес, дисфункція мітохондрій, стрес ендоплазматичного ретикулуму в гепатоцитах з внутрішньоклітинним накопиченням ліпідів (при НАСГ - через зниження ефективності антиоксидантного захисту, при АСГ - через токсичну дію алкоголю і ацетальдегіду).

Сьогодні визначені молекулярні шляхи розвитку фероптоза клітин [97-98], але морфологічні прояви такого виду загибелі клітин не описані. В наших дослідженнях визначено, що у хворих на АСГ з накопиченням різновалентного заліза гепатоцитах і макрофагах, в печінці спостерігаються

зменшені гепатоцити, цитоплазма яких повністю заповнена щільними накопиченнями тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза. Такі клітини мають зменшене, пікнотичне або фрагментоване ядро, в препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, такі клітини оточені начебто оптично пустою щілиною, яка насправді являє собою відростки CD 68-позитивних макрофагів. Такі ГХ і мікроскопічні параметри стали обґрунтуванням того, що такі клітини, найімовірніше, є гепатоцитами в стані фероптозу. Мікроскопічна характеристика і молекулярні шляхи апоптозу гепатоцитів в достатній мірі вивчені при хронічному вірусному гепатиті [226-227]. Апоптотично змінені гепатоцити містять фрагменти СК 18, що вивільняються в кров [15], тому підвищені рівні циркулюючих фрагментів СК 18 іноді використовуються для діагностики НАСГ [228].

Майже всі дослідники вважають балонні гепатоцити ознакою активації стеатогепатиту, ІГХ дослідження показали втрату такими клітинами СК8 і 18, часто асоційовану з імунореактивністю до убіквітину [14-15]. Методами ІГХ і електронної мікроскопії нами визначено, що так звані балонні гепатоцити, є клітинами в стані балонного цитолізису. Про це свідчить спустошення цитоплазми балонної клітини та значне збільшення її об'єму за рахунок набухання цитозолу, втрата цими клітинами цитокератинових мікрофіламентів цитозолу, різке зменшення в цитоплазмі кількості цистерн ГрЕС і ГЕС, структур комплексу Гольджі, мітохондрій, а також відсутність гранулярної експресії Нераг – антитіла, яке реагує з ферментом карбаміл-фосфатсінтазой-1 циклу сечовини в мітохондріях печінки. В останні роки увагу патологоанатомів зосереджують на диференційних відмінностях балонних гепатоцитів від гепатоцитів з тяжким крупновезикулярним стеатозом [229]. Незважаючи на певні суперечності в розумінні структури балонних клітин [чи обов'язковим для балонних гепатоцитів є наявність тілець Малорі-Денка, центрально (а не периферійно) локалізованого ядра, чи можуть в цитоплазмі цих клітин виявлятися вакуолі], в останнє десятиріччя

прийшли до згоди, що морфологічним проявом гепатоцелюлярного балонування є набухання цитоплазми, згущення в ній еозинофільних проміжних філаментів, втрата цитокератинів 8 і 18, накопичення убіквітованих білків [114], дрібних крапель з окисленими фосфоліпідами і зміненою експресією периліпіна [230], а також продукція sonic hedgehog та лігандів hedgehog сигнального шляху [231-232]. Ці клітини є проявом ліпотоксичності [9] і знаходяться в стані «нежиттєздатності», вони виділяють різні фактори (включно sonic hedgehog), які сприяють фіброзному ремоделюванню печінки [80,271], або активують прогеніторні клітини печінки [233]. Провідні спеціалісти з патології печінки вважають балонування гепатоцитів незворотнім набуханням клітин, яке може закінчуватися руйнуванням гепатоцитів [229].

У біоптатах печінки деяких хворих на НАСГ при світловій мікроскопії нами виявлена значна активація аутофагії в стеатотично змінених гепатоцитах, яка проявлялась значним і поширеним накопиченням в їх цитоплазмі гранул ліпофусцину. При ЕМ в цитоплазмі таких стеатотично змінених гепатоцитів нами виявлена величезна кількість аутофаголізосом. Аутофагія являє собою процес, при якому білково-ліпідні агрегати і фрагменти пошкоджених органел оточуються подвійною мембраною, яка зливається з лізосоною, утворюючи аутофаголізосому для деградації цих пошкоджених цитозольних компонентів [234].

Нами також було виявлене значне депонування різновалентного заліза в гепатоцитах і в макрофагах Купфера печінки деяких хворих на НАСГ, а у хворих на АСГ - також в холангіоцитах. У хворих на АСГ достовірно накопичення тривалентного Fe^{3+} заліза спостерігалось в гепатоцитах і макрофагах центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зон печінкових дольок, в той час як у клітинах перипортальних Z_1 зон тривалентне Fe^{3+} залізо не накопичувалось. Найбільший відсоток гепатоцитів і макрофагів з депонованим двовалентним Fe^{2+} залізом спостерігався в центролобулярних Z_3

і в проміжних Z_2 зонах печінкових дольок, в той час як в перипортальних Z_1 зонах клітини з двовалентним Fe^{2+} залізом були відсутні. Напроти, у 53,5 % хворих на НАСГ, відсоток гепатоцитів і макрофагів з накопиченим тривалентним Fe^{3+} залізом в центролобулярних Z_3 і в проміжних Z_2 зонах дольок печінки був статистично достовірно менший, ніж в перипортальній Z_1 зоні дольок печінки. Відсоток гепатоцитів і макрофагів з накопиченим двовалентним Fe^{2+} залізом був достовірно більшим лише в центролобулярній Z_3 і в проміжній Z_2 зонах дольок печінки. При порівняльному кількісному аналізі з'ясовано, що відмінності між накопиченням тривалентного Fe^{3+} і двовалентного Fe^{2+} заліза в гепатоцитах при АСГ та НАСГ статистично не достовірні.

Виявлене нами в половині спостережень АСГ накопичення Fe^{3+} переважно в гепатоцитах центролобулярних зон печінки, з урахуванням літературних даних [235], найбільш ймовірно відображає процеси окислення двовалентного заліза в тривалентне і з'єднання двовалентного заліза з цитоплазматичними білками, які активно протікають в гепатоцитах цих зон. Інші автори депонування заліза в ретикулоендотеліальних клітинах печінки при стеатогепатиті пов'язують з розвитком фіброзу [15]. За даними Р. Sorrentino [236], надмірне накопичення заліза в гепатоцитах і в перисинусоїдальному просторі є тригерним механізмом для прогресування простого стеатозу в НАСГ, та прогресування НАСГ в цироз печінки, яке діагностується у 16-25 % хворих. Позаклітинна або внутрішньоклітинна локалізація заліза в гепатоцитах і макрофагах сприяють різним наслідкам захворювання, особливо несприятливим є депонування заліза в перисинусоїдальному просторі, яке в 6,9-20 % випадків може бути пов'язано з розвитком гепатоцелюлярної карциноми [236]. Хоча на думку Е.А. Pulixi [237] виявлення в аутопсійному матеріалі значної кількості заліза з одного боку свідчить про інтенсивність жирової дистрофії гепатоцитів, при якій залізо переокислюється зі зміною валентності Fe^{2+} на Fe^{3+} і піддається

фагоцитозу макрофагами, а з іншого боку - про процеси посмертного аутолізу клітин, при якому залізо вивільняється в екстрацелюлярний простір.

Проведені ІГХ дослідження показали, що при НАСГ та АСГ в печінці серед імунокомпетентних клітин переважають CD 68+ макрофаги, а також виявляються CD 4+, CD 8+ Т-лімфоцити і поодинокі плазматичні клітини, які нерівномірно розподілені в дольках і в портальних трактах. У портальних трактах локалізовані нечисленні CD 68+ макрофаги, CD 8+ Т-лімфоцити і CD 4+ Т-лімфоцити. У перисинусоїдальних просторах печінкових дольок виявляються одиничні CD 8+ Т-лімфоцити, CD 4+ Т-лімфоцити і плазматичні клітини, а також нечисленні CD 68+ макрофаги Купфера. CD 68+ макрофаги Купфера в підвищених кількостях концентруються в осередках вираженого стеатозу гепатоцитів, а також в зонах перисинусоїдально-перичелюлярного і портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу. Навколо балонних гепатоцитів і гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка зазвичай концентруються нечисленні нейтрофіли, еозинофіли і лімфоцити, що формують дрібновогнищеві запально-клітинні інфільтрати. Сьогодні доведено, що запальну відповідь в печінці ініціює зростання сигналів інфламасом, що активують через Toll-подібні рецептори зірчасті клітини і клітини Купфера, які забезпечують хемокін-опосередковану інфільтрацію печінки нейтрофилами, моноцитами, натуральними кілерами і Т-кілерами [238]. Проте, долькова і портальна запально-клітинна інфільтрація печінки при НАСГ та АСГ значно менше виражена, ніж при вірусних гепатитах. Про це також свідчать дані інших патологів [14,15]. Проведені ІГХ дослідження показали, що CD 4+, CD 8+ Т-лімфоцити і CD 68+ макрофаги Купфера в різних співвідношеннях локалізуються навколо важко пошкоджених гепатоцитів, формуючи локуси імунноклітинного килінгу. Раніше проведені нами дослідження показали, що наслідками імунноклітинного килінгу при хронічному вірусному гепатиті В і С є апоптоз і каріоцитолізіс гепатоцитів [226].

Неоднозначні результати кількісної диференційної оцінки активності НАСГ і АСГ в біоптатах печінки, отримані в останні роки незалежними експертними групами патоморфологів [19-21], визначили актуальність подальшого пошуку додаткових морфологічних параметрів активності цих хвороб.

Проведений нами детальний патоморфологічний аналіз біопсійно-секційного матеріалу дозволив уточнити морфологічні параметри активності і тяжкості хронічного неалкогольного і алкогольного стеатогепатиту. Активність хронічного стеатогепатиту при НАСГ і АСГ визначає комплекс мікроскопічних ознак: $S_1-S_2-S_3$ ступінь стеатозу печінки; збільшення кількості гепатоцитів з тільцями Малорі-Денка і балонних гепатоцитів; інтенсифікація стеатонекрозу, балонного цитолізу і апоптозу гепатоцитів; зростання кількості та розширення вогнищ стеатонекрозу в печінці; зростання імуноцитарної та запально-клітинної інфільтрації печінки, а також збільшення в ній кількості вогнищ ареактивного синусоїдального стеатопеліозу.

Визначені також рідкі ознаки активації хронічного стеатогепатиту: розвиток біліостаза у хворих на АСГ, поява стеатогранульом (частіше у хворих на АСГ), зростання інтенсивності та розповсюдженості аутофагії в стеатотично змінених гепатоцитах (частіше у хворих на НАСГ), а також збільшення депонування заліза в гепатоцитах і макрофагах (при НАСГ і АСГ), яке веде до фероптозу гепатоцитів (частіше при АСГ). З часом стеатогранульоми можуть фіброзуватися, але це не впливає на ступінь тяжкості стеатозу [54].

Нами визначено, що перисинусоїдально-перичелюлярний і портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз печінки, що прогресує від легкого F_1 ступеню, через помірну F_2 ступень до важкого F_3 фіброзу і цирозу печінки є показником тяжкості і тривалості хвороби. Проведені ІГХ і МФМ дослідження показали, що в основі розвитку любого різновиду фіброзу

печінки у хворих на НАСГ і АСГ лежить збільшення кількості активованих α -SMA-позитивних перисинусоїдальних міофібробластів в дольках печінки та α -SMA-позитивних фібробластів в порталних трактах, які мають фіброгенний імунофенотип з коекспресією ними α SMA, фасцину, віментину і відсутністю експресії десміна. Саме ці клітини продукують надлишок колагену I, III, IV типів та інших молекул позаклітинного матриксу.

Відповідно до сучасних уявлень міофібробласти відсутні в нормальній печінці і з'являються при її хронічних захворюваннях з двох джерел: з трансформованих ПЗК і з мезенхімних клітин порталних трактів [241]. В міофібробласти також можуть активуватися клітини другого шару навколо централобулярних вен печінки, клітини середнього шару судин печінки і фібробласти капсули Глісона [242]. Спочиваючі ПЗК в печінці здорової людини експресують нейронні маркери: гліальних фібрилярний кислий пептид (GFAP), синаптофізін, рецептори фактора росту нервів (NGF), p75 [243]; вони забезпечують метаболізм ретиноидов, функції презентації антигенів і фагоцитозу [244]. Активовані ПЗК набувають високу проліферативну активність, втрачають вітамін-А містять ліпідні краплі, нейронні маркери і трансформуються в зірчасті МФБ з експресією α SMA, фасцину, віментину, фібронектину, а у лабораторних тварин - також десміна, матриксних металопротеїназ (MMP) -2, -9, -14 і їх тканинних інгібіторів, лізил-оксидази, пуринергічної CD39L1 / нуклеозидтрифосфат-діфосфогідролази-2, CD73 / екто-5-ектонуклеотідази і β -рецепторів тромбоцитарного фактора росту (PDGF β R) [122]. Портальні фібробласти в невеликій кількості знаходяться навколо жовчних проток і порталної вени, вони підтримують оптимальний склад міжклітинного молекулярно-волокнистого матриксу порталних трактів [245], а також регулюють кількість і функції епітелію жовчних проток шляхом експресії ектонуклеотідази 2 (NTPDase2) і модуляції перібіліарних нуклеотид-залежних мітогенних сигналів [232]. Активовані порталні ФБ мають високі проліферативні можливості [246], експресують *de*

novo α -SMA і TE-7 маркер фібробластів, колаген I типу [247], фібрoneктин, фібулін-2 и лізил-оксидазу [248].

Розширені ІГХ дослідження D. Karin et al. [243] дозволили в 2016 році ідентифікувати диференційні відмінності активованих портальних ФБ і активованих ПЗК печінки у експериментальних мишей. Цими дослідниками показано, що в активованих ПЗК печінки мишей визначається експресія α SMA, ендогліна, CD73, CD146, GFAR, p75NTR, сінеміна і Lrat, а в активованих портальних ФБ - експресія α SMA, ендогліна, CD73, CD146, а також Thy1, Msln, фібуліну 2, еластину, греліну 1, аспоріну. D. Karin et al. [243] постулювали положення про те, що активовані портальні ФБ синтезують фібрили і протеїни міжклітинного матриксу в портальних трактах для холангіоцитів і проліферуючих холангіол, в той час як активовані ПЗК синтезують фібрили і інші молекули міжклітинної матриксу для гепатоцитів печінкових дольок.

На сьогоднішній день формується консолідована концепція, викладена в оглядах F. Stickel et al. [7], Ch. Trautwein et al. [143], A. Takaki et al. [144], про те, що при НАСГ і АСГ трансформацію ПЗК і портальних фібробластів в фіброгенні клітини печінки викликають молекули клітинного пошкодження (вільні перекисні радикали, продукти перекисного окислення ліпідів і фрагменти ДНК), які вивільнюються з пошкоджених і некротизованих гепатоцитів в міжклітинний простір, та прозапальні цитокіни, що вивільнюються лімфоцитами, активованими макрофагами Купфера і моноцитарними макрофагами. В активації ПЗК також беруть участь патогенні молекули, що надходять з кишківника при його підвищеній проникності [239] або при зміні мікробіому хворих на НАСГ і АСГ [240]. Допускається участь у розвитку фіброзу печінки також циркулюючих кістково-мозкових фіброцитів.

Виконані нами ГХ, ІГХ та ЕМ дослідження показали, що при НАСГ і АСГ може розвиватися один з двох основних типів фіброзу печінки:

перисинусоїдально-перичелюлярний або портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз (рис 6.1).

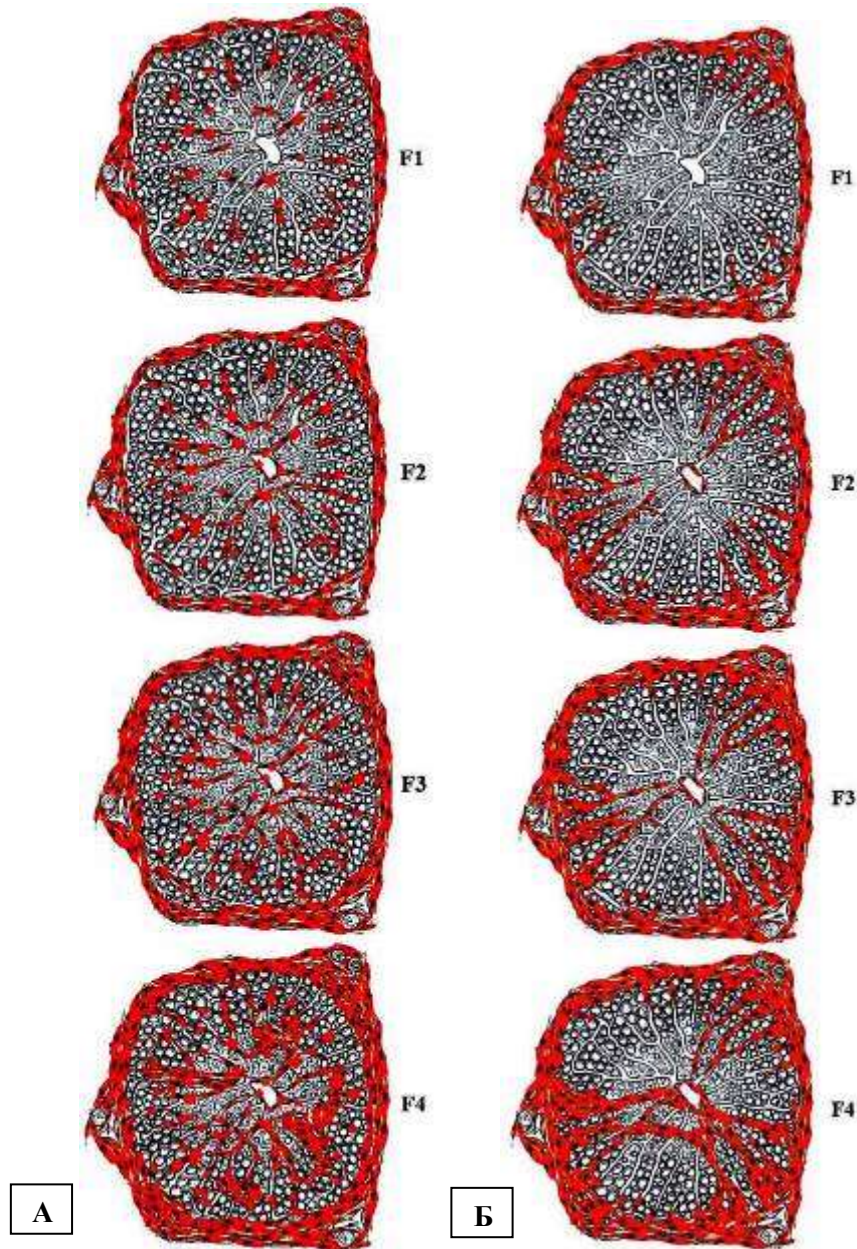


Рисунок 6.1 – Схема розвитку двох основних типів фіброзу печінки при АСГ та НАСГ: А-перисинусоїдально-перичелюлярний; Б- портально- Z_{1-3} перисинусоїдальний фіброз. Фіброз – червоного кольору.

Інші автори [146] також виділяють три властивих для стеатогепатиту різновидів фіброзу печінки: перисинусоїдально-перичелюлярний, портально-перисинусоїдальний і портально-септальний. За отриманими нами даними, основними джерелами розвитку перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу печінки є активовані перисинусоїдальні міофібробласти печінкових

дольок, а джерелами розвитку портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу печінки є, головним чином, активовані портальні ФБ, і в меншій мірі - активовані перисинусоїдальні міофібробласти Z_1 -зон печінкових дольок.

За результатами мікроскопічного і ІГХ аналізу біопсійно-секційного матеріалу печінки хворих на НАСГ і АСГ визначено, що загибель гепатоцитів шляхом стеатонекрозу, балонного цитолізу, апоптозу і фероптозу дуже рано активує перичелюлярний фіброгенез. Нами встановлено, що в феномені перичелюлярного фіброзу печінки у хворих НАСГ і АСГ важливу роль відіграють активовані CD-68 позитивні макрофаги і S100 (клон А4)-позитивні макрофаги, що накопичуються в локусах максимально вираженого балонного цитолізу, стеатонекрозу і апоптозу гепатоцитів. Відростки активованих макрофагів охоплюють гепатоцити, які розпадаються шляхом стеатонекрозу, апоптозу і балонного цитолізу. При прогресуванні НАСГ пошкоджені гепатоцити активують макрофагальні NALP3-інфламасоми, які стимулюють агрегацію макрофагів Купфера навколо вогнищ ліпоапоптозу гепатоцитів, а також активують перисинусоїдальні зірчасті клітини фіброгенного фенотипу з подальшим формуванням фіброзу і цирозу печінки [216]. S100 (клон А4) позитивні макрофаги, які з'являються при стеатогепатиті, за даними L Chen et al. [249], секретують білок S100A4, що активує ПЗК печінки. Ці активовані макрофаги швидше за все не відповідають ні типу M1, ні типу M2 поляризованих макрофагів за класифікацією P.J. Murray et al. [250]. Відомості про наявність широкого спектра активованих макрофагів, які не відповідають ні типу M1, ні типу M2, висвітлені також іншими авторами [251].

Нами підтверджено, що при НАСГ і АСГ, на додаток до активації профіброгенних перисинусоїдальних МФБ і портальних ФБ активними радикалами кисню і продуктами пероксидації ліпідів, які виділяються в міжклітинний простір гепатоцитами при оксидативному стресі і стресі ендоплазматичної сітки та при апоптозі і некрозі гепатоцитів, найважливішу

роль відіграє екзосомальне залучення макрофагів в зони балонного лізису, апоптозу і некрозу гепатоцитів [283-284], а також локальна екзосомально-цитокінова активація перисинусоїдальних зірчастих клітин (рис 6.2.).

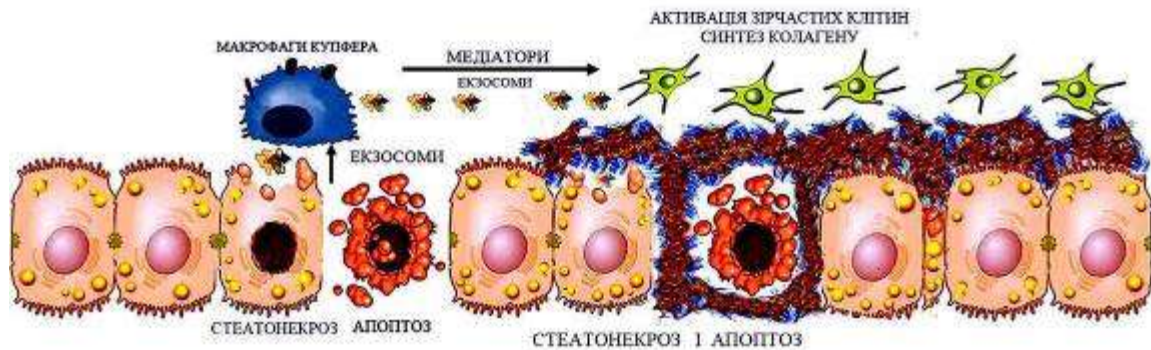


Рисунок 6.2 – Схема екзосомального залучення макрофагів в локуси стеатонекрозу і апоптозу гепатоцитів, а також локальної екзосомально-цитокінової активації перисинусоїдальних зірчастих клітин при НАСГ і АСГ (елементи графіки із Bames M.A. et al. Innate immunity and cell death in alcoholic liver disease. *Redox biology*. 2014. Vol.2. P.929-993).

Р. Hirsova et al. [9] звернули увагу на те, що при стеатогепатиті гепатоцити і макрофаги можуть взаємодіяти через позаклітинні везикули, що вивільняються гепатоцитами і активують макрофаги до продукції прозапальних цитокінів. Облямовані мембраною позаклітинні везикули слугують в якості човників для мембранного і цитозольного взаємозв'язку між клітинами, вони можуть або відшнуровуватись від плазматичної мембрани (мікропухирці), або утворюватися внутрішньоклітинно у вигляді мультивезикулярної ендосоми, яка потім секретується з клітини як екзосома [253]. Екзосоми містять ферменти, білки мембранного транспорту, білки теплового шоку (HSP60, HSP70, HSP90), білки головного комплексу гістосумісності, сигнальні Wnt-білки, аннексини, антиапоптотичні і ростові фактори, цитокіни, ДНК, матричні РНК, мікроРНК, що впливають на експресію генів в клітинах-мішенях, а також ліпіди, які беруть участь в реорганізації клітинних мембран і ліпіди-носії мікроРНК [254]. При НАСГ і АСГ екзосоми звільняють в міжклітинний сектор печінки гепатоцити і макрофаги, а також в кров - моноцити [255-256].

В печінці екзосоми захоплюють ендоцитозом макрофаги Купфера, моноцитарні макрофаги і перисинусоїдальні зірчасті клітини [254]. Макрофаги Купфера продукують реакційні види кисню, прозапальний туморонекротичний фактор α (TNF- α) і макрофагальний запальний білок MIP-1, інтерлейкіни (IL-1 β , IL-6), а також профіброгенний TGF- β , під впливом яких зірчасті клітини печінки набувають фенотип міофібробластів [257]. Одночасно з цим, екзосоми опосередковують перенесення між перисинусоїдальними зірчастими клітинами фактора росту сполучної тканини (CCN2) [258] і мікроРНК [259], яка викликає епігенетичні модуляції синтезу зірчастими клітинами фактора росту сполучної тканини [260].

Макрофаги Купфера стимулюють фіброгенез не тільки шляхом активації зірчастих клітин печінки, а й шляхом активації припливу в печінку [через цистеїн-цистеїнові хемокіноподібні ліганди 2 і 5 (CCL2 і CCL5)] кістковомозкових моноцитів, які, в залежності від молекулярно-клітинного мікрооточення, диференціюються в моноцитарні прозапальні-профіброгенні макрофаги Ly6C^{high}, які беруть участь в прогресії фіброзу, або в протизапально-фібролітичні макрофаги Ly6C^{low}, які беруть участь у резорбції фіброзу печінки [261-263].

Таким чином, значне збільшення числа активованих CD-68 позитивних макрофагів у вогнищах інтенсивного стеатозу гепатоцитів і поява S100 (A4) позитивних макрофагів, які активують зірчасті клітини, а також дані інших дослідників, дають підставу вважати, що феномен перицелюлярного фіброзу печінки при НАСГ та АСГ обумовлений екзосомальним залученням макрофагів в зони стеатонекрозу, апоптозу і балонного цитолізису гепатоцитів, а також локальною екзосомально-цитокіновою активацією перисинусоїдальних міофібробластів. Саме феномен перицелюлярності відрізняє обидва типи фіброзу печінки у хворих на НАСГ і АСГ від фіброзу печінки у хворих ХВГС і ХВГВ, для яких характерним є перисинусоїдально-центролобулярний або портально-септальний фіброз печінки [264-265].

В результаті виконаних нами ІГХ досліджень біоптатів печінки пацієнтів контрольної групи, що не страждали НАСГ і не мали фіброзу печінки, встановлено наявність у них колагенів I, III і IV типу, нерівномірно розподілених у структурах печінки. Фрагменти фібрилярних колагенів I і III типу виявляються в інтерстиції портальних трактів, а також в стінках централобулярних вен печінки; точкова експресія колагену III типу визначається в перисинусоїдальних просторах. Експресія колагену IV типу спостерігається в стінках вен, артерій і жовчних проток в портальних трактах, точково-лінійна експресія цього колагену виявляється у перисинусоїдальних просторах печінкових дольок.

У сучасних посібниках з патології печінки A.D.Burt, B.C.Portmann, L.D.Ferrell [266], S.P.S. Monga [267] підсумовані суперечливі результати ІГХ досліджень 1980-2000 років щодо складу позаклітинного матриксу та локалізації його основних компонентів в печінці людини. В ті роки визначено, що в нормальних умовах в інтерстиціальному матриксі портальних трактів виявляються переважно фібрилярні колагени колагену I, III і V типу, а також нефібрилярний колаген VI типу. Крім цього, колаген IV типу з ламініном формує в портальних трактах базальні мембрани жовчних проток, артерій і вен. У перисинусоїдальному просторі печінкових дольок домінує нефібрилярний колаген IV типу, в асоціації з ним визначається колаген III типу, в мінорних кількостях виявляється також фібрилярний колаген V типу, мікрофібрилярної колаген VI типу і колаген XVIII типу. У стінках централобулярних печінкових вен виявляються в невеликих кількостях колаген I, III і V типу. Нещодавно Мак Кі М. et al. [268] описали особливості так званого «вікового» фіброзу печінки, виявленого в аутопсійному матеріалі літніх хворих (без аналізу перенесених за життя хвороб), до якого вони віднесли експресію колагену I і III типу, а також еластину в портальних трактах, фіброзних септах і централобулярних венах печінки; експресію колагену IV типу в фіброзно змінених

перисинусоїдальних просторах печінкових дольок, в базальних мембранах капілярів і атипових дуктулах портально-септального фіброзу.

Результати ІГХ и ФЦММ досліджень показали, що по мірі прогресування перисинусоїдально-перичелюлярного та портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від легкого F_1 ступеня, через середній F_2 ступінь до важкого F_3 фіброзу і до F_4 мікронодулярного цирозу в печінці статистично достовірно зростає площа Масон-позитивного позаклітинного молекулярно-волокнистого матриксу і площа α SMA+ колаген-продукуючих міофібробластів перисинусоїдально-перичелюлярної локалізації та площа активованих α SMA+ портальних фібробластів і перисинусоїдальних міофібробластів Z_1 зон печінкових дольок. У хворих на НАСГ по мірі прогресування перисинусоїдально-перичелюлярного фіброзу від слабкого F_1 до важкого F_3 фіброзу в печінці зростає депонування колагенів I і IV типу перисинусоїдально-перичелюлярної локалізації, площа яких в 20 разів перевищує нормальні величини; площа депонування колагену III типу аналогічної локалізації зростає більш ніж в 10 разів, в порівнянні з нормальними величинами, і потім сповільнюється. У цих хворих при F_4 фіброзі / мікронодулярному цирозі печінки перичелюлярного типу депонування колагену I і IV типу досягає максимуму, при цьому площа депонування фібрилярного колагену I типу більш ніж на 50% перевищує площу депонування фібрилярного колагену III типу. По мірі прогресування портально- Z_{1-3} перисинусоїдального фіброзу від слабкого F_1 до важкого F_3 , в зонах фіброзу печінки зростає депонування колагену I і IV типу, площа яких більш ніж в 2 рази перевищує нормальні величини; площа депонування колагену III типу на 30% перевищує нормальні величини. При F_4 фіброзі / мікронодулярному цирозі печінки портально- Z_{1-3} перисинусоїдального типу площа депонування колагену III и IV типу стабілізується на рівні важкого F_3 фіброзу печінки.

Біохімічні, імунофлуоресцентні, ІГХ та ЕМ дослідження, виконані в кінці ХХ - початку ХХІ століття, в загальних рисах також показали, що при фіброзі і цирозі печінки, асоційованими з неалкогольним, алкогольним і вірусним гепатитом, в перисинусоїдально-періцелюлярних просторах, в портальних трактах і в фіброзних септах печінки в 3-10 раз зростає вміст колагену I, III, IV, V і VI типу та інших молекул позаклітинного матриксу [126, 145, 267]. W. Chen et al. [269] в біопсійному матеріалі хворих вірусним гепатитом С показали, що експресія колагену III, IV, V, VI типу і фібронектину статистично достовірно зростає від ранніх до пізніх стадій фіброзу печінки. При переході від ранніх до пізніх стадій гепатофіброза різко зростає фіброз, який виявляється методом Массон-трихром (на їхню думку, цей метод виявляє, головним чином, колаген I типу) і експресія колагену IV типу, в той час як експресія колагену III типу і фібронектину зростає дуже поступово. На думку авторів, колаген V і VI типу може допомогти виявити ранню стадію фіброзу, яка майже не виявляється методом Массон-трихром [269]. При протеомному аналізі децелюляризованої печінки хворих з гепатофіброзом, асоційованим з гепатитом С, показано, що при еволюції фіброзу від F₁ до F₃ стадії має місце кумуляція фібрилярного колагену I і III типу, а також еластину. В F₃ стадії фіброзу сильно зростає експресія TIMP-3, яка свідчить про пригнічення фібролітичних процесів; в цій стадії має місце незначний перехід від депонування фібрилярного колагену I, III і V типу до нефібрилярного колагену VI типу. У F₄ стадії фіброзу /цирозу печінки визначається помірне зниження рівня колагену I і III типу та масивна кумуляція еластичних волокон, асоційована з патологічним ремоделюванням органу [126]. За даними інших ІГХ досліджень, при прогресуванні фіброзу в цироз печінки колаген III типу витісняється колагеном I типу [270].

При розвитку фіброзу печінки істотно ремоделюється міжклітинний матрикс. За нашими і літературними даними в зонах перисинусоїдально-періцелюлярного і в Z₁ зонах портально-перисинусоїдального фіброзу

печінки F₂, F₃, F₄ ступеня тяжкості визначається експресія фибронектина, який синтезується гепатоцитами і зв'язується з проколлагеновими фібрилами, змінюючи їх структуру в перичелюлярному матриксі. Дослідження фибронектина в культурі портальних фібробластів і зірчастих клітин щурів при експериментальному фіброзі печінки показали, що позаклітинний домен-А фибронектина підсилює рухливість зірчастих клітин і не впливає на їх диференціювання в міофібробласти [270].

За результатами мікроскопічного і ІГХ аналізу біопсійно-секційного матеріалу печінки хворих на НАСГ і АСГ визначені значні особливості репаративного процесу в печінці при цих захворюваннях. В гепатобіоптатах пацієнтів контрольної групи, які не мали стеатозу та фіброзу печінки, експресія маркера клітинної проліферації Ki-67 визначається лише в 1-2 % гепатоцитів (рис. 6.3).

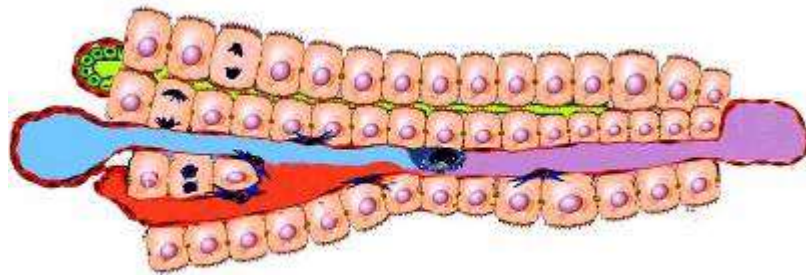


Рисунок 6.3 – Схема слабкого мітотичного розподілу гепатоцитів в нормі.

Загибель гепатоцитів шляхом стеатонекрозу, балонного цитолізу, апоптозу і фероптозу при стеатогепатиті у хворих на НАСГ і АСГ дуже рано активує перичелюлярний фіброгенез; незворотні пошкодження гепатоцитів, які виникають в умовах раннього F₁-F₂ перичелюлярного фіброза, стимулюють не стільки мітотичний розподіл гепатоцитів, скільки компенсаторно-приспосувальні процеси з появою двох-трьох-шестиядерних гепатоцитів, великих одноядерних гепатоцитів з кількома ядрцями та гепатоцитів з великими гіперхромними ядрами (рис. 6.4) та активацію прогеніторних клітин печінки з розвитком репаративної дуктулярної реакції.

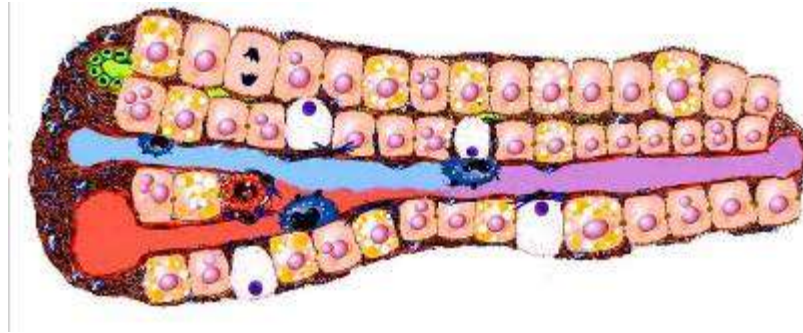


Рисунок 6.4 – Схема активації компенсаторних змін гепатоцитів при помірному F₁-F₂ перичелюлярному фіброзі печінки у хворих на НАСГ і АСГ

Проведені ПГ, ГХ і ІГХ дослідження показали, що при хронічному стеатогепатиті у хворих на НАСГ і АСГ дуктулярна реакція може виявлятися в активній фазі з максимальними патоморфологічними проявами, а також з виразними, помірними і слабкими мікроскопічними проявами. При помірному F₂ і тяжкому F₃ фіброзі печінки перисинусоїдально-перичелюлярного і портально-Z₁₋₃перисинусоїдального типу в гепатобіоптатах деяких хворих на НАСГ і АСГ виявляються помірні або слабкі мікроскопічні прояви дуктулярної реакції, в той час як максимальні прояви активної дуктулярної реакції спостерігаються при цирозі печінки. Дуктулярна реакція печінки з максимальними проявами в активній фазі виявлена в гепатобіоптатах у 12 % хворих на цироз печінки, який виник на тлі хронічного стеатогепатиту. Активна фаза дуктулярної реакції проявляється появою на межі печінкових дольок і портальних трактів в проекції каналців Герінга клітинних скупчень, розгалужених клітинних ланцюжків і реактивних дуктул, які містять нечисленні клітини с імунофенотипом прогеніторних клітин печінки (c-kit CD117 +, CD34 +, CD56 +, CD44 Std./HCAM+, α-FTP +, CK7 -, CK19-, Нераг-) і клітин проміжного гепато-біліарного диференціювання (CK7 +, CK19 +, Нераг +, α-FTP +), а також поодинокі клітини біліарного диференціювання (CK7 +, CK19 +) і гепатоцитарного диференціювання (Нераг + і α-FTP +). В клітинних ланцюжках і клітинних скупченнях в активній фазі дуктулярної реакції визначається підвищена кількість дрібних клітин з ядерною експресією Ki-67,

що свідчить про активну проліферацію прогеніторних клітин репаративного комплексу печінки. В активній фазі дуктулярної реакції розгалужені клітинні ланцюжки і дуктули проникають вглиб печінкових дольок, а також в порталні тракти.

У деяких хворих на НАСГ і АСГ з помірним F₂ і тяжким F₃ фіброзом печінки в гепатобіоптатах виявляється дуктулярна реакція помірного ступеня, яка проявляється наявністю на межі дольок і порталних трактів з помірним або слабким фіброзом поодиноких дрібних груп з 3-6 овальних клітин, невеликої кількості клітинних ланцюжків і фрагментів реактивних дуктул, а також наявністю в печінкових дольках невеликого числа в одно-двохрядних клітинних ланцюжків і одиничних реактивних дуктул або їх фрагментів. В дрібних скупченнях овальних клітин і в клітинних ланцюжках спостерігаються поодинокі c-kit CD117 імунопозитивні клітини і CD34 імунопозитивні клітини, дуже рідко – одна-дві CK7+ і CK19+ клітини.

Дуктулярна реакція слабого ступеня в гепатобіоптатах діагностується за наявності на межі дольок і порталних трактів з помірним або слабким фіброзом однієї-двох реактивних дуктул, або, як виключення, - однієї-двох дрібних реактивних дуктул в перипортальній Z₁ чи в проміжній Z₂ зоні печінкової дольки. В одно-двохрядних клітинних ланцюжках і в реактивних дуктулах дольок печінки при слабкій і помірній дуктулярній реакції рідко виявляються клітини з ІГХ характеристиками прогеніторних клітин, у реактивних дуктулах клітини біліарного (CK7 +, CK19 +) диференціювання чередуються з проміжними крупними гепатоцитоподібними CK7+ клітинами і з клітинами гепатоцитарного (Hepar +) диференціювання.

Незважаючи на те, що ще в 2004 році T.Roskams et al. [271] звернули увагу на здатність прогеніторних клітин печінки після їх ампліфікації диференціюватися в клітини гепатоцелюлярної або гепатобіліарної лінії, в подальшому дослідники дуктулярної реакції основну увагу приділили її холангіо-дуктулярному компоненту при хронічних холангіопатіях [272, 273,

274], в той час як її гепатоцелюлярний компонент залишився не вивченим. Те, що в одно-двохрядних клітинних ланцюжках і дуктулах на периферії і в проміжних зонах дольок печінки, клітини біліарного (СК7+, СК19+) диференціювання чередуються з крупними гепатоцитоподібними СК7+ проміжними клітинами і з клітинами гепатоцитарного (Hepar+) диференціювання, дає підставу вважати клітинні ланцюжки печінкових дольок структурами репаративного комплексу печінки з потенційно біфазним клітинним диференціюванням. У диференціації прогеніторних клітин печінки активну роль виконують Notch-сигнали і Wnt-білки: при біліарному диференціюванні експресія Jagged 1 міофібробластами підсилює Notch-сигналізацію в прогеніторних клітинах і їх диференціювання в холангіоцити; при зниженні Notch сигналів і активації секреції Wnt3a макрофагами прогеніторні клітини паралельно диференціюються в гепатоцити [275]. Виконаний нами ІГХ аналіз ПЗК матриксу, який оточує клітинні ланцюжки і реактивні дуктули печінки, показав, що гепатоцитарному диференціюванню прогеніторних клітин сприяє наявність ламініну в нішах прогеніторних клітин та експресія ламініну ПЗК в печінкових дольках. За даними L.K. Kanninen et al. [276] саме лімінін підтримує гепатоцитарну спеціалізацію культивуємих плюрипотентних стовбурових клітин людини.

Несприятливим ускладненням НАСГ і АСГ є мікронодулярний цироз печінки перисинусоїдально-перичелюлярного або портально-Z₁-зперисинусоїдального типу, зареєстрований у 10,48% хворих. Цироз печінки у хворих на НАСГ і АСГ супроводжуються зростанням некрозу і апоптозу гепатоцитів та компенсаторними процесами в неуражених гепатоцитах, а також активацією репаративного комплексу печінки, спрямованого на поповнення дефіциту гепатоцитів і біліарних структур. Активація репаративного комплексу печінки мікроскопічно проявляється дуктулярною реакцією, в процесі якої відмічається проліферація прогеніторних клітин і диференціювання їх нових поколінь в гепатоцити і в холангіоцити. При

цирозі печінки реактивні дуктули і клітинні ланцюжки визначаються на периферії печінкових дольок в проекції каналів Герінга, а також серед колагенових волокон і відростків α -SMA + міофібробластів - в фіброзно змінених портальних трактах, субкапсулярній тканини і в фіброзних септах. В клітинних ланцюжках і реактивних дуктулах спостерігаються СК7 +, СК19 + клітини, а також нечисленні Нерар +, α -FTP + і α -FTP- клітини. Важливим проявом дуктулярної реакції при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ є утворення нових псевдодольок печінки (рис.6.5).

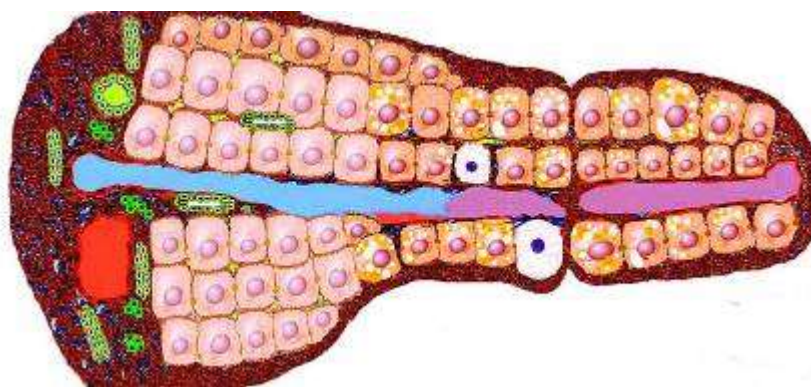


Рисунок 6.5 – Схема утворення псевдодольки і прогресування перипортального фіброзу при репаративній дуктулярній реакції в умовах мікронодулярного цирозу печінки у хворих на НАСГ і АСГ.

Нові печінкові псевдодольки містять на периферії нечисленні проміжні СК-7 позитивні гепатоцити, і не мають централобулярних вен і упорядкованих синусоїдів. По периферії сформованих псевдодольок виявляються локуси проліферації овальних клітин та дрібні дуктули, вистелені СК-7 позитивними холангіоцитами. Нечисленні дуктули, вистелені СК-7 позитивним епітелієм, спостерігаються також в збережених дольках.

Про віддалені наслідки дуктулярної реакції при цирозі печінки свідчить наявність серед колагенових волокон фіброзно зміненої портально-септальної і субкапсулярної тканини великої кількості СК7-позитивних дуктул, що не містять жовчі, а також наявність в дольках печінки без реактивних клітинних ланцюжків і дуктул, псевдодольок і нечітко

окреслених вогнищ гіперплазії гепатоцитів без впорядковано орієнтованих синусоїдів.

При тяжкому мікронодулярному цирозі печінки, коли площа печінкових дольок і псевдодольок стає рівною або меншою площі прилеглого до них фіброзу, має місце паралельне зростання числа Ki-67 + клітин в портально-долькових дуктулах і ланцюжках, а також числа Ki-67 + гепатоцитів в печінкових дольках і псевдодольках.

За літературними даними дуктулярна реакція при НАСГ корелює зі стадією прогресії фіброзу печінки [277]. Результати виконаних ІГХ досліджень показали, що при репарації стеатогепатиту важливу роль відіграє активація двох різних фіброзних шляхів: по-перше – ранній перицелюлярний фіброгенез, пов'язаний з активацією пошкодженими гепатоцитами перисинусоїдальних МФБ (див.рис.6.2); по-друге - активація прогеніторних клітин печінки з розвитком дуктулярної реакції, при якій активуються перидуктальні міофібробласти, які посилюють портальний і портально-портальний фіброз (див.рис.6.5). Репаративний процес при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ дискоординований в бік формування нових, функціонально малоцінних гепатоцелюлярних псевдодольок і накопичення пустопорожніх дуктул без жовчі в фіброзно змінених портальних трактах і в фіброзних септах з надлишком депонованого колагену I, III і IV типу.

Проведені ПГ, ГХ і ІГХ дослідження показали, що при мікроскопічному виявленні дуктулярної реакції різного ступеня виразності, увага, як правило, фіксується лише на формуванні нових дуктул на периферії печінкових дольок і в портальних трактах. Нами ІГХ методиками встановлено, що прогеніторні клітини печінки диференціюються в гепатоцити через проміжні гепатобілярні і гепатоцитоподібні клітини.

Встановлено, що несприятливими наслідками подальшого прогресування мікронодулярного цирозу у хворих на НАСГ і АСГ є надмірне накопичення пустопорожніх дуктул в портальних трактах, яке асоційоване з

надмірним порталним і мостоподібним попортально-портальним фіброзом, а також розвиток вкрай важкого перичелюлярного фіброзу в псевдодольках, який ізолює гепатоцити та веде до їх руйнування через стеатонекроз.

Найбільш рідкісним несприятливим наслідком цирозу печінки у хворих на НАСГ і АСГ є розвиток гепатоцелюлярної карциноми печінки, виявленої на фоні ЦП у 1,80 % хворих на НАСГ і АСГ, та у 0,84 % померлих від ЦП зі стеатотичними змінами гепатоцитів неуточненого генезу. Частота розвитку ГЦК у цієї категорії хворих значно нижча, ніж у хворих на хронічні вірусні гепатити [278]. Ретроспективний аналіз, проведений іншими авторами, показав, що ризик прогресування НАЖХП в ГЦК складає на стадії простого стеатозу печінки 0-0,5 %, на стадії НАСГ - 0-2,8 % і на стадії цирозу печінки - 40-62 % [174-175]. Патоморфологічні дослідження ГЦК у хворих на НАСГ і АСГ відсутні, але загальна мікроскопічна характеристика ГЦК, без прив'язки до її конкретного генезу, висвітлена в багатьох публікаціях і оглядах.

Нами встановлено, що гепатоцелюлярна карцинома при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ, має характерні для «класичного» гепатоцелюлярного раку клітинно-гістоархітектонічні патерни: трабекулярний, солідно-клітинний, ацинарний, фіброзний. В гепатоцелюлярній карциномі, яка розвивається в цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ найбільш поширеними є трабекулярний, ацинарний і солідно-клітинний патерни.

Проведені ІГХ дослідження показали, що у клітинах ГЦК при цирозі печінки у хворих на НАСГ і АСГ, також як і у клітинах «класичного» гепатоцелюлярного раку, виявляється цитоплазматична гранулярна експресія Нераг, а також варіабельна цитоплазматична експресія α -фетопротейну. Інтенсивна цитоплазматична гранулярна експресія Нераг визначається в 45-100 % пухлинних клітин трабекулярного, ацинарного і солідно-клітинного патернів ГЦК, а експресія α -фетопротейну виявляється у 20-35 % клітин ГЦК і відрізняється значно меншою інтенсивністю.

ВИСНОВКИ

Незважаючи на широку розповсюдженість НАСГ і АСГ на сьогодні недостатньо розроблені патоморфологічні критерії їх диференційної діагностики та несприятливого перебігу в біоптатах печінки. В дисертації вирішується актуальне питання патологічної анатомії щодо ПМ порівняльних характеристик хронічного неалкогольного і алкогольного СГ, 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 хворих. Між ступенем тяжкості стеатозу печінки (y) і підвищеним рівнем пальмітинової (x_1) та стеаринової (x_2) кислот в печінці має місце достовірна 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. Гепатоци при НАСГ і АСГ гинуть шляхом стеатонекрозу, балонного цитолізису, апоптозу і фероптозу. При балонному цитолізисі в гепатоцитах визначається набухання цитозолю, втрата мікрофіламентів, цистерн ГрЕС, ГЕС і 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 гепатоцитах і макрофагах 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 імуноцитарної 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 ступеня і до цирозу печінки.

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

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 міофібробластів ($p < 0,05$), Масон+ позаклітинного матриксу ($p < 0,05$), 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 міофібробластів і Z_1 перисинусоїдальних міофібробластів ($p < 0,05$), Масон+ позаклітинного матриксу ($p < 0,05$), 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 F₂ – F₃ 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-Z₁₋₃ 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 Масон-триколор, 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 імуногістохімічне визначення СК7-позитивних гепатоцитоподібних клітин, що свідчать про відновлення пулу гепатоцитів; для визначення інтенсивності дуктулярної реакції печінки доцільним є виявлення СК7-позитивних дуктул в порталних трактах і печінкових дольках.

3. Для оцінки ступеню тяжкості перисинусоїдально-перичелюлярного і портално-Z₁₋₃перисинусоїдального фіброзу та прогресування мікронодулярного цирозу печінки у хворих на НАСГ і АСГ доцільним є забарвлення зрізів методом Масон-триколор, а також імуногістохімічне визначення α SMA+ міофібробластів 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. C. D. Williams, J. Stenge, M. I. Asike et al. *Gastroenterology*. 2011. Vol. 140 (1). P. 124–131.
2. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. A. R. Araújo, N. Rosso, G. Bedogni et al. *Liver Int*. 2018. Vol. 38 (suppl. 1). P. 47–51.
3. Rehm J., Samokhvalov A. V., Shield K. D. Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol*. 2013. Vol. 59. P.160–168.
4. World Health Organization. WHO mortality database: raw data files. Geneva. Geneva : WHO, 2018. www.who.int/healthinfo/.../mortality_rawdata/en/index1.
5. White D. L., Kanwal F., El-Serag H. B. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin. Gastroenterol Hepatol*. 2012. Vol. 10. P. 1342–1359.
6. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. A. Lonardo, F. Nascimbeni, M. Maurantonio et al. *World J. Gastroenterol*. 2017. Vol. 23 (36). P. 6571–6592. DOI : 10.3748/wjg.v23.i36.6571.
7. Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016. F. Stickel, C. Datz, J. Hampe, R. Bataller. *Gut. Liver*. 2017. Vol. 11 (2). P.173–188. DOI : 10.5009/gnl16477.
8. Fung P., Pirsopoulos N. Emerging concepts in alcoholic hepatitis. *World J. Hepatol*. 2017. Vol. 9 (12). P. 567–585. DOI : 10.4254/wjh.v9.i12.567.
9. Lipotoxic Lethal and Sublethal Stress Signaling in Hepatocytes: Relevance to NASH pathogenesis. P. Hirsova, S. H. Ibrahim, G. J. Gores, H. Malhi. *J. Lipid Res*. 2018. Vol. 57. P. 1758–1770.
10. Aigner E., Weiss G., Datz C. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World J. Hepatology*. 2015. Vol. 7 (2). P. 177–188.

11. The diagnosis and management of non-alcoholic liver disease: practice guidelines by the American association for the study of liver diseases, American college of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association. N. Chalassi, Z. Younossi, J. E. Lavine, A. M. Diehl et al. *Am. J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 7 (6). P. 811–826.
12. EASL-ALEH Clinical practice guidelines: non-invasive tests for evaluation of liver diseases severity and prognosis. L. Castera, H. L. Yuen Chan, M. Arrese, et al. *J. Hepatol.* 2015. Vol. 63 (1). P. 237–264.
13. Celli R., Zhang X. Pathology of Alcoholic Liver Disease. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2014. Vol. 2 (2). P. 103–109. DOI : 10.14218/JCTH.2014.00010.
14. Kleiner D. E., Makhlof H. R. Histology of NAFLD and NASH in Adults and Children. *Clin. Liver Dis.* 2016. Vol. 20 (2). P. 293–312. DOI : 10.1016/j.cld.2015.10.011.
15. Brown G. T., Kleiner D. E. Histopathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Metabolism.* 2016. Vol. 65 (8). P. 1080–1086.
16. Pathogenesis and novel treatment options for non-alcoholic steatohepatitis. W.-S. Wong, S. Chitturi, G. L-H. Wong et al. *Lancet Gastroenterol. Hepatology.* 2016. Vol. 1 (1). P. 56–67.
17. Takahashi Y., Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 20 (42). P. 15539–15548.
18. Sakhuja P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol 20 (44). P. 16474–16479. URL : <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16474>
19. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. P. Bedossa, C. Poitou, N. Veyrie et al. *Hepatology.* 2012. Vol. 56. P. 1751–1759.

20. Bedossa P. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014. Vol. 60. P. 565–575.
21. Brunt E. M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pros and Cons of Histologic Systems of Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol.17 (97). P. 1–10.
22. Emerging concepts in biliary repair and fibrosis. L. Fabris, C. Spirli, M. Cadamuro et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2017. Vol. 313 (2). P. 102–116.
23. CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin $\alpha\beta$ -mediated activation of NF- κ B. K. H. Kim, C. C. Chen, G. Alpini et al. *J. Clin. Invest.* 2015. Vol. 125. P. 1886–1900.
24. Centrilobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. L. Zhao, M. Westerhoff, R. K. Pai et al. *Modern Pathology advance online publication*. 2017. Vol. 31 (1). P. 150–159.
25. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. Geneva, 2012. 32 p.
26. Asrih M., Jornayvaz F. R. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link. *Mol. Cell Endocrinol.* 2015. Vol. 418, pt. 1. P. 55–65.
27. Duseja A., Singh S. P., Saraswat V. A. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome - Position Paper of the Indian National Association for the Study of the Liver, Endocrine Society of India, Indian College of Cardiology and Indian Society of Gastroenterology. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2015. Vol. 5 (1). P. 51–68.
28. Nayak N. C. Cirrhosis and end-stage chronic liver disease: The changing scenes on etiopathogenesis. *Curr. Med. Arch. Prac.* 2014. Vol. 4, Is. 2. P. 62–77.
29. Zelman S. The liver in obesity. *AMA Arch. Intern. Med.* 1952. Vol. 90, N 2. P. 141–156.

30. Westwater J. O., Fainer D. Liver impairment in the obese. *Gastroenterology*. 1958. Vol. 34, N 4. P. 686–693.
31. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. J. Ludwig, T. R. Viggiano, D. B. McGill, B. J. Oh. *Mayo Clin. Proc.* 1980. Vol. 55, N 7. P. 434–438.
32. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. G. Marchesini, E. Bugianesi, G. Forlani et al. *World J. Hepatol.* 2003. Vol. 37, N 4. P. 917–923.
33. Loomba R., Sanyal A. J. The global NAFLD epidemic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2013. N 10. P. 686–690.
34. Stress-induced Biomarkers in Liver with Non-alcohol Fatty Liver Diseases and Non-alcohol Steatohepatitis. H. Ono, A. Tanaka, K. Nakazato et al. *Kitakanto Med. J.* 2016. Vol. 66, N 1. P. 79–80.
35. Schwabe R. F., Maher J. J. Lipids in Liver Disease: Looking Beyond Steatosis. *J. Gastroenterology*. 2012. Vol. 124. N 1. P. 8–11.
36. Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). URL : <http://mkb-10.com/>
37. Strassburg C. P., Manns M. P. Liver biopsy techniques. *Zakim and Boyer's Hepatology : A textbook of liver disease*. eds T. D. Boyer, T. L. Wright, M. P. Manns. 5th ed. Saunders Elsevier, 2006. Vol. 1. P. 195–203.
38. Brunt E. M. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2004. Vol. 24. P. 3–20.
39. The diagnosis and management of non alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the american association for the study of liver diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. N. Chalasani, Z. Younossi, J. E. Lavine et al. *Hepatology*. 2012. Vol. 55. P. 2005–2023.
40. Guido M., Ruge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Seminars in liver disease*. 2004. Vol. 24 (1). P. 89–97.

41. Kleiner D. E., Bedossa P. Liver histology and NASH clinical trials: two pathologist's perspective gastroenterology. *Gastroenterology*. 2015. Vol. 149. P. 1305–1308.
42. Nalbantoglu I. L., Brunt E. M. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol*. 2014. Vol. 20. P. 9026–9037.
43. Liver biopsy. D. C. Rockey, S. H. Caldwell, Z. D. Goodman et al. *Hepatology*. 2009. Vol. 49 (3). P. 1017–1044.
44. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. C. A. Matteoni, Z. M. Younossi, T. Gramlich et al. *Gastroenterology*. 1999. Vol. 116. P. 1413–1419.
45. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. Z. M. Younossi, M. Stepanova, N. Rafiq et al. *Hepatology*. 2011. Vol. 53. P. 1874–1882.
46. Kleiner D. E. The alcoholic hepatitis histologic score: structured prognostic biopsy evaluation comes to alcoholic hepatitis. *Gastroneterology*. 2014. Vol. 146. P. 1156–1158.
47. Stellate cell lipidosis in liver biopsy specimens. Recognition and significance. P. H. Levine, Y. Delgado, N. D. Theise et al. *Am. J. Clin. Pathol*. 2003. Vol. 119. P. 254–258.
48. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. A. L. Fracanzani, L. Valenti, E. Bugianesi et al. *Hepatology*. 2008. Vol. 48. P. 792–798.
49. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. S. Tandra, M. M. Yeh, E. M. Brunt et al. *J. Hepatol*. 2011. Vol. 55. P. 654–659.
50. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. L. M. Pawella, M. Hashani, E. Eiteneuer et al. *J. Hepatol*. 2014. Vol. 60. P. 633–642.
51. Burt A. D., Mutton A., Day C. P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn. Pathol*. 1998. Vol. 15. P. 246–258.

52. Sun B., Karini M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J. Hepatol.* 2012. Vol. 56. P. 704–713.
53. Brunt E. M. A novel genetic marker of liver disease aetiology in hepatocellular carcinoma: culling the metabolic syndrome. *Gut.* 2013. Vol. 62. P. 808–809.
54. Wanless I. R., Geddie W. R. Mineral oil lipogranulomata in liver and spleen. A study of 465 autopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985. Vol. 109. P. 283–286.
55. Fellman V., Kotarsky H. Mitochondrial hepatopathies in the newborn period. *Semin Fetal Neonatal. Med.* 2011. Vol. 16. P. 222–228.
56. Desing and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. D. E. Kleiner, E. M. Brunt, M. van Natta et al. *J. Hepatology.* 2005. Vol. 41, N 6. P. 1313–1321.
57. Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis. G. Guzman, E. M. Brunt, L. M. Petrovic et al. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008. Vol. 132. P. 1761–1766.
58. Vernon G., Baranova A., Younossi Z. M. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2011. Vol. 34. P. 274–285.
59. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. S. McPherson, T. Hardy, E. Henderson et al. *J. Hepatol.* 2015. Vol. 62, N 5. P. 1148–1155.
60. Torres D. M., Harrison S. A. Diagnosis and therapy of non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2008. Vol. 134. P. 1682–1698.
61. Kirsch M. D. Liver biopsy without clear indication or informed consent. *Am. J. Gastroenterol.* 2000. Vol. 95. P. 1588–1589.
62. Bianchi L. Liver biopsy in elevated liver functions tests. An old question revisited. *J. Hepatol.* 2001. Vol. 35. P. 290–294.

63. Non-alcoholic fatty liver: Another feature of the metabolic syndrome. H. Cortez-Pinto, M. E. Camilo, A. Baptista et al. *Clin. Nutr.* 1999. Vol. 18. P. 353–358.
64. Haleboua-De Marzio D. L., Fenkel J. M. Concepts and treatment approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *Adv. Hepatol.* 2014. Vol. 2014. P. 1–7.
65. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, M. J. Thun. *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348. P. 1625–1638.
66. Pereira K., Salsamendi J., Casillas J. The global nonalcoholic fatty liver disease epidemic: what a radiologist needs to know. *J. Clin. Imaging Sci.* 2015. Vol. 5. P. 32.
67. Ong J. P., Younossi Z. M. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin. Liver Dis.* 2007. Vol. 11. P. 1–16.
68. Liver Foundation. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). URL : http://www.liverfoundation.org/downloads/alf_download_1169.pdf.
69. European Association for the Study of the Liver. The Burden of Liver Disease in Europe. URL : http://www.easl.eu/medias/EASLimg/Discover/EU/54ae845caec619f_file.
70. Weiss J., Rau M., Geier A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Clinical Course, Investigation, and Treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2014. Vol. 111 (26). P. 447–452.
71. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Non-alcoholic Steatohepatitis. URL : http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012_NASH%20and%20NAFLD_Final_long.pdf.
72. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. J. D. Browning, L. S. Szczepaniak, R. Dobbins et al. *Hepatology.* 2004. Vol. 40. P. 1387–1395.

73. Clark J. M., Brancati F. L., Diehl A. M. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am. J. Gastroenterol.* 2003. Vol. 98. P. 960–967.
74. Драпкина О. М., Ивашкин В. Т. Эпидемиологические особенности неалкогольной жировой болезни печени в России (результаты открытого многоцентрового проспективного исследования-наблюдения DIREG L 01903). *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.* 2014. Т. 24, № 4. С. 32–38.
75. Вдовиченко В. І., Аксентійчук Х. Б. Поширеність неалкогольної жирової хвороби печінки серед померлих, які страждали на цукровий діабет 2 типу. *Сучасна гастроентерологія.* 2013. № 1 (69). С. 41–46.
76. Скибчик В. А., Войтович М. О. Неалкогольна жирова хвороба печінки : Сучасна діагностика. *Гепатологія.* 2015. № 1. С. 52–56.
77. Dumas M.-E., Kinross J., Nicholson J. K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2014. Vol. 46. P. 46–62.
78. Hepatocellular ballooning in NASH. S. Caldwell, Y. Ikura, D. Dias et al. *J. Hepatol.* 2010. Vol. 53. P. 719–723.
79. Treatment response in the PIVENS trial is associated with decreased hedgehog pathway activity. C. D. Guy, A. Suzuki, M. F. Abdelmalek et al. *Hepatology.* 2015. Vol. 61. P. 98–107.
80. Hirsova P., Gores G. J. Ballooned hepatocytes, undead cells, Sonic hedgehog, and vitamin E: therapeutic implications for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2015. Vol. 61. P. 15–17.
81. Kupffer cells influence parenchymal invasion and phenotypic orientation, but not the proliferation, of liver progenitor cells in a murine model of liver injury. N. Van Hul, N. Lanthier, R. Español Suárez et al. *Am. J. Pathol.* 2011. Vol. 179. P. 1839–1850.

82. Bieghs V., Trautwein C. The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 2013. Vol. 34. 446–452.
83. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD - clinic pathologic correlations from the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. E. M. Brunt, D. E. Kleiner, L. A. Wilson et al. *Hepatology.* 2009. Vol. 49. P. 809–820.
84. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. E. M. Brunt, C. G. Janney, Di A. M. Bisceglie et al. *Am. J. Gastroenterol.* 1999. Vol. 94 (9). P. 2467–2474.
85. Nelson J. E., Klintworth H., Kowdley K. V. Iron metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2012. Vol. 14. P. 8–16.
86. Hepatic reticuloendothelial system cell iron deposition is associated with increased apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. B. D. Maliken, J. E. Nelson, H. M. Klintworth et al. *Hepatology.* 2013. Vol. 57. P. 1806–1813.
87. Deugnier Y., Turlin B. Disorders of Iron Homeostasis: Iron Overload and Related Conditions - The Pathology of Hepatic Iron Overload. *Iron Physiology and Pathophysiology in Humansn.* N.Y. : Springer ; London : Dordrecht Heidelberg, 2012. Section IV. P. 345–355.
88. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: A promising therapeutic target. P. Dongiovanni, A. L. Fracanzani, S. Fargion et al. *J. Hepatol.* 2011. Vol. 55. P. 920–932.
89. Crawford D. H., Fletcher L. M., Kowdley K. V. Disorders of Iron Homeostasis: Iron Overload and Related Conditions - Iron and Liver Disease. *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans / eds : G. D. Anderson, G. J. McLaren.* 1st edn. N.Y. : Springer ; London : Dordrecht Heidelberg, 2012. Section IV. P. 441–454.
90. Shim J.-J. Body iron, serum ferritin, and nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J. Hepatol.* 2012. Vol. 18 (1). P. 105–107.

91. Vela D. Low hepcidin in liver fibrosis and cirrhosis; a tale of progressive disorder and a case for a new biochemical marker. *Molecular Medicine*. 2018. Vol. 24, N 5. P. 18.
92. Богущ Л. С., Сивицкая Л. Н., Даниленко Н. Г. Роль С282У и Н63D мутаций HFE гена в формировании вторичной перегрузки железом. *Мед. панорама*. 2009. № 7. С. 52–55.
93. Population-based analysis of the frequency of HFE gene polymorphisms: Correlation with the susceptibility to develop hereditary hemochromatosis. M. S. Katsarou, R. Latsi, M. Papasavva et al. *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 14, issue 1. P. 630–636.
94. Corradini E., Pietrangelo A. Iron and steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012. Vol. 27, suppl. 2. P. 42–46.
95. Современные аспекты метаболизма железа и его регуляции. В. И. Филимонов, М. А. Тихоновская, Г. И. Бессараб и др. *Запорож. мед. журн.* 2012. № 4. С. 54–59.
96. Гепсидин как регулятор гомеостаза железа. А. А. Левина, Т. В. Казюкова, Н. В. Цветаева и др. *Педиатрия*. 2008. Т. 87, № 1. С. 67–74.
97. Dixon S. J., Stockwell B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature chemical biology*. 2014. Vol. 10, N 1. P. 9–17.
98. Ferroptosis: process and function. Y. Xie, W. Hou, X. Song et al. *Cell death and differentiation*. 2016. Vol. 23, N 3. P. 369–379.
99. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. T. Vanden Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet et al. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2014. Vol. 15, N 2. P. 135–147.
100. Sanyal A. J., Camapbell-Sargent C., Mirshahi F. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2011. Vol. 120. P. 1183–1192.
101. Brunt E. M. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*. 2012. Vol. 21. P. 3–16.

102. Yamauchi T., Kamon J., Waki H. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 2008. Vol. 7. P. 941–946.
103. Scheuer P., Williams R., Muir A. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J. Pathol. Bacteriol.* 1962. Vol. 84. P. 53–64.
104. Familial hemochromatosis: characteristics of the pre cirrhotic stage in a large kindred / J. W. Rowe, J. R. Wands, E. Mezey et al. *Medicine.* 1977. Vol. 56. P. 197–211.
105. Torbenson M. Classification of iron grading. *Linda F., Sanjay K., David E. Book Liver Pathology.* Pennsylvania, 2009. 537 p.
106. Mandayam S., Jamal M. M., Morgan T. R. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 2004. Vol. 24. P. 217–232.
107. Epidemiology of alcohol- related liver and pancreatic disease in the United States. A. L. Yang, S. Vadhavkar, G. Singh, M. B. Omary. *Arch. Intern. Med.* 2008. Vol. 168, N 6. P. 649–656.
108. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. J. Rehm, C. Mathers, S. Popova et al. *Lancet.* 2009. Vol. 373. P. 2223–2233.
109. Jewell J., Sheron N. Trends in European liver death rates: implications for alcohol policy. *Clin. Med.* 2010. Vol. 10. P. 259–263.
110. Немцов А. В., Давыдов К. В., Разводовский Ю. Е. Сравнительный анализ алкогольной ситуации в Беларуси и России. *Наркология.* 2009. № 1. С. 52–60.
111. From Mallory to Mallory-Denk bodies: What, how, and why? K. Zatloukal, S. W. French, C. Stumptner et al. *Exp. Cell Res.* 2007. Vol. 313. P. 2033–2049.
112. Mallory-Denk body pathogenesis revisited. S. W. French, F. Bardag-Gorce, J. Li et al. *World J. Hepatol.* 2010. Vol. 2. P. 295–301.
113. Ubiquitin as a marker of cell injury in nonalcoholic steatohepatitis. B. F. Banner, L. Savas, J. Zivny et al. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000. Vol. 114. P. 860–866.

114. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. C. Lackner, M. Gogg-Kamerer, K. Zatloukal et al. *J. Hepatol.* 2008. Vol. 48. P. 821–828.
115. Strnad P. The cytoskeleton on nonalcoholic steatohepatitis - 100 years old but still youth ful. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. Vol. 5 (2). P. 167–177.
116. Intramitochondrial crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. S. H. Caldwell, A. R. deFreitas, S. H. Park et al. *Hepatology.* 2009. Vol. 49. P. 1888–1895.
117. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. D. D. Harrison-Findik, E. Klein, C. Crist et al. *Hepatology.* 2007. Vol. 46. P. 1979–1985.
118. Hepcidin regulation in wild-type and Hfe knockout mice in response to alcohol consumption: Evidence for an alcohol-induced hypoxic response. M. Heritage, T. Murphy, K. Bridle et al. *Alcohol Clin. Exp. Re.* 2009. Vol. 33. P. 1391–1400.
119. The hypoxia-inducible factor-C/EBPalpha axis controls ethanol-mediated hepcidin repression. E. R. Anderson, M. Taylor, X. Xue et al. *Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 32. P. 4068–4077.
120. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. S. Singh, A. M. Allen, Zh. Wang et al. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2015. Vol. 13 (4). P. 643–654.
121. Wells R. G. The portal fibroblast: not just a poor man's stellate cell. *Gastroenterology.* 2014. Vol. 174 (1). P. 41–47.
122. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. J. Xu, X. Liu, Y. Koyama et al. *Front Pharmacol.* 2014. Vol. 22 (5). P. 167–179.
123. Kisseleva T., Brenner D. A. Mechanisms of fibrogenesis. *Experim. Biol. and Med.* 2008. Vol. 233. P. 109–122.

124. Ferrell L. D., Kakar S. *Liver Pathology*. N.Y. : Demos Medical Publishing, 2011. 537 p.
125. Ismail M. H., Pinzani M. Reversal of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2009. Vol. 15, issue. 1. P. 72–79.
126. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. A. Baiocchi, C. Montaldo, A. Conigliaro et al. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11 (3). P. 1–14.
127. Soyer M. T., Ceballos R., Aldrete J. S. Reversibility of severe hepatic damage caused by jejunoileal bypass after-establishment of normal intestinal continuity. *Surgery*. 1976. Vol. 79. P. 601–604.
128. Reuben A. Ito becomes a star. *Hepatology*. 2002. Vol. 35, issue 2. P. 503–504
129. Popper H., Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am. J. Med.* 1970. Vol. 49. P. 707–721.
130. Rasband, W. S. (1997–2016) Image. J. Bethesda, Maryland. Retrived from: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
131. Otto D. A., Veech R. L. Isolation of a lipocyte-rich fraction from rat liver nonparenchymal cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1980. Vol. 132. P. 509–517.
132. 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. Vol. 24. P. 193–195.
133. Casu A., Canepa M., Nanni G. Perisinusoidal stellate cells or Ito cells and their role in hepatic fibrosis. *Pathologica*. 1994. Vol. 86, N 5. P.467–499.
134. Wasser S., Tan C. E. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 1999. Vol. 28. P. 109–111.
135. Gressner A. M. Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z. Gastroenterol.* 1992. Vol. 30, suppl. 1. P. 5–16.
136. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001. Vol. 21 (3). P. 311–35.

137. Tsukada S., Parsons C. J., Rippe R. A. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta*. 2006. Vol. 364. P. 33–60.
138. Stanciu A., Cotutiu C., Amalinei C. New data about ITO cells. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*. 2002. Vol. 107 (2). P. 235–239.
139. Ito cells are liver resident antigen presenting cells for activating T cell responses. F. Winau, G. Hegasy, R. Weiskirchen et al. *Immunity*. 2007. Vol. 26. P. 117–129.
140. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. C. Kordes, I. Sawitza, A. M. Marbach et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 352. P. 410–417.
141. Wake K. Hepatic stellate cells: three dimensional structure, localization, heterogeneity and development. *Proc. Jpn. Acad.* 2006. Vol. 82. P. 155–164.
142. Степанов Ю. М., Філіппова О. Ю. Стеатоз і стеатогепатит - тригери печінкового фіброгенезу? *Гастроентерологія*. 2013. № 2 (48). С. 97–106.
143. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. Ch. Trautwein, S.L. Friedman, D. Schuppan et al. *J. Hepatol.* 2015. Vol. 62, suppl. 1. P. 15–24.
144. Takaki A., Kawai D., Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. P. 7352–7379.
145. Iredale J. P., Thompson A., Henderson N. C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: biochemistry and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1832 (7). P. 876–883.
146. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. E. M. Brunt, D. E. Kleiner, L. A. Wilson et al. *Hepatology*. 2011. Vol. 53 (3). P. 810–820.
147. Hepatic pathology among patients without known liver disease undergoing bariatric surgery: observations and a perspective from the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Study. D. E. Kleiner, P. D. Berk, J. Y. Hsu et al. *Semin Liver Dis.* 2014. Vol. 34. P. 98–107.

148. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. V. L. Gadd, R. Skoien, E. E. Powell et al. *Hepatology*. 2014. Vol. 59. P. 1393–405.
149. The Laennec staging system for histological sub-classification of cirrhosis is useful for stratification of prognosis in patients with liver cirrhosis. S. U. Kim, H. J. Oh, I. R. Wanless et al. *J. Hepatol.* 2012. Vol. 57 (3). P. 556–563.
150. Orfei E. Reviv of pathology of the liver. URL : <http://www.meddean.luc.edu/lumen/meded/orfpath/pathtitl.htm>.
151. Low clinical relevance of the nonalcoholic fatty liver disease activity score (NAS) in predicting fibrosis progression. M. Ekstedt, L. E. Franzén, U. L. Mathiesen, S. Kechagias. *Scand. J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 47. P. 108–115.
152. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. P. Angulo, D. E. Kleiner, S. Dam-Larsen et al. *Gastroenterology*. 2015. Vol. 149. P. 389–397.e10.
153. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. M. Ekstedt, H. Hagström, P. Nasr et al. *Hepatology*. 2015. Vol. 61. P. 1547–1554.
154. Hepatic steatosis estimated microscopically versus digital image analysis. A. R. Hall, A. P. Dhillon, A. C. Green et al. *Liver Int.* 2013. Vol. 33. P. 926–935.
155. Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. H. O. Adami, W. H. Chow, O. Nyrén et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996. Vol. 88. P. 1472–1477.
156. Is postprandial insulin a useful screening tool for insulin resistance: and its comparison with HOMA in patients with NAFLD. A. K. Jain, A. Namdeo, S. Jain et al. *J. Hepatol.* 2010. Vol. 52, suppl. 1. S145.
157. Global Status Report on Alcohol and Health. World Health Organization. Geneva : World Health Organization, 2014. - 376 p.

158. Leon D. A., Collier T. Trends in mortality from liver cirrhosis in Europe in EASL meeting on alcoholic liver disease. Athens, 2010.
159. Parna K, Rahu K. Dramatic increase in alcoholic liver cirrhosis mortality in Estonia in 1992-2008. *Alcohol Alcohol*. 2010. Vol. 45. P. 548–551.
160. Бабак О.Я. Алкогольная болезнь печени: научные достижения и клинические перспективы. *Сучасна гастроентерологія*. 2006. № 6(32). С.4–9.
161. Desmet V. J., Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J. Hepatol*. 2004. Vol. 40. P. 860–867.
162. 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.
163. 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.
164. Geller S. A., Petrovic L. M. *Biopsy Interpretation of the Liver*. 2nd ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2009. 435 p.
165. Патологическая анатомия : нац. руководство / гл. ред. М. А. Пальцев, Л. В. Кактурский, О. В. Зайратьянц. М. : ГЭОТАРМедиа, 2011. 1264 с.
166. Said A., Ghufuran A. Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *World J. Clin. Oncol*. 2017. Vol. 8. P. 429–436.
167. Fat and hepatocellular carcinoma. C. Balsano, C. Porcu, S. Sideri, S. Tavolaro. *Hepatoma Res*. 2018. Vol. 38. P. 1–12.
168. Global cancer statistics. A. Jemal, F. Bray, M. M. Center et al. *CA Cancer J. Clin*. 2011. Vol. 61. P. 69–90.
169. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence: mortality and prevalence worldwide 2012. URL : http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
170. El-Serag H. B. Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med*. 2011. Vol. 365. P. 1118–1127.

171. Ringelhan M., McKeating J. A., Protzer U. Viral hepatitis and liver cancer. *Philos Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2017. Vol. 372 (1732). Pii: 20160274.
172. Alcoholic liver disease confers a worse prognosis than HCV infection and nonalcoholic fatty liver disease among patients with cirrhosis: an observational study. A. Marot, J. Henrion, J. F. Knebel et al. *PLoS One.* 2017. Vol. 12. P. e0186715.
173. Incidence of hepatocellular carcinoma in all 50 United States, from 2000 through 2012. D. L. White, A. P. Thrift, F. Kanwal et al. *Gastroenterology.* 2017. Vol. 152 . P. 812–820.e5.
174. Reeves H. L., Zaki M. Y., Day C. P. Hepatocellular carcinoma in obesity, type 2 diabetes, and NAFLD. *Dig. Dis. Sci.* 2016. Vol. 61. P. 1234–1245.
175. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. M. S. Ascha, I. A. Hanouneh, R. Lopez et al. *Hepatology.* 2010. Vol. 51. P. 1972–1978.
176. Krishna M. Role of Special Stains in Diagnostic Liver Pathology. *Clin. Liver Dis.* 2013. Vol. 2, N 1. P. 8–10.
177. Prediction of Elderly Anthropometric Dimension Based On Age, Gender, Origin, and Body Mass Index. P. Indah, A. D. Sari, M. R. Suryoputro, H. Purnomo. *IOP Conf. Series : Materials Science and Engineering.* 2016. Vol. 105. P. 7.
178. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Пер. с англ. М. : Мир, 1969. С. 375–376.
179. 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.
180. 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.

181. 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.
182. 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.
183. 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.
184. 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. 56.
185. 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.
186. 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.

187. 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.
188. 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.
189. 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.
190. 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.
191. 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.
192. Туманский В. А., Фень С. В. Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени больных хроническим гепатитом. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 1 (42). С. 18–28.

193. 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.
194. 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.
195. 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.
196. Порівняльна характеристика біохімічних показників крові при хронічному гепатиті та цирозі печінки. Ю. О. Філіппов, Л. Я. Мельниченко, Н. О. Домашнева та ін. *Гастроентерологія*. Дніпропетровськ, 2011. Вип. 45. С. 318–326.
197. Anthropometric and biochemical characteristics of patients with nonalcoholic fatty liver diagnosed by noninvasive diagnostic methods. T. Novakovic, M. Mekic, L. Smilic et.al. *Med. Arch.* 2014. Vol. 68 (1). P. 22–26.
198. Filippova A. Non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease in patients suffering from biliary tract pathology and obesity: clinical and functional aspects. *Modern Science Moderni Věda*. 2015. Vol. 4. P. 134–149.
199. Диагностическая значимость сывороточных маркеров фиброза при хронических заболеваниях печени. Е. В. Винницкая, В. Н. Дроздов, Ю. М. Юнусова и др. *Терапевт. арх.* 2013. № 2. С. 27–31.

200. Чеснокова Л. В., Петров И. М., Трошина И. А. Инсулинорезистентность, атерогенные нарушения и фиброз печени у больных с метаболическим синдромом. *Ожирение и метаболизм*. 2014. № 2. С. 17–23.
201. Association of pro-inflammatory cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver disease Indian. K. Ramesh, P. Shyam, C. Shruti et al. *J. Med. Res.* 2012. Vol. 136, N 2. P. 229–236.
202. Hepatic iron is the major determinant of serum ferritin in NAFLD patients. J. D. Ryan, A. E. Armitage, J. F. Cobbold et al. *Liver Int.* 2018. Vol. 38 (1). P. 164–173.
203. Elevated serum ferritin is associated with increased mortality in non-alcoholic fatty liver disease after 16 years of follow-up. H. Hagström, P. Nasr, M. Bottai et al. *Liver Int.* 2016. Vol. 36 (11). P. 1688–1695.
204. Novel Algorithm for Non-Invasive Assessment of Fibrosis in NAFLD. J. P. Sowa, D. Heider, L. P. Bechmann, G. Gerken. *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (4). P. e62439.
205. Tiniakos D. G., Vos M. B., Brunt E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Ann. Rev. Pathol.* 2010. N 5. P. 145–171.
206. Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences. S. Joshi-Barve, I. Kirpich, M. C. Cave et al. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2015. Vol. 1, N 4. P. 356–367.
207. Bettermann K., Hohensee T., Haybaeck J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15 (6). P. 9924–9944.
208. Fernandez-Rojo M. A., Ramm G. A. Caveolin-1 Function in Liver Physiology and Disease. *Trends Mol. Med.* 2016. Vol. 22 (10). P. 889–904.
209. Iancu T. C., Manov I. Electron Microscopy of Liver Biopsies. *Liver biopsy*. 2011. Vol. 4 (17). P. 109–136.
210. Ultrastructural findings in human nonalcoholic steatohepatitis. S. Jayakumar, S. Guillot, C. Argo et al. *Exp. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. Vol. 5 (2). P. 141–145.

211. The plasma lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. P. Puri, M. M. Wiest, O. Cheung et al. *J. Hepatol.* 2009. Vol. 46 (4). P. 1081–1090.
212. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. A. E. Feldstein, R. Lopez, T. A. Tamimi et al. *J. Lipid Res.* 2010. Vol. 51 (10). P. 3046–3054.
213. Caligiuri A., Gentilini A., Marra, F. Molecular Pathogenesis of NASH. *J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17 (9). P. 1–34.
214. Musso G., Gambino R., Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog. Lipid Res.* 2013. Vol. 52 (1). P. 175–191.
215. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Y. Takeshita, T. Takamura, M. Honda et al. *J. Diabetol.* 2014. Vol. 57 (5). P. 878–890.
216. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. A. Wree, M. D. McGeough, C. A. Peña et al. *J. Mol. Med.* 2014. Vol. 92 (10). P. 1069–1082.
217. Schuppan D., Schattenberg J. M. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013. Vol. 28 (suppl. 1). P. 68–76.
218. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. S. Subramanian, L. Goodspeed, S. Wang et al. *J. Lipid Res.* 2011. Vol. 52 (9). P. 1626–1635.
219. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Is Associated With A Decline In Pancreatic Beta Cell (β -Cell) Function. M. S. Siddiqui, K. L. Cheang, V. A. Luketic et al. *Dig. Dis. Sci.* 2015. Vol. 60 (8). P. 2529–2537.
220. Transcriptional Regulation of Bim by FoxO3A Mediates Hepatocyte Lipoapoptosis. F. J. Barreyro, S. Kobayashi, S. F. Bronk et al. *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282 (37). P. 141–157.

221. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. R. Loomba, O. Quehenberger, A. Armando, E. A. Dennis. *J. Lipid Res.* 2015. Vol. 56 (1). P. 185–192.
222. Сучасні патоморфологічні особливості та перспективні напрямки діагностики неалкогольного стеатогепатиту. О.О.Дядик, Ю.І.Бекетова, О.П.Мінцер, О.О.Суханова *Art of Medicine.* 2018. № 3(7), с. 39-44.
223. Mallory-Denk-bodies: Lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. P. Strnad, K. Zatloukal, C. Stumptner et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1782. P. 764–774.
224. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. H. C. Pinto, A. Baptista, M. E. Camilo et al. *Dig. Dis. Sci.* 1996. Vol. 41. P. 172–179.
225. Transglutaminase-2 regulates Mallory body inclusion formation and injury associated liver hypertrophy. P. Strnad, M. Harada, M. Siegel et al. *Gastroenterology.* 2007. Vol. 132. P. 1515–1526.
226. Туманский В. А., Шишкин М. А., Шебеко Ю. А. Иммуноклеточный киллинг: морфогенез и последствия для больных хроническим вирусным гепатитом. *Патологія.* 2008. Т. 5, № 3 С. 110–112.
227. Туманский В. А., Шебеко Ю. А. Патогенно индуцированный апоптоз гепатоцитов при хроническом вирусном гепатите: молекулярные механизмы и микроскопическая диагностика. *Патологія.* 2008. Т. 5, № 3. С. 29–34.
228. Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and nonalcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012. Vol. 36 (9). P. 815–823.
229. Crawford J. M., Burt A. D. Ballooning degeneration. *MacSween's Pathology of the Liver.* 6 ed. Churchill Livingstone-Elsevier, 2012. Ch. 1 : Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. P. 37.

230. The Fat Droplet in Hepatocellular Ballooning and Implications for Scoring Nonalcoholic Steatohepatitis Therapeutic Response. C. K. Argo, Y. Ikura, C. Lackner, S. H. Caldwell. *Hepatology*. 2016. Vol. 63/3. P. 1056–1057.
231. Increased production of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes. F. Rangwala, C. D. Guy, J. Lu et al. *J. Pathol.* 2011. Vol. 224. P. 401–410.
232. Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. C. D. Guy, A. Suzuki, M. Zdanowicz et al. *Hepatology*. 2012. Vol. 55. P. 1711–1721.
233. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. Y. Jung, R. P. Witek, W. K. Syn et al. *Gut*. 2010. Vol. 59. P. 655–665.
234. Increased Autophagy Markers Are Associated with Ductular Reaction during the Development of Cirrhosis. T. M. Hung, R. H. Yuan, W. P. Huang et al. *Am. J. Pathology*. 2015. Vol. 185 (9). P. 2454–2467.
235. Harrison-Findik D. D. Gender-related variations in iron metabolism and liver diseases. *World J. Hepatol.* 2010. Vol. 2, N 8. P. 302–310.
236. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steatohepatitis. P. Sorrentino, S. D'Angelo, U. Ferbo et al. *J. Hepatol.* 2010. Vol. 50, N 2. P. 351–357.
237. Pulixi E. A., Arosio P. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and alcoholic steatohepatitis in the pathogenesis of altered iron regulation in chronic hepatitis. *Heamatologica*. 2010. Vol. 92, N 8. P. 1037–1042.
238. Heymann F., Tacke F. Immunology in the liver - from homeostasis to disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016. Vol. 13 (2). P. 88–110.
239. Intestinal permeability in non-alcoholic fatty liver disease: the gut-liver axis. E. Scarpellini, M. Lupo, C. Iegri et al. *Rev. Recent Clin. Trials*. 2014. Vol. 9. P. 141–147.
240. Fukui H. Gut Microbiota and host reaction in liver diseases. *Microorganisms*. 2015. Vol. 3 (4). P. 759–791.

241. Origins and functions of liver myofibroblasts. S. Lemoinne, A. Cadoret , H. el Mourabit et al. *BBA*. 2013. Vol. 1832 (7). P. 948–954.
242. Lepreux S., Desmoulière A. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo)fibroblasts. *Front Physiol*. 2015. Vol. 6. P. 173.
243. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. D. Karin, Yu. Koyama, D. Brenner et al. *Dif*. 2016. Vol. 92, issue 3. P. 84–92.
244. Fausther M., Lavoie E. G., Dranoff J. A. Contribution of myofibroblasts of different origins to liver fibrosis. *Curr. Pathobiol. Rep*. 2013. Vol. 1(3). P. 225–230.
245. Dranoff J. A., Wells R. G. Portal fibroblasts: Under appreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology*. 2010. Vol. 51 (4). P. 1438–1444.
246. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. N. Bosselut, C. Housset, P. Marcelo et al. *Proteomics*. 2010. Vol. 10 (5). P. 1017–1028.
247. Comparative proteomic analysis of rat hepatic stellate cell activation: a comprehensive view and suppressed immune response. J. Ji, F. Yu, Q. Ji et al. *Hepatology*. 2012. Vol. 56 (1). P. 332–349.
248. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. M. Perepelyuk, M. Terajima, A. Y.Wang et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2013. Vol. 304 (6). P. 605–614.
249. S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. L. Chen, J. Li, J. Zhang et al. *J. Hepatol*. 2015. Vol. 62 (1). P. 156–164.
250. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. P. J. Murray, J. E. Allen, S. K. Biswas et al. *Immunity*. 2014. Vol. 41 (1). P. 14–20.

251. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. J. Xue, S. V. Schmidt, J. Sander et al. *Immunity*. 2014. Vol. 40 (2). P. 274–288.
252. Szabo G., Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015. Vol. 12. P. 387–400.
253. Schattenberg J. M., Lee M. S. Extracellular vesicles as messengers between hepatocytes and macrophages in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016. Vol. 150 (4). P. 815–818.
254. Exosomes in liver pathology. K. Sato, F. Meng, S. Glaser et al. *J. Hepatol.* 2016. Vol. 65 (1). P. 213–221.
255. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. F. Momen-Heravi, B. Saha, K. Kodys, D. Catalano et al. *J. Transl. Med.* 2015. Vol. 13 (261). P. 1–13.
256. Alcohol stimulates macrophage activation through caspase dependent hepatocyte derived release of CD40L containing extracellular vesicles. V. K. Verma, H. Li, R. Wang et al. *J. Hepatol.* 2016. Vol. 64. P. 651–660.
257. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. J. P. Pradere, J. Kluwe, S. De Minicis et al. *Hepatology*. 2013. Vol. 58 (4). P. 1461–1473.
258. Exosomes mediate intercellular transfer of pro-fibrogenic connective tissue growth factor (CCN2) between hepatic stellate cells, the principal fibrotic cells in the liver. A. Charrier, R. Chen, L. Chen et al. *Surgery*. 2014. Vol. 156. P. 548–555.
259. Chen L., Brigstock D. R. Integrins and heparan sulfate proteoglycans on hepatic stellate cells (HSC) are novel receptors for HSC-derived exosomes. *FEBS Lett.* 2016. Vol. 590 (23). P. 4263–4274.
260. Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by microRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. L. Chen, A. Charrier, Y. Zhou et al. *Hepatology*. 2014. Vol. 59. P. 1118–1129.

261. Marra F., Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014. Vol. 147. P. 577–594.
262. Tacke F., Zimmermann H.W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J. Hepatol.* 2014. Vol. 60. P. 1090–1096.
263. Hepatitis C virus-induced CCL5 secretion from macrophages activates hepatic stellate cells. R. Sasaki, P. B. Devhare, R. Steele et al. *Hepatology*. 2017. Vol. 66 (3). P. 746–757.
264. Гаврилюк А. О. Гістологічні і імуногістохімічні ознаки ймовірного прогресування фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит В, С і В+С. *Світ медицини та біології*. 2012. № 3. С. 25–29.
265. Barnes M. A., Roychowdhury S., Nagy L. E. Innate immunity and cell death in alcoholic liver disease: Role of cytochrome P4502E1. *Redox Biology*. 2014. Vol.2. P. 929–993.
266. Burt A. D., Portmann B. C., Ferrell L. D. MacSween's Pathology of the Liver. 6th (enl.). N.Y. : *Churchill livingstone Elsevier*; 2012. 1020 p.
267. Hernandez-Gea V., Friedman S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Ann. Rev. Pathol.* 2011. Vol. 6. P. 425–456.
268. Liver fibrosis in elderly cadavers: localization of collagen types I, III and IV, α -smooth muscle actin, and elastic fibers. K. M. Mak, E. Chu, K. H. Lau, A. J. Kwong. *Anat. Rec.* 2012. Vol. 295 (7). P. 1159–1167.
269. Different collagen types show distinct rates of increase from early to late stages of hepatitis C-related liver fibrosis. W. Chen, J. B. Rock, M. M. Yearsley et al. *Hum. Pathol.* 2014. Vol. 45 (1). P. 160–165.
270. Wells R. G. Hepatic fibrosis and cirrhosis. *Molecular Pathology of Liver Diseases* / ed. S. P. S. Monga. Pittsburgh : Springer Science+Business Media, 2011. P. 449–466.
271. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. T.Roskams, N.D.Theise, C. Balabaud et al. *Hepatology*. 2004. Vol.39. P.1739–1745.

272. Strazzabosco M., Fabris L. Development of the bile ducts: essentials for the clinical hepatologist. *J Hepatol.* 2012. Vol. 56(5). P.1159–1570.
273. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. V. Cardinale, Y. Wang, G. Carpino et al. *Hepatology.* 2011. Vol. 54 (6). P. 2159–2172.
274. Emerging concepts in biliary repair and fibrosis. L.Fabris, C.Spirli, M.Cadamuro et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017. Vol. 313(2). P.G102–G116.
275. Role of hepatic progenitor cells in nonalcoholic fatty liver disease development: cellular cross-talks and molecular networks. G. Carpino, A. Renzi, P. Onori, E. Gaudio. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14 (10). P. 20112–20130.
276. Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. L.K.Kanninen, R.Harjumäki, P.Peltoniemi et al. *Biomaterials.* 2016. - Vol. 103. P. 86-100.
277. Centrilobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. L. Zhao, M. Westerhoff, R. K. Pai et al. *Mod. Pathol.* 2018. Vol. 31 (1). P. 150–159.
278. Гаврилюк А.О. Наслідки хронічних вірусних гепатитів В, С, В+С. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2015. №4. С. 23-25.

ДОДАТОК А1



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник КУ «Одеське обласне
патологоанатомічне бюро» ООР

В.П. Бурлаченко

(керівник установи, в якій проведено впровадження)

«3» 11 2017 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особенности депонирования разновалентного железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите // Патология – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.

Фень С.В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом // Морфология. – 2017. - №3.

Пат. № 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 Запоріж. держ. мед. ун-т. - № u201600602; заявл. 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл. №13.

Пат. №112148 Україна, МПК7(2016.01) G01N21/00, A61B1/00 Спосіб визначення ступеня стеатозу в біоптатах печінки / Туманський В.О., Фень С.В.; заявник і патентовласник Запоріж. держ. мед. ун-т. - № u201604674; заявл. 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл. №23.

4. **Впроваджено:** в КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро» ООР

5. **Строки впровадження:**

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)** - запропоновані критерії ефективні

| Показники | За даними | |
|--|-------------|--------------------------------------|
| | Розробників | Установи, яка проводила впровадження |
| Підвищення точності діагностики та прогресування фіброзу і стеатозу в трепанобіоптатах при стеатогепатиті. | 25% | |

7. **Зауваження, додатки** не вносилися

Відповідальний за впровадження Зав. Суворовським ПАВ Матюшина Н.М
(посада, підпис, ПІБ)

«3» 11 2017 р.

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник начальника медичної роботи
КУ «Запорізьке обласне
патологоанатомічне бюро» ЗОР
А.М. Шербина
(керівник установи в разі відсутності керівництва)
«13» 09 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особливості депонирования разновалентного железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите // Патологія – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.

Туманський В.А., Фень С.В. Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом // Патологія. – 2018. - №1. –с.18-28.

Пат. № 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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201600602;заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.

Пат. №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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201604674;заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.

Пат. № 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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201610030; заявл 03.10.2016; опубл. 25.05.2018, Бюл. №10.

4. **Впроваджено:** в КУ «Запорізьке обласне патологоанатомічне бюро» ЗОР

5. **Строки впровадження:**

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3) - запропоновані критерії ефективні**

| Показники | За даними | |
|--|-------------|--------------------------------------|
| | Розробників | Установи, яка проводила впровадження |
| Підвищення точності діагностики та прогресування фіброзу і стеатозу в трепанобіоптатах при стеатогепатиті. | 25% | |

7. **Зауваження, додатки** не вносилися

Відповідальний за впровадження: завідувач відділенням ПАВ «НДЦ» Лапсарь Г.С.
(познач, підпис, ПІБ)

13.09 2018 р.

ДОДАТОК АЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник КУ «Запорізьке обласне бюро
судово-медичної експертизи» ЗОРА.В. Куртєв
(керівник установи, в якій проведено впровадження)
« 14 » вересня, 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** 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.

Туманский В.А., Фень С.В. Особенности депонирования развалентного железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите // Патологія. – 2015. – Т.35.- №3. – с. 41-48.

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.

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.

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.

Пат. №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 Запорізь. держ. мед.ун-т. - № u201604674; заявл. 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл. №23.

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.

4. **Впроваджено:** в КУ «Запорізьке обласне бюро судово-медичної експертизи» ЗОР

5. **Строки впровадження:** грудень 2016 – вересень 2018

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)** - запропоновані критерії ефективні

| Показники | За даними | |
|--|-------------|--------------------------------------|
| | Розробників | Установи, яка проводила впровадження |
| Підвищення точності діагностики та градації стеатозу і фіброзу в печінці при стеатогепатиті. | | 20% |

7. **Зауваження, додатки** не вносилися

Відповідальний за впровадження: зав.відділенням судово-медичної гістології
10 вересня 2018 р. П.О. Курилов

ДОДАТОК А4



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особливості депонирования разновалентного заліза (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печені при алкогольному и неалкогольному стеатогепатите // Патологія – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.

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.

Фень С.В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом // Морфологія. – 2017. - №3.

Пат. № 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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201600602;заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.

Пат. №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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201604674;заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.

4. **Впроваджено:** принципи діагностики прогресування фіброзу та стеатозу при стеатогепатиті в трепанобіоптатах хворих.

5. **Термін впровадження:**

6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України.

7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України (протокол від 25.10.2017р. №3).

Завідувач кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права
Вінницького національного медичного університету
ім. М.І. Пирогова
д.мед.н., проф.

А.О. Гаврилюк

ДОДАТОК А5



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особенности депонирования развального железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите // Патология – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.

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 // Патология – 2016. – Т. 38. – №3. – с. 35-42.

Фень С.В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом // Морфология. – 2017. - №3.

Пат. № 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 Запорізь. держ. мед.ун-т. - № u201600602; заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.

Пат. №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 Запорізь. держ. мед.ун-т. - № u201604674; заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.

4. **Впроваджено:** принципи діагностики прогресування фіброзу та стеатозу при стеатогепатиті в трепанобіоптатах хворих.

5. **Термін впровадження:**

6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України.

7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України (протокол від 12.10.2017р № 2).

Завідувач кафедри патологічної анатомії та судової медицини
Львівського національного медичного університету
ім. Данила Галицького МОЗ України

д.мед.н., проф.

Ю.О. Поспішіль

ДОДАТОК А6

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової та лікувальної роботи Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», д.мед.н., професор _____ В.Й. Мамчур
 “ 20 ” _____ 10 _____ 2017р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особливості депонирования разновалентного железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите // Патологія – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.

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.

Фень С.В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом // Морфологія. – 2017. - №3.

Пат. № 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 Запорізь. держ. мед. ун-т. - № u201600602; заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.

Пат. №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 Запорізь. держ. мед. ун-т. - № u201604674; заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.

4. **Впроваджено:** принципи діагностики прогресування фіброзу та стеатозу при стеатогепатиті в трепанобіоптатах хворих.

5. **Термін впровадження:** 01.03.2017-02.10.2017р.

6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол № 27 від 19 жовтня 2017р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗ України»
к.м.н., доц.



О.А. Алексеевко

ДОДАТОК А7



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.
2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.
3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особливості депонирования разновалентного заліза (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольному и неалкогольному стеатогепатите // Патологія – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.
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.
Фень С.В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом // Морфологія. – 2017. – №3.
Пат. № 108321 Україна, МПК7(2016.01) G01N21/00, G01N1/00. Спосіб визначення дивалентного заліза в біопсійному матеріалі / Туманський В.О., Фень С.В.; заявник і патентовласник Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201600602;заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.
Пат. №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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201604674;заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.
4. **Впроваджено:** принципи діагностики прогресування фіброзу та стеатозу при стеатогепатиті в трепанобіоптатах хворих.
5. **Термін впровадження:** 01.03.2017-02.10.2017р.
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України.
7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріалі лекцій і практичних занять з патологічної анатомії, а також в наукову роботу кафедри.
8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України (протокол від 23.10.2017р №226).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України

д.мед.н., проф.



І.І. Яковцова

ДОДАТОК А8

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
 Медичного інституту
 Сумського державного університету
 МОН України
 проф. Лобода А.М.
 «08» fd 2017р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу та фіброзу печінки в біоптатах хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:** Туманський В.А., Фень С.В. Особливості депонирования разновалентного заліза (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в печени при алкогольном и неалкогольном стеатогепатите // Патологія – 2015. – Т.35.-№3. – с. 41-48.

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.

Фень С.В. Иммуногистохимическая характеристика депонирования коллагена I, III, IV, типа в динамике прогрессирования основных типов фиброза печени у больных неалкогольным стеатогепатитом // Морфологія. – 2017. - №3.

Пат. № 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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201600602;заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.

Пат. №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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201604674;заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.

4. **Впроваджено:** принципи діагностики прогресування фіброзу та стеатозу при стеатогепатиті в трепанобіоптатах хворих.

5. **Термін впровадження:**

6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патоморфології з курсом судової медицини і курсом гістології, цитології та ембріології Медичного інституту Сумського державного університету МОН України.

7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патоморфології з курсом судової медицини і курсом гістології, цитології та ембріології Медичного інституту Сумського державного університету МОН України (протокол від 5.12.2017 р № 18).

Завідувач кафедри патоморфології з курсом судової медицини і курсом гістології, цитології та ембріології Медичного інституту
 Сумського державного університету МОН України

д.мед.н., проф.



А.М. Романюк

ДОДАТОК А9



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Запорізького державного медичного
університету МОЗ України
проф. Візир В.А.
14/09 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток стеатогепатиту, градація стеатозу, фіброзу та репаративних процесів в біоптатах печінки хворих.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.

3. **Джерело інформації:**

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.

Туманский В.А., Фень С.В. Патоморфология фиброза печени в трепанобиоптатах больных стеатогепатитом: основные типы, источники развития, особенности прогрессирования // Патологія. – 2017. - №3. –с.244-256.

Туманский В.А., Фень С.В. Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом // Патологія. – 2018. - №1. –с.18-28.

Пат. № 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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201600602;заявл 25.01.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл №13.

Пат. №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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201604674;заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.

Пат. № 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 Запорізь.держ. мед.ун-т. - № u201610030; заявл 03.10.2016; опубл. 25.05.2018, Бюл. №10.

4. **Впроваджено:** принципи діагностики прогресування фіброзу та стеатозу при стеатогепатиті в трепанобиоптатах хворих.

5. **Термін впровадження:**

6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії та судової медицини Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії та судової медицини Запорізького державного медичного університету МОЗ України (протокол від 13.09.2018р № 3).

Завідувач кафедри патологічної анатомії та судової медицини
Запорізького державного медичного університету МОЗ України

д.м.н., проф.

С.І. Тертишний

ДОДАТОК А10




АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** визначення чинників, що впливають на розвиток та прогресування стеатогепатиту, градація стеатозу печінки в біоптатах хворих.
2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: проректор з наукової роботи, д.мед.н., професор Туманський В.О., аспірант кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Фень С.В.
3. **Джерело інформації:** Tumanskiy V. A., Fcn' 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.
 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.
 Пат. №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 Запорізьк. держ. мед.ун-т. - № u201604674;заявл 26.04.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл №23.
4. **Впроваджено:** на кафедрі фізичної та колоїдної хімії Запорізького державного медичного університету .
5. **Термін впровадження:** грудень 2016- вересень 2018 року
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра фізичної та колоїдної хімії Запорізького державного медичного університету МОЗ України.
7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з фізичної та колоїдної хімії, а також в наукову роботу кафедри.
8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри фізичної та колоїдної хімії Запорізького державного медичного університету МОЗ України (протокол від 3 вересня 2018 р № 1).

Завідувач кафедри фізичної та колоїдної хімії
 Запорізького державного медичного університету МОЗ України

д.фарм.н., проф.


 А.Г. Каплаушенко

ДОДАТОК Б
НАУКОВІ ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ 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. doi: 10.14739/2310-1237.2015.3.55589 (Дисертант виконав набір матеріалу, ГХ дослідження та статистичну обробку результатів).

2. Tumanskiy V. A., Fen' S. V., Varynskyi 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. DOI: 10.14739/2310-1237.2016.3.87485 (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. DOI: 10.14739/2310-1237. 2017.3.118299. (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. DOI: 10.14739/2310-1237. 2018.1.129316. (*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.

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. 56.

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 ВЕР-ХМС дослідження та статистичну обробку результатів).*

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2013» (Запоріжжя, 2013) – публікація тез, усна доповідь.
2. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2015) – публікація тез, усна доповідь.
3. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2016» (Запоріжжя, 2016) – публікація тез, усна доповідь.
4. Міжнародна науково-практична конференція «Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки» (Львів, 2016) – публікація тез.
5. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2017» (Запоріжжя, 2017) – публікація тез, усна доповідь.
6. Міжнародна науково-практична конференція «Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення» (Дніпро, 2017) – публікація тез.
7. Науково-практична конференція «Актуальні проблеми сучасної патологічної анатомії» (Київ, 2017) – публікація тез, усна доповідь.
8. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної медицини та фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ)» (Запоріжжя, 2018) – публікація тез, усна доповідь.
9. Всеукраїнська науково-практична конференція «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2018) – публікація тез, усна доповідь.
10. X Конгрес Асоціації патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології» (Івано-Франківськ, 2018) – публікація тез, усна доповідь.