

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. С.І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО**

ШИШКІН МАКСИМ АНДРІЙОВИЧ

УДК 616.36-002.1 – 091.8-076

**ПАТОГІСТОЛОГІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
ПРОГРЕСІЇ ХРОНІЧНИХ ВІРУСНИХ ГЕПАТИТІВ В ТА С ЗА ДАНИМИ
ТРЕПАНОБІОПСІЙ ПЕЧІНКИ**

14.03.02 – патологічна анатомія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Сімферополь – 2008

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник:

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

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор **Загорулько Олександр Кімович**, Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії;

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

Захист дисертації відбудеться 14.05.2008 р. о 15годині, на засіданні вченої ради Д 52.600.02 при Кримському державному медичному університеті ім. С.І. Георгієвського (95006, м. Сімферополь, б. Леніна, 5/7).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського (95006, м. Сімферополь, б. Леніна, 5/7).

Автореферат розісланий 12.03. 2008 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Г. О. Мороз

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хронічні вірусні гепатити В (ХВГВ) і С (ХВГС) відрізняються малосимптомним перебігом, пізньою діагностикою і терапією, а також безсимптомним розвитком цирозу і раку печінки з нерідкими летальними наслідками (Д.Т. Абдурахманов, 2002; О.Л. Арямкина з співавт., 2004). Орієнтовно у 25% осіб працездатного віку, інфікованих вірусом гепатиту С, визначається мінімальна клінічна симптоматика гепатиту, нормальний рівень трансаміназ в крові та відсутність гіпербілірубінемії (О.О. Знойко, Н.Д. Ющук, Е.А. Климова, 2003; К.В. Жданов з співавт., 2006). В той же час, за даними гістологічних досліджень печінки, у 10-30 % хворих ХВГС з нормальним рівнем амінотрансфераз визначаються ознаки помірного запалення і вираженого фіброзу печінки, а малосимптомний розвиток ХВГС більш ніж у 80% пацієнтів завершується цирозом печінки (И.Г. Никитин, С.Л. Кузнецов, 1998; L.G. Guidotti, F.V. Chisari, 2006).

«Золотим» стандартом діагностики хронічного вірусного гепатиту (ХВГ), разом з ідентифікацією вірусу в крові полімеразною ланцюговою реакцією, є пункційна біопсія печінки, при патоморфологічному дослідженні якої визначається морфологічна активність гепатиту і розвиток фіброзу печінки шляхом розрахунку індексу гістологічної активності (ІГА) гепатиту за Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C. (1981), стадії патологічного процесу за Desmet V., з співавт. (1995) і стадії фіброзу печінки за класифікацією METAVIR (G. Caughan, A. Zekry, 2002). Ці визнані гепатологами класифікаційні системи мають безперечні переваги і водночас - обмежену прогностичну цінність в ранньому визначенні прогресії хронічного вірусного гепатиту, на призупинення якої направлені сучасні методи медикаментозного лікування хворих.

На основі сучасних молекулярних досліджень і клінічного досвіду визначені три можливі модальності прогресії ХВГ: вірус-індуковане руйнування гепатоцитів і запалення в печінці, деструкція печінки активованими імунними клітинами та розвиток фіброзу і цирозу печінки. Серед мікроскопічних критеріїв прогресії ХВГВ і ХВГС до теперішнього часу найменш вивченим є морфогенез імунного кілінгу гепатоцитів і деструкції печінки імунноцитами порталних трактів, роль в цьому процесі активованих зірчастих клітин Купфера, а також наслідки імунноклітинної деструкції для прогресії хвороби. Недостатньо досліджений також морфогенез фіброзу і цирозу печінки у хворих на ХВГ. Розвиток цирозу печінки традиційно пов'язували з активацією синтезу колагену фібробластами; останніми роками з'явилися повідомлення про важливу роль в розвитку фіброзу і цирозу у хворих на ХВГ активованих перисинусоїдальних зірчастих клітин Іто, які в нормі накопичують ретиноїди і синтезують обмежений спектр молекул міжклітинного матриксу (G.B. Gabrielli, M. Casaril, A.M. Stanzial, 2003; J.S. Campbell, Riehle, 2006). При розвитку фіброзу печінки недостатньо вивчені взаємовідносини між активованими зірчастими клітинами Купфера, активованими клітинами Іто і фібробластами, не конкретизовані структурні

прояви активації клітин Іто і їх колагенсинтезуючих функцій при прогресії фіброзу печінки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи Запорізького державного медичного університету: «Нові технології ранньої діагностики онкологічних, нейро-ендокринних, серцево-судинних, цереброваскулярних, аутоімунних і інфекційних захворювань», 2006-2010 р.р. (№ державної реєстрації 0106U003709).

Мета і завдання дослідження:

Удосконалити і доповнити морфогенетичні критерії прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С на підставі імуногістохімічних, патогістологічних і комп'ютерно-морфометричних досліджень трепанобіопсій печінки хворих і аналізу їх клініко-біохімічних даних для використання в патологоанатомічній діагностиці і прогнозуванні перебігу хвороби.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. У трепанобіоптатах печінки хворих на ХВГВ і ХВГС різного ступеня гістологічної активності визначити патогістологічні і імуногістохімічні маркери вірус-індукованих пошкоджень печінки.

2. У трепанобіоптатах печінки хворих на ХВГВ і ХВГС різного ступеня гістологічної активності типувати склад імуноцитів у вогнищах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, в портальних імуноклітинних інфільтратах і в «ступінчастих некрозах», та визначити патогістологічні і імуногістохімічні особливості імуноклітинних пошкоджень печінки.

3. На підставі даних патогістологічних, комп'ютерно-морфо-метричних і імуногістохімічних досліджень вивчити взаємозв'язок між активацією фібробластів в портальних трактах, перисинусоїдальних клітин Іто і макрофагів Купфера із ступенем розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГС.

4. Визначити патогістологічні і імуногістохімічні показники прогресії фіброзу печінки і вивчити кореляційні взаємозв'язки між вираженістю фіброзу печінки і клініко-біохімічними проявами ХВГВ і ХВГС.

5. Співвіднести результати патоморфологічного дослідження біоптатів печінки з клініко-біохімічними даними хворих ХВГВ і ХВГС різного ступеня гістологічної активності.

6. Впровадити для використання в патологоанатомічній діагностиці найбільш значущі мікроскопічні показники прогресії ХВГВ і ХВГС.

Об'єкт дослідження: морфогенез хронічного вірусного гепатиту В і С.

Предмет дослідження: патоморфологічні особливості прогресії хронічних вірусних гепатитів В і С за даними трепанобіопсій печінки.

Методи дослідження: гістологічні, імуногістохімічні і комп'ютерно-морфометричні дослідження трепанобіоптатів печінки для визначення молекулярно-клітинних критеріїв прогресії ХВГВ і ХВГС, порівняльний аналіз морфологічних і клініко-біохімічних даних хворих на ХВГВ і ХВГС різного ступеня активності; варіаційний статистичний і кореляційний аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі комплексного патогістологічного, гістохімічного, імуногістохімічного і комп'ютерно-морфометричного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих і аналізу їх клініко-біохімічних показників вперше одержані нові дані про мікроскопічні критерії прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С. В печінці хворих на ХВГВ і ХВГС вперше типовано склад імуноцитів у вогнищах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», а також в порталних імуноклітинних інфільтратах.

Вперше визначено, що так звана «запальна лімфоцитарна інфільтрація часточок печінки» у вигляді скупчень імунокомпетентних клітин навколо гепатоцитів, є вогнищами імунного кілінгу інфікованих вірусом гепатоцитів з наявністю CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів, а так звані «ступінчасті некрози» є зонами імуноклітинної деструкції гепатоцитів периферії печінкових часточок, в яких швидко активується колагеноутворення активованими клітинами Іто і фібробластами. Встановлено, що найбільш значущими мікроскопічними додатковими ознаками прогресії ХВГ є: значна кількість внутрішньочасточкових вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, збільшення кількості CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів у вогнищах імуноклітинного кілінгу і в крайових зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення в часточках печінки числа CD68+ клітин Купфера з ознаками фагоцитоза, прогресуюча колагенізація внутрішньочасточкових синусоїдів, розширення площі лімфоцитарної інфільтрації і фіброзу порталних трактів.

На підставі імуногістохімічних досліджень встановлено, що надмірну продукцію колагену в печінці хворих на ХВГС здійснюють активовані А-SMA (антиген до гладком'язового актину) позитивні зірчасті перисинусоїдальні клітини Іто і А-SMA позитивні фібробласти порталних трактів. Вперше доведено, що поява нових поколінь клітин Іто фіброгенного типу пов'язана з лімфоцитарною інфільтрацією порталних трактів, із збільшенням числа і площі імуноклітинних «ступінчастих некрозів», а також з наростанням фагоцитарної активності клітин Купфера.

Вперше встановлено, що експресія А-SMA клітинами Іто і фібробластами є раннім прогностичним маркером вірогідності розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГС з нормальним рівнем трансаміназ в крові або з помірною гіперферментемією, тоді як розвитку важкого фіброзу печінки передують значне зростання числа активованих клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки.

За результатами гістохімічних і гістологічних досліджень визначені основні складові важкого фіброзу печінки у хворих хронічним вірусним гепатитом С: збільшення числа перисинусоїдальних клітин Іто, поширена колагенізація стінок внутрішньочасточкових синусоїдів і розширення їх отворів, виражений фіброз в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» і в порталних трактах.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі зіставлення вивчених патогістологічних і імуногістохімічних змін в печінці з клініко-

біохімічними показниками доведено, що хворим на ХВГВ і ХВГС, навіть при мінімальних симптомах хвороби і при мінімальних відхиленнях лабораторних показників гепато-біліарних функцій, показана пункційна трепанобіопсія печінки, результати якої найадекватніше відображують ступінь виразності вірус-індукованих і імуноклітинних уражень печінки, ступінь активації колагеноутворення і прогресії фіброзу печінки. Встановлено, що найточніше ступінь вірусного інфікування гепатоцитів вірусом гепатиту В визначається при імуногістохімічному виявленні HBsAg і HBcAg.

Показано, що найбільш достовірні діагностичні і прогностичні результати патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих на ХВГ забезпечує паралельне забарвлення серійних зрізів гематоксилином і еозином, трибарвним методом Масона і методом ван-Гизон; при уточненні ступеня активності хронічного гепатиту істотні додаткові дані дає імуногістохімічне виявлення HBsAg в гепатоцитах, CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ клітин Купфера, для прогнозування вірогідності розвитку важкого фіброзу печінки, окрім методик Масона і ван-Гизон, необхідно використовувати імуногістохімічне виявлення А-SMA позитивних клітин Іто і фібробластів, а також колагену 4 типу.

При прогнозуванні вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих на ХВГВ і ХВГС слід враховувати зростання числа активованих А-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки, а також сегментарну колагенізацію стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність А-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в порталних трактах, проникнення тонких фіброзних септ з порталних трактів в часточки печінки, зростання числа порталних трактів з фіброзом різного ступеня. Разом з науковим керівником проф. Туманським В.О. розроблений і запатентований спосіб прогнозування розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГС в трепанобіопсіях печінки.

Результати проведених досліджень впроваджені в роботу КУ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро», КУ «Запорізьке обласне патологоанатомічне бюро» і КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро», в патологоанатомічне відділення Донецького обласного клінічного територіального медичного об'єднання, в відділ патоморфології центральної наочно-дослідної лабораторії Донецького національного медичного університету ім. М. Горького.

Нові теоретичні і практичні положення дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі на кафедрі патологічної анатомії і судової медицини з основами права Запорізького державного медичного університету (ЗДМУ), на кафедрі патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, на кафедрі патологічної анатомії, патологічної фізіології, внутрішніх хвороб №1, внутрішніх хвороб №2, інфекційних хвороб Донецького національного медичного університету ім. М. Горького.

Особистий внесок дисертанта. Ідея, мета і завдання дисертаційного дослідження розроблені науковим керівником д.мед.н., проф. Туманським В.О.

Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук і аналіз літератури з даної проблеми, самостійно виконав патогістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні і комп'ютерно-морфометричні дослідження біоптатів печінки хворих на ХВГВ і ХВГС, провів статистичний аналіз одержаних даних, інтерпретував і систематизував отримані результати. Для імуногістохімічних досліджень використано 13,8% трепанобіоптатів печінки з архіву кафедри. Дисертант самостійно написав всі розділи дисертації, сформулював висновки і рекомендації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи були представлені і обговорені на науково-практичній конференції морфологів «Роль імунної, ендокринної і нервової систем в процесах морфогенезу і регенерації» (Запоріжжя, 2003), на Всеукраїнських наукових конференціях молодих вчених «Сучасні аспекти медицини і фармації» (Запоріжжя, 2004; 2005; 2006; 2007), на міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Донецьк, 2007), на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Захворювання печінки в практиці клініциста» (Харків, 2007), на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Патологоанатомічна діагностика хвороб людини: здобутки, проблеми, перспективи» (Чернівці, 2007).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць: з них 4 статі - у виданнях, рекомендованих ВАК України (з них 1 стаття – без співавторів), а також 2 статті і 4 тез в матеріалах Всеукраїнських науково-практичних конференцій. Одержаний 1 деклараційний патент України.

Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена державною мовою на 160 сторінках. Складається з вступу, огляду літератури, розділу матеріалу і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, аналізу і обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій і списку використаних джерел (59 вітчизняних і 182 зарубіжних авторів). Робота ілюстрована 59 рисунками і 14 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи досліджень. Визначення діагностично-патоморфологічних маркерів вірусного і імуноклітинного пошкодження печінки, а також морфогенезу важкого фіброзу печінки проведено в трепанобіопсіях печінки у 180 хворих на ХВГВ і ХВГС, які склали 2 групи спостережень: 1-а група - 40 хворих ХВГВ (11 жінок і 29 чоловіків), 2 група - 140 хворих ХВГС (41 жінка і 99 чоловіків); групу умовного контролю склали 10 осіб (4 жінки і 6 чоловіків), хворих на транзиторні гепатози без клініко-біохімічних і патогістологічних ознак вірусного ураження печінки.

Вік обстежених хворих 1-ї групи спостережень коливався від 16 до 65 років, вік обстежених хворих 2-ї групи спостережень коливався від 19 до 68 років, вік групи умовного контролю коливався від 23 до 45 років. Середній вік хворих ХВГВ склав 37 років, середній вік хворих ХВГС - 39 років. Слід зазначити, що серед обстежених хворих на ХВГС і ХВГВ частіше зустрічалися пацієнти чоловічої статі, які склали 70,71 % і 72,5% відповідно.

У групи спостереження відібрані тільки пацієнти, яким для верифікації діагнозу у відповідності до сучасного протоколу було проведене комплексне клінічне, лабораторне та патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів печінки.

Клінічне і лабораторне обстеження хворих проводилося в гепатологічному центрі Запорізької обласної інфекційної клінічної лікарні. Етіологія вірусного гепатиту і фаза інфекційного процесу визначалися за допомогою імуноферментного методу і методу ампліфікації з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Вираженість синдрому цитолізу визначалась на підставі рівня в крові активності аланін – і аспартат-амінотрансферази (АлАТ, АсАТ).

В 1-му хірургічному відділенні 3-ої клінічної лікарні Запоріжжя лікарем хірургом виконувалась черезшкірна трепанобіопсія печінки голками Uni-Cut і BioCut 14-16G під контролем апарату УЗД Conbizon-320-5 Ultima-Pro-30 з використанням секторального і конвексного датчиків з ультразвуковою частотою випромінювання першого датчика 3-4 МГц, і 3,5МГц – другого датчика. В результаті пункції одержували стовпчик тканини печінки, завдовжки не менше 1,5 см, що відповідало стандарту для подальшого повного і інформативного морфологічного дослідження трепанобіоптата.

Для патоморфологічного і імуногістохімічного дослідження стовпчики трепанобіоптатів печінки фіксували в забуференому 10% формаліні і заливали в парафін. На прецезійному ротаційному мікротомі НМ 3600 (фірми «MICROM Laborgerate GmbH» - Німеччина) виготовляли серійні зрізи завтовшки 3 μ , які поміщали на предметні скельця для стандартного патогістологічного фарбування або на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» і «SUPER FROST GOLD» (фірми «DAKO» - Данія) - для імуногістохімічних досліджень.

Для мікроскопічного дослідження парафінові зрізи трепанобіоптатів печінки фарбували гематоксиліном і еозином (для виявлення основних патогістологічних змін), а також трибарвним методом Масона і методом ван-Гизон (для оцінки вираженості фіброзу печінки).

Ступінь активності і прогресії хронічного вірусного гепатиту в біоптатах печінки хворих оцінювали шляхом розрахунку ІГА за Knodell R.G. з співавт. (1981); виразність фіброзу печінки визначали в градації METAVIR і Desmet V. з співавт. (1995) в серійних парафінових зрізах, забарвлених за ван-Гизон і за Масон. Відповідно до вказаних вище градацій в біоптатах печінки розрізняли гепатит з мінімальною активністю (ІГА 1-3 бали), із слабкою активністю (ІГА 4-8 балів), з помірною активністю (ІГА 9-12 балів) і з вираженою активністю (ІГА 13-18 балів), а також різний ступінь фіброзу печінки [F0 - відсутність фіброзу, F1 – слабкий фіброз портальних трактів, F2 - портальний фіброз з рідкісними септами в часточках (помірний фіброз), F3 - множинні септи в часточках без цирозу (важкий фіброз), F4 – цироз печінки]. Для визначення ступеня виразності фіброзу аналізувалася ступінь розвитку і гістотопографія сполучнотканинних волокон в печінці: наявність цих волокон в портальних трактах, наявність і ступінь виразності фіброзу стінок централобулярних вен,

наявність внутрішньочасточкових фіброзних септ і порто-портальних фіброзних септ.

Наявність інфікування гепатоцитів вірусом гепатиту В визначали в парафінових зрізах непрямим імунопероксидазним методом з використанням антитіл до HBsAg і HBcAg і систем візуалізації DAKO EnVision. Для визначення кількості гепатоцитів, інфікованих вірусом гепатиту В, підраховували число HBsAg позитивних гепатоцитів в умовному стандартному полі зору мікроскопа при збільшенні 400.

Імуногістохімічне дослідження активованих зірчастих клітин Іто проводилося в парафінових зрізах з використанням моноклональних антитіл до А-ізоформи гладком'язового актина (А-SMA) і системи візуалізації DAKO EnVision.

Імуногістохімічне дослідження клітин Купфера проводилося в парафінових зрізах з використанням моноклональних антитіл до CD-68-антигену і системи візуалізації DAKO EnVision.

Активовані CD45R0+ Т-лімфоцити і CD8+ Т-кілери маркували в парафінових зрізах з використанням антитіл до CD45R0 і CD8 антигенам, а також системи візуалізації DAKO EnVision.

Імуногістохімічне дослідження колагену проводилося імунопероксидазним методом за допомогою моноклональних антитіл до колагену 4-го типу, а також системи візуалізації DAKO EnVision.

Методом прямої комп'ютерної морфометрії в мікроскопі AxioPlan 2 («Carl Zeiss» - Німеччина) з відеокамерою DXC-151A («Sony» - Японія) і пакетом програм KS 200 («Kontron Elektronik» - Німеччина) оцінювали площі лімфоцитарної інфільтрації і фіброзу портальних трактів в 4 групах хворих ХВГВ і хворих ХВГС (з мінімальним, слабковираженим, помірним та вираженим ступенем гістологічної активності гепатиту), а також в 3 групах хворих з ознаками слабого, помірного і важкого фіброзу печінки (F1, F2, F3 відповідно). Для морфометричних вимірювань використовувалося не менше 5 портальних трактів в 1-му біоптаті печінки.

Площі, займані в часточках печінки активованими зірчастими клітинами і клітинами Купфера, визначали методом комп'ютерного аналізу цифрового зображення в мікроскопі Axioskop («Carl Zeiss» - Німеччина) з використанням системи VIDAS («Kontron Elektronik» - Німеччина) в Центральній науково-дослідній лабораторії ЗДМУ (за що – щира вдячність д.мед.н., проф. Абрамову А.В.).

Отримані кількісні результати оброблялися методом варіаційного статистичного аналізу середніх величин на персональному комп'ютері «Sempron 2800», з використанням програмного пакету STATISTICA 6.0 for Windows з подальшим аналізом одержаних матеріалів. Обчислювалася середня арифметична величина (M), середнє квадратичне відхилення (б) і стандартна помилка середньої арифметичної (m). Достовірність відмінностей порівнюваних величин визначалася за допомогою критерію Стьюдента (Т). За достовірну мінімальну вірогідність відмінностей бралася $p < 0,05$. Проводився також кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r). Значення

коефіцієнта r кореляції Пірсона від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак; значення r від 0,3 до 0,69 підтверджувало середній ступінь сполучення ознак; значення r від 0,7 і вище свідчило про наявність сильного зв'язку між ознаками, що вивчалися.

Результати дослідження та їх обговорення.

При мікроскопічному дослідженні серійних гістологічних зрізів біоптатів печінки хворих 1-ї групи спостережень були виявлені характерні патогномонічні мікроскопічні ознаки ХВГВ: «пісочні» і вакуолізовані ядра гепатоцитів, «матово-склоподібні» гепатоцити, рідкісні і малоінтенсивні внутріклітинні холестази, тільця Каунсілмена і вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, імуноклітинні інфільтрати в порталних трактах, а також так звані імуноклітинні «ступінчасті некрози» - імуноклітинні інфільтрати в порталних трактах, які проникали через прикордонну пластинку в часточки печінки.

Відповідно до індексу гістологічної активності ХВГВ з мінімальною активністю (ІГА 1-3 бали) був ідентифікований в біоптатах печінки у 26,0% пацієнтів, гепатит із слабо вираженою активністю (ІГА 4-8 балів) виявлений у 47% хворих, гепатит з помірною активністю (ІГА 9-12 балів) виявлений у 8,6% осіб, гепатит з вираженою активністю (ІГА 13-18 балів) визначений у 8,6% хворих. В середньому індекс гістологічної активності ХГВ у обстежених хворих склав $10,1 \pm 0,41$ балів.

Встановлено, що в печінці хворих на ХВГВ тільця Каунсілмена за морфологією є гепатоцитами в стані апоптозу. В гістологічних зрізах трепанобіоптатів печінки спостерігаються різні етапи апоптозу гепатоцитів: конденсація хроматину, пікноз ядра і формування виступів каріолеми (ядро у вигляді тутової ягоди) при збереженому ядерці; конденсація і еозинофілія цитоплазми, каріорексис з формуванням внутріклітинних апоптотичних тілець розтщеного ядра, оточення зморщеного гепатоциту (тільця Каунсілмена) відростками макрофагів.

Встановлена позитивна кореляція між ІГА і площею імуноклітинної інфільтрації порталних трактів, коефіцієнт кореляції склав ($r = + 0,76$, $p < 0,05$); водночас визначено переважання площі імуноклітинної інфільтрації порталних трактів над площею їх фіброзу ($p < 0,05$).

При зіставленні виразності морфологічних змін в печінці у хворих на ХВГВ з нормальним рівнем АЛТ і у хворих з підвищеним її рівнем виявлено, що середній показник ІГА у хворих з нормальним рівнем ферментів склав $6,87 \pm 0,09$ балів, а у хворих з гіперферментемією він склав $7,41 \pm 0,1$ балів. При цьому достовірних відмінностей між середніми показниками ІГА хронічного гепатиту у хворих основної і контрольної груп не виявлено (коефіцієнт кореляції Пірсона r склав $+ 0,21$, $p < 0,05$). При зіставленні ступеня виразності фіброзу печінки у хворих на ХВГВ з нормальним та підвищеним рівнем АЛТ також не виявлено достовірних відмінностей (коефіцієнт кореляції Пірсона r склав $+ 0,35$, $p < 0,05$). Отримані результати свідчать про те, що рівень амінотрансфераз в крові хворих на ХВГВ не відзеркалює виразність ушкоджень

печінки; ступінь виразності вирус-індукованих і імуноклітинних уражень печінки, ступінь активації колагеноутворення і прогресії фіброзу у хворих на ХВГВ адекватніше відображають результати патоморфологічного дослідження пункційної трепанобіопсії печінки.

При морфологічному визначенні ступеню інфікування гепатоцитів вірусом гепатиту В у хворих на ХВГВ шляхом паралельного кількісного аналізу наявності «матово-склоподібних» гепатоцитів у гістологічних зрізах печінки, забарвлених гематоксиліном і еозином, та кількості гепатоцитів з наявністю імуногістохімічно визначеним HBsAg, виявлений високий кореляційний зв'язок між індексом гістологічної активності ХВГВ і ступенем інфікування гепатоцитів з наявністю HBsAg (коефіцієнт кореляції Пірсона r склав $+ 0,81$, $p > 0,05$), що дозволяє використовувати імуногістохімічну маркіровку HBsAg на ранніх етапах діагностики для прогнозування можливої прогресії ХВГВ у хворих з нормальним рівнем трансаміназ в крові.

При мікроскопічному дослідженні серійних гістологічних зрізів біоптатів печінки хворих 2-ї групи спостережень виявлені характерні патогномонічні мікроскопічні ознаки ХВГС: поліморфізм ядер гепатоцитів і пошкодження у вигляді «пісочних» ядер і ядер з вакуолями; жирова дистрофія гепатоцитів; внутріклітинні холестази, вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів; тільця Каунсилмена і поодинокі гепатоцити з ознаками цитолізу; ланцюжки імуноклітинів уподовж внутрішньочасточкових синусоїдів печінки, а також так звані імуноклітинні «ступінчасті некрози»; у окремих випадках виявлялися так звані імуноклітинні «мостоподібні некрози» - імуноклітинні інфільтрати, які розповсюджувалися від одного порталного тракту – через часточку печінки – до іншого порталного тракту.

В біоптатах печінки хворих ХВГС гепатит з мінімальною активністю (ІГА 1-3 бали) ідентифікований у 24,2% пацієнтів, гепатит з слабкою активністю (ІГА 4-8 балів) виявлений у 40% хворих, гепатит з помірною активністю (ІГА 9-12 балів) виявлений у 23,5% осіб, гепатит з вираженою активністю (ІГА 13-18 балів) визначений у 12,1% хворих. Середнє значення індексу гістологічної активності ХВГС у обстежених хворих склало $9,34 \pm 0,1$ балів.

Результати патогістологічних досліджень показали, що однією з ознак зростання гістологічної активності ХВГ є наявність руйнування гепатоцитів шляхом апоптозу, цитокаріолізу і «балонного» цитолізу. В часточках печінки хворих на ХВГС з різним індексом ІГА визначається різна кількість поодиноких тілець Каунсилмена, які є однією з прикінцевих фаз апоптозу гепатоцитів, а також гепатоцитів в стані «балонного» цитолізу (збільшення гепатоциту зі спустошеною цитоплазмою і перетворення в шароподібну клітину з дрібним пікнотичним ядром без ядерця). Руйнування гепатоцитів шляхом апоптозу і цитокаріолізу відбувається також в вогнищах імуноклітинного кілінгу, в яких гепатоцит оточується імуноклеточними клітинами, а також в краєвих зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів».

Як показало імуногістохімічне дослідження, вогнища імуноклітинного кілінгу гепатоцитів в часточках печінки складають CD8+Т-лімфоцити,

CD45RO+ лімфоцити і CD68+ макрофаги, в складі клітин «ступінчастих некрозів» переважають CD8+Т-лімфоцити і CD45RO+лімфоцити, на периферії «ступінчастих некрозів» виявляються CD68+ макрофаги. Імуногістохімічні дослідження показали, що наявність CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів у вогнищах імуноклітинного кілінгу в часточках печінки і в краєвих зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» свідчить про вірус-індуковане імуноклітинне пошкодження печінки і одночасно відображає участь цих клітин в елімінації гепатоцитів, інфікованих гепатотропними вірусами. У імуноклітинних інфільтратах портальних трактів печінки хворих на ХВГС в значній кількості присутні CD45RO+ лімфоцити, тоді як у вогнищах імуноклітинного кілінгу визначалися рідкісні поодинокі CD45RO+ лімфоцити.

Встановлено, що однією з характерних ознак прогресії ХВГС є розвиток фіброзу печінки з її надмірною колагенізацією. При гістологічному дослідженні трепанобіоптатів печінки хворих ХГС виявлені основні мікроскопічні ознаки розвитку фіброзу печінки: фіброз портальних трактів, фіброз центральних часточкових вен, а також колагенізація стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів печінки різного ступеня виразності.

При вивченні залежності між індексом гістологічної активності ХГС, площею імуноклітинних інфільтратів і площею фіброзу портальних трактів встановлена позитивна кореляція між ІГА і площею імуноклітинного інфільтрату портального тракту, коефіцієнт кореляції Пірсона r склав $+ 0,83$ ($p < 0,05$).

При зіставленні виразності морфологічних змін в печінці у хворих на ХВГС з нормальним рівнем АЛАТ і у хворих з підвищеним її рівнем виявлено, що середній показник ІГА у хворих з нормальним рівнем ферментів склав $7,45 \pm 0,105$ балів, а у хворих з гіперферментемією він склав $7,98 \pm 0,11$ балів. При цьому достовірних відмінностей між середніми показниками ІГА хронічного гепатиту у хворих цих підгруп не виявлено (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = + 0,22$, $p < 0,05$) При зіставленні ступеня виразності фіброзу печінки у хворих на ХВГС з нормальним і підвищеним рівнем АЛАТ, також не виявило достовірних відмінностей у виразності фіброзу печінки у хворих цих підгруп (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = + 0,33$, $p < 0,05$).

Вивчення морфогенезу фіброзу печінки при ХВГС показало, що основними структурними одиницями печінки, з якими пов'язаний розвиток фіброзу є венозні синусоїди часточки печінки, центральна часточкова вена і портальний тракт. Встановлено, що метод Ван-Гизон і трибарвний метод Масона а також імуногістохімічне дослідження колагену 4 типу, дозволяють диференціювати в гістологічних препаратах печінки хворих з мінімальною і слабковираженою активністю ХВГС, початкові етапи колагенізації стінок внутрішньочасточкових синусоїдів за відсутності значущого фіброзу в портальних трактах.

При імуногістохімічному дослідженні біоптатів печінки встановлено, що у хворих ХВГС з різним ступенем ІГА перисинусоїдальні А-SMA-позитивні клітини в часточках печінки за гістологічною будовою відповідали клітинам Іто, вони в основному локалізувалися в зонах пошкоджених гепатоцитів і в

зонах лімфоцитарних інфільтратів. Відмічена позитивна кореляція між ІГА ХВГС і площею, займаною активованими клітинами Іто в часточці, коефіцієнт кореляції Пірсона r склав $+ 0,65$ ($p < 0,05$).

Водночас в трепанобіоптатах печінки хворих на ХВГС різного ступеню ІГА в портальних трактах також визначалися А-SMA позитивні клітини, які мали типову структуру фібробластів.

Встановлено, що прогностичними ознаками вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих на ХВГВ і ХВГС є: гіперплазія активованих А-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах часточок печінки і сегментарна колагенізація стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність А-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в портальних трактах, проникнення тонких фіброзних септ з портальних трактів в часточки печінки, збільшення числа портальних трактів з фіброзом різного ступеня виразності.

При імуногістохімічній детекції активованих макрофагів Купфера встановлено, що CD-68 активовані макрофаги (клітини Купфера) мали ознаки фагоцитозу: неправильну форму, збільшену за рахунок фагоцитованого матеріалу цитоплазму, овальне ядро і декілька тонких або трохи потовщених відростків. Активовані CD68-позитивні клітини Купфера в часточках печінки локалізувалися поряд з пошкодженими гепатоцитами і по периферії лімфоцитарних інфільтратів, а також по периферії імуноклітинних «ступінчастих некрозів». При вивченні взаємовідносин між клітинами Купфера і клітинами Іто в часточках печінки у хворих з різним значенням ІГА встановлена позитивна кореляція між площею, займаною активованими клітинами Купфера з ознаками фагоцитозу, і активованими клітинами Іто в часточках печінки (коефіцієнт кореляції Пірсона r склав $+ 0,76$, $p < 0,05$).

На підставі проведених гістологічних, імуногістохімічних і комп'ютерно-морфометричних досліджень визначено, що найбільш значущими мікроскопічними ознаками прогресії хронічного вірусного гепатиту в трепанобіоптатах печінки є: наявність «балонного» цитолізісу гепатоцитів, значної кількості тілець Каунсілмена (гепатоцитів в стані апоптозу) і вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, збільшення кількості і протяжності імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення кількості CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів у внутрішньочасточкових вогнищах імуноклітинного кілінгу і в краєвих зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення числа активованих CD68+ клітин Купфера з ознаками фагоцитозу в часточках печінки, наростаюча колагенізація внутрішньочасточкових синусоїдів і центральних часточкових вен, розширення площі лімфоцитарної інфільтрації і фіброзу портальних трактів.

Проведені гістохімічні, імуногістохімічні і комп'ютерно-морфометричні дослідження визначили найбільш значущі прогностичні показники розвитку фіброзу печінки у хворих на ХВГВ і ХВГС: гіперплазія активованих А-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки і сегментарна колагенізація стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність А-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в

портальних трактах, проникнення тонких фіброзних септ з портальних трактів в часточки печінки, зростання числа портальних трактів з фіброзом різного ступеня виразності. За результатами гістохімічних і гістологічних досліджень основними складовими важкого фіброзу печінки у хворих на ХВГС є збільшення числа перисинусоїдальних клітин Іто, поширена колагенізація стінок внутрішньочасточкових синусоїдів і розширення їх отворів, виражений фіброз в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» і в портальних трактах.

ВИСНОВКИ

У дисертації приведено теоретичне узагальнення і нове рішення наукової задачі, що полягає в удосконаленні найбільш значущих мікроскопічних критеріїв прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С в трепанобіоптатах печінки хворих, а також у визначенні молекулярно-мікроскопічних показників прогнозу розвитку фіброзу печінки для використання в патологоанатомічній діагностиці і оптимізації лікування хворих.

1. Разом з відомими патогістологічними вірус-обумовленими пошкодженнями гепатоцитів («пісочні» і вакуолізовані ядра, жирова дистрофія гепатоцитів при ХВГС і наявність «матово-склоподібних» гепатоцитів при ХВГВ, внутриклітинні холестази, «балонний» цитолізис та апоптоз гепатоцитів – тільца Каунсілмена), мікроскопічними ознаками прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С є наростання імуноклітинної деструкції печінки (велика кількість вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів; значна інфільтрація імуніцитами внутрішньочасточкових синусоїдів і портальних трактів, поширеність або велика кількість імуноклітинних «ступінчастих некрозів»), а також прогресія фіброзу печінки (поширена колагенізація стінок внутрішньочасточкових синусоїдів, фіброз зон «ступінчастих некрозів», значний фіброз портальних трактів і централобулярних вен).

2. Найточніше ступінь вірусного інфікування гепатоцитів в трепанобіоптатах печінки хворих на ХВГВ визначає імуногістохімічне виявлення в них HBsAg і HBeAg, «матово-склоподібні» гепатоцити, що виявляються при мікроскопії, не повно відображають ступінь інфікування гепатоцитів. Наявність прямого, високого кореляційного зв'язку між кількістю інфікованих гепатоцитів з HBsAg і індексом гістологічної активності гепатиту дає підставу використовувати імуногістохімічне маркування HBsAg на ранніх етапах діагностики для прогнозування можливої прогресії ХВГВ у хворих з нормальним рівнем трансаміназ в крові.

3. В часточках печінки хворих на ХВГ з різним індексом ІГА визначається різна кількість поодиноких тілец Каунсілмена, які є однією з прикінцевих фаз апоптозу гепатоцитів, а також гепатоцитів в стані «балонного» цитолізу. Руйнування гепатоцитів шляхом апоптозу і цитокаріолізу відбувається також в вогнищах імуноклітинного кілінгу, в яких гепатоцит оточується імунокompatентними клітинами, а також в краєвих зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів».

4. У вогнищах імуноклітинного кілінгу в часточках печінки і в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» печінки переважають CD8+ Т-

лімфоцити і CD68+ макрофаги, в імуноклітинних інфільтратах портальних трактів, окрім цих клітин, в значній кількості присутні CD45RO+ лімфоцити. Наявність CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагов свідчить про вірус-індуковане імуноклітинне пошкодження печінки і одночасно відображає участь цих клітин в елімінації гепатоцитів, інфікованих гепатотропними вірусами. CD45RO+ лімфоцити, найімовірніше виконують функції Th2 клітин пам'яті при персистенції гепатотропних вірусів.

5. Найбільш значущими ознаками імуноклітинної прогресії хронічного вірусного гепатиту, що визначаються в трепанобіоптатах печінки є: наявність «балонного» цитолізісу гепатоцитів, значної кількості тілець Каунсілмена і вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, збільшення кількості і протяжності імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення кількості CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів у вогнищах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів і в крайових зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення в часточках печінки числа активованих CD68+ клітин Купфера з ознаками фагоцитозу, розширення площі лімфоцитарної інфільтрації портальних трактів.

6. Надмірну продукцію колагену в печінці хворих на хронічний вірусний гепатит С здійснюють активовані А-SMA позитивні зірчасті перисинусоїдальні клітини Іто і А-SMA позитивні фібробласти портальних трактів. За даними комп'ютерної морфометрії активація зірчастих клітин Іто і поява їх нових клітинних поколінь фіброгенного типу корелює із лімфоцитарною інфільтрацією портальних трактів, із збільшенням числа і площі імуноклітинних «ступінчастих некрозів», а також з наростанням фагоцитарної активності клітин Купфера.

7. Експресія А-ізоформи гладком'язового актину клітинами Іто і фібробластами є раннім прогностичним маркером вірогідності розвитку фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С з нормальним рівнем трансаміназ в крові або з помірною гіперферментемією, розвитку важкого фіброзу печінки передуює значне збільшення кількості активованих клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки.

8. Прогностичними ознаками вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих на хронічні вірусні гепатити В або С є: гіперплазія активованих А-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки і сегментарна колагенізація стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність А-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в портальних трактах, проникнення тонких фіброзних септ з портальних трактів в часточки печінки, зростання числа портальних трактів з фіброзом різного ступеня виразності. Основними складовими важкого фіброзу печінки у хворих на ХГС є збільшення числа перисинусоїдальних клітин Іто, поширена колагенізація стінок внутрішньочасточкових синусоїдів і розширення їх отворів, значна колагенізація центральних часточкових вен, виражений фіброз в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» і в портальних трактах.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Хворим на хронічні вірусні гепатити В або С навіть при мінімальних симптомах хвороби і при мінімальних відхиленнях лабораторних показників гепато-біліарних функцій показана пункційна трепанобіопсія печінки, результати якої найадекватніше відображають ступінь виразності вірус-індукованих і імуноклітинних уражень печінки, ступінь активації колагенотворення і прогресії фіброзу.

2. Найбільш достовірні діагностичні і прогностичні результати патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих на хронічні вірусні гепатити забезпечує паралельне забарвлення серійних зрізів гематоксиліном і еозином, трибарвним методом Масона і методом ван-Гизон; при уточненні ступеня активності хронічного гепатиту істотні додаткові дані надає імуногістохімічне виявлення HBsAg в гепатоцитах, CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ клітин Купфера; для прогнозування вірогідності розвитку важкого фіброзу печінки, окрім методик Масона і ван-Гизон, доцільно використовувати імуногістохімічне виявлення А-SMA позитивних клітин Іто і фібробластів, а також колагену 4 типу.

3. При визначенні прогресії хронічного вірусного гепатиту в трепанобіоптатах печінки слід враховувати наявність значної кількості гепатоцитів в стані «балонного» цитолізису, тілець Каунсілмена і вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, збільшення кількості і протяжності імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення кількості CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів у внутрішньочасточкових вогнищах імуноклітинного кілінгу і в крайових зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення числа CD68+ клітин Купфера з ознаками фагоцитозу в часточках печінки, розширення площі лімфоцитарної інфільтрації портальних трактів.

4. При прогнозуванні вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит В або С слід враховувати гіперплазію активованих А-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки, а також сегментарну колагенізацію стінок внутрішньочасточкових венонних синусоїдів, наявність А-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в портальних трактах, проникнення тонких фіброзних септ з портальних трактів в часточки печінки, зростання числа портальних трактів з фіброзом різного ступеня.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Туманский В.А., Шишкин М.А., Живица С.Г. Морфогенез перестройки печени при хроническом гепатите–циррозе по данным трепанобиопсий // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – Запоріжжя: вид. ЗДМУ. - 2003. - Вип. XI. С. 305-310. *(Автор забезпечив морфологічне дослідження матеріалу.)*

2. Туманский В.А., Шишкин М.А. Некоторые молекулярно-клеточные механизмы развития фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С // Патологія. - 2006. - Т 3, № 2. - С 60-66. *(Автор забезпечив морфологічне*

дослідження матеріалу, аналіз та обговорення результатів, формулювання висновків).

3. Туманский В.А., Шишкин М.А. Роль клеток Ито в развитии фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С // *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики.* – Запоріжжя: вид. ЗДМУ. - 2006. - Вип. XVII. - С. 207-210. *(Автор забезпечив морфологічне дослідження матеріалу, аналіз та обговорення результатів).*

4. Шишкин М.А. Определение степени инфицирования гепатоцитов при хроническом вирусном гепатите В по данным трепанобиопсий печени // *Вісник Вінницького національного медичного університету.* - 2007. Вип. 11 (2/1). - С. 668-670. *(Автор забезпечив морфологічне дослідження матеріалу, клініко-морфологічне зіставлення, аналіз та узагальнення результатів, формулювання висновків).*

5. Патент № 21679 України, МПК (2006) G01N 21/00, G01N 33/00. Спосіб прогнозування розвитку фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С./В.О. Туманський, М.А. Шишкін (Україна).- № u 2006 12118; Заявл. 20.11.206; Опубл. 15.03.07 // *Промислова власність.* – 2007. - № 3. *(Автор забезпечив обґрунтування актуальності корисної моделі і формулювання винаходу).*

6. Шишкин М.А. Компьютерная морфометрия взаимоотношений процессов воспаления и развития фиброза при хронических вирусных гепатитах В и С // *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики.* – Запоріжжя: вид. ЗДМУ. - 2005. -Вип. XIV. - С. 243-244. *(Автор забезпечив обґрунтування завдань дослідження, морфологічне дослідження матеріалу, обробку та обговорення результатів).*

7. Шишкин М.А. Иммуногистохимическое маркирование биоптатов печени в диагностике хронического вирусного гепатита В // *Хвороби печінки в практиці клініциста: (Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю. Харків 1-2 березня 2007 р.).* – Харків, 2007. - С. 318-319. *(Автор забезпечив морфологічне дослідження матеріалу, аналіз та узагальнення результатів, формулювання висновків).*

8. Туманский В.А., Шишкин М.А. Молекулярно – клеточные особенности развития фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С // *Хвороби печінки в практиці клініциста: (Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю. Харків 1-2 березня 2007 р.).* – Харків. 2007. - С. 289-290. *(Автор забезпечив морфологічне дослідження матеріалу, аналіз та узагальнення результатів, формулювання висновків).*

9. Туманский В.А., Шишкин М.А. Современные методы патоморфологической диагностики прогрессии хронических вирусных гепатитов в биоптатах печени // *Патологоанатомічна діагностика хвороб людини: здобутки, проблеми, перспективи: (Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з дня народження професора Н.М. Шінкермана. Чернівці, 21-22 травня 2007 р.).* - Чернівці: Медуніверситет, 2007. – С. 169-176. *(Автор забезпечив морфологічне дослідження матеріалу,*

клініко-морфологічне зіставлення. аналіз та узагальнення результатів, формулювання висновків).

10. Shishkin M.A. Immunohistochemical marking as a basic method of diagnostics of chronic viral hepatitis B // *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених. – Донецьк, 2007. - Вип. 69. - С. 178. (Автор забезпечив обґрунтування завдань дослідження. морфологічне дослідження матеріалу, аналіз та обговорення результатів, формулювання висновків).*

АНОТАЦІЯ

Шишкін М.А. Патогістологічні і імуногістохімічні особливості прогресії хронічних вірусних гепатитів В та С за даними трепанобіопсій печінки. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 - патологічна анатомія. - Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського МОЗ України, Сімферополь, 2008.

Дисертація містить результати комплексного патогістологічного і імуногістохімічного дослідження біоптатів печінки хворих на хронічний вірусний гепатит В та С у зіставленні з клініко-біохімічними показниками для удосконалення найбільш значущих мікроскопічних критеріїв прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С в трепанобіоптатах печінки хворих.

За результатами досліджень визначено, що разом з відомими патогістологічними вірус-обумовленими пошкодженнями гепатоцитів («пісочні» і вакуолізовані ядра, жирова дистрофія гепатоцитів при ХВГС і наявність «матово-склоподібних» гепатоцитів при ХВГВ, внутриклітинні холестази, «балонний» цитолізис та апоптоз гепатоцитів – тільца Каунсілмена), мікроскопічними ознаками прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С є наростання імуноклітинної деструкції печінки, а також прогресія фіброзу печінки.

Найбільш значущими ознаками імуноклітинної прогресії хронічного вірусного гепатиту, що визначаються в трепанобіоптатах печінки є: наявність «балонного» цитолізісу гепатоцитів, значної кількості тілець Каунсілмена і вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, збільшення кількості і протяжності імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення кількості CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів у вогнищах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів і в крайових зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення в часточках печінки числа активованих CD68+ клітин Купфера з ознаками фагоцитозу, розширення площі лімфоцитарної інфільтрації портальних трактів.

При прогнозуванні вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит В і С слід враховувати зростання числа активованих А-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки, колагенізацію стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність А-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в портальних трактах, проникнення тонких фіброзних септ з

портальних трактів в часточки печінки, зростання числа портальних трактів з фіброзом різного ступеня, фіброз зон «ступінчастих некрозів», значний фіброз централобулярних вен

Доведено, що найбільш достовірні діагностичні і прогностичні результати патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих на хронічні вірусні гепатити забезпечують гістологічні, гістохімічні і імуногістохімічні методики: при уточненні ступеня активності хронічного гепатиту істотні додаткові дані дає імуногістохімічне виявлення HBsAg в гепатоцитах, визначення CD-8+Т-лімфоцитів і CD-68+ клітин Купфера; для прогнозування вірогідності розвитку важкого фіброзу печінки, окрім трибарвної методики Масона і ван-Гизон, необхідно імуногістохімічно визначити А-SMA позитивні клітини Іто і фібробласти, а також колаген 4 типу.

Ключові слова: хронічний вірусний гепатит В та С, морфологічна діагностика прогресії, імунноклітинний кілінг, А-SMA+ клітини Іто і фібробласти, фіброз печінки.

АННОТАЦІЯ

Шишкин М.А. Патогистологические и иммуногистохимические особенности прогрессии хронических вирусных гепатитов В и С по данным траепанобиопсий печени. – Рукопис.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия. – Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского МЗ Украины, Симферополь 2008.

Диссертация содержит результаты комплексного обследования больных хроническим вирусным гепатитом В и С. Морфологические и иммуногистохимические особенности печени при хроническом вирусном гепатите В изучены у 40 больных, изучение клинко-патоморфологических особенностей хронического вирусного гепатита С проведено у 140 больных, группу условного контроля составили 10 человек (4 женщин и 6 мужчин) без клинко-биохимических и патогистологических признаков вирусного поражения печени.

На основании комплексного патогистологического, гистохимического, иммуногистохимического и компьютерно-морфометрического исследования трепанобиоптатов печени больных и анализа их клинко-биохимических показателей впервые получены новые данные о микроскопических критериях прогрессии хронического вирусного гепатита В и С. В печени больных хроническим вирусным гепатитом В и С впервые типирован состав иммуноцитов в очагах иммуноклеточного киллинга гепатоцитов, в зонах иммуноклеточных «ступенчатых некрозов», а также в портальных иммуноклеточных инфильтратах.

Впервые доказано, что так называемая «воспалительная лимфоцитарная инфильтрация долек печени» в виде скоплений иммунокомпетентных клеток вокруг гепатоцитов, является очагами иммунного киллинга инфицированных вирусом гепатоцитов с наличием CD-8+Т-лимфоцитов и CD-68+макрофагов, а

так называемые «ступенчатые некрозы» являются зонами иммуноклеточной деструкции гепатоцитов периферии печеночных долек, в которых быстро активируется коллагенообразование активированными клетками Ито и фибробластами. Установлено, что наиболее значимыми микроскопическими дополнительными признаками прогрессии хронического вирусного гепатита являются: значительное число внутридольковых очагов иммуноклеточного киллинга гепатоцитов, увеличение количества CD-8+Т-лимфоцитов и CD-68+макрофагов в очагах иммуноклеточного киллинга и в краевых зонах иммуноклеточных «ступенчатых некрозов», увеличение числа фагоцитирующих CD-68+ клеток Купфера в дольках печени, нарастающая коллагенизация внутридольковых синусоидов, расширение площади лимфоцитарной инфильтрации и фиброза портальных трактов.

На основании иммуногистохимических исследований установлено, что избыточную продукцию коллагена в печени больных хроническим вирусным гепатитом С осуществляют активированные А-SMA (антиген А-изоформ гладкомышечного актина) позитивные звездчатые перисинусоидальные клетки Ито и А-SMA позитивные фибробласты портальных трактов. Впервые доказано, что появление новых поколений клеток Ито фиброгенного типа связано с лимфоцитарной инфильтрацией портальных трактов, с увеличением числа и площади иммуноклеточных «ступенчатых некрозов», а также с нарастанием фагоцитарной активации клеток Купфера.

Впервые установлено, что экспрессия клетками Ито А-SMA и фибробластами является ранним прогностическим маркером вероятности развития фиброза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С с нормальным уровнем трансаминаз в крови или с умеренной гиперферментемией, в то время как развитию тяжелого фиброза печени предшествует значительный рост числа активированных клеток Ито в перисинусоидальных пространствах печени.

По результатам гистохимических и гистологических исследований определены основные составляющие тяжелого фиброза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С: увеличение числа перисинусоидальных клеток Ито, распространенная коллагенизация стенок внутридольковых синусоидов и расширение их просветов, выраженный фиброз в зонах иммуноклеточных «ступенчатых некрозов» и в портальных трактах.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В и С, морфологическая диагностика прогрессии, иммуноклеточный киллинг, А-SMA+ клетки Ито и фибробласты, фиброз печени.

ANNOTATION

Shishkin M. A. Pathohistological and immunohistochemical peculiarities of progression of chronic viral hepatitis B and C according to data of liver`s trepanobiopsies.- Manuscript.

Thesis is for application on scientific degree of the Medical Science Candidate in specialty 14.03.02 - Pathological anatomy.- Crimean State Medical University after S.I.Georgievsky Ministry of Health of Ukraine, Simferopol 2008.

Thesis contains the results of complex inspection of patients with chronic viral hepatitis B and C. There is conducted theoretic generalization and new salvation of scientific task, that consists of perfection of the most valuable microscopic criteria of progression of chronic viral hepatitis B and C according to data of liver`s trepanobiopsies, and also definition of molecular- microscopic features, prognosing the development of liver fibrosis, in order to use this in diagnostic work and to optimize the treatment.

According to comparison of studied pathohistological and immunohistochemical changes in liver with clinical and biochemical data , there is estimated, that patients with chronic viral hepatitis B and C even with minimal symptoms and minimal deviations of laboratory indexes should proceed liver`s trepanobiopsy, the result of which the best indicates the degree of viral-inducative and immunocellular damage of liver, the degree of activation of collagen production and progression of liver fibrosis. There is estimated, that the degree of viral infection by hepatitis C virus is defined by immunohistochemical revealing of HBsAg and HBcAg.

There is shown that the most reliable diagnostic and prognostic results of pathomorphologic investigation of liver`s trepanobiopsies of patients with chronic viral hepatitis is provided by parallel coloring of serial cuts by hematoxylin and eosin, three color method of Masson and method of Van-Hyson. In order to define more precisely the activity`s degree of chronic viral hepatitis, we can use immunohistochemical revealing of HBsAg in hepatocytes CD-8+T-lymphocytes and CD-68+ Kupfer cells, for prognosing the possibility of development of severe liver`s fibrosis, besides methods of Masson and Van-Hyson, it is necessary to use immunohistochemical revealing of A-SMA-positive Ito cells and fibroblasts, and also 4-type of collagen.

During prognosing the possibility of development of severe liver`s fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C, we must take into consideration the increasing number of activated A-SMA-positive Ito cells within perisinusoidal spaces of the liver, and also segmental collagenisation of walls of intralobular venous sinusoids, availability of A-SMA-positive fibroblasts in immunocellular “pacemeal necrosis” and portal tracts, development of thin fibrous septa from portal tracts into liver`s lobules, increasing the number of portal tracts with different grade of fibrosis.

Keywords: **chronic:** viral hepatitis B and C, morphological diagnostics, stellate perisinusoidal Ito cells, myofibroblasts, A-SMA, collagenisation, fibrosis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ – аланін-амінотрансфераза
АсАТ – аспартат-амінотрансфераза
ІГА – індекс гістологічної активності
ХВГ – хронічний вірусний гепатит
ХВГВ – хронічний вірусний гепатит В
ХВГС – хронічний вірусний гепатит С
НВсАg –серцевинний антиген вірусу гепатиту В
НВsАg – поверхневий антиген вірусу гепатиту В
А-SМА - антиген до гладком'язового актину

Підписано до друку 09.04.2008. Гарнітура Times New Roman.

Папір друкарський. Формат 60x90/16. Умовн. друк. арк.0,9.

Наклад - 100 прим. Зам. № 3700

Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.