ШИШКІН Максим Андрійович **ГІСТОЛОГІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОГРЕСІЇ ХРОНІЧНИХ ВІРУСНИХ ГЕПАТИТІВ В ТА С ЗА ДАНИМИ ТРЕПАНОБІОПСІЙ ПЕЧІНКИ** 14.03.02 – патологічна анатомія ДИСЕРТАЦІЯ на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук Запоріжжя, 2008	**ГАВРИЛЮК Алла Олександрівна** **МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА ПЕРЕБІГУ, ПРОГРЕСУВАННЯ ТА НАСЛІДКІВ ХРОНІЧНИХ ВІРУСНИХ ГЕПАТИТІВ** 14.03.02 – патологічна анатомія ДИСЕРТАЦІЯ на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук Вінниця – 2012

Вступ (стор. 6) «Золотим» стандартом діагностики хронічного вірусного гепатиту, разом з ідентифікацією вірусу в крові полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР), є пункційна біопсія печінки, яка дозволяє не тільки розпізнати захворювання, але також визначити активність гепатиту і ступінь розвитку фіброзу печінки [53, 199, 227]. Для визначення цих параметрів в біоптатах печінки використовується індекс гістологічної активності (ІГА) гепатиту за R.G. Knodell зі співавт. [152, 228], градація стадій патологічного процесу за V. Desmet. зі співавт., а також стадій фіброзу печінки в класифікаційній системі METAVIR [175].	**Вступ** (стор. 5) Золотим» стандартом діагностики хронічного вірусного гепатиту є пункційна біопсія печінки, при патоморфологічному дослідженні якої визначається індекс гістологічної активності (ІГА) гепатиту за R.G. Knodell et al. (1981), ступінь тяжкості гепатиту за V.Desmet et al. (1995) і стадія перебігу гепатиту та фіброзу печінки за градацією METAVIR (1994).
Стор. 7 Для досягнення поставленої мети були	Стор. 6-7

сформульовані наступні завдання: 1. У трепанобіоптатах печінки хворих на хронічний вірусний гепатит В і С різного ступеня активності визначити патогістологічні та імуногістохімічні маркери вірус-індукованих пошкоджень печінки. 2. У трепанобіоптатах печінки хворих на хронічний вірусний гепатит В і С різного ступеню активності типувати склад **імуноцитів** у осередках імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, в портальних імуноклітинних інфільтратах і в «ступінчастих некрозах», а також **визначити патогістологічні і імуногістохімічні характеристики імуноклітинних пошкоджень печінки.** 3. На підставі даних патогістологічних, комп'ютерно-морфометричних і імуногістохімічних досліджень вивчити взаємозв'язок між активацією фібробластів в портальних трактах, перисинусоїдальних клітин Іто та макрофагів Купфера зі ступенем розвитку фіброзу	Для досягнення поставленої мети сформульовані наступні завдання: 1. В біопсійному матеріалі визначити гістологічні та імуногістохімічні прояви значної вірусобумовленої деструкції печінки і її компенсації у хворих на хронічний вірусний гепатит В, С і В+С та її особливості при різних генотипах вірусу С. 2. В гепатобіоптатах визначити гістологічні і імуногістохімічні параметри **імуноцитарної інфільтрації** печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит В, С і В+С та їх особливості при різних генотипах вірусу гепатиту С. 3. В гепатобіоптатах хворих на хронічний вірусний гепатит В, С і В+С **визначити гістологічні і імуногістохімічні особливості імуноклітинної деструкції печінки**. 4. В біопсійному матеріалі визначити гістологічні, імуногістохімічні характеристики зростання імуноклітинної деструкції печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит В, С і В+С.

печінки хворих на хронічний вірусний гепатит С. 4. Визначити патогістологічні та імуногістохімічні показники прогресії фіброзу печінки та вивчити кореляційні взаємозв'язки між вираженістю фіброзу печінки і клініко-біохімічними проявами хронічного гепатиту В і С. 5. Співвіднести результати патоморфологічного дослідження біоптатів печінки з клініко-біохімічними даними хворих хронічним гепатитом В і С різного ступеню активності. 6. Впровадити для використання у патологоанатомічній діагностиці найбільш значущі мікроскопічні показники прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С. ***Об'єкт дослідження:*** морфогенез хронічного **вірусного гепатиту В і С**. ***Предмет дослідження:*** **патоморфологічні особливості прогресії хронічних вірусних гепатитів**	5. В біопсійному матеріалі хворих на ХВГ визначити гістологічні і імуногістохімічні особливості основних різновидів фіброзу печінки з морфометричним аналізом накопичення колагену І і ІІІ типу при гепатофіброзі різного ступеню. 6. Провести кореляційний аналіз між індексом гістологічної активності хронічного вірусного гепатиту В, С і В+С, ступенем фіброзу печінки і клініко-лабораторними ознаками активності хронічного вірусного гепатиту та залежність його перебігу від генотипу вірусу гепатиту С. 7. За результатами біопсійних і лабораторно-біохімічних досліджень визначити імуногістохімічні і біохімічні предиктори ймовірної активації фіброзу печінки та залежність його прогресування від результатів противірусної терапії. ***Об'єкт дослідження*** – хронічний **вірусний гепатит В, С** і В+С.

В і С за даними трепанобіопсій печінки. **Методи дослідження***:* гістологічні, **імуногістохімічні та комп'ютерно-морфометричні дослідження трепанобіоптатів печінки для встановлення молекулярно-клітинних критеріїв прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С**; порівняльний аналіз морфологічних і клініко-біохімічних даних хворих на хронічний гепатит В і С різного ступеню активності; варіаційний статистичний і кореляційний аналіз отриманих результатів. **Наукова новизна отриманих результатів**. **На підставі**	***Предмет дослідження*** **– патоморфологічні зміни в печінці при різному перебігу хронічного вірусного гепатиту В, С і В+С, його прогресуванні та наслідках за даними біопсій печінки**. **Методи дослідження:** гістологічні, гістохімічні, **імуногістохімічні, лабораторно-біохімічні та морфометричні дослідження гепатобіоптатів для визначення морфогенезу прогресування хронічного вірусного гепатиту В, С** і В+С та формування цирозу і раку печінки; порівняльний і кореляційний аналіз морфологічних і клініко-лабораторних даних хворих на хронічні вірусні гепатити. **Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше *на підставі комплексного патогістологічного, гістохімічного, імуногістохімічного (ІГХ)* і

комплексного патогістологічного, гістохімічного, імуногістохімічного і комп'ютерно-морфометричного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих і аналізу їх клініко-біохімічних показників вперше отримані нові дані про мікроскопічні критерії прогресії хронічного вірусного гепатиту В і С. В печінці хворих на хронічний вірусний гепатит В і С вперше типовано склад імуноцитів у осередках імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, у зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», а також у портальних імуноклітинних інфільтратах. Вперше доведено, що так звана «запальна лімфоцитарна інфільтрація часточок печінки» у вигляді скупчень імунокомпетентних клітин навколо гепатоцитів є осередками 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 активуються	морфометричного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих і аналізу їх лабораторно-біохімічних показників у дисертації науково обґрунтована концепція патоморфологічного визначення основних модальностей прогресії хронічних вірусних гепатитів В, С і В+С з урахуванням вірусобумовленого руйнування гепатоцитів, виразності імуноклітинної деструкції, ступеня та типу фіброзу печінки. Доведена необхідність індивідуального підходу до патоморфологічного дослідження гепатобіопсій, спрямованого на визначення варіабельності перебігу ХВГ і його прогресування, які залежать від генотипу збудника, стану реактивності макроорганізму та відповіді хворого на противірусну терапію. На підставі патоморфологічного аналізу біопсій і лабораторно-біохімічних параметрів визначено, що найбільш несприятливий перебіг ХВГ С спостерігається у хворих з 1б генотипом HCV. Уперше визначено, що патоморфологічними складовими прогресування хронічного вірусного гепатиту В, С і В+С є зростання вірусобумовленого

колагеноутворення активованими клітинами Іто і фібробластами. Встановлено, що найбільш значущими додатковими мікроскопічними ознаками прогресії хронічного вірусного гепатиту **є: значне число внутрішньочасточкових осередків імуноклітинного кілінгу гепатоцитів, збільшення кількості CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів в осередках імуноклітинного кілінгу та в крайових зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів», збільшення числа фагоцитуючих CD68+ клітин Купфера** в часточках печінки, зростаюча колагенізація внутрішньочасточкових синусоїдів, розширення площі лімфоцитарної інфільтрації й фіброзу портальних трактів.

На підставі імуногістохімічних досліджень встановлено, що надмірну продукцію колагену в печінці хворих хронічним вірусним гепатитом С здійснюють **позитивні зірчасті перисинусоїдальні клітини Іто, активовані А-SMA (А-ізоформи гладком'язового** руйнування гепатоцитів і печінкових дольок, імуноклітинної деструкції печінки та активізація подальшого розвитку тяжкого фіброзу печінки. Переконливо доказано, що в прогресуванні ХВГ домінантне значення мають **імуноцитарний кілінг гепатоцитів та імуноклітинне руйнування печінки в зонах «ступінчастих та мостоподібних некрозів» агресивними спеціалізованими імуноцитами (CD8+**

Т-лімфоцитами, CD68+ макрофагами Купфера, pit-клітинами) за участю CD5+ лімфоцитів, CD20+ В-лімфоцитів і CD45R0+ Т-лімфоцитів.

ІГХ методами доказано, що в прогресуванні хронічного вірусного гепатиту В, С та В+С негативну роль відіграє не тільки портально-септальний, але й перисинусоїдально-центролобулярний та змішаний портально-септально-перисинусоїдально-центролобулярний фіброз печінки, предикторами яких є **збільшення чисельності перисинусоїдальних α-SMA+ клітин та α-SMA+ фібробластів в портальних трактах і в перипортальних зонах з**

актину), й A-SMA позитивні фібробласти портальних трактів. Вперше доведено, що поява нових поколінь клітин Іто фіброгенного типу пов'язана з лімфоцитарною інфільтрацією портальних трактів, зі збільшенням числа і площі імуноклітинних «ступінчастих некрозів», а також з наростанням фагоцитарної активації клітин Купфера.

Вперше встановлено, що експресія A-SMA клітинами Іто й фібробластами є раннім прогностичним маркером вірогідності розвитку фіброзу печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С з нормальним рівнем трансаміназ крові або з помірною гіперферментемією, тоді як розвитку тяжкого фіброзу печінки передує значне зростання числа активованих клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки.

За результатами гістохімічних і гістологічних досліджень визначені основні складові тяжкого фіброзу печінки у хворих хронічним **подальшим надмірним синтезом цими клітинами колагену I, III і IV типу, а також високий** рівень в сироватці крові хворих трансформуючого фактору росту β1 (TGF-β1) і гіалуронової кислоти. Визначено, що прогресування гепатофіброзу від слабкого F1 до тяжкого F3 ступеню у хворих, які не відповіли на противірусну терапію (ПВТ), в порівнянні з вірусологічними респондерами, реєструється в 6,6 разів частіше при ХВГ С та в 2 рази частіше при ХВГ В; тому через 5 років після ПТВ прогресування фіброзу печінки виявляється у 41,7% хворих на ХВГ С і у 33,3% хворих на ХВГ В. Морфометричними і ІГХ методами встановлено, що при прогресуванні гепатофіброзу від помірного F2 до тяжкого F3 ступеню при портально-септальному фіброзі в печінці достовірно збільшується в півтора рази накопичення колагену I типу та вдвічі – колагену III типу, а при змішаному портально-перисинусоїдально-центролобулярному фіброзі в печінці достовірно збільшується в 2,5 рази накопичення колагену I типу та в півтора рази – колагену III типу. Таким чином підтверджено, що стадію перебігу ХВГ В, С та В+С найбільш

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 портальних трактах.**	достовірно віддзеркалює, визначений в біопсіях, ступінь фіброзу печінки. Доведено, що експресія раковими клітинами HBcAg та HBsAg є найбільш переконливим свідченням взаємозв'язку раку печінки та ХВГ В. Встановлено, що патоморфологічними ознаками ремісії хронічного вірусного **гепатиту є відсутність імуноклітинних «ступінчастих і мостоподібних некрозів» та значної кількості α-SMA-позитивних клітин в перисинусоїдальних просторах і в портальних трактах печінки, а також стабілізація ступеню гепатофіброзу**.
Практичне значення отриманих результатів При прогнозуванні вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих хронічним	**Практичне значення отриманих результатів** Визначені предиктори подальшого розвитку фіброзу печінки: **збільшення кількості α-SMA+ клітин у внутрішньодольковых перисинусоїдальних просторах та α-SMA+ фібробластів в**

вірусним гепатитом В і С слід враховувати зростання числа активованих **A-SMA-позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки, а також сегментарну колагенізацію стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність A-SMA позитивних фібробластів в імуноклітинних «ступінчастих некрозах» і в портальних трактах, розвиток тонких фіброзних септ з портальних трактів в часточки печінки, зростання числа портальних трактів з фіброзом різного ступеня.** У співавторстві з науковим керівником проф. В.О. Туманським розроблений і запатентований спосіб прогнозування розвитку фіброзу печінки хворих хронічним вірусним гепатитом С у трепанобіопсіях печінки шляхом імуногістохімічного визначення активованих зірчастих клітин Іто з використанням антитіл до A-SMA й гістохімічного визначення наявності сегментарної колагенізації	**портальних трактах і в перипортальних імуноклітинних інфільтратах,** а також збільшення кількості Кі-67+ клітин в перисинусоїдальних просторах. Доведено, **що паралельне визначення α-SMA+ клітин, колагену I, III і IV типу дає можливість конкретизувати, який тип гепатофіброзу (портально-септальний, перисинусоїдальний чи змішаний портально-септально-перисинусоїдально-центролобулярний) відіграє основну роль в прогресуванні перебігу ХВГ та в розвитку його ускладнень**.

внутрішньочасточкових венозних синусоїдів печінки. Стор. 32 Це великі гепатоцити з блідо-еозинофільною дрібнозернистою цитоплазмою, з ядром, зміщеним до оболонки клітини і відокремленим від цитоплазми світлим обідком, що зустрічаються у 36% випадків хронічного гепатиту В (морфологічний показник наявності HBsAg), і гепатоцити з «пісочними ядрами» (хроматин яких розташовується на периферії, з проясненням в центрі ядра) маркер HBcAg Стор. 48 При мікроскопічному дослідженні серійних гістологічних зрізів біоптатів печінки 40 хворих були виявлені наступні патогномонічні мікроскопічні ознаки ХГВ: «пісочні» і вакуолізовані ядра гепатоцитів (Рис. 3.1), «матово-склоподібні» гепатоцити (Рис. 3.2), малоінтенсивні внутріклітинні холестази, рідкісні тільця	Стор. 39 Внутрішньоядерні частини HBcAg розташовані дифузно або утворюють агрегати. Описані морфологічні зміни, що характерні для ХГВ, представлені гідропічною рідше балонною дистрофіює гепатоцитів, появою «матово-склоподібних» гепатоцитів (що є морфологічним маркером HBsAg) та «пісочних» ядер (маркер HBcAg) Стор. 83 При мікроскопіі біоптатів печінки 255 хворих на ХВГ С, В і В+С виділені неспецифічні, але характерні для вірусних гепатитів, загальні гістологічні зміни в печінці: поліморфізм ядер гепатоцитів з наявністю певної частки «пісочних», пікнотичних і вакуолізованих ядер (Рис. 3.1), білкова та дрібно-крупновакуольна жирова дистрофія гепатоцитів, наявність в дольках різної кількості вогнищ імуноклітинного кілінгу інфікованих гепатоцитів (Рис.

Каунсілмена, осередки імуноклітинного кілінгу гепатоцитів (Рис. 3.3), імуноклітинні інфільтрати у портальних трактах (Рис. 3.4), імуноклітинні «ступінчасті некрози».	3.2), тілець Каунсілмена і цитокаріолізису гепатоцитів.
Рис. 3.2 Осередок імуноклітинного кілінгу гепатоцитів в биоптаті печінки хворого на ХВГ С	Рис. 3.3 Осередки імуноклітинного кілінгу гепатоцитів Рис. 3.5 «Матово-склоподібні» гепатоцити і вогнище імуноклітинного кілінгу при ХВГ В.
Відповідно до індексу гістологічної активності за R.G. Knodell зі співавт. (1981) і V. Desmet зі співавт. (1995) у біоптатах печінки 40 хворих ХГВ з мінімальною активністю (ІГА 1-3 бали) був виявлений у 26,0% пацієнтів, гепатит із слабкою активністю (ІГА 4-8 балів) – 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±0,41 балів.	Стор. 88 Деякі з перерахованих гістологічних ознак ХВГ (дистрофія гепатоцитів, ацидофільні тільця Каунсілмена, портальне запалення, «ступінчасті», «мостоподібні» та мультилобулярні некрози), виражені в балах за їх інтенсивністю, використовуються для напівкількісного підрахунку індексу гістологічної активності (ІГА) хронічного вірусного гепатиту за R.G. Knodell зі співавт. (1981), широко розповсюдженого серед гепатологів. У біоптатах печінки 136 хворих на ХВГ С мінімальна активність гепатита (ІГА 1-3 бали)

	визначена у 12,4% пацієнтів, низька (ІГА 4-8 балів) – у 42,6% хворих, помірна (ІГА 9-12 балів) виявлена у 32,6% осіб і висока активність (ІГА 13-18 балів) визначена у 12,4% хворих. У біоптатах печінки 51 хворого на ХВГ В+С мінімальна активність гепатита (ІГА 1-3 бали) виявлена у 24,1% пацієнтів, низька (ІГА 4-8 балів) – у 13,86%, помірна (ІГА 9-12 балів) - у 34,5% осіб і висока активність гепатиту (ІГА 13-18 балів) визначена у 27,6% хворих.
«Матово-склоподібні» гепатоцити, переважно розташовувалися в центральних відділах часток печінки і були виявлені у 72,5% хворих ХГВ. При імуногістохімічному дослідженні HBsAg був виявлений у 80% хворих ХГВ: тільки у половини хворих ХГВ HBsAg локалізувався в цитоплазмі «матово-склоподібних»	для ХВГ В притаманні «матово-склоподібні» гепатоцити з гомогенною світлорожевою цитоплазмою в гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином Імуногістохімічною відзнакою ХВГ В є наявність в гепатоцитах вірусних HBsAg і HbcAg антигенів. При імуногістохімічному дослідженні HBsAg визначався у вигляді численних дрібних коричневих гранул, що субтотально заповнювали цитоплазму гепатоцитів (Рис. 3.6), тоді як

гепатоцитів, в решті випадків HBsAg визначався в цитоплазмі інших, не «матово-склоподібних», гепатоцитів. При морфологічному дослідженні серійних гістологічних препаратів, забарвлених гематоксиліном та еозином, склоподібно-матові гепатоцити розташовувалися переважно в центральних відділах частки і були виявлені у 29 хворих з 40. При проведенні імуногістохімічного дослідження, HBsAg був виявлений у 32 хворих, з них у 16 хворих в цитоплазмі склоподібно-матових гепатоцитів був знайдений HBsAg. Виявлено, що у 8 хворих HBsAg визначався в цитоплазмі одиничних гепатоцитів або нечисленних груп гепатоцитів, хаотично розташованих в частці печінки, тоді як склоподібно-матові гепатоцити займали обширні поля в центральних відділах частки печінки Стор. 76-77	HBcAg візуалізувався у вигляді дрібних, нечисленних коричневих гранул, які вогнищево розташовувалися в цитоплазмі гепатоцитів або кільцеподібно охоплювали вакуолізовані і пікнотизовані ядра гепатоцитів Стор. 101 В печінці цих же хворих у складі клітинних інфільтратів портальних трактів визначаються

При проведенні імуногістохімічного дослідження трепанобіоптатів печінки хворих ХГС з використанням моноклональних антитіл до CD-45 RO і до CD-8 антигенам, а також антитіл до CD-68 антигенам були виявлені певні особливості. Як показало імуногістохімічне дослідження, в імуноклітинних інфільтратах портальних трактів у великому числі були представлені лімфоцити, які експресували на своїй поверхні молекули CD-45RO; вони дифузно розташовувалися навколо портального тракту і в ступінчастих некрозах без якого-небудь переважання (Рис. 4.15). У лімфоїдних фолікулах портальних трактів вони розташовувалися переважно в периферичних відділах фолікулів.	CD20+ В-лімфоцити, CD5+ лімфоцити, CD45R0+ Т-лімфоцити, CD8+ Т-лімфоцити і CD68+ макрофаги. Ці клітини в різній кількості та в різних пропорціях складають в портальних трактах дифузні імуноцитарні інфільтрати різної густоти та поширення (Рис.3.21, 3.22), а також фолікулоподібні структури (подібні до вторинних фолікулів лімфатичних вузлів) (Рис.3.23), в центрі яких концентруються CD20+ В-лімфоцити і макрофаги (Рис.3.24), по периферії оточені іншими імунними клітинами. В різних портальних трактах можуть одночасно спостерігатись дифузні і фолікулоподібні імуноцитарні інфільтрати. Фолікулоподібні імуноцитарні інфільтрати інколи досягають дуже значних розмірів і значно потовщують портальні тракти. Стор. 167, 178

	Свідченням ймовірної імуноклітинної деструкції долек печінки є виявлення в перипортальних імуноклітинних «ступінчастих» некрозах та в прилеглих перисинусоїдальних просторах значної кількості CD8 позитивних Т-кілерів (Рис. 5.31), а також значної кількості активованих CD68 позитивних макрофагів з ознаками фагоцитозу (Рис. 5.32).
Стор. 95 В результаті проведеного імуногістохімічного дослідження біоптатів печінки хворих ХГС з різним ступенем	Стор. 125 Проведеними імуногістохімічними дослідженнями підтверджено, що основними продуцентами надлишку колагену і інших компонентів позаклітинного матриксу при фіброзі печінки у хворих на ХВГ є нові покоління активованих α-SMA-позитивних перисинусоїдальних зірчастих клітин, а також активовані α-SMA-позитивні фібробласти портальних трактів та

гістологічної активності на предмет виявлення A-SMA позитивних клітин встановлено, що у хворих на хронічний вірусний гепатит перисинусоїдальні A-SMA-позитивні клітини в часточках печінки за гістологічною будовою відповідють клітинам Іто і в основному локалізуються в зонах пошкоджених гепатоцитів та в області лімфоцитарних інфільтратів. Стор. 65 При зіставленні вираженості морфологічних змін у печінці хворих ХГВ з нормальним рівнем АЛАТ і хворих з підвищеним її рівнем виявлено, що середній показник ІГА у хворих з нормальним рівнем ферментів склав 6,87±0,09 балів, а у хворих з гіперферментемією він склав 7,41±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 вираженості фіброзу печінки	перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів». Стор. 133-134 У пацієнтів з ХВГ В активність трансаміназ слабко вірогідно корелювала з ІГА при біопсії (r=0,36). Як і при ХВГ С, найбільші по модулю зв'язки реєструвались між рівнями трансаміназ та виразністю перипортальних/мостовидних некрозів (r=0,44 - 0,39), менші – між рівнями трансаміназ та активністю портального запалення (r=0,33 - 0,30). В той же час у хворих на ХВГ В **не було виявлено вірогідних кореляційних зв'язків** між активністю АЛТ, АСТ сироватки крові та важкістю фокальних некрозів та дистрофії гепатоцитів в дольках печінки. При мікст-гепатиті В+С рівень трансаміназ вірогідно не корелює ні з сумарним ІГА, ні з окремими його компонентами.

хворих хронічним вірусним гепатитом В з нормальним та підвищеним рівнем АлАТ, **не виявлено достовірних відмінностей** (коефіцієнт кореляції Пірсона r склав + **0,35,** p<0,05). Отримані результати говорять про те, що найадекватніше ступінь вираженості вирус-індукованих і імуноклітинних уражень печінки, ступінь активації колагеноутворення і прогресії фіброзу у хворих хронічним вірусним гепатитом В відображають результати патоморфологічного дослідження пункційної трепанобіопсії печінки.	
Стор. 85-86. За даними патогістологічних досліджень біоптатів печінки мінімальний ступінь гістологічної активності гепатиту був виявлений у 32% хворих з підвищеним рівнем АлАТ і у 30% хворих з нормальним її рівнем; слабковиражений ступень активності гепатиту визначений у 38% хворих з підвищеним рівнем АлАТ і у 40% пацієнтів з нормальним її рівнем; помірна активність гепатиту мала місце	Стор. 144 Отримані нами дані засвідчили, що активність АЛТ в сироватці крові досить слабко пов’язана із важкістю фіброзу печінки у хворих на ХВГ (табл. 4.8). Незначне, однак достовірне зростання рівня АЛТ реєструвалось лише у хворих з виразним фіброзом печінки (Ф > 2 бали). В той же час активність АСТ виявляла тенденцію до зростання по мірі збільшення

у 22% хворих з підвищеним рівнем АлАТ і у 24% хворих з нормальним її рівнем; виражена активність гепатиту була у 8% хворих з підвищеним рівнем АлАТ і у 6% осіб з її нормальними значеннями. При зіставленні вираженості морфологічних змін в печінці у хворих на ХГС 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±0,1 балів, а у хворих з гіперферментемією він склав 7,98±0,11 балів. При цьому достовірних відмінностей між середніми показниками ІГА хронічного гепатиту у хворих основної і контрольної груп не виявлено (коефіцієнт кореляції **Пірсона r= + 0,22, p<0,05)** **Стор. 150** **Висновки** У дисертації приведено теоретичне узагальнення і нове рішення наукової задачі, що полягає в удосконаленні найбільш значущих	стадії фіброзу, у пацієнтів з цирозом вона була вдвічі вищою, ніж у хворих з фіброзом 0 балів. Активність АЛТ не корелювала із стадією фіброзу, а активність АСТ та співвідношення АЛТ/АСТ виявляли слабкий, достовірний кореляційний зв'язок із стадією фіброзу при біопсії (**r=0,22,** -0,30, відповідно).

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. 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 CD45R0+ 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.	Стор. 288 **Висновки** У дисертації приведене теоретичне узагальнення і нове рішення актуальної науково-практичної проблеми щодо патоморфологічного визначення вірусобумовленого руйнування гепатоцитів, імуноклітинної деструкції та зростання фіброзу печінки при прогресуванні хронічних вірусних гепатитів В, С і В+С, а також їх наслідків для клініко-патоморфологічного прогнозування перебігу хвороби та оптимізації лікування хворих. 2. За даними імуногістохімічного аналізу у хворих на ХВГ в складі перисинусоїдальних імуноцитарних інфільтратів печінки визначаються CD5+ лімфоцити, CD20+ В-лімфоцити, CD8+ Т-лімфоцити і CD68+ макрофаги Купфера, а в дифузних і фолікулоподібних імуноцитарних інфільтратах портальних трактів визначаються CD20+ В-лімфоцити, CD5+ лімфоцити, CD45R0+

CD45R0+ лімфоцити, найімовірніше виконують функції Th_2-клітин пам'яті при персистенції гепатотропних вірусів.	Т-лімфоцити, CD8+ Т-лімфоцити і CD68+ макрофаги
8. Прогностичними ознаками вірогідності розвитку значного фіброзу печінки у хворих на хронічні вірусні гепатити В або С є: гіперплазія активованих A-SMA позитивних клітин Іто в перисинусоїдальних просторах печінки і сегментарна колагенізація стінок внутрішньочасточкових венозних синусоїдів, наявність A-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 вираженості. Основними складовими важкого фіброзу печінки у хворих на ХГС є збільшення числа перисинусоїдальних клітин Іто, поширена колагенізація стінок внутрішньочасточкових синусоїдів і розширення їх	7. Прогностичними ознаками ймовірної активації фіброзу печінки при ХВГ є збільшення числа α-SMA-позитивних фібробластів в портальних трактах і α-SMA+ зірчастих клітин в дольках печінки, наявність Кі-67+ проліферуючих фібробластів в портальних трактах, фіброзних септах, «мостоподібних некрозах» і в численних «ступінчастих некрозах», а також високий рівень в сироватці крові хворих TGF-β1 і гіалуронової кислоти. При відсутності відповіді на противірусну терапію прогресування фіброзу печінки виявляється у 41,7% хворих на ХВГ С і у 33,3% хворих на ХВГ В.

отворів, значна колагенізація центральних часточкових вен, виражений фіброз в зонах імуноклітинних «ступінчастих некрозів» і в портальних трактах. 5. Найбільш значущими ознаками імуноклітинної прогресії хронічного вірусного гепатиту, що визначаються в трепанобіоптатах печінки є: наявність 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.	3. Для прогнозування імовірного прогресування ХВГ в парафінових зрізах гепатобіоптатів, окрім вищевказаних методик, по-мінімуму необхідно визначити рівень експресії гепатоцитами і клітинами Іто Кі-67 та каспази-3**,**

	а також визначити кількість вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів та тілець Каунсілмена, кількість і розповсюдженість імуноцитарних «ступінчастих і мостоподібних некрозів» з наявністю в них CD8+ Т-лімфоцитів, CD68+ макрофагів і CD20+ В-лімфоцитів.
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 вірусіндукованих і імуноклітинних уражень печінки, ступінь активації колагеноутворення і прогресії фіброзу. 2. Найбільш достовірні діагностичні і прогностичні результати патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів	**Практичні рекомендації** За результатами проведених гістологічних, імуногістохімічних і лабораторно-біохімічних досліджень запропонований алгоритм патоморфологічного дослідження біопсій печінки у хворих на ХВГ з урахуванням ступеню виразності вірусіндукованих і імуноклітинних уражень печінки, ступеню активації колагеноутворення і прогресування фіброзу. 2. Ступінь виразності вірусобумовленої і імуноклітинної деструкції, а також ступень фіброзу печінки у хворих на ХВГ визначається в парафінових

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 тяжкого фіброзу печінки, окрім методик Масона і ван-Гизон, доцільно використовувати імуногістохімічне виявлення A-SMA позитивних клітин Іто і фібробластів, а також колагену 4 типу. 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	зрізах гепатобіоптатів при наявності в трепанобіоптатах не менш ніж 18–20 дольок і 10–12 портальних трактів та при застосуванні мінімуму патоморфологічних методик: забарвлення гематоксиліном та еозином, за Ван Гізон, Масон-триколор, імуногістохімічне визначення рівня експресії α-SMA, колагену I, III і IV типу, а також HBsAg і HBcAg. 3. Для прогнозування імовірного прогресування ХВГ в парафінових зрізах гепатобіоптатів, окрім вищевказаних методик, по-мінімуму необхідно визначити рівень експресії гепатоцитами і клітинами Іто Кі-67 та каспази-3, а також визначити кількість вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів та тілець Каунсілмена, кількість і розповсюдженість імуноцитарних «ступінчастих і мостоподібних некрозів» з наявністю в них CD8+ Т-лімфоцитів, CD68+ макрофагів і CD20+ В-лімфоцитів. 4. Необхідним мінімумом методик для виявлення цирозу печінки в трепанобіоптатах печінки у хворих на ХВГ є

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.	забарвлення гематоксиліном та еозином, за Ван Гізон і Масон-триколор; для визначення прогресування цирозу печінки необхідно визначити рівень експресії клітинами Кі-67, каспази-3, α-SMA, колагенів I, III і IV типу, кількість вогнищ імуноклітинного кілінгу в хибних і істинних печінкових дольках, а також кількість і розповсюдженість в фіброзних септах імуноцитарних «ступінчастих некрозів» з наявністю в них CD8+ Т-лімфоцитів і CD68+ макрофагів. 5. Необхідним мінімумом методик для виявлення гепатоцелюлярного раку в трепанобіоптатах печінки у хворих на ХВГ є забарвлення гематоксиліном та еозином і за Ван Гізон.