

А. О. Гаврилюк, В. О. Туманський, Н. О. Пентюк

КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАСЛІДКІВ ЛІКОВАНОГО ХРОНІЧНОГО ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ В, С і В+С

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (м. Вінниця)

Робота є фрагментом наукової тематики кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова «Морфогенез та патоморфоз захворювань кишково-шлункового тракту», номер держ. реєстрації 0111U010555.

Вступ. При хронічних вірусних гепатитах В, С і В+С важливою ланкою патоморфологічних змін у печінці є її фіброзування. Тривале перебування HBV і HCV у клітинах печінки сприяє деструктивним процесам, що ведуть до прогресування фіброзу і розвитку ЦП [3]. При низькій морфологічній активності запального процесу, помірного підвищенні активності трансаміназ цироз печінки розвивається у 30% хворих протягом 10-15 років. При високій активності запального процесу цироз печінки формується в середньому через 3,5 роки [3], а у 45% хворих – протягом 5 років [4]. Розвиток ГЦК залежить від багатьох чинників: рівня вірусного навантаження і генотипу вірусу, здатності вірусу інтегрувати в геном гепатоцитів, тривалості персистування вірусів у хворих на ХГ В і ХГ С з наявністю або відсутністю ЦП, віку пацієнтів, генотипової і фенотипової резистентності макроорганізму, оскільки роль вірусів у розвитку ГЦК невід’ємна від впливу на організм інфікованих осіб чинників зовнішнього середовища та коінфікування іншими вірусами [2-5].

При прогресуванні ХГВ ризик розвитку пухлини збільшується і стає більш високим на стадії ЦП. Серед хворих на HBV асоційований ЦП ризик розвитку ГЦК складає 2% на рік [7]. При дослідженні циротичних вузлів встановлено, що 10-40% з них мають моноклональну природу [8]. Надалі клітини набувають риси дисплазії і перетворюють на інвазивних рак. HCV-індукована ГЦК майже завжди розвивається на тлі ЦП [1]. Малігнізація настає в 12,5 випадків, за відсутності цирозу печінки – в 3,8%. Неконтрольована проліферація пухлинних клітин може бути обумовлена порушенням регуляції механізмів внутрішньоклітинної трансдукції сигналів. У хворих із мікст-інфекцією хвороба набуває агресивнішого перебігу із швидким трансформуванням у цироз печінки і високою вірогідністю ГЦК [10].

Щорічна захворюваність на ГЦК серед пацієнтів із цирозом печінки 2,5%. Цироз-рак – найчастіша форма цієї хвороби. Переважно хворіють чоловіки. Зв’язок ГЦК з HBV і HCV сумнівів не викликає, але механізми онтогенезу вивчені недостатньо. Більшість дослідників однастайні в тому, що хронічний запальний процес, зумовлений імунною відповіддю

на інфіковані гепатоцити, відіграє провідну роль у процесі канцерогенезу [6]. Злоякісна трансформація гепатоцитів відбувається на тлі посиленого клітинного поновлення, зумовленого хронічним запаленням та пошкодженням клітин в умовах окислювального стресу. Ці процеси асоційовані з генетичними порушеннями, що сприяють активації онкогенів [9].

Діагностика ГЦК на тлі ЦП утруднена. Ультразвукове дослідження дозволяє запідозрити ГЦК у 80-90% випадків. Відбір хворих для уточнення діагнозу не уніфікований. Якщо діаметр вузла не перевищує 2 см, рекомендується проведення біопсії печінки, оскільки проведення УЗД печінки та визначення α -ФП є недостатніми діагностичними заходами для проведення диференційної діагностики між ГЦК та доброякісною пухлиною.

Тому **метою роботи** було вивчення наслідків лікованого хронічного вірусного гепатиту В, С і В+С за даними біопсії печінки за допомогою гістологічних і імуногістохімічних методів.

Об’єкт і методи дослідження. Нами був проведений ретроспективний аналіз клінічних даних 444 хворих на ХГ В, С і В+С, яким виконувалась біопсія печінки. Для верифікації клінічного діагнозу всім хворим проведено клінічне, лабораторне та інструментальне дослідження. Етіологія вірусного гепатиту і фаза інфекційного процесу визначалися за допомогою імуноферментного методу і методу ампліфікації з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Хронічний гепатит В діагностували за наявності HBsAg, HBeAg, анти-HBc IgM, анти-HBc IgG, анти-HBe, ДНК HBV. Про активну реплікацію вірусу свідчила наявність в сироватці крові HBeAg, анти-HBc IgM і ДНК HBV. Хронічний гепатит С верифікували за наявності в сироватці крові HCV IgG, анти-HCV IgM, і РНК HCV. Фаза реплікації вірусу у хворих ХГС визначалася за наявності в сироватці крові РНК HCV і анти-HCV IgM. Хронічний гепатит В+С діагностували за наявності HBsAg, HBeAg, HCV IgG, анти-HCV IgM і РНК HCV. Виразність синдрому цитолізу в печінці визначалась рівнем в сироватці крові хворих активності аланін- і аспартат-амінотрансферази (АлАТ, АсАТ).

Для патоморфологічної верифікації діагнозу, визначення ІГА і виразності фіброзу печінки хворим виконувались біопсійні дослідження. Пункційні трепанобіопсії печінки хворим на ХГВ виконувались під контролем ультразвукового дослідження хірургом в 1-му хірургічному відділенні 3-ої міської клінічної

лікарні Запоріжжя та в хірургічному відділенні Вінницької обласної лікарні. Для черезшкірної трепанобіопсії печінки використовувались голки Uni-Cut і BioCut 14-16G, які, у відповідності до клінічного стандарту, дозволяли отримати стовпчики тканини печінки завдовжки 1,5 см для подальшого інформативного морфологічного дослідження трепанобіоптата.

Для патоморфологічного і імуногістохімічного дослідження стовпчики трепанобіоптатів та шматочки лапароскопічних біоптатів печінки фіксували в забуференому 10% формаліні і заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 3600 («MICROM Laborgerate GmbH» – Німеччина) і санному мікротомі (Японія) виготовляли серійні зрізи завтовшки 4–5 μм, які використовували для стандартних патогістологічних, а також для імуногістохімічних досліджень. Для імуногістохімічних досліджень використовували серійні парафінові зрізи, розміщені на адгезивних предметних скельцях «SUPER FROST PLUS» і «SUPER FROST PLUS GOLD» фірми «DAKO» – Данія.

Імуногістохімічні дослідження з використанням моноклональних антитіл виконувались в парафінових зрізах тканини печінки. Після депарафінізації і регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів (шляхом нагрівання на водяній бані в цитратному (pH=6,0) або в Трис-ЕДТА буфері з pH=9,0), подавляли активність ендogenous пероксидази 3% розчином перекису водню та наносили блокуючу сироватку. Після інкубації з первинними антитілами відповідні антигени виявляли з використанням систем візуалізації DAKO EnVision+System з діамінобензидином або LSAB2 System (фірми «DAKO», Данія).

Апоптоз гепатоцитів імуногістохімічно визначався з використанням моноклональних антитіл до каспази-3 *Mo a-Hu Caspase Ab-3, Clone 3CSP03* (фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) та системи візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином («DAKO» – Данія).

Стан клітинної проліферації в печінці при хронічному вірусному гепатиті, цирозі і карциномі печінки визначався з використанням моноклональних антитіл *Ki-67 Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1* («DAKO», Данія).

Диспластичні і пухлинні зміни в печінці аналізували в парафінових зрізах біоптатів, забарвлених гематоксиліном і еозином та методом ван-Гізона. Стан клітинної проліферації в печінці при хронічному вірусному гепатиті, цирозі і карциномі печінки визначався з використанням моноклональних антитіл *Ki-67 Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1* («DAKO», Данія) та проти *PCNA Mo Anti- Proliferative Cell Nuclear Ag (PCNA), Clone PC10* («DAKO Cytomation», Данія), а також системи візуалізації EnVision+ («DAKO» – Данія) з діамінобензидином.

Результати досліджень та їх обговорення. За даними виконаного ретроспективного клініко-патоморфологічного аналізу протягом 2001-2011 років з 444 хворих на ХВГ В, С і В+С цироз печінки після гепатобіопсії діагностовано у 114 (25,67%) хворих: у 16,67% хворих на ХВГ С, у 4,05% хворих на ХВГ В і 4,95% хворих на ХВГ В+С.

Результати паралельного патогістологічного, гістохімічного і імуногістохімічного аналізу гепатобіоптатів показали, що при цирозі печінки у хворих на ХВГ В, С і В+С продовжується притаманна хронічним вірусним гепатитам імуноцитарна деструкція печінки і подальше прогресування її фіброзу, саме ці процеси з патоморфологічної точки зору обумовлюють активність цирозу і несприятливий прогноз його перебігу для хворого.

Імуноцитарна деструкція при цирозі печінки проявляється утворенням перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів» та імуноклітинних «ступінчастих некрозів», які проникають в печінку з фіброзних септ зі значною імуноцитарною інфільтрацією, появою імуноклітинних зон деструкції в псевдочасточках і атипових часточках печінки, а також збільшенням в них кількості вогнищ імуноклітинного кілінгу гепатоцитів.

Потенції прогресування фіброзу при цирозі печінки у хворих на ХВГ розкривають імуногістохімічні методики. Виконаний імуногістохімічний аналіз показав, що на зростання портального і перипортального фіброзу вказує проліферація фіброblastів в цих зонах печінки, про що свідчить наявність Ki67 позитивних фіброblastів в портальних трактах і в перипортальних зонах. Про можливість подальшого розвитку перипортального фіброзу свідчить також поява в перипортальних зонах колагену IV типу, розташованого в перипортальному імуноклітинному інфільтраті.

На розвиток в найближчий час перисинусоїдального і септального фіброзу в атипових та хибних дольках при цирозі печінки вказує поява в них тонких, так званих мостоподібних фіброзних септ з наявністю α-SMA позитивних зірчастих клітин та тонких прошарків колагену IV типу. Про розвиток в атипових та хибних дольках перисинусоїдального фіброзу свідчить експресія α-SMA значною кількістю перисинусоїдальних зірчастих клітин – продуцентів колагену в печінкових часточках.

При цирозі також активується проліферативна активність печінкових клітин з експресією маркерів проліферації Ki67 та PCNA. Виконані імуногістохімічні дослідження показали, що при цирозі печінки серед проліферуючих клітин з експресією ядерного антигену Ki67 лідерами є епітеліоцити дрібних холангіол та фіброblastи портальних трактів, а також лімфоцити центральної зони фолікулоподібних імуноклітинних інфільтратів портальних трактів. Експресія маркеру клітинної проліферації Ki67 визначається також в ядрах поодиноких гепатоцитів та перисинусоїдальних зірчастих клітин. В той же час, при цирозі печінки експресія маркеру клітинної проліферації PCNA визначається в значно більшій кількості гепатоцитів. Експресія PCNA спостерігається в ядрах великої кількості гепатоцитів, розташованих в зонах імуноцитарної деструкції атипових часточок циротично зміненої печінки, а також у вогнищах проліферації так званих овальних клітин, які є камбіальними клітинами для відновлення популяції гепатоцитів.

Таким чином, виконані дослідження доказали високу проліферативну активність печінкових клітин при цирозі печінки у хворих на ХВГ, яка обумовлена

з одного боку необхідністю поповнення популяції гепатоцитів на тлі зростаючого їх дефіциту, а з іншого – інтенсивним новоутворенням фібробластами надлишку колагену і інших молекул позаклітинного матриксу та новоутворенням дрібних холангіол в порталних трактах та в потовщених прошарках сполучної тканини.

При цирозі печінки у хворих на ХВГ В, С і В+С прогресування портално-перисинусоїдального фіброзу призводить до розвитку порталної гіпертензії зі смертельною кровотечею з варикозно розширених вен стравоходу, а зростаючий дефіцит гепатоцитів внаслідок їх прогресуючого руйнування різними механізмами призводить до розвитку смертельної печінково-клітинної недостатності. У відносно невеликої кількості хворих на тлі цирозу печінки розвивається печінковоклітинний рак.

За результатами спостережень нами відмічено, що при цирозі печінки рак розвився у 12,28% хворих на ХВГ С і у хворих на ХВГ В у співвідношенні 2,5:1 (тобто у 71,4% випадків – на тлі ХВГ С і у 28,5% випадків – на тлі ХВГ В). Виконані паралельні патогістологічні і гістохімічні дослідження дали змогу визначити мікроскопічні характеристики раку печінки, який виник у хворих на ХВГ С і В на тлі цирозу печінки, а також визначили диспластичні зміни в печінці, які спостерігаються в перифокальних зонах раку печінки, і які можуть спостерігатись при цирозі печінки як предиктори ймовірного розвитку раку.

Диспластичні зміни стосувались зміни структури гепатоцитів (величини клітин, кількості ядер і ядерець різної щільності та форми) і зростанням кількості структурно аномальних гепатоцитів, а також проявлялись так званою нодулярною гіперплазією гепатоцитів.

Так звана нодулярна гіперплазія гепатоцитів до сьогодняшнього часу відноситься до диспластичних процесів невизначеного функціонального або патологічного значення. Вона характеризується мозаїчно-вогнищцевою розповсюдженістю в циротично зміненій печінці або в печінці з тяжким F3 портално-септальним фіброзом.

Проведений патогістологічний аналіз особливостей розвитку раку на тлі цирозу печінки показав, що у хворих на ХВГ С і В виникає печінковоклітинний або гепатоцелюлярний рак. При аналізі біоптатів печінки хворих на ХВГ з'ясовано, що злоякісна пухлина може виникати з товстих прошарків сполучної тканини циротично зміненої печінки і в таких випадках вона тісно пов'язана з сполучною тканиною або може визначатись на відстані від сполучнотканинних прошарків і імітувати рак, який начебто виникає без будь якого зв'язку з цирозом печінки. На

наш погляд, відсутність визначаємого в мікроскопі взаємозв'язку між цирозом і раком пояснюється дуже малим об'ємом стовпчика трепанобіоптата, в який не попадає типова ділянка цироза-рака печінки.

Гістоструктура гепатоцелюлярного рака при цирозі печінки у хворих на ХВГ дуже поліморфна. В раковій пухлині спостерігаються патологічні мітози гепатоцитів, а також ділянки апоптотичного розпаду пухлинних гепатоцитів. Пухлинні гепатоцити місцями містять значно гіперхромні і поліморфні ядра з наявністю гігантських ядер і ядерних сімплів, місцями визначаються більш менш мономорфні за розмірами ядра з вакуолями.

Висновки.

За даними патоморфологічних досліджень біопсії протягом 10 років перебігу ХВГ цироз на тлі хронічного вірусного гепатиту виникає 25,67% хворих, рак печінки – у 12,3% від всіх хворих на цироз вірусного генезу, тривала ремісія – у 0,67% хворих на ХВГ.

За даними біопсійних досліджень мікронодулярний цироз печінки діагностовано у 16,67% хворих на ХВГ С, у 4,05% хворих на ХВГ В і 4,95% хворих на ХВГ В+С. При цирозі печінки, на тлі зростаючого дефіциту гепатоцитів, максимальної виразності досягають компенсаторно-присосовчі та проліферативні процеси, які на тлі глибоких порушень типової портално-часточкової гемомікроциркуляції та молекулярної структури позаклітинного молекулярного матриксу і перисинусоїдальних просторів не призводять до відновлення типової архітектури печінкових часточок.

Цироз печінки у хворих на ХВГ відрізняється морфологічними ознаками значної активації імунітарної деструкції печінки, а також прогресування фіброзу із поступовим знищенням істинних і хибних мікрочасточок.

За результатами клініко-морфологічних спостережень при цирозі печінки у 12,28% хворих на ХВГ С і у хворих на ХВГ В у співвідношенні 2,5:1 (тобто у 71,4% випадків – на тлі ХВГ С і у 28,5% випадків – на тлі ХВГ В) розвився гепатоцелюлярний рак печінки ацинарно-солідної, трабекулярної, трабекулярно-тубулярної структури. Гепатоцелюлярний рак при цирозі печінки у хворих на ХВГ може мати гістоструктуру фіброламельярної карциноми та типової світлоклітинної карциноми печінки.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується встановити, які ще клініко-морфологічні спостереження можливі при цирозі печінки на тлі різних форм ХВЧ.

Список літератури

1. Герасун В. А. Гепатоцелюлярна карцинома у хворих на хронічну НВ-вірусну інфекцію / В. А. Герасун // Гепатологія. – 2012. – №2. – С. 29-36.
2. Подымова С. Д. Болезни печени. Руководство для врачей. – 3-е изд., перераб. и доп. / С. Д. Подымова. – М.: Медицина, 1998 – 704 с.
3. Cooreman M. P. Hepatitis C virus: biological and clinical consequences of genetic heterogeneity / M. P. Cooreman // Scand. J. Gastroenterol. – 1996. – Vol. 218. – P. 106-115.
4. Farci P. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies / P. Farci, R. H. Purcell // Semin. Liver. Dis. – 2000. – Vol. 20. – P. 103-126.

5. Gottlob R. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity / R. Gottlob, M. Fulco, M. Levero // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 347-353.
6. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma / J. Nakamoto, L. G. Guidolli, C. V. Kuhlen [et al.] // J. Exp. Med. – 1988. – Vol. 188. – P. 3441-350.
7. Kim H. X-gene product of hepatitis B induced apoptosis in liver cell / H. Kim, H. Lee, Y. Yun // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 381-385.
8. Lee J. H. Evaluation and comparison of different hepatitis C genotyping and serotyping assays / J. H. Lee, W. K. Roth, S. Zeuzem // J. Hepatol. – 1997. – Vol. 26.
9. Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance / S. H. Ahn, Y. N. Park, J. Y. Park [et al.] // J. Hepatology. – 2005. – №2. – P. 188-194.
10. Tanabe G. A comparison of hepatocellular carcinoma associated with HBV or HCV infection / G. Tanabe, K. Nuruiki, Y. Baba // Hepatogastroenterology. – 1999. – Vol. 46. – P. 2442-2446.

УДК 616.36-002:572.7

КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАСЛІДКІВ ЛІКОВАНОГО ХРОНІЧНОГО ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ В, С І В+С

Гаврилюк А. О., Туманський В. О., Пентюк Н. О.

Резюме. За даними патоморфологічних досліджень біопсій протягом 10 років перебігу ХВГ цироз на тлі хронічного вірусного гепатиту виникає у 25,67% хворих, рак печінки – у 12,3% від всіх хворих на цироз вірусного генезу. За даними біопсійних досліджень мікронодулярний цироз печінки діагностовано у 16,67% хворих на ХВГ С, у 4,05% хворих на ХВГ В і 4,95% хворих на ХВГ В+С. При цирозі печінки, на тлі зростаючого дефіциту гепатоцитів, максимальної виразності досягають компенсаторно-приспосовні та проліферативні процеси, які на тлі глибоких порушень типової портально-часточкової гемомікроциркуляції та молекулярної структури позаклітинного молекулярного матриксу і перисинусоїдальних просторів не призводять до відновлення типової архітектури печінкових часточок. За результатами морфологічних досліджень при цирозі печінки розвився гепатоцелюлярний рак ацинарно-солідної, трабекулярної, трабекулярно-тубулярної структури.

Ключові слова: хронічний вірусний гепатит В, С і В+С, цироз печінки, HBV і HCV-асоційована гепатоцелюлярна карцинома, імуногістохімічні маркери.

УДК 616.36-002:572.7

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДСТВИЙ ЛЕЧЕНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В, С И В+С

Гаврилюк А. А., Туманский В. А., Пентюк Н. А.

Резюме. За даними патоморфологічних досліджень біопсій на протязі 10 років течення ХВГ цирроз на початку хронічного вірусного гепатиту виникає у 25,67% хворих, рак печінки – у 12,3% від всіх хворих на цирроз вірусного генезу. За даними біопсійних досліджень мікронодулярний цирроз печінки діагностовано у 16,67% хворих, на ХВГ С, у 4,05% хворих на ХВГ В і 4,95% хворих на ХВГ В+С. При циррозі печінки на фоні збільшення дефіциту гепатоцитів максимальної вираженості досягають компенсаторно-приспосовні та проліферативні процеси, які на фоні глибоких порушень типової портально-долькової гемомікроциркуляції та молекулярної структури внеклеточного молекулярного матриксу і перисинусоїдальних просторів не приводять до відновлення типової архітектури печінкових долек. За результатами морфологічних досліджень при циррозі печінки розвивається гепатоцелюлярний рак ацинарно-солідної, трабекулярно-тубулярної структури.

Ключевые слова: хронічний вірусний гепатит В, С і В+С, цирроз печінки, HBV і HCV-асоційована гепатоцелюлярна карцинома, імуногістохімічні маркери.

UDC 616.36-002:572.7

Clinical And Morphological Characteristics Of The Consequences Of Treated Chronic Viral Hepatitis B, C And B+C

Gavryluk A. A., Tumanskiy V. A., Pentiuk N. A.

Summary. According to pathomorphological research of biopsies of the liver in patients with 10 years duration of HVH cirrhosis against chronic hepatitis occurs in 25,67% of patients, liver cancer – in 12,3% of all patients with cirrhosis of viral origin. According to biopsy studies mikronodular cirrhosis was diagnosed in 16,67% of patients with HVH C, 4,05% of patients in the HVH B and 4,95% of patients with HVH B + C. In liver cirrhosis, against decreasing amount of hepatocytes, reaching maximum expression compensatory adaptive and proliferative processes, which on the background of profound disturbances of typical portal-lobular hemomicrocirculation and molecular structure of extracellular matrix and perysinusoidal spaces do not lead to restoration of the typical architecture of liver lobules. According to the results of morphological studies in liver cirrhosis developed hepatocellular cancer with acinar-solid, trabecular, trabecular-tubular structure.

Key words: chronic viral hepatitis B, C and B + C, cirrhosis, HBV and HCV-associated hepatocellular carcinoma, immunohistochemical markers.

Стаття надійшла 4.08.2012 р.

Рецензент – проф. Гасюк А. П.