

С.П. Лукашик*¹, О.В. Аленикова², В.М. Цыркунов³,
Я.И. Исайкина², Р.И. Кравчук⁴

¹ — УО «Белорусский государственный медицинский университет», кафедра инфекционных болезней, Минск, Беларусь

² — ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Беларусь

³ — УО «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра инфекционных болезней, Минск, Беларусь

⁴ — УО «Гродненский государственный медицинский университет», научно-исследовательская лаборатория, Минск, Беларусь

МОНИТОРИНГ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ В ПЕЧЕНЬ ПРИ ВИРУСНОМ ЦИРРОЗЕ (клиническое наблюдение)

S.P. Lukashyk*¹, O.V. Aleinikova², V.M. Tsyркunov³,
Y.I. Isaikina², R.I. Kravchuk⁴

¹ — Belarusian stat medical university, Department of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

² — Belarusian research center for pediatric oncology, hematology and immunology, Minsk, Belarus

³ — Grodno stat medical university, Department of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

⁴ — Grodno stat medical university, Research Laboratory, Minsk, Belarus

MONITORING OF MORPHOLOGICAL EFFECTS AUTOLOGICAL MESENCHYMAL STEM CELLS, TRANSPLANTED IN LIVER WITH VIRUS CYRROSIS (clinical observation)

Резюме

Введение. Актуальность инфекции, вызванной вирусом гепатита С (ВГС), определяется широким распространением, прогрессирующим течением, формированием цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы. Остаются не до конца изученными механизмы воздействия вируса на печеночные клетки, процессы фиброгенеза и фибролиза, механизмы обратного развития ЦП. Отсутствует эффективная патогенетическая терапия. **Цель** — определить эффективность и безопасность внутрипеченочной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при хронической ВГС-инфекции на стадии цирроза печени. **Материалы и методы.** Пациентка с ВГС-ЦП, имеющая вторичный (вызванный ВГС) геморрагический васкулит, которой была произведена трансплантация аутологичных МСК в ткань печени. Исследование биоптата печени проведено методом световой и электронной микроскопии, иммуногистохимии. **Результаты.** Введение аутологичных МСК и посттрансплантационный период протекали без осложнений. После введения МСК сохранялись признаки сформированного микроnodулярного ЦП. На отдельных участках образцов септы выглядели истонченными, иногда — перфорированными, свидетельствуя о резорбции в этом месте фиброзной ткани. Наблюдалось снижение выраженности трансдифференцировки ЗКИ в миофибробласты, уменьшение количества фиброцитов и фибробластов, отсутствовали иммунные реакции в виде отложения аморфных и волокнистых масс умеренной электронной плотности вдоль синусоидных капилляров, которые были значительно выражены в первичной биопсии. Эти изменения сочетались с появлением гетерогенности гепатоцитов по плотности цитоплазматического матрикса, состоянию и количеству органелл и включений, структурным улучшением внутриклеточных органелл. **Выводы.** Трансплантация МСК из костного мозга уменьшает степень деструктивных изменений гепатоцитов, выраженность фиброза и способствует улучшению морфофункционального состояния печени, в связи с чем, может быть рекомендована в качестве важного компонента лечебных мероприятий.

Ключевые слова: цирроз печени, вирус гепатита С, поражение печени, мезенхимальные стволовые клетки

*Контакты/Contacts. E-mail: svetlanalukashik@mail.ru

Для цитирования: Лукашук С.П., Аленикова О.В., Цыркунов В.М., Исайкина Я.И., Кравчук Р.И. МОНИТОРИНГ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ В ПЕЧЕНЬ ПРИ ВИРУСНОМ ЦИРРОЗЕ (клиническое наблюдение). Архивъ внутренней медицины. 2018; 8(2): 150-160. DOI: 10.20514/2226-6704-2018-8-2-150-160

Abstract

Introduction. The importance of the HCV-infection is determined by the wide spread, progressive course, the formation of liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma. The mechanisms of the effect of the virus on hepatic cells, the processes of fibrogenesis and fibrolysis, mechanisms of the reverse development of the LC remain unexplored. There is no effective pathogenetic therapy. **The aim of the study** — determination of the effectiveness and safety of intrahepatic transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic HCV-infection at the stage of LC. **Methods.** A patient with HCV-LC who has a secondary hemorrhagic vacuities who underwent autologous MSC transplantation into the liver tissue. The liver biopsy specimens were studied in dynamics by light and electronic microscopy and by immunohistochemistry. **Results.** The transplantation and posttransplantation period proceeded without complications. After the introduction of MSC the features of the formed micronodular LC remained. In some parts of the samples, the septa looked thin, sometimes perforated, indicating a resorption in this place of fibrous tissue. There was a decrease in the degree of transdifferentiation of stellate cells into myofibroblasts, a decrease in the number of fibroblasts and fibroblasts, there were no immune reactions in the form of deposition of amorphous and fibrous masses of moderate electron density along the sinusoidal capillaries that were significantly expressed in the primary biopsy. These changes were combined with the appearance of hepatocyte heterogeneity in the density of the cytoplasmic matrix, the state and quantity of organelles and inclusions, and the structural improvement of intracellular organelles. **Conclusion.** Autologous transplantation of mesenchymal bone marrow stem cells reduces the degree of destructive changes in hepatocytes, the severity of fibrosis and contributes to the improvement of the morpho-functional state of the liver, and therefore, it can be recommended as an important component of medical interventions.

Key words: *Cirrhosis, hepatitis C virus, liver damage, mesenchymal bone marrow stem cells*

For citation: Lukashuk S.P., Aleinikova O.V., Tsykunov V.M., Isaikina Y.I., Kravchuk R.I. MONITORING OF MORPHOLOGICAL EFFECTS AUTOLOGICAL MESENCHYMAL STEM CELLS, TRANSPLANTED IN LIVER WITH VIRUS CYRROSIS (clinical observation). The Russian Archives of Internal Medicine. 2018; 8(2): 150-160. [In Russian]. DOI: 10.20514/2226-6704-2018-8-2-150-160

DOI: 10.20514/2226-6704-2018-8-2-150-160

ВГС — вирус гепатита С, ГТГП — гаммаглутамилтрансептидаза, ЗКИ — звездчатые клетки Ито, ИГР — иммуногистохимическая реакция, МСК — мезенхимальные стволовые клетки, Мх — митохондрий, ЦП — цирроз печени, ЩФ — щелочная фосфатаза

Введение

История изучения хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита С (ВГС), насчитывает более 25 лет с момента открытия возбудителя. За это время изучены строение и жизненный цикл вируса, естественное течение и эпидемиология заболевания, убедительно продемонстрировано экономическое бремя инфекции для общества, разработаны препараты для противовирусной терапии. В то же время, сохраняющаяся актуальность заболевания определяется многими составляющими: данными о широком распространении, прогрессирующем течении с формированием цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы, а также возможностью репликации вируса не только в гепатоцитах, но и в В-лимфоцитах [7, 11,17]. Остаются не до конца изученными механизмы воздействия вируса на печеночные клетки, регенерация гепатоцитов, процессы фиброгенеза и фибролиза, в том числе у пациентов с печеночной и внепеченочной репликацией вируса, мало изучены механизмы обратного развития уже сформировавшегося ЦП. Отсутствует эффективная патогенетическая терапия, способствующая реверсии уже сформировавшегося фиброза в ткани печени.

Цель исследования — определение эффективности и безопасности внутрипеченочной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при хронической ВГС-инфекции на стадии ЦП.

Материалы и методы

Приводим результат трансплантации аутологичных МСК в ткань печени пациентки Т. с ВГС-ЦП, имеющей вторичный (вызванный ВГС) геморрагический васкулит.

В 1998 году впервые в сыворотке крови пациентки Т. были выявлены антитела к ВГС (anti-HCV+). Находилась на диспансерном учете у инфекциониста по месту жительства с диагнозом хронический гепатит С (RNA HCV+), умеренной степени клинико-биохимической активности. Противовирусную терапию не получала. При динамическом наблюдении в крови выявлялись признаки активного хронического гепатита с увеличением уровня аминотрансфераз в 3-4 раза выше верхней границы нормы, признаки поражения почек (эритроцитурия до 40 в поле зрения), повышенная активность ревматоидного фактора. При обследовании у гематолога данных за гематологическую патологию не было выявлено. С 2007 года принимала преднизолон по 40 мг/сутки. При снижении дозы препарата отмечались периодические обострения васкулита. От лечения противовирусными препаратами отказывалась.

С 2005 года в виду наличия активности процесса и прогрессирующего течения заболевания с учетом возникших изменений в результатах исследований выставлен диагноз: ЦП вирусной ВГС-этиологии (anti-HCV+, РНК ВГС+, 1 генотип ВГС), класс тяже-

сти А по Чайлд-Пью. Внутрипеченочная форма портальной гипертензии. Спленомегалия. Тромбоцитопения. Варикозное расширение вен пищевода 1 ст. Васкулит с поражением кожных покровов и почек (мезангиокапиллярный гломерулонефрит морфологически не верифицированный). Сопутствующий диагноз: хронический панкреатит, ЖКБ, хронический калькулезный холецистит. В 2009 г. пациентке предложено включение в проводимое исследование по трансплантации аутологичных МСК из костного мозга. Дизайн исследования предусматривал первичную госпитализацию для комплексного обследования и забора МСК из костного мозга. Диагностические тесты и инструментальные методы включали проведение биохимического анализа крови с определением уровней общего билирубина, АсАТ, АлАТ, щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), креатинина, мочевины, альфа-фетопротеина; исследование общего анализа крови и мочи; протромбинового времени и МНО; УЗИ органов брюшной полости; проведение ПЦР крови на наличие RNA HCV; пункционная биопсия печени с комплексным морфологическим исследованием биоптата с целью установления возможной регрессии фиброза печени. Выше перечисленные исследования были использованы в дальнейшем для динамического наблюдения за статусом пациентки в посттрансплантационном периоде. Повторная госпитализация предусматривалась через 1 мес. для проведения трансплантации МСК в ткань печени, оценки безопасности и переносимости процедуры. Контрольная госпитализация через 6 мес. после проведения трансплантации имела цель контроля эффективности и оценки отдаленных последствий терапии.

В августе 2009 года пациентка госпитализирована в клинику РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Клиническое обследование подтвердило наличие инфекции, вызванной 1 генотипом ВГС, с умеренной биохимической активностью процесса на стадии сформированного ЦП. ПЦР крови выявило репликативную активность вируса с уровнем РНК $3,39 \times 10^5$ МЕ/мл. MELD 13 баллов. Отмечались признаки васкулита: сосудистая пурпура в области голеней, поражение почек (эритроцитурия), артралгии. Исследование крови на аутоиммунные заболевания: антитела к митохондриям (АМА-M2),

антинуклеарные антитела (ANA), антитела к микросомам печени и почек (LKM-1), — показало отрицательные результаты. ИФА крови исключил наличие ВИЧ-инфекции и HBV-инфекции.

Во время первичной госпитализации под местной анестезией в асептических условиях был произведен забор костного мозга из нескольких проколов подвздошной кости. Аутоотрансплантат МСК был получен из 35 мл костного мозга пациентки; выделено 242×10^6 МСК. В дальнейшем для получения достаточного количества МСК было проведено 3 пассажа, продолжительность культивирования клеток составила 42 дня. В результате экспансии клеток *in vitro* получено 113×10^6 МСК, что позволило получить аутоотрансплантат МСК в дозе в среднем $1,8 \times 10^6$ /кг веса пациентки. Получение такого количества клеточной массы после 3 пассажей свидетельствует о высокой пролиферативной активности клеток. Результаты иммунофенотипического анализа *in vitro* экспансированных МСК свидетельствовали, что CD90 антиген экспрессировали 98% клеток, CD105 антиген — 96% клеток и CD44 антиген — 98% клеток. В то же время, количество клеток, несущих на своей поверхности антигены CD45 и CD34, являющихся гемопоэтическими маркерами, составляло менее 1%, наличие клеток, экспрессирующих CD14 антиген не обнаружено. Это свидетельствовало о том, что полученный для инфузии биотрансплантат составляли МСК, и контаминация миелоидными клетками отсутствовала. Жизнеспособность клеток в аутоотрансплантате МСК составляла 99%. Для инфузии пациентке использовалась свежеприготовленная культура МСК, срок приготовления трансплантата МСК составлял 2 часа до введения. Методом ПЦР до начала трансплантации произведено тестирование клеток на наличие в них РНК HCV. Был получен отрицательный результат.

Морфологическая верификация диагноза проведена путем проведения пункционной биопсии с изучением биоптата печени одновременно с процедурой забора костного мозга. Для исключения ограничений возможной ошибки выборки в результате пункционной биопсии был получен образец ткани длиной 20 мм, содержащий 12 портальных трактов.

Первоначально биоптат оценивался с использованием световой микроскопии. В литературе уже существуют указания на особенности изменений ткани печени у пациентов с ЦП, вызванным ВГС, и внепеченочными проявлениями инфекции при использовании данного метода. В этом исследовании нами был применен комплексный морфологический подход, при котором дополнительно введены иммуногистохимический метод, позволивший оценить степень выраженности феномена «капилляризации» синусоидов (по экспрессии CD34) и состояние трансдифференцировки миофибробластов (по экспрессии альфа-гладкомышечного актина), а также

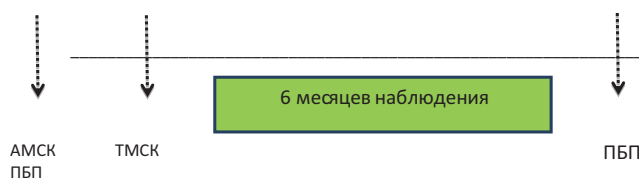


Рисунок 1. Дизайн исследования

Figure 1. Study design

Примечание/Note: АМСК — аспирация МС/aspiration of mesenchymal stem cells; ПБП — пункционная биопсия печени/puncture liver biopsy; ТМСК — трансплантация МСК/transplantation of mesenchymal stem cells

метод электронной микроскопии с оценкой непаренхиматозного и паренхиматозного компарментов печени.

В биоптатах были оценены следующие признаки: фиброзные септы, их толщина и расположение; наличие и размер регенераторных узлов; внутридольковые инфильтраты; характер и выраженность повреждения печеночных клеток. Это позволило установить глубину происходящих структурных перестроек, влияющих на клиническое течение заболевания у пациентки с системными проявлениями ВГС-инфекции. Выявленные морфологические изменения в последующем были использованы для уточнения динамики процесса через 6 месяцев после трансплантации аутологичных МСК.

Результаты морфологического исследования по данным световой микроскопии, полученные до проведения трансплантации МСК, показали, что в образцах печени пациентки наблюдались изменения,

характерные для ЦП на стадии 4В по Лаеннеку [2]. Отмечалось нарушение структуры печеночных долек и формирование регенеративных узлов. Мелкие узлы регенерации наблюдались в менее половины ткани исследованного биоптата. Вокруг узлов-регенераторов определялось разрастание фиброзной ткани в виде узких и широких септ. Обнаруженные изменения свидетельствовали о повышенном градиенте портального давления и соответствовали выявленным у пациентки клиническим признакам портальной гипертензии. Воспалительные инфильтраты были выражены неравномерно, представлены преимущественно лимфоцитами, на отдельных участках проникали вглубь дольки (рисунки 2а, 2в).

Проведенное иммуногистохимическое исследование позволило установить наличие в образцах умеренно выраженной «капилляризации» синусоидов, наряду с выраженной трансдифференцировкой звездчатых клеток Ито в миофибробласты (рисунки 3а и 3в).

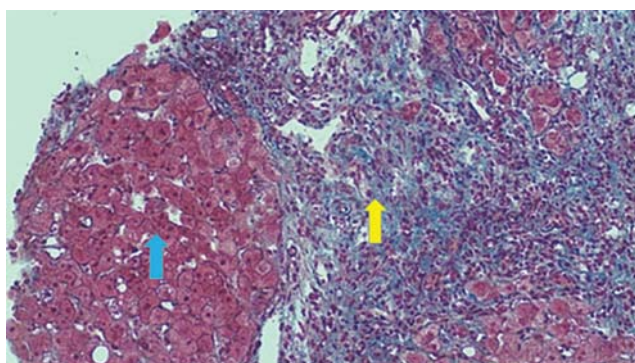


Рисунок 2а. Сформированный микронодулярный цирроз. Регенераторный узел с разрастанием фиброзной ткани (желтая стрелка), ложная долька (голубая стрелка). Окраска по Массону. – $\times 126$

Figure 2a. Formed micronodular cirrhosis. Regenerator node with proliferation of fibrous tissue (yellow arrow), false segment (blue arrow). Masson coloring. – $\times 126$

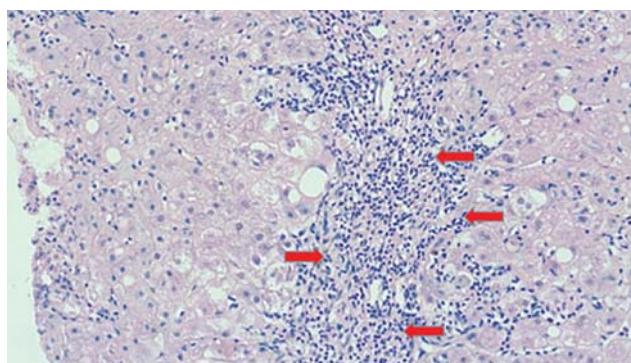


Рисунок 2в. Воспалительная лимфо-макрофагальная инфильтрация в фиброзных септах и перипортально (красные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином. – $\times 63$

Figure 2b. Inflammatory lympho-macrophage infiltration in fibrotic septa and periportal (red arrows). Stained with hematoxylin-eosin. – $\times 63$.

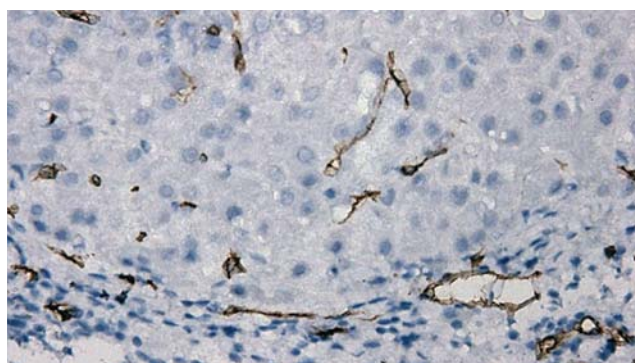


Рисунок 3а. ИГР (иммуногистохимическая реакция): CD34. $\times 400$. Умеренно выраженная капилляризация синусоидов

Figure 3a. IHR (immunohistochemical reaction): CD34. $\times 400$. Moderate capillarization of sinusoids

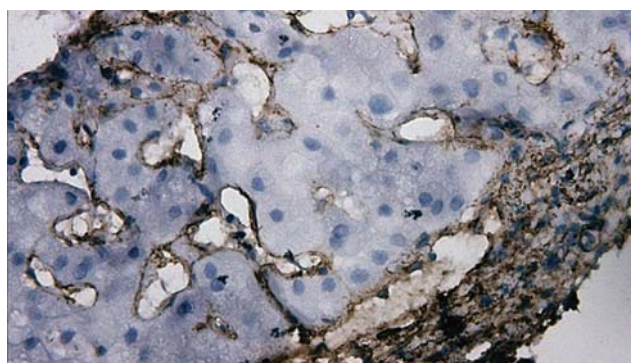


Рисунок 3в. ИГР (иммуногистохимическая реакция): α -SMA. $\times 400$. Выраженная трансдифференцировка звездчатых клеток Ито в миофибробласты

Figure 3b. IHR (immunohistochemical reaction): α -SMA. $\times 400$. The pronounced transdifferentiation of Ito star cells into myofibroblasts

Значительным дополнением к пониманию происходящего в печени патологического процесса явились данные, полученные при исследовании биоптата методом электронной микроскопии. Со стороны микроциркуляторного русла наблюдались выраженные деструктивные изменения, связанные с разрушением цитоплазматических мембран. Обнаруживались агрессивные лимфоциты. Выявлялись выраженные иммунные реакции с отложением материала повышенной электронной плотности по ходу синусоидных капилляров, что подтверждало и дополняло информацию иммуногистохимического исследования (рисунки 4а и 4в).

На всей площади среза биоптата наблюдалась альтерация гепатоцитов с последующей их гибелью путем некроза или апоптоза. Границы клеток, как правило, не определялись. Во многих из них в цитоплазме наблюдалось формирование волокнистых структур (рисунки 4с и 4д), вероятно представляющих собой фибриллы патологически измененного белка, располагающихся в цитоплазме гепатоцитов без ограничивающей их мембраны.

Значительные деструктивные изменения наблюдались со стороны митохондрий (Мх), что вероятно было связано с нарушением осмотического равновесия в их межмембранном пространстве. Встречались конденсированные митохондрии атипичной формы. Нередко состояние их усугублялось разрыхлением внешней и отслаиванием внутренней мембран с образованием пузырей и разрушением ультраструктуры митохондрий (рисунок 4ф). Наблюдалось расширение межклеточных пространств и фрагментация Мх с явлением микроклазматоза.

Ранее в литературе уже были описаны подобные структурные изменения органелл при некоторых патологических состояниях. Следствием таких перестроек, по мнению ряда авторов, является падение уровня дыхания и фосфорилирования, так как в конденсированных Мх количество эндогенного АТФ в несколько раз выше, чем в «обычных», а способность синтезировать АТФ на «экспорт» вдвое ниже [1]. В то же время в биоптате встречались набухшие Мх с просветленным матриксом (рисунок 4г), характеризующиеся низким уровнем энергетического обеспечения. В таких органеллах имел место лизис крист, гомогенизация матрикса, увеличение числа крупных митохондриальных гранул. Последнее связано с нарушением обмена двухвалентных катионов, в том числе Са.

Гладкая цитоплазматическая сеть характеризовалась достаточным развитием, профили которой, как правило, были значительно расширены. Местами в цитоплазме гепатоцитов выявлялись единичные вакуолизированные мембраны ГрЭС, достаточно часто — полиморфные резидуальные тельца, в неко-

торых гепатоцитах — желчесодержащие лизосомы, регистрировался локальный или тотальный цитолиз. В цитоплазме гепатоцитов, а также в просветах синусоидных капилляров, выявлялись многочисленные крупные прозрачные или заполненные мелкозернистой субстанцией вакуоли. В части гепатоцитов обнаруживались крупные липидные включения. Ядра в сохранившихся гепатоцитах характеризовались округлой формой, мелкогранулярным хроматином, содержали, как правило, компактное ядрышко, с преимущественно фибриллярным компонентом, что соответствовало их неактивному состоянию.

В октябре 2010 года пациентке была проведена трансплантация МСК в ткань печени. Оперативное вмешательство и послеоперационный период протекали без осложнений. Выписана из стационара на 8 день госпитализации. В последующем осуществлялось амбулаторное динамическое наблюдение.

Результаты наблюдения продемонстрировали клиническое улучшение уже на 1-м месяце после проведенной трансплантации МСК: исчезла общая слабость, проявления диспепсического синдрома, улучшился аппетит. На кожных покровах голеней отсутствовали свежие элементы сыпи, наблюдалось наличие коричневых пятен, появление которых было обусловлено отложением гемосидерина после исчезновения имевшейся ранее пурпуры.

Через 6 месяцев после трансплантации МСК пациентка повторно была госпитализирована для оценки результатов терапии. Жалоб при поступлении не предъявляла. На кожных покровах нижних конечностей — пигментация коричневого цвета. Иктеричность склер. Регионарные лимфатические узлы не увеличены. В легких дыхание везикулярное. ЧД 16 в 1 мин. Тоны сердца ритмичные, приглушены. ЧСС 80 в 1 мин. АД 130/80 мм рт. ст. Язык влажный, у корня обложен белым налетом. Живот не увеличен в размере, при пальпации — мягкий безболезненный. Печень на 1 см выступает из-под края реберной дуги. Пальпируется увеличенная селезенка. Стул регулярный, окрашен. Мочеиспускание свободное, безболезненное до 5 раз в сутки. Цвет мочи не изменен. В общем анализе крови отмечалась тенденция к увеличению уровня тромбоцитов (с 38 до 49 тыс Ед/мкл); остальные показатели общего анализа крови не измененные до начала трансплантации сохранялись на нормальных значениях весь период посттрансплантационного наблюдения. В биохимическом анализе крови отмечалась тенденция к снижению уровня билирубина (с 24 до 21,7 мкмоль/л), АлАТ (со 115 до 106 МЕ/мл), сывороточного железа (с 32 до 17,9 мкмоль/л), амилазы (со 156,3 до 88 МЕ/мл). Сохранялись повышенные значения ЩФ (276 ЕД/л до и 280 ЕД/л после трансплантации). Показатели альбумина, холестерина, мочевины, креатинина не изменились и соответствовали нормальным

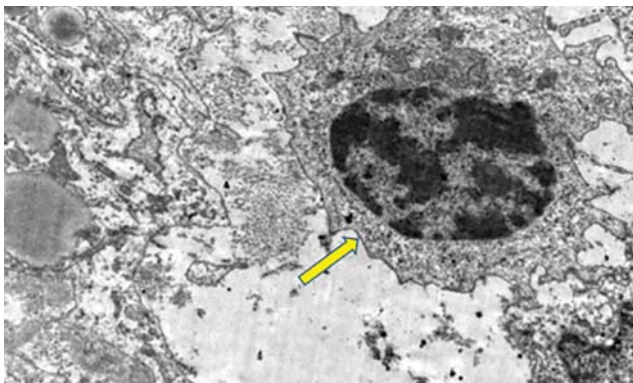


Рисунок 4а. Агрессивный лимфоцит в просвете синусоидного капилляра (стрелка). $\times 20\,000$
Figure 4a. Aggressive lymphocyte in the lumen of the sinusoidal capillary (arrow). $\times 20\,000$

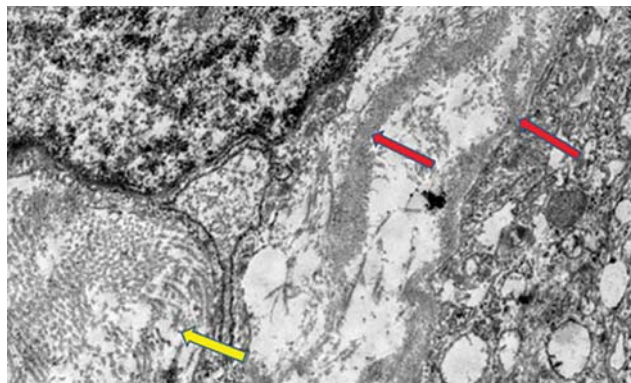


Рисунок 4в. Иммунная реакция (красная стрелка) и крупный пучок фибрилл коллагенового волокна в перикапиллярном пространстве (желтая стрелка). $\times 20\,000$
Figure 4в. Immune reaction (red arrow) and a large bundle of collagen fiber fibrils in the pericapillary space (yellow arrow). $\times 20\,000$

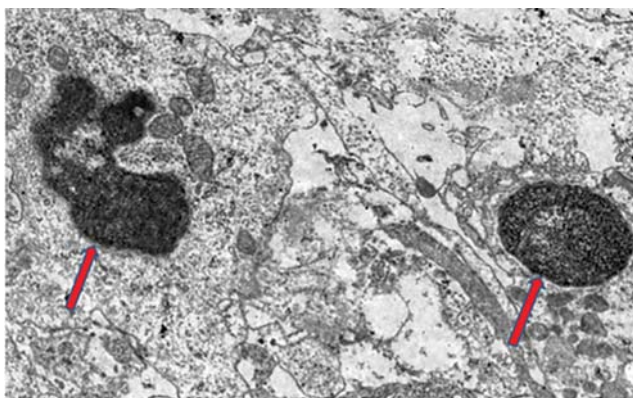


Рисунок 4с. Апоптотические ядра гепатоцитов (стрелки). $\times 15\,000$
Figure 4с. Apoptotic nuclei of hepatocytes (arrows). $\times 15\,000$

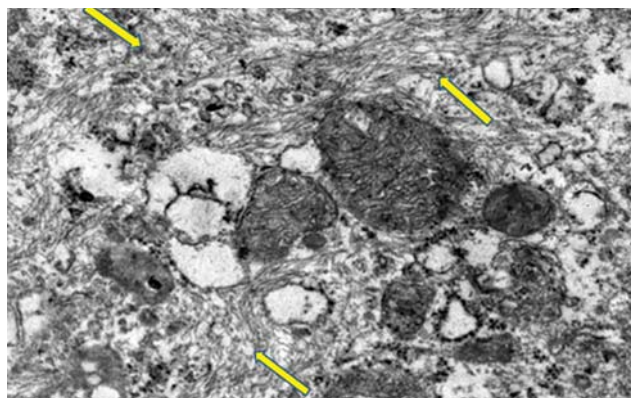


Рисунок 4д. Фибриллы патологически измененного белка, располагающиеся в цитоплазме гепатоцита без ограничивающей их мембраны (желтые стрелки). $\times 20\,000$
Figure 4д. Fibrils of pathologically altered protein located in the cytoplasm of the hepatocyte without the membrane bounding them (yellow arrows). $\times 20\,000$

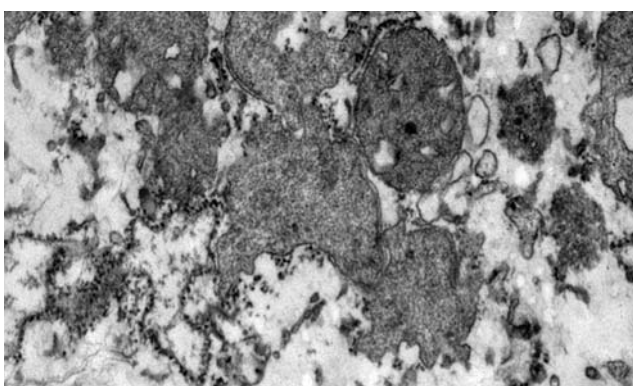


Рисунок 4ф. Деструктивно измененные конденсированные митохондрии с разрыхлением внешней и отслаиванием внутренней мембраны с образованием пузырей. $\times 20\,000$
Figure 4ф. Destructively altered condensed mitochondria with loosening of the outer membrane and exfoliation of the inner membrane with the formation of bubbles. $\times 20\,000$

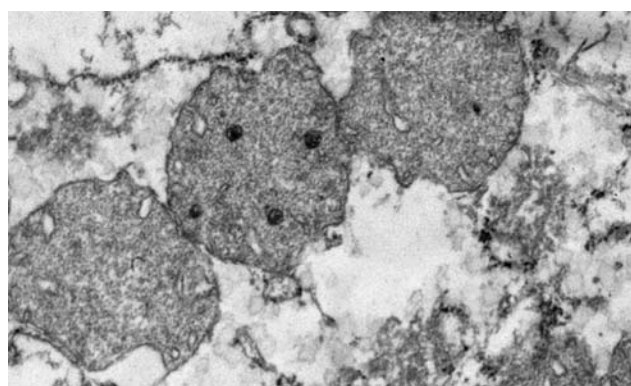


Рисунок 4г. Набухшие митохондрии с просветленным матриксом, соответствующие низкоэнергетическому состоянию. $\times 20\,000$
Figure 4г. Swollen mitochondria with an enlightened matrix corresponding to a low-energy state. $\times 20\,000$

значениям в течение всего периода наблюдения. Методом ПЦР в крови определялось РНК ВГС. В общем анализе мочи — единичные эритроциты.

При повторно выполненной пункционной биопсии печени и исследовании биоптата при световой микроскопии сохранялись признаки сформированного микронодулярного ЦП с наличием тонких и толстых септ. Однако на отдельных участках исследуе-

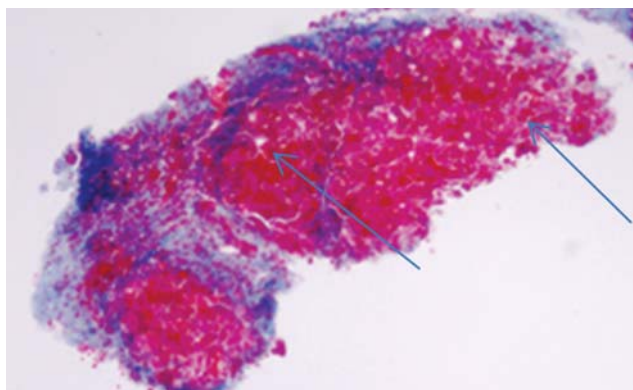


Рисунок 5а. Сформированный микронодулярный цирроз. Цирротический узел состоит из нескольких отдельных микроциркуляторных единиц, каждый из которых, возможно, относился к бывшему регенераторному узлу. Окраска по Массону. — $\times 32$. Длинные стрелки указывают на остатки тонких септ. Расширенные синусоиды с обеих сторон резорбированной перегородки представляют собой части эфферентной микроциркуляции

Figure 5a. Formed micronodular cirrhosis. The cirrhotic node consists of several separate microcirculatory units, each of which, possibly, belonged to the former regenerative node. Painting according to the Mason. — $\times 32$. Long arrows indicate the remnants of thin sept. The expanded sinusoids on both sides of the resorbed septum are parts of the efferent microcirculation

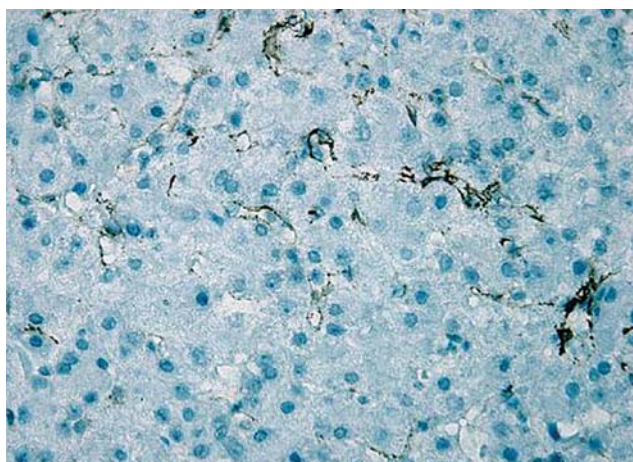


Рисунок 6а. ИГР (иммуногистохимическая реакция): α -SMA. $\times 400$. Умеренно выраженная трансдифференцировка звездчатых клеток Ито в миофибробласты

Figure 6a. IHR (immunohistochemical reaction): α -SMA. $\times 400$. Moderately expressed transdifferentiation of Ito star cells into myofibroblasts

мых образцов септы выглядели истонченными, иногда — перфорированными, свидетельствуя о резорбции в этом месте фиброзной ткани, а не о ее накоплении, что ранее уже было описано рядом авторов [23]. Косвенными доказательствами такого процесса могли служить определяемые в биоптате популяции гепатоцитов, которые соединялись в местах перфорации септ. При этом расширенные синусоиды на месте соединенных регенераторных узлов являлись, по-видимому, частями эфферентной микроциркуляции. Образовавшиеся при истончении или перфорации септ объединенные участки паренхимы могли содержать несколько микроциркуляторных единиц, каждая из которых представляла собой бывший цирротический узел.

Наблюдалась слабовыраженная воспалительная лимфо-макрофагальная инфильтрация в фиброзных септах и перипортально (рисунок 5а).

При иммуногистохимическом исследовании отмечено снижение выраженности трансдифференцировки звездчатых клеток Ито (ЗКИ) в миофибробласты при сохранении «капилляризации» синусоидов (рисунки 6а и 6в).

Динамика фиброзных изменений, происходящих в ткани печени, наблюдалась и при электронно-микроскопическом исследовании. В исследованных биоптатах фиброзная ткань визуализировалась перицеллюлярно, перикапиллярно, а также внутри клеток. Обнаруживались некротические участки внутри дольковой инфильтрации. Изредка встречались плазматические клетки, выявлялись фиброциты и фибробласты.

После проведенной трансплантации МСК было отмечено значительное улучшение со стороны микро-

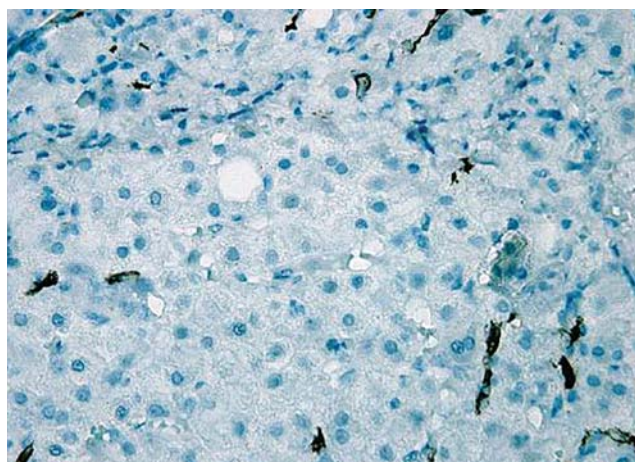


Рисунок 6в. ИГР (иммуногистохимическая реакция): CD34. $\times 400$. Умеренно выраженная капилляризация синусоидов

Figure 6b. IHR (immunohistochemical reaction): CD34. $\times 400$. Moderate capillarization of sinusoids

сосудистой системы, отсутствовали иммунные реакции в виде отложения аморфных и волокнистых масс умеренной электронной плотности вдоль синусоидных капилляров («капилляризация синусоидов»), которые были значительно выражены в первичной биопсии. Не обнаруживались крупные вакуоли, закупоривающие просвет синусоидов.

Такое улучшение сочеталось с наблюдаемой после трансплантации гетерогенностью гепатоцитов по плотности цитоплазматического матрикса, состоянию и количеству органелл и включений (рисунок 7а) и структурным улучшением внутриклеточных органелл. Так, в клетках печени в большей части дольки наблюдалась относительная нормализация ультраструктуры митохондрий. Во всех гепатоцитах регистрировалось их большое количество. В части клеток отмечалось наличие многочисленных митохондрий, имеющих не конденсированный, свидетельствующий о высокоэнергетизированном состоянии, матрикс (как это наблюдалось в первичной биопсии), а умеренно электронно-плотный, характерный для оптимально энергизованного статуса, с отчетливыми кристами, ориентированными преимущественно поперек длинной оси органелл (рисунок 7в). В матриксе органелл выявлялись крупные внутримитохондриальные гранулы, свидетельствующие об изменении обмена двухвалентных катионов, главным образом кальция. В то же время не наблюдалось расширения и тем более чрезмерного расширения интракристных промежутков с отслоением внутренней мембраны, как это было отмечено в первичной биопсии. Митохондрии локализовались в клет-

ках в основном диффузно. В части гепатоцитов наблюдалась концентрация митохондрий вокруг ядра. В гепатоцитах другой части дольки, преимущественно в тех, в которых выявлялись крупные липидные включения, в митохондриях регистрировался лизис крист и гомогенизация матрикса. Нередко в одном и том же гепатоците (рисунок 7с) находились митохондрии имеющие нормальную ультраструктуру (на рисунке слева от ядра) и деструктивно измененные органеллы, вплоть до лизиса крист и гомогенизации матрикса (на рисунке справа от ядра).

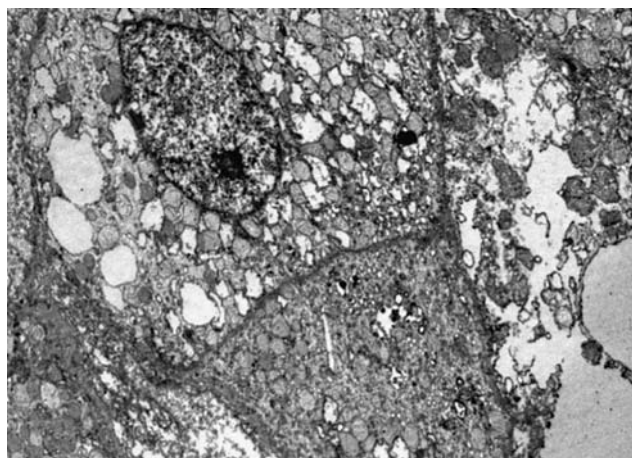


Рисунок 7а. Выраженная гетерогенность гепатоцитов по количеству и степени изменений органелл и плотности цитоплазматического матрикса. – $\times 5\,000$
Figure 7a. The expressed heterogeneity of hepatocytes in the number and degree of changes in the organelles and density of the cytoplasmic matrix. – $\times 5\,000$

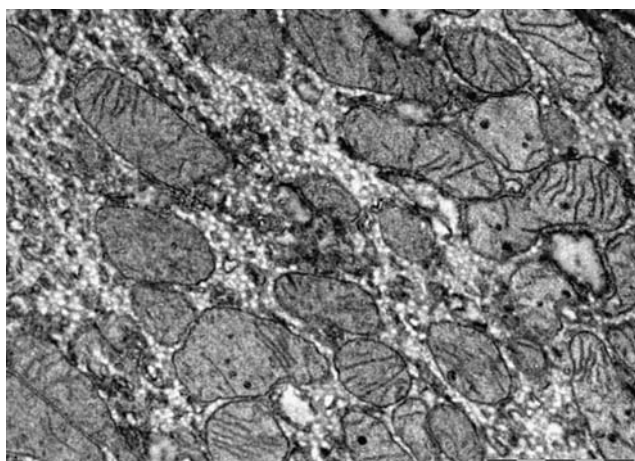


Рисунок 7в. Многочисленные митохондрии, отличающиеся полиморфизмом, матриксом умеренной электронной плотности, отчетливыми, кристами, ориентированными преимущественно поперек длинной оси органелл, крупными внутримитохондриальными гранулами. – $\times 30\,000$.
Figure 7в. Numerous mitochondria characterized by polymorphism, a matrix of moderate electron density, distinct, crystals oriented predominantly across the long axis of the organelles, large intramitochondrial granules. – $\times 30\,000$

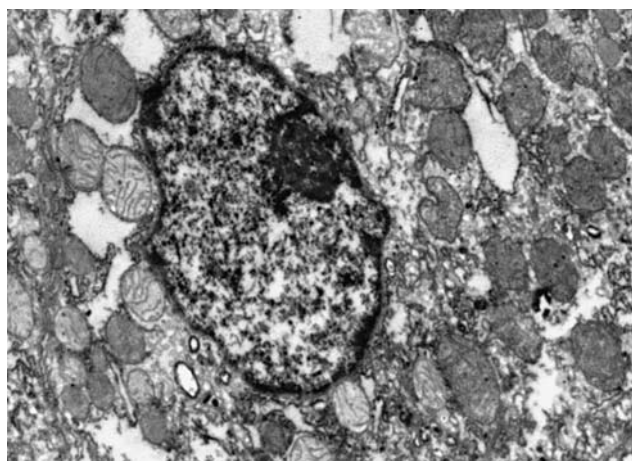


Рисунок 7с. Гетерогенность митохондрий в гепатоците. На рисунке слева от ядра – митохондрии с нормальной ультраструктурой, справа – лизис крист и гомогенизация матрикса митохондрий. – $\times 12\,000$
Figure 7с. Heterogeneity of mitochondria in the hepatocyte. In the figure to the left of the nucleus is the mitochondria with normal ultrastructure, to the right – the lysis of the crista and the homogenization of the mitochondrial matrix. – $\times 12\,000$

Таблица 1. Сравнительный морфометрический анализ митохондрий первичной и повторной биопсии пациентки Т.

Table 1. Comparative morphometric analysis of mitochondria of primary and repeated biopsy of patient T.

Период/ Period	Площадь митохондрий на 100 мкм ² / Area of mitochondria per 100 μm ²	Количество митохондрий на 100 мкм ² / Amount of mitochondria per 100 μm ²	Средняя площадь одной митохондрии мкм ² / The average area of one mitochondria μm ²
До трансплантации/ Before transplantation	15,446	60,298	0,256
После трансплантации/ After transplantation	20,229	75,514	0,268

Проведенный морфометрический анализ показал, что в повторной биопсии происходило увеличение общей площади митохондрий на 24%, что коррелировало с увеличением количества органелл на 20% на единице площади среза. При этом средняя площадь одной митохондрии первичной и повторной биопсии не изменяется (таблица 1).

Между митохондриями выявлялись единичные цистерны ГрЭС и многочисленные профили ГлЭС либо полигональной, либо округлой формы, что придавало цитоплазме микро- или макровакуолизированный вид.

Ультраструктурное состояние ядер свидетельствовало о неактивном состоянии.

В повторном биоптате ни в одном гепатоците не были выявлены волокнистые образования, обнаруживаемые в большом числе клеток первичной биопсии печени. Кроме того реже встречались резидуальные тельца. Отсутствовали гибнущие гепатоциты по типу замещения цитоплазмы волокнистыми структурами, как это имело место в первичной биопсии. Отсутствовали признаки окклюзии синусоидных капилляров крупными вакуолями, не обнаруживались крупные вакуоли в цитоплазме гепатоцитов по сравнению с первичной биопсией.

Таким образом, выявленные морфологические признаки свидетельствовали о положительных структурных сдвигах в печени в ответ на введение МСК.

Полученные нами данные согласуются с общепринятым мнением о том, что ранее сформировавшаяся в процессе перестройки в ЦП плотная фиброзная ткань не может претерпевать обратного развития. В то же время мы продемонстрировали, что процесс фиброгенеза не является статичным и при воздействии на ткань печени, в нашем случае МСК, экстрацеллюлярный матрикс способен рассасываться и нивелировать составляющую феномена «капилляризации» синусоидов с одновременным апоптозом, играющих ключевую роль в процессе фиброгенеза, миофибробластов.

В то же время нам удалось продемонстрировать положительное влияние МСК на паренхиматозный компартмент печеночной ткани. Наблюдались структурные перестройки в виде улучшения и даже нормализации ультраструктуры митохондрий, что изменяло статус клеток и приводило их к более оптимальному энергетическому и биосинтетическому состоянию. Под влиянием МСК отмечалось снижение регенераторных процессов гепатоцитов, на что указывало состояние ядерного аппарата и ГрЭС, и косвенно свидетельствовало о меньших масштабах повреждения гепатоцитов. В тоже время отсутствовали клетки, гибнущие по типу замещения их цитоплазмы волокнистыми структурами. Нивелировалась окклюзия синусоидных капилляров крупными вакуолями.

Обсуждение

Процесс образование фиброзной ткани в печени является стереотипным ответом на повреждение, сопровождающееся гибелью гепатоцитов. Возникающие при этом изменения характеризуются взаимодействием между собой многих типов резидентных и рекрутируемых в печень клеток (в том числе клеток костного мозга), что способствует появлению воспалительных сигнальных путей и, в конечном итоге, приводит к активизации покоящиеся в норме ЗКИ [6, 12, 14, 16, 21]. Последние превращаются в миофибробласты, продуцирующие примерно до 90% всех внеклеточных матриксных протеинов в печени [10, 12]. Описанные выше взаимодействия являются динамичными и могут способствовать как развитию, так и регрессии фиброзной ткани, контролируя активность ЗКИ и содержание экстрацеллюлярного матрикса в ткани печени. Клеточная гибель, воспаление и фиброз являются ключевыми признаками, происходящих событий, в связи с чем и были предложены в качестве основных при создании гистологических классификаций Scheuer и Knodell [2, 8, 18]. При остром повреждении печени описанный сценарий событий в последующем приводит к восстановлению архитектоники и функционального статуса печени: (1) фиброз обеспечивает механическую стабильность; (2) воспалительные

клетки способствуют удалению клеточного мусора; (3) воспалительные сигнальные пути играют важную роль в развитии регенерации печени [13, 19]. Однако в условиях постоянного и длительного воздействия повреждающего фактора, эти же реакции становятся дисадаптированными, продолжаясь гибель гепатоцитов — неконтролируемой и длительной, что приводит к хроническому воспалению, прогрессированию фиброза и формированию цирроза печени. Длительное время цирроз считался процессом необратимым. Однако несколько проведенных исследований с морфологическим контролем биоптатов продемонстрировали, что даже на стадии цирроза фиброз может со временем уменьшаться [3, 9, 15].

Мы описали пациентку с ЦП и активной репликацией ВГС в печеночном и внепеченочных сайтах, которой была произведена трансплантация МСК в ткань печени, и продемонстрировали частичное улучшение и регрессию патологического процесса на уровне паренхиматозного и непаренхиматозного компартментов. С целью анализа мы выбрали несколько параметров, которые изучили более подробно: синусоидальный фиброз, септальный фиброз и состояние гепатоцитов. При морфологическом исследовании ткани печени методом световой микроскопии было отмечено, что через 6 мес после трансплантации МСК фиброзные септы, разделяющие узлы регенерации, становились более тонкими и фрагментированными, в пределах рядом расположенных узлов, разделенных перфорированными перегородками, можно было распознать независимо сформированные и топографически объединенные системы микроциркуляции. Как известно, регенераторные узлы при циррозе имеют отдельную систему микроциркуляции и наблюдаемые нами изменения могут косвенно указывать на то, что перфорация перегородок возникала уже после формирования микроциркуляции. Частичную резорбцию фиброзной ткани мы также наблюдали при изучении образцов печени методом электронной микроскопии: отсутствовали иммунные реакции в виде отложения аморфных и волокнистых масс умеренной электронной плотности вдоль синусоидных капилляров («капилляризация синусоидов»), которые были значительно выражены в первичной биопсии.

В этой связи можно предположить, что при ЦП при сохранении хронического воспалительного процесса в печени фибролиз более активно происходит в тех участках печени, где гепатоциты еще не повреждены или повреждены незначительно. Если печеночные клетки погибают, синусоидальный экстрацеллюлярный матрикс, по-видимому, может объединяться с тонкими септами, и в последующем рассасываться [20]. В то же время, сформировавшиеся при циррозе плотные коллагеновые септы, претер-

певшие значительную архитектурную перестройку, не поддаются полной резорбции и сохраняются, что мы и наблюдали в описываемом случае After transplantation.

С другой стороны, цирротические узлы в динамике фибролиза, по-видимому, могут увеличиваться за счет слияния в момент лизиса тонких септ (рисунок 5а) и выглядеть в последующем как крупные узлы регенерации, окруженные широкими перегородками и областями гибели печеночной паренхимы. Эта гипотеза требует подтверждения.

Еще одним существенным препятствием для полной реверсии цирроза является наличие больших очагов разрушившейся паренхимы [20]. В биоптатах печени при иммуногистохимическом исследовании мы наблюдали сохранившиеся очаги гибели гепатоцитов, которые визуализировались, как четко ограниченные области с синусоидами, выложенными CD34-позитивными эндотелиальными клетками (рисунок 6в). Такие области часто содержали отдельно идущие артерии и расширенные синусоиды, свидетельствующие, по-видимому, о наличии артериовенозных шунтов. Синусоиды, выстланные CD34-положительными эндотелиальными клетками, могут быть эквивалентны «капилляризации», как описано Шаффером, Поппером и другими [18, 22] и сохраняться при уменьшении активности миофибробластов (рисунок 6а).

В то же время, рядом авторов была описана репопуляризация очагов повреждения за счет активации так называемого репаративного комплекса, состоящего из пролиферирующих дуктул, гепатоцитов, окруженных коллагеном и CD34-позитивных синусоидов [20]. При наличии небольших очагов повреждения происходит регенерация гепатоцитов с отсутствием экстрацеллюлярного матрикса в прилегающих синусоидах, что в нашем исследовании подтверждается ультраструктурными изменениями в гепатоцитах после трансплантации МСК.

Полученные нами данные согласуются с общепринятым мнением о том, что при циррозе ранее сформировавшаяся плотная фиброзная ткань не может претерпевать обратного развития. В то же время мы продемонстрировали, что процесс фиброгенеза не является статичным и при воздействии на ткань печени, в нашем случае МСК, экстрацеллюлярный матрикс способен рассасываться и нивелировать составляющую феномена «капилляризации» синусоидов с одновременным апоптозом, играющих ключевую роль в процессе фиброгенеза, миофибробластов.

В то же время нам удалось продемонстрировать положительное влияние МСК на состояние гепатоцитов. Наблюдались структурные перестройки в виде

улучшения и даже нормализации ультраструктуры митохондрий, что изменяло статус клеток и приводило их к более оптимальному энергизированному состоянию. Под влиянием МСК отмечалось снижение репаративных процессов гепатоцитов, на что указывало состояние ядерного аппарата и ГрЭС, и косвенно свидетельствовало о меньших масштабах повреждения гепатоцитов. В тоже время отсутствовали клетки, гибнущие по типу замещения их цитоплазмы волокнистыми структурами. Нивелировалась окклюзия синусоидных капилляров крупными вакуолями.

Выводы

1. Морфологическая характеристика ЦП, связанного с ВГС, а также динамика процессов фиброгенеза и фибролиза, не зависят от преимущественного сайта репликации вируса.

2. Трансплантация МСК из костного мозга является перспективным методом компенсации хронической гепато-целлюлярной недостаточности, способствующим регрессии фиброзной ткани в печени. Эффективность ее воздействия зависит от исходной тяжести течения заболевания и резервного потенциала печени реципиента.

3. Трансплантация МСК уменьшает степень деструктивных изменений гепатоцитов, снижает выраженность цирротического процесса и способствует улучшению морфо-функционального состояния печени, в связи с чем, может быть рекомендована в качестве важного компонента лечебных мероприятий.

Конфликт интересов/Conflict of interests

Авторы заявляют, что данная работа, её тема, предмет и содержание не затрагивают конкурирующих интересов/The authors state that this work, its theme, subject and content do not affect competing interests

Список литературы/ References:

- Mityushin V.M., Kozyreva E.V. Некоторые типы ультраструктуры митохондрий клеток животных и их связь с энергопродукцией. Цитология. 1978; 4: 371-379.
Mityushin V.M., Kozyreva E.V. Some types of ultrastructure of mitochondria of animal cells and their relationship to energy production. Cytology. 1978; 4: 371-379 [in Russian].
- Almpanisa Z., Demonakoua M., Tiniakos D. Evaluation of liver fibrosis: «Something old, something new...» 2016; 29: 1-9.
- Biswas S, Sharma S Hepatic Fibrosis and its Regression: The Pursuit of Treatment. J Liver Res Disord Ther. 2016; 2(1): 1-4.
- Deleve L.D., Wang X., Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. Hepatology. 2008; 48: 920-930.
- Ding B.S., Cao Z., Lis R. et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. Nature. 2014; 505: 97-102.
- Garcia-Tsao G., Friedman S., Iredale J. et al. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology. 2010; 51: 445-9.
- Jacobson I.M., Cacoub P., Dal Maso L. et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2010; 12: 1017-1029.
- Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology. 1981; 1: 431-435.
- Luetkemeyer A.F., Wyles D.L. CROI 2016: Viral Hepatitis and Liver Fibrosis. 2016; 24(1): 47-58.
- Luedde T., Kaplowitz N., Schwabe R.F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. Gastroenterology. 2014; 4: 765 — 783.
- Matignon M., Cacoub P., Colombat M. et al. Clinical and morphologic spectrum of renal involvement in patients with mixed cryoglobulinaemia without evidence of hepatitis C virus infection. Medicine (Baltimore). 2009; 6: 341-348.
- Mederacke I., Hsu C.C., Troeger J.S. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. Nat Commun. 2013; 4: 2823.
- Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration. Science. 1997; 276: 60-66.
- Pradere J.P., Kluwe J., De Minicis S. et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. Hepatology. 2013; 58: 1461-1473.
- Pradhan A.M., Bhawe S.A., Joshi V.V. et al. Reversal of Indian childhood cirrhosis by D-penicillamine therapy. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1995; 20: 28-35.
- Radaeva S., Sun R., Jaruga B. et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. Gastroenterology. 2006; 130: 435-452.
- Ramos-Casals M., Stone J.H., Cid M.C., Bosch X. The cryoglobulinaemias. Lancet. 2012; 9813: 348-360.
- Schaffner F., Popper H. Capillarization of the hepatic sinusoids in man. Gastroenterology. 1963; 4: 239-242.
- Scheuer P.J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. J Hepatol. 1991; 13: 372-374.
- Stueck A.E., Wanless I.R. Hepatocyte Buds Derived From Progenitor Cells Repopulate Regions of Parenchymal Extinction in Human Cirrhosis. Hepatology. 2015;5: 1696-1707.
- Syal G., Fausther M., Dranoff J.A. Advances in cholangiocyte immunobiology. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012; 303: G1077-G1086.
- Taguchi K, Asano G. Neovascularization of pericellular fibrosis in alcoholic liver disease. Acta Pathol Jpn. 1988; 38: 615-626.
- Wanless I.R., Nakashima E., Sherman M. Regression of Human Cirrhosis Morphologic Features and the Genesis of Incomplete Septal Cirrhosis. Arch Pathol Lab Med. 2000; 124: 1599 — 1607.

А

Статья получена/Article received 15.11.2017 г.
Принята к публикации/ Adopted for publication
09.01.2018 г.