

УДК 616.36–044–122.6–089.843–018.46

ЭФФЕКТЫ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК, ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ В ПЕЧЕНЬ ПРИ ВИРУСНОМ ЦИРРОЗЕ*

* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.

Лукашик С. П.¹, Аленикова О. В.², Цыркунов В. М.³, Романова О. Н.², Исайкина Я. И.², Кравчук Р. И.⁴

¹ УО «Белорусский государственный медицинский университет», кафедра инфекционных болезней (г. Минск, Беларусь)

² ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (г. Минск, Беларусь)

³ УО «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра инфекционных болезней (г. Минск, Беларусь)

⁴ УО «Гродненский государственный медицинский университет», научно-исследовательская лаборатория (г. Минск, Беларусь)

EFFECTS OF AUTOLOGICAL MESENCHYMAL STEM CELLS, TRANSPLANTED IN LIVER WITH VIRUS CYRROSIS*

* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal.

Lukashyk S. P.¹, Aleinikova O. V.², Tsykunov V. M.³, Romanova O. N.², Isaikina Y. I.², Kravchuk R. I.⁴

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)

Для цитирования: Лукашик С. П., Аленикова О. В., Цыркунов В. М., Романова О. Н., Исайкина Я. И., Кравчук Р. И. Эффекты аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, трансплантированных в печень при вирусном циррозе. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2018;150(2): 61–67.

For citation: Lukashyk S. P., Aleinikova O. V., Tsykunov V. M., Romanova O. N., Isaikina Y. I., Kravchuk R. I. Effects of autological mesenchymal stem cells, transplanted in liver with virus cyrrosis. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;150(2): 61–67.

Лукашик С. П. — к.м.н., доцент, Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», доцент кафедры инфекционных болезней.

Алейникова О. В. — д.м.н., проф., чл.-кор. НАН РБ, Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь, директор.

Цыркунов В. М. — д.м.н., проф., Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра инфекционных болезней, г. Минск, Беларусь, профессор кафедры инфекционных болезней.

Романова О. Н. — д.м.н., проф., Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», заведующая кафедрой детских инфекций.

Исайкина Я. И. — к.м.н., Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь, заведующая лабораторией

Кравчук Р. И. — к.б.н., Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь, старший научный сотрудник ЦНИЛ.

Lukashyk S. P. — Ph.D., Associate Professor, Belarusian State Medical University, Department of Infectious Diseases

Aleinikova O. V. — M.D., professor, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, State Institution "Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", director

Tsykunov V. M. — M.D., professor, Grodno State Medical University, Department of Infectious Diseases

Romanova O. N. — M.D., professor, Belarusian State Medical University, Head of Department of Infectious Diseases

Isaikina Y. I. — Ph.D., State Institution "Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", Head of Department

Kravchuk R. I. — Ph.D., Grodno State Medical University, Senior Researcher

Лукашик

Светлана Петровна

Lukashyk Svetlana P.

svetlanalukashik@mail.ru

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 и регенерации гепатоцитов, процессы фиброгенеза и фибролиза, механизмы обратного развития ЦП. Отсутствует эффективная патогенетическая терапия, способствующая регрессу сформировавшегося фиброза в ткани печени.

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, методом иммуногистохимии.

Результаты. Процедура введения аутологичных МСК и посттрансплантационный период протекали без осложнений. После введения МСК по данным морфологического исследования сохранялись признаки сформированного микронодулярного 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 морфо-функционального 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.

Summary

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 and regeneration of hepatocytes, the processes of fibrogenesis and fibrolysis, mechanisms of the reverse development of the LC remain unexplored. There is no effective pathogenetic therapy, which contributes to the regress of the formed fibrosis in the liver tissue.

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 procedure of transplantation and posttransplantation period proceeded without complications. After the introduction of MSC from the data of the morphological study, 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.

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, продемонстрировано экономическое бремя инфекции для общества, разработаны препараты для противовирусной терапии (ПВТ). Актуальность инфекции определяется широким распространением, прогрессирующим течением, формированием цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы, а также возможностью репликации вируса не

только в гепатоцитах, но и в В-лимфоцитах [1,2,3]. В то же время остаются не до конца изученными механизмы воздействия вируса на печеночные клетки, регенерации гепатоцитов, процессы фиброгенеза и фибролиза, мало изучены механизмы обратного развития ЦП. Отсутствует эффективная патогенетическая терапия, способствующая регрессу сформировавшегося фиброза в ткани печени.

Цель исследования – определить эффективность и безопасность внутрипеченочной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при хронической ВГС-инфекции на стадии цирроза печени.

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 были выявлены антитела к ВГС (anti-VГС). Находилась на диспансерном учете у инфекциониста с диагнозом хронический гепатит С (ХГС), РНК ВГС+, умеренной степени клиничко-биохимической активности. При динамическом наблюдении выявлялись признаки активного ХГ с увеличением уровня аминотрансфераз в 3–4 раза выше верхней границы нормы (ВГН), повышенная активность ревматоидного фактора (РФ). В 2005 году выставлен диагноз: ЦП вирусной ВГС-этиологии (anti-VГС+, РНК ВГС+, 1 генотип ВГС), класс тяжести А по Чайлд-Пью. Внутривенная форма портальной гипертензии (ПГ). Спленомегалия. Тромбоцитопения. Варикозное расширение вен пищевода 1 ст. Васкулит с поражением кожных покровов и почек (мезангиокапиллярный гломерулонефрит морфологически не верифицированный). Назначен преднизолон в дозе 40 мг/сут. От лечения противовирусными препаратами отказывалась.

В 2009 году пациентка была включена 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 включали исследование общего анализа крови и мочи; проведение биохимического анализа крови с определением уровней общего билирубина, аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), креатинина, мочевины, альфа-фетопротеина, протромбинового времени и МНО; УЗИ органов брюшной полости; проведение ПЦР крови на наличие РНК ВГС; пункционную биопсию печени (ПБП) с комплексным морфологическим изучением биоптата. Выше перечисленные исследования были использованы в дальнейшем для динамического наблюдения за статусом пациентки в посттрансплантационном периоде. Повторная госпитализация предусматривалась через 1 месяц для трансплантации МСК в ткань печени, оценки безопасности и переносимости процедуры. Контрольное обследование через 6 месяцев после трансплантации имело цель определения эффективности и отдаленных последствий терапии.

Во время первой госпитализации после детального обследования диагноз пациентки был полностью подтвержден. Произведен забор костного мозга. В дальнейшем получен аутоотрансплантат МСК в дозе $1,8 \times 10^6$ /кг веса. Тестирование аутоотрансплантата методом ПЦР РНК ВГС не обнаружило. Для морфологического изучения структуры печени проведена пункционная биопсия: получен образец ткани длиной 20 мм, содержащий 12 портальных трактов. В этом исследовании нами был применен

комплексный морфологический подход, при котором использовался метод световой микроскопии, иммуногистохимический (ИГХ) метод (для оценки степени выраженности феномена «капилляризации» синусоидов (по экспрессии CD34) и состояние трансдифференцировки миофибробластов (по экспрессии альфа-гладкомышечного актина), а также метод электронной микроскопии (ЭМ).

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 [4]. Обнаруженные признаки свидетельствовали о повышенном градиенте ПГ и соответствовали выявленным у пациентки клиническим проявлениям. Воспалительные инфильтраты были выражены неравномерно, представлены преимущественно лимфоцитами, на отдельных участках проникали вглубь дольки (рисунок 1).

Проведенное ИГХ-исследование позволило установить наличие в образцах умеренно выраженной «капилляризации» синусоидов, наряду с выраженной трансдифференцировкой звездчатых клеток Ито (ЗКИ) в миофибробласты (рисунки 2 и 3).

Значительным дополнением к пониманию происходящего в печени патологического процесса явились данные, полученные при исследовании биоптата методом ЭМ. Со стороны микроциркуляторного русла наблюдались выраженные деструктивные изменения, связанные с разрушением цитоплазматических мембран. Обнаруживались лимфоциты, а также выраженные иммунные реакции с отложением материала повышенной электронной плотности по ходу синусоидных капилляров, что подтверждало и дополняло информацию ИГХ исследования (рисунки 4 и 5).

На всей площади среза биоптата выявлялась альтерация гепатоцитов с последующей их гибелью путем некроза или апоптоза (рисунок 6). Границы клеток, как правило, не определялись. Во многих из них в цитоплазме наблюдалось формирование волокнистых структур, вероятно представляющих собой фибриллы патологически измененного белка, располагающихся в цитоплазме гепатоцитов без ограничивающей их мембраны.

Значительные деструктивные изменения происходили в митохондриях (Мх), что вероятно было связано с нарушением осмотического равновесия в их межмембранном пространстве. Встречались конденсированные Мх атипичной формы. Нередко состояние их усугублялось разрыхлением внешней и отслаиванием внутренней мембран с образованием пузырей и разрушением ультраструктуры (рисунок 7). 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

* иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал

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 [4]. В то же время встречались набухшие Мх с просветленным матриксом (рисунок 8), характеризующиеся низким уровнем энергетического обеспечения. В них имел место лизис крист, гомогенизация матрикса, увеличение числа крупных митохондриальных гранул. Последнее связано с нарушением обмена двухвалентных катионов, в том числе кальция.

Гладкая эндоплазматическая сеть (ГлЭС) была достаточно развита, профили ее – значительно расширены. Местами в цитоплазме гепатоцитов выявлялись единичные вакуолизированные мембраны гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС), часто – полиморфные резидуальные тельца, в некоторых гепатоцитах – желчесодержащие лизосомы, регистрировался локальный или тотальный цитолиз. В цитоплазме гепатоцитов и просветах синусоидных капилляров выявлялись многочисленные крупные прозрачные вакуоли или мелкозернистая субстанция. В части клеток 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 наблюдение. Результаты обследования продемонстрировали клиническое улучшение уже на 1-м месяце после проведенной трансплантации МСК: исчезла общая слабость, проявления диспепсического синдрома, улучшился аппетит. На коже голеней свежие элементы сыпи отсутствовали, наблюдалось наличие коричневых пятен, появление которых было обусловлено отложением гемосидерина после исчезновения имевшейся ранее пурпуры.

При госпитализации на 6-м месяце после трансплантации МСК состояние пациентки сохранялось удовлетворительным, жалоб не предъявляла. В биохимическом анализе крови наблюдалась тенденция к снижению уровня 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). Остальные показатели крови соответствовали нормальным значениям в течение всего периода наблюдения. В крови продолжала определяться РНК ВГС.

При повторном исследовании биоптата печени методом световой микроскопии сохранялись признаки сформированного микронодулярного ЦП с наличием тонких и толстых септ. Однако на отдельных участках образцов септы выглядели истонченными, иногда – перфорированными, свидетельствуя о резорбции в этом месте фиброзной ткани, что ранее уже было описано рядом авторов [6]. 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 слабо выраженная воспалительная лимфомакрофагальная инфильтрация в фиброзных септах и перипортально (рисунок 9).

При ИГХ отмечено снижение выраженности трансдифференцировки ЗКИ в миофибробласты и сохранение «капиляризации» синусоидов (рисунки 10 и 11).

Динамика фиброзных изменений, происходящих печени, наблюдалась и при ЭМ. Фиброзная ткань визуализировалась перичеллюлярно, перикапиллярно, внутри клеток. Обнаруживались не крупные участки внутريدольковой инфильтрации. Изредка встречались плазматические клетки, фиброциты и фибробласты. Отмечено значительное улучшение со стороны микрососудистой системы, отсутствовали иммунные реакции в виде отложения аморфных и волокнистых масс умеренной электронной плотности вдоль синусоидных капилляров, которые были значительно выражены в первичной биопсии, а также вакуоли, закупоривающие просвет синусоидов. Такое улучшение сочеталось с наблюдаемой после трансплантации гетерогенностью гепатоцитов по плотности цитоплазматического матрикса, состоянию и количеству органелл и включений (рисунок 12) и структурным улучшением внутриклеточных органелл. Так, в клетках печени в большей части дольки наблюдалась относительная нормализация ультраструктуры митохондрий. Во всех гепатоцитах регистрировалось их большее 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 13). В матриксе Мх выявлялись крупные внутримитохондриальные гранулы, свидетельствующие об изменении обмена двухвалентных катионов. 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 клетках в основном диффузно, в части гепатоцитов – вокруг ядра. В гепатоцитах другой части дольки, в которых выявлялись крупные липидные включения, в митохондриях регистрировался лизис крист и гомогенизация матрикса. Нередко в одном и том же гепатоците (рисунок 14) находились митохондрии имеющие нормальную ультраструктуру (на рисунке слева от ядра) и деструктивно измененные органеллы (на рисунке справа от ядра).

Проведенный морфометрический анализ показал, что в повторной биопсии происходило увеличение общей площади митохондрий на 24%, что коррелировало с увеличением количества органелл на 20% на единицу площади среза. При этом средняя площадь одной митохондрии первичной и повторной биопсии не изменялась. Между митохондриями выявлялись единичные цистерны ГрЭС и многочисленные профили ГлЭС либо полигональной, либо округлой формы, что придавало цитоплазме

микро- или макровакуолизированный вид. Ультраструктурные признаки ядер свидетельствовали об их неактивном состоянии. В повторном биоптате ни в одном гепатоците не были выявлены волокнистые образования, обнаруживаемые в большом числе клеток первичной биопсии печени. Реже встречались резидуальные тельца.

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

Обсуждение

Процесс образование фиброзной ткани в печени является стереотипным ответом на повреждение, сопровождающееся гибелью гепатоцитов. Возникающие в печени изменения характеризуются взаимодействием между собой многих типов клеток, что способствует появлению воспалительных сигнальных путей и приводит к активизации покоящиеся в норме ЗКИ [7,8,9,10,11]. Последние превращаются в миофибробласты, продуцирующие примерно до 90% всех внеклеточных матриксных протеинов в печени [8,12]. Описанные взаимодействия являются динамичными и могут способствовать как развитию, так и регрессии фиброзной ткани, контролируя активность ЗКИ и содержание экстрацеллюлярного матрикса в ткани печени, в связи с чем и были предложены в качестве основных при создании гистологических классификаций Scheuer и Knodell [4,13,14,15].

Длительное время ЦП считался процессом необратимым. Однако проведенные рядом авторов исследования продемонстрировали, что при успешном лечении даже на стадии цирроза фиброз может со временем регрессировать [16,17,18]. Мы описали пациентку с ЦП и активной репликацией ВГС в печеночном и внепеченочных сайтах, которой была произведена трансплантация МСК в ткань печени. При исследовании печени при световой микроскопии отмечено, что через 6 месяцев 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 наблюдали также при изучении образцов печени при ЭМ. Можно предположить, что при ЦП 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 [19]. В то же время, сформировавшиеся при циррозе плотные коллагеновые септы, претерпевшие значительную архитектурную перестройку, не поддаются полной

резорбции и сохраняются, что мы и наблюдали в описываемом случае. Кроме того, возможно, что цирротические узлы в динамике фибролиза могут увеличиваться за счет слияния в момент лизиса тонких септ (рисунок 9) и выглядеть в последующем как крупные узлы регенерации, окруженные широкими перегородками и областями гибели печеночной паренхимы.

Существенным препятствием для обратного развития ЦП является наличие больших очагов разрушившейся паренхимы [19]. В биоптатах печени при ИГХ исследовании мы наблюдали сохранившиеся очаги гибели гепатоцитов, которые визуализировались, как четко ограниченные области с синусоидами, выложенными CD34-позитивными эндотелиальными клетками (рисунок 10). 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» и сохраняться при уменьшении активности миофибробластов [14,20,21] (рисунок 11). В то же время, рядом авторов была описана репопуляризация очагов повреждения за счет активации так называемого репаративного комплекса, состоящего из пролиферирующих дуктулов, гепатоцитов, окруженных коллагеном, и CD34-позитивных синусоидов [19]. При наличии небольших очагов повреждения происходит регенерация гепатоцитов с резорбцией экстрацеллюлярного матрикса в прилегающих синусоидах, что в нашем исследовании подтверждается ультраструктурными признаками после трансплантации МСК.

Таким образом, мы продемонстрировали, что процесс фиброгенеза не является статичным и при лечении, в нашем случае трансплантация МСК, экстрацеллюлярный матрикс способен частично резорбироваться с одновременным апоптозом, играющих ключевую роль в процессе фиброгенеза, миофибробластов. Нам удалось показать положительное влияние МСК на состояние гепатоцитов. Наблюдались структурные перестройки в виде улучшения и даже нормализации ультраструктуры Мх, что изменяло статус клеток и приводило их к более оптимальному энергетизированному состоянию. Отмечались изменения состояния ядерного аппарата и ГрЭС, что косвенно свидетельствовало о меньших масштабах повреждения гепатоцитов. В тоже время отсутствовали клетки, гибнущие по типу замещения их цитоплазмы волокнистыми структурами.

Выводы

1. Морфологическая характеристика ВГС-ЦП, динамика процессов фиброгенеза и фибролиза, не зависят от сайта репликации вируса.
2. Трансплантация МСК из костного мозга уменьшает степень деструктивных изменений

гепатоцитов, выраженность фиброза и способствует улучшению морфо-функционального состояния печени, в связи с чем, может быть рекомендована в качестве важного компонента лечебных мероприятий.

Литература

1. Jacobson I.M., Cacoub P., Dal Maso L. et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 12. – P. 1017–1029.
2. 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. – Vol. 6. – P. 341–348.
3. Ramos-Casals M., Stone J.H., Cid M.C., Bosch X. The cryoglobulinaemias. Lancet. 2012; 9813: 348–360.
4. Almpinisa Z., Demonakoua M., Tiniakos D. Evaluation of liver fibrosis: “Something old, something new...” // Annals of Gastroenterology. – 2016. Vol. 29. P. 1–9.
5. Mityushin V.M., Kozyreva E. V. Some types of ultra-structure of mitochondria of animal cells and their relationship to energy production // Cytology. – 1978. Vol.4. – P. 371–379.
6. 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. – Vol. 124. – P. 1599–1607.
7. 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. – Vol. 51. P. 445–9.
8. 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.
9. 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.
10. 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. – Vol. 130. – P. 435–452.
11. Syal G., Fausther M., Dranoff J. A. Advances in cholangiocyte immunobiology // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2012. Vol. 303. – P. G1077–G1086.
12. Luedde T., Kaplowitz N., Schwabe R. F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance // Gastroenterology. – 2014. Vol. 4. – P. 765–783.
13. 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. – Vol. 1. P. 431–435.
14. Scheuer P.J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment // J Hepatol. – 1991. Vol. 13. – P. 372–374.
15. 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.
16. Biswas S, Sharma S Hepatic Fibrosis and its Regression: The Pursuit of Treatment // J Liver Res Disord Ther. – 2016. – Vol. 2. – P. 1–4.
17. Luetkemeyer A. F., Wyles D. L. CROI 2016: Viral Hepatitis and Liver Fibrosis. – 2016. – Vol. 24. – P. 47–58.
18. 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. – Vol. 20. P. 28–35.
19. Stueck A.E., Wanless I. R. Hepatocyte Buds Derived From Progenitor Cells Repopulate Regions of Parenchymal Extinction in Human Cirrhosis // Hepatology. – 2015. Vol. 5. P. 1696–1707.
20. 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.
21. Taguchi K, Asano G. Neovascularization of pericellular fibrosis in alcoholic liver disease // Acta Pathol Jpn. – 1988. – Vol. 38. P. 615–626.

Reference

1. Jacobson I.M., Cacoub P., Dal Maso L. et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 12. – P. 1017–1029.
2. 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. – Vol. 6. – P. 341–348.
3. Ramos-Casals M., Stone J.H., Cid M.C., Bosch X. The cryoglobulinaemias. Lancet. 2012; 9813: 348–360.
4. Almpinisa Z., Demonakoua M., Tiniakos D. Evaluation of liver fibrosis: “Something old, something new...” // Annals of Gastroenterology. – 2016. Vol. 29. P. 1–9.
5. Mityushin V.M., Kozyreva E. V. Some types of ultra-structure of mitochondria of animal cells and their relationship to energy production // Cytology. – 1978. Vol.4. – P. 371–379.
6. 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. – Vol. 124. – P. 1599–1607.
7. 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. – Vol. 51. P. 445–9.
8. 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.
9. Pradere J.P., Kluwe J., De Minicis S. et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis

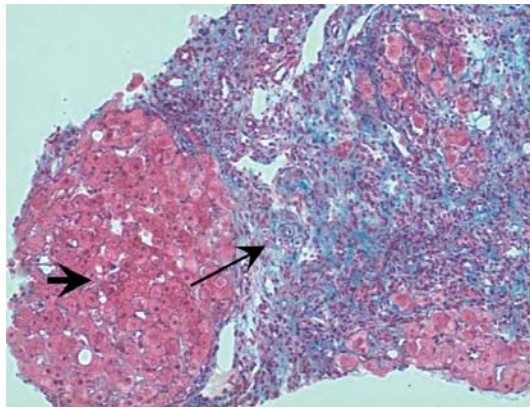
- by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. 2013; 58: 1461–1473.
10. Radaeva S., Sun R., Jaruga B. *et al.* Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners // *Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 130. – P. 435–452.
11. Syal G., Fausther M., Dranoff J. A. Advances in cholangiocyte immunobiology // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2012. Vol. 303. – P. G1077–G1086.
12. Luedde T., Kaplowitz N., Schwabe R. F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance // *Gastroenterology*. – 2014. Vol. 4. – P. 765–783.
13. 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. – Vol. 1. P. 431–435.
14. Scheuer P. J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment // *J Hepatol*. – 1991. Vol. 13. – P. 372–374.
15. 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.
16. Biswas S, Sharma S Hepatic Fibrosis and its Regression: The Pursuit of Treatment // *J Liver Res Disord Ther*. – 2016. – Vol. 2. – P. 1–4.
17. Luetkemeyer A. F., Wyles D. L. CROI 2016: Viral Hepatitis and Liver Fibrosis. – 2016. – Vol. 24. – P. 47–58.
18. 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. – Vol. 20. P. 28–35.
19. Stueck A. E., Wanless I. R. Hepatocyte Buds Derived From Progenitor Cells Repopulate Regions of Parenchymal Extinction in Human Cirrhosis // *Hepatology*. – 2015. Vol. 5. P. 1696–1707.
20. 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.
21. Taguchi K, Asano G. Neovascularization of pericellular fibrosis in alcoholic liver disease // *Acta Pathol Jpn*. – 1988. – Vol. 38. P. 615–626.

К статье

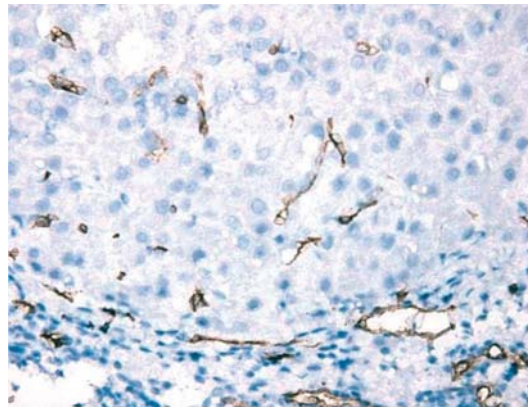
Эффекты аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, трансплантированных в печень при вирусном циррозе (стр. 61–67)

To article

Effects of autologous mesenchymal stem cells, transplanted in liver with virus cyrrosis (p. 61–67)



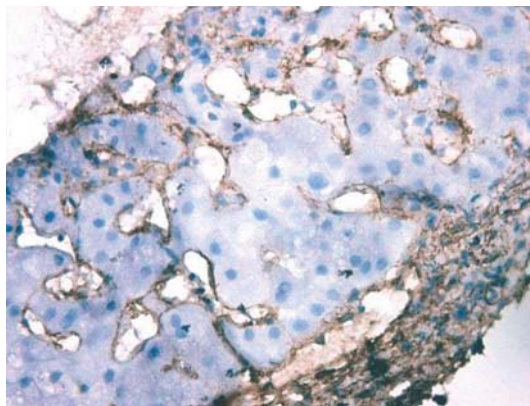
Сформированный микронодулярный цирроз. Регенераторный узел с разрастанием фиброзной ткани (длинная стрелка), ложная долька (короткая стрелка). Окраска по Массону. $\times 126$.
Formed micronodular cirrhosis. Regenerator node with proliferation of fibrous tissue (long arrow), false lobule (short arrow). Masson coloring. $\times 126$.



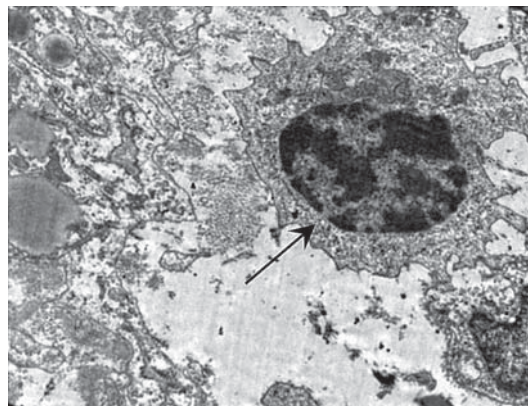
ИГХ: CD34. Умеренно выраженная капилляризация синусоидов. $\times 400$.
IHC: CD34. Moderate capillarization sinusoids. $\times 400$.

Рисунок 1.
Figure 1.

Рисунок 2.
Figure 2.



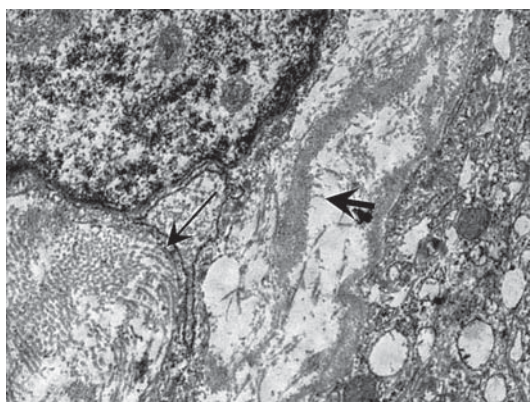
ИГХ: α-SMA. Выраженная трансдифференцировка звездчатых клеток Ито в миофибробласты. $\times 400$.
IHC: α-SMA. The pronounced transdifferentiation Ito cells in myofibroblasts. $\times 400$.



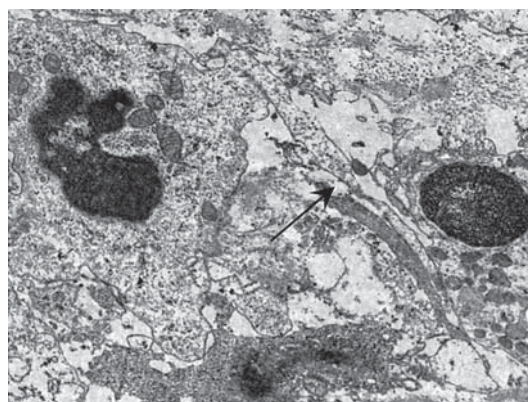
Лимфоцит в просвете синусоидного капилляра (стрелка). $\times 20000$.
Lymphocyte in hepatic sinusoid (arrow). $\times 20000$.

Рисунок 3.
Figure 3.

Рисунок 4.
Figure 4.



Иммунная реакция (короткая стрелка) и крупный пучок фибрилл коллагенового волокна в перикапиллярном пространстве (длинная стрелка). $\times 20000$.
Immune reaction (short arrow) and a large bundle of collagen fibrils in the pericapillary space (long arrow). $\times 20000$.

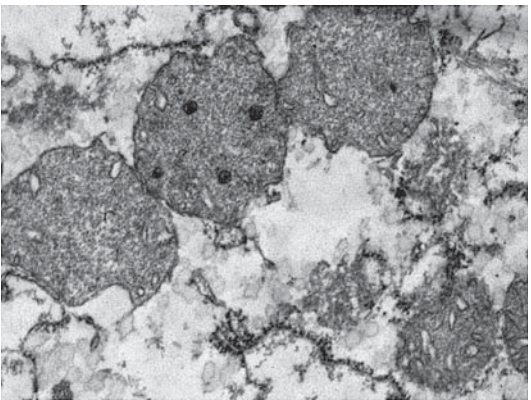
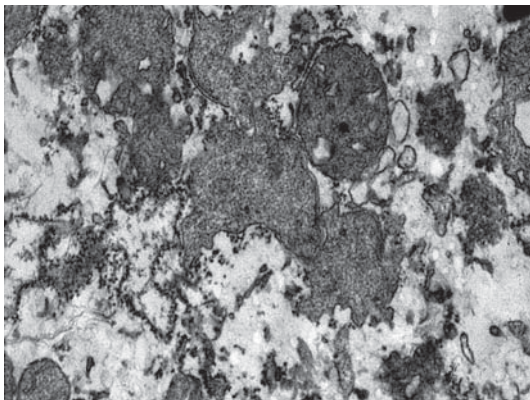


Апoptозное ядро в гепатоците. $\times 15000$.
Apoptotic nucleus in the hepatocyte. $\times 15000$.

Рисунок 5.
Figure 5.

Рисунок 6.
Figure 6.

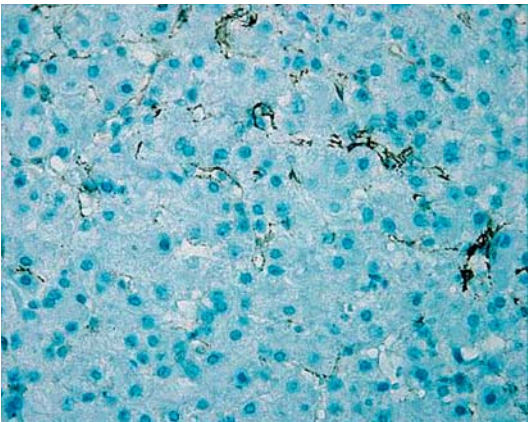
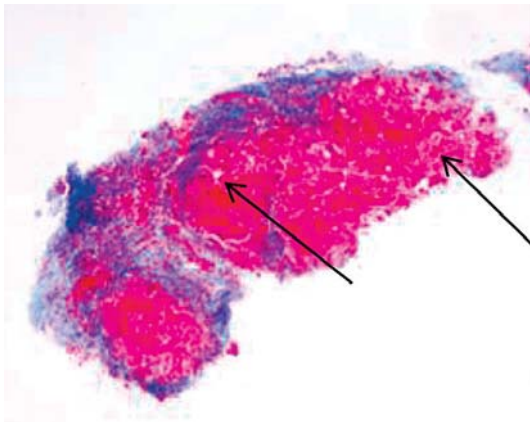
Рисунок 7.
Figure 7.



Деструктивно измененные конденсированные митохондрии с разрыхлением внешней и отслаиванием внутренней мембраны с образованием пузырей. $\times 20000$.
Destructively altered condensed mitochondria with loosening of the outer membrane and exfoliation of the inner membrane with the formation of bubbles. $\times 20000$.

Набухшие митохондрии с просветленным матриксом, соответствующие низко энергетическому состоянию. $\times 20000$.
Swollen mitochondria with an enlightened matrix, corresponding to a low energy state. $\times 20000$.

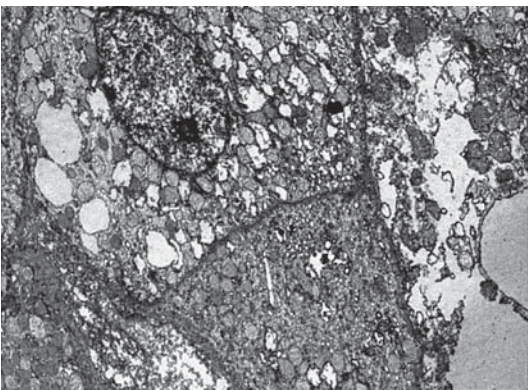
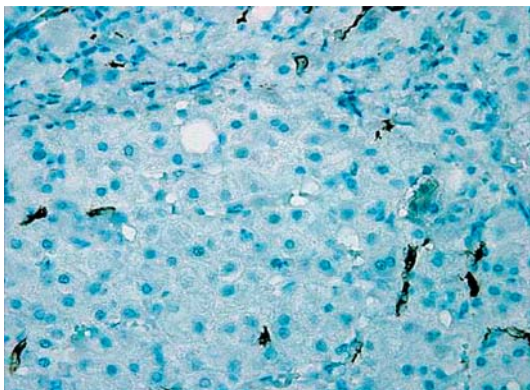
Рисунок 9.
Figure 9.



Сформированный микронодулярный цирроз.
Цирротический узел состоит из нескольких отдельных микроциркуляторных единиц, каждая, возможно, относилась к бывшему регенераторному узлу. Длинные стрелки указывают на остатки тонких септ. Расширенные синусоиды с обеих сторон резорбированной перегородки представляют собой части эфферентной микроциркуляции. Окраска по Массону. $\times 32$.
Formed micronodular cirrhosis.
The cirrhotic node consists of several separate microcirculatory units, each, perhaps, related to the former regenerative node. The expanded sinusoids on both sides of the resorbed septum are parts of the efferent microcirculation. Masson coloring. $\times 32$.

ИГХ: α -SMA. Умеренно выраженная трансдифференцировка ЗКИ в миофибробласты. $\times 400$.
IHC: α -SMA. Moderately expressed transdifferentiation of Ito cells into myofibroblasts. $\times 400$.

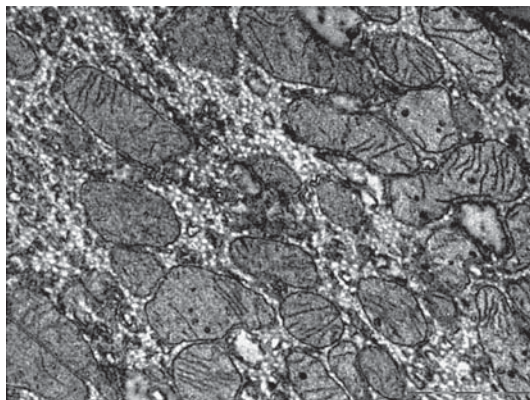
Рисунок 11.
Figure 11.



ИГХ: CD34. Умеренно выраженная капилляризация синусоидов. $\times 400$.
IHC: CD34. Moderate capillarization of sinusoids. $\times 400$.

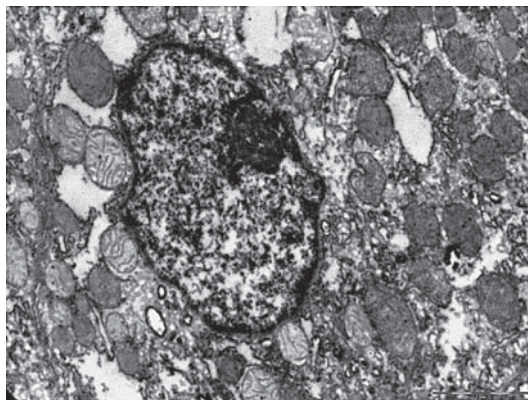
Выраженная гетерогенность гепатоцитов по количеству и степени изменений органелл и плотности цитоплазматического матрикса. $\times 5000$.
The expressed heterogeneity of hepatocytes in the number and degree of changes in the organelles and density of the cytoplasmic matrix. $\times 5000$.

Рисунок 12.
Figure 12.



Многочисленные митохондрии, отличающиеся полиморфизмом, матриксом умеренной электронной плотности, отчетливыми кристами, ориентированными преимущественно поперек длинной оси органелл, с крупными внутримитохондриальными гранулами. $\times 3000$.

Numerous mitochondria characterized by polymorphism, a matrix of moderate electron density, distinct crystals oriented predominantly across the long axis of the organelles, with large intramitochondrial granules. $\times 3000$.



Гетерогенность митохондрий в гепатоците. На рисунке слева от ядра – митохондрии с нормальной ультраструктурой, справа – лизис крист и гомогенизация матрикса митохондрий. $\times 12000$.

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. $\times 12000$.

Рисунок 13.

Figure 13.

Рисунок 14.

Figure 14.