



МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРВИЧНОМ БИЛИАРНОМ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

Шаймарданова Г.М., Федотовских Г.В., Рахметова В.С., Аскарров М.Б., Смагулова А.К.

АО «Национальный научный медицинский центр» г.Астана, Казахстан

Абстракт

При морфологическом гистологическом исследовании печени после трансплантации СККМ выявлено снижение степени воспалительной лимфоплазмацитарной инфильтрации в портальных трактах, уменьшение степени дистрофических процессов в гепатоцитах, увеличение количества моноцитов и активированных макрофагов в просвете синусоидов. Отмечена гиперплазия холангиоцитов и переходных зон между гепатоцитами и клетками ветвящихся желчных протоков. В портальных трактах появлялись многочисленные кровеносные капилляры. Электронномикроскопически отмечены признаки регрессии фиброзной ткани путем фагоцитоза коллагеновых фибрилл синусоидальной поверхностью печени, фибробластами и макрофагами. Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга при билиарном циррозе печени снижала степень воспалительной инфильтрации, способствовала регенерации холангиоцитов, обратному развитию склеротических изменений и усилению ангиогенеза в портальных трактах.

Ключевые слова: билиарный цирроз печени, трансплантация стволовых клеток костного мозга, морфология.

Введение

Первичный билиарный цирроз (ПБЦ) – хроническое гранулематозное деструктивное воспалительное заболевание междольковых и септальных желчных протоков аутоиммунной природы, приводящее к развитию длительного холестаза, а на поздних стадиях к формированию цирроза [1]. Патогенез фиброза печени при ПБЦ связан с поражением билиарного эпителия, содержащего митохондриальные аутоантигены. Начинаясь с перидуктальной локализации и формирования соединительнотканых порто – портальных и портоцентральных септ, фиброзные изменения заканчиваются всеми признаками крупноузлового или смешанного цирроза печени. При этом, основными фиброгенными клетками портальных трактов являются фибробласты и миофибробласты, а в периферической области активированные звездчатые клетки.

Учитывая патогенетические особенности заболевания, современная терапия ПБЦ включает лекарственные вещества, обладающие иммуносупрессивными, противовоспалительными и антифибротическими свойствами. Однако, отсутствие оптимального метода лечения ПБЦ, неизбежно затрагивает вопросы эффективного использования и трансплантационной клеточной гепатоцитопластики с механизмами ингибирования аутоиммунного воспаления, активизации процессов репаративной регенерации и ангиогенеза [2,3,4]. Экспериментально показана возможность стимуляции регенерации печени аутогенными стволовыми клетками костного мозга и аллогенными стволовыми клетками пуповинной крови (Kakinuma S et al., 2003; Masson S., et al., 2004; Fujii H. et al., 2002). Отмечена эффективность ауто-трансплантации гемопоэтических

стволовых клеток больным хроническими гепатитами в стадии тяжелого фиброза печени (А.П.Киясов и др., 2008). Торможение активации печеночных звездчатых клеток может достигаться как опосредованным уменьшением воспалительной инфильтрации, приводящей к высвобождению ряда факторов активации ПЗК, так и прямым торможением трансформации их в активные миофибробласты. Перспективным направлением в контроле печеночного фиброза представляется применение цитокинов и антагонистов их рецепторов, что обусловлено непосредственным участием ростовых факторов на всех этапах сложного комплекса межклеточных взаимодействий в процессе фиброгенеза. И в этой связи, эффективным терапевтическим методом в лечении ХДЗП может стать клеточная трансплантация, изменяющая профиль продуцируемых цитокинов и участвующая в регуляции состояния иммунной системы.

Учитывая необходимость разработки методов клеточной терапии при ПБЦ нами было проведено морфологическое исследование печени данных больных при трансплантации аутологичных прекультивированных стволовых клеток костного мозга.

Цель исследования: провести комплексное морфологическое исследование печени больных первичным билиарным циррозом до и после трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга.

Материалы и методы

Материалом для морфологического исследования послужил биопсийный материал печени 5 больных с билиарным циррозом печени, взятый до и после 2-3

трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Аспирация костного мозга из гребня подвздошной кости в количестве 400 мл проводилась после полного клинико-лабораторного обследования. Биотехнологическим методом была выделена гемопоэтическая фракция стволовых клеток с последующим трансплантацией культивированием их в течение 72 часов. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток проводилась системно внутривенно в среднем в количестве до 140×10^6 клеток.

Парафиновые срезы ткани печени окрашивались гематоксилином, эозином и по Массон-трихром. Для электронно-микроскопического исследования кусочки ткани печени фиксированы в 2,5% растворе глутаральдегида с постфиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия. Материал проведен по общепринятой методике и заключен в эпон. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливались на ультрамикротоме Leica. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим, азуром-2 и основным фуксином. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы изучали и фотографировали в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss).

методике. С парафиновых блоков изготавливались срезы толщиной 3-5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином, Массон – трихромом, Конго – рот, PAS и серебром. Иммунофлуоресцентные исследования проводились по общепринятой методике и окрашивались антителами FITC. Микроскопия осуществлялась на светооптических системах «AxioStar» и «Axioskop-40» фирмы «C. Zeiss». Для электронномикроскопического исследования биопсийные кусочки ткани почек фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида с постфиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия, проводились по общепринятой методике и заключались в эпон. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Leica. Полутонкие срезы окрашивались метиленовым синим, азуром 2 и основным фуксином (С. Humphrey, F. Pittman, 1974). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу, исследовали и сохраняли в электронном микроскопе Libra 120 (C. Zeiss).

Результаты

При гистологическом светооптическом исследовании биопсийного материала печени до трансплантации СККМ структурные изменения характеризовались наличием, как правило, активного монобулярного цирроза с выраженным разрастанием соединительной ткани и плотным инфильтратом из лимфоцитов, плазматических клеток, полиморфно – ядерных лейкоцитов и макрофагов в портальных и перипортальных трактах печени (рисунок 1). Формировались порто-портальные и порто-центральные септы с образованием ложных долек. В портальных трактах воспалительная инфильтрация выходила за пределы пограничной пластинки, определялись холангиолы, распространяющиеся в перипортальные отделы. В большей части протоков пролиферация снижается. Вокруг желчных протоков перидуктальный фиброз. В паренхиме определялось большое количество печеночных клеток в состоянии гидropической и очаговой баллонной дистрофии. В гепатоцитах скопление желчного пигмента, формирование псевдодуктул. Холестаз перипортально и центральнобулярно.

Воспалительная инфильтрация в паренхиме долек. На полутонких срезах портальные и перипортальные поля были склерозированы. Явления фиброза были отмечены как в перипортальной ткани, так и внутри долек в результате врастания в дольку соединительнотканых септ. Междольковая соединительная ткань и соединительнотканые прослойки характеризовались различной степенью макрофагально-плазмоцитарной инфильтрации и большим количеством пролиферирующих фибробластов. В перисинусоидальном пространстве увеличивалось количество коллагеновых волокон, наблюдалась выраженная капилляризация синусоидов с формированием тонкой соединительнотканной мембраны (рисунок 2). Довольно часто встречались признаки жировой, реже вакуольной дистрофии гепатоцитов. Содержание гликогена было неравномерным и сниженным.

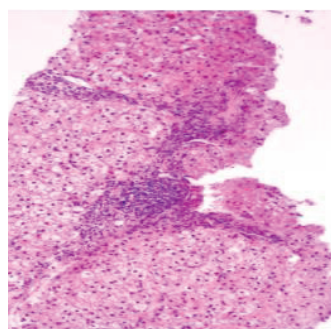


Рисунок 1 - Морфология печени до трансплантации СККМ. Цирроз печени монобулярного типа. Окраска гематоксилином и эозином. X 100

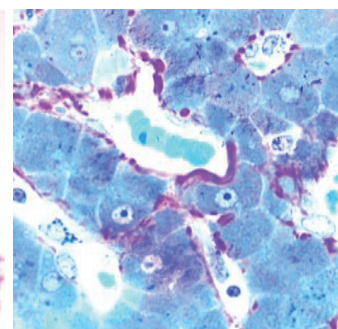


Рисунок 2 - Морфология печени до трансплантации СККМ. Коллагеновые волокна в перисинусоидальном пространстве. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим, азуром 2 и основным фуксином. X 1000

Электронномикроскопически, гепатоциты содержали крупные ядра с ровными контурами ядерной оболочки. Конденсированный хроматин распределялся узкой полоской примаргинально. Перинуклеарное пространство узкое. Многочисленные митохондрии характеризовались зернистой дезорганизацией крист, набуханием матрикса и деструкцией. Канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума располагались беспорядочно, мембраносвязанные рибосомы были десквамированы, узкие просветы заполнены хлопьевидным материалом средней электронной плотности. В цитоплазме были отмечены мелкие, частично разрушенные везикулы агранулярного эндоплазматического ретикулума и плотные включения желчных пигментов. Жировые капли полиморфны по величине и гомогенны по плотности. Синусоидальная поверхность гепатоцитов на отдельных участках была сглажена. Вдоль нее располагалась четкая, хорошо выраженная базальная мембрана, свидетельствующая о капилляризации синусоидов. В перисинусоидальном пространстве Диссе располагались хлопьевидные массы, тонкие фибриллы и и пучки зрелых коллагеновых фибрилл с характерной поперечной исчерченностью. Тонкие эндотелиальные клетки синусоидов печени находились в состоянии отека с резким просветлением гиалоплазмы и исчезновением органелл. Отдельные эндотелиоциты

были разрушены. В пространстве Диссе были отмечены клетки Ито (рисунок 3), миофибробласты и фибробласты с резко расширенными канальцами гранулярного эндоплазматического ретикулума, что отражало активную коллагенпродуцирующую функцию данных клеточных элементов. Часть макрофагов находилась в состоянии некроза. К особенностям первичного билиарного цирроза печени, как аутоиммунного заболевания были отнесены тесные контакты лимфоцитов с клетками желчных протоков, расположенными в портальном тракте (рисунок 4).

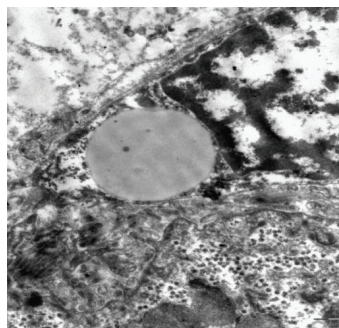


Рисунок 3 - Морфология печени до трансплантации СККМ. Коллагеновые волокна в перисинусоидальном пространстве. Клетка Ито. Электроннограмма

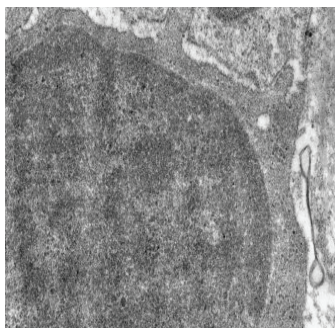


Рисунок 4 - Морфология печени до трансплантации СККМ. Тесный контакт лимфоцита с клеткой желчного протока. Электроннограмма

На фоне трансплантации аутологичных стволовых клеток наблюдалось клиническое улучшение состояния больных, нивелирование асцита, купирование кожного зуда, уменьшение холестаза, цитолиза, вторичной коагулопатии, переход функционального класса С в класс В по Чайлд-Пью.

Морфологическое исследование печени после трансплантации СККМ показало снижение степени воспалительной лимфоплазмацитарной инфильтрации в портальных трактах. Сохранялись умеренно выраженные дистрофические изменения гепатоцитов и наличие грубой волокнистой соединительной ткани в портальных трактах (рисунок 5). Увеличивалось количество моноцитов и активированных макрофагов в просвете синусоидов. Отмечена гиперплазия холангиоцитов и переходных зон между гепатоцитами и клетками ветвящихся желчных протоков (рисунок 6). В портальных трактах появлялись многочисленные кровеносные капилляры с тонкой эндотелиальной выстилкой.

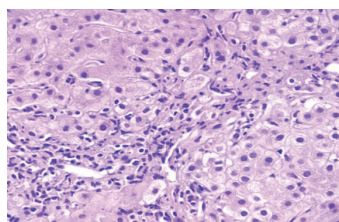


Рисунок 5 - Монобулярный цирроз печени после трансплантации СККМ В портальном тракте умеренная лимфоплазмацитарная инфильтрация. Выраженный портальный фиброз, порто-портальные септы с лимфогистиоцитарной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином. X 400

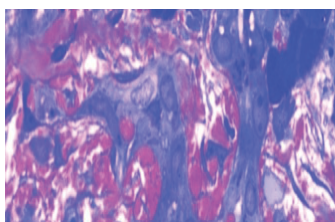


Рисунок 6 - Монобулярный цирроз печени после трансплантации СККМ. Гиперплазия холангиоцитов и переходных зон между гепатоцитами и клетками желчных протоков. Полутопкий срез. Окраска метиленовым синим, азуром 2 и основным фуксином. X 1000

При электронномикроскопическом исследовании гепатоциты содержали крупные ядра круглой формы с диффузным распределением гетеро- и эухроматина. Перинуклеарное пространство слегка расширено. В цитоплазме располагались многочисленные крупные митохондрии с зернисто дезорганизованным матриксом умеренной степени электронной плотности и четкими кристами. Отмечена гиперплазия канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума, в основном обвивавших наружные мембраны митохондрий или принимавших упорядоченное расположение. Часть канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума преобразовывалась в вакуоли агранулярного эндоплазматического ретикулума, между которыми располагались многочисленные электронноплотные розетки гранул гликогена. Синусоидальная поверхность была снабжена многочисленными длинными и тонкими микроворсинками и цитоплазматическими выростами, которые погружались в разрыхленные, фрагментированные, лизированные массы коллагеновых фибрилл, разделяя их на фрагменты и втягивая внутрь цитоплазмы. Вдоль синусоидальной поверхности в цитоплазме гепатоцитов были видны многочисленные крупные пузырьки с фрагментами разрыхленного аморфного коллагена. Здесь же располагались электронноплотные первичные лизосомы и расположенные в тесный ряд гипертрофированные митохондрии удлинённой и лопастной формы с плотным матриксом и четкими кристами (рисунок 7). Фагоцитарные вакуоли с коллагеновыми фибриллами были обнаружены в цитоплазме фибробластов и активированных макрофагов (рисунок 8). Последние имели гиалоплазму с мелкими плотными лизосомами и многочисленными вакуолями с хлопьевидным содержимым. Также нами были отмечены многочисленные клетки Ито с характерными липидными каплями.

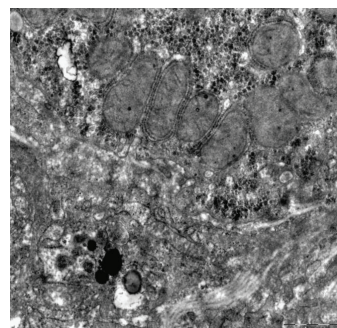


Рисунок 7 - Морфология печени после трансплантации СККМ. Гипертрофированные митохондрии вдоль синусоидальной поверхности плазматической мембраны. Электроннограмма

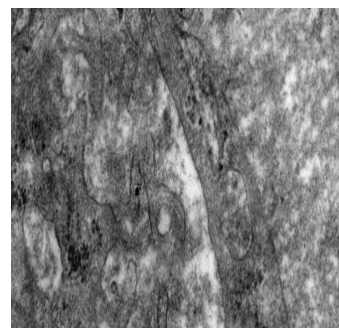


Рисунок 8 - Морфология печени после трансплантации СККМ. Коллагеновые волокна в цитоплазме фиброклста. Электроннограмма

Обсуждение

Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга при билиарном циррозе печени способствовала положительной динамике ее морфологической структуры. Весьма важным было снижение воспалительной инфильтрации, являющейся

опосредованным путем регресса фиброзной ткани. Отмечена регенерация холангиоцитов и усиление ангиогенеза в портальных трактах. И хотя гистологически фибротические изменения печеночной ткани обладали более медленной динамикой регресса по сравнению с воспалительными реакциями, электронномикроскопические данные показали тенденцию к обратному развитию склеротических изменений.

Выводы

Таким образом, трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга при билиарном циррозе печени снижала степень воспалительной инфильтрации и дистрофических процессов, способствовала регенерации холангиоцитов, обратному развитию склеротических изменений и усилению ангиогенеза в портальных трактах.

Литература:

1. Подымова С.Д. Болезни печени. 3 издание. Руководство для врачей М. Медицина.-1998-703 с.
2. Гарбузенко Д.В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при ее повреждении и их практическое значение. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2008.-Т.6.-С.14-21
3. Черных Е.Р., Пальцев А.И., Старостина Н.М. и др. Аутологичные клетки костного мозга в комплексном лечении пациентов с хроническими гепатитами и циррозом печени. Гепатология.-2005.-Т1.
4. Gordon M.Y., Levisar N., Pai M. et al. Characterization and clinical application of human CD 34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. Stem Cells. 2006.-24(7).-1822-30
5. Masson S., Harrison D.J., Plevris J.N. et al. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. Stem Cells .-2004.-22(6)-897-907
6. Fujii H., Hirose T., Oe S. et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. J. Hepatol. 2002/-36(5)/-653-9
7. Киясов А.П., Одинцова А.Х., Гумерова А.А и др. Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.-2009.-Т3(1).-с.70-75.