

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ: ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЛИМФОЦИТЫ

Цыркунов В. М. (tvm111@mail.ru), Андреев В. П. (andrvp@yandex.ru),
Прокопчик Н. И. (prokopni@mail.ru), Кравчук Р. И. (cnil@grsmu.by)

УО «Гродненский государственный медицинский университет» Гродно, Беларусь

Введение. Печень – орган иммунной системы, в котором представителями врожденного и приобретенного иммунитета являются разные популяции лимфоцитов: NK-клетки, NKT-клетки, LGL-клетки, CD8+ (CTL)-клетки, принимающие участие в цитотоксических реакциях.

Цель исследования – представить структурно-функциональную характеристику основных популяций цитотоксических лимфоцитов, принимающих активное участие в развитии воспаления при вирусных повреждениях печени.

Материал и методы. Проведена морфологическая оценка прижизненных биоптатов печени пациентов с хроническими вирусными гепатитами методами световой и электронной микроскопии с применением классических и оригинальных методик фиксации и окраски препаратов.

Результаты. Представлено подробное описание структуры основных популяций лимфоцитов в печени (NK-клетки, NKT-клетки, LGL-клетки, CD8+-клетки) и представлены их основные иммуноморфологические данные и цитотоксические характеристики. Описаны основные методы, применяемые в клинике для морфологической оценки активности воспаления в печени.

Выводы. Наиболее изученными участниками развития цитотоксичности при хронических вирусных гепатитах являются лимфоциты, обеспечивающие прямое и опосредованное повреждение гепатоцитов: NK-клетки, NKT-клетки, LGL и ЦТЛ (CD8 + T-клетки), различающиеся фенотипически и по своим структурным и функциональным характеристикам. Классический метод световой микроскопии биоптатов печени не позволяет дифференцировать популяции цитотоксических лимфоцитов, в отличие от световой микроскопии полутонких срезов и электронной микроскопии. Дополнительным морфологическим показателем для оценки активности и мониторинга воспаления в печени может стать морфологическая (количественная) характеристика клеточной популяции лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: печень, цитотоксические лимфоциты, воспаление, морфология.

Введение

Особенностью воспаления в печени является его развитие непосредственно в иммунном органе (печени), с участием собственных клеток иммунной системы [1, 2]. Наиболее известными типами клеток, ответственными за прямой и опосредованный лизис гепатоцитов, являются представители врожденного и адаптивного иммунитета [3]. Среди многочисленных клеток, участвующих во врожденных иммунных реакциях в печени, выделяют гепатоциты, холангиоциты, перисинусоидальные липоциты (Hepatic stellate cells, HSC, звездчатые клетки Ито), печеночные синусоидальные эндотелиальные клетки (Liver sinusoidal endothelial cells, LSEC), дендритные клетки, клетки Купффера, натуральные киллеры (NK-клетки), Т-лимфоциты с активностью естественных киллеров (NKT-клетки) и другие популяции лимфоцитов. Печень содержит 2-15 млн лимфоцитов в расчете на 1 г ее ткани, представленных NK-клетками (20%), NKT- (50%), Tαβ- (20%), Tγδ-клетками (3%), В-лимфоцитами (5%) [4, 5, 6, 7].

Несмотря на установленную патогенетическую значимость лимфоцитов и других клеток врожденного иммунитета в развитии поражений печени, представленных в публикациях [8-10] и в известных руководствах по клинической морфологии печени [11-12], морфологическая визуализация разных популяций лимфоцитов, обладающих цитотоксичностью и принимающих

участие в развитии воспаления, представлена недостаточно.

Цель исследования – представить структурно-функциональную характеристику основных популяций лимфоцитов, принимающих активное участие в развитии воспаления при вирусных поражениях печени.

Материал и методы

Биоптаты печени получены путем проведения аспирационной биопсии печени у пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС), от которых имелось письменное информированное согласие.

Для световой микроскопии биоптат фиксировали 10% раствором формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, по Перлсу на железо. Для окраски суданом-III на липидные включения использовались криостатные срезы. Для оценки степени выраженности изменений в структуре печени применяли шкалы В. В. Серова и соавт. (1996), Knodell et al. (1981).

Для световой микроскопии полутонких срезов образцы биоптата печени пациентов (размером 0,5×2 мм) фиксировали методом двойной фиксации: вначале – по методике Sato Taizan [13], затем образцы ткани в течение 1 часа дополнительно фиксировали в 1% осмиевом фиксаторе, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере Зёренсена pH 7,4. Для лучшего выявления

ния внутриклеточных структур и межклеточного вещества на полутонких срезах в 1% четырехокись осмия добавляли дихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) или кристаллы хромового ангидрида (1 мг/мл). После дегидратации образцов в серии спиртовых растворов возрастающей концентрации и в ацетоне они помещались в преполимеризованную смесь бутилового метакрилата и стирола, полимеризовались при 55°C. Полутонкие срезы (толщиной 1 мкм) последовательно окрашивали азуром II, основным фуксином. Микрофотографии получали с использованием цифровой видеокамеры (Leica FC 320, Германия).

Электронно-микроскопическое изучение проводили в образцах биоптатов печени размером 0,5×1,0 мм, фиксированных 1% раствором четырехокси осмия на 0.1 М буфере Миллони-га, рН 7.4, при +4°C в течение двух часов [14]. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали аралдитовую эпоксидную смолу [15, 16]. Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Германия) готовили полутонкие срезы (400 нм) и окрашивали метиленовым синим. Срезы исследовались в световом микроскопе и выбирали однотипный участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм) контрастировали 2% раствором уранилацетата на 50% метаноле [17] и цитратом свинца по E. S. Reynolds [18]. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 10 000-60 000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Германия) и программы для обработки изображений iTEM (Olympus, Германия).

Результаты и обсуждение

Лимфоциты печени представляют собой важнейшие клетки, регулирующие продолжительность жизни гепатоцитов в физиологическом (апоптоз) и патологическом (некроз) цикле жизни [19, 20].

Врожденный иммунный ответ, являясь первым иммунологическим барьером, эффективен при удалении из организма цитопатических вирусов, но недостаточен для нейтрализации нецитопатических возбудителей.

НК-клетки, экспрессируя поверхностные распознающие рецепторы и имея фенотип CD3, CD16, CD56+, CD 94+, не экспрессируют Т-клеточные рецепторы (TCR). Выделяют две субпопуляции НК-клеток. Примерно 90% циркулирующих в крови НК-лимфоцитов имеют низкую CD56 (CD56dim) и высокую CD16 (CD16briht) плотность. В периферических лимфоидных органах уровень экспрессии CD56 высокий (CD16briht), а уровень CD16 – низкий (CD56dim). С участием молекулы CD16 (тип FcRIII) НК-клетки осуществляют антителозависимую цитотоксичность, разрушая опсонизированные антителами клетки-мишени по перфорин-гранзимному механизму. Клетки с фенотипом CD16briht и CD56dim экспрессируют

хемокиновые рецепторы CCR5 и CCR7, L-лектин, что позволяет им мигрировать в лимфатические узлы и секретировать различные цитокины ИФН-гамма, ФНО-р, ГМ-КСФ, ИЛ-10. Основная роль этих клеток в иммунной системе сводится к обнаружению и уничтожению опухолевых и инфицированных вирусами клеток [21].

Природные киллерные лимфоциты, развивающиеся в костном мозге из общей клетки предшественника лимфоцитов (LSC), дифференцируются в лимфоидных тканях и мигрируют в разные органы (печень, легкие и др.), где созревают и становятся резидентными НК-клетками. Продолжительность их жизни в печени – около двух недель. Они составляют до 30-50% популяции лимфоцитов печени у человека, обеспечивая защиту от трансформированных клеток и патогенов, включая вирусы (рис. 1, 2) [22].

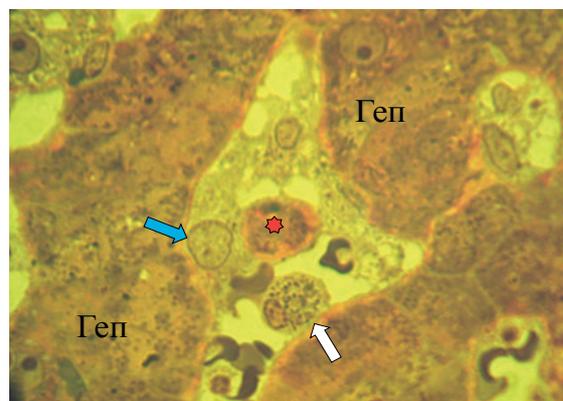


Рисунок 1. – НК-клетка (белая стрелка) в контакте с гепатоцитом (Геп). На противоположной стороне от эксцентрично расположенного ядра в цитоплазме – азурофильные гранулы. В просвете синусоида дегенерирующий гепатоцит (звездочка). Макрофаг (синяя стрелка) контактирует с гепатоцитом (Геп). Увеличение. 1000

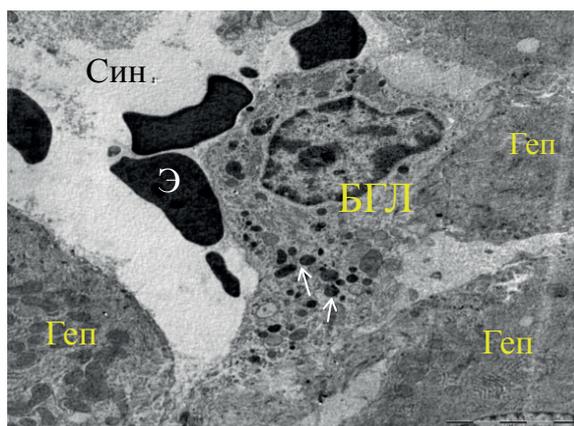


Рисунок 2. – НК-клетка в тесном контакте с двумя гепатоцитами (Геп). На противоположной стороне от эксцентрично расположенного ядра в цитоплазме видны многочисленные литические гранулы, разные по величине, форме и размеру. В синусоидном капилляре (Син) к БГЛ примыкают эритроциты (Э).

Электроннограмма. Увеличение. 8000

Естественные киллерные Т-клетки (NKT-клетки являются высококонсервативной неклассической субпопуляцией Т-лимфоцитов с активностью NK-клеток, занимающих промежуточное положение между клетками врождённого и адаптивного иммунитета. Они экспрессируют антиген-распознающий $\alpha\beta$ Т-клеточный рецепторный комплекс, включающий антиген CD3, характерный для популяции Т-клеток, и маркерные рецепторы естественных клеток-киллеров, включая антиген CD16 (Fc-рецептор для IgG) [4].

В 1976 г. впервые описаны как Pit-клетки (клетки-ямы), название которых связано с особенностями цитоплазматических гранул, на голландском языке – "яма" (семена винограда). Сейчас эти клетки называют большими зернистыми гранулярными лимфоцитами (LGL, БГЛ) и относят к популяции NKT-клеток, которые, как и природные NK-клетки, «нафаршированы» крупными гранулами. LGL (БГЛ) стимулируют пролиферацию гепатоцитов, распознают и разрушают опухолевые клетки печени и клетки, зараженные вирусами [23] (рис. 3, 4).

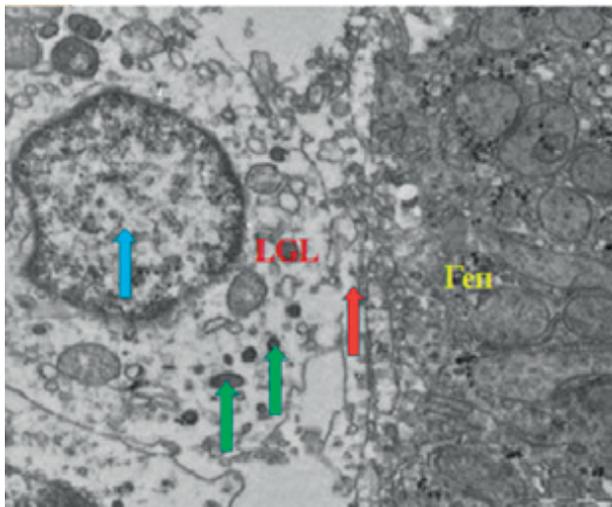


Рисунок 3. – Тесный контакт (красная стрелка) гепатоцита (Геп) и LGL с ядром высокой плотности (синяя стрелка) и избытком характерных электронно-плотных азурофильных гранул (зеленые стрелки) и других органелл. Электронограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 15000$

LGL располагаются на эндотелиальных клетках или между ними, фиксируясь в синусоидах посредством псевдоподий, проникающих сквозь эндотелиальную выстилку, соединяясь с микроворсинками паренхиматозных клеток в пространстве Дриссе. LGL живут недолго и обновляются за счёт лимфоцитов крови, дифференцирующихся в синусоидах. LGL, как правило, более многочисленны в перипортальной (чем в околоцентральной) области печеночной дольки. LGL отличаются от NK-клеток относительно

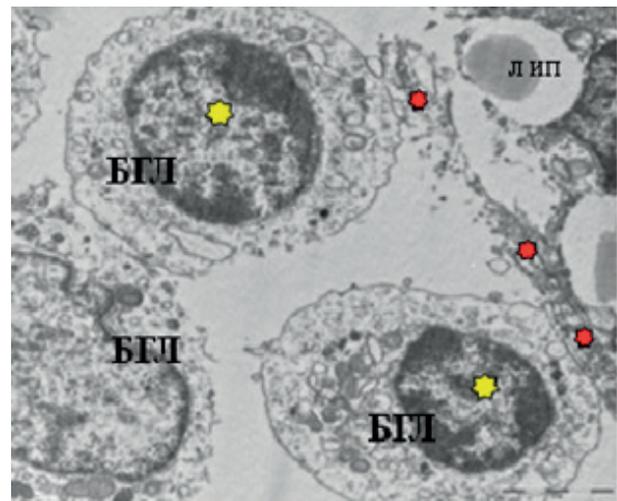


Рисунок 4. – Кластер БГЛ (NKT-клеток). БГЛ имеют высокое цитоплазма-ядерное соотношение, единичные электронно-плотные гранулы, разреженные митохондрии, отсутствие аппарата Гольджи. БГЛ (желтые звездочки) контактирует с разрушающейся эндотелиальной клеткой (красные звездочки). Лип. – липидная капля клетки Ито. Электронограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 15000$

большим размером (приблизительно 15 мкм), асимметрией клетки с зазубренностью, ядром высокой плотности в форме почки и наличием характерных электронно-плотных гранул и других органелл, расположенных главным образом на одной стороне ядра [24] (рис. 5, 6).

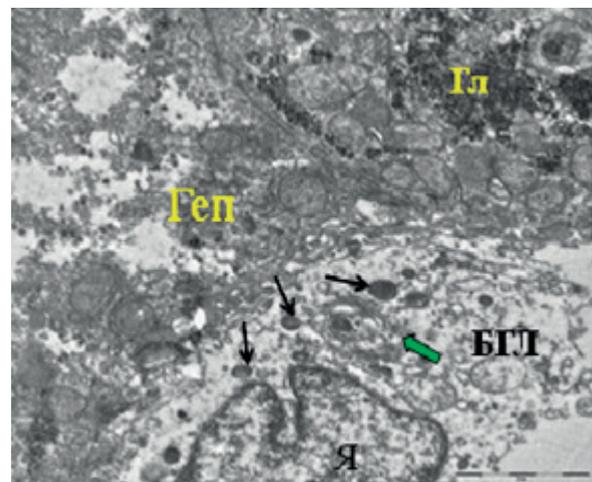
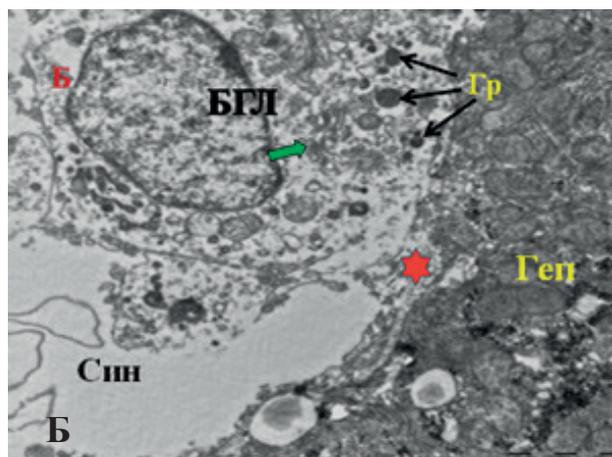
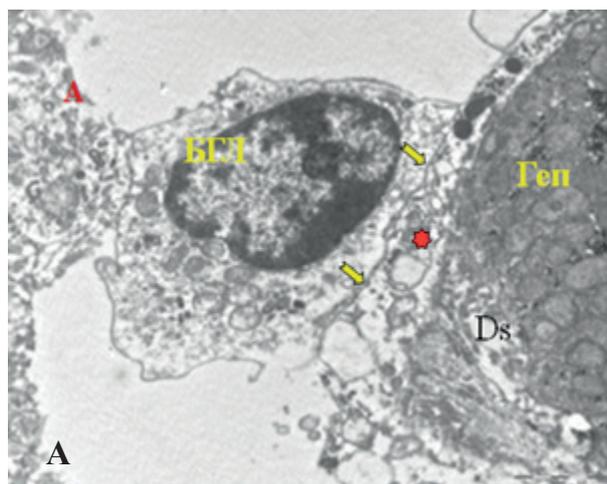


Рисунок 5. – Взаимодействие (БГЛ) с гепатоцитом (Геп), пораженным HCV. Наличие аппарата Гольджи (зеленая стрелка) позволяет отнести БГЛ к NK-клетке. На месте контакта дефект: отсутствие пространства Дриссе вследствие разрушения эндотелиальной выстилки. В интактном гепатоците (правый верхний угол) отмечается большое количество гликогена (Гл). Разнородные по величине и плотности гранулы БГЛ обозначены стрелками. Электронограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 15000$



Рисунки 6А, 6Б. – Контакт БГЛ (Гр. – гранулы, аппарат Гольджи – зеленая стрелка) с разрушающейся эндотелиальной клеткой (звездочка) и гепатоцитом (ГеП).
Электроннограмма.
Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 15000$

Электронно-плотные гранулы LGL имеют несколько особенностей. Они – azurophilic (азурофильны), хорошо окрашиваются по Гимза. При электронной микроскопии LGL дифференцируются по плотности гранул: малой плотности (LD) и высокоплотные (HD) LGL. Гранулы содержат лизосомальные ферменты (кислая фосфатаза). Несмотря на установление в гранулах NK-клеток перфорина и гранзимов, их идентификация в гранулах клетки LGL пока не завершена. В LGL идентифицированы маленькие включения в виде пузырьков (диаметр от 0,17 до 0,2 мкм) с прямым стержнем (rod-cored), длиной 30-50 нм, проходящим через весь диаметр пузырька (рис. 7, 8).

Пузырьки с отсутствием стержня распределяются вокруг аппарата Гольджи. Возможно, rod-cored пузырьки содержат цитостатические компоненты естественной цитотоксичности. Идентификация LGL в печени у человека затруднена из-за небольшого числа гранул и пузырьков с удаленным стержнем. С другой стороны, только 5 от 25% человеческих LGL содержат «параллельные трубчатые структуры» (РТА), связанные с NK-клетками крови, что является их особенностью [25].

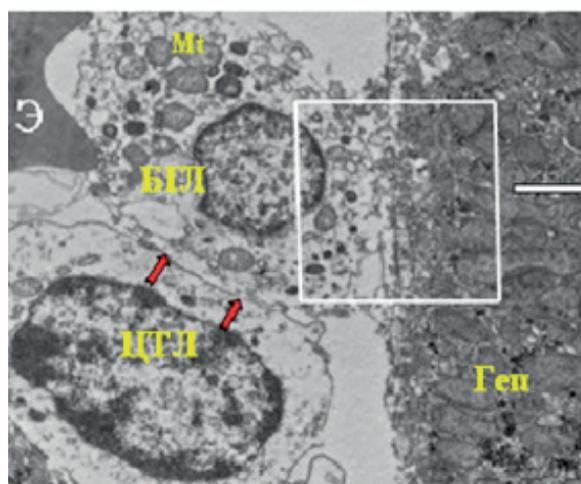


Рисунок 7. – Тесный контакт между плазмолеммами двух лимфоцитов (стрелки): ЦТЛ (CD8+Т-клетка) и БГЛ (NKT-клетка). Диспергированный хроматин ядра свидетельствует о высокой активности БГЛ. В рамке обозначен участок взаимодействия БГЛ с гепатоцитом (ГеП).
Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 8000$

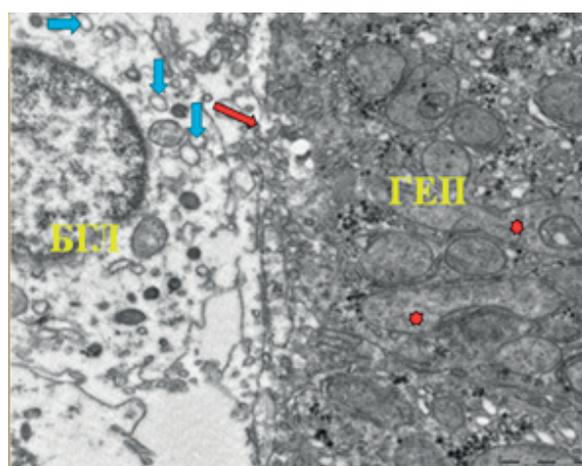


Рисунок 8. – Контакт БГЛ (NKT-клетка) с гепатоцитом (ГеП) на участке разрушенной эндотелиальной клетки. В цитоплазме БГЛ пузырьки (голубые стрелки). В месте контакта – нарушение целостности плазмолеммы гепатоцита (красная стрелка), скопление митохондрий с нарушением их ультраструктуры (звездочки).
Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 15000$

Помимо эффекторной, внутрипеченочные NKT-лимфоциты выполняют иммунорегуляторную функцию во врожденном и адаптивном иммунном ответе, играя ключевую роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа за счет продукции IFN- γ , который активирует NK-клетки, ЦТЛ (CD8+) и макрофаги [26].

Адаптивный иммунный ответ представляет вторую линию иммунологической защиты от нецитопатических вирусов из-за способности таких инфекций оставаться оккультными для врожденной системы [27]. Клеточный имму-

нитет, особенно адаптивный, опосредованный Т-клетками CD8+, играет решающую роль в ингибировании и клиренсе HBV и HCV. Именно адаптивный иммунитет приводит к воспалительному повреждению гепатоцитов [28].

Цитотоксические Т-клетки (ТС, цитотоксические Т-лимфоциты, CTL, Т-клетки-киллеры, цитолитические Т-клетки, CD8+ Т-клетки или убийцы Т-клеток) являются Т-лимфоцитами, уничтожающими раковые клетки, инфицированные вирусами клетки, или клетки, которые повреждены другими способами [29].

ЦТЛ (CD8+) экспрессируют Т-клеточные рецепторы (TCR), постоянно тестируя клетки организма с помощью антиген-распознающего комплекса МНС-I-TCR, который распознает молекулы антигена (эпитопы – короткие длинные пептиды длиной 8-10 аминокислот), ассоциированного с антигенами гистосовместимости (МНС) класса I (МНС-I) клетки-мишени. При обнаружении элементов генетической чужеродности ЦТЛ активируются под влиянием IFN I типа и IL-2 (фактор роста Т-клеток, вырабатывается Th0 или аутокринно самими ЦТЛ), продуцируют большие количества IFN γ , размножаются и разрушают клетки-мишени (рис. 9, 10) [30].

В циркуляции ЦТЛ существуют в виде клеток-предшественников, активация и созревание которых происходит при содействии Т-хелперов в течение 7-10 дней [31].

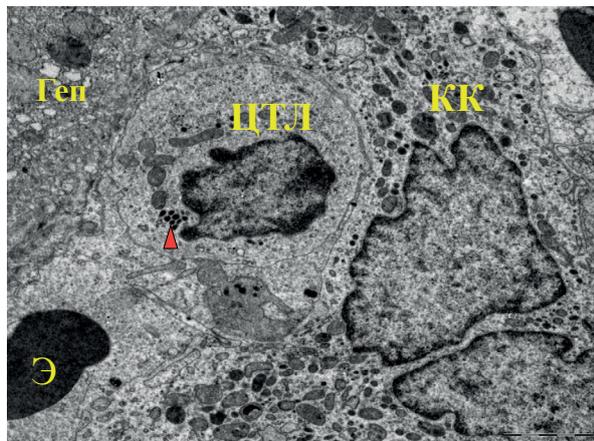


Рисунок 9. – Тесный контакт ЦТЛ (CD8+Т-клетки) с гепатоцитом (Геп) и клеткой Купфера (КК). Кластер электронноплотных мелких гранул обозначен красным наконечником стрелки. «Э» – эритроцит. Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 15000$

Специфические ЦТЛ играют центральную роль в иммунопатогенезе HCV. Во время первичной инфекции, когда адаптивная иммунная система не в состоянии контролировать инфекцию, инфицированные гепатоциты секретируют хемокины, чтобы попытаться привлечь больше защитных клеток. При ХГС описана экспрессия в печени CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL-10, CXCL11, CCR5 и CXCR3 [32, 33]. Установлено, что уровни мРНК внутрипеченочного CXCL10 связаны с внутрилобулярным воспалением и с CXCL9 и CXCL11, которые коррелируют с ак-

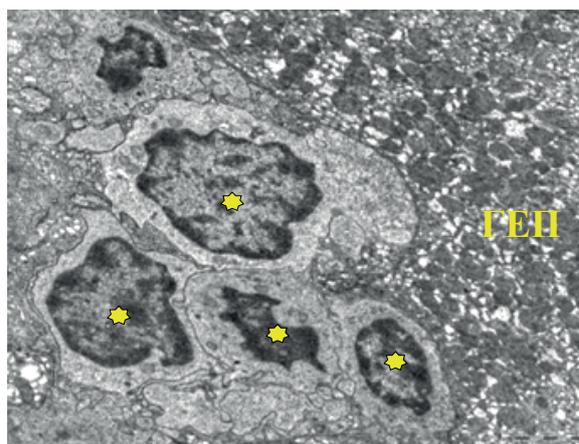


Рисунок 10. – Кластер ЦТЛ (помечены звездочками), участвующих в лизисе гепатоцита (Геп). На границе с лимфоцитами в цитоплазме гепатоцита наблюдается многочисленное скопление митохондрий. Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 8000$

тивностью воспаления печени, а внутрипеченочный уровень CCL5 коррелирует с воспалительной активностью, но не с фиброзом печени. В связи с тем, что хемокины являются неспецифическими хемоаттрактантами, имеющий место внутрипеченочный воспалительный инфильтрат при хронической HCV-инфекции не способен устранить её, но способен продуцировать цитокины, инициирующие и пролонгирующие повреждение печени и фиброгенез [34].

ЦТЛ представляют собой необычные секреторные клетки, использующие модифицированные лизосомы для секреции белков, обладающих литическими свойствами. Передача сигнала от рецепторного комплекса TcR/CD3 вызывает перемещение литических гранул по системе микротрубочек к месту контакта ЦТЛ с клеткой-мишенью и экзоцитоз содержимого гранул (перфорины, гранзимы, ФНО- α) (рис. 11) [35].

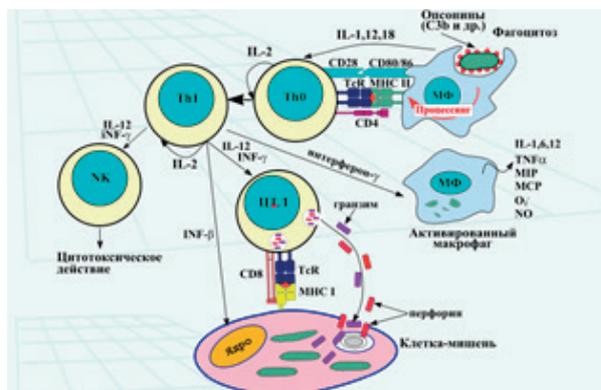
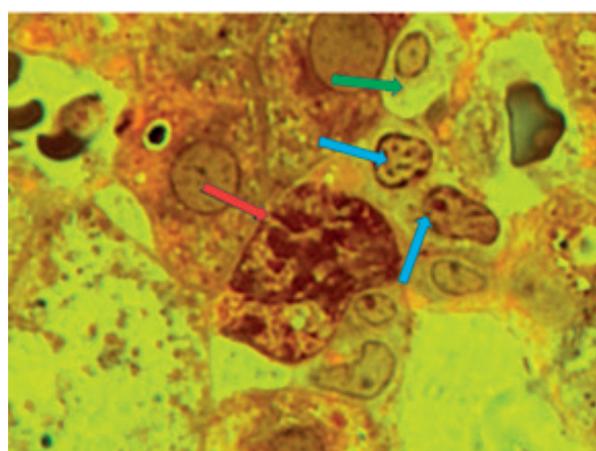
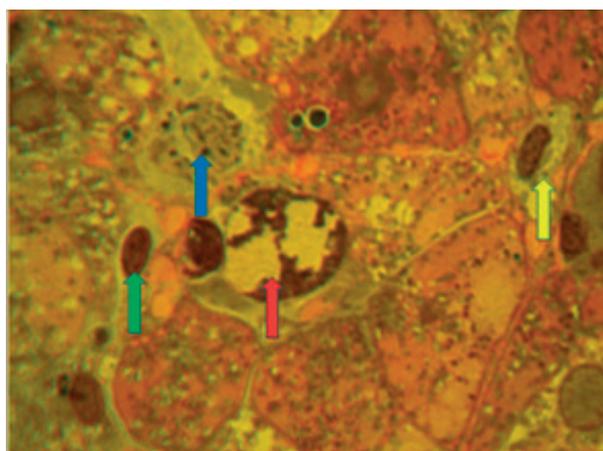


Рисунок 11. – Схема экзоцитоза (<https://nsau.edu.ru>)

В результате нарушения перфорином целостности мембраны, клетка-мишень погибает от осмотического лизиса и при воздействии гранзимов подвергается апоптозу (рис. 12, 13).



Рисунки 12, 13. – Участники процессов апоптоза гепатоцита и фиброгенеза: апоптотный гепатоцит (красная стрелка), ЦТЛ (зеленая стрелка), НК-клетка (желтая стрелка), макрофаг (синяя стрелка), ядра липоцита – активированной (без гранул) клетки Ито (голубые стрелки). Увеличение: объектив 100, окуляр 10

После контакта с первой мишенью ЦТЛ покидает ее и осуществляет поиск следующей, при этом в ЦТЛ быстро образуются новые гранулы. На определенной стадии экспансия ЦТЛ прекращается, когда новоактивированные ЦТЛ уничтожают антигенпрезентирующие клетки, стимулирующие активность ЦТЛ. Важность цитолитической функции при HCV-инфекции подтверждается тем фактом, что ответы CD8+ Т-клеток совпадают не только с уменьшением титров РНК HCV в крови, но также с пиком в сыворотке АлАТ [27].

Часть ЦТЛ – ЦТЛ1 – секретирует цитокины, подобные тем, которые вырабатываются Т-хелперами типа I (Th1), тогда как другие (ЦТЛ2) секретируют цитокины, подобные таковым Th2. В соответствии с этим ЦТЛ1 проявляют цитолитические свойства, тогда как ЦТЛ2 выполняют регуляторные и супрессорные функции, однако, по другим данным, все субпопуляции ЦТЛ являются цитотоксическими. Эти клетки обозначают так же, как Tc1 и Tc2, соответственно. Третья субпопуляция Tc0 не ограничена какой-либо продукцией цитокинов [30].

CD8 + Т-клетки могут существовать в трех состояниях реакционной способности в зависимости от их способности убивать и секретировать эффекторные цитокины во время запуска TCR ex vivo: низкий – для наивных CD8+ Т-клеток, высокий – для активированных/эффекторных CD8+ Т-клеток, и промежуточный – для памяти CD8 + Т-клеток [30].

Так «малый», наивный, неактивированный ЦТЛ представляет собой клетку размером 6-9 мкм с округлым ядром, содержащий плотный гетерохроматин и узкий ободок цитоплазмы с небольшим количеством органоидов (рис. 14).

Активированный лимфоцит – клетка с увеличенной площадью цитоплазмы и количеством органелл, размером около 9 мкм, в ядре которой преобладает эухроматин (рис. 15, 16).

Киллерный эффект ЦТЛ в отношении пораженных HCV гепатоцитов выражается в трех разновидностях этого процесса: активного периполеза (рис. 17), инвагинации и эмпериполеза (рис. 15).

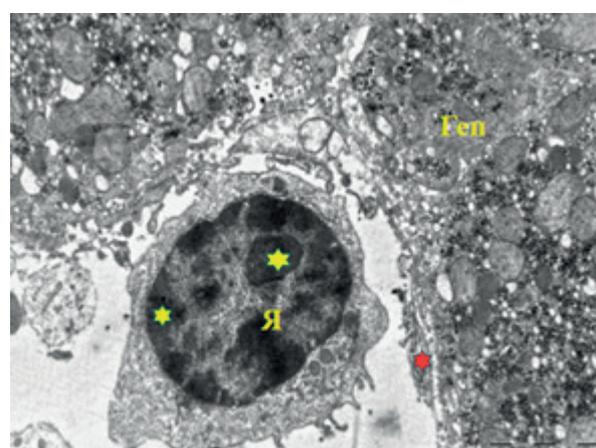


Рисунок 14. – «Малый», наивный, неактивированный ЦТЛ с округлым ядром (Я), содержащий плотный гетерохроматин (обозначен желтыми звездочками) и узкий ободок цитоплазмы с небольшим количеством органоидов. Разрушающаяся эндотелиальная клетка отмечена красной звездочкой. Геп – гепатоцит. Электронограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм. – ×8 000

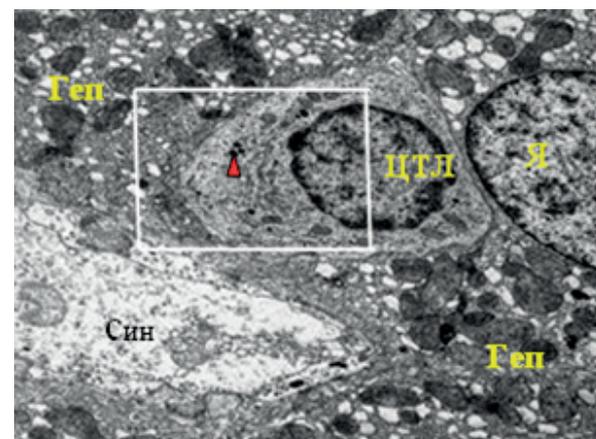


Рисунок 15. – Эмпериполез ЦТЛ (CD8+ Т-клетки) в гепатоцит. Сближение плазмолеммы ЦТЛ с ядром (Я) гепатоцита (Геп). Интенсивная вакуолизация цитоплазмы гепатоцита указывает на инфицированность клетки вирусом. Син – синусоид. Электронограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм. – ×10 000

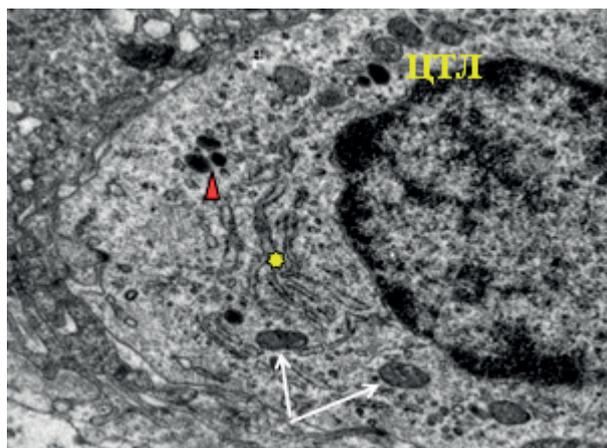


Рисунок 15. – Эмпериопоз ЦТЛ (CD8+ Т-клетки) в гепатоцит. Сближение плазмолеммы ЦТЛ с ядром (Я) гепатоцита (Геп). Интенсивная вакуолизация цитоплазмы гепатоцита указывает на инфицированность клетки вирусом. Син – синусоид. Электронограмма. Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 10\ 000$

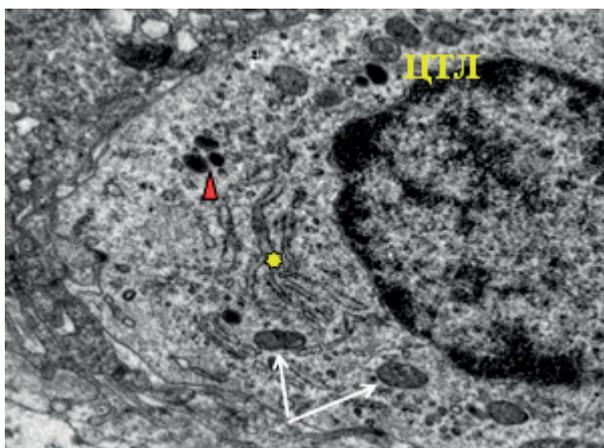


Рисунок 16. – Фрагмент цитоплазмы ЦТЛ при большем увеличении. На активность ЦТЛ указывают: преобладание эухроматина над гетерохроматином, развитая зернистая эндоплазматическая сеть (звездочка) и свободные рибосомы, литические гранулы (красный наконечник стрелки). Белые стрелки – митохондрии. Электронограмма.

Масштабный отрезок равен 1 мкм – $\times 25\ 000$

Активный периполез – внедрение мигрирующих лимфоцитов между гепатоцитами с нарушением их межклеточных контактов, вплоть до лизиса мембраны гепатоцита (рис. 17). Инвагинация – впячивание участка плазмолеммы в цитоплазму гепатоцита с наличием лимфоцита в инвагинате. Эмпериопоз – пенетрация лимфоцитом плазмолеммы и внедрение в цитоплазму гепатоцита с последующим его лизисом (рис. 15).

Механизмы разрушения клеток-мишеней ЦТЛ аналогичны НК-лимфоцитам, однако в отличие от НК-клеток ЦТЛ формируют клетки-памяти. Каждый ЦТЛ может лизировать несколько клеток-мишеней с максимальной скоростью

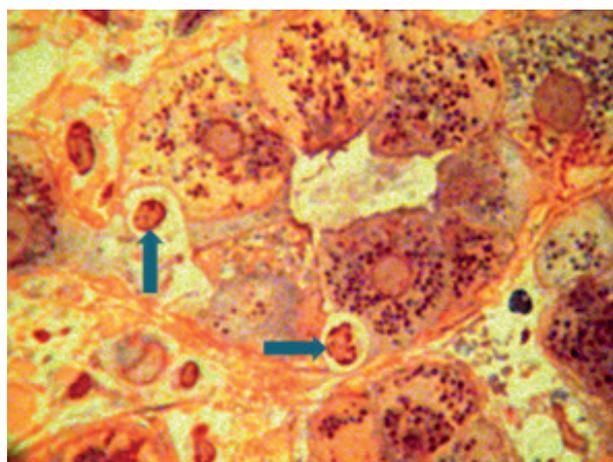


Рисунок 17. – Группа гепатоцитов, окружённая фиброзной тканью. Стрелками показаны ЦТЛ («агрессивные») в контакте с гепатоцитами (активный периполез). Полутоновый срез фрагмента печёночной ткани из биоптата пациента с неэффективной интерферонотерапией. Увеличение: объектив 100, окуляр 10

4 клетки-мишени в час, лизис протекает быстро и при инкубировании *in vitro* сенсibilизированных ЦТЛ с клетками-мишенями завершается за 1-3 часа. При взаимодействии двух ЦТЛ, обладающих антигенраспознающей способностью, литические функции проявляет только одна клетка, вторая разрушается (рис. 18, 19).

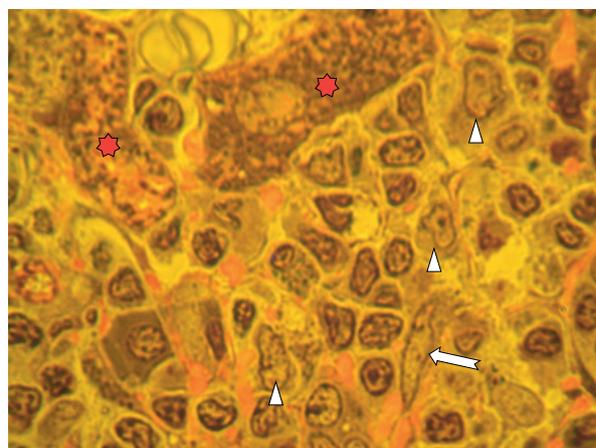


Рисунок 18. – Обширный очаг лизиса гепатоцитов внутри дольки. Частично лизированные гепатоциты (звездочки). Клеточный инфильтрат состоит из лимфоцитов, макрофагов (отмечены наконечником стрелки), фибробластов (фигурная стрелка). Пучки коллагеновых волокон красного цвета. $\times 1000$

Проявление цитолитического действия ЦТЛ развивается в два этапа. Первый сопровождается образованием специфически сенсibilизированных эффекторных клеток, способных оказывать цитолитическое действие на соответствующие клетки-мишени, и клеток памяти. На втором этапе осуществляется собственно эффекторная функция активированных (сенсibilизированных) Т-клеток, развиваются следующие основ-

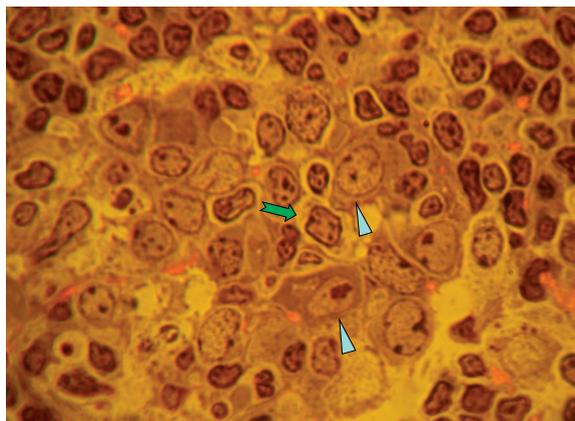


Рисунок 19. – Центральная часть перипортального лимфоидного фолликула представлена макрофагами, дендритическими ретикулярными клетками (наконечники стрелки), активированными ЦТЛ (фигурная стрелка). По периферии фолликула (сверху и справа) многочисленные ряды незрелых лимфоцитов (черные стрелки). $\times 1000$

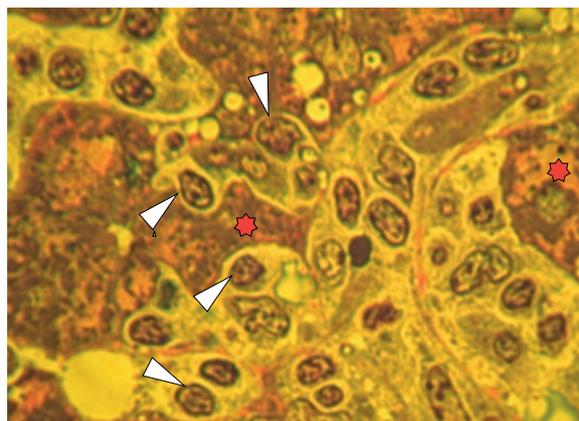


Рисунок 21. – Нарушение цитоархитектоники печеночной ткани, вызванное высокой активностью ЦТЛ (наконечник стрелки). Звездочкой отмечены частично лизированные гепатоциты. Полутонкий срез. $\times 1000$

ные стадии цитотоксического действия ЦТЛ на клетки-мишени (рис. 15-21):

- взаимодействие ЦТЛ с клеткой-мишенью;
- адгезия и образование иммунологического синапса;
- распознавание антигенсвязывающим комплексом ЦТЛ «свое»-«чужое» поверхностных мембранных структур клетки-мишени;

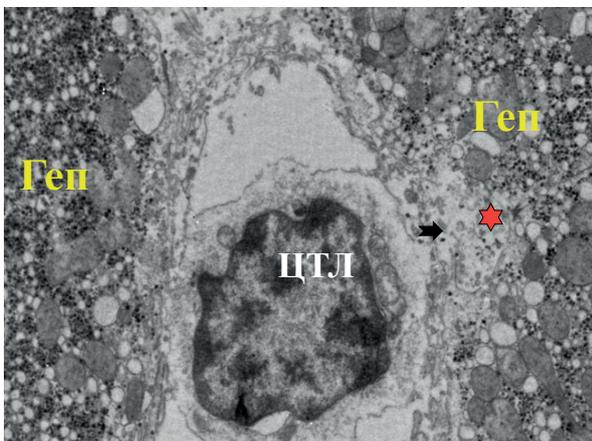


Рисунок 20. – Взаимодействие ЦТЛ с клеткой-мишенью – гепатоцитом (Геп), инфицированным HCV. Нарушение целостности плазмолеммы гепатоцита (стрелка). На участке адгезии ЦТЛ локальная деструкция цитоплазмы гепатоцита (звездочка). Электронограмма, $\times 12000$

- летальный удар (секреция ЦТЛ молекул – перфоринов, гранзимов) и готовность ЦТЛ к взаимодействию с новой клеткой-мишенью;
- независимый от присутствия ЦТЛ лизис клетки-мишени.

Хроническая HCV-инфекция характеризуется неспецифическим воспалительным инфильтратом в печени, представленным главным образом CD8+ клетками [36].

Воспалительный инфильтрат располагается в портальном тракте и может выходить за его пределы, причем могут быть поражены или отдельные тракты, или их большинство (рис. 22, 23).

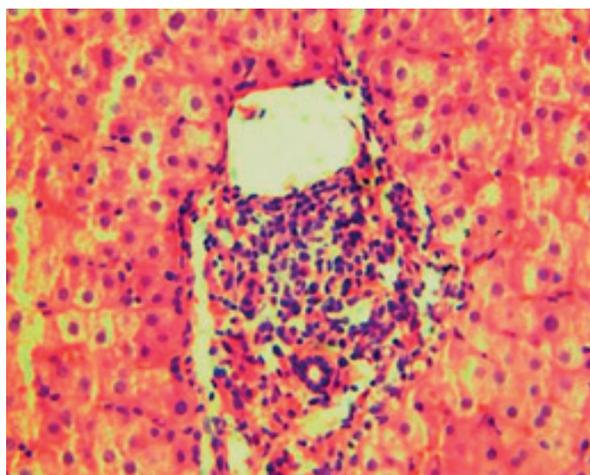


Рисунок 22. – Умеренно выраженная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация портального тракта. Окр.: гематоксилином и эозином. $\times 200$

Инфильтрат располагается в виде небольших либо значительных скоплений, причем при ХГС на фоне клеточной инфильтрации формируются очаговые лимфоидные скопления в виде лимфоидных фолликулов, располагающихся как в портальных трактах, так и в дольках (рис. 24, 25).

При ХГС отмечаются гиперплазия звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и эндотелия, скопление лимфоцитов в виде цепочек в синусоидах (рис. 26). Не остаются интактными и желчные протоки, иногда видна деструкция стенок и пролиферация эпителия (рис. 27).

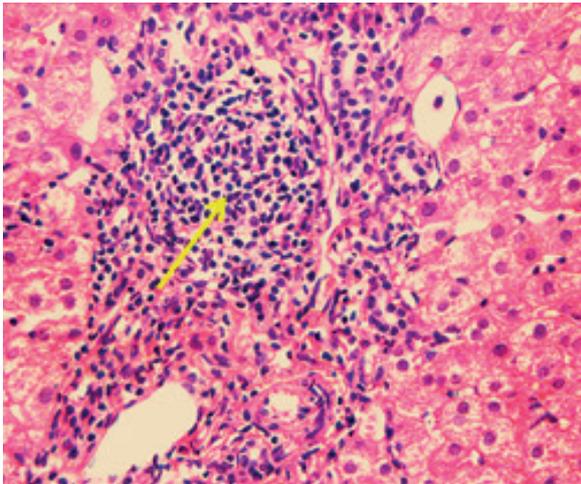


Рисунок 23 – Резко выраженная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация портального тракта с формированием лимфоидного фолликула (стрелка) и распространением воспаления на перипортальную зону.
Окр.: гематоксилином и эозином. $\times 200$.

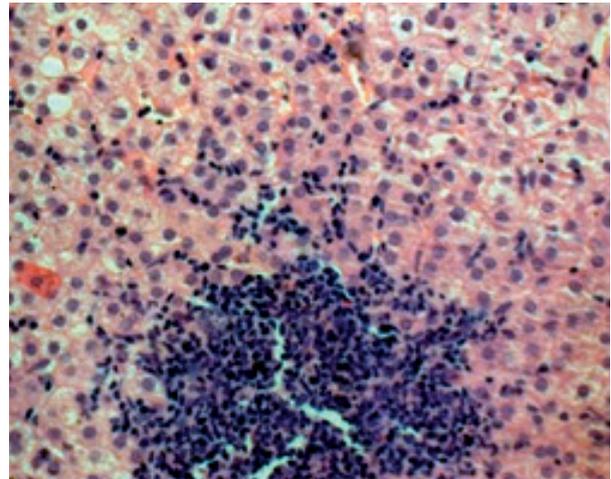


Рисунок 26 – HCV умеренной степени активности: лимфоидная инфильтрация портального тракта с образованием фолликула; инфильтрат проникает в дольку; ступенчатые некрозы гепатоцитов; цепочки лимфоцитов в синусоидах. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$.

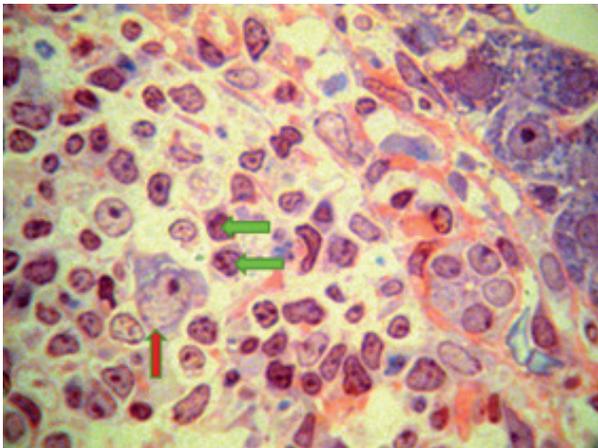


Рисунок 24. – Участок лимфоцитарно-макрофагального клеточного инфильтрата, расположенного в портальной зоне. Красная стрелка – макрофаг, зеленые – ЦТЛ. $\times 1000$

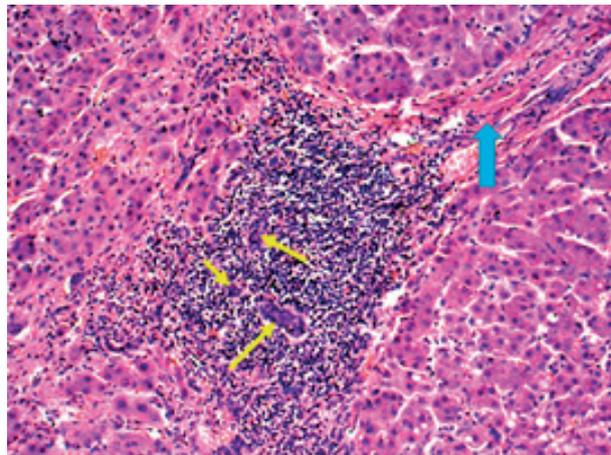


Рисунок 27. – Резко выраженная воспалительная инфильтрация портального тракта и перипортальной зоны с формированием лимфоидного фолликула; пролиферация желчных протоков (желтые стрелки); порто-портальная септа (синяя стрелка). Окр.: гематоксилином и эозином. $\times 100$

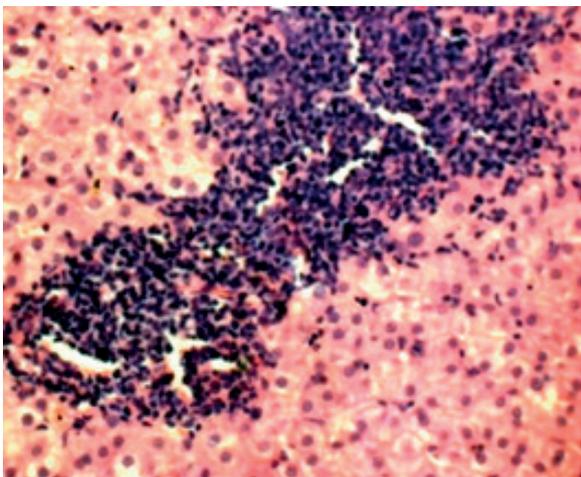


Рисунок 25 – Резко выраженная инфильтрация портального тракта и дольки с образованием лимфоидного фолликула. Окр.: гематоксилином и эозином. $\times 100$.

Методы морфологической оценки воспалительной инфильтрации в биоптатах печени. Светооптические и электронно-микроскопические методы дифференцировки субпопуляций лимфоцитов проблематичны, поэтому для точной идентификации клеток применяют иммуноморфологический метод с использованием моноклональных антител. С другой стороны, до сих пор морфологическая характеристика лимфоцитов (отдельно как клеток иммунной системы печени) при оценке активности и стадии хронизации при хронических повреждениях печени, к сожалению, не учитывается ни в одной классификации [8].

В существующих международных классификациях лимфоцитарный компонент фиксируется

при оценке степени активности патологического процесса с помощью индекса гистологической активности (ИГА, индекса Knodell). В биоптате печени морфолог оценивает перипортальные и мостовидные некрозы, внутридольковые фокальные некрозы и дистрофию гепатоцитов, воспалительный инфильтрат в портальных трактах и фиброз. ИГА от 1 до 3 баллов соответствует минимальной активности, 4-8 баллов – низкой, 9-12 баллов – умеренной, 13-18 баллов – высокой активности хронического гепатита.

Включение в общую комплексную оценку (ИГА) показателя, характеризующего воспалительный инфильтрат в портальных трактах (0-4 балла), подразумевает описание и количественную оценку воспалительной инфильтрации портальных трактов (ВИПТ).

Оценка ВИПТ по шкале Knodell предусматривает следующие градации: отсутствие ВИПТ – 0 баллов; умеренная – инфильтрация воспалительными клетками от 1/3 до 2/3 портальных трактов (ПТ) – 1 балл; слабо выраженная – инфильтрация воспалительными клетками <1/3 ПТ – 3 балла; выраженная инфильтрация >2/3 ПТ – 4 балла. Одним из недостатков является отсутствие в данной классификации показателя, оцениваемого в 2 балла.

Оценка портального воспаления по V. M. Desmet et al. предусматривает следующие оценочные баллы: отсутствие воспаления – 0 баллов, слабо выраженное (единичные воспалительные клетки в менее 1/3 портальных трактов) – 1 балл, а также компоненты портального воспаления: умеренно выраженное (повышенное количество воспалительных клеток в 1/3-2/3 портальных трактов) – 3 балла, выраженное воспаление (большие скопления воспалительных клеток в 2/3 портальных трактов) – 4 балла.

Оценка воспаления по K. Ishak. В 1995 г. ведущими морфологами мира под руководством К. Ishak предложена методика полуколичественной оценки степени активности воспаления. Оценка портального воспаления проводится по следующей полуколичественной шкале: отсутствие воспаления (инфильтрации) – 0 баллов, легкое в некоторых или всех портальных трактах – 1 балл, умеренное в некоторых или всех портальных трактах – 2 балла, умеренное/выраженное во всех портальных трактах – 3 балла, выраженное во всех портальных трактах – 4 балла. К сожалению, не учитывается наличие воспалительной инфильтрации в синусоидах.

По мнению автора, дополнительными изменениями в биоптате, которые должны быть описаны в заключении, но не подлежат количественной оценке, являются: воспаление и поражение желчных протоков; лимфоидные фолликулы, а также стеатоз и его степень (слабо-, умеренно- или значительно выраженный); гепатоцеллюлярная дисплазия (крупно- или мелко-клеточная); аденоматозная гиперплазия; повышенный уровень железа или меди; внутриклеточные включения: тельца Мэллори.

Оценка воспаления в биоптате печени по шкале МЕТАВИР предусматривает подразделение на следующие категории: 0 – минимальная активность, 1 – умеренная активность, 2 – выраженная активность воспаления в печени.

Оценка воспаления в биоптате печени по В. В. Серову (1996). Эта система оценки широко используется в нашей клинике. Количественно показатели оценки воспаления выглядят следующим образом: наличие воспаления в портальных трактах (в зависимости от числа пораженных трактов) – 1-3 балла, в перипортальной зоне (слабый, умеренный, выраженный) – 2-6 баллов, внутри долек – 1-3 балла, лимфоидные фолликулы в портальных трактах и(или) внутри долек (в зависимости от числа пораженных трактов и долек) – 1-6 баллов. В количественную оценку шкалы В. В. Серова, в отличие от других, включены изменения в синусоидах: гиперплазия звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и эндотелия (1-3 балла), цепочки лимфоцитов в синусоидах (1-6 баллов) и желчных протоках: деструкция желчных протоков (1-3 балла), пролиферация желчных протоков (слабая, умеренная, выраженная) – 1-6 баллов.

В большинстве клинических классификаций при оценке активности воспаления не учитываются структурно-функциональные характеристики лимфоцитов. Вероятно, это связано с недостаточной информативностью метода классической световой микроскопии, при которой количественный анализ затруднен в связи с большой вероятностью ошибки при подсчете количества лимфоцитов и их дифференцировки. Нами предложен способ прогнозирования рецидива ХГС после достижения полного ответа на интерферонотерапию, заключающийся в определении индекса гистологической активности (ГИСА) и количества ЦТЛ в синусоидах (расчет ведется на 100 синусоидов) в биоптате печени, забранном при повторной биопсии. При снижении показателей ГиСА до 4 и более баллов, отсутствии ЦТЛ в синусоидах печени после курса терапии прогнозируется стойкая ремиссия; при наличии 30 и более ЦТЛ в синусоидах печени, несмотря на снижение показателей ГиСА, – прогнозируется рецидив [8].

Заключение

Печень представляет собой важный регуляторный лимфоидный орган иммунной системы, в котором реализуются несколько механизмов цитотоксичности, обеспечиваемой представителями врожденного и адаптивного иммунитета. Наиболее изученными участниками развития цитотоксичности при хронических вирусных гепатитах являются лимфоциты, обеспечивающие прямое и опосредованное повреждение гепатоцитов: NK-клетки, NKT-клетки, LGL и ЦТЛ (CD8 + Т-клетки), которые различают фенотипически и по своим структурным и функциональным характеристикам. Основным механизмом опосредованного Т-клеточного лизиса при HCV-инфекции, возбудитель которой является нецитопатическим вирусом, является ци-

токсичность, опосредованная перфорин-гранзимным лизисом клетки-мишени (апоптоз). Адаптивный клеточный иммунитет, опосредованный ЦТЛ (CD8+), играет решающую роль в воспалительном повреждении гепатоцитов из-за иммунной толерантности HCV-специфических CD8+ при хронической HCV-инфекции.

Классический метод световой микроскопии биоптатов печени не позволяет дифференциро-

вать популяции цитотоксических лимфоцитов, в отличие от световой микроскопии полутонких срезов и электронной микроскопии. Дополнительным морфологическим показателем для оценки активности и мониторинга воспаления в печени может стать морфологическая (количественная) характеристика клеточной популяции лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета.

Литература

- Ивашкин, В. Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С / В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009. – Т. 19, № 6. – С. 4-10.
- Adaptive immune response during hepatitis C virus infection / J. R. Larrubia [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20 (13). – P. 3418-3430. – doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3418.
- Heim, M. H. Innate and adaptive immune responses in HCV infections / M. H. Heim, R. Thimme // *Journal of Hepatology*. – 2014. – Vol. 61 (1). – P. 14-25. – doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.035.
- NK-клетки. Функции NK-клеток [Электронный ресурс] // *Dommedika. Современная медицина: медицинский портал*. – Режим доступа: <http://dommedika.com/physiology/796.html>. – Дата доступа: 02.03.2018.
- Nemeth, E. Microanatomy of the liver immune system / E. Nemeth, A. W. Baird, C. O'Farrelly // *Seminars in Immunopathology*. – 2009. – Vol. 31 (3). – P. 333-343. – doi: 10.1007/s00281-009-0173-4.
- Proliferation and maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance / L. Diehl [et al.] // *Hepatology*. – 2008. – Vol. 47 (1). – P. 296-305.
- Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization / N. Von Oppen [et al.] // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 49 (5). – P. 1664-1672. – doi: 10.1002/hep.22795.
- Цыркунов, В. М. HCV-инфекция : монография / В. М. Цыркунов, Н. В. Матиевская, С. П. Лукашик ; под ред. В. М. Цыркунова. – Минск : Асар, 2012. – 480 с.
- Клиническая цитология печени: звездчатые клетки Ито / В. М. Цыркунов [и др.] // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2016. – № 4 (56). – С. 90-99.
- Клиническая цитология печени: клетки Купффера / В. М. Цыркунов [и др.] // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 419-431. – doi: <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-4-419-431>.
- Шерлок, Ш. Заболевание печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 1999. – 864 с.
- Струков, А. И. Патологическая анатомия : учебник / А. И. Струков, В. В. Серов ; под ред. В. С. Паукова. – 6-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 880 с.
- Sato, T. An electron microscopic study of specimen-fixed for longer periods in phosphate buffered formalin / T. Sato, I. Takagi // *Journal of Electron Microscopy*. – 1982. – Vol. 31, № 4. – P. 423-428. – <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a050388>.
- Glauert, R. H. Araldite as embedding medium for electron microscopy / R. H. Glauert // *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. – 1958. – Vol. 4. – P. 409-414.
- Millonig, G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G. A. Millonig // *Journal of Applied Physics*. – 1961. – Vol. 32. – P. 1637-1643.
- Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M. L. Watson // *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. – 1958. – Vol. 4. – P. 475-478.
- Glauert, A. M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens / A. M. Glauert // *Practical Methods in Electron Microscopy* / A. M. Glauert [ed.]. – New York : American Elsevier, 1975. – Vol. 3, part 1. – 207 p.
- Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *The Journal of Cell Biology*. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
- Клиническая морфология печени: дисплазия, апоптоз, регенерация / В. М. Цыркунов [и др.] // *Гепатология и гастроэнтерология*. – 2017. – Т. 1, № 1. – С. 41-52.
- Клиническая морфология печени: некрозы / В. М. Цыркунов [и др.] // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 557-568. – doi: <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-5-557-568>.
- Pahl, J. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity / J. Pahl, A. Cerwenka // *Immunobiology*. – 2017. – Vol. 222 (1). – P. 11-20. – doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.012.
- Holz, L. E. Mechanisms of T cell death in the liver: to Bim or not to Bim? / L. E. Holz, D. G. Bowen, P. Bertolino // *Digestive Diseases*. – 2010. – Vol. 28 (1). – P. 14-24. – doi: 10.1159/000282060.
- On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells / E. Wisse [et al.] // *Seminars in Liver Disease*. – 1997. – Vol. 17 (4). – P. 265-286.
- Bouwens, L. Pit cells in the liver / L. Bouwens, E. Wisse // *Liver*. – 1992. – Vol. 12 (1). – P. 3-9. – <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1992.tb00547.x>.
- Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function / K. Nakatani [et al.] // *Medical Electron Microscopy*. – 2004. – Vol. 37 (1). – P. 29-36.
- Jakab, L. The liver and the immune system / L. Jakab // *Orvosi Hetilap*. – 2015. – Vol. 156 (30). – P. 1203-1213. – doi: 10.1556/650.2015.30190.
- Sung, P. S. CD8+ T-Cell Responses in Acute Hepatitis C Virus Infection / P. S. Sung, V. Racanelli, E.-C. Shin // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 266. – doi: 10.3389/fimmu.2014.00266.
- Adaptive immunity in the liver / Z. Shuai [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2016. – Vol. 13 (3). – P. 354-368. – doi: 10.1038/cmi.2016.4.
- Gao, B. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases / B. Gao, S. Radaeva, O. Park // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – Vol. 86 (3). – P. 513-528. – doi: 10.1189/JLB.0309135.
- Sun, J. C. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8T cells / J. C. Sun, L. L. Lanier // *Nature Reviews Immunology*. – 2011. – Vol. 11 (10). – P. 645-

657. – doi: 10.1038/nri3044.

31. Adaptive immunity in the liver / S. Zongwen [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2016. – Vol. 13 (3). – P. 354-368. – doi: 10.1038/cmi.2016.4.

32. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection / J. R. Larrubia [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2007. – Vol. 47 (5). – P. 632-641. – <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.009>.

33. CXCR5+ CD8+ T Cells Indirectly Offer B Cell Help and Are Inversely Correlated with Viral Load in Chronic Hepatitis B Infection / H. Jiang [et al.] // *DNA and Cell Biology*. – 2017. – Vol. 36 (4). – P. 321-327. – doi: 10.1089/dna.2016.3571.

34. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection / J. R. Larrubia [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 14 (47). – P. 7149-7159. – doi: 10.3748/wjg.14.7149.

35. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection / H. Wedemeyer [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2002. – Vol. 169 (6). – P. 3447-3458.

36. Kayla, A. Natural Killer Cell Function and Dysfunction in Hepatitis C Virus Infection [Электронный ресурс] / A. Kayla, R. S Russell, M. D. Grant // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/903764/>. – <http://dx.doi.org/10.1155/2014/903764>.

References

1. Ivashkin VT. Immunnaja sistema i povrezhdenija pecheni pri hronicheskikh gepatitah V i S [Immune system and damage of liver at chronic hepatitis B and C]. *Rossijskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii* [Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology]. 2009;19(6):4-10. (Russian).

2. Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, García-Garzón S, Lázaro A, Miquel J, Perna C, Sanz-de-Villalobos E. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20 (13):3418-3430. doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3418.

3. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *Journal of Hepatology*. 2014;61(1):14-25. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.035.

4. NK-kletki. Funkcii NK-kletok [Internet] // Dommedika. Sovremennaja medicina: medicinskij portal. Available from: <http://dommedika.com/physiology/796.html>. (accessed 02.03.2018). (Russian).

5. Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system. *Seminars in Immunopathology*. 2009;31(3):333-343. doi: 10.1007/s00281-009-0173-4.

6. Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology*. 2008;47(1):296-305.

7. Schurich A, Hegenbarth S, Stabenow D, Tolba R, Weiskirchen R, Geerts A, Kolanus W, Knolle P, Diehl L. Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology*. 2009;49(5):1664-1672. doi: 10.1002/hep.22795.

8. Tsyrukunov VM, Matsiyevskaya NV, Lukashyk SP. HCV-infekcija [HCV-infection]. Minsk: Asar; 2012. 480 p. (Russian).

9. Tsyrukunov VM, Andreev VP, Kravchuk RI, Kandratovich IA. Klinicheskaja citologija pecheni: zvezdchatye kletki Ito

[Clinical cytology of the liver: ITO stellate cells (hepatic stellate cells)]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2016;4(56):90-99. (Russian).

10. Tsyrukunov VM, Andreev VP, Kravchuk RI, Prokopchik NI. Klinicheskaja citologija pecheni: kletki Kupffera [Clinical cytology of the liver: Kupffer cells]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2017;15(4):419-431. doi: <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-4-419-431>. (Russian).

11. Sherlok Sh, Duli Dzh. Zabolevanie pecheni i zhelchnykh putej. Moscow: GJeOTAR-Media; 1999. 864 p. (Russian).

12. Strukov AI, Serov VV; Paukova VS, editor. Patologicheskaya anatomija: uchebnik [Pathological anatomy: a textbook]. 6th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. 880 p. (Russian).

13. Sato T, Takagi I. An electron microscopic study of specimen-fixed for longer periods in phosphate buffered formalin. *Journal of Electron Microscopy*. 1982;31(4):423-428. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a050388>.

14. Glauert AM, Glauert RH. Araldite as embedding medium for electron microscopy. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1958;4(2):409-414.

15. Millonig GA. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *Journal of Applied Physics*. 1961;32:1637-1643.

16. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1958;4:475-478.

17. Glauert AM, editor. Practical Methods in Electron Microscopy. Vol. 3, Pt. 1, Glauert AM. Fixation, degydration and embedding of biological specimens. New York: American Elsevier; 1975. 207 p.

18. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 1963;17:208-212.

19. Tsyrukunov VM, Andreev VP, Prokopchik NI, Kravchuk RI. Klinicheskaja morfologija pecheni: distroffii [Clinical morphology of the liver: disropfies]. *Gepatologija i gastrojenterologija* [Hepatology and Gastroenterology]. 2017;1(2):140-151. (Russian).

20. Tsyrukunov VM, Prokopchik NI, Andreev VP, Kravchuk RI. Klinicheskaja morfologija pecheni: nekrozy [Clinical morphology of the liver: necrosis]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2017;15(5):557-568. doi: <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-5-557-568>.

21. Pahl J, Cerwenka A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology*. 2017;222(1):11-20. doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.012.

22. Holz LE, Bowen DG, Bertolino P. Mechanisms of T cell death in the liver: to Bim or not to Bim? *Digestive Diseases*. 2010;28(1):14-24. doi: 10.1159/000282060.

23. Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Seminars in Liver Disease*. 1997;17(4):265-286.

24. Bouwens L, Wisse E. Pit cells in the liver. *Liver*. 1992;12(1):3-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1992.tb00547.x>

25. Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Medical Electron Microscopy*. 2004;37(1):29-36.

26. Jakab, L. The liver and the immune system. *Orvosi Hetilap*. 2015;156(30):1203-1213. doi: 10.1556/650.2015.30190.

27. Sung PS, Racanelli V, Shin E.-C. CD8+ T-Cell Responses in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:266. doi: 10.3389/fimmu.2014.00266.
28. Shuai Z1, Leung MW, He X, Zhang W, Yang G, Leung PS, Eric Gershwin M. Adaptive immunity in the liver. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016;13(3):354-368. doi: 10.1038/cmi.2016.4.
29. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;86(3):513-528. doi: 10.1189/JLB.0309135.
30. Sun JC, Sun LL, Lanier JC. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(10):645-657. doi: 10.1038/nri3044.
31. Zongwen S, Leung MWY, He X, Zhang W, Yang G, Leung PSC, Gershwin ME. Adaptive immunity in the liver. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016;13(3):354-368. doi: 10.1038/cmi.2016.4.
32. Larrubia JR, Calvino M, Benito S, Sanz-de-Villalobos E, Perna C, Pérez-Hornedo J, González-Mateos F, García-Garzón S, Bienvenido A, Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. 2007;47(5):632-641. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.009>.
33. Jiang HLiL, Han J, Sun Z, Rong Y, Jin Y. CXCR5+ CD8+ T Cells Indirectly Offer B Cell Help and Are Inversely Correlated with Viral Load in Chronic Hepatitis B Infection. *DNA and Cell Biology*. 2017;36(4):321-327. doi: 10.1089/dna.2016.3571.
34. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(47):7149-7159. doi: 10.3748/wjg.14.7149.
35. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection / et al.]. *Journal of Immunology*. 2002;169(6):3447-3458.
36. Kayla A, Russell RS, Grant MD. Natural Killer Cell Function and Dysfunction in Hepatitis C Virus Infection [Internet]. *BioMed Research International*. 2014; 2014. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/903764/>. (accessed 12.03.2018). <http://dx.doi.org/10.1155/2014/903764>.

CLINICAL LIVER MORPHOLOGY: CYTOTOXIC LYMPHOCYTES

Tsyrukunov V. M., Andreev V. P., Prokopchik N. I., Kravchuk R. I.

Educational Institution «Grodno State Medical University Grodno», Grodno, Belarus

Background. The liver is the organ of the immune system, in which various populations of lymphocytes are representatives of congenital and acquired immunity: NK cells, NKT cells, LGL cells, CD8 + (CTL) cells that participate in cytotoxic reactions.

The aim of the study is to present the structural and functional characteristics of the main populations of cytotoxic lymphocytes that take an active part in the development of inflammation in viral liver damage.

Material and methods. Morphological evaluation of intravital hepatic biopsy specimens of patients with chronic viral hepatitis was performed by light and electron microscopy with the use of classical and original techniques for fixing and staining preparations.

Results. A detailed description of the structure of the main populations of lymphocytes in the liver (NK cells, NKT cells, LGL cells, CD8 + cells) and their basic immunomorphological data and cytotoxic characteristics are presented. The main methods used in clinical practice for morphological evaluation of the activity of inflammation in the liver are described.

Conclusions. The most studied participants in the development of cytotoxicity in chronic viral hepatitis are lymphocytes, which cause direct and indirect damage to hepatocytes: NK cells, NKT cells, LGL and CTL (CD8+ T cells) cells that differ by their phenotypic as well as structural and functional characteristics. The classical method of light microscopy of liver biopsy samples does not allow to differentiate populations of cytotoxic lymphocytes, in contrast to light microscopy of semi-thin sections and electron microscopy. An additional morphological indicator for the evaluation of activity and monitoring of inflammation in the liver can be a morphological (quantitative) characteristic of the cellular population of lymphocytes of the congenital and adaptive immunity.

Keywords: liver, cytotoxic lymphocytes, inflammation, morphology.

Поступила: 27.03.2018

Отрецензирована: 10.04.2018