

УДК 576.31: 612.014.2/.35: 616-006.327.03

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ ФИБРОЗА

Постникова О.А., Непомнящих Д.Л., Айдагулова С.В., Виноградова Е.В., Капустина В.И., Нохрина Ж.В.

*НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Новосибирск,
e-mail: pathol@soramn.ru*

Проведен ультраструктурный, иммуногистохимический и морфометрический анализ популяции звездчатых клеток печени в динамике развития фиброза и цирроза инфекционно-вирусного генеза. Выявлена фиброгенная активация звездчатых клеток печени, которая характеризуется редукцией липидных капель и синхронной экспрессией фибробластоподобных характеристик – позитивной иммуногистохимической реакцией на гладкомышечный α -актин, гиперплазией гранулярной цитоплазматической сети и перицеллюлярным формированием многочисленных коллагеновых фибрилл. Показано, что, несмотря на прогрессирующее уменьшение численной плотности липидосодержащих звездчатых клеток при развитии фиброза, сохраняется необходимость поддержания функции депонирования ретиноидов – при циррозе печени в фиброзных септах и внутри долек обнаружены липидосодержащие звездчатые клетки. Сделано заключение, что звездчатые клетки печени – полиморфная гетерогенная популяция с широким спектром функциональной активности.

Ключевые слова: фиброгенез, звездчатые клетки печени, ультраструктура, иммуногистохимия

STRUCTURAL-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LIVER STELLATE CELLS IN FIBROGENESIS

Postnikova O.A., Nepomnyashchikh D.L., Aidagulova S.V., Vinogradova E.V., Kapustina V.I., Nohrina Z.V.

*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS, Novosibirsk,
e-mail: pathol@soramn.ru*

According to ultrastructural, immunohistochemical, and morphometric analysis the population of stellate cells of liver has been investigated in the process of development of fibrosis and cirrhosis of infectious-viral genesis. Fibrogenic activation of stellate cells of liver is characterized by reduction of lipidic drops and synchronous expression of fibroblast-like characteristics – positive immunohistochemical reaction to smooth muscle α -actin, hyperplasia of granular cytoplasmic reticulum and pericellular forming of numerous collagenous fibrils. In spite of progressing decrease in number density of lipid carrying stellate cells during fibrosis development the necessity of maintenance of retinoids deposit function remains – lipid carrying stellate cells have been found in fibrous septum and inside liver lobes under liver cirrhosis. As a whole, liver stellate cells are the polymorphic heterogenic population with wide spectrum of functional activity.

Keywords: fibrogenesis, stellate cells of liver, ultrastructure, immunohistochemistry

Звездчатые клетки печени (липоциты, клетки Ито, жиронакапливающие клетки печени) локализуются в пространствах Диссе между гепатоцитами и эндотелиальной выстилкой синусоидов и играют ведущую роль в регуляции гомеостаза ретиноидов, депонируя до 80% витамина А [1, 8]. Пространство Диссе является зоной наибольшей функциональной ответственности, обеспечивая транссинусоидальный обмен. С помощью экспериментальных моделей и в культуре клеток продемонстрировано, что звездчатые клетки печени дифференцируются по крупным цитоплазматическим липидным каплям, содержащим витамин А; этот фенотип интерпретирован как «покоящийся».

Все большее значение придается роли звездчатых клеток в развитии фиброза и цирроза печени. При получении фиброгенных стимулов «покоящиеся» звездчатые клетки «трансдифференцируются», приобретая миофибробластоподобный фенотип, и начинают продуцировать коллаген, протеогликаны и другие компоненты экс-

трацеллюлярного матрикса [6]. Фиброз на уровне центральных вен, синусоидов или портальных сосудов лимитирует нормальную гемодинамику печени, что приводит к сокращению метаболически эффективной паренхимы, в дальнейшем – портальной гипертензии и порто-системному шунтированию. Накопление соединительной ткани в пространствах Диссе нарушает нормальный метаболический трафик между кровью и гепатоцитами, препятствуя клиренсу циркулирующих макромолекул, изменяя межклеточные взаимодействия и приводя к дисфункции клеток печени [2].

Существуют противоречивые мнения относительно того, способны ли активированные звездчатые клетки возвращаться к покоящемуся фенотипу. Получены данные о том, что фиброгенные звездчатые клетки печени могут частично нивелировать процесс активации, например, при воздействии ретиноидов или при взаимодействии с компонентами экстрацеллюлярного матрикса, в том числе с фибриллярным коллагеном

I типа или компонентами базальной мембраны [7]. Решение этого вопроса лежит в основе проблемы обратимости фиброза и разработки терапевтических подходов к лечению цирроза печени.

Цель исследования – провести комплексное изучение структурно-функциональных особенностей звездчатых клеток печени в динамике фиброзных изменений на модели хронической HCV-инфекции.

Материал и методы исследования

Проведено комплексное светооптическое, электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование биопатов печени при хронической HCV-инфекции на различных стадиях фиброзных изменений (100 образцов, разделенных на 4 равные группы по степени выраженности фиброза). Важно отметить, что липидосодержащие звездчатые клетки лучше всего визуализируются на полутонких срезах, фиброгенные звездчатые клетки – только на ультратонких срезах либо с помощью иммуногистохимической визуализации.

Образцы печени фиксировали в охлажденном до 4°C 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на фосфатном буфере Миллонига (рН 7,2–7,4); парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса, по ван Гизону с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Полутонкие срезы окрашивали реактивом Шиффа и азуром II. Исследование проводили в универсальном микроскопе Leica DM 4000B (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 320 и компьютерной программы Leica QWin. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе «JEM 1010» при ускоряющем напряжении 80 кВт.

Стадию фиброза печени определяли по 4-балльной шкале, начиная от портального фиброза (I стадия) до цирроза с образованием порто-центральных васкуляризованных септ и нодулярной трансформацией паренхимы [3, 9]. Звездчатые клетки печени и другие матрикс-продуцирующие клеточные элементы выявляли в динамике развития фиброза по экспрессии гладкомышечного α -актина.

Экспрессию гладкомышечного α -актина в матрикс-продуцирующих клетках печени тестировали с помощью двухшагового непрямого иммунопероксидазного метода со стрептавидин-биотиновой системой визуализации продуктов реакции с негативным контролем. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела к гладкомышечному α -актину (NovoCastralab, Ltd, Великобритания) в разведении 1:25; в качестве вторичных антител – универсальные биотинилированные антитела. Продукты иммуногистохимической реакции визуализировали с помощью диаминобензидина, затем срезы докрасивали гематоксилином Майера. Численную плотность липидосодержащих звездчатых клеток оценивали на полутонких срезах в единице поля зрения, равной 38000 $\mu\text{м}^2$. При статистической обработке данных применяли критерий Стьюдента; различия сравниваемых параметров считали значимыми, если вероятность ошибки Р была меньше 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

При минимальных фиброзных изменениях печени пациентов с хроническим гепатитом С обнаруживается, как правило, достаточно большое количество звездчатых клеток, которые хорошо видны лишь на полутонких и ультратонких срезах и дифференцируются в пространствах Диссе по наличию в цитоплазме крупных липидных капель. Превращение звездчатых клеток из «покоящихся», содержащих ретиноиды, в фиброгенные сопровождается постепенным уменьшением числа липидных капель. В связи с этим истинное количество звездчатых клеток можно определить, используя комплексное электронно-микроскопическое и иммуногистохимическое исследование.

На начальных стадиях фиброза (0, I) при хроническом гепатите С при изучении полутонких срезов популяция звездчатых клеток печени отличалась выраженным полиморфизмом – резко варьировали размеры, форма, количество липидных капель и их тинкториальные свойства: обращали на себя внимание различия в осмиофильности липидосодержащего материала в разных клетках. Численная плотность звездчатых клеток печени, визуализируемых в препаратах по наличию цитоплазматических липидных капель, составляла $5,01 \pm 0,18$ на единицу поля зрения.

Особенности ультраструктуры звездчатых клеток связаны с гетерогенностью электронной плотности липидных капель не только в пределах одной клетки, но и между разными липоцитами: на фоне электронно-прозрачного липидного субстрата выделялся более осмиофильный маргинальный ободок; кроме того, резко полиморфны ядра, варьировалась длина цитоплазматических отростков. Среди ультраструктурных особенностей липидосодержащих звездчатых клеток, наряду с присутствием липидных капель, можно отметить очень малое количество цитоплазматического матрикса, бедного мембранными органеллами, в том числе митохондриями, в связи с чем, по-видимому, данный фенотип липоцитов называют «покоящимся» или «пассивным» [1, 10].

На стадиях фиброза II и III ультраструктура большинства звездчатых клеток приобретала так называемый смешанный, или переходный, фенотип – одновременное присутствие морфологических признаков и липидосодержащей и фибробластоподобной клетки. В таких липоцитах ядра имели глубокие инвагинации нуклеолеммы, более крупное ядрышко, увеличенный объем цитоплазмы, сохраняющей липидные капли.

Одновременно резко возрастало количество митохондрий, свободных рибосом, полисом и канальцев гранулярной цитоплазматической сети. Как правило, имелся мембранный контакт липидных капель и митохондрий, свидетельствующий об «утилизации» липидов. Во многих клетках деградация липидных капель осуществлялась путем формирования аутофагосом, затем элиминирующихся путем экзоцитоза. В некоторых случаях отмечалась пролиферация звездчатых клеток смешанного фенотипа.

Матрикс-продуцирующие звездчатые клетки, наиболее многочисленные на стадии цирроза печени, характеризовались полным отсутствием липидных гранул, отростчатой фибробластоподобной формой, развитым белоксинтезирующим компартментом и формированием в цитоплазме контрактильных фибриллярных структур; перицеллюлярно в пространствах Диссе локализовались многочисленные пучки коллагеновых фибрилл со специфичной поперечной исчерченностью.

В целом, при прогрессировании хронического гепатита С, сопровождающегося внутريدольковым перисинусоидальным фиброгенезом, имели место морфологические признаки активации звездчатых клеток печени, превращение их из так называемых «пассивных», накапливающих витамин А, в клетки фиброгенные и пролиферирующие.

На стадии трансформации в цирроз печени происходило значительное уменьшение численной плотности липидосодержащих звездчатых клеток, свидетельствующее об их фиброгенной трансформации. Однако при сформированном циррозе печени в единичных случаях встречались участки паренхимы печени с перисинусоидальными липидосодержащими звездчатыми клетками. Кроме того, в одном образце в перипортальной фиброзной ткани обнаружены многочисленные липоциты, что, вероятно, свидетельствует о важной роли звездчатых клеток в метаболизме ретиноидов в организме даже на стадии цирроза органа. Кроме того, по-видимому, звездчатые клетки имеют ряд других функций, они обнаружены и во внепеченочных органах, таких как поджелудочная железа, легкие, почки и кишечник, и существует мнение о том, что печеночные и внепеченочные звездчатые клетки формируют диссемированную систему звездчатых клеток организма, аналогично APUD-системе [5]. Например, несмотря на ассоциацию фиброгенных звездчатых клеток с циррозом печени, их активация может играть благоприятную роль в случаях острого повреждения, потому что в результате формируется соот-

ветствующий стромальный контур для регенерации паренхиматозных клеток.

Степень выраженности перигепатоцеллюлярного фиброза при хронической HCV-инфекции, по данным морфометрического анализа, имела достоверную обратную корреляцию с численной плотностью липидосодержащих звездчатых клеток – на стадии фиброза III и при циррозе органа она составляла $0,20 \pm 0,03$ в единице поля зрения, что достоверно меньше ($p < 0,05$), чем на стадиях фиброза 0 – I ($5,01 \pm 0,18$) и II ($2,02 \pm 0,04$).

Фиброгенная активность матрикс-продуцирующих клеток печени тестирована нами с помощью иммуногистохимического исследования по экспрессии гладкомышечного альфа-актина. Продукты иммуногистохимической реакции различной интенсивности обнаруживались в цитоплазме активированных звездчатых клеток, локализующихся внутри печеночных долек. Особенно значительная экспрессия гладкомышечного α -актина отмечалась в цитоплазме фибробластов и миофибробластов портальных зон, гладкомышечных клетках сосудов и миофибробластах вокруг центральных вен.

Большинство данных о клеточных механизмах фиброгенеза получено в исследованиях, выполненных на звездчатых клетках печени, однако очевидно, что различные матрикс-продуцирующие клетки (каждая с определенной локализацией, иммуногистохимическим и ультраструктурным фенотипом) вносят свой вклад в развитие фиброза печени [4]. Они включают в себя фибробласты и миофибробласты портальных трактов, гладкомышечные клетки сосудов и миофибробласты вокруг центральных вен, активизирующиеся в условиях хронического повреждения печени.

Заключение

Продемонстрирована роль звездчатых клеток печени в развитии фиброза органа при хроническом гепатите С. При прогрессировании фиброза значимо уменьшается численная плотность липидосодержащих звездчатых клеток, при этом часть популяции сохраняет так называемый «покоящийся» фенотип для осуществления метаболической функции. «Миофибробластоподобные» звездчатые клетки печени в состоянии фиброгенной активации характеризуются следующими структурно-функциональными особенностями: уменьшением числа и последующим исчезновением липидных капель, гиперплазией гранулярной цитоплазматической сети и митохондрий, очаговой пролиферацией, иммуногисто-

химической экспрессией фибробластоподобных характеристик, в том числе гладкомышечного α -актина, и формированием перицеллюлярных коллагеновых фибрилл в пространствах Диссе.

Таким образом, звездчатые клетки печени представляют собой не статичную, а динамичную популяцию, принимающую непосредственное участие в ремоделировании внутридолькового перигепатоцеллюлярного матрикса.

Список литературы

1. Balabaud C., Bioulac-Sage P., Desmouliere A. The role of hepatic stellate cells in liver regeneration // *J. Hepatol.* – 2004. – Vol. 40. – P. 1023–1026.
2. Brandao D.F., Ramalho L.N.Z., Ramalho F.S. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells // *Acta Cirúrgica Brasileira.* – 2006. – Vol. 21. – P. 54–57.
3. Desmet V.J., Gerber M., Hoofnagle J.H. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging // *Hepatology.* – 1994. – Vol. 19. – P. 1523–1520.
4. Gabele E., Brenner D.A., Rippe R.A. Liver fibrosis: Signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell // *Front. Biosci.* – 2003. – Vol. 8. – P. 69–77.
5. Geerts A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? // *J. Hepatol.* – 2004. – Vol. 40. – P. 331–334.

6. Gutierrez-Ruiz M.C., Gomez-Quiroz L.E. Liver fibrosis: searching for cell model answers // *Liver Intern.* – 2007. – Vol. 10. – P. 434–439.

7. Kisseleva T., Brenner D.A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – Vol. 22. – P. S73–S78.

8. Ryder S.D. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study // *Gut.* – 2004. – Vol. 53. – P. 451–455.

9. Schuppan D., Afdhal N.H. Liver cirrhosis // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371. – P. 838–851.

10. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells // *Med. Electron. Microsc.* – 2004. – Vol. 37. – P. 3–15.

Рецензенты:

Вавилин В.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией метаболизма лекарств НИИ молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск;

Кливер Е.Э., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии Новосибирского НИИ патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Минздравсоцразвития РФ, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 15.08.2011.