УДК 576.31: 612.014.2/.35: 616-006.327.03

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ И СТЕРЕОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Капустина В.И., Постникова О.А., Айдагулова С.В.
НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН,
Новосибирск, e-mail: pathol@soramn.ru

В онтогенезе у крыс Вистар звездчатые клетки печени в состоянии фиброгенной активации экспрессируют переходный, или смешанный, фенотип: уменьшение числа и последующее исчезновение липидных капель с синхронной сменой звездчатой формы на фибробластоподобную полигональную и увеличением размеров клетки с синхронной гиперплазией гранулярной цитоплазматической сети и увеличением числа митохондрий. В динамике онтогенеза у крыс в звездчатых клетках выявлены ультраструктурные стереологические маркеры индукции белоксинтезирующей функции, обратно коррелирующие с выраженностью функции депонирования ретиноидов, оцениваемой по поверхностной плотности липидных капель. Прогрессирующие в онтогенезе дисфункции митохондрий гепатоцитов, ассоциированные с окислительным стрессом, и более выраженная фиброгенная активность звездчатых клеток являются ключевыми факторами фиброза печени.

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

ELECTRON-MICROSCOPIC AND STEREOLOGICAL ANALYSIS OF LIVER STELLATE CELLS POPULATION IN ONTOGENESIS

Kapustina V.I., Postnikova O.A., Aidagulova S.V.
Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS,
Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru

During the ontogenesis of Wistar rats, activated hepatic stellate cells express a transitional (mixed) phenotype – reduction and subsequent loss of lipid droplets, synchronous cell enlargement and shape transformation (from stellar to fibroblast-like polygonal) with hyperplasia of granular cytoplasmic reticulum and mitochondria. In the course of ontogenesis, ultrastructural stereological markers of protein synthesis induction were revealed, inversely correlating with retinoid storage assessed by surface density of lipid droplets. Hepatocyte mitochondrial dysfunction (associated with oxidative stress) and increased fibrogenic activity of stellate cells, progressing with age, are key factors of liver fibrosis.

Keywords: fibrogenesis, liver stellate cells, ultrastructure, stereology

Звездчатые клетки печени (жиронакапливающие клетки, липоциты печени, или клетки Ито), локализующиеся в пространствах Диссе и содержащие ретиноиды, привлекают внимание исследователей – гистологов, физиологов, гепатологов на протяжении более 130 лет, но лишь в последние годы, после значительного прогресса методов структурного исследования, появились доказательства их роли в фиброгенных процессах печени [1, 3, 4, 6, 7, 12, 14].

В настоящее время функции звездчатых клеток печени связывают не только с поражением печени, но и с развитием, регенерацией печени, реакцией на воздействия ксенобиотиков и иммунорегуляцией. Разрабатываются аспекты необходимого участия звездчатых клеток печени в пролиферации и дифференцировке стволовых клеток печени [15]. Звездчатые клетки рассматриваются как необходимое звено в пространстве Диссе, участвующее в тонкой регуляции аутокринных и паракринных стимулов, в быстром ответе на изменения компонентов экстрацеллюлярного матрикса и адекватном реагировании на метаболические потребности, возникающие в онтогенезе. Более того, жизненно важная функция поддержания системного гомеостаза связана с депонированием и мобилизацией ретиноидов, их способностью презентации антигенов и индукции толерантности, так же как с определенными взаимоотношениями с потомками костномозговых клеток [9]. Интерес к этому типу клеток неуклонно возрастает, с ними связаны определенные надежды более глубокого понимания физиологии печени, а также диагностики и лечения патологических процессов [5, 10, 11].

Цель работы – исследование количественно-качественных изменений популяции звездчатых клеток печени крыс Вистар в онтогенезе.

Материал и методы исследования

Проведен сравнительный анализ популяции звездчатых клеток печени у 38 крыс-самцов Вистар массой тела от 110 до 480 г 4-х возрастных групп: 4, 9, 12 и 24 мес. (10, 10, 9 и 9 животных соответственно). На всех этапах были учтены Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977).

Образцы печени фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на фосфатном буфере Миллонига (pH 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). Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе «JEM 1010» при ускоряющем напряжении 80 кВт.

Стереологический анализ образцов печени проводили на электронограммах с использованием методов, основанных на подсчете числа пересечений тестовой линии с ее границами [2]. Ультраструктурный стереологический анализ включал определение поверхностной плотности цитоплазматических органелл звездчатых клеток. Тестовая система состояла из циклоидов суммарной длиной 45 мкм и 70 тестовых точек [8]. При статистической обработке данных применяли критерий Стьюдента; различия сравниваемых параметров считали значимыми, если вероятность ошибки P была меньше 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В образцах печени звездчатые клетки были хорошо видны лишь на полутонких и ультратонких срезах и дифференцировались в пространствах Диссе по наличию в цитоплазме крупных липидных капель. При электронно-микроскопическом исследовании печени 4-месячных крыс Вистар звездчатые клетки содержали немногочисленные крупные электронно-прозрачные или умеренно осмиофильные липидные капли, вместе с округлым эухромным ядром занимающие почти всю цитоплазму. Перинуклеарно, между липидными капелями, локализовалось минимальное количество мембранных органелл – одиночные мелкие митохондрии с плотным матриксом и редкими кристами и короткие профили гранулярной цитоплазматической сети.

В ультраструктурной организации гепатоцитов крыс данной возрастной группы обращало на себя внимание множество розеток гликогена. Среди цитоплазматических органелл наиболее многочисленны митохондрии, компактно группирующиеся в различных участках цитоплазмы, характеризующиеся большим числом, мелкими размерами и достаточно осмиофильным матриксом, что свидетельствовало в пользу пролиферации митохондрий. В гепатоцитах слабо представлены элементы гранулярной цитоплазматической сети, преобладали свободные рибосомы и полисомы, значительно гиперплазированы микроворсинки синусоидального полюса. В целом, комплекс ультраструктурных особенностей соответствовал ювенильному фенотипу.

В печени крыс в возрасте 9 и 12 мес. сохранялось большое содержание гликогена, нарастающее в порто-центральном направлении, при этом отмечены различной степени выраженности эозинофилия цитоплазмы части гепатоцитов и умеренная мононуклеарная инфильтрация портальных трактов. На полутонких срезах обнаружена очаговая метахромазия межклеточного матрикса, отражающая ремоделирование соединительной ткани в динамике онтогенеза.

У крыс Вистар в возрастной группе 9 мес. наиболее четко выявлялся зональный полиморфизм звездчатых клеток. Он выражался в наибольшей численной плотности липоцитов в перипортальной зоне печеночной дольки с постепенным ее уменьшением и почти полным отсутствием в перицентральных зонах. При электронно-микроскопическом исследовании центролобулярные и перицентральные звездчатые клетки содержали очень мелкие немногочисленные липидные включения, иногда с признаками деградации. Вокруг центральных вен выявлялись лишь фибробластоподобные клетки, своим ультраструктурным фенотипом не отличающиеся от клеток, продуцирующих компоненты внеклеточного матрикса непосредственно в стенке центральных вен.

В возрасте 12 мес. приблизительно четверть центролобулярной популяции звездчатых клеток печени приобретала переходный фенотип с увеличением площади цитоплазмы и одновременным присутствием и крупных липидных включений, и более развитого белоксинтезирующего компартмента. Деградация липидных капель осуществлялась путем формирования аутофагосом с последующей элиминацией экзоцитозом. Перинуклеарно локализовались канальцы гранулярной цитоплазматической сети и приуроченные к ним мелкие митохондрии, в ядрах формировались крупные ядрышки, что свидетельствовало об индукции синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса, ремоделирующих пространства Диссе.

В данной возрастной группе при электронно-микроскопическом исследовании выявлены признаки дегенеративно-дистрофических процессов в паренхиматозных клетках печени: многочисленные гранулы липофусцина (маркер гипоксии и/или старения клеток), гетерогенные лизосомы и полиморфные резидуальные тельца. Митохондрии были многочисленны, но приобретали более крупные размеры и полиморфизм; матрикс митохондрий менее осмиофилен; кристы редкие, очень тонкие, хаотично ориентированные. Отмечалась гетерогенность гепатоцитов по наличию

фокусов внутриклеточной регенерации (скоплений параллельных профилей гранулярной цитоплазматической сети в ассоциации с митохондриями).

Печень крыс в возрасте 24 мес. характеризовалась умеренно выраженной дискомплексацией печеночных трабекул и полиморфизмом паренхиматозных клеток: неравномерным включением гликогена в пределах долек, ацидофильной и липидной дегенерацией перипортальных и перицентральных гепатоцитов, опустошенностью цитоплазмы части гепатоцитов. Наблюдались фиброз центральных вен и неравномерное расширение преимущественно перицентральных синусоидов.

При ультраструктурном исследовании выявлено ремоделирование пространств Диссе с очаговым развитием перигепатоцеллюлярного фиброза – с коллагеновыми фибриллами, локализованными также вдоль латеральных полюсов гепатоцитов. Возрастающее количество фибриллярных структур обусловливало формирование базальной мембраны эндотелиоцитов («капилляризацию» синусоидов) с изменением фенотипа микрососудистой выстилки: эндотелиальные клетки утрачивали фенестры и содержали лишь единичные пиноцитозные везикулы.

Звездчатые клетки печени у крыс в возрасте 24 мес. характеризовались значительной гетерогенностью ультраструктурной организации: среди них липидосодержащие и фиброгенные клетки, при этом большинство популяции звездчатых клеток имело переходный фенотип. Наряду с крупными липидными каплями видны свободные рибосомы и мембранные органеллы – митохондрии, элементы гранулярной и гладкой цитоплазматической сети, везикулы комплекса Гольджи, а также резидуальные структуры, отражающие процесс фокальной внутриклеточной деградации. Отмечено появление двуядерных звездчатых клеток.

В паренхиматозных клетках печени крыс в возрасте 24 мес. обнаруживалась полиморфная липидная инфильтрация, сниженное содержание гликогена, формирование аутофагосом и многочисленных резидуальных телец. Митохондрии уменьшены в количестве, крупные, с единичными кристами и гомогенным, умеренно электронно-плотным матриксом, с мелкими осмиофильными гранулами, патогномоничными для гипоксии и интоксикаций различного генеза.

Стереологический анализ ультраструктурной организации звездчатых клеток печени крыс в онтогенезе продемонстрировал уменьшение поверхностной плотности липидных включений, имеющее достоверные отличия ($p < 0,05$) в возрасте 24 мес.: 4 мес. – 376,8 ± 21,2 м^2/см^3; 9 мес. – 396,8 ± 11,6; 12 мес. – 286,3 ± 13,5 и 24 мес. – 243,3 ± 12,7 м^2/см^3. Соответствующие четырем возрастным группам показатели поверхностной плотности профилей гранулярной цитоплазматической сети звездчатых клеток печени демонстрировали неуклонный рост: 28,1 ± 4,3; 32,4 ± 5,1; 38,9 ± 6,2 и 52,7 ± 4,9 м^2/см^3. Таким образом, в динамике онтогенеза в звездчатых клетках печени выявлены ультраструктурные стереологические маркеры индукции белоксинтезирующей функции, обратно коррелирующие с выраженностью функции депонирования ретиноидов, оцениваемой по поверхностной плотности липидных капель. Это свидетельствует о том, что в динамике онтогенеза при снижении энергетического потенциала гепатоцитов у крыс в возрасте 24 мес. синхронно индуцируется фиброгенная трансформация звездчатых клеток печени, обусловливающая инволютивные изменения и фиброзную трансформацию печени.

Нарушения функций митохондрий играют ключевую роль в старении клеток; в процессе онтогенеза в клетках изменяется как относительное количество митохондрий, так и их качество, определяемое, прежде всего, их способностью продуцировать АТФ. Следствием окислительного стресса являются угнетение дыхания, имеющее структурное выражение в набухании митохондрий. Повреждение митохондриальных крист, характерное для «старых» митохондрий, может быть ответственным за снижение трансмембранного потенциала [13]. Можно полагать, что нарастающее нарушение функций митохондрий гепатоцитов ведет к развитию дефицита энергии, в условиях которого баланс в «системе про- и антиоксиданты» в тканях крыс сдвигается в пользу первых, и развивается окислительный стресс, являющийся индуктором фиброгенной активности звездчатых клеток печени. В целом, альтерация гепатоцитов в связи с нарастающим в онтогенезе развитием окислительного стресса является одним из факторов индукции фиброгенной активации звездчатых клеток печени.

Заключение

В онтогенезе крыс Вистар центральным событием ремоделирования пространств Диссе является активация звездчатых клеток печени, превращение их из липоцитов, накапливающих витамин А, в фиброгенные клетки. Липидонакапливающие звездчатые клетки характеризуются выраженным полиморфизмом по размерам, форме, коли-

честву липидных капель и их тинкториальным свойствам.

В онтогенезе у крыс при постепенном развитии внутридолькового фиброза ультраструктура звездчатых клеток печени приобретала смешанный, или переходный, фенотип – одновременное присутствие морфологических признаков и липидосодержащей, и фибробластоподобной клетки. В переходных звездчатых клетках при сохранении одиночных липидных капель увеличивался объем цитоплазмы и активизировалась белоксинтезирующая функция с увеличением количества свободных рибосом, полисом и канальцев гранулярной цитоплазматической сети. Деградация липидных капель осуществлялась путем формирования аутофагосом.

В динамике онтогенеза у крыс Вистар в звездчатых клетках выявлены ультраструктурные стереологические маркеры индукции белоксинтезирующей функции, обратно коррелирующие с выраженностью функции депонирования ретиноидов, оцениваемой по поверхностной плотности липидных капель. Прогрессирующие дисфункции митохондрий гепатоцитов и более выраженная фиброгенная активность звездчатых клеток являются ключевыми факторами фиброза печени у крыс в возрасте 24 мес.

Список литературы

1. Непомнящих Д.Л., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И. Биопсия печени: Патоморфогенез хронического гепатита и цирроза. – М.: Изд-во РАМН, 2006. – 368 с.

2. Непомнящих Л.М., Бакарев М.А. Морфогенез метаболических повреждений скелетных мышц. – М.: Изд-во РАМН, 2005. – 352 с.

3. Balabaud C., Bioulac-Sage P., Desmouliere A. The role of hepatic stellate cells in liver regeneration // J. Hepatol. – 2004. – Vol. 40. – P. 1023–1026.

4. Brandao D.F., Ramalho L.N.Z., Ramalho F.S. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells // Acta Cirúr. Brasil. – 2006. – Vol. 21. – P. 54–57.

5. Desmet V.J., Roskams T. Cirrhosis reversal: A duel between dogma and myth // J. Hepatol. – 2004. – Vol. 40. – P. 860–867.

6. Gabele E., Brenner D.A., Rippe R.A. Liver fibrosis: Signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell // Front. Biosc. – 2003. – Vol. 8. – P. 69–77.

7. Geerts A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? // J. Hepatol. – 2004. – Vol. 40. – P. 331–334.

8. Gundersen H.J.G., Bendtsen T.F., Korbo L. The new stereological tools // Acta Path. Micr. Immunol. Scand. – 1988. – Vol. 96. – P. 379–394.

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

10. 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.

11. Hepatic stellate cells and fibrogenesis in hepatitis C virus infection: an ultrastructural insight / S.S. Mansy, N.A. ElKhafif, A.S. AbelFatah et al. // Ultrastruct. Pathol. – 2010. – Vol. 34. – P. 62–67.

12. Sato M., Suzuki S., Senoo H. Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype // Cell Struct. Funct. – 2003. – Vol. 28. – P. 105–112.

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

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

15. Xu L., Hui A.Y., Albanis E. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis // Gut. – 2005. – Vol. 54, № 1. – P. 142–151.

Рецензенты:

Богатова Н.П., д.б.н., профессор, зав. лабораторией ультраструктурных исследований НИИ института клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМЕ, г. Новосибирск;

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

Работа поступила в редакцию 19.09.2011.