

ПОЛИМОРФИЗМ ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ИХ РОЛЬ В ФИБРОГЕНЕЗЕ**Светлана Владимировна АЙДАГУЛОВА, Валентина Ильинична КАПУСТИНА***ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН
630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2*

По данным ультраструктурного, иммуногистохимического и морфометрического анализа изучена популяция звездчатых клеток печени в процессе развития фиброза и цирроза инфекционно-вирусного генеза. Фиброгенная активация звездчатых клеток печени 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. 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 перисинусоидально обнаружены липидосодержащие звездчатые клетки. В целом, звездчатые клетки печени — полиморфная гетерогенная популяция с широким спектром функциональной активности.

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

Звездчатые клетки печени (клетки Ито, липоциты печени, жиронакапливающие клетки печени), локализующиеся в пространствах Диссе (между гепатоцитами и эндотелиальной выстилкой синусоидов), играют ведущую роль в регуляции гомеостаза ретиноидов (содержат до 80 % витамина А организма), в ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, развитии и регенерации печени [1–3]. Экспрессия генов в звездчатых клетках печени и соответствующие модуляции функциональной активности регулируются межклеточными и клеточно-матриксными взаимодействиями, а также цитокинами и факторами роста. В различных экспериментальных моделях и культуральных системах показано, что звездчатые клетки печени «покоящегося» фенотипа дифференцируются по цитоплазматическим крупным липидным каплям, содержащим витамин А; при получении фиброгенных стимулов они становятся активированными и «трансдифференцируются» в миофибробластоподобный фенотип без липидных капель, приобретая фиброгенную сущность с продукцией компонентов экстрацеллюлярного матрикса, в том числе коллагена и протеогликанов [4].

Способны ли активированные звездчатые клетки возвращаться к покоящемуся фенотипу, неизвестно, на этот счет существуют противоречивые мнения. Предполагается, что активированные звездчатые клетки печени могут, по крайней мере, частично, нивелировать процесс активации, например, при воздействии ретиноидов или активации определенных рецепто-

ров, или при взаимодействии с компонентами экстрацеллюлярного матрикса, такими как фибриллярный коллаген I типа, или с компонентами базальной мембраны [5, 6]. Эти исследования важны для решения вопроса об обратимости фиброза и разработки терапевтических подходов к лечению цирроза печени.

Цель исследования — изучить светооптические, ультраструктурные и иммуногистохимические маркеры популяции звездчатых клеток печени при фиброзе и циррозе органа.

Материал и методы исследования

Выполнено комплексное морфологическое исследование 100 биоптатов печени 84 пациентов с хронической HCV-инфекцией (вирус гепатита С) на различных стадиях развития фиброза и цирроза печени. Клинико-морфологические исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации (2000 г.). Стадию фиброза печени оценивали по 4-балльной системе [7], начиная от портального фиброза (I стадия) до цирроза с образованием порто-центральных васкуляризированных септ и нодулярной трансформацией паренхимы печени.

Ткань 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. Необходимо

отметить, что липидосодержащие звездчатые клетки лучше всего визуализируются на полутонких срезах, фиброгенные звездчатые клетки — только на ультратонких либо с помощью иммуногистохимических методов. 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 (Германия) и компьютерной программы Leica QWin. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе «JEM 1010» при ускоряющем напряжении 80 кВт.

Звездчатые клетки печени и другие матрикс-продуцирующие клеточные популяции выявляли в динамике развития фиброза по экспрессии гладкомышечного α -актина. Иммунодетекцию проводили по адаптированной методике иммуногистохимических реакций с использованием моноклональных антител [8]. Для тестирования экспрессии гладкомышечного α -актина в матрикс-продуцирующих клетках печени использовали двухшаговый непрямой иммунопероксидазный метод со стрептавидин-биотиневой системой визуализации продуктов реакции. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела к гладкомышечному α -актину (NovoCastra Laboratories Ltd, Великобритания) в разведении 1 : 25; в качестве вторичных антител — универсальные биотинилированные антитела. Визуализацию продуктов иммуногистохимической реакции осуществляли с помощью хромогена (диаминобензидина), затем докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили срезы без инкубирования с первичными антителами.

Морфометрический анализ состоял в оценке численной плотности липидосодержащих звездчатых клеток на полутонких срезах в единице поля зрения, равной 38000 мкм². При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое (М), ошибку среднего (m), для сравнения средних применяли критерий Стьюдента; различия сравниваемых параметров считали значимыми, если вероятность ошибки Р была меньше 0,05.

Результаты исследования

В ткани печени пациентов с хроническим гепатитом С при минимальных фиброзных изменениях 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 (рис. а, б). Превращение звездчатых клеток из «пассивных», содержащих липидосодержащий материал, в фиброгенные сопровождается постепенным исчезновением этого основного морфологического маркера. В связи с этим истинное количество звездчатых клеток можно определить, используя комплексное ультраструктурное и иммуногистохимическое исследование.

На начальных стадиях фиброза (0, I) при хроническом гепатите С при изучении полутонких срезов популяция звездчатых клеток печени отличалась выраженным полиморфизмом по размерам, форме, количеству липидных капель и их тинкториальным свойствам (различия в осмиофильности липидосодержащего материала в разных клетках) (рис. а). Численная плотность звездчатых клеток печени, визуализируемых по наличию цитоплазматических липидных капель, составляла $4,98 \pm 0,17$ на единицу поля зрения.

При электронно-микроскопическом исследовании популяция звездчатых клеток еще более гетерогенна — отмечены неравномерность в электронной плотности липидных капель не только в пределах одной клетки, но и между разными липоцитами, иногда на фоне светлого липидного субстрата формировался более осмиофильный маргинальный ободок; кроме того, резко полиморфны ядра, варьировала длина цитоплазматических отростков. Характерной ультраструктурной особенностью липидосодержащих звездчатых клеток, наряду с присутствием липидных капель, можно считать очень малое количество цитоплазматического матрикса, бедного мембранными оргanelлами, в том числе митохондриями, в связи с чем, по-видимому, данный фенотип липоцитов называют «покоящимся» или «пассивным» [2, 9].

При прогрессировании фиброза печени (стадии 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 кон-

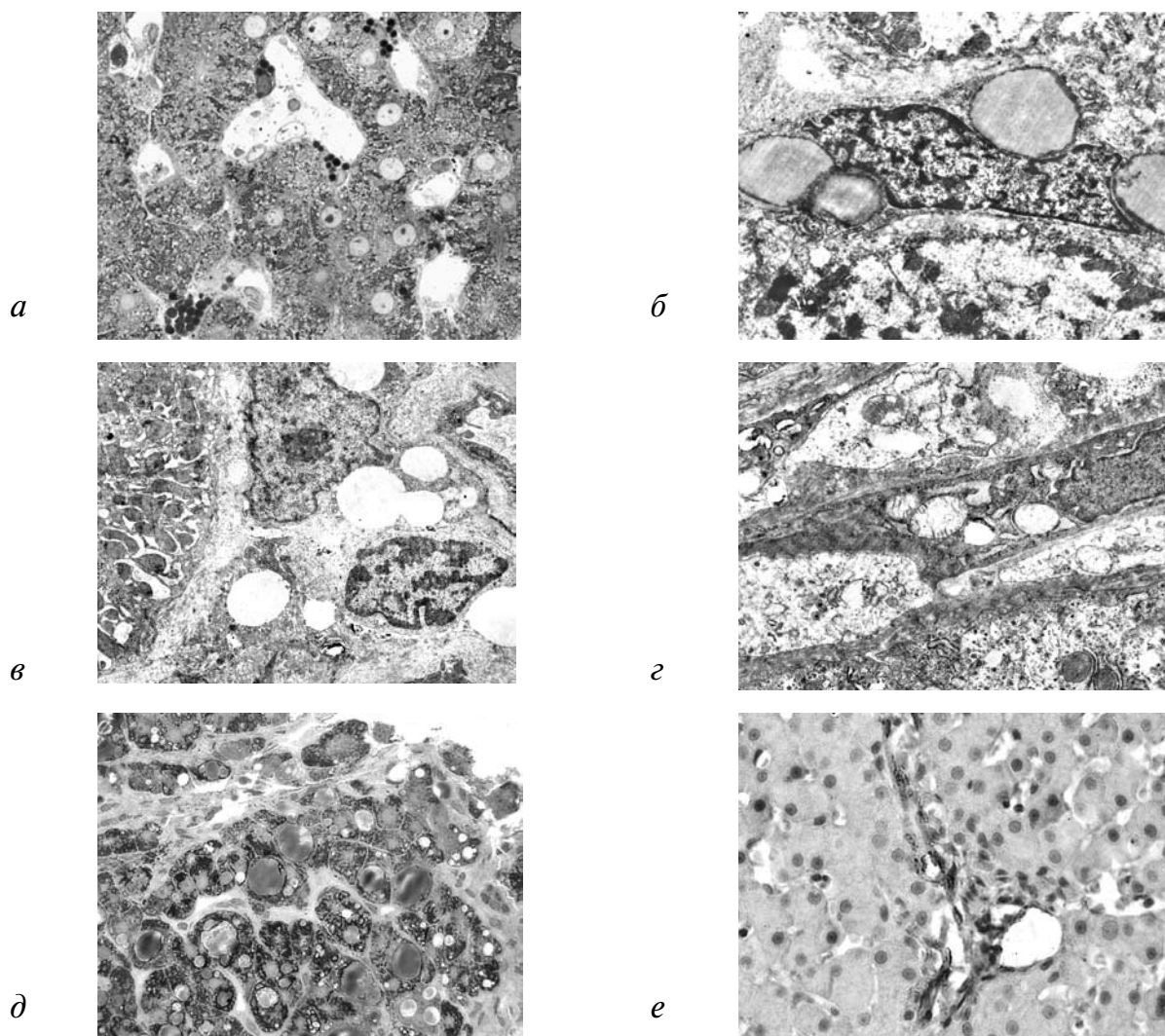


Рис. Звездчатые клетки печени в динамике фиброзных изменений (а, б – стадия I ; в – стадия II ; г, е – стадия III ; д – цирроз печени). а – полиморфные липидосодержащие клетки в пространствах Диссе, увел. 950; б – «покоящаяся» звездчатая клетка (липоцит), увел. 6000; в – переходный фенотип: редукция липидных капель, увеличение числа белоксинтезирующих органелл, увел. 4000; г – фибробластоподобная звездчатая клетка, увел. 4000; д – перисинусоидальные липидосодержащие звездчатые клетки, увел. 650; е – экспрессия гладкомышечного α-актина в звездчатых клетках и фибробластах портального тракта, увел. 350. а, д – полутонкие срезы, окраска реактивом Шиффа и азуром II; б – г – электронограммы; е – иммуногистохимическая реакция, непрямой двухшаговый стрептавидин-биотиновый метод. Окраска диаминобензидином и гематоксилином.

такт 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 липоцитов смешанного фенотипа (рис. в).

Фиброгенные звездчатые клетки, наиболее многочисленные на стадии цирроза печени, отличались полным отсутствием липидных гранул, вытянутой фибробластоподобной формой, выраженным белоксинтезирующим компарт-

ментом и формированием в цитоплазме контрактильных фибриллярных структур; перицеллюлярно в пространствах Диссе локализовались многочисленные пучки коллагеновых фибрилл (рис. г).

Таким образом, при формировании внутридолькового перисинусоидального фиброза при прогрессировании хронического гепатита С выявлены морфологические признаки активации звездчатых клеток печени, превращение их из так называемых «пассивных», накапливающих витамин А, в клетки контрактильные, пролиферирующие и фиброгенные.

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 (рис. д). Кроме того, в одном биоптате 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 диссеминированную систему звездчатых клеток организма, аналогично APUD-системе [10]. Например, несмотря на ассоциацию звездчатых клеток с циррозом печени, их активация может играть благоприятную роль в случаях острого повреждения, потому что в результате формируется соответствующий стромальный контур для регенерации с поддержанием печеночной архитектуры [11].

По данным морфометрического анализа, степень выраженности перигепатоцеллюлярного фиброза при хронической HCV-инфекции имела достоверную обратную корреляцию с численной плотностью липидосодержащих звездчатых клеток — последняя на стадии фиброза III и при циррозе органа составляла $0,20 \pm 0,03$ в единице поля зрения, что достоверно меньше ($p < 0,05$), чем на стадиях фиброза 0—I ($4,98 \pm 0,17$) и II ($2,02 \pm 0,04$).

Фиброгенная активность матрикс-продуцирующих клеток печени тестирована нами с помощью иммуногистохимического исследования по экспрессии гладкомышечного α -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, в гладкомышечных клетках сосудов и миофибробластах вокруг центральных вен (рис. е).

Несмотря на то, что большинство данных о клеточных механизмах фиброгенеза получены в исследованиях, выполненных на звездчатых

клетках печени, в настоящее время очевидно, что различные матрикс-продуцирующие клетки (каждая с определенной локализацией, иммуногистохимическим и ультраструктурным фенотипом) вносят свой вклад в развитие фиброза печени [12, 13]. Они включают в себя фибробласты и миофибробласты портальных трактов, гладкомышечные клетки сосудов и миофибробласты вокруг центральных вен. Вероятно, все матрикс-продуцирующие клетки активизируются в условиях хронического повреждения печени.

Заключение

В целом, нами 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 «покоящийся» фенотип для осуществления метаболической функции. «Миофибробластоподобные» звездчатые клетки печени в состоянии фиброгенной активации характеризуются следующими морфологическими признаками: уменьшение числа и последующее исчезновение липидных капель, очаговая пролиферация липоцитов, гиперплазия гранулярной цитоплазматической сети и митохондрий, иммуногистохимическая экспрессия фибробластоподобных характеристик, в том числе гладкомышечного α -актина, и формирование перичеселлюлярных коллагеновых фибрилл в пространствах Диссе.

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 [14].

Большинство современных исследований по циррозу печени сфокусировано на роли звездчатых клеток. Однако необходимо отметить, что иницирующим фактором фиброгенной трансформации звездчатых клеток является повреждение паренхиматозных клеток печени — гепатоцитов [15]. Различные цитопатические воздействия приводят к уменьшению численности популяции гепатоцитов и дисфункции

микроокружения паренхиматозных клеток с последующей прогрессирующей гибелью гепатоцитов и развитием фиброза и цирроза органа.

Таким образом, звездчатые клетки печени представляют собой не статичную, а динамичную популяцию в меняющейся в зависимости от функциональной активности трехмерной структуре тканевого микрорайона печени.

Литература

1. Sato M., Suzuki S., Senoo H. Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype // Cell Struct. Funct. 2003. 28. 105-112.
2. Balabaud C., Bioulac-Sage P., Desmouliere A. The role of hepatic stellate cells in liver regeneration // J. Hepatol. 2004. 40. 1023-1026.
3. Ryder S.D. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study // Gut. 2004. 53. 451-455.
4. Gutierrez-Ruiz M.C., Gomez-Quiroz L.E. Liver fibrosis: searching for cell model answers // Liver Intern. 2007. 10. 434-439.
5. Arthur M.J.P. Fibrogenesis. II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2000. 279. G245-G249.
6. Kisseleva T., Brenner D.A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis // J. Gastroenterol. Hepatol. 2007. 22. S73-S78.
7. Desmet V.J., Gerber M., Hoofnagle J.H. et al. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging // Hepatology. 1994. 19. 1523-1520.
8. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань, 2000. 287.
9. Petrov S.V., Raikhlin N.T. Handbook on immunohistochemical diagnostics of human tumors. Kazan', 2000. 287.
10. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells // Med. Electron. Microsc. 2004. 37. 3-15.
11. Geerts A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? // J. Hepatol. 2004. 40. 331-334.
12. Pinzani M., Marra F., Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells // Liver. 1998. 18. 2-13.
13. Desmet V.J., Roskams T. Cirrhosis reversal: A duel between dogma and myth // J. Hepatol. 2004. 40. 860-867.
14. Gabele E., Brenner D.A., Rippe R.A. Liver fibrosis: Signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell // Front. Biosci. 2003. 8. 69-77.
15. Brandao D.F., Ramalho L.N.Z., Ramalho F.S. et al. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells // Acta Cirurgica Brasileira. 2006. 21. 54-57.
16. Непомнящих Д.Л., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И. Биопсия печени: Патоморфогенез хронического гепатита и цирроза. М.: Изд-во РАМН, 2006. 368.
17. Nepomnyaschikh D.L., Aidagulova S.V., Nepomnyaschikh G.I. Liver biopsy: Pathomorphogenesis of chronic hepatitis and cirrhosis. M. Izd-vo RAMN, 2006. 368.

POLYMORPHISM OF STELLATE CELLS OF LIVER AND THEIR ROLE IN FIBROGENESIS

Svetlana Vladimirovna AIDAGULOVA, Valentina Il'ichna KAPUSTINA

SI RI for regional pathology and pathomorphology of SB RAMS
2, Ac. Timakov str., bd. 2, Novosibirsk, 630117

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 alpha-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 perisinusoid lobes under liver cirrhosis. As a whole, stellate cells of liver are the polymorphic heterogenic population with wide range of functional activity.

Key words: stellate cells of liver, fibrogenesis, ultrastructure, immunohistochemistry.

Aidagulova S.V. – doctor of Biological sciences, professor, head of laboratory of functional morphology,
e-mail: pathol@soramn.ru

Kapustina V.I. – researcher of laboratory of ultrastructural basis of pathology of SI RI for regional pathology and pathomorphology of SB RAMS