

УДК: 616.98:578.826.6HIV+616.36.-002]:612.35.014.2

СТРУКТУРА СИНУСОИДАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ У ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ /ВИРУС ГЕПАТИТ С

Н.В. Матиевская, В.М. Цыркунов, Р.И. Кравчук, В.П. Андреев

УО "Гродненский государственный медицинский университет", Гродно, Беларусь

Цель исследования: установить особенности структуры синусоидных капилляров и синусоидальных клеток печени у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Материалы и методы. Структура синусоидальных клеток печени была изучена у 14 пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. Препараты печени, полученные в результате биопсии, были изучены в световой и электронной микроскопии.

Результаты. Выявлены нарушения печеночной микроциркуляции, структуры эндотелиальных клеток синусоидов, Купферовских клеток, активация иммунных реакций в печени, ускорение фиброгенеза различной степени выраженности у всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Ключевые слова: ВИЧ, ВГС, электронная микроскопия, эндотелиальные клетки синусоидов, Купферовские клетки, звездчатые клетки печени, фиброгенез.

Актуальность. Морфофункциональными единицами печени являются классическая и портальная дольки, а также ацинус. Наиболее часто употребляемым термином является классическая печеночная долька, которая имеет гексагональную форму и сформирована из гепатоцитов и синусоидных капилляров, сходящихся к центральной печеночной вене. На уровне синусоидов осуществляется транссудативный обмен между клетками печени и кровью. Синусоидальные клетки печени (СКП) являются "первой линией обороны" при встрече с различными патогенами, токсинами и другими повреждающими факторами, т.к. синусоиды и микроциркуляция печени служат плацдармом и объектом иммунопатологических реакций [1]. В настоящее время к СКП относят эндотелиальные клетки синусоидов (ЭКС), звездчатые клетки печени (ЗКП, клетки Ито), клетки Купфера (КК), Рит-клетки (ПК), дендритные клетки (ДК). СКП составляют около 33% от клеточного состава печени, при этом доля ЭКС достигает 70%, ЗКП - 10%, КК - 20%, ПК - <1% [2, 3]. Изучение морфофункциональных характеристик СКП при коинфекции ВИЧ/вирус гепатит С (ВИЧ/ВГС) имеет важное значение для уточнения механизмов поражения печени у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Цель исследования: установить особенности структуры синусоидных капилляров и СКП у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Материалы и методы. Структура СКП была изучена у 14 пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС (8 мужчин, 6 женщин, средний возраст - $33,4 \pm 6,5$ лет). Диагноз ВИЧ-инфекции и хронического гепатита С (ХГС) верифицирован стандартными лабораторными методами (ИФА, иммунный блоттинг, ПЦР) с учетом клинико-эпидемиологических данных. В зависимости от клинической стадии ВИЧ-инфекции (классификация ВОЗ, 2006) пациенты распределились следующим образом: 1 стадия - 6 (42,8%) пациентов, 2 стадия - 4 (28,6%), 3 стадия - 4 (28,6%). Подготовку биоптатов печени для электронномикроскопического исследования проводили по стандартной методике. Препараты изучали в световом микроскопе и выбирали однотипный участок из интермедиальной области дольки для детального изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм), контрастировали 2% раствором уранилацетата на 50% метаноле и цитратом свинца по E.S. Reynolds. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (Япония) при увеличениях 5000-20000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения сним-

ков использовался комплекс из смонтированной цифровой камеры Olympus MegaView III (Германия) и программ для обработки изображений iTEM.

Для подготовки ультратонких срезов кусочки печени фиксировались в смеси формальдегида и параформальдегида, глютаральдегида на фосфатном буфере pH 7,4 с последующей постфиксацией в 1% растворе осмия на фосфатном буфере. Из блоков ткани, залитой в смесь бутил-метилметакрилатов, готовили полутонкие срезы толщиной 0,5 - 1 мкм и окрашивали азуром II, метиленовым синим, основным фуксином.

Результаты исследования и их обсуждение. В 13 из 14 исследованных биоптатов пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС регистрировался пелиоз (расширение синусоидных капилляров), сопровождаемый стазом эритроцитов (рисунок 1А), а в ряде случаев тромбоцитов. При этом у 13 пациентов отмечалась закупорка просветов синусоидов крупными электронно-светлыми, полиморфными вакуолями, содержащими зернистую субстанцию (рисунок 1В). Данные признаки указывали на нарушение микроциркуляции в синусоидах печени. На это же обращено внимание в эксперименте, в котором показано, что замедление синусоидального кровотока при хронических вирусных поражениях печени ассоциируется с ростом вирусной нагрузки и глубиной иммунопатологического повреждения гепатоцитов [1, 4].

В синусоидных капиллярах выявлялись многочисленные, плотно контактирующие СКП, в т.ч. КК, ПК, а также эритроциты, лимфоциты, гранулярные лейкоциты, плазматические клетки (рисунок 2С, 2Д), фрагменты цитоплазматических органелл. Нередко в просветах синусоидов выявлялись апоптозные тельца, что указывало на активацию иммунопатологических реакций в синусоидах печени при коинфекции ВИЧ/ВГС.

При изучении ультраструктуры ЭКС в группе наблюдения у всех пациентов отмечены изменения ультраструктуры клеток. ЭКС отличались крупным телом, крупным фрагментированным ядром и истонченными отростками. Ядра характеризовались периферической концентрацией конденсированного хроматина и компактным ядрышком. В цитоплазме ЭКС выявлялись единичные митохондрии и элементы гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, идущего параллельно клеточной мембране, немногочисленные компоненты пластинчатого комплекса, а также плотные тельца, однородные по размеру. Доказано, что ЭКС играют значительную роль в нарушении микроциркуляции в синусоидах

печени при различных патологических состояниях, т.к. в цитоплазме этих клеток обнаруживаются тельца Weibel-Palade (WP), которые содержат фактор Виллебранда, Р-селектин, гистамин, эндотелин-1, оксид азота, кальцитонин и др. [4, 5].

При изучении ультраструктуры ЭКС у пациентов в группе наблюдения часто наблюдались отек и усиленное везикулообразование под гладкой мембраной, обращен-

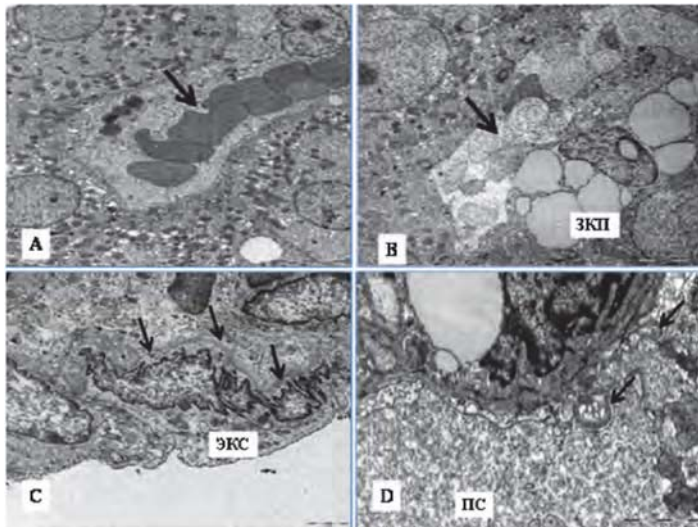


Рисунок 1 - Ультраструктура синусоидов печени и ЭКП.
 А - агрегация эритроцитов (стрелка) в просвете синусоида $\times 5000$; В - окклюзия просвета синусоида полиморфными электронно-светлыми вакуолями (стрелка); С - Фрагментация ядра эндотелиальной клетки в результате глубоких инвагинаций кариолеммы. Субэндотелиальное отложение материала повышенной электронной плотности (капилляризация синусоида - стрелки). - $\times 8000$; D - булавовидные полимембранные образования на поверхности ЭКС. - $\times 15000$; ПС - просвет синусоида печени, ЗКП - звездчатая клетка печени (клетка Ито), ЭКС - эндотелиальная клетка синусоида

ной в просвет синусоида, либо в пространство Диссе. При этом цитоплазматические микропиноцитозные везикулы имели краевое распределение, что приводило к увеличению поверхности плазмалеммы клеток. Местами регистрировалось формирование булавовидных полимембранных образований на поверхности ЭКС, обращенной в синусоид (рисунок 1D).

В настоящее время установлено, что ЭКС могут быть инфицированы ВИЧ как *in vitro*, так *in vivo*, т.к. на их поверхности экспрессирован рецептор CD4+. При электронной микроскопии культуры ВИЧ-инфицированных ЭКС вирионы ВИЧ определялись во внутриклеточных везикулах и булавовидных образованиях на поверхности клеточных мембран ЭКС, что доказало наличие продуктивной ВИЧ-инфекции ЭКС [5].

Во многих случаях имело место отложение электронно-плотного материала на цитомембране ЭКС, приводящего к капилляризации синусоидов, что было результатом активации ЗКП [6, 7]. В участках печеночной дольки с явлениями капилляризации синусоидов выявлялись ЭКС, ядра которых подвергались фрагментации в результате глубоких инвагинаций кариолеммы (рисунок 1С).

Известно, что особенностью морфологии ЭКС человека является пористость мембран ЭКС за счет многочисленных отверстий и отсутствие базальной мембраны, что позволяет осуществлять функцию фильтрации и свободную диффузию растворимых веществ небольшого размера между кровью и пространством Диссе. ЭКС

у здоровых лиц осуществляют пиноцитоз многих лигандов (гликопротеинов, компоненты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), иммунных комплексов, трансферина, церулоплазмينا) и способны функционировать как антигенпрезентирующие клеточки (АПК), секретируют ряд цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6), эйкосоноидов, эндотелин -1, нитрат оксида, некоторые компоненты ЭЦМ [2, 3].

Капилляризация синусоидов, отмеченная у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС, приводила к нарушению трансапикального обмена, пластического и энергетического обеспечения гепатоцитов. Данный факт подтверждался наличием различной степени выраженных изменений гепатоцитов у всех пациентов в группе наблюдения: стеатоза, деструкции митохондрий и ядер, активации ГлЭС, снижения активности ГрЭС и пластинчатого комплекса, гиперплазии вторичных лизосом и резидуальных телец.

При изучении структуры КК у всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС по данным световой микроскопии полутонких срезов печени в синусоидах печени определялись активированные КК, содержащие большое количество фагосом (рисунок 2А). При этом КК характеризовались большим размером тела клетки, а их ядра содержали разреженный (не концентрированный) хроматин. Электронномикроскопическое исследование КК также выявляло существенную активацию КК, что проявлялось в виде гиперплазии и гипертрофии клеток, содержащих многочисленные лизосомы, фагосомы и мелкие электронно-плотные гранулы (рисунок 2В).

Показано, что фагоцитоз является основной функцией и морфологическим маркером КК, которые вовлечены как в механизмы иммунной защиты организма, так и в механизмы поражения печени [3]. Как и все макрофаги, КК инфицируются уже на ранних стадиях ВИЧ-инфекции R5-тропные вирусом. Установлено, что КК высоко устойчивы к цитопатическому действию ВИЧ, что приводит к длительной циркуляции инфицированных КК, продуцирующих ВИЧ, поскольку КК являются долгоживущими клетками и имеющими медленную частоту репликации. Вирусный протеин ВИЧ Nef предотвращает деструкцию компонентов ВИЧ-1 в фагосомах, блокируя противовирусную роль фагоцитоза КК.

В то же время было установлено, что HIV-1 или, как минимум, некоторые из его компонентов нуждаются в фагоцитозе для завершения цикла репликации ВИЧ в макрофагах. Фагоцитоз ВИЧ в КК приводит к образованию мультивезикулярных телец внутри макрофагов, где происходит продуктивная репликация ВИЧ. Кроме того, ВИЧ-1 способен стимулировать так называемый "бистандартный эффект" макрофагов - уничтожение не инфицированных ВИЧ CD4+Т-лимфоцитов и других иммунных клеток человека, что считается одним из механизмов формирования иммуносупрессии при ВИЧ-инфекции [8, 9].

Как правило, макрофаги тесно взаимодействовали с гепатоцитами, в которых отмечались глубокие деструктивные изменения внутри клеток и в окружающем микрососудистом русле. Ядра большинства КК характеризовались глубокими инвагинациями кариолеммы, вплоть до фрагментации. Часто определялись КК, у которых исчезали выросты и складки, наблюдался распад плазматической мембраны и, как следствие, - выход внутриклеточного содержимого в окружающее пространство (рисунок 2С).

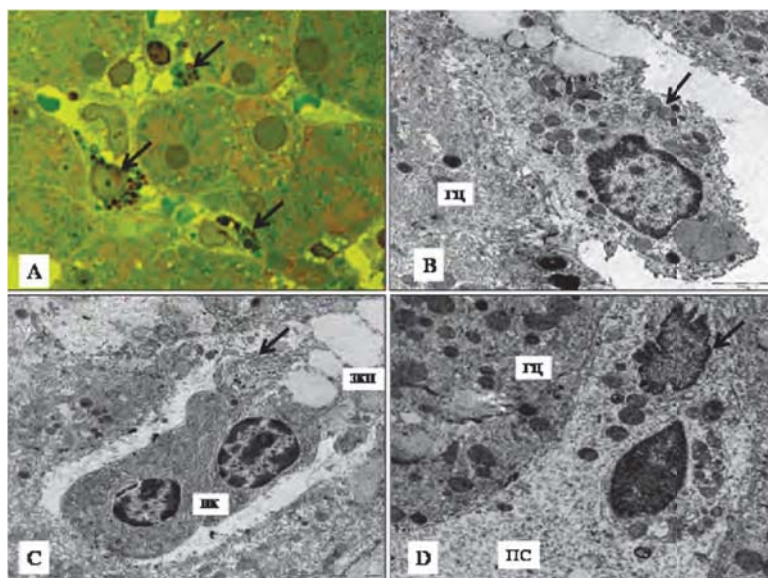


Рисунок 2 - Структура клеток Купфера у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. А - клетки Купфера (стрелки) в просвете синусоида (полутонкие срезы, окраска азури II). Об. 100, ок. 10.; В - клетка Купфера в просвете синусоида печени (стрелка). X 10000; С - Плазматические клетки в контакте с клеткой Купфера (стрелка) и ЗКП - x6000; D - контакт клетки Купфера (стрелка) с агрессивным лимфоцитом - x10000; ПС - просвет синусоида печени, ГЦ - гепатоцит, ПК - плазматические клетки, ЗКП - звездчатая клетка печени (клетка Ито)

Нередко КК и другие СКП находились в тесном топографическом контакте с плазматическими клетками (рисунок 2С). Кроме того, наблюдался контакт макрофагов с агрессивными лимфоцитами (рисунок 2D) - один из морфологических признаков активации иммунных реакций в печени.

При изучении структуры ЗКП у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС отмечалась гиперплазия данных клеток, большинство из которых отличались обилием липидных включений разных размеров, минимальным органоеллом и полигональным ядром, сдавленным липидными каплями. Существенных изменений в структурной организации ЗКП не наблюдалось, лишь в отдельных случаях имело место слияние липидных капель (рисунок 3А). У всех пациентов наряду с ЗКП, перегруженными липидными включениями, достаточно часто обнаруживались клетки, тело и ядра которых приобретали вытянутую форму, что было сопряжено с уменьшением в их цитоплазме липидных включений и свидетельствовало об активации данных ЗКП (рисунок 3В и 3С).

В нормальном состоянии ЗКП остаются неактивными, продуцирующими небольшое количество экстрацеллюлярных мембран, таких как ламинин и коллаген типа IV. Под воздействием растворимых факторов, продуцируемых поврежденными гепатоцитами, активированными клетками Купфера, а также при непосредственном воздействии на клетки различных патогенных микроорганизмов, токсических факторов, липолисахарида и др. ЗКП теряют липиды и подвергаются морфологической трансформации в миофибробласт-подобные клетки. Активированные ЗКП продуцируют большое количество электронноплотного экстрацеллюлярного матрикса (в том числе коллаген I), что проявляется в виде феномена капилляризации синусоидов и свидетельствует об индукции фиброгенеза в печени [10, 11, 132].

Известно, что активированные КК обладают паракринным эффектом на ЗКП, так как они выделяют множество растворимых агентов, таких как цитокины, трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), ростовой фактор тромбоцитов (PDGF), и TNF-α, свободные радикалы кислорода и другие факторы, которые способны активировать ЗКП [11].

Перикапиллярный фиброз различной степени выраженности был отмечен у всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС и проявлялся либо в виде сформированных крупных пучков фибрилл коллагеновых волокон, либо в виде массивных отложений в пространстве Диссе волокнистой массы, представляющей собой набухшие и потерявшие периодическую исчерченность коллагеновые волокна (рисунок 4D).

Имели место различные варианты клеточной кооперации ЗКП: с лимфоцитами (рисунок 3D), с пролиферирующими плазматическими клетками (рисунок 2С), с клетками, содержащими крупные гранулы (вероятно ПК).

В настоящее время доказано, что, несмотря на низкую экспрессию CD4 рецептора на поверхности ЗКП, ВИЧ может инфицировать активированные ЗКП по CD4+ независимому механизму. В условиях коинфекции ВИЧ/ВГС поражение печени ВГС или другими этиологическими агентами ведет к активации ЗКП,

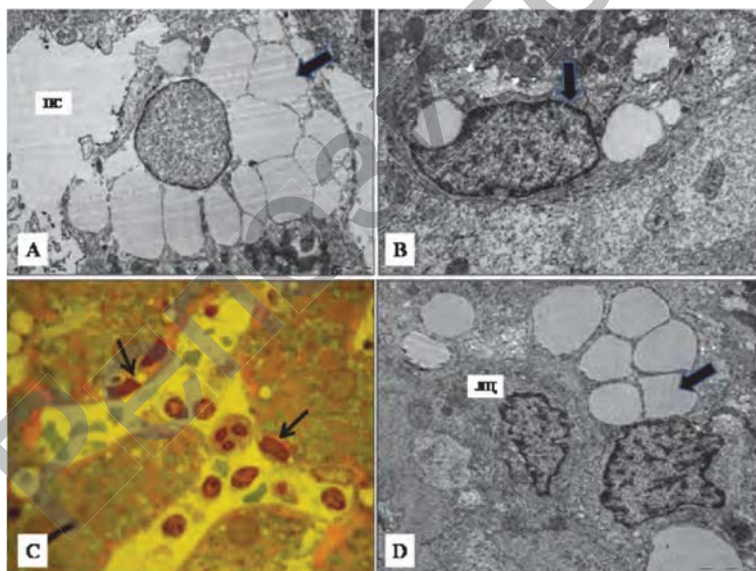


Рисунок 3 - Структура звездчатых клеток печени у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. А - ЗКП, перегруженная липидными включениями (стрелка), X8000; В - ЗКП (стрелка) с небольшим содержанием липидных включений (активные). x10000; С - активированные ЗКП (показаны стрелками) в центральной зоне ацинуса печени. Полутонкий срез, окраска: азури-фуксин. Об. 100, ок. 10.; D - контакт ЗКП и лимфоцита. x10000. ПС - просвет синусоида, ЛЦ - лимфоцит

что создает условия для их инфицирования ВИЧ [12].

После активации ЗКП демонстрируют свойства профессиональных АПК и у них появляется возможность эндоцитоза внешних частиц, а также способность стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов. ВИЧ-инфицированные ЗКП могут передавать вирусы восприимчивым CD4⁺ лимфоцитам посредством межклеточных контактов. Возможность контакта ЗКП с лимфоцитами была доказана по данным электронной микроскопии [13, 14].

Возможный механизм CD4-независимой инфицирования ВИЧ ЗКП связывают с использованием альтернативных рецепторов входа в клетки как C-type lectins, как было описано для ДК, а также путем рецептор-независимого эндоцитоза [15, 16].

Гранулярные лимфоциты ПК обнаруживались лишь у отдельных пациентов и обычно контактировали с ЗКП. Ядра в этих клетках на площади среза не обнаруживались.

У большинства пациентов (13 из 14) отмечены выраженные изменения со стороны сосудистого полюса гепатоцита: укорочение и редукция микроворсинок, отек и слаживание синусоидальной поверхности, сужение пространства Диссе (рисунок 4А).

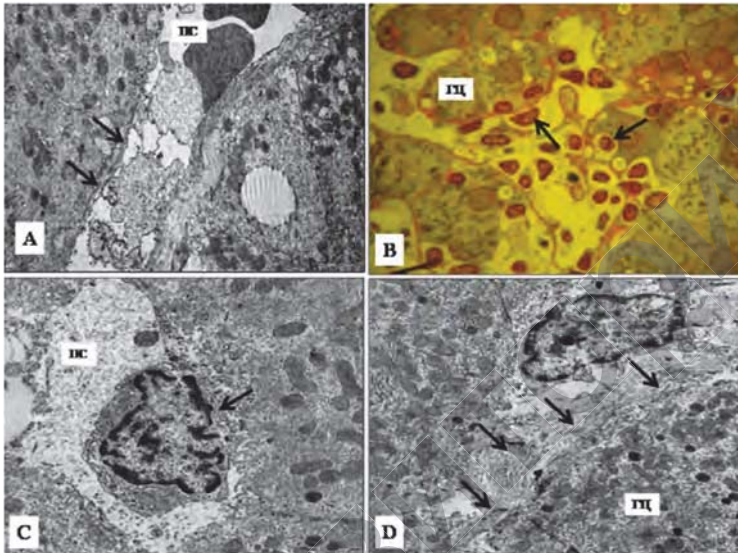


Рисунок 4 - Структура синусоидов печени у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. А - Отек на сосудистом полюсе гепатоцитов, редукция микроворсинок, сужение пространства Диссе (стрелки). - X8000, ПС - просвет синусоида; В - периполез цитотоксических лимфоцитов (стрелки) и иммунный цитоллиз гепатоцитов в центральной зоне ацинуса печени. Полутонкий срез, окраска: азур-фуксин. Об. 100, ок. 10.; С - Контакт лимфоцита (стрелка) с гепатоцитом (периполез). - x10000; D - фиброз в пространстве Диссе - x10000. ПС - просвет синусоида; ГЦ - гепатоцит

В ряде случаев регистрировалось проникновение в перикапиллярное пространство эритроцитов, лимфоцитов (периполез), их тесный контакт с гепатоцитами (рисунки 4В и 4С), с одновременным увеличением количества коллагеновых волокон в пространстве Диссе (4D).

Заключение. У пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС установлены выраженные нарушения микроциркуляции в синусоидах печени, проявляющиеся окклюзией синусоидов, наличием электронноплотных масс и вакуолей, агрегацией в них эритроцитов и тромбоцитов, сужением пространства Диссе.

Морфологическими признаками активации иммунных реакций в синусоидах печени всех пациентов с коин-

фекцией ВИЧ/ВГС были:

- активация и выраженная структурная деструкция КК;
- выраженные деструктивные изменения структуры ЭКС с формированием булавовидных полимембранных образований на поверхности;
- активация ЗКП, кооперация их с лимфоцитами, капилляризация синусоидов и формирование перикапиллярного фиброза;
- межклеточные кооперации СКП с агрессивными лимфоцитами и плазматическими клетками;
- проникновение лимфоцитов и эритроцитов в перикапиллярное пространство, их тесный контакт с гепатоцитами и КК.

Для пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС характерным является редукция микроворсинок со стороны гепатоцитов, сужение перикапиллярного пространства, реактивные структурные изменения СКП, свидетельствующие о нарушении межтканевого обмена между гепатоцитами и кровью.

Таким образом, изменения ультраструктуры СКП при коинфекции ВИЧ/ВГС приводят к нарушению транскапиллярного обмена, пластического и энергетического обеспечения гепатоцитов, активации иммунных реакций в печени, ускорению процессов фиброобразования.

Литература

1. Ивашкин, В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени /В.Т. Ивашкин//Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2009. - №2. - С.2-13.
2. McCuskey, R. S. The Hepatic Microvascular System in Health and Its Response to Toxicants / R. S. McCuskey //The anatomical record. - 2008. - №291. - P. 661-671.
3. Kmiec, Z. Cooperation of liver cells in health and disease /Z. Kmiec // Adv Anat Embryol Cell Biol. - 2001. №161, III-XIII, 1- P.151.
4. Hepatic microcirculatory disturbances in patients with chronic hepatitis B/ Hao Jinghua [et al] //Chinese Medical Journal. - 2002, Vol. 115 No. 1. - P. 65-68
5. Steffan, A. Primary cultures of endothelial cells from the human liver sinusoid are permissive for human immunodeficiency virus type 1/A. Steffan [et al]//Proc. Nati. Acad. Sci. USA. - 1992. - Vol. 89. - P. 1582-1586.
6. Gressner A.M., Bachem M.G. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm //Ann.Biol.Clin. - 1994/ -Vol.52. -P.205-226;
7. Маянский, Д.Н. Клеточно-молекулярные механизмы формирования цирроза печени /Д.Н. Маянский, А.А.Зубахин //Рос. Журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. -1998. -№6. - С.6-12.
8. Kupffer cells are depleted with HIV immunodeficiency and partially recovered with antiretroviral immunoreconstitution /A. Balagopal [et al]// AIDS. - 2009. - № 23(18). P. 2397-2404.
9. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors /JM Eekels [et al.] // Virology journal. - 2012, Vol.9. - P.69 - 80
10. Permissivity of primary cultures of human Kupffer cells for HIV-1. M.P.[et al]// AIDS Res Hum Retroviruses. - 1990. - №6(8). P.987-991.
11. Human Immunodeficiency Gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver ?brogenesis /R. Bruno [et al.]//Gut 2010. - №59. - P.513-520.
12. Virus (HIV)-1 Infects Human Hepatic Stellate Cells and Promotes Collagen I and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression: Implications for the Pathogenesis of HIV/Hepatitis C

Virus-Induced Liver Fibrosis /A. C. Tuyama [et al.]/ Hepatology. - 2010. - №52(2). - P.612-622.

13. Cubero F. J. Kupffer cells and alcoholic liver disease / F. J. Cubero, N. Nieto// Rev. Esp. Enferm. Dig. - 2006. - Vol. 98., № 6. - P. 460-472

14. Crane, M. Human immunodeficiency virus infection and the liver /M. Crane, D. Iser, S. R. Lewin//World J Hepatol 202 March 27;

4(3): 9 -98

15. Brand?o D.F. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. / D.F. Brand?o //Acta Cir Bras. [serial on the Internet]. - 2006. №21.// <http://www.scielo.br/acb>

16. HIV and HCV Cooperatively Promote Hepatic Fibrogenesis via Induction of Reactive Oxygen Species and NF?B/ W. Lin [et al.] / Journal of Biological Chemistry. - 2011. - № 286. - P. 2665-2674.

STRUCTURE OF SINUSOIDAL LIVER CELLS IN PATIENTS WITH HIV/HCV COINFECTION

N.V. Matsiyevskaya, V.M. Tsytkunov, R.I. Kravchuk, V.P. Andreev

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

The aim of the study: to reveal structural changes of liver sinusoidal cells in patients with HIV/HCV coinfections.

Material and methods. Structure of sinusoidal liver cells was studied in 14 patients with HIV/HCV coinfections by light and electron microscopy examination of liver tissue obtained from patients by liver biopsy.

Results. Hepatic microcirculatory disturbances, structural changes in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells, activation of immune reactions in the liver; acceleration of fibrogenesis of various degree of expression were revealed in all patients with HIV/HCV coinfections.

Key words: HIV, HCV, electron microscopy, sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, stellate liver cells, fibrogenesis.

Адрес для корреспонденции: e-mail: natamati@mail.ru

Поступила 27.02.2013