

УДК 616.36-076.5

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЦИТОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ: ЗВЕЗДЧАТЫЕ КЛЕТКИ ИТО**Цыркунов В. М. (tvm111@mail.ru), Андреев В. П. (andrvp@yandex.ru),  
Кравчук Р. И. (cnil@grsmu.by), Кондратович И. А. (iriskak22@mail.ru)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*Введение.* Роль звездчатых клеток Ито (ЗКИ) определена как одна из ведущих в развитии фиброза в печени, однако прижизненная визуализация структуры ЗКИ в клинической практике использована минимально.

*Цель работы:* представить структурно-функциональную характеристику ЗКИ по результатам цитологической идентификации прижизненных биоптатов печени.

*Материалы и методы.* Применены классические методы световой и электронной микроскопии биоптатов и оригинальные методики с использованием ультратонких срезов, фиксации и окраски.

*Результаты.* На фотоиллюстрациях световой и электронной микроскопии биоптатов печени пациентов с хроническим гепатитом С представлены структурные характеристики ЗКИ, находящихся на разных стадиях (покоя, активации) и в процессе трансформации в миофибробласты.

*Выводы.* Применение оригинальных методов клинической морфологической идентификации и оценки функционального состояния ЗКИ повысит качество диагностики и прогнозирования фиброза печени.

**Ключевые слова:** печень, звездчатые клетки Ито, морфология, характеристика, витамин А, фиброз.

**Введение**

Неблагоприятным исходом большинства хронических диффузных поражений печени разной этиологии, включая хронический гепатит С (ХГС), является фиброз печени, в развитии которого главными участниками являются активированные фибробласты, основным источником которых являются активированные звездчатые клетки Ито (ЗКИ) [17, 25].

ЗКИ, синоним – звездчатые клетки печени, жирозапасующие клетки, перисинусоидальные липоциты, стеллатные клетки (англ. Hepatic Stellate Cell, HSC, Cell of Ito, Ito cell). ЗКИ впервые были описаны в 1876 г. К. Купффером и названы им звездчатыми клетками («Sternzellen»). Т. Ито (Т. Ito), обнаружив в них капли жира, обозначил их вначале жиропоглощающими («shibo-sesshusaibo»), а затем, установив, что жир вырабатывался самими клетками из гликогена, – жирозапасующими клетками («shibochozosaibo») [37]. В 1971 г. К. Вакэ (K. Wake) доказал идентичность звездчатых клеток Купффера и жирозапасующих клеток Ито и то, что эти клетки «складируют» витамин А [29].

Около 80% витамина А, находящегося в организме, накапливается в печени, и до 80% всех ретиноидов печени депонировано в жировых каплях ЗКИ. Эфиры ретинола в составе хиломикроннов попадают в гепатоциты, где конвертируются в ретинол, образуя комплекс витамина А с ретинолсвязывающим белком (РСБ), который секретируется в перисинусоидальное пространство, откуда депонируется клетками [34].

Установленная К. Поппером тесная связь ЗКИ с фиброзом печени продемонстрировала их не статичную, а динамичную функцию – способность непосредственно участвовать в ремоделировании внутридолькового перигепатоцеллюлярного матрикса [28].

Основным методом морфологического исследования печени, проводимого по оценке изменений в прижизненных биоптатах, является световая микроскопия, которая в клинической практике позволяет установить активность вос-

паления и стадию хронизации [4]. Недостатком метода является малое разрешение, не позволяющее оценить особенности строения клеток, внутриклеточных органелл, включений, функциональные характеристики. Прижизненное электронно-микроскопическое исследование ультраструктурных изменений в печени дает возможность дополнить данные световой микроскопии и повысить их диагностическую ценность.

В связи с этим идентификация ЗКИ печени, изучение их фенотипа в процессе трансдифференцировки, определение интенсивности их пролиферации являются важнейшим вкладом в прогнозирование исходов болезней печени, а также в патоморфологию и патофизиологию фиброгенеза.

**Цель** – представить структурно-функциональную характеристику ЗКИ по результатам цитологической идентификации прижизненных биоптатов печени.

**Материалы и методы**

Прижизненный биоптат печени получен проведением аспирационной биопсии печени у пациентов с ХГС (РНК HCV+), от которых получено письменное информированное согласие.

Для световой микроскопии полутонких срезов образцы биоптата печени пациентов размером 0,5×2 мм фиксировали методом двойной фиксации: вначале – по методике Sato Taizan [33], затем образцы ткани в течение 1 часа дополнительно фиксировали в 1% осмиевом фиксаторе, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере Зёренсена, рН 7,4. Для лучшего выявления внутриклеточных структур и межклеточного вещества на полутонких срезах в 1% четырехокись осмия добавляли дихромат калия (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) или кристаллы хромового ангидрида (1 мг/мл). После дегидратации образцов в серии спиртовых растворов возрастающей концентрации и ацетоне они помещались в преполимеризованную смесь бутилового метакрилата и стирола и полимеризовались при 550С. Полутонкие срезы (толщиной 1 мкм) последовательно окрашивали

азур 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 четырехоксида осмия на 0,1 М буфере Миллони-га, рН 7,4, при +40С в течение 2 часов [15]. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в аралдит [23, 41]. Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica EM VC7 (Германия) готовили полутонкие срезы (400 нм) и окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе и выбирали однотипный участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм) контрастировали 2% раствором уранилацетата на 50% метаноле [12] и цитратом свинца по E. S. Reynolds [31]. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 10 000-60 000 при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus MegaViewIII (Германия) и программы для обработки изображений iTEM (Olympus, Германия).

### Результаты и обсуждение

ЗКИ располагаются в перисинусоидальном пространстве (Диссе) в карманах между гепатоцитами и эндотелиальными клетками, имеют длинные отростки, проникающие глубоко между гепатоцитами. В большинстве публикаций, посвященных данной популяции ЗКИ, приводится их схематическое изображение, позволяющее только обозначить «территориальную» принадлежность ЗКИ в печени и по отношению к окружающим их «соседям» (рисунок 1).

ЗКИ имеют тесный контакт с эндотелиоцитами через компоненты неполной базальной мембраны и интерстициальные коллагеновые волокна. Нервные окончания проникают между ЗКИ и паренхиматозными клетками, из-за чего пространство Диссе определяют как пространство между пластинками паренхиматозных клеток и

комплексом ЗКИ и эндотелиальных клеток [39].

Полагают, что ЗКИ происходят из слабо-дифференцированных мезенхимных клеток поперечной перегородки развивающейся печени [26]. В эксперименте установлено, что в образовании ЗКИ участвуют гемопоэтические стволовые клетки и что этот процесс не обусловлен сливанием клеток [35].

Синусоидальные клетки (СК), прежде всего ЗКИ, при всех видах регенерации печени играют ведущую роль. Фиброзирующая регенерация печени происходит в результате ингибирования стволовых функций ЗКИ и стволовых клеток костного мозга [7]. В печени человека ЗКИ составляют 5-15%, являясь одной из 4-х разновидностей СК, имеющих мезенхимальное происхождение: клетки Купфера, эндотелиоциты, Pit-клетки. В составе пула СК обнаруживается также 20-25% лейкоцитов [3, 14].

В цитоплазме ЗКИ находятся жировые включения с ретинолом, триглицеридами, фосфолипидами, холестерин, свободные жирные кислоты, а-актин и десмин [10]. Для визуализации ЗКИ применяется окрашивание хлоридом золота. В эксперименте установлено, что маркером дифференциации ЗКИ от других миофибробластов является экспрессия ими белка рилин [19].

ЗКИ существуют в спокойном («неактивные ЗКИ»), переходном и длительно активированном состоянии, каждое из которых характеризуется экспрессией генов и фенотипом ( $\alpha$ -SMA, ICAM-1, хемокины и цитокины).

ЗКИ в неактивном состоянии имеют округлую, слегка вытянутую или неправильную форму, крупное ядро и яркий визуализационный признак – липидные включения (капли), содержащие ретинол (рисунок 2).

Количество липидных капель в неактивной ЗКИ достигает 30 и более, они близки по размеру, прилежат друг к другу, вдавливаясь в ядро и оттесняя его к периферии (рисунок 2). Между большими каплями могут располагаться мелкие включения. Цвет капель зависит от фиксатора и окраски материала. В одном случае они светлые (рисунок 2а), в другом – темно зеленые (рисунок 2б).

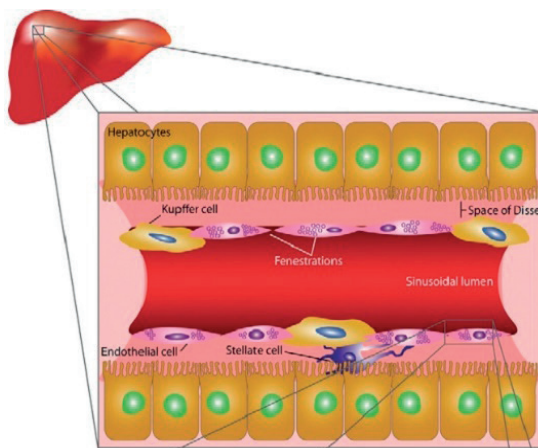
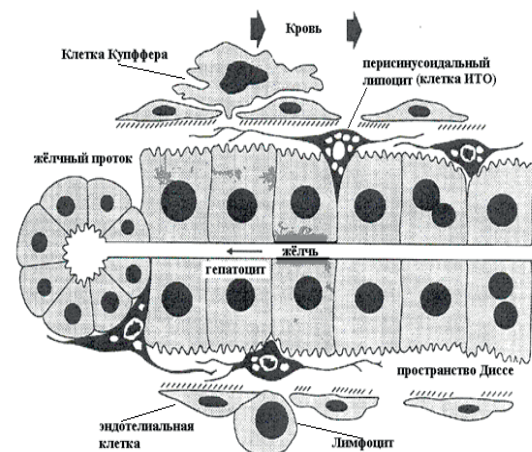
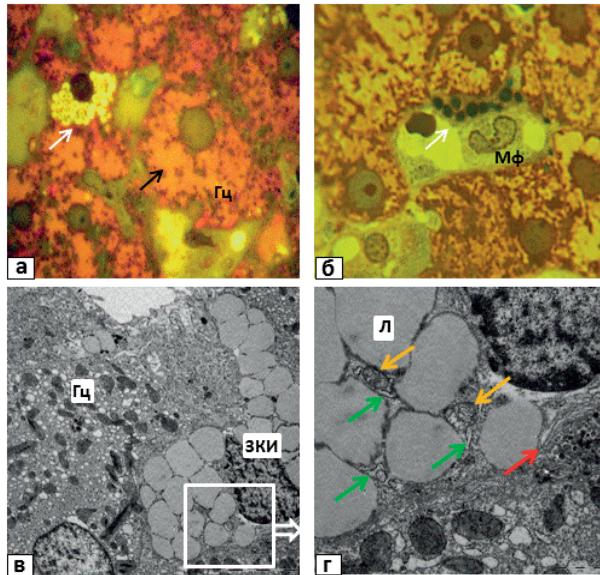


Рисунок 1. – Схема расположения ЗКИ (stellate cell, перисинусоидальный липоцит) в перисинусоидальном пространстве Диссе (space of Disse), Интернет-ресурс







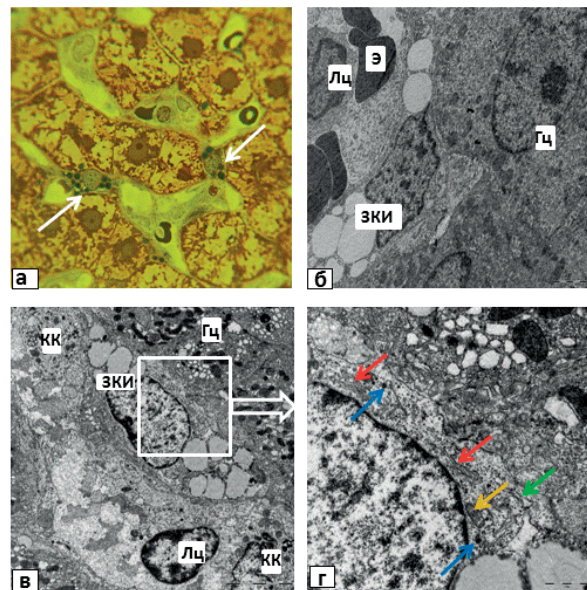
**Рисунок 2. – ЗКИ, находящиеся в неактивном состоянии**

*а* – ЗКИ округлой формы с большим содержанием липидных капель со светлой окраской (белые стрелки), гепатоциты (Гц) с опустошенной цитоплазмой (черная стрелка); *б* – ЗКИ с липидными каплями темной окраски, в тесном контакте с макрофагом (Мф); *а-б* – полутонкие срезы. Окраска азури II – основной фуксин. Микрофотографии. Увел. 1000; *в* – ЗКИ с обилием липидных капель (более 30), имеющая неправильную форму (ув. 6 000); *г* – ультраструктурные компоненты ЗКИ: л – липидные капли, митохондрии (оранжевые стрелки), ГрЭС (зеленые стрелки), комплекс Гольджи (красная стрелка), ув. 15 000; *в-г* – электронограммы

При электронной микроскопии на фоне светлого липидного субстрата формируется более осмиофильный маргинальный ободок (рисунок 5а) [6]. У большинства «покоящихся» ЗКИ наряду с крупными липидными включениями заметно малое количество цитоплазматического матрикса, бедного митохондриями (Мх) и гранулярной эндоплазматической сетью (ГрЭС). При этом отчетливо видны компартменты умеренно развитого комплекса Гольджи в виде стопки из 3-4 уплощенных цистерн со слегка расширенными концами (рисунок 2г).

При определенных условиях активирующиеся ЗКИ приобретают смешанный, или переходный фенотип, сочетающий морфологические признаки и липидосодержащей, и фибробластоподобной клетки [6] (рисунок 3).

Переходный фенотип ЗКИ также имеет свои морфологические признаки. Клетка приобретает вытянутую форму, количество липидных включений уменьшается, происходит сокращение числа инвагинаций нуклеолеммы. Увеличивается объем цитоплазмы, содержащей многочисленные цистерны ГрЭС со связанными рибосомами и свободные рибосомы, Мх. Наблюдается гиперплазия компонентов пластинчатого комплекса Гольджи, представленного несколькими стопками из 3-8 уплощенных цистерн, возрастает численность лизосом, участвующих в деграда-



**Рисунок 3. – ЗКИ, находящиеся в переходном состоянии**

*а* – ЗКИ (белые стрелки). Полутонкий срез. Окраска азури II – основной фуксин. Микрофотография. Увел. 1000; *б* – ЗКИ удлиненной формы и с малым количеством липидных капель; ув. 8 000; *в* – ЗКИ в контакте с клетками Купффера (КК) и лимфоцитом (Лц), ув. 6 000. (Гц – гепатоцит, л – липидные капли, Э – эритроцит); *г* – митохондрии (оранжевые стрелки), ГрЭС (зеленые стрелки), к. Гольджи (красная стрелка), лизосомы (синие стрелки), ув. 20 000; *б, в, г* – электронограммы

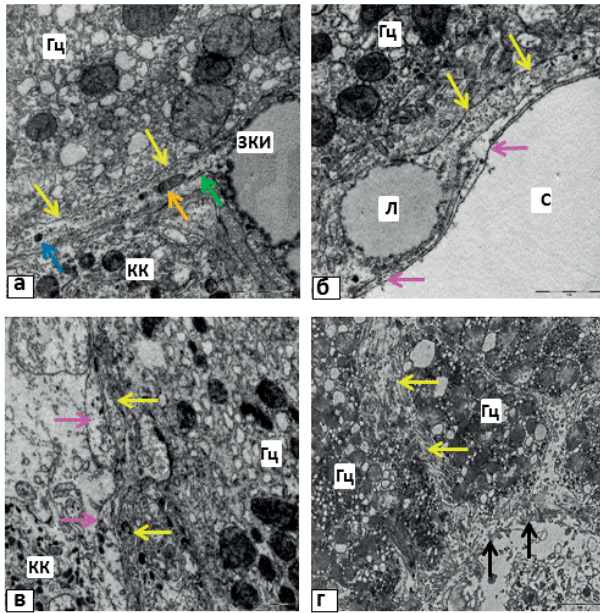
ции липидных капель (рисунок 3г). Гиперплазия компонентов ГрЭС и комплекса Гольджи связана со способностью фибробластов синтезировать молекулы коллагена, а также моделировать их путем посттрансляционного гидроксилирования и гликозилирования в эндоплазматическом ретикулуме и элементах комплекса Гольджи.

В неповрежденной печени ЗКИ, находясь в спокойном состоянии, охватывают своими отростками синусоидный капилляр. Отростки ЗКИ подразделяются на 2 типа: перисинусоидальные (субэндотелиальные) и интергепатоцеллюлярные (рисунок 4).

Первые выходят из тела клетки и простираются вдоль поверхности синусоидного капилляра, охватывая его тонкими пальцеобразными ответвлениями. Они покрыты короткими ворсинками, имеют характерные длинные микровыбросы, простирающиеся еще дальше по поверхности эндотелиальной трубки капилляра. Интергепатоцеллюлярные выросты, преодолев пластинку гепатоцитов и достигнув соседнего синусоида, делятся на несколько перисинусоидальных выростов. Таким образом, ЗКИ в среднем охватывает больше двух соседних синусоидов [40].

При поражениях печени происходит активация ЗКИ и процесса фиброгенеза, в котором выделяют 3 фазы. Они обозначаются как инициация, пролонгация и резолуция (разрешение фиброзной ткани) [9]. Этот процесс трансформации «покоящихся» ЗКИ в фиброзирующие миофибробласты инициируется цитокинами (IL-1, IL-6,





**Рисунок 4.** – Перисинусоидальные (субэндотелиальные) и интергепатоцеллюлярные отростки (выросты) ЗКИ

*а* – отросток ЗКИ (желтые стрелки), выходящий из тела клетки, ув. 30 000; *б* – отросток ЗКИ, расположенный вдоль поверхности синусоидного капилляра, содержащий липидную каплю, ув. 30 000; *в* – субэндотелиально расположенные отростки ЗКИ. Отростки эндотелиальных клеток (розовые стрелки); *г* – интергепатоцеллюлярный отросток ЗКИ; участок разрушения мембран ЗКИ и гепатоцита (черные стрелки), ув. 10 000. Электронограммы

TNF- $\alpha$ ), недоокисленными продуктами метаболизма, активными формами кислорода, оксидом азота, эндотелином, тромбоцитарным фактором (PDGF), активатором плазминогена, трансформирующим фактором роста (TGF-1), ацетальдегидом и многими другими. Непосредственными активаторами являются гепатоциты в состоянии окислительного стресса, клетки Купфера, эндотелиоциты, лейкоциты, тромбоциты, продуцирующие цитокины (паракринные сигналы) и сами ЗКИ (аутокринная стимуляция). Активация сопровождается экспрессией (включением в работу) новых генов, синтезом цитокинов и белков экстрацеллюлярного матрикса (коллагенов I, III, V типов) [1, 27].

На данном этапе процесс активации ЗКИ может завершиться за счет стимуляции образования в ЗКИ противовоспалительных цитокинов, ингибирующих продукцию TNF- $\alpha$  макрофагами в зоне повреждения. В результате количество ЗКИ резко сокращается, они подвергаются апоптозу и процессы фиброза в печени не развиваются [18, 32].

Во вторую фазу (продолжительную) при продолжительном постоянном паракринном и аутокринном воздействии активирующих стимулов в ЗКИ «поддерживается» активированный фенотип, характеризующийся превращением ЗКИ в контракильные миофибробластоподобные клетки, осуществляющие синтез экстрацеллюлярного фибриллярного коллагена.

Активированный фенотип характеризуется пролиферацией, хемотаксисом, сокращаемостью, потерей запасов ретиноида и образованием клеток, напоминающих миофибробластные [36]. Активированные ЗКИ также демонстрируют повышенное содержание новых генов, таких как  $\alpha$ -SMA, ICAM-1, хемокины и цитокины. Активация клеток свидетельствует о начале ранней стадии фиброгенеза и предшествует повышенному продуцированию ЕСМ-белков [13]. Образовавшиеся фиброзные ткани подвергаются ремоделированию за счет расщепления матрикса с помощью матриксных металлопротеиназ (matrixmetalloproteinases – MMPs). В свою очередь расщепление матрикса регулируется тканевыми ингибиторами MMPs (tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases – TIMPs). MMPs и TIMPs входят в семейство цинкозависимых ферментов. MMPs синтезируются в ЗКИ в виде неактивных проферментов, которые активируются при отщеплении пропептида, но ингибируются при взаимодействии с эндогенными TIMPs – TIMPs-1 и TIMPs-2. ЗКИ продуцируют 4 типа MMPs мембранного типа, которые активируются под воздействием IL-1  $\beta$ . Среди MMPs особое значение придается MMPs-9 – нейтральной матриксной металлопротеиназе, которая обладает активностью против коллагена 4-го типа, входящего в состав базальной мембраны, а также против частично денатурированных коллагенов 1-го и 5-го типов [5, 13, 21].

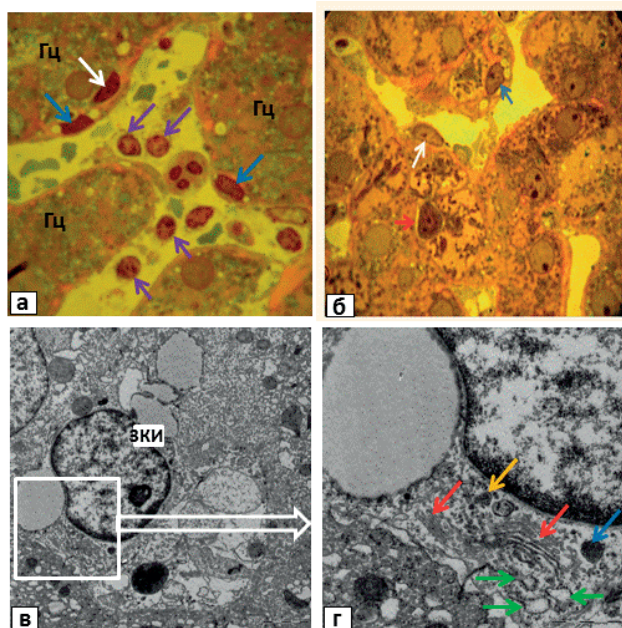
Об увеличении популяции ЗКИ при разного рода повреждениях печени судят по активности значительного числа митогенных факторов, родственных им тирозинкиназных рецепторов и других идентифицированных митогенов, которые вызывают наиболее выраженную пролиферацию ЗКИ: эндотелин-1, тромбин, FGF – фактор роста фибробластов, PDGF – фактор роста эндотелия сосудов, IGF – инсулиноподобный фактор роста. Накопление ЗКИ в зонах повреждения печени происходит не только за счет пролиферации этих клеток, но и за счет их направленной миграции в эти зоны путем хемотаксиса, при участии таких хемоаттрактантов, как PDGF и лейкоцитарный хемоаттрактант–MCP (моноцитарный хемотаксический протеин-1) [9, 21].

У активированных ЗКИ количество липидных капель сокращается до 1-3-х с расположением их на противоположных полюсах клетки (рисунок 5).

Активированные ЗКИ приобретают вытянутую форму, значительные участки цитоплазмы занимает комплекс Гольджи, выявляются довольно многочисленные цистерны ГрЭС (показатель синтеза белка на экспорт). Количество остальных органелл снижено: обнаруживаются малочисленные свободные рибосомы и полисомы, единичные митохондрии, нерегулярно – лизосомы (рисунок 6).

В 2007 г. ЗКИ были впервые названы стволовыми клетками печени, так как они экспрессируют один из маркеров кроветворных мезенхимальных стволовых клеток – CD133 [8].



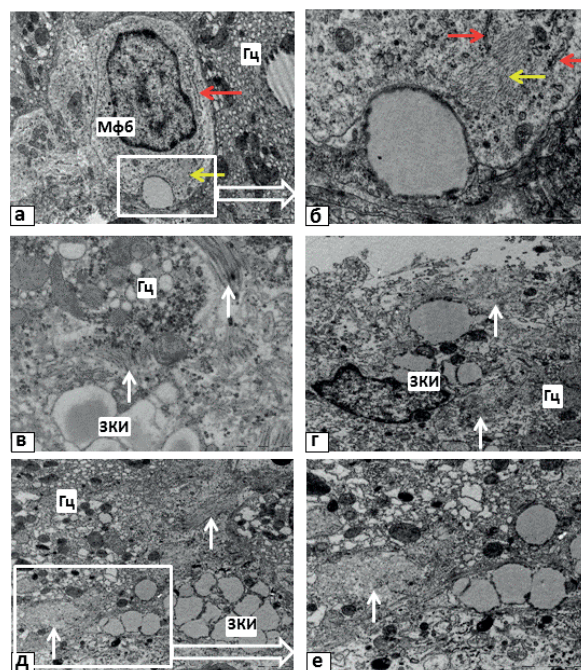


**Рисунок 5. – ЗКИ, находящиеся в активированном состоянии**

а, б – ЗКИ (синие стрелки) с единичными липидными включениями, локализованными у противоположных полюсов ядра. Перисинусоидальная соединительная ткань (на рис. ба) и прослойка межклеточного матрикса вокруг гепатоцита (на рис. бб) окрашены в красный цвет. Цитотоксические лимфоциты (фиолетовые стрелки). Эндотелиальная клетка (белая стрелка). Тесный контакт плазматической клетки (красная стрелка) и гепатоцита. Полутонкие срезы. Окраска азури II – основной фуксин. Микрофотографии. Увел. 1000 ; в, г – ультраструктурные компоненты ЗКИ: митохондрии (оранжевые стрелки), комплекс Гольджи (красная стрелка), цистерны его более осmioфильной цис-стороны обращены к расширенным элементам гранулярной эндоплазматической сети (зеленые стрелки), лизосома (голубая стрелка) (ув. 10 000 и 20 000, соответственно); в, г – электронограммы

Миофибробласты, которые отсутствуют в нормальной печени, имеют три потенциальных источника: первый – во время внутриутробного развития печени, в портальных трактах миофибробласты окружают сосуды и желчные протоки во время их созревания, а после полного развития печени они исчезают и заменяются в портальных трактах портальными фибробластами; второй – при поражении печени они образуются за счет портальных мезенхимальных клеток и покоящихся ЗКИ, реже за счет переходных эпителиально-мезенхимальных клеток. Они характеризуются наличием CD45-, CD34-, Desmin +, глиального фибриллярного белка, ассоциированного с (GFAP) + и Thy-1 +.

Недавние исследования показали, что гепатоциты, холангиоциты и эндотелиальные клетки могут стать миофибробластами через эпителиальные или через переход эндотелиальных клеток в мезенхимальные (EMT). Эти клетки включают такие маркеры, как CD45-, альбумин+ (т.е. гепатоцитов), CD45-, СК19+ (т.е. холангиоцитов) или Tie-2 + (эндотелиальные клетки).



**Рисунок 6. – Высокая фибротическая активность ЗКИ**

а, б – миофибробласт (Мфб), клетка содержит крупное ядро, элементы ГрЭС (красные стрелки), многочисленные свободные рибосомы, полиморфные везикулы и гранулы, единичные митохондрии и яркий визуализационный признак – пучок актиновых нитей в цитоплазме (желтые стрелки); увел. 12 000 и 40 000; в, г, д, е – высокая фибротическая активность ЗКИ при сохранении в цитоплазме ретиноидсодержащих липидных капель. Многочисленные пучки коллагеновых фибрилл (белые стрелки), сохранивших (а) и потерявших (г, д, е) специфическую поперечную исчерченность; увел. 25 000, 15 000, 8 000, 15 000. Электронограммы

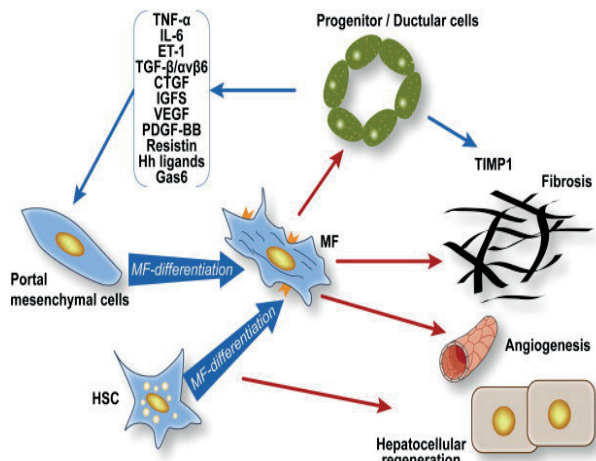
Кроме того, клетки костного мозга, состоящие из фиброцитов и циркулирующих мезенхимных клеток, могут трансформироваться в миофибробласты. Это клетки CD45+ (фиброциты), CD45+/- (циркулирующие мезенхимальные клетки), коллаген типа I+, CD11d+ и МНС класса II+ (рисунок 7) [25, 26].

Литературные данные подтверждают не только тесную связь пролиферации овальных клеток с пролиферацией синусоидальных клеток [24], но и данные о возможной дифференцировке ЗКИ в печеночный эпителий [11], которая была названа мезенхимально-эпителиальной трансформацией перисинусоидальных клеток [2].

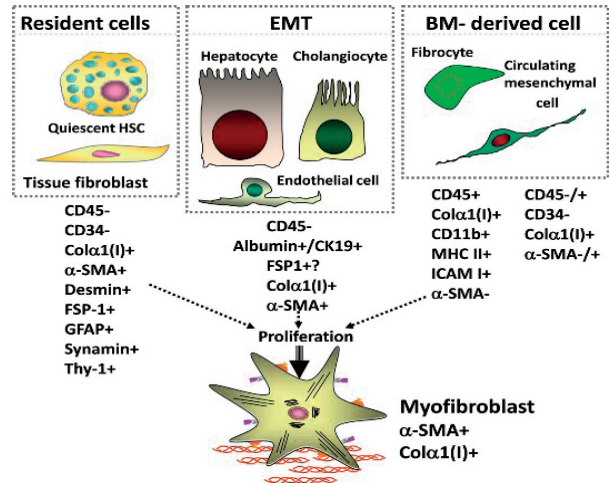
В состоянии фиброгенной активации миофибробластоподобные ЗКИ, наряду с уменьшением числа и последующим исчезновением липидных капель, характеризуются очаговой пролиферацией (рисунок 8), иммуногистохимической экспрессией фибробластоподобных маркеров, в том числе гладкомышечного α-актина, и формированием перицеллюлярных коллагеновых фибрилл в пространствах Диссе [16, 20].

В фазу развития фиброза нарастающая гипоксия печеночной ткани становится фактором дополнительной избыточной экспрессии в стволовых клетках провоспалительных молекул адгезии – ICAM-1, ICAM-2, VEGF, провоспа-





Взаимодействие протоковых печеночных клеток-предшественников с миофибробластами печени



Миофибробластоподобные ЗКИ в состоянии фиброгенной активации [16, 20].

Рисунок 7. – Участники миофибробластической активации ЗКИ

лительных хемоаттрактантов – M-CSF, MCP-1 (монокитарный хемотаксический протеин-1) и CJNC (цитокин-обусловленный нейтрофильный хемоаттрактант) и других, которые стимулируют образование провоспалительных цитокинов (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, PAF, SCF, ET-1) и усиливают процессы фиброгенеза в печени, создавая условия для самоподдерживаемой индукции непрекращающейся активации ЗКИ и процессов фиброгенеза [21].

На микроскопических препаратах перикапиллярный фиброз проявляется в виде интенсивной окраски перисинусоидальной соединительной ткани и прослойки межклеточного матрикса вокруг гепатоцитов (часто гибнущих) в красный цвет. На электронно-микроскопических препаратах фиброзные изменения визуализируются либо в виде сформированных крупных пучков фибрилл коллагеновых волокон, сохранивших поперечную исчерченность, либо в виде массив-

ных отложений в пространстве Диссе волокнистой массы, представляющей собой набухшие и потерявшие периодическую исчерченность коллагеновые волокна (рисунок 9).

По современным представлениям, фиброз – динамический процесс, который может прогрессировать и регрессировать (рисунок 10).

В последнее время были предложены несколько специфических маркеров ЗКИ: расцвет витамина А (ВА) в липидные капли, GFAP, рецептор p75 NGF и синаптофизин [1, 30]. Проводятся исследования по участию ЗКИ печени в пролиферации и дифференцировке стволовых клеток печени [26, 35].

Нами исследовано содержание ретинолсвязывающего белка (РСБ-4), образующего комплекс с ВА, концентрация которого в плазме крови в норме коррелирует с обеспеченностью организма ВА, 80% которого находится в ЗКИ.

Установлена зависимость между содержани-

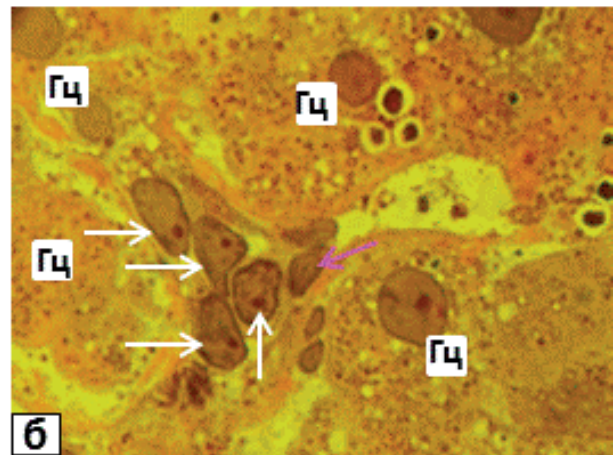
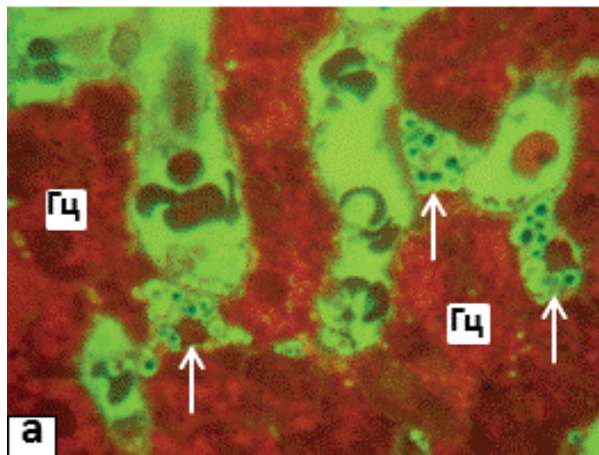
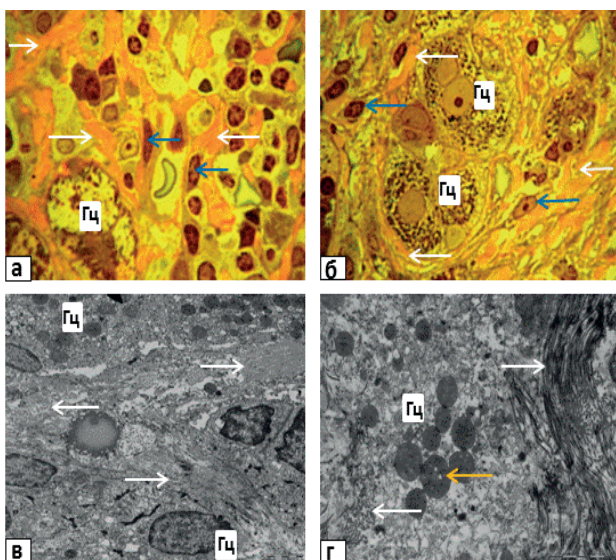


Рисунок 8. – Очаговая пролиферация ЗКИ в состоянии фиброгенной активации

а – гиперплазия ЗКИ (белые стрелки) в просвете расширенных синусоидов; б – пролиферация трансдифференцированных ЗКИ (белые стрелки), эндотелиальная клетка (розовая стрелка). Полутонкие срезы. Окраска азур II – основной фуксин. Микрофотографии. Увел. 1000



**Рисунок 9. – Финальная стадия миофибробластической активации ЗКИ**

а, б – перисинусоидальный фиброз (белые стрелки). Перисинусоидальная соединительная ткань и прослойка межклеточного матрикса вокруг гепатоцитов (б) окрашены основным фуксином в красный цвет. ЗКИ, активированные и трансформированные в фибробласты (синие стрелки). Гц на рис. а – гепатоцит с опустошенной цитоплазмой. Полутонкие срезы. Окраска азури II – основным фуксин. Микрофотографии. Увел. 1000; в, з – перисинусоидальный и перигепатоцеллюлярный фиброз в дольке печени, повышенная электронная плотность фибрилл коллагеновых волокон; конденсация матрикса митохондрий в гепатоците (оранжевая стрелка). Ув.8 000 и 15 000, соответственно. Электронограммы

**Таблица 1. – Показатели содержания РСБ-4 у пациентов с циррозом печени (ЦП) и хроническим гепатитом (ХГ) разной этиологии, нг/мл (M±m)**

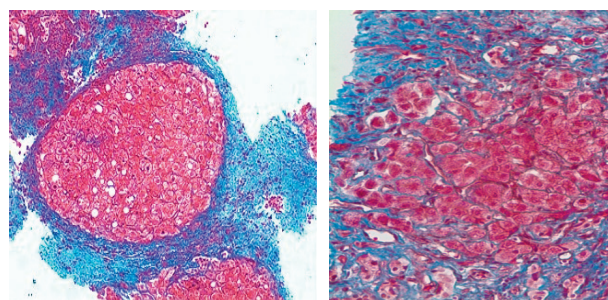
Группа	n	M±m	p
Цирроз печени	17	23,6±2,29	<0,05
ХГ, АсАТ норма	16	36,9±2,05*	>0,05
ХГ, АсАТ >2-х норм	13	33,0±3,04*	>0,05
ХГ, АлАТ норма	13	37,5±3,02*	>0,05
ХГ, АлАТ >2-х норм	21	35,9±2,25*	>0,05
Контроль	15	31,2±2,82	

Примечание: p – достоверные различия с контролем (p<0,05); \* – достоверные различия между ЦП и ХГ (p<0,05)

**Литература**

1. Ивашкин, В. Т. Клиническая симптоматика дофибротических изменений : стенограмма лекции Всероссийского Интернет-Конгресса специалистов по внутренним болезням / В. Т. Ивашкин, А. О. Бугеров // ИНТЕРНИСТ : Национальное Интернет-Общество специалистов по внутренним болезням. – 2013. – Режим доступа: <http://internist.ru/publications/detail/6569/>. – Дата доступа: 21.11.2016.

2. Киясов, А. П. Овальные клетки – предполагаемые стволовые клетки печени или гепатобласты? / А. П. Киясов, А. А. Гумерова, М. А. Титова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 2, № 4. – С. 55–58.



Ложная долька, окруженная фиброзной септой. Окраска по Массону. Ув.×50  
Резолюция фиброзной септы вокруг ложной дольки. Окраска по Массону. Ув.×200

**Рисунок 10. – Динамика событий в ложной дольке пациента с вирусным циррозом печени через 6 месяцев после трансплантации в печень аутологических мезенхимальных стволовых клеток [22]**

ем РСБ-4 и 4-й стадией фиброза (цирроз) в отличие от хронического гепатита, при котором такая зависимость не прослеживалась, независимо от биохимических маркеров активности воспаления в печени.

Данный факт необходимо учитывать при обосновании заместительной терапии для устранения дефицита ВА в организме, который может быть обусловлен истощением потенциала ЗКИ, обусловленного прогрессирующим фиброзом в печени.

**Выводы**

1. Максимальная результативность оценки структурно-функционального состояния ЗКИ обеспечивается морфологическим исследованием прижизненного биоптата при одновременном использовании комплекса методик клеточной визуализации (световая, электронная микроскопия ультратонких срезов и оригинальных методов фиксации и окраски).
2. Результаты морфологического исследования ЗКИ позволяют повысить качество прижизненной диагностики фиброза, провести его мониторинг и прогнозирование исходов хронических диффузных поражений печени на более высоком современном уровне.
3. Результаты морфологических заключений позволят клиницисту дополнительно включить в формулировку окончательного диагноза уточненные данные по стадии хронизации (стабилизация, прогрессирование или резолюция фиброза) в процессе терапии.

**Literatura**

1. Ivashkin, V. T. Klinicheskaya simptomatika dofibrroticheskikh izmenenij : stenogramma lekcii Vserossijskogo Internet-Kongressa specialistov po vnutrennim boleznyam / V. T. Ivashkin, A. O. Bueverov // INTERNIST : Nacional'noe Internet-Obshchestvo specialistov po vnutrennim boleznyam. – 2013. – Rezhim dostupa: <http://internist.ru/publications/detail/6569/>. – Data dostupa: 21.11.2016.

2. Kiyasov, A. P. Oval'nye kletki – predpolagaemye stvolovyye kletki pecheni ili hepatoblasty? / A. P. Kiyasov, A. A. Gumerova, M. A. Titova // Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. – 2006. – Т. 2, № 4. – С. 55–58.



3. О роли синусоидальных клеток печени и клеток костного мозга в обеспечении регенераторной стратегии здоровой и поврежденной печени / А. В. Люндуп [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII, № 1. – С. 78–85.
4. Серов, В. В. Морфологические критерии оценки этиологии, степени активности и стадии процесса при вирусных хронических гепатитах В и С / В. В. Серов, Л. О. Севергина // Архив патологии. – 1996. – № 4. – С. 61–64.
5. Структурно-функциональная характеристика звездчатых клеток печени в динамике фиброза / О. А. Постникова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10. – С. 359–362.
6. Ультраструктурное и иммуногистохимическое исследование звездчатых клеток печени в динамике фиброза и цирроза печени инфекционно-вирусного генеза / Г. И. Непомнящих [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 12. – С. 681–686.
7. Щеглев, А. И. Структурно-метаболическая характеристика синусоидальных клеток печени / А. И. Щеглев, О. Д. Мишнев // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 3, № 1. – С. 73–82.
8. CD34 hepatic stellate cells are progenitor cells / C. Kordes [et al.] // Biochem., Biophys. Res. Common. – 2007. – Vol. 352 (2). – P. 410–417.
9. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis / M. J. Arthur [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 1994. – Vol. 190 (9-10). – P. 825–833.
10. Effects of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cell lipid droplets / H. Moriwaki [et al.] // J. Lipid. Res. – 1988. – Vol. 29. – P. 1523–1534.
11. Fetal liver consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition / J. Chagraoni [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 101. – P. 2973–2982.
12. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens / A. M. Glauert [et al.] // Practical Methods in Electron Microscopy. – New York : Am. Elsevier, 1975. – Vol. 3, part 1.
13. Friedman, S. Hepatic fibrosis 2006: Report of the Third AASLD Single Topic Conference / S. Friedman, D. Rockey, B. Montgomery // Hepatology. – 2006. – Vol. 45 (1). – P. 242–249.
14. Gaga, M. D. Human and rat hepatic stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis / M. D. Gaga // J. Hepatol. – 1999. – Vol. 30, № 5. – P. 850–858.
15. Glauert, A. M. Araldite as embedding medium for electron microscopy / A. M. Glauert, R. H. Glauert // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1958. – Vol. 4. – P. 409–414.
16. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury / M. Perepelyuk [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2013. – Vol. 304 (6). – P. 605–614.
17. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells / R. Bataller [et al.] // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 126, iss. 2. – P. 529–540.
18. Iredale, J. P. Hepatic Stellate Cell Behavior During Resolution of Liver Injury / J. P. Iredale // Semin. Liver Dis. – 2001. – Vol. 21 (3). – P. 427–436.
19. Kobold, D. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts / D. Kobold // J. Hepatol. – 2002. – Vol. 36 (5). – P. 607–613.
20. Lepreux, S. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo) fibroblasts [Electronic resource] / S. Lepreux, A. Desmoulière
3. O roli sinusoidal'nyh kletok pecheni i kletok kostnogo mozga v obespechenii regeneratornoj strategii zdravoj i povrezhdennoj pecheni / A. V. Lyundup [i dr.] // Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. – 2010. – T. XII, № 1. – S. 78–85.
4. Serov, V. V. Morfolozicheskie kriterii ocenki ehtologii, stepeni aktivnosti i stadii processa pri virusnyh hronicheskikh gepatitah V i S / V. V. Serov, L. O. Severgina // Arhiv patologii. – 1996. – № 4. – S. 61–64.
5. Strukturno-funkcional'naya harakteristika zvezdchatykh kletok pecheni v dinamike fibroza / O. A. Postnikova [i dr.] // Fundamental'nye issledovaniya. – 2011. – № 10. – S. 359–362.
6. Ul'trastrukturnoe i immunogistohimicheskoe issledovanie zvezdchatykh kletok pecheni v dinamike fibroza i cirroza pecheni infekcionno-virusnogo geneza / G. I. Nepomnyashchih [i dr.] // Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny. – 2006. – T. 142, № 12. – S. 681–686.
7. SHCHeglev, A. I. Strukturno-metabolicheskaya harakteristika sinusoidal'nyh kletok pecheni / A. I. SHCHeglev, O. D. Mishnev // Uspekhi sovremennoj biologii. – 1991. – T. 3, № 1. – S. 73–82.
8. CD34 hepatic stellate cells are progenitor cells / C. Kordes [et al.] // Biochem., Biophys. Res. Common. – 2007. – Vol. 352 (2). – P. 410–417.
9. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis / M. J. Arthur [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 1994. – Vol. 190 (9-10). – P. 825–833.
10. Effects of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cell lipid droplets / H. Moriwaki [et al.] // J. Lipid. Res. – 1988. – Vol. 29. – P. 1523–1534.
11. Fetal liver consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition / J. Chagraoni [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 101. – P. 2973–2982.
12. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens / A. M. Glauert [et al.] // Practical Methods in Electron Microscopy. – New York : Am. Elsevier, 1975. – Vol. 3, part 1.
13. Friedman, S. Hepatic fibrosis 2006: Report of the Third AASLD Single Topic Conference / S. Friedman, D. Rockey, B. Montgomery // Hepatology. – 2006. – Vol. 45 (1). – P. 242–249.
14. Gaga, M. D. Human and rat hepatic stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis / M. D. Gaga // J. Hepatol. – 1999. – Vol. 30, № 5. – P. 850–858.
15. Glauert, A. M. Araldite as embedding medium for electron microscopy / A. M. Glauert, R. H. Glauert // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1958. – Vol. 4. – P. 409–414.
16. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury / M. Perepelyuk [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2013. – Vol. 304 (6). – P. 605–614.
17. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells / R. Bataller [et al.] // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 126, iss. 2. – P. 529–540.
18. Iredale, J. P. Hepatic Stellate Cell Behavior During Resolution of Liver Injury / J. P. Iredale // Semin. Liver Dis. – 2001. – Vol. 21 (3). – P. 427–436.
19. Kobold, D. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts / D. Kobold // J. Hepatol. – 2002. – Vol. 36 (5). – P. 607–613.
20. Lepreux, S. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo) fibroblasts [Electronic resource] / S. Lepreux, A. Desmoulière



- fibroblasts [Electronic resource] / S. Lepreux, A. Desmoulière // *Front. Physiol.* – 2015. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00173>. – Date of access: 31.10.2016.
21. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma mod-ulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells / F. Marra [et al.] // *Gastroenterology.* – 2000. – Vol. 119. – P. 466–478.
  22. Mesenchymal Bone Marrow-derived Stem Cells Transplantation in Patients with HCV Related Liver Cirrhosis / S. Lukashyk [et al.] // *J. Clin. Transl. Hepatol.* – 2014. – Vol. 2, iss. 4. – P. 217–221.
  23. Millonig, G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G. A. Millonig // *J. Appl. Physics.* – 1961. – Vol. 32. – P. 1637–1643.
  24. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver / S. Paku [et al.] // *Am. J. Hepatol.* – 2001. – Vol. 158. – P. 1313–1323.
  25. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis / D. A. Brenner [et al.] // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2012. – Vol. 5, suppl. 1. – S. 17.
  26. Origins and functions of liver myofibroblasts / S. Lemoine [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1832 (7). – P. 948–954.
  27. Pinzani, M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells / M. Pinzani // *Front. Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 1720–1726.
  28. Popper, H. Distribution of vitamin A in tissue as revealed by fluorescence microscopy / H. Popper // *Physiol. Rev.* – 1944. – Vol. 24. – P. 205–224.
  29. Querner, F. Der mikroskopische Nachweis von Vitamin A im animalen Gewebe. Zur Kenntnis der paraplasmatischen Leberzellen-einschlüsse. Dritte Mitteilung / F. Querner // *Klin. Wschr.* – 1935. – Vol. 14. – P. 1213–1217.
  30. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling / B. Hinz [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2012. – Vol. 180. – P. 1340–1355.
  31. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.
  32. Safadi, R. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes / R. Safadi // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127 (3). – P. 870–882.
  33. Sato, T. An electron microscopic study of specimen-fixed for longer periods in phosphate buffered formalin / T. Sato, I. Takagi // *J. Electron Microsc.* – 1982. – Vol. 31, № 4. – P. 423–428.
  34. Senoo, H. Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells) / H. Senoo, N. Kojima, M. Sato // *Vitam. Horm.* – 2007. – Vol. 75. – P. 131–159.
  35. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver / K. Asahina [et al.] // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 53. – P. 983–995.
  36. Stanciu, A. New data about ITO cells / A. Stanciu, C. Cotutiu, C. Amalinei // *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* – 2002. – Vol. 107, № 2. – P. 235–239.
  37. Suematsu, M. Professor Toshio Ito: a clairvoyant in pericyte biology / M. Suematsu, S. Aiso // *Keio J. Med.* – 2000. – Vol. 50. – P. 66–71.
  38. Thabut, D. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? / D. Thabut, V. Shah // *J. Hepatol.* – 2010. – Vol. 53. – P. 976–980.
  39. Wake, K. Hepatic stellate cells: Three-dimensional structure, localization, heterogeneity and development / K. Wake // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci.* – 2006. – Vol. 82, Part 1. – P. 1–12.
  40. Wake, K. Hepatic stellate cells: A review of their biology and role in liver fibrosis / K. Wake // *Front. Physiol.* – 2015. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00173>. – Date of access: 31.10.2016.
  21. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma mod-ulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells / F. Marra [et al.] // *Gastroenterology.* – 2000. – Vol. 119. – P. 466–478.
  22. Mesenchymal Bone Marrow-derived Stem Cells Transplantation in Patients with HCV Related Liver Cirrhosis / S. Lukashyk [et al.] // *J. Clin. Transl. Hepatol.* – 2014. – Vol. 2, iss. 4. – P. 217–221.
  23. Millonig, G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G. A. Millonig // *J. Appl. Physics.* – 1961. – Vol. 32. – P. 1637–1643.
  24. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver / S. Paku [et al.] // *Am. J. Hepatol.* – 2001. – Vol. 158. – P. 1313–1323.
  25. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis / D. A. Brenner [et al.] // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2012. – Vol. 5, suppl. 1. – S. 17.
  26. Origins and functions of liver myofibroblasts / S. Lemoine [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1832 (7). – P. 948–954.
  27. Pinzani, M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells / M. Pinzani // *Front. Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 1720–1726.
  28. Popper, H. Distribution of vitamin A in tissue as revealed by fluorescence microscopy / H. Popper // *Physiol. Rev.* – 1944. – Vol. 24. – P. 205–224.
  29. Querner, F. Der mikroskopische Nachweis von Vitamin A im animalen Gewebe. Zur Kenntnis der paraplasmatischen Leberzellen-einschlüsse. Dritte Mitteilung / F. Querner // *Klin. Wschr.* – 1935. – Vol. 14. – P. 1213–1217.
  30. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling / B. Hinz [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2012. – Vol. 180. – P. 1340–1355.
  31. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.
  32. Safadi, R. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes / R. Safadi // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127 (3). – P. 870–882.
  33. Sato, T. An electron microscopic study of specimen-fixed for longer periods in phosphate buffered formalin / T. Sato, I. Takagi // *J. Electron Microsc.* – 1982. – Vol. 31, № 4. – P. 423–428.
  34. Senoo, H. Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells) / H. Senoo, N. Kojima, M. Sato // *Vitam. Horm.* – 2007. – Vol. 75. – P. 131–159.
  35. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver / K. Asahina [et al.] // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 53. – P. 983–995.
  36. Stanciu, A. New data about ITO cells / A. Stanciu, C. Cotutiu, C. Amalinei // *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* – 2002. – Vol. 107, № 2. – P. 235–239.
  37. Suematsu, M. Professor Toshio Ito: a clairvoyant in pericyte biology / M. Suematsu, S. Aiso // *Keio J. Med.* – 2000. – Vol. 50. – P. 66–71.
  38. Thabut, D. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? / D. Thabut, V. Shah // *J. Hepatol.* – 2010. – Vol. 53. – P. 976–980.
  39. Wake, K. Hepatic stellate cells: Three-dimensional structure, localization, heterogeneity and development / K. Wake // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci.* – 2006. – Vol. 82, Part 1. – P. 1–12.

- Wake // Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci. – 2006. – Vol. 82 (4). – P. 155–164.
40. Wake, K. In Cells of the Hepatic Sinusoid / K. Wake, H. Senoo // Kupffer Cell Foundation (Rijswijk, The Netherlands). – 1986. – Vol. 1. – P. 215–220.
41. Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M. L. Watson // J. Biophys. Biochem. Cyt. – 1958. – Vol. 4. – P. 475–478.
40. Wake, K. In Cells of the Hepatic Sinusoid / K. Wake, H. Senoo // Kupffer Cell Foundation (Rijswijk, The Netherlands). – 1986. – Vol. 1. – P. 215–220.
41. Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M. L. Watson // J. Biophys. Biochem. Cyt. – 1958. – Vol. 4. – P. 475–478.

## CLINICAL CYTOLOGY OF THE LIVER: ITO STELLATE CELLS (HEPATIC STELLATE CELLS)

*Tsyrkunov V. M., Andreev V. P., Kravchuk R. I., Kandratovich I. A.*

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

*Introduction. The role of Ito stellate cells (Hepatic Stellate Cells, HSC) has been identified as one of the leading in the development of liver fibrosis, but the use of intravital visualization of HSC structures in clinical practice is minimal.*

*The aim of the work is to present the structural and functional characteristic of HSC based on the findings of cytological identification of intravital liver biopsy samples.*

*Materials and methods. Classical methods of light and electron microscopy of biopsy samples within the original technique of using ultrathin sections, fixation and staining were applied.*

*Results. The structural characteristics of the HSC of the liver biopsy samples from patients with chronic hepatitis C are presented on photo illustrations of light and electron microscopy. HSC are depicted at different stages (rest, activation) and during the process of transformation into myofibroblasts.*

*Conclusions. The use of original methods of clinical and morphological identification and evaluation of the functional status of HSC allows to improve the quality of diagnosis and prognosis of liver fibrosis.*

**Keywords:** liver, hepatic stellate cells, morphology, characteristic, vitamin A, fibrosis.

*Поступила: 03.11.2016*

*Отрецензирована: 25.11.2016*