

УДК: 616.98:578.826.6НIV+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 порталная 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 транссосудистый 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), Рit-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±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 вмонтированной цифровой камеры Olympus MegaView III (Германия) и программы для обработки изображений iTEM.

Для подготовки ультратонких срезов кусочки печени фиксировались в смеси формальдегида и параформальдегида, глутаральдегида 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.

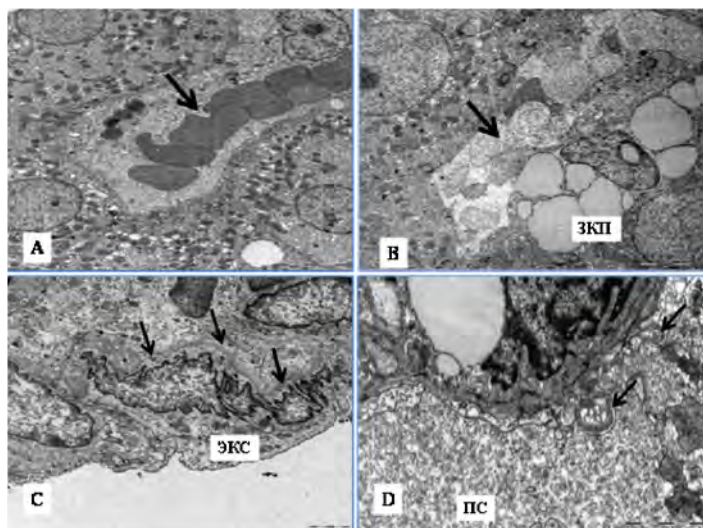
**Результаты исследования и их обсуждение.** В 13 из 14 исследованных биоптатов пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС регистрировался пелиоз (расширение синусоидных капилляров), сопровождаемый стазом эритроцитов (рисунок 1А), а в ряде случаев тромбоцитов. При этом у 13 пациентов отмечалась закупорка просветов 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, 2D), 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.

*A* - агрегация эритроцитов (стрелка) в просвете синусоида  $\times 5000$ ; *B* - окклюзия просвета синусоида полиморфными электронно-светлыми вакуолями (стрелка); *C* - 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 1C).

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 экстрацеллюлярно-матрикса (ЭЦМ), иммунных комплексов, трансферина, церулоплазмينا) и способны функционировать как антигенпрезентирующие клетки (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 транскапиллярного обмена, пластического и энергетического обеспечения гепатоцитов. Данный факт подтверждался наличием различной степени выраженности 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.

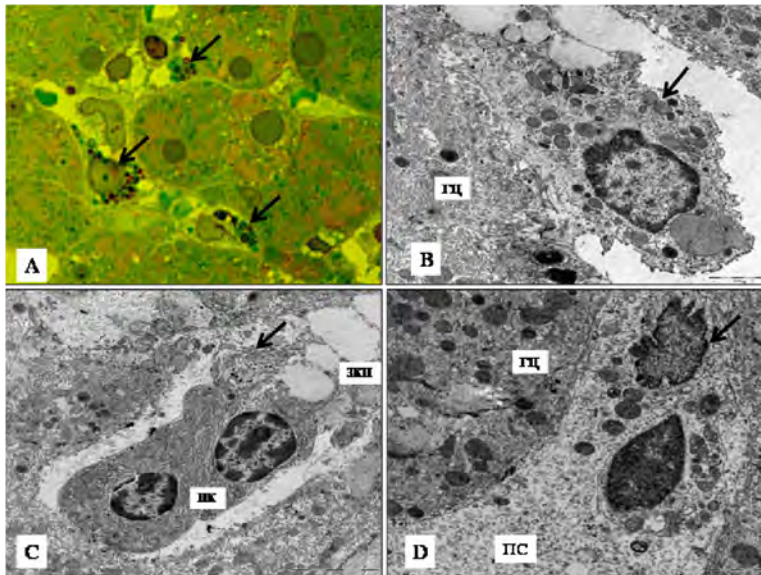
При изучении структуры КК у всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС по данным световой микроскопии полутонких срезов печени в синусоидах печени определялись активированные КК, содержащие большое количество фагосом (рисунок 2A). При этом КК характеризовались большим размером тела клетки, а их ядра содержали разреженный (не концентрированный) хроматин. Электронно-микроскопическое 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 2B).

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+T-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 2C).



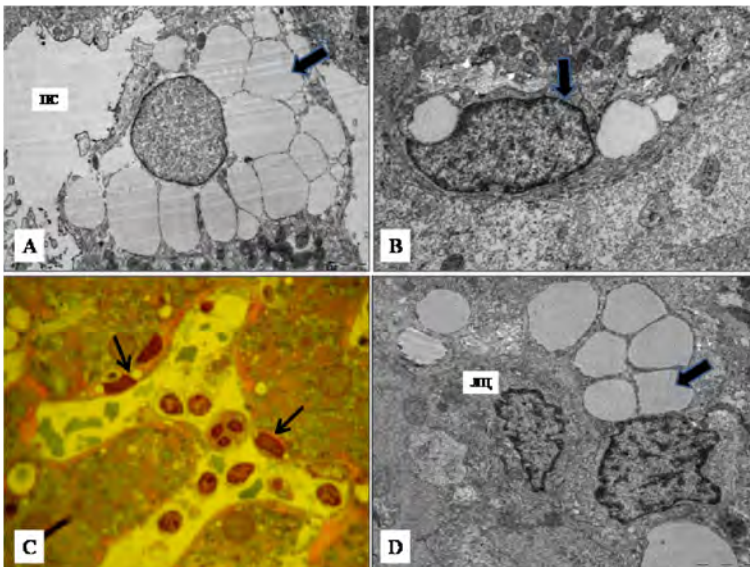


**Рисунок 2** - Структура клеток Купфера у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. А - клетки Купфера (стрелки) в просвете синусоида (полутонкие срезы, окраска азури II) Об. 100, ок. 10.; В - клетка Купфера в просвете синусоида печени (стрелка). X 10000; С - Плазматические клетки в контакте с клеткой Купфера (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 оргanelл 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].



**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

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,

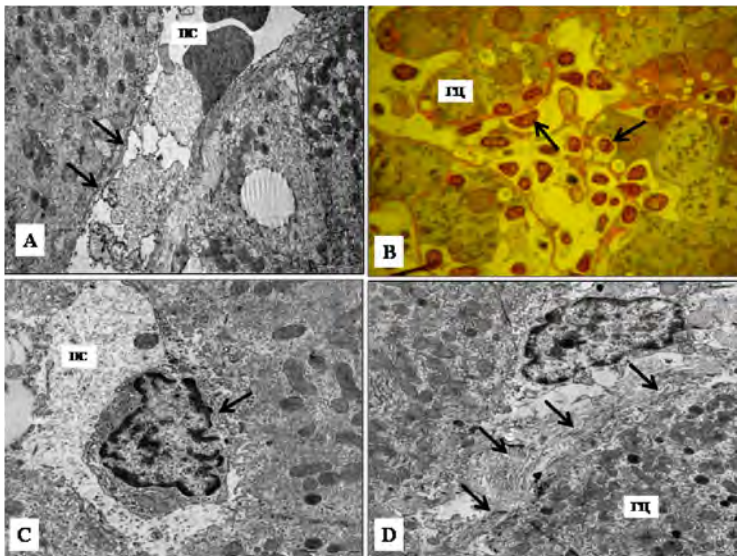
что создает условия для их инфицирования ВИЧ [12].

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<sup>+</sup> 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 С-типе 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., ПК - 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. ПК - 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 межклеточного 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 // 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. Natl. 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 fibrogenesis /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](mailto:natamati@mail.ru)

Поступила 27.02.2013