

УДК 616.36 : 57.044 : 615.91

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА СТРОМЫ В КОМПЕНСАТОРНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ДИФфуЗНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

З. А. Шафигуллина^{1,2}, С. Ю. Медведева^{1,2},
И. Г. Данилова^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Институт естественных наук и математики, Департамент биологический факультет, кафедра медицинской биохимии и биофизики, 620002, г. Екатеринбург, Российская Федерация
²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», лаборатория морфологии и биохимии, 620049, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Цель исследования – оценить роль клеточного компонента стромы в регенерации печени при ее токсическом повреждении.

На экспериментальной модели токсического гепатита, вызванного внутрибрюшинным введением тетрахлорметана (CCl₄) показано, что на 3 сутки регенераторные процессы в печени проявляются в увеличении двуядерных гепатоцитов, Ki-67+ клеток и гепатоцитов делящихся митозом. Реакция стромального компонента выражается в увеличении количества CD45+, тучных и синусоидальных клеток (СК). На 7 сутки развития токсического гепатита нарастает альтерация гепатоцитов, что сопровождается резким снижением митотического индекса и количества Ki-67+ клеток. В стромальном компоненте отмечается снижение числа синусоидальных клеток, CD45+ и значительное увеличение тучных клеток с высоким содержанием секреторных гранул.

Ключевые слова: тетрахлорметан, токсический гепатит, печень, тучные клетки, синусоидальные клетки.

Введение. В регенерации нормальной и патологически измененной печени принимают участие все ее клеточные элементы: гепатоциты, синусоидальные клетки, лейкоциты, клетки соединительной ткани (фибробласты, тучные клетки), а также внеклеточный матрикс, постоянно взаимодействующие между собой и составляющие единую структурно - функциональную систему [1]. Исследование клеточного компонента стромы печени и ее основных элементов представляется актуальным, поскольку именно эти клетки участвуют в регуляции и координации как деструктивных, так и пролиферативных процессов в печени при ее диффузном повреждении, вызванном, в том числе, и различными токсикантами [2]. В настоящее время пристальное внимание уделяется исследованию реакции синусоидальных и тучных клеток при токсическом повреждении печени, поскольку они обладают, как способностью усиливать альтерацию, так и стимулировать регенераторные процессы [3, 4].

СК представлены 4 основными разновидностями

клеток, имеющих мезенхимальное происхождение: лейкоциты, эндотелиоциты, клетки Ито, клетки Купфера или фиксированные макрофаги, которые составляют основную часть от всей популяции синусоидальных клеток [5, 3, 6]. Относящиеся к синусоидальным клеткам макрофаги печени осуществляют фагоцитоз, презентацию антигена, выделяя провоспалительные цитокины и привлекая нейтрофилы, базофилы и цитотоксические Т-лимфоциты. Кроме того, роль макрофагов заключается в регуляции завершения воспалительного процесса посредством выделения противовоспалительных факторов и факторов роста, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов и ангиогенез [7].

Известно также, что тучные клетки не только принимают участие в развитии отека в начальную фазу воспаления, но в регуляции продуктивно-пролиферативной фазы воспаления, выделяя факторы роста капилляров, цитокины, хемоаттрактанты [8]. Неадекватное количество и (или) функциональная активность СК и мастоцитов

Шафигуллина Злата Александровна (Shafigullina Zlata Aleksandrovna), аспирант Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, м.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, г. Екатеринбург, zlata_puankova@mail.ru

Медведева Светлана Юрьевна (Medvedeva Svetlana Yur'evna), к.м.н., доцент кафедры медицинской биохимии и медицинской биофизики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, ведущий научный сотрудник Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, medvedeva-ran@yandex.ru

Данилова Ирина Георгиевна (Danilova Irina Georgievna), д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, г. Екатеринбург, заведующая кафедрой медицинской биохимии и медицинской биофизики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, ig-danilova@yandex.ru

могут сопровождаться нарушением соотношения фаз воспалительного процесса и проявляться в виде увеличения некротизированных клеток, развития цирроза и как следствие, угнетением регенераторных процессов в печени.

Комплексные исследования изменения соотношения СК и тучных клеток при токсическом повреждении печени могут быть полезны при поиске новых подходов к коррекции нарушения восстановительных процессов органа посредством воздействия на определенные типы регуляторных клеток и изменения выраженности той или иной фазы воспаления [9].

В условиях диффузного поражения печени, вызванного токсическими или инфекционными агентами, когда пролиферативная активность клеток печени угнетена, поиск источников образования новых гепатоцитов и сохранение оставшихся, является одной из актуальных задач современной токсикологии.

Материалы и методы исследования. Эксперимент по моделированию токсического гепатита был выполнен на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 180 ± 10 г в соответствии с принципами международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU) и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол (No-D-ПМ-2015-28)). Крысы содержались в одинаковых условиях по 5 крыс в клетке на обычном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде и температурным режимом $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Для создания модели токсического гепатита использовали CCl_4 , который вводили животным экспериментальных групп однократно внутривенно в дозе 50 мг/кг веса. Интактную группу составляли здоровые животные. Крысам контрольной группы вводили аналогичную дозу 0,85% раствора хлорида натрия (1 группа). Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3 и 7 сутки передозировкой диэтилового эфира (соответственно 2 и 3 группы).

Образцы печени погружали в 10% нейтральный формалин на 24 часа при комнатной температуре. Подготовку образцов для гистологического исследования осуществляли с использованием автоматического процессора Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин. Со срезов толщиной 3-4 мкм удаляли парафин, для этого стекла помещались последовательно в ксилол, в 100% спирт и в растворы с постепенным снижением концентрации спирта до полностью водного раствора [10]. Структурное исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500. Программу Leica Application Suite (V4) использовали для анализа изображений и морфометрического исследования, которое включало подсчет количества синусоидальных клеток в единице площади в

10-ти полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$. Тучные клетки выявляли при окраске препаратов толуидиновым синим, подсчитывали их количество в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении $\times 1000$. Для оценки функциональной активности тучных клеток измеряли интенсивность окрашивания толуидиновым синим сульфатированных гликозаминогликанов в составе секреторных гранул цитоплазмы с помощью программы Leica Application Suite (V4), показатель выражали в единицах оптической плотности.

Морфометрические исследования печени включали: определение индекса альтерации (количество гепатоцитов, ‰), определение митотического индекса ‰, определение количества двуядерных клеток, ‰.

Индекс альтерации клеток (ИАК) рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ИАК} = \text{ИН} / \text{АИ}, \quad (1)$$

где ИН - индекс некроза;

АИ - апоптотический индекс.

Расчет митотического индекса осуществляли по формуле (2):

$$\text{MI} = \text{MN} \times 1000 (\text{‰}), \quad (2)$$

где М – число клеток в митозе;

N – число клеток в зоне деления.

Для определения митотической активности на препарате в зоне деления подсчитывали общее число клеток в поле зрения и из них число клеток в фазах митоза. Анализ проводили в 10 полях зрения.

ИГХ методом выявляли в печени лейкоциты, экспрессирующие CD45+, и пролиферирующие гепатоциты по маркеру Ki67+, с использованием моноклональных антител соответственно mouse anti – rat CD45 clone OX -1 и anti-human Ki-67 clone B56 (BD, USA), а также вторичных антител biotin goat anti-mouse (BD, USA), тест-системы Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd) и автостейнера Pascal DAKO. Маркер Ki-67+ позволяет определять не только пролиферацию, но и готовность клеток к делению. Для реакции с Ki-67 применяли высокотемпературную обработку срезов в цитратном буфере, pH 6,0. Для устранения неспецифического связывания антител использовали блокирующий раствор BlockAid (Thermo Fisher, USA). Первичные mouse-anti-rat антитела и вторичные поликлональные антитела biotin-goat-anti-mouse (BD, США) использовали в разведении 1:50. Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, использовали позитивные и негативные контроли антигенов для исключения неспецифического окрашивания.

Определяли количество клеток, экспрессирующих CD45+ и Ki-67 в единице площади среза печени при увеличении 1000 в 20 полях зрения каж-

дого образца с последующим пересчетом на 1мм² среза.

Вычисления и статистическая обработка результатов исследований выполнены с помощью пакета программ Statistica 10.0 и непараметрического критерия Манна-Уитни для 2-х независимых выборок. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($P < 0.05$). Данные представлены в виде средне-±ошибка среднего.

Результаты и обсуждение. В связи с тем, что в ходе гистологического и морфометрического анализа тканей печени различий между группой интактных и контрольных животных не было установлено, в дальнейшем представлены результаты только контрольной группы.

При гистологическом исследовании печени на 3 сутки после введения CCl₄ были отмечены признаки, характерные для острого токсического гепатита (очаговые некрозы гепатоцитов (рис. 1. В) с перифокальной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией), также обнаружены выраженная

диффузная вакуольная дистрофия гепатоцитов, анизоцитоз, анизонуклеоз.

В соответствии с гистологической картиной на 3 сутки после введения токсиканта отмечается достоверное увеличение количества СК с $9,69 \pm 0,48$ (контроль) до $13,0 \pm 0,28$ (рис. 4), значительное увеличение количества лейкоцитов с $15,9 \pm 2,3$ (контроль) до $277,8 \pm 12,5$ (рис. 4, рис. 3) и рост числа тучных клеток с $51,2 \pm 4,9$ (контроль) до $94,7 \pm 12,7$ (рис. 4, рис. 2), а также увеличение количества секреторных гранул в каждой тучной клетке с $0,045 \pm 0,011$ до $0,071 \pm 0,015$ относительно контроля (рис. 4). В модели индуцированного CCl₄ повреждения печени рядом исследователей было обнаружено увеличение числа тучных клеток в портальных областях, которое постепенно возрастало по мере увеличения степени фиброза [2, 11]. Увеличение количества печеночных тучных клеток свидетельствует о их значительной роли при патологии печени [12 – 15].

Рост числа СК на 3 сутки после токсического воздействия на фоне компенсаторной реакции,

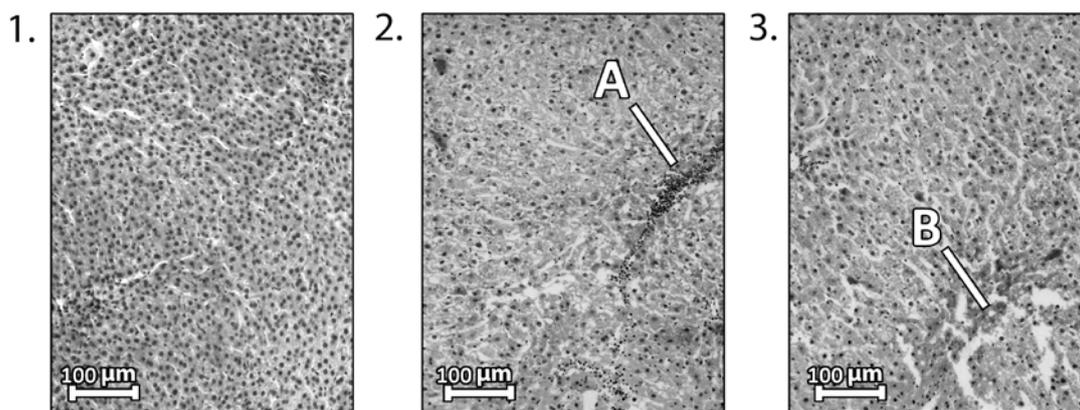


Рис. 1. Печень крысы в динамике течения токсического гепатита, окраска гематоксилином и эозином, ув.200. Примечание: 1 – контрольная группа; 2 – группа CCl₄, 3 сутки; 3 – группа CCl₄, 7 сутки. А – полнокровие; В – некрозы.

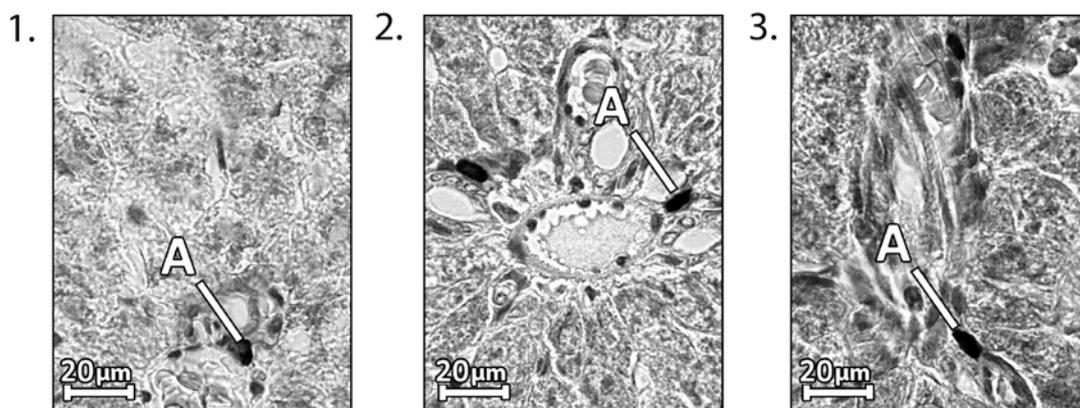


Рис. 2. Тучные клетки в печени крысы (А) в динамике течения токсического гепатита, окраска толуидиновым синим, ув.1000. Примечание: 1 – контрольная группа; 2 – группа CCl₄, 3 сутки; 3 – группа CCl₄, 7 сутки.

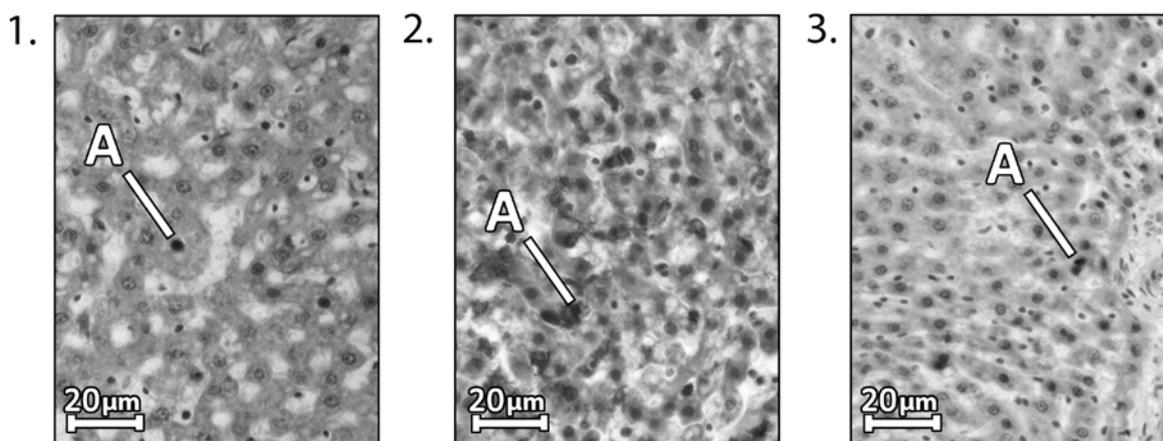


Рис. 3. Лейкоциты (CD45+) в паренхиме печени (А) в динамике течения токсического гепатита, иммуногистохимическое окрашивание, ув.1000

Примечание: 1 - контрольная группа; 2 - группа CCl_4 , 3 сутки; 3 - группа CCl_4 , 7 сутки.

сопровождается увеличением количества двуядерных (с $15,4 \pm 1,4$ до $51,8 \pm 0,3$) и находящихся в процессе деления гепатоцитов, экспрессирующих Ki-67, (с $14,3 \pm 1,5$ до $47,6 \pm 10,9$) (рис. 4) вероятно, связано с процессами инактивации токсиканта и фагоцитозом некротизированных клеток. Имеются сведения о том, что СК способны принимать участие в синтезе и remodelировании компонентов экстрацеллюлярного матрикса, регулирующего функции гепатоцитов [16].

На 7 сутки в печени экспериментальных животных наряду с уменьшением признаков эксудативного воспаления наблюдали сохранение деструктивных процессов. Уменьшение признаков воспаления на 7 сутки, является следствием значительного сокращения, по сравнению с предыдущим сроком, инфильтрации ткани печени лейкоцитами (рис 3, рис. 4). При подсчете СК обнаружено достоверное снижение этого показателя на 7 сутки не только относительно контроля, но и предыдущего срока эксперимента (рис. 4). При повреждении паренхимы печени СК выступают в роли мишени токсического воздействия и их регуляторное влияние на процессы регенерации снижается.

В то же время отмечено дальнейшее увеличение количества тучных клеток на 7 сутки по сравнению с показателем, измеренным на 3 сутки (с $94,7 \pm 12,7$ до $219,7 \pm 21,3$) (рис. 2, рис. 4). Оптическая плотность секреторных гранул в единичной тучной клетке на 7 сутки по сравнению с предыдущим сроком не изменилась. Увеличение числа тучных клеток свидетельствует о том, что они выполняют роль индукторов и регуляторов восстановительного процесса в печени после токсического воздействия.

Несмотря на уменьшение выраженности эксудативного воспаления, выявленного при исследо-

вании гистологических срезов на 7 сутки эксперимента, количество поврежденных гепатоцитов не только не снизилось, а увеличилось по сравнению с показателем, измеренным на 3 сутки эксперимента (с $333,27 \pm 27,6$ до $421,5 \pm 0,5$) (рис 4), при незначительном снижении уровня двуядерных гепатоцитов, снижении митотического индекса (с $43,77 \pm 0,3$ до $28,6 \pm 0,2$) (рис 4) и количества Ki67+ гепатоцитов (с $47,6 \pm 10,9$ до $14,3 \pm 2,6$) (рис 4).

Заключение. На 3 сутки эксперимента в ответ на действие токсиканта отмечается стимуляция регенераторных процессов, сопровождающаяся увеличением клеточного компонента стромы: лейкоцитов, тучных и синусоидальных клеток. В ранние сроки эксперимента СК выступают в роли мишени токсического воздействия, осуществляют фагоцитоз поврежденных гепатоцитов и способствуют завершению воспалительного процесса. Данное предположение подтверждается уменьшением числа CD45+ клеток, обуславливающих лейкоцитарную инфильтрацию. Уменьшение уровня СК коррелирует со снижением митотического индекса и количеством Ki67+ гепатоцитов.

На 7 сутки токсического воздействия основная роль в регенераторной стратегии отводится тучным клеткам, которые выделяют факторы роста капилляров, цитокины и хемоаттрактанты.

Выявленные закономерности дают основание для разработки новых подходов в лечении токсического гепатита.

Исследование проведено в рамках бюджетной программы «Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм», № Гос. регистрации – АААА -А18-118020590107-0.

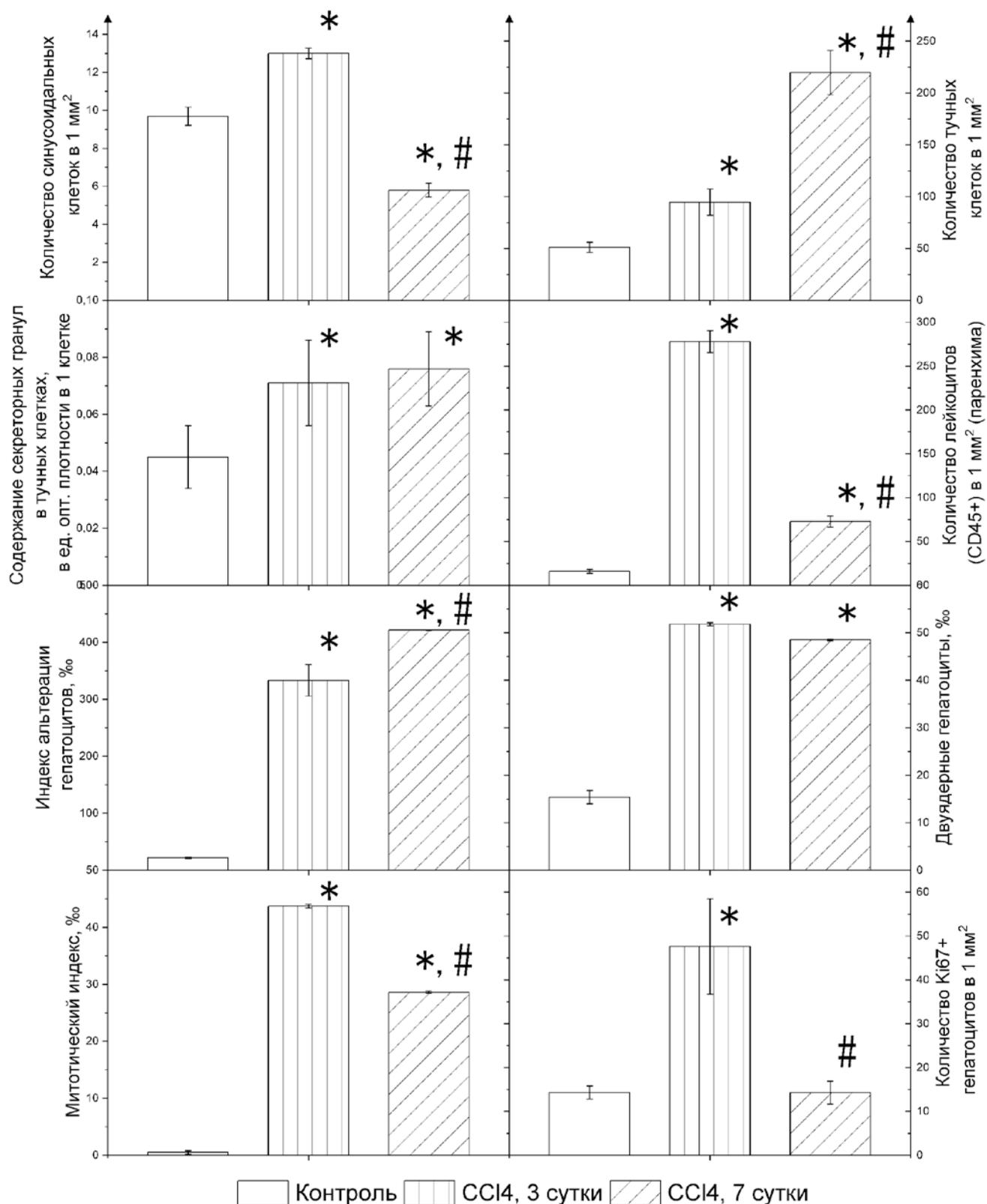


Рис. 4. Морфометрические показатели в печени контрольных и экспериментальных крыс
 Примечание: * - различия с интактными животными достоверны при P < 0.05;
 # - различия между группами CCl₄, 3 сутки и CCl₄, 7 сутки достоверны при P < 0.05.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arias I.M., Wolkoff A.W., Boyer J.L., Shafritz D.A., Fausto N, Alter H.J. et al. eds. *The Liver Biology and Pathobiology*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2011.
- Francis H, Cynthia J., Meininger A. Review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Digestive and Liver Disease*. 2010; 42: 529-536.
- Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Деев Р.В., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М. Е. Синусоидальные клетки печени и клетки костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011; 6 (2): 78-92.
- Храмцова Ю.С., Арташян О.С., Б.Г. Ушков Б.Г. Морфогенетическая функция иммунокомпетентных клеток при репаративной регенерации тканей с
- разной восстановительной способностью. *Таврический медико-биологический вестник*. 2012; 15 (3): 372-375.
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis*. 2001; 21: 311-35.
- Okada T, Kimura A., Kanki K., Nakatani S., Nagahara Y., Hiraga M. et al. Liver Resident Macrophages (Kupffer Cells) Share Several Functional Antigens in Common with Endothelial Cells. *Scandinavian Journal of Immunology Experimental immunology*. 2016; 83: 139-150.
- Mantovani A., Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22 (2): 231-237.
- Theoharides T.C., Alysandratos K-D., Angelidou A., Delivanis D-A., Sismanopoulos N., Zhang B. et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822 (1): 21-33.
- Haretskaya M.V. Hepatoprotective properties of taurine during carbon tetrachloride intoxication. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2014; 8 (4): 286-292.
- Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: Спец. Лит.; 2010.
- Jeong D.H, Lee G.P, Jeong W.I, et al. Alterations of mast cells and tgf-beta1 on the silymarin treatment for CCl(4)-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 1141-1148.
- Koda W, Harada K, Tsuneyama K, et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic
- biliary tree. *Lab Invest*. 2000; 80: 1007-1017.
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000; 20: 152-156.
- Nakamura A, Yamazaki K, Suzuki K, et al. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 1997; 92: 2245-2249.
- Stoyanova I.I. Relevance of mast cells and hepatic lobule innervation to liver injury. *Romanian journal of gastroenterology*. 2004; 13: 203-209.
- Schurich A, Berg M, Stabenow D, Böttcher J, Kern M, et al. Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *The Journal of Immunology*. 2010; 184: 4107-4114.

REFERENCES:

- Arias I.M., Wolkoff A.W., Boyer J.L., Shafritz D.A., Fausto N, Alter H.J. et al. eds. *The Liver Biology and Pathobiology*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2011.
- Francis H, Cynthia J., Meininger A. Review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Digestive and Liver Disease*. 2010; 42: 529-536.
- Onishchenko N.A., Lyundup A.V., Deev R.V., Shagidulin M.Yu., Krashennnikov M. E. Sinusoidal liver cells and bone marrow cells as components of the common functional system for regulation of recovery morphogenesis of healthy and damaged liver. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011; 6 (2): 78-92 (in Russian).
- Khramtsova Yu.S., Artashyan O.S., B.G. Ushkov B.G. Morphogenetic function of immunocompetent cells at reparative regenerations of tissues with different
- regenerative ability. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik*. 2012; 15 (3): 372-375 (in Russian).
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis*. 2001; 21: 311-35.
- Okada T, Kimura A., Kanki K., Nakatani S., Nagahara Y., Hiraga M. et al. Liver Resident Macrophages (Kupffer Cells) Share Several Functional Antigens in Common with Endothelial Cells. *Scandinavian Journal of Immunology Experimental immunology*. 2016; 83: 139-150.
- Mantovani A., Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22 (2): 231-237.
- Theoharides T.C., Alysandratos K-D., Angelidou A., Delivanis D-A., Sismanopoulos N., Zhang B. et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822 (1): 21-33.
- Haretskaya M.V. Hepatoprotective properties of taurine during carbon tetrachloride intoxication. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2014; 8 (4): 286-292.
- Korzhevskiy D.E., Gilyarov A.V. Basics of histological technique. Spb.: Spets. Lit.; 2010 (in Russian).
- Jeong D.H, Lee G.P, Jeong W.I, et al. Alterations of mast cells and tgf-beta1 on the silymarin treatment for CCl(4)-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 1141-1148.
- Koda W, Harada K, Tsuneyama K, et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic
- biliary tree. *Lab Invest*. 2000; 80: 1007-1017.
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000; 20: 152-156.
- Nakamura A, Yamazaki K, Suzuki K, et al. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 1997; 92: 2245-2249.
- Stoyanova I.I. Relevance of mast cells and hepatic lobule innervation to liver injury. *Romanian journal of gastroenterology*. 2004; 13: 203-209.
- Schurich A, Berg M, Stabenow D, Böttcher J, Kern M, et al. Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *The Journal of Immunology*. 2010; 184: 4107-4114.

Z. A. Shafigullina^{1,2}, S. Yu. Medvedeva^{1,2}, I. G. Danilova^{1,2}

ROLE OF THE STROMAL CELLULAR COMPONENT IN COMPENSATORY PROCESSES IN DIFFUSE LIVER DAMAGE

¹Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Institute of Natural Sciences and Mathematics, 620002, Ekaterinburg, Russian Federation

²Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, 620049, Ekaterinburg, Russian Federation

The aim of the study was to assess the role of the cellular component of the stroma in liver regeneration after its toxic damage.

The experimental model of toxic hepatitis caused by intraperitoneal administration of tetrachloromethane (CCl₄) showed that regeneration processes in the liver on the 3rd day are manifested in an increase in binuclear hepatocytes, Ki-67 + cells and hepatocytes dividing by mitosis. The reaction of the stromal component is expressed in an increase in the number of CD45 +, mast and sinusoidal cells (SC). On the 7th day of the development of toxic hepatitis the hepatocyte alteration increases, that is accompanied by a sharp decrease in the mitotic index and the number of Ki-67 + cells. In the stromal component there is a decrease in the number of sinusoidal cells, CD45 + and a significant increase in mast cells with a high secretion granule content.

Keywords: tetrachloromethane, toxic hepatitis, liver, mast cells, sinusoidal cells.

Материал поступил в редакцию 10.04.2018 г.