Udx: 616.36-002.2-022-06:616.36-002.17]-616.36-091.818

В.А. Туманский, М.А.Шишкин, Ю.А.Шебеко

Иммуноклеточный киллинг: морфогенез и последствия для больных хроническим вирусным гепатитом

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: иммуноклеточный киллинг, апоптоз и некроз гепатоцитов, фиброз печени.
Ключові слова: імуноклітинний кіллінг, апоптоз і некроз гепатоцитів, фіброз печінки.
Key words: immunocellular killing, hepatocytes apoptosis and necrosis , liver fibrosis

При прогрессии хронического вирусного гепатита в дольках печени возрастает количество очагов иммуноклеточного киллинга гепатоцитов, в которых доминируют CD8+ Т-лимфоциты, присутствуют одиночные CD68+ макрофаги, активированные α-SMA+ клетки Ито и NK-клетки. Киллинг гепатоцитов также происходит в иммуноклеточных «ступенчатых некрозах», в которых идентифицируются CD8+ Т-лимфоциты, CD68+ макрофаги, CD45R0+ лимфоциты, а также звездчатые α-SMA+ клетки Ито и α-SMA+ фибробласты. Последствиями иммунного киллинга является апоптоз и кариоцитолизис гепатоцитов, а также развитие фиброза печени.

При прогресії хронічного вірусного гепатиту в часточках печінки зростає кількість вогнищ імуноклітинного кіллінгу гепатоцитів, в яких домінують CD8+ Т-лімфоцити, присутні поодинокі CD68+ макрофаги, активовані α-SMA+ клітини Іто і NK-клітини. Кіллінг гепатоцитів також відбувається в імуноклітинних «ступінчастих некрозах», в яких ідентифікуються CD8+ Т-лімфоцити, CD68+ макрофаги, CD45R0+ лімфоцити, а також зірчасті α-SMA+ клітини Іто та α-SMA+ фібробласти. Наслідками імуноклітинного кіллінгу є апоптоз і каріоцитолізис гепатоцитів, а також розвиток фіброзу печінки.

In progression of chronic viral hepatitis in liver lobules the number of foci of hepatocytes' immunocellular killing increases with prevail CD8+ T-lymphocytes, there also can be found singular CD68+ macrophages, α-SMA+ Ito cells and NK-cells. Hepatocytes killing also takes place in immunocellular «piecemeal necrosis» in which CD8+ T-lymphocytes, CD68+ macrophages, CD45R0+ lymphocytes, stellate α-SMA+ Ito cells and α-SMA+ fibroblasts are identified. The outcomes of immunocellular killing are apoptosis and kariocytolysis of hepatocytes and development of liver fibrosis.

Иммуноклеточный киллинг («клеточно-опосредованная цитотоксичность») является разновидностью разрушения иммуноцитами клеток-мишеней без их поглощения. Киллинг осуществляют Т-киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты), естественные киллеры (NK-клетки), К-клетки (новые поколения Т-лимфоцитов, NK-клеток, макрофагов и эозинофилов с поверхностными Fc-рецепторами к иммуноглобулинам G и E), а также активированные макрофаги [1]. По способу распознания иммуноцитами «чужой» клетки различают два типа киллинга: антителозависимый и антителонезависимый. Антителозависимый киллинг используют К-клетки, которые распознают антитела, фиксированные к клеткам-мишеням, и, после антитело-опосредованного прикрепления к плазматической мембране клетки-мишени, уничтожают такие клетки. Антителонезависимый киллинг используют Т-киллеры и NK-клетки, распознающие клетки-мишени посредством своих специальных рецепторов (без участия антител), контакт киллера и его жертвы обеспечивают молекулы клеточной адгезии [1].

В норме в синусоидах печени содержится гетерогенная популяция печеночно-ассоциированных лимфоцитов, среди которых больше всего CD56+ NK-клеток, значительное число CD8+лимфоцитов и небольшое число CD4+лимфоцитов. Печеночно-ассоциированные лимфоциты качественно отличаются от лимфоцитов периферической крови по содержанию молекул клеточной адгезии [5,8].

Значительная иммуноклеточная инфильтрация печени, свойственная прогрессии хронического вирусного гепатита, пока не получила однозначной оценки: одни гепатологи считают ее иммуновоспалительным компонентом болезни, другие – процессом иммуноклеточной деструкции печени.

Цель работы. Иммуногистохимическими методами маркировать клетки иммуноклеточных инфильтратов печени больных хроническим вирусным гепатитом и оценить последствия иммуноклеточной инфильтрации для больных.

Материал и методы. В трепанобиоптатах печени 40 больных хроническим вирусным гепатитом С и 15 больных хроническим вирусным гепатитом В микроскопическими и иммуногистохимическими методиками изучен клеточный состав иммунных инфильтратов. В соответствии с гистологическим индексом активности хронического вирусного гепатита В и С по Knodell R.G. с соавт . (1981) в биоптатах печени больных различали гепатит с умеренной активностью (9-12 баллов) и выраженной активностью (13-18 баллов – высокий гистологический индекс активности гепатита). Для световой микроскопии биопсийный материал фиксировали в забуференном 10% формалине и заливали в парафин. Серийные срезы, изготовленные в прецезионном ротационном микротоме HM 3600 («MICROM» - Германия), помещали на обычные предметные стекла (для стандартного патогистологического окрашивания гематоксилином и эозином, по ван Гизон, трехцветным методом Массона) или на адгезивные предметные стекла «Super frost plus» и «Super frost gold» фирмы «DAKO» - Дания (для иммуногистохимических исследований). В биоптатах печени больных иммунопероксидазным методом с использованием антител и системы визуализации DAKO EnVision маркировались CD8+ Т-лимфоциты, CD45R0+ Т–лимфо-

© ЧПДРФЕМN, В.А. ТУМАНСКИЙ, М.А. ШИШКИН, Ю.А. ШЕБЕКО, 2008

циты, CD68+макрофаги Купфера, а также A-SMA+ клетки Ито и A-SMA+ фибробласты, экспрессирующие α-изоформу гладкомышечного актина (A-SMA). Фиброз печени определяли в препаратах печени, окрашенных по ван Гизон и трехцветным методом Массона, а также иммунопероксидазным методом с помощью моноклональных антител к коллагену 4-го типа и системы визуализации DAKO EnVision.

Результаты и их обсуждение.

Проведенные исследования показали, что иммуноклеточные инфильтраты печени больных хроническим вирусным гепатитом В и С представляют собой очаги иммуноклеточного киллинга гепатоцитов, локализованные в дольках (рис.1, цв.вкладка 3), а также в зонах имунноклеточных «ступенчатых некрозов», расположенных в периферических отделах печеночных долек на границе с портальными трактами. Возрастание индекса гистологической активности хронического гепатита, свидетельствующего о прогрессии болезни, сопровождается увеличением количества очагов иммуноклеточного киллинга гепатоцитов в дольках печени, а также протяженности и числа зон иммуноклеточных «ступенчатых некрозов». В очагах иммуноклеточного киллинга в дольках печени преобладают CD8+ Т-лимфоциты-киллеры, присутствуют одиночные CD68+ макрофаги и активированные A-SMA+ клетки Ито, а иногда – также и крупные NK-клетки, содержащие в цитоплазме плотные гранулы и полые пузырьки (рис.2,3,4, цв.вкладка 3). В зонах имунноклеточных «ступенчатых некрозов» присутствуют в большом количестве CD8+ Т-лимфоциты-киллеры, относительно многочисленные CD68+ макрофаги, активированные A-SMA+ клетки Ито и, как исключение, - NK-клетки (рис.5,6, цв.вкладка 3). В биоптатах печени некоторых больных хроническим вирусным гепатитом С на границе зон имунноклеточных «ступенчатых некрозов» и филликулоподобных лимфоцитарных инфильтратов обнаруживаются также CD45R0+ Т-лимфоциты, которые, по данным литературы [6], являются Th2-клетками памяти, ассоциирующейся с персистенцией вирусов и хронизацией вирусного гепатита.

Исследования последних лет показали, что в очагах иммуноклеточного киллинга реализуется рецептор-опосредованный апоптоз гепатоцитов. Гепатоциты имеют в плазматической мембране несколько рецепторов апоптотической гибели клетки: Fas/CD95 (реагирующий с Fas-лигандом сенсибилизированного Т-лимфоцита, с провоспалительными интерлейкинами-1, -2, -6 и γ-интерфероном), TNF-R1 (реагирующий с лигандом активированной клетки Купфера, а также с α-туморонеркротическим фактором), TRAIL-R1 и TRAIL-R2 (реагирующие с TRAIL-лигандами цитотоксических Т-лимфоцитов, NK-клеток, активированных макрофагов и клеток Ито), TGFβ-R1 и TGFβ-R2 (реагирующие с тромбоцитарным фактором роста β) (схема 1, цв. вкладка 4) [4]. Цитотоксические Т-лимфоциты реагируют с Fas/CD95 рецептором или через TNF-α - с TNF-R1 рецептором; активированные клетки Ито реагируют с TRAIL-R1/R2 и TGFβ-R1/R2 рецепторами; активированные клетки Купфера взаимодействуют с TNF-R1, Fas/CD95 и TRAIL-R1/R2 рецепторами. К рецептор-опосредованному пути добавляется митохондриальный путь активации апоптоза (схема 1, цв. вкладка 4). При вирусном гепатите активированные звездчатые клетки Купфера уничтожают гепатоциты путем TRAIL и TNF-R1/CD95 лиганд-рецепторного пути, а также освобождают TGF-β, который также вызывает апоптоз гепатоцитов. Апоптоз также инициируют NK-клетки, которые освобождают гранзим В и перфорин. Перфорин поступает по трансмембранным каналам в клетку-мишень и способствует проникновению гранзима В. Гранзим В-опосредованный апоптоз зависит от активации каспаз и чувствительности клеток-мишеней [4].

При микроскопии биоптатов печени хроническим вирусным гепатитом в очагах иммуноклеточного киллинга и в зонах иммуноклеточных «ступенчатых некрозов» в окружении нескольких иммунокомпетентных клеток определяются обреченные на гибель гепатоциты, имеющие некоторые структурные отличия, зависящие от фазы апоптоза. В эффекторной фазе апоптоза определяются уменьшенные в размерах, неправильной формы эозинофильные гепатоциты с кариопикнозом (рис. 7, цв.вкладка 4), в фазе апоптотической деградации гепатоциты имеют вид мелких ацидофильно-эозинофильных клеток с гиперхромными остатками распавшегося ядра. Апоптотически измененные гепатоциты обычно отделены от окружающих клеток просветленным ободком расширенного межклеточного пространства (рис.7, цв.вкладка 4). К отделению апоптотической клетки от соседних клеток и от базальной мембраны приводит расщепление компонентов комплекса местной адгезии [7]. Мелкие ацидофильные погибшие гепатоциты с фрагментами апоптотических телец в цитоплазме обнаруживаются также в просветах внутридольковых синусоидов.

Проведенные исследования показали, что в очагах иммуноклеточного киллинга и в зонах иммуноклеточных «ступенчатых некрозов» в окружении иммунокомпетентных клеток также определяются гепатоциты, погибающие путем кариоцитолизиса (рис.8, цв.вкладка 4). Наиболее вероятным молекулярным путем лизиса гепатоцитов при иммунном киллинге может быть перфорин / гранзим В-зависимый механизм, который используют NK-клетки и, возможно, новые клоны специфических для вирусного гепатита С цитотоксических лимфоцитов [4]. Допускается два возможных молекулярных механизма иммуноклеточного цитокариолизиса цитотоксическими лимфоцитами. Т-киллер, после контакта с клеткой-мишенью, с помощью освобождаемого перфорина образует в плазмолемме мишени поры, через которые проникает кальций и инициирует цитокариолизис клетки-мишени. Возможна инъекция киллером в клетку-мишень деструктивных ферментов лизосом и пероксисом, вызывающих цитокариолизис мишени.

© ᵘ.ⁱ. ´ЧПΔРФЕМN ¸.ⁱ. ´I MÉ ΞMP, B.ⁱ. ´I I EI Ξ∑, 2008

Таким образом, прямым следствием иммуноклеточного киллинга является апоптоз и цитокариоцитолизис гепатоцитов, которые, учитывая высокие репаративные потенции гепатоцитов печени [2], длительное время не приводят к значимой утрате печеночных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами В и С. Вторым следствием иммуноклеточного киллинга гепатоцитов является активация скрытого развития фиброза печени, прогрессирующего в соответствии с возрастанием иммунодеструктивных процессов в печени. Параллельные гистохимические и иммуногистохимические исследования коллагенов печени и A-SMA+ клеток свидельствуют о том, что главными продуцентами избытка коллагена в печени при хроническом вирусном гепатите являются новые поколения активированных A-SMA+ звездчатых клеток Ито и A-SMA+ фибробластов [3]. A-SMA+ клетки Ито становятся основным источником коллагенизации внутридольковых синусоидов печени, в то время как кооперация A-SMA+ клеток Ито и A-SMA+ фибробластов вызывает развитие фиброза в зонах иммуноклеточных ступенчатых некрозов.

Выводы

1. При прогрессии хронического вирусного гепатита в печени возрастает количество очагов иммуноклеточного киллинга гепатоцитов в дольках печени, а также протяженность и число зон иммуноклеточных «ступенчатых некрозов».

2. В очагах иммуноклеточного киллинга гепатоцитов в дольках печени доминируют CD8+ Т-лимфоциты, присутствуют одиночные CD68+ макрофаги, активированные A-SMA+ клетки Ито и NK-клетки. Киллинг гепатоцитов также происходит в иммуноклеточных «ступенчатых некрозах», в которых идентифицируются CD8+ Т-лимфоциты, CD68+ макрофаги, активированные A-SMA+ клетки Ито и, как исключение, - NK-клетки.

3. Последствиями иммунного киллинга является апоптоз и цитокариолизис гепатоцитов, а также развитие фиброза печени.

Литература.

1. *Туманский В.А.* Селективная гибель специализированных клеток // Патологія. - 2005. Т.2, № 1, с. 10-18.

2. *Туманский В.А.* Физиологическое самообновление и репаративная регенерация специализированных клеток / / Патологія. – 2006. –Том 3. - №2. стр. 19-31.

3. *Туманский В.А., Шишкин М.А.* Некоторые молекулярно-клеточные механизмы развития фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С // Патологія. – 2006. –Том 3. - №2. стр. 60-66.

4. *Fischer R., Baumert T., Blum H.E.* Hepatitis C virus infec-tion and apoptosis // World J Gastroenterol., 2007; Vol.13, No.36, p. 4865-4872.

5. *Garcma-Barcina M., Winnock M., Bidaurrazaga I. et al.* Detection of cell-adhesion molecules on human liver-associated lymphocytes // Immunology. -1994. Vol.82, No.1, p.95–98.

6. *Hultgren C., Milich D.R., Weiland O., Sallberg M.* The antiviral compound ribavirin modylates the T helper (Th)1/ Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses // J.Gen.Virol.- 1998. Vol.79б p. 2381-2391.

7. *Wen L. P., Fahrni J. A., Troie S. et al.*. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis // J. Biol. Chem. -1997. Vol.272, p.26056-26061.

Winnock M., Garcia-Barcina M., Lukomska B. et al. Liver-associated lymphocytes: an overview // J Gastroenterol and Hepatology.-1995. Vol.10, Issue s1, p.S43-S46.

Сведения об авторах:

Туманский В.А. – д.мед.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ, директор Института клинической патологии человека;

Шишкин М.А. – ассистент кафедры патанатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ.

Шебеко Ю.В. – ассистент кафедры патанатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Туманский Валерий Алексеевич, ЗГМУ, пр.Маяковского,26 г.Запорожье, 69035, УКРАИНА. Тел.: (061) 233-50-93

© u.i. ´ЧПДРФЕМN ¸.i. ´I MéЕMP, B.i. ´I I EI ΞΣ, 2008