

## ЛИПИДНАЯ ИНФИЛЬТРАЦИЯ ГЕПАТОЦИТОВ В МОРФОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

Давид Львович НЕПОМНЯЩИХ<sup>1</sup>, Ольга Алексеевна ПОСТНИКОВА<sup>1</sup>,  
Екатерина Эдуардовна АБРАМОВА<sup>1</sup>, Ольга Игоревна ДОРОВСКАЯ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

<sup>2</sup>Государственная Новосибирская областная клиническая больница  
630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130

Цель исследования – изучить структурно-функциональные особенности липидной инфильтрации гепатоцитов в морфогенезе хронического гепатита С. **Материал и методы.** Проведено клинко-морфологическое исследование 199 пациентов с маркерами HCV-инфекции (139 мужчин и 60 женщин в возрасте от 20 до 65 лет). Во всех случаях выполнено комплексное исследование, включающее анализ биохимических показателей крови, серологических маркеров вирусного гепатита, изучение данных о наличии маркеров репликации HCV в крови и печени, уровне виремии, количестве инфицированных гепатоцитов и генотипах HCV. Диагностический комплекс включал клинические, биохимические, иммуносерологические методы. **Результаты и их обсуждение.** Представлены результаты анализа структурно-функциональных особенностей липидосодержащих гепатоцитов и показателей репликации вирусных частиц хронического гепатита С. Для своей репродукции HCV вступает в сложные взаимоотношения с метаболическим аппаратом клетки, важную роль в которых играют липидный обмен и связанные с ним структуры – липидные капли. Единственным структурным маркером, коррелирующим с показателями вирусной репликации, является субцитолеммальная мелковезикулярная липидная инфильтрация, которая может отражать вирусиндуцированное усиление обмена липидов в клетке-хозяине для эффективного производства инфекционно активных вирусных частиц.

**Ключевые слова:** HCV-инфекция, липидосодержащие гепатоциты, генотипирование.

**Автор для переписки:** Абрамова Е.Э., e-mail: eamed1974@mail.ru

**Для цитирования:** Непомнящих Д.Л., Постникова О.А., Абрамова Е.Э., Доровская О.И. Липидная инфильтрация гепатоцитов в морфогенезе хронического гепатита С. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 150–154. doi: 10.15372/SSMJ20190419.

## LIPID INFILTRATION OF HEPATOCYTES IN THE MORPHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS C

David L'vovich NEPOMNYASHCHIKH<sup>1</sup>, Olga Alexeevna POSTNIKOVA<sup>1</sup>,  
Ekaterina Eduardovna ABRAMOVA<sup>1</sup>, Olga Igorevna DOROVSKAYA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

<sup>2</sup>State Novosibirsk Regional Clinical Hospital  
630087, Novosibirsk, Nemirovicha-Danchenko str., 130

The aim of the study was to investigate structurally functional features of lipidic infiltration of hepatocytes in a morphogenesis of chronic hepatitis C. **Material and methods.** A clinical and morphological study of 199 patients with HCV infection markers (139 men and 60 women aged from 20 till 65 years) was conducted. In all cases, a comprehensive study including analysis of blood biochemical parameters, serological markers of HCV replication in blood and liver, viremia level, number of the infected hepatocytes and HCV genotypes was performed. Diagnostic complex included clinical, biochemical, immunoserological methods. **Results and discussion.** The results of the analysis of structural and functional features of lipid-containing hepatocytes and indicators of replication of virus particles of chronic hepatitis C

are provided. For its reproduction HCV enters into complex relationships with the metabolic apparatus of the cell, in which lipid metabolism and related structures – lipid droplets play an important role. The only structural marker that correlates with indicators of virus replication is subcytolemmal small-vesicular lipid infiltration, which can reflect a virus-induced increase in lipid metabolism in the host cell for the effective production of infectious active viral particles.

**Key words:** HCV infection, lipid-containing hepatocytes, genotyping.

**Correspondence author:** Abramova Ye.E., e-mail: eamed1974@mail.ru

**Citation:** Nepomnyashchikh D.L., Postnikova O.A., Abramova E.E., Dorovskaya O.I. Lipid infiltration of hepatocytes in the morphogenesis of chronic hepatitis C. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 150–154. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190419.

Липидная инфильтрация является важнейшей реакцией паренхиматозных клеток печени и одним из главных маркеров гепатита С. Стеатоз может быть связан с метаболическими факторами, однако некоторые исследования продемонстрировали достоверную зависимость между зараженностью вирусом гепатита С (HCV) и липидной инфильтрацией – в случаях инфекции вирусом с генотипом 3 наличие стеатоза коррелирует с внутривнутрипеченочными титрами РНК HCV [14]. Более того, оба типа нарушения внутриклеточного обмена липидов (вирусный и метаболический) могут сосуществовать, при этом у пациентов, инфицированных HCV генотипа 3, стеатоз, скорее всего, является преимущественно вирусиндуцированным, у пациентов с другими генотипами вируса – преимущественно метаболическим [11].

Для своей репродукции HCV вступает в сложные взаимоотношения с метаболическим аппаратом клетки, важную роль в которых играют липидный обмен и связанные с ним структуры – липидные капли. Эти взаимоотношения, по-видимому, носят «равновесный» персистирующий характер, обеспечивающий сохранение клеточных механизмов, необходимых для воспроизводства вируса, поэтому уровень его репродукции и число инфицированных гепатоцитов не вносят значительного вклада в повреждение печени при хроническом гепатите С [2, 4].

Показано, что сердцевинный белок (core protein), являющийся одним из основных факторов HCV-индуцированного повреждения печени, накапливается вокруг липидных капель, которые представляют собой внутриклеточные депо триглицеридов и эфиров холестерина, окруженные монослоем фосфолипидов [9, 14].

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено клинико-морфологическое исследование 199 пациентов с маркерами HCV-инфекции (139 мужчин и 60 женщин в возрасте

от 20 до 65 лет). Во всех случаях выполнено комплексное исследование, включающее анализ биохимических показателей крови, серологических маркеров вирусного гепатита, изучение данных о наличии маркеров репликации HCV в крови и печени, уровне виремии, количестве инфицированных гепатоцитов и генотипах HCV. Диагностический комплекс включал клинические, биохимические, иммуносерологические методы. Клинические исследования проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (1964 г. с поправками 2000 г.) и Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». У пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

С помощью ПЦР выявляли РНК HCV в сыворотке и мононуклеарных клетках крови, в нативной ткани печени, а также ДНК вируса гепатита В (HBV) в образцах крови и ткани печени. Длительность инфицирования устанавливали по первичному выявлению серологических маркеров HCV-инфекции, оценку уровня виремии в сыворотке проводили с помощью тест-системы научно-производственной лаборатории ЦНИИ эпидемиологии (Москва), линейный диапазон которой составляет от 1 тыс. до 3 млн геномных копий РНК HCV в 1 мл сыворотки крови. Вирусную нагрузку свыше 800000 МЕ/мл считали высокой, меньше 800 000 МЕ/мл – низкой. При анализе морфологических изменений в биоптатах печени использована Лос-Анджелесская классификация хронических гепатитов, выделяющая в качестве ведущей характеристики этиологический фактор, а также определение степени активности инфекционного процесса.

Для светооптического анализа парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса, по Ван Гизону с

докраской эластических волокон резорцин-фуксин-ом Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Образцы печени и желудка для электронной микроскопии фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). Полутонкие срезы окрашивали реактивом Шиффа и азуром II. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе «JEM 1010» («JEOL Ltd.», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Связь между признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Липидная инфильтрация гепатоцитов выявлена в 87 % биоптатов и имела, как правило, диффузный и полиморфный характер. Однако при совместном анализе полутонких и ультратонких срезов и результатов ПЦР нами сделан вывод, что фазе репликации вируса гепатита С соответствует особый вид стеатоза – мелкоvesикулярная субцитолеммальная липидная инфильтрация. При моноинфекции РНК HCV в наших исследованиях обнаружена в сыворотке крови в 77 % случаев, в мононуклеарных клетках крови – в 73 %; одновременно в сыворотке и мононуклеарах – в 55 % наблюдений. Важно отметить наличие РНК HCV в некоторых образцах слюны и мочи. ПЦР на РНК HCV в нативной ткани печени была позитивной в 79 % случаев. При комплексном анализе (сыворотка, мононуклеарные клетки крови, ткань печени) три положительных результата получены в 52 % наблюдений.

При генотипировании HCV установлено, что большинство пациентов (53 % случаев) инфицированы вирусом с генотипом 1b, 30 % – с генотипом 2 и 14 % – с генотипом 3a. При генотипах 1b и 3a в 80 % случаев преобладала слабо выраженная (70 %) или минимальная (10 %) степень активности инфекционного процесса при достаточно высоком уровне виремии (от 106 до 108 копий РНК HCV в 1 мл плазмы). При генотипе 2 в 10 % наблюдений имела место низкая виремия, однако именно этот генотип ассоциировался с более высокими показателями активности патологического процесса.

При корреляционном анализе в целом по группе статистически значимых корреляционных связей между наличием РНК HCV в образцах крови, а также числом инфицированных гепатоцитов (по экспрессии NS3AgHCV) и выраженностью клинико-биохимических показателей и структур-

ных изменений в биоптатах печени выявлено не было. У пациентов с высоким уровнем виремии, в отличие от больных с низкой вирусной нагрузкой, обнаружена отрицательная корреляционная связь со степенью активности HCV-инфекции ( $r = -0,631$ ;  $p < 0,001$ ).

Вирусный гепатит С занимает особое место среди персистирующих инфекций. Наиболее важной особенностью HCV-инфекции является способность вируса к длительной персистенции в организме хозяина [1]. Поражение печени при хронической HCV-инфекции не имеет отчетливой корреляции с показателями репродукции вируса. Ведущими моментами в интерпретации этого парадокса могут быть особенности морфогенеза хронического гепатита С, связанные с реакциями паренхиматозных клеток печени.

В патоморфологическом анализе биоптатов печени при HCV-инфекции уделено особое внимание липидной инфильтрации гепатоцитов – одному из главных маркеров гепатита С [2, 5], имеющей, как правило, диффузный и полиморфный характер и выявляемой в 87 % биоптатов. Установлено, что первым этапом HCV-инфицирования гепатоцита является взаимодействие вириона со специфическими белками на клеточной поверхности, что запускает процесс управляемого эндоцитоза, в результате которого геном освобождается от оболочки, выходит в цитозоль и начинает производство протеинов-прекурсоров [6]. Считается, что неструктурные белки HCV участвуют в сборке комплексов репликации, которые тесно связаны с мембранными структурами эндоплазматического ретикула. По мере прогрессивного накопления во внутриклеточном компартменте новых геномных РНК и структурных протеинов образующиеся вирусные частицы покидают клетку через секреторный путь [13, 15].

Сопоставление данных иммуногистохимического выявления NS3-антигена вируса с морфологическими маркерами HCV-индуцированного изменения печени продемонстрировало, что при малой интенсивности NS3Ag-специфического окрашивания в 72 % случаев выявлялись единичные мелкоvesикулярные липидные включения в небольшом количестве гепатоцитов, средняя интенсивность иммуногистохимической реакции в 67 % случаев сочеталась с наличием мелких липидных включений (60–70 % гепатоцитов). Высокая интенсивность выявления NS3-антигена сопровождалась выраженным накоплением мелкоvesикулярных липидных вакуолей в 90 % гепатоцитов биоптата.

Крупновезикулярная липидная инфильтрация гепатоцитов, нередко встречаемая в биоптатах

печени при хронических вирусных гепатитах, преимущественно характерна для токсических воздействий и имеет, вероятно, компенсаторный характер, минимизируя функцию клетки, но сохраняя численность популяции гепатоцитов и возможность последующего восстановления. В большинстве биоптатов печени формируется полиморфная липидная инфильтрация – от минимальной, видимой лишь на полутонких срезах, до гигантских капель, заполняющих целиком всю цитоплазму. Кроме того, обращает на себя внимание дистрофия, связанная с накоплением в цитоплазме гепатоцитов компонентов желчи, иногда довольно значительная [2].

Результаты, полученные на клиническом материале, свидетельствуют о возможном участии липидных капель в репродукции вируса в инфицированных гепатоцитах. Это согласуется с новыми экспериментальными данными, которые указывают на тесные взаимоотношения жизненного цикла HCV и липидного метаболизма клеток печени хозяина. Данная ассоциация становится все более очевидной на уровне как клинических симптомов гепатита С, так и молекулярных механизмов, лежащих в основе морфогенеза и механизма инфицирования [7].

Показано, что сердцевинный белок (core protein), являющийся одним из основных факторов HCV-индуцированного повреждения печени, накапливается вокруг липидных капель, которые представляют собой внутриклеточные депо триглицеридов и эфиров холестерина, окруженные монослоем фосфолипидов [9, 14]. В клетках карциномы печени человека (HuH7), продуцирующих HCV, мембрана липидных капель местами приобретает многослойный характер, а вокруг них наблюдаются скопления мембраноподобных структур, которые отсутствуют в неинфицированных клетках [12].

Локализуясь на поверхности липидных капель, сердцевинный белок и неструктурные белки вируса «рекрутируют» репликационные комплексы, осуществляющие синтез РНК [10]. При этом ассоциация с липидными каплями имеет ключевое значение для производства инфекционных вирусных частиц – показано, что клетки, несущие вирусный геном, содержащий мутантный ген неструктурного белка (NS5A), который не способен связываться с липидными каплями, продуцируют только неинфекционное вирусное потомство. В то же время вирусные частицы, формирующиеся вокруг липидных капель, имеют другую композицию вирусных белков и нуклеиновых кислот (или связаны с компонентами меньшей плотности), что определяет их способ-

ность к инфицированию [8]. Кроме того, показано, что HCV-инфекция сопровождается возрастанием количества липидных капель, и для такого увеличения необходим сердцевинный белок, который активирует фактор транскрипции SREBP, участвующий в синтезе липидов [10, 12].

На основании этих данных сделано несколько предположений о возможных механизмах реализации роли липидных капель в репродукции вируса: 1) липидная капля создает агрегат с неструктурными белками и репликационным комплексом, 2) предоставляет вирусным частицам фактор, необходимый для их инфекционности; 3) включает вирусную частицу в систему везикулярного транспорта липидов и связанных с липидами веществ, способствуя экспорту вируса [2, 3, 12].

Участие липидных капель в транспорте вирусных частиц из клетки, возможно, имеет определенное отношение к их характерной субцитолеммальной локализации, которая соответствует фазе репликации вируса и может указывать на вирусиндуцированный характер нарушений липидного обмена. Диффузная мелкоvesикулярная липидная инфильтрация может соответствовать метаболическому стеатозу в неинфицированных или производящих неинфекционное потомство клетках.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Единственным структурным маркером, коррелирующим с показателями вирусной репликации, является субцитолеммальная мелкоvesикулярная липидная инфильтрация, которая может отражать вирусиндуцированное усиление обмена липидов в клетке-хозяине для эффективного производства инфекционно-активных вирусных частиц. Лучшее понимание взаимодействия HCV и липидного обмена может помочь понять некоторые патофизиологические механизмы, которые имеют место при хронической HCV-инфекции и указать на возможные новые стратегии терапии.

Для своей репродукции HCV вступает в сложные взаимоотношения с метаболическим аппаратом клетки, важную роль в которых играет липидный обмен и связанные с ним структуры – липидные капли. Эти взаимоотношения, по-видимому, носят «равновесный» персистирующий характер, обеспечивающий сохранение клеточных механизмов, необходимых для воспроизводства вируса, поэтому уровень его репродукции и число инфицированных гепатоцитов не вносят значительного вклада в повреждение печени при хроническом гепатите С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ивашкин В.Т., Павлов Ч.С. Фиброз печени. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 168 с.

Ivashkin V.T., Pavlov C.S. Hepatic fibrosis. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 168 p. [In Russian].

2. Непомнящих Г.И. Биопсия в гепатологии: Общая патология и патоморфология. М.: Изд-во РАМН, 2014. 192 с.

Nepomnyashchikh G.I. Biopsy in hepatology: General pathology and pathomorphology. Moscow, 2014. 192 p. [In Russian].

3. Непомнящих Г.И., Айдагулова С.В., Постникова О.А., Непомнящих Д.Л., Нохрина Ж.В., Виноградова Е.В. Морфогенез хронического гепатита С и инфекционно-вирусного цирроза печени. *Клин. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2012; (2): 13–21.

Nepomnyashchikh G.I., Aydagulova S.B., Postnikova O.A., Nepomnyashchikh D.L., Nokhrina Zh.V., Vinogradova E.V. Morphogenesis of chronic hepatitis C and infectious-viral cirrhosis. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii = Clinical prospects of gastroenterology, hepatology*. 2012; (2): 13–21. [In Russian].

4. Непомнящих Г.И., Бакарев М.А., Непомнящих Д.Л., Юданов А.В., Капустина В.И., Мигуськина Е.И., Постникова О.А., Виноградова Е.В., Нохрина Ж.В., Савченко С.А. Роль липидной инфильтрации гепатоцитов в морфогенезе хронического гепатита С. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2013; 151 (8): 250–254.

Nepomnyashchikh G.I., Bakarev M.A., Nepomnyashchikh D.L., Yudanov A.V., Kapustina V.I., Migus'kina E.I., Postnikova O.A., Vinogradova E.V., Nokhrina Zh.V., Savchenko S.A. Role of lipid infiltration of hepatocytes in the morphogenesis of chronic hepatitis C. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 151 (8): 250–254.

5. Непомнящих Г.И., Постникова О.А., Бакарев М.А., Непомнящих Д.Л., Капустина В.И. Структурно-функциональные особенности липидосодер-

жащих гепатоцитов при гепатите С. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2012; 153 (5): 751–754.

Nepomnyashchikh G.I., Postnikova O.A., Bakarev M.A., Nepomnyashchikh D.L., Kapustina V.I. Structural and functional features of lipid-containing hepatocytes in hepatitis C. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153 (5): 751–754.

6. Burlone M.E., Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 1055–1070.

7. Dubuisson J., Helle F., Cocquerel L. Early steps in the hepatitis C virus life cycle. *Cell. Microbiol.* 2008; 10: 821–827.

8. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* 2008; 82: 7964–7976.

9. McLauchlan J. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1791: 552–559.

10. Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Wataishi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biol.* 2007; 9: 1089–1097.

11. Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 6756–6765.

12. Ogawa K., Hishiki T., Shimizu Y., Funami K., Sugiyama K., Miyanari Y., Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 2009; 85: 217–227.

13. Popescu C.I., Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol. Cell.* 2010; 102: 63–74.

14. Roingard P., Hourieux C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J. Viral Hepat.* 2008. 157–164.

15. Von Hahn T., Rice C.M. Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 3689–3693.

Сведения об авторах:

Непомнящих Д.Л., д.м.н., e-mail: dln\_nco@mail.ru

Постникова О.А., д.б.н., e-mail: oap@mail.ru

Абрамова Е.Э., к.м.н., e-mail: eamed1974@mail.ru

Доровская О.И., e-mail: ponamarchouk@mail.ru

Information about authors:

Nepomnyashchikh D.L., doctor of medical sciences, e-mail: dln\_nco@mail.ru

Postnikova O.A., doctor of biological sciences, e-mail: oap@mail.ru

Abramova E.E., candidate of medical sciences, assistant, e-mail: eamed1974@mail.ru

Dorovskaya O.I., e-mail: ponamarchouk@mail.ru