

ROLE OF NITRIC OXIDE IN APOPTOSIS OF RETINAL NEURONS IN HUMAN FETUSES

N.Yu. Matveyeva, S.G. Kalinichenko, I.I. Pushchin and P.A. Motavkin

The localization of NADPH-diaphorase (NADPH-d), inducible NO-synthase (iNOS) and TUNEL-immunoreactive neurons was studied in the retina of human fetuses in the I–III trimesters of pregnancy. High NADPH-d activity was found in internal segments of photosensory cells, amacrine and ganglion cells. The population of NADPH-d-positive amacrine cells included three types of neurons. Neurons of the 1st type had large size and scarce dendritic field, occupying the inner nuclear and outer plexiform layers. Small neurons of the 2nd type were located in the inner plexiform layer. Ectopic amacrine cells of 3rd type could be found in the outer part of the ganglion cell layer. High density of the NADPH-d-positive neurons was detected in the central portion of retina surrounding fovea cen-

tralis and the optic disk area. The activity of NADPH-d was found to grow progressively in ontogenesis and to correlate with the appearance of immunoreactive iNOS in neurons. Immunoreactive iNOS marked a subpopulation of amacrine and ganglion cells which appeared in weeks 20–21 of gestation and attained maximal immunoreactivity by the end of the III trimester. TUNEL-immunoreactive nuclei of the neurons with the signs of the apoptotic destruction were found in weeks 30–31 of gestation. The highest apoptotic index was found in the population of ganglion cells. The data obtained strongly suggest that NO is a factor, mediating the neuronal apoptosis during the critical period of a differentiation of interneuronal connections in the human retina.

Key words: *apoptosis, nitric oxide, amacrine cells, ganglion cells, photoreceptors, neurogenesis of the human retina.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Vladivostok State Medical University, Laboratories of Cytophysiology and Physiology, RAS Far-Eastern Branch Institute of Marine Biology, Vladivostok.

© В.И. Лапша, В.Н. Гурин, 2005
УДК 611-127:612..59.

В.И. Лапша и В.Н. Гурин

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В ПРАВОМ ПРЕДСЕРДИИ У КРЫС ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

Лаборатория физиологии функциональных систем (зав. — академик НАН Беларуси проф. В.Н.Гурин)
Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск

В острых опытах на крысах изучены изменения ультраструктуры гистогематических барьеров миокарда в правом предсердии при кратковременном и длительном тепловом стрессе. Показано, что при кратковременном перегревании животных (40 °С, 30 и 60 мин) ректальная температура повышалась на 3,0–3,5 °С. Сразу после перегревания и через 24 и 48 ч наблюдались деструктивные и компенсаторно-приспособительные изменения в микроциркуляторном русле, отек перикапиллярного пространства, изменения размеров митохондрий под сарколеммой кардиомиоцитов. При длительном перегревании животных (40 °С, 4 ч/сут, 28 сут) ректальная температура повышалась на 0,4–1,6 °С, изменения в микроциркуляторном русле имели как дистрофический, так и компенсаторно-приспособительный характер. В просвете микрососудов отмечался сдвиг эритроцитов и тромбоцитов, лизис эритроцитов. Количество пиноцитозных пузырьков в эндотелиоцитах вариабельно, ядра эндотелиоцитов имеют повышенную электронную плотность, изрезанные контуры. В перикапиллярном пространстве встречались миелоноподобные фигуры и апоптотные тела. В кардиомиоцитах под сарколеммой отмечалось скопление митохондрий, вакуолизации саркоплазмы. Сравнение эффектов кратковременного и длительного действия тепла на гистогематические барьеры в правом предсердии указывает на более значительные изменения при длительном тепловом стрессе.

Ключевые слова: *тепловой стресс, сердце, правое предсердие, гистогематический барьер.*

Тепловой стресс характеризуется многими структурно-функциональными изменениями в организме [3]. Показано, что в кардиомиоцитах при этом состоянии происходят изменения, характерные для разных стадий апоптоза: скопление мелких митохондрий (чаще под сарколеммой), инвагинации цитоплазмы в ядро, глыбчатое распределение хроматина, пикноз ядра [5], появление апоптотных тел. Известно также, что патологические изменения в миокарде во многом определяются состоянием его гистогематических барьеров [4, 6]. Однако состояние этих барьеров, объединяющих микроциркуляторное русло, периваскулярное пространство и внешние клеточные мембраны кардиомиоцитов, в условиях теплового стресса не изучено.

Цель настоящего исследования — изучение изменений ультраструктуры гистогематических барьеров правого предсердия в условиях кратковременного и продолжительного теплового стресса.

Материал и методы. Эксперименты выполнены с соблюдением всех правил работы с лабораторными животными на 16 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Животные находились в стационарных условиях вивария при температуре $22,0 \pm 1,0$ °С со свободным доступом к воде и пище.

За 12–14 ч до эксперимента крыс лишали пищи. Животные были разделены на 4 группы. 1-ю группу составили интактные крысы (контроль). Тепловой стресс вызывали перегреванием животных в хорошо вентилируемой термокамере при температуре воздуха 40 °С в течение 30 мин

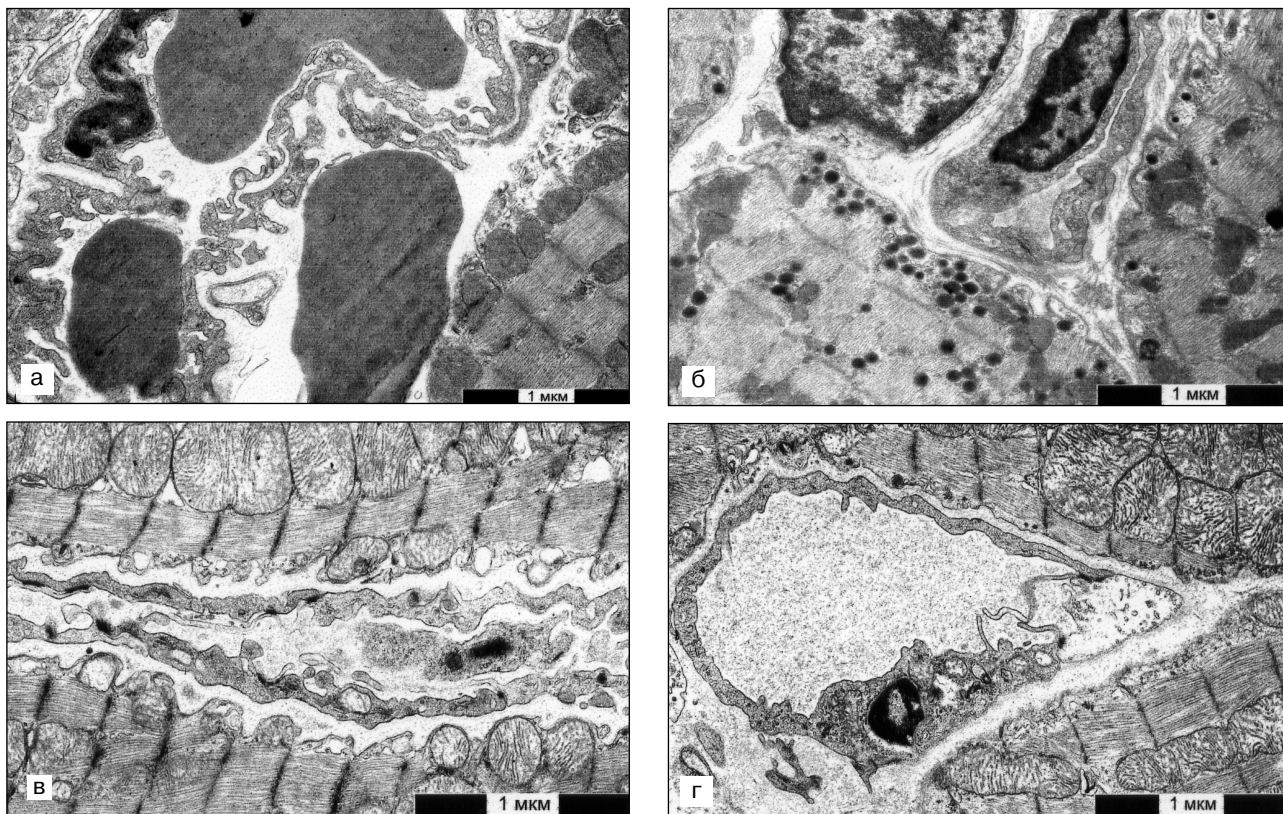


Рис. 1. Ультраструктура микрососудов и кардиомиоцитов у крыс при кратковременном тепловом стрессе.

а — эритроциты в периваскулярном пространстве (перегревание при 40 °С в течение 30 мин); б — скопление гранул, содержащих натрийуретические пептиды, под сарколеммой кардиомиоцита вблизи микрососуда (перегревание при 40 °С в течение 60 мин); в — выросты на люминальной поверхности эндотелиоцита, микрокламатоз через 24 ч после перегревания при 40 °С в течение 60 мин; г — эндотелиоциты с просветленным и электронно-плотным матриксом через 24 ч после перегревания при 40 °С в течение 60 мин.

(2-я группа), 60 мин (3-я группа), по 4 ч/сут в течение 28 сут (4-я группа). Ректальную температуру (РТ) измеряли с помощью трехканального электронного термометра с миниатюрными терморезисторами СТЗ-14, сигнал с которых подавался на цифровой вольтметр В7-38. После окончания всех воздействий у животных под эфирным наркозом извлекали сердце. Объектом исследования было правое предсердие. Материал брали как в день нагревания, так и через 1–2 дня. Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в смеси 4% параформа, 1% глутарового альдегида и 1% раствора четырехокси осмия по общепринятой методике и заливали в эпон—аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали на микротоме LKB (Швеция); просматривали в электронном микроскопе JEM 100 CX (Япония).

Результаты исследования. Перегревание крыс в течение 30 мин при 40 °С повышало РТ на 3 °С и вызывало изменения в ультраструктуре гистогематического барьера. Отмечалось усиление пиноцитозной активности в эндотелиоцитах микрососудов, выражавшееся в увеличении количества пиноцитозных пузырьков. На люминальной поверхности эндотелиоцитов наблюдалось появление длинных микроворсинок, складок, мембранных структур, выступающих в просвет сосуда, что способствует увеличению обменной поверхности капилляров и может приводить к нарушению процессов микроциркуляции. Часть микрососудов были расширены, в них наблюдался сладж эритроцитов. Иногда эритроциты были видны в периваскулярном пространстве (рис. 1, а). Отмечалось набухание отдельных эндотелиоцитов,

суживающих просвет сосуда. Базальная мембрана теряла структурную целостность. Некоторые эндотелиоциты имели повышенную электронную плотность цитоплазмы, а их ядра — глыбчатое распределение хроматина, неровные контуры. В кардиомиоцитах, прилегающих к микрососудам, под сарколеммой наблюдались митохондрии повышенной электронной плотности, миелоноподобные тела.

При перегревании крыс в течение 60 мин РТ повышалась на 3,5 °С. Изменения ультраструктуры, наблюдаемые при перегревании в течение 30 мин, сохранялись. Просвет одних капилляров был резко сужен, других расширен. Цитоплазма части эндотелиоцитов была вакуолизирована. В микрососудах, кроме эритроцитов, отмечались скопления тромбоцитов. Иногда можно было видеть адгезию лейкоцитов к внешней клеточной мембране эндотелиоцитов. Под сарколеммой кардиомиоцитов часто наблюдалось скопление митохондрий, в том числе мелких. В гормонпродуцирующих кардиомиоцитах гранулы, содержащие натрийуретические пептиды, которые регулируют объем циркулирующей крови и водно-солевой гомеостаз, концентрировались под сарколеммой вблизи микрососудов, иногда наблюдались в периваскулярном пространстве или в цитоплазме эндотелиоцитов (см. рис. 1, б).

Через 24 и 48 ч после перегревания в термокамере в течение 60 мин РТ была на уровне контроля, однако наблюдалось дальнейшее развитие дегенеративных, а также компенсаторно-приспособительных из-

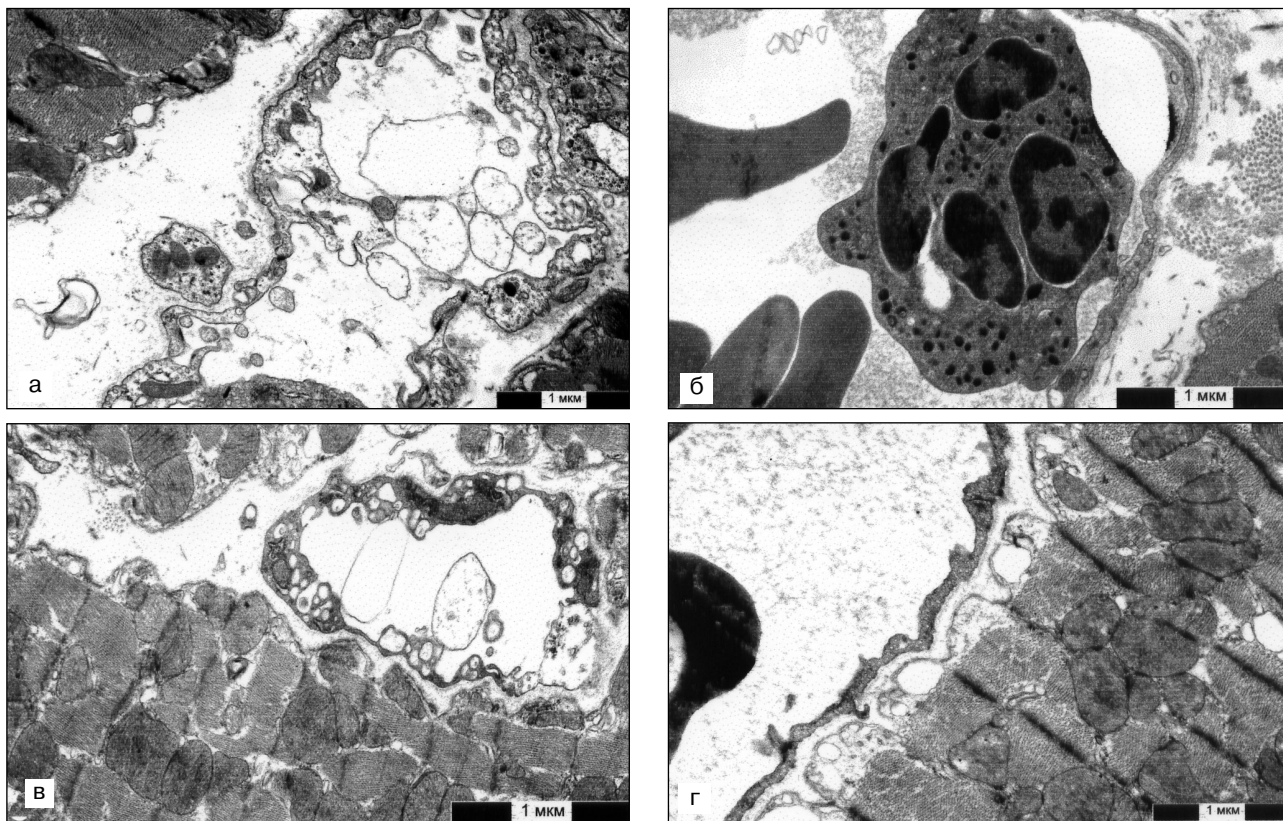


Рис. 2 Ультраструктура микрососудов и кардиомиоцитов при длительном тепловом стрессе (перегревание при 40 °С по 4 ч/сут в течение 28 сут).

а — гемолизированные эритроциты в просвете микрососуда; б — адгезия лейкоцитов к стенке эндотелиоцита; в — вакуолизация эндотелиоцита; г — вакуолизация под сарколеммой кардиомиоцита.

менений в структурах, образующих гистогематические барьеры миокарда. Просвет многих капилляров был резко сужен. В одних случаях это происходило вследствие отека эндотелия, в других — из-за деформации и сжатия капилляров кардиомиоцитами, находящимися в состоянии контрактуры. На люминальной поверхности эндотелиоцитов и складок их внешней мембраны отмечались многочисленные выросты. В таких клетках часто наблюдался микрокламатоз (см. рис. 1, в). Ядра эндотелиоцитов находились в состоянии функционального напряжения, были зарегистрированы глубокие инвагинации ядерной оболочки, уплотнение, глыбчатость и концентрация хроматина у внутренней ядерной мембраны. В части эндотелиоцитов митохондрии были набухшие, отмечалась редукция крист, расширение канальцев эндоплазматической сети, усиление осмиофилии цитоплазмы. Сохранялся перикапиллярный отек, что свидетельствовало о сохранении повышенной сосудистой проницаемости, в интерстиции наблюдались миелоноподобные тела. Встречались микрососуды, в которых один из эндотелиоцитов был разбухшим, с просветленным матриксом и единичными пиноцитозными пузырьками, тогда как другой имел увеличенное количество пиноцитозных пузырьков и более электронно-плотный матрикс (см. рис. 1, г). Митохондрии под сарколеммой выглядели разбухшими, иногда были значительно увеличены в размере и занимали несколько саркомеров, миофибриллы которых находились в состоянии контрактуры. Наряду с

увеличенными в размере митохондриями, отмечались мелкие, новообразованные. Под сарколеммой встречались миелоноподобные тела, вакуоли. В митохондриях были видны плотные гранулы, вероятно, содержащие кальций.

При длительном ежедневном перегревании животных в термокамере при 40 °С (4ч/сут 28 сут) РТ в первые 2 сут повышалась на 1,2–1,6 °С, затем в течение 4 сут только на 0,4 °С. Начиная с 7-х до 16-х суток РТ повышалась на 1,2 °С, затем до конца эксперимента на 0,7 °С.

Изменения в микроциркуляторном русле имели как дистрофический, так и компенсаторно-приспособительный характер. В просвете микрососудов отмечался сладж эритроцитов, тромбоцитов. Иногда наблюдались лизированные эритроциты, когда сохранялись лишь их контуры в виде петель (рис. 2, а). Отмечалась адгезия лейкоцитов к внешней клеточной мембране эндотелиоцитов (см. рис. 2, б). Ядра эндотелиоцитов имели повышенную электронную плотность, изрезанные контуры. Отмечалась вакуолизация части эндотелиоцитов, уменьшение в них содержания пиноцитозных пузырьков и одновременное увеличение количества пиноцитозных пузырьков в соседних эндотелиоцитах (см. рис. 2, в). В просвете сосудов наблюдался микрокламатоз. В перикапиллярном пространстве встречались миелоноподобные и апоптотные тела. Под сарколеммой кардиомиоцитов отмечалось скопление мелких или крупных митохондрий, иногда с повышенной электронной

плотностью, наблюдалась вакуолизация саркоплазмы (см. рис. 2, г).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, при кратковременном (длительностью 30–60 мин) тепловом стрессе увеличивается пиноцитозная активность в эндотелиоцитах микрососудов, просвет части сосудов суживается за счет набухания отдельных эндотелиоцитов. Предполагается, что набухание эндотелиоцитов связано с потерей калия в результате нарушения натриево-калиевого равновесия, что приводит к нарушению гидрофильности клетки. Подобного рода явления наблюдались в микрососудах сердца при циркуляторной и дыхательной гипоксии [6]. Апоптотические изменения в эндотелиоцитах, выражавшиеся в набухании и слущивании отростков эндотелиоцитов в кровеносных сосудах, обнаруживаются также при электронно-микроскопическом исследовании биопсийного материала при кардиомиопатии, миокардите, сердечной недостаточности [8, 9, 12]. При ишемии в течение 20 мин, а затем последующей реперфузии апоптотические изменения также наблюдались в эндотелиоцитах [13]. Добавление L-аргинина в перфузионную жидкость защищало кардиомиоциты и эндотелий сосудов от повреждений [10, 11]. Установлено, что если повреждающий фактор действует кратковременно, то одновременно с нарушением ультраструктуры в эндотелиоците происходит восстановление поврежденных органелл, в том числе митохондрий [6]. Наряду с изменениями, которые можно рассматривать как ранние стадии апоптоза, отмечались и регенераторно-компенсаторные изменения. Мелкие новообразованные [6, 10] митохондрии встречались как в эндотелиоцитах, так и кардиомиоцитах; отмечалось уплотнение базальной мембраны. Такие изменения наблюдались через 24–48 ч после перегревания в течение 60 мин.

При более продолжительном перегревании (28 сут, 4 ч/сут) чаще отмечался сладж эритроцитов, иногда их гемолиз, скопление тромбоцитов, адгезия лейкоцитов к мембране эндотелиоцита. Эритроциты теряли гемоглобин и тромбопластин, в результате чего, по мнению В.А.Шахламова [6], развивается гипоксия, которая может оказывать повреждающее действие на эндотелиоциты микрососудов. Такие изменения в микрососудах происходят при действии в организме эндотоксина кишечной палочки [1]. Показано, что перегревание организма, особенно длительное, нарушает барьерную функцию кишечника и способствует попаданию эндотоксина в кровяное русло [7]. Дегенеративные изменения, сопровождавшиеся вакуолизацией эндотелиоцитов, локальным лизисом цитоплазмы, сокращением числа внутриклеточных структур и микропиноцитозных пузырьков, слущиванием эндотелия в просвет сосуда, приводят к нарушению транскапиллярного обмена, повышению проницаемости сосудистой стенки и перикапиллярному отеку. Наряду с эндотелиоцитами с набухшей цитоплазмой, появлялось значительное количество эндотелиоцитов с гиперосмированной цитоплазмой, что, по мнению В.А.Шахламова [6], указывает на нарушение белкового обмена. Просветление цитоплазмы одних эндотелиальных клеток и ее уплотнение в

других могут свидетельствовать об эндогенной интоксикации, вызванной повреждением гистогематического барьера за счет вымывания из тканей в кровоток токсических продуктов [2]. Сравнение эффектов кратковременного и продолжительного действия тепла позволяет заключить, что более значительное изменение ультраструктуры гистогематического барьера в правом предсердии происходит при длительном тепловом стрессе. Вместе с тем, во всех случаях перегревания, наряду с дегенеративными изменениями, в эндотелио- и кардиомиоцитах правого предсердия могут быть зарегистрированы и регенераторно-компенсаторные изменения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бардахчян Э.А. и Харланова Н.Г. Морфологические изменения эритроцитов и содержания железа в крови крыс при действии эндотоксина кишечной палочки. Бюл. exper. биол., 1992, т. 114, № 10, с. 439–442.
2. Володина А.В., Гурко Н.С., Кипренский Ю.В. и Поздняков О.М. Патоморфологические признаки повреждения эндотелия капилляров при травме и реплантации скелетной мышцы. Бюл. exper. биол., 1994, т. 118, № 10, с. 378–384.
3. Гуринов В.Н. Терморегуляция и симпатическая нервная система. Минск, Наука и техника, 1989.
4. Ескунов П.Н. и Семченко В.В. Структурно-функциональные изменения гистогематического барьера миокарда крыс в постишемическом периоде. Морфология, 2003, т. 123, вып. 2, с. 60–64.
5. Лапша В.И., Бочарова В.Н., Савчина Е.Н. и Гуринов В.Н. Морфофункциональные изменения в сердце при тепловом стрессе. В кн.: Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине (к 100-летию юбилею присуждения Нобелевской премии акад. И.П.Павлову). Минск, ПЧУП Бизнес-офсет, 2004, с. 209–211.
6. Шахламов В.А. Капилляры. М., Медицина, 1971.
7. Hales J., Hubbard R. and Gaffin S. Limitation of heat tolerance. Am. Physiol. New York, Soc/Oxford Univ. Press, 1996, p. 285–355.
8. Hayakawa K., Takemura G., Kanoh M. et al. Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage. Circulation, 2003, v. 108, № 1, p. 104.
9. Magbool H. Apoptosis and cardiovascular disease. Focus on heart failure. Pak J. Med. Sci., 2001, v. 17, № 4, p. 193–196.
10. Okonski P., Banach M., Szram S. et al. L-arginine in reperfusion solution as a heart protecting factor. Pol. Merkuriusz Lek., 2004, v. 17, № 102, p. 550–554.
11. Okonski P., Szram S., Banach M. et al. Effect of — arginine on overhydration and ultrastructure preservation of rat's heart exposed to cold cardioplegic ischaemia. Ann. Transplant., 2003, v. 8, № 2, p. 57–62.
12. Takemura G., Ohno M., Hayakawa Y. et al. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. Circ. Res., 1998, v. 82, p. 1130–1138.
13. Ward B.J. and McCarthy Endothelial cell «swelling» in ischemia and reperfusion. J. Molec. Cell. Cardiol., 1995, v. 27, № 6, p. 1293–1800.

Поступила в редакцию 13.10.2005 г.

CHANGES OF THE ULTRASTRUCTURE OF HISTO-HEMATIC BARRIER IN RAT RIGHT ATRIUM AFTER SHORT-TERM AND PROLONGED HEAT STRESS

V.I. Lapsha and V.N. Gurin

In experiments on rats, changes of the ultrastructure of myocardial histo-hematic barriers in the right atrium during short-term and prolonged heat stress were studied. Short-term heat exposure (40°C, 30 and 60 min) increased the rectal temperature by 3.0–3.5°C. Immediately after heat exposure and 24 and 48 h following the exposure, the destructive and compensatory adaptive alterations in the microcirculatory bed were detected, accompanied by an edema of the pericapillary space and the changes in the size of mitochondria under the cardiomyocyte sarcolemma. Prolonged heating (40°C, 4 h daily for

28 days) led to an increase in the rectal temperature by 0.4–1.6°C. Changes in the microcirculatory bed had both dystrophic and compensatory adaptive nature. Erythrocyte and thrombocyte sludge and erythrocyte lysis were found in the lumen of microvessels. The number of endocytotic vesicles in endotheliocytes was variable; endotheliocyte nuclei had increased electron density and irregular outline. Myelin-like structures and apoptotic bodies were found in the pericapillary spaces. Under the cardiomyocyte sarcolemma the accumulation of mitochondria and sarcoplasmic vacuolization were noted. Comparison of short- and long-term effects of heat on histo-hematic barriers in the right atrium shows more significant changes after prolonged heat stress.

Key words: *heat stress, heart, right atrium, histo-hematic barrier.*

Laboratory of the Physiology of Functional Systems, Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus.

© Коллектив авторов, 2006
УДК 611.018.2:599.323.4

Л. А. Мусина, С. А. Муслимов, А. И. Лебедева и Е. А. Волгарева*

УЛЬТРАСТРУКТУРА МАКРОФАГОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА АЛЛОПЛАНТ

Отдел морфологии (зав. — проф. С.А.Муслимов) Всероссийского центра глазной и пластической хирургии МЗ РФ, г. Уфа
Исследована ультраструктура макрофагов, выявленных у крыс при подкожном введении аллогенного диспергированного биоматериала Аллоплант. Установлено, что при имплантации биоматериала Аллоплант создаются условия для концентрации и полного созревания разных субпопуляций макрофагов, функциональная активность которых и взаимодействие с другими клеточными популяциями приводит к полноценной регенерации соединительной ткани. Полученные данные подтверждают представления о главной регуляторной роли макрофагов в межклеточных взаимодействиях при репаративных процессах и свидетельствуют в пользу гипотезы о двухкомпонентном механизме формирования коллагеновых волокон на месте имплантации биоматериала Аллоплант.

Ключевые слова: *макрофаги, ультраструктура, регенерация, аллогенный биоматериал.*

Одним из эффективных способов стимуляции регенерации и восстановления поврежденных тканей является применение аллогенных биоматериалов [16, 18]. Установлено, что биоматериалы Аллоплант после имплантации подвергаются постепенной резорбции с последующим формированием полноценного регенерата [2,4]. В зоне имплантации биоматериалов обнаруживается концентрация макрофагов, обладающих высокой функциональной активностью [3]. Цель данного исследования — изучение ультраструктурных особенностей популяции макрофагов, выявляемых при имплантации биоматериала Аллоплант.

Материал и методы. Эксперимент проводили на 25 белых крысах линии Вистар массой 180–200 г с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Под эфирным наркозом животным в область основания хвоста подкожно вводили диспергированный биоматериал Аллоплант (ДБМА) в виде суспензии в изотоническом растворе. Животных выводили из опыта на 2-, 4-, 7-, 14-, 30-е сутки ингаляционной передозировкой паров эфира. Кусочки тканей, иссеченных в области введения ДБМА, фиксировали в 2% растворе глutarового альдегида на какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO₄ на том же буфере. Материал заливали в эпон-812. Полутонкие и ультратонкие срезы

готовили на ультратоме LKB-III 8800 (Швеция). Срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата и цитратом свинца (по Рейнольдсу) и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-100 CX II (Япония).

Результаты исследования. На 2–4-е сутки после подкожного введения ДБМА в месте инъекции у крыс, наряду с небольшим количеством сегментоядерных лейкоцитов, выявлялась локальная концентрация мононуклеарных клеток, среди которых преобладали резидентные макрофаги — гистиоциты. Они были амебовидной формы, имели длинные вытянутые отростки и удлиненные ядра с извилистыми неровными контурами. Эухроматин в ядре распределялся равномерно, а около ядерной оболочки в виде тонкого слоя выявлялся гетерохроматин. В цитоплазме определялись различные органеллы, в том числе значительное количество первичных и вторичных лизосом, множество микропиноцитозных пузырьков. Отростками клетки охватывали частички имплантированного биоматериала. Кроме скопления гистиоцитов в окружающих биоматериал тканях, выявлялись признаки миграции из сосудистого русла моноцитов крови, которые дифференцировались в клетки моноцитоидного типа около 8–11 мкм в диаметре (рисунок, а). По ультраструктурным особенностям мы идентифициро-

*E-mail — morphoplant@mail.ru