

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 удлинённые 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

вали эти клетки как юные макрофаги. Ядра бобовидной, иногда овальной формы, с равномерно распределенным эухроматином в нуклеоплазме и значительным количеством гетерохроматина около ядерной оболочки содержали одно или два ядрышка. В цитоплазме определялись редкие органеллы: округлые светлые митохондрии, лизосомы разных размеров с темным и светлым однородным содержимым, слабо развитый комплекс Гольджи, при этом выявлялись множество свободных рибосом и полисом. Немногочисленные каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС) локализовались в околоядерной части цитоплазмы. Плазмолемма макрофагов была относительно гладкой, хотя у некоторых клеток она образовывала короткие толстые выросты и инвагинации, участвующие в захвате частиц биоматериала и формировании фагоцитарных вакуолей.

В дальнейшем, наряду с признаками продолжающейся миграции в ткани юных макрофагов, проявлялись ультраструктурные признаки усиления их белоксинтезирующей и фагоцитарной активности, свидетельствующие о полном созревании и дифференциации клеток (см. рисунок, б). Ядра теряли округлость формы, края их становились более изрезанными. Ядерный материал большей частью был представлен в виде эухроматина. Цитоплазма содержала множество первичных и вторичных лизосом и пузырьков, относительно хорошо развитые ГЭС и комплекс Гольджи, большое количество свободных рибосом и полирибосом, мелкие округлые и удлинённые митохондрии с электронно-плотным матриксом. Плазмолемма фагоцитирующих макрофагов образовывала длинные и короткие выросты вдоль частиц имплантированного биоматериала, имевших признаки лизиса. Встречались также макрофаги, фагоцитирующие немногочисленные разрушенные сегментоядерные лейкоциты.

На 4–7-е сутки обнаруживались макрофаги с отличительными особенностями в ультраструктуре. Это были крупные клетки (до 20 мкм и более) эллипсоидной или слегка вытянутой формы, с небольшими несколько вытянутыми или округлыми ядрами, с большим количеством толстых и тонких цитоплазматических отростков — псевдоподий, микроворсинок, коротких крыловидных складок (см. рисунок, в). В ядрах преобладал эухроматин. В цитоплазме клеток определялись признаки функциональной активности и повышенного внутриклеточного транспорта метаболитов в виде многочисленных микропузырьков и вакуолей, окаймленных мембраной, с хлопьевидным, мелкозернистым или слегка более плотным содержимым, и множества пиноцитозных пузырьков — пиносом. Мелкие вакуоли сливались друг с другом, образуя большие. От цистерн комплекса Гольджи, представленного 3–5 диктиосомами, отшнуровывалось множество пузырьков. Обнаруживались короткие цепочки ГЭС, крупные и мелкие митохондрии округлой или удлинённой формы с параллельно ориентированными кристами и электронно-плотным матриксом. В гиалоплазме были рассеяны многочисленные свободные рибосомы, полисомы, редкие мелкие светлые и темные лизосомы. Выявлялись признаки активного как экзо-, так и эндоцитоза. Некоторые ламеллоподии заканчивались ампулообразными расширениями, в которых обнаруживались группы мелких пузырьков, окаймленных мембраной. На отдельных участках поверхности секреторных макрофагов, а также иногда на концах их длин-

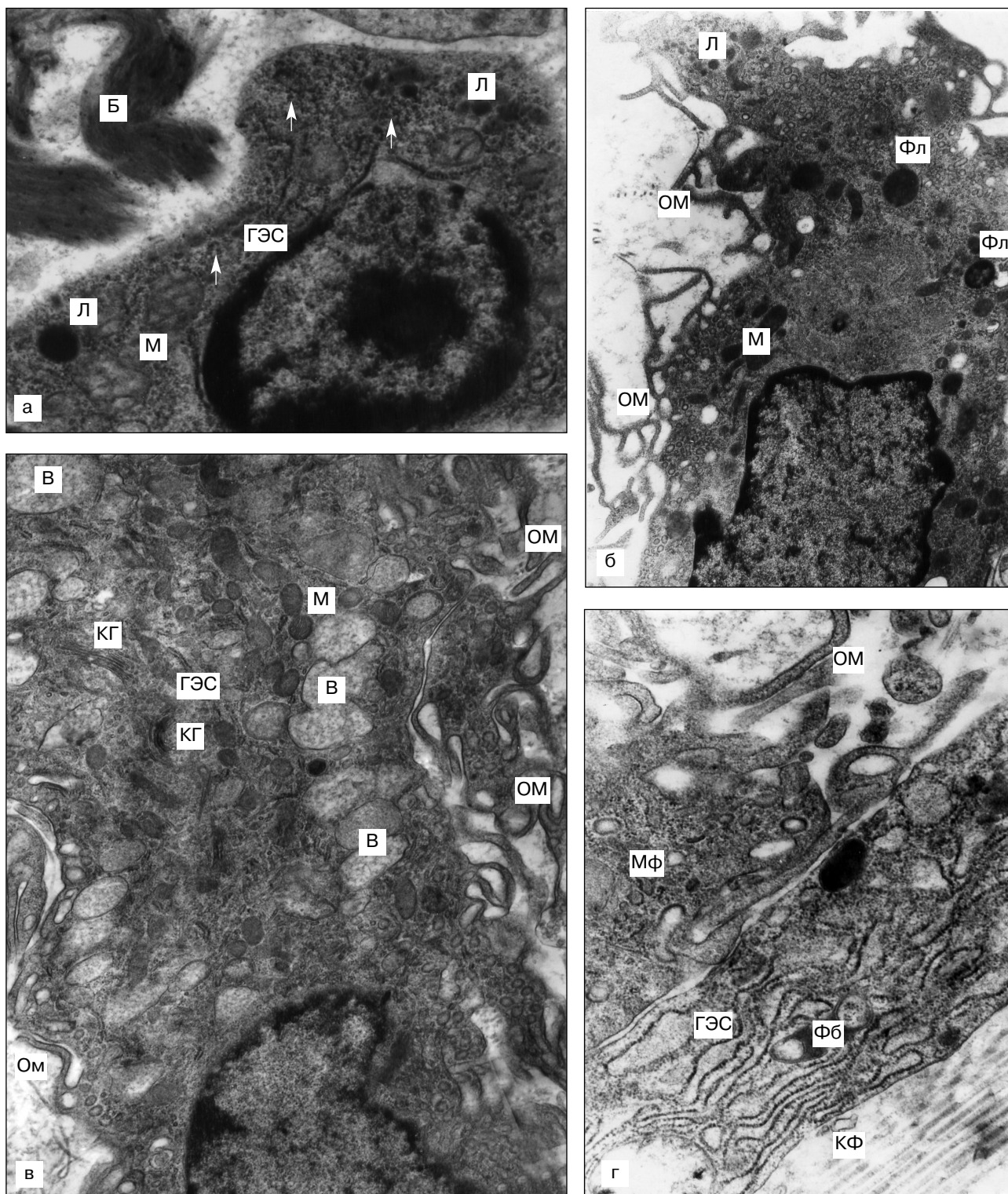
ных выростов имелись щелевидные контакты (нексусы) с активными фибробластами, рядом с которыми выявлялись тонкие фибриллы новообразованных коллагеновых волокон (см. рисунок, г).

На 14-е сутки в зоне введения ДБМА при некотором снижении общего количества клеток преобладали макрофаги со структурой, характеризующей функционально активные зрелые клетки, как фагоцитарного, так и секреторного типа, которые обнаруживались и в дальнейшем. Через 30 сут частицы имплантированного биоматериала в области инъекции не определялись вследствие их полной резорбции, а рыхлая соединительная ткань содержала гистиоциты с типичной для них ультраструктурой.

Обсуждение полученных данных. Проведенное электронно-микроскопическое исследование показало, что в зоне подкожного введения ДБМА выявляются макрофаги, находящиеся на всех стадиях дифференцировки: от юных моноцитоподобных до зрелых активных форм. Ранее было установлено, что именно макрофагами осуществляются лизис и резорбция частиц введенного аллогенного биоматериала [3]. Предполагается, что продукты распада коллагена, а также протеогликаны являются хемоаттрактантами для моноцитов-макрофагов [6, 13], которые принимают участие не только в деградации имплантированных биоматериалов, но и в регуляции межклеточных взаимодействий в пролиферативной фазе асептического воспаления, частным случаем которого является и реакция на операционную травму [3]. Однако при имплантации коллагена закономерной стадией является образование рубца [5], а при имплантации ДБМА, содержащего почти неизменные коллагеновые волокна, эта фаза отсутствует, и регенерация соединительной ткани происходит без фиброза и рубцевания [2, 3]. При этом нами была обнаружена низкая экспрессия трансформирующего фактора роста TGF- β 1 [17], индуцирующего фиброгенез [11, 19], и относительно высокая экспрессия фактора некроза опухоли TNF α , который является ингибитором TGF- β 1 [9].

Вероятно, одним из условий, влияющих на формирование полноценного по структуре регенерата при имплантации аллогенных биоматериалов, является относительно высокая концентрация макрофагов в очаге введения и созревание их в функционально активные субпопуляции. На это указывают результаты нашего исследования. Созревание и дифференцировка клеток происходят под действием продуктов полной резорбции макрофагами аллогенного биоматериала. Об этом свидетельствует тот факт, что в области введения ДБМА макрофаги с большим количеством остаточных телец в цитоплазме, которые обычно наблюдаются при незавершенном фагоцитозе, а также эпителиоидные клетки, гигантские клетки инородных тел, образующиеся вследствие функциональной несостоятельности макрофагов, нами не выявлены. Такие клетки, как правило, встречаются обычно в очаге хронического воспаления, при ксено-трансплантации, вокруг инородных тел, где процессы репарации заканчиваются образованием рубца или грубой соединительнотканной капсулы [5, 8].

Другим важным фактором, придающим пролиферативной фазе регенерации физиологические очертания, на наш взгляд, являются секреторные, так называемые «ма-



Макрофаги в области подкожного введения крысам биоматериала Аллоплант (ДБМА).

а — юный моноцитоидный макрофаг (2 сут после имплантации); б — зрелый макрофаг фагоцитарного типа (4 сут после имплантации); в — макрофаг секреторного типа (4 сут после имплантации); г — щелевидные контакты между секреторным макрофагом и активным фибробластом (7 сут после имплантации). Б — фрагменты ДБМА; КФ — коллагеновые фибриллы; Мф — макрофаг; Фб — фибробласт; ОМ — отростки макрофага; ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть; КГ — комплекс Гольджи; М — митохондрии; Л — лизосомы; Фл — фаголизосомы; В — вакуоли; стрелки — полирибосомы. Ув.: а — 16 000; б, в — 7200; г — 19 000.

триксформирующие» макрофаги [17]. Известно, что схожие с ними по ультраструктуре плацентарные макрофаги (клетки Кашенко—Гофбауэра) выполняют важную роль в росте и дифференцировке клеток ворсин хориона при беременности [7, 10, 12, 14], т. е. в физиологических усло-

виях. Кроме того, ранее было показано, что цитоплазма секреторных «матриксформирующих» макрофагов дает положительную реакцию при выявлении гликозаминогликанов по методу Хейла [17]. Опираясь на морфофункциональную характеристику этих клеток (несколько хо-

рошо развитых диктиосом комплекса Гольджи, большие многочисленные вакуоли, содержание в цитоплазме гликозаминогликанов, наличие морфологических признаков активного метаболизма, а также признаков эндо- и экзцитоза, их близость с активными фибробластами и наличие контактов с ними) мы можем предположить, что данные макрофаги интенсивно синтезируют (или ресинтезируют) протеогликановый компонент новообразующихся коллагеновых волокон. Как известно, именно в цистернах комплекса Гольджи гликозилируются белки и липиды, а образующиеся в них гликопротеины, протеогликаны, гликолипиды и сульфатированные гликозаминогликаны в последующем секреторируются во внешнюю среду [20, 21]. Перечисленные морфофункциональные особенности и их предполагаемая физиологическая роль дают нам основание для выделения «матриксформирующих» макрофагов в отдельную субпопуляцию.

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что при имплантации ДБМА создаются условия для концентрации и полного созревания разных субпопуляций макрофагов, функциональная активность которых и взаимодействие с другими клеточными популяциями приводят к полноценной регенерации соединительной ткани. Эти результаты также подтверждают известные факты о главной регуляторной функции макрофагов в межклеточных взаимодействиях при репаративных процессах [1, 5, 15]. Кроме того, наши данные позволяют выдвинуть гипотезу о существовании двухкомпонентного механизма формирования коллагеновых волокон новообразованной ткани на месте имплантации ДБМА. Согласно ей, коллагеновые фибриллы синтезируются фибробластами, а протеогликановый компонент — «матриксформирующими» макрофагами. Возможно, указанный механизм и является ключевым в регенерации полноценной соединительной ткани, инициированной введением аллогенных биоматериалов и зависящим от их свойств.

ЛИТЕРАТУРА

- Маянский Д.Н. Роль макрофагов в репаративных процессах. В кн.: Механизмы патологических реакций. Томск, Изд-во Томск. ун-та, 1981, с. 56–62.
- Мулдашев Э.Р. Теоретические и прикладные аспекты создания аллотрансплантатов серии «Аллоплант» для пластической хирургии лица: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 1994.
- Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. Уфа, Башкортостан, 2000.
- Нигматуллин Р.Т. Морфологические аспекты пересадки соединительнотканых аллотрансплантатов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск, 1996.
- Серов В.В. и Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М., Медицина, 1981.
- Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истратов Л.П. и др. Коллаген и его применение в медицине. М., Медицина, 1976.
- Шатилова И.Г. Роль плацентарных макрофагов (клетки Кащенко—Гофбауэра) в развитии ворсин и патогенезе неразвивающейся беременности: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М., 1999.
- Шехтер А.Б. и Розанова И.Б. Тканевая реакция на имплантат. В кн.: Биосовместимость. М., 1999, изд. Гуп «Информационный центр ВНИИ Геосистем», с. 174–211.
- Abraham D. J., Shiwen X., Black C. M. et al. Tumor necrosis factor suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2000, v. 275, № 20, p. 15220–15225.
- Anteby E.Y., Natanson-Yaron S., Greenfield C. et al. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching. *Placenta*, 2005, v. 26, № 6, p. 476–483.
- Bissell D.M. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J. Gastroenterol.*, 1998, v. 33, № 2, p. 295–302.
- Castellucci M., Zaccaro D. and Pescetto G. A three-dimensional study of the normal human placental villous core. I. The Hofbauer cells. *Cell Tissue Res.*, 1980, v. 210, № 2, p. 235–247.
- Diegelmann R.F., Linblad W. and Cohen I.K. Fibrogenic processes during tissue repair. In: *Collagen*. Florida, CPC Press, 1988, p. 114–138.
- Khan S., Katabuchi H., Araki M. et al. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. *Biol. Reprod.*, 2000, v. 4, № 62, p. 1075–1083.
- Leibovich S.J. and Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and anti-macrophage serum. *Am. J. Pathol.*, 1975, v. 78, p. 71–101.
- Messner K. Meniscal regeneration or meniscal transplantation. *Scand. J. Med. Sci. Sports.*, 1999, v. 9, № 3, p. 162–167.
- Muldashev E.R., Muslimov S.A., Musina L.A. et al. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank*, 2005, v. 6, № 2, p. 99–107.
- Muldashev E.R., Muslimov S.A., Nigmatullin R.T. et al. Basic research conducted on Alloplant biomaterials. *Eur. J. Ophthalmol.*, 1999, v. 9, № 1, p. 8–13.
- Rodemann H.P., Binder A., Burger A. et al. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int. Suppl.*, 1996, v. 5, № 54, c. 32–36.
- Silbert J.E., Sugumaran G. Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, v. 1241, № 3, p. 371–384.
- Silbert J.E., Sugumaran G., Prydz K. and Dalen K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.*, 2000, v. 113, № 2, p. 193–205.

Поступила в редакцию 10.11.2005 г.

ULTRASTRUCTURE OF MACROPHAGES DETECTED AFTER THE IMPLANTATION OF THE ALLOPLANT ALLOGENIC BIOMATERIAL

L.A. Musina, S.A. Muslimov, A.I. Lebedeva, Ye.A. Volgareva

The ultrastructure of macrophages detected in rats after subcutaneous implantation of the dispersed allogenic Alloplant biomaterial was studied. It was found that with the Alloplant biomaterial implantation the conditions were created promoting the concentration and complete maturation of different macrophage subpopulations. Their functional activity and interaction with other cellular populations result in complete regeneration of the connective tissue. The data obtained confirm the concept of main regulatory role of macrophages in the intercellular interactions during tissue repair and support the hypothesis of bicomponent mechanism of collagen fiber formation in the place of the Alloplant biomaterial implantation.

Key words: *macrophages, ultrastructure, regeneration, allogenic biomaterial.*

Department of Morphology, Russian State Center of Eye and Plastic Surgery, Ufa.