

Функциональная морфология макрофагов при регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами

МУСЛИМОВ С.А., МУСИНА Л.А.

ФГУ Всероссийский Центр глазной и пластической хирургии
Уфа, Россия

РЕФЕРАТ. Цель исследования - определение роли макрофагов в регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами. Установлен механизм действия аллогенных биоматериалов на регенерацию тканей, осуществляющейся через фенотипическое созревание макрофагов и оптимизацию их регуляторного влияния на дифференциацию и функциональную активность других клеток. Впервые раскрыты особенности дифференциации клеток фибробластического ряда в зависимости от функциональной активности макрофагов, стимулированных алло- и ксеногенными биоматериалами. Предложена гипотеза о механизме двухкомпонентного формирования коллагеновых волокон соединительной ткани. Результаты работы позволяют расширить представления о регенерации и о роли макрофагов в ней, обсудить новые механизмы регуляции регенерации, что вносит вклад в решение общих и частных вопросов гистологии, цитологии и клеточной биологии. Важным результатом работы является обоснования использования аллогенного биоматериала в клинической практике для лечения ряда заболеваний человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: макрофаги, регенерация, соединительная ткань, печень, аллогенный и ксеногенный биоматериал

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Изучение проблем воспаления и репаративной регенерации является одной из фундаментальных задач биологии и медицины. В последние годы существенно изменились представления о механизмах регуляции репаративных процессов, знание которых открывает перспективы для разработки научных основ стимуляции и управления процессом

регенерации (Озерская О.С., 2001; Fausto N., 2000; Fu X. et al., 2005). Результаты многочисленных исследований позволяют сделать вывод о том, что в воспалении и регенерации поврежденных тканей ведущую роль играют макрофаги, которые, секретировав различные цитокины, регулируют скорость размножения и характер дифференцировки клеток (Маянский Д.Н., 1991; Шехтер А.Б., Серов В.В., 1991; Sobiczwska E., Szmigielski S., 1997; Sutherland J. et al., 2005). Установлено, что при вялотекущем заживлении ран и фиброзе количество и активность макрофагов значительно снижаются и повышается

экспрессия трансформирующего фактора роста TGF- β 1, что способствует быстрому развитию фибропластических процессов (Шехтер А.Б., Серов В.В., 1991; Lin R.Y. et al., 1995; Santana A., Saxena B., 1995; Rodemann H.P. et al. 1996).

В настоящее время для восстановления тканей все шире используются аллогенные биоматериалы, применение которых, основанное на их резорбции и замещении, позволяет избежать рубцевания и достичь полноценной регенерации тканей (Мулдашев Э.Р., 1994; Нигматуллин Р.Т., 1996; Муслимов С.А., 2000). Анализ процесса замещения биоматериалов в различных тканях, в том числе и в паренхиме печени, показал, что в первую очередь в зону имплантации биоматериала мигрируют макрофаги, осуществляющие лизис и резорбцию коллагеновых волокон биоматериала (Мусина Л.А., 1999; Муслимов С.А., 2000). Однако остаются нераскрытыми как механизмы реализации функциональной активности макрофагов и их субпопуляций, так и ключевые факторы, влияющие на их дифференцировку. Ответы на эти вопросы позволили бы найти патогенетические подходы к разработке научных основ стимуляции и управления процессами восстановления, а исходя из этого, к разработке новых методов стимуляции регенерации различных тканей.

Цель исследования

Определение роли макрофагов в регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами.

Задачи исследования

1. Изучить динамику дифференциации и фенотипические особенности макрофагов в соединительной ткани после имплантации аллогенного биоматериала.
2. Установить фенотипические особенности макрофагов в соединительной ткани после имплантации ксеногенного биоматериала.
3. Изучить сравнительную динамику экспрессии макрофагами цитокинов TNF- α и TGF- β 1 при имплантации аллогенного и ксеногенного биоматериалов.
4. Изучить зависимость между функциональной активностью макрофагов и характером дифференциации клеток фибробластического ряда в соединительной ткани после введения аллогенного и ксеногенного биоматериалов.

5. Провести гистохимическую идентификацию гликозамингликанов в соединительной ткани при имплантации аллогенного и ксеногенного биоматериалов.
6. Изучить морфо-функциональные особенности звездчатых макрофагов при регенерации печени, стимулированной диспергированным биоматериалом Аллоплант.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подкожная имплантация биоматериалов

Эксперимент проведен на 292 крысах породы Вистар обоего пола массой от 0,18 до 0,2 кг. В качестве аллогенного биоматериала использовался разработанный во Всероссийском центре глазной и пластической хирургии диспергированный биоматериал (АДБ), приготовленный из сухожилий крыс и обработанный по технологии Аллоплант® (Мулдашев Э.Р., 1994). В составе биоматериала преобладают коллаген, протеогликаны, гликозамингликаны (Хасанов Р.А., 1999). Низкая антигенная активность препаратов серии Аллоплант обусловлена специальной обработкой – дозированной элиминацией гликозамингликанов из состава коллагеновых волокон и удалением клеточных элементов (Мулдашев Э.Р., 1994). Ксеногенный биоматериал для крыс (КДБ) был изготовлен по названной технологии из сухожилий человека. Биоматериалы, разведенные физиологическим раствором, вводили подкожно инъекционно в область основания хвоста в количестве 125 мг (Хасанов Р.А., 1999). Крысам контрольной группы вводился физиологический раствор. Эксперименты проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных выводили из опыта ингаляционной передозировкой паров эфира. На исследование забирали кусочки тканей из места введения биоматериалов в сроки 2, 4, 7, 14, 30 суток, 6 месяцев.

Для гистологического исследования кусочки тканей фиксировали в 10% нейтральном формалине, после обезвоживания в серии спиртов возрастающей концентрации заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином, по методам Ван-Гизон, по Футу. Процентное соотношение макрофагов на парафи-

новых срезах считали на 2000 клеток. Материал подвергался электронно-микроскопическому исследованию.

Для выявления общего количества гликозаминогликанов (ГАГ) проводили окрашивание парафиновых срезов по методу Хейла (реакция связывания коллоидного железа). Идентификацию ГАГ проводили при окраске препаратов альциановым синим (рН 2,5 и 1,0) по Луппа (1980) и при разной молярности р-ра $MgCl_2$ по Скотту и Дорлингу (Кононский А.И., 1976). Для дифференциации сульфатированных и несulfатированных ГАГ использовали метод блокирования сульфатных групп воздействием метанола. В контроле использовали 1% р-р тестиккулярной гиалуронидазы на физиологическом р-ре. Использовали метод Р.И. Еникеева и Р.Т. Нигматуллина «Способ количественного анализа ГАГ» (Рац. пред. № 1052, выданное Башкирским госуд.мединститутом 20.01.88 г.) с использованием поляризационного микроскопа Amplival Pol.U. с микроспектрофотометрической приставкой САУ-10 (ЛОМО). Анализ проводили с применением однолучевого метода (Агроскин Л.С., Папаян Г.В., 1977). Данные рассчитывали по формуле $I/I_0 = N$, где T – величина пропускания света, I – величина прошедшего через препарат монохроматического света, I_0 – исходная величина монохроматического света.

Иммуногистохимические исследования проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм. Использовали непрямой стрептавидин-биотиновый метод с применением моноклональных антител к TGF- β 1 – трансформирующему фактору роста- β , TNF- α - фактору некроза опухолей, PCNA – Proliferative Cells Nuclear Antigen, виментину – маркеру клеток мезенхимального происхождения (фирмы Santa Cruz Biotechnology). Определяли процентное соотношение положительно окрашивающихся клеток (эндогенная экспрессия TGF- β 1 и TNF- α). Для анализа экзогенных цитокинов, определяющихся во внеклеточном матриксе, применяли полуколичественный метод (в крестах) при увеличении микроскопа X160.

Экспериментальный цирроз печени

Эксперимент проведен на 62 кроликах обоего пола породы «Шиншилла» массой 2,5-3,0 кг с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Патология печени была получена путем подкожного введения 50%-ного тетрахлорметана (четырёх-

хлористого углерода) в течение 3 месяцев (Рубецкой Л.С., Короткина Р.Н., 1962). Через 3 месяца интоксикации тетрахлорметаном гистологически 39 кроликам поставлен диагноз: цирроз печени и 2 кроликам – хронический активный гепатит с переходом в цирроз. Кроликов с циррозом разделили на 2 группы. Операцию лапаротомии проводили под наркозом (тиопентал натрия 30мг/кг + 5% кетамина гидрохлорид – 1мл – внутримышечно). Животным I контрольной группы (20 кроликов) после визуального осмотра печени и биопсии зашивали рану. Животным II группы (21 кролик) после осмотра печени и биопсии, в каждую долю безигольным инъектором вводили по 0,1-0,2 мл суспензии АДБ на физиологическом р-ре, после чего рану зашивали. III группу (контрольную) составили 21 интактных кролика. Животных всех групп выводили из опыта на 2, 7, 14, 30, 90, 180 сутки после операции. При вскрытии брюшной полости образцы ткани для исследований брали во всех случаях из середины и края левой латеральной доли печени.

Для гистологического исследования кусочки печени фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезжовивали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Маллори, проводили ШИК-реакцию на гликоген с использованием ферментативного контроля (амилаза слюны), для идентификации и подсчета фагоцитирующих звездчатых макрофагов (ЗМФ) окрашивали срезы азурII-эозином (Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1982). Фагоцитирующие макрофаги в каждом препарате считали при увеличении X100 в 20 полях зрения, общее количество исследованных полей зрения на препаратах составило 200 от животных каждого срока. Подсчитывали среднее количество клеток на условное поле зрения. Подсчет двуядерных гепатоцитов и площади ядер гепатоцитов проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Процентное соотношение двуядерных считали на 2000 просчитанных клеток. Измерение средней площади ядер гепатоцитов производили при увеличении X160 с помощью аппаратно-программного комплекса анализа изображений Bioskan-2 (Канако, Белоруссия). Производилось измерение ядер 200 гепатоцитов у каждого животного. Материал подвергался электронно-микроскопическому исследованию. Регенерацию печени оценивали по индексу пролиферации гепатоцитов (ИП), экспрессирующих PCNA (ядерный антиген пролиферирующих кле-

ток) (фирмы Santa Cruz Biotechnology). ИП высчитывали по формуле – $ИП = \frac{\text{кол-во меченых клеток}}{\text{общее кол-во клеток}}$. Для выявления апоптотных клеток использовали моноклональные антитела к FAS-L той же фирмы. Достоверность определяли по t-критерию Стьюдента (Стрелков Р.В., 1986). Уровень экспрессии TGF- β определяли путем измерения относительной площади специфического окрашивания на гистологических срезах печени с помощью аппаратно-программного комплекса анализа изображений Биоскан-2 (Канако, Беларусь).

Исследование биопсийного материала пациентов

Исследовано 83 биоптата мягких тканей десны человека, взятых у лиц мужского и женского пола в возрасте от 23 до 60 лет (с их добровольного согласия). Из них, 52 было взято у больных пародонтитом различных степеней тяжести и 31 – после лечения аллогенным биоматериалом. Метод введения АДБ: однократно, инъекционно в область переходной складки верхней и нижней челюстей. Забор тканей десен проводился в различные сроки (через 3, 7, 14 дней, 1, 6, 10, 12 месяцев) в области межзубных сосочков.

Была изучена биопсия печени, взятая у пациента С. с диагнозом «макронодулярный цирроз печени» через 1,5 года после лечения аллогенным биоматериалом. Биопсийный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ван-Гизон. Биопсийный материал частично подвергался иммуногистохимическому и электронно-микроскопическому исследованию.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5% р-ре глутаральдегида, приготовленном на какодилатном буфере (рН 7,2-7,4) с последующей дофиксацией в 1% растворе OsO₄. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике Б. Уикли (1975). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-ном растворе безводной соды и на них выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Срезы готовили на ультратоме LKB-III 8800 (Швеция). Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу (Уикли Б., 1975) и изучали в трансмиссионных микроскопах JEM-7A и JEM-CX II (Япония) при увеличениях от 4000 до 35000.

Обработку цифровых данных производили с использованием пакета статистического анализа программного обеспечения Microsoft Excel с вычислением средних значений, доверительных интервалов и сравнением средних значений с использованием t-критерия Стьюдента (Стрелков Р.В., 1986).

Микроскопические исследования проводились с использованием световых микроскопов JENAVAL и AXIO IMAGER-Z1 фирмы «CARL ZEISS» (Германия). Препараты фотографировали фотоаппаратом NICON D-100 (Япония). Всего изготовлено и изучено 3269 гистологических препаратов (в том числе и 661 с применением гистохимических реакций), 320 полутонких среза, 267 блоков для ультратонких срезов, проведены 602 иммуногистохимические реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфо-функциональная характеристика макрофагов соединительной ткани кожи крыс интактной и контрольной групп

Макрофаги соединительной ткани кожи крыс – гистиоциты округлой или амебовидной формы с длинными вытянутыми отростками и удлиненные ядра с извилистыми неровными краями. Эухроматин в ядре распределяется равномерно, гетерохроматин выявляется по периферии кариолеммы в виде тонкого ободка. В цитоплазме определяется разное количество первичных и вторичных лизосом, фаголизосом, множество микропиноцитозных пузырьков, вакуолей, немногочисленные короткие цепочки гранулярного эндоплазматического ретикулаума (ГЭР) и единичные небольшие комплексы Гольджи. У крыс контрольной группы в зоне введения физиологического раствора большинство макрофагов по ультраструктуре не отличались от таковых интактных крыс. Иногда выявлялись отростчатые клетки фагоцитарного типа, цитоплазма которых содержала большое количество вакуолей средних и мелких размеров со светлым или темным содержимым и небольшие фаголизосомы, мелкие митохондрии с темным матриксом и параллельно расположенными кристами, умеренно развитый пластинчатый комплекс Гольджи, немногочисленные короткие каналы ГЭР. Микропиноцитоз был выражен в сроки 2 и 4 суток. Цитолемма образовывала длинные тонкие выросты и инвагинации, участвующие в захвате субстрата и образовании

фагосом. Количество макрофагов через 2 суток составляло $10,13\% \pm 1,2$ от общего числа клеток, через 4 суток – $9,29\% \pm 1,1$, 7 суток – $8,22\% \pm 0,9$, 14 суток – $9,22\% \pm 0,8$, через 30 суток – $7,12\% \pm 0,9$ и спустя 6 – месяцев $6,97\% \pm 1,1$ (рис. 1). При иммуногистохимическом исследовании тканей обнаружено, что цитокины TGF- β и TNF- α у крыс контрольной группы экспрессируются очень слабо, лишь в виде следов. Причем, TNF- α через 2 суток экспрессируют лишь $2,05\% \pm 0,02$ клеток, а TGF- β – через 4 суток экспрессируют $3,01\% \pm 0,01$ клеток.

Морфо-функциональные особенности созревания и дифференциации макрофагов, выявленных в зоне введения аллогенного биоматериала

В зоне подкожного введения АДБ макрофаги выявляются на всех стадиях дифференциации: от юных моноцитоподобных – до зрелых активных форм, подразделяющихся в свою очередь на фагоцитирующие и секреторные типы. Макрофагами осуществляется лизис и резорбция частиц имплантированного аллогенного биоматериала представляющий собой соединительнотканый внеклеточный матрикс (Хасанов Р.А., 1999; Muldashev E.R. et al., 1994). Матриксные металлопротеиназы (MMPs) активированных макрофагов способны лизировать почти все компоненты внеклеточного матрикса соединительной ткани: коллаген, фибронектин, ламинин, протеогликаны и др. (Woessner Jr. J.F., 1991; Andersen T.L. et al., 2004; Scabilloni J.F. et al., 2005;

Bergin P.J. et al., 2005; Eerola L.M. et al., 2005; Sluifster J.P. et al., 2006), а продукты распада коллагена и протеогликаны соединительной ткани являются хемоаттрактантами для моноцитов-макрофагов (Хилькин А.М. с соавт., 1976; Diegelmann R.F. et al., 1988). На 2 сутки после имплантации в окружающих биоматериал тканях выявлялись признаки интенсивной миграции из сосудистого русла моноцитов крови, которые дифференцировались в юные макрофаги моноцитоподобного типа около 8-11 мкм в диаметре. Ядра бобовидной иногда овальной формы с равномерно распределенным эухроматином в кариоплазме содержали одно или два ядрышка. В цитоплазме клеток определялось небольшое количество органелл: редкие округлые светлые митохондрии, немногочисленные удлинённые каналы ГЭР, лизосомы разных размеров с темным и светлым однородным содержимым, слабо развитый комплекс Гольджи, множество свободных рибосом и полисом. Цитолемма у некоторых макрофагов формировала короткие утолщенные выросты и инвагинации, участвующие в захвате частиц биоматериала и образовании фагоцитарных вакуолей. В перифокальной зоне концентрация мононуклеарных фагоцитов была выше, чем в глубоких слоях имплантата. При подсчете макрофагов из расчета на сто клеток их количество в данный срок эксперимента составляло в среднем $16,85\% \pm 6,5$ ($p < 0,05$ в сравнении с контролем) (рис. 1). Через 4

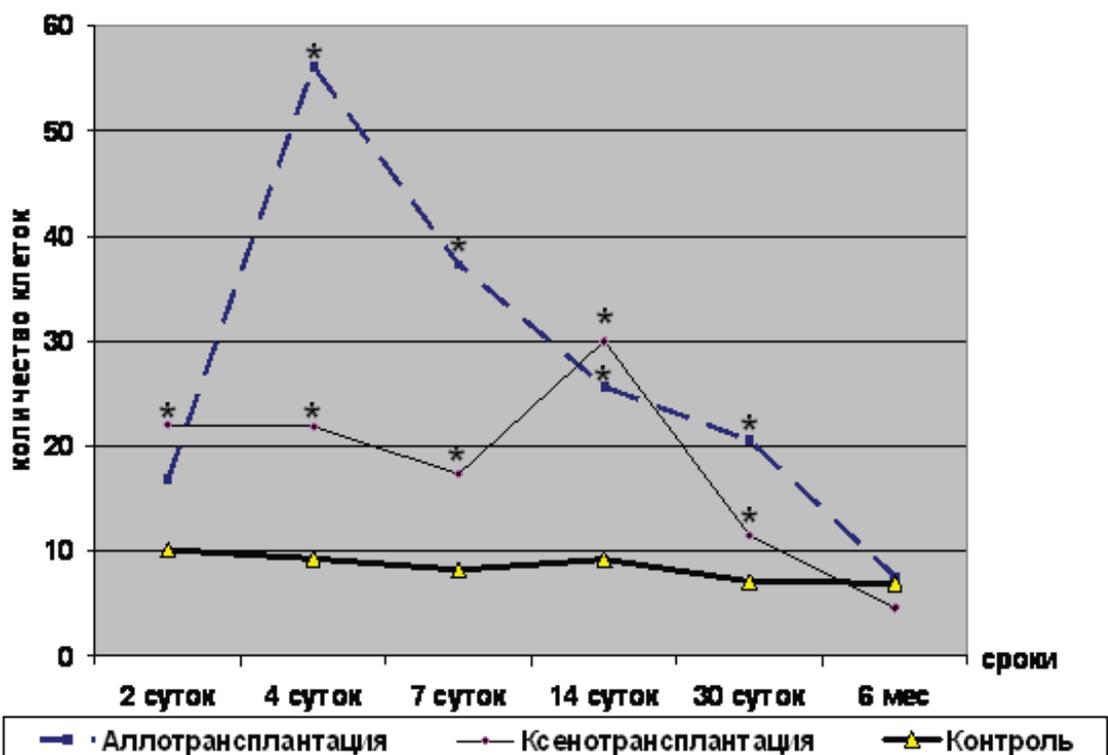


Рис.1. Количество макрофагов в зоне введения АДБ и КДБ и в контроле. *Различия значимы при $p < 0,05$ (в сравнении с контролем)

суток количество клеток в месте имплантации АДБ увеличивалось до $56,15\% \pm 18,0$ ($p < 0,05$). Наряду с возрастанием в тканях числа юных макрофагов проявлялись ультраструктурные признаки усиления их белоксинтезирующей и фагоцитарной активности, свидетельствующие о фенотипическом созревании и дифференциации клеток. Цитоплазма содержала множество первичных и вторичных лизосом, выраженный ГЭР, развитый пластинчатый комплекс Гольджи, большое количество свободных и связанных с мембранами рибосом, мелкие округлые митохондрии с затемненным матриксом. Фагоцитарные макрофаги множеством длинных и коротких отростков обхватывали частицы биоматериала. Ядра теряли округлость формы, края их становились более изрезанными. Ядро содержало одно или два ядрышка. Ядерный материал большей частью был представлен в виде эухроматина, а конденсированный гетерохроматин располагался тонким ободком по внутренней стороне кариолеммы.

Об усилении коллагенолитической активности макрофагов свидетельствовали изменения тинкториальных свойств частиц АДБ. Выявлялись признаки их набухания, гомогенизации и лизиса. При проведении реакции Хейла фрагменты АДБ, граничащие с макрофагами, окрашивались в ярко-голубой цвет, что свидетельствовало об интенсивном выходе ГАГ из состава биоматериала. Коллагеновые волокна биоматериала подвергались дезорганизации вплоть до отдельных тонких фибрилл с отсутствием поперечной исчерченности и до гомогенных частиц, которые фагоцитировались зрелыми макрофагами. Наряду с фагоцитами в этот срок эксперимента обнаруживались клетки секреторного типа с множеством вакуолей и редкими лизосомами в цитоплазме. На 7 сутки количество макрофагов составило $37,3\% \pm 10,4$ ($p < 0,05$).

На 4-7 сутки выявлялись секреторные макрофаги с особенностями в ультраструктуре. Крупные клетки (более 20 мкм) эллипсоидной или слегка вытянутой формы с множеством толстых и тонких цитоплазматических отростков – псевдоподий, микроворсинок, коротких крыловидных складок, имели признаки выраженной функциональной активности и повышенного внутриклеточного транспорта метаболитов в виде многочисленных вакуолей, окаймленных одиночной мембраной, с хлопьевидным, мелкозернистым или плотным содержимым и множества пиноцитозных пузырьков в цитоплазме. Мелкие вакуоли сливались друг

другом, образуя большие. От развитого пластинчатого комплекса Гольджи, выявляющегося в клетках в количестве 3-5 диктиосом, отшнуровывались многочисленные пузырьки и везикулы. Обнаруживались короткие цистерны ГЭР, крупные и мелкие митохондрии округлой или удлинённой формы с параллельно ориентированными кристами и плотным матриксом. В цитозоле были рассеяны многочисленные свободные рибосомы, полисомы, редкие светлые и темные лизосомы небольших размеров. Выявлялись признаки активного как эндо- так и экзоцитоза. Некоторые ламеллоподии заканчивались ампулообразными расширениями, в которых обнаруживались группы мелких везикул, окаймленных одиночной мембраной. Клеточная поверхность макрофагов образовывала множество длинных тонких выростов, некоторые посредством нексусов контактировали с активными формами фибробластов. Макрофаги имели эозинофильную цитоплазму, по методу Хейла она положительно окрашивалась на ГАГ в интенсивный голубой цвет. Иммуногистохимически в цитоплазме определялся виментин – маркер клеток мезенхимального происхождения. На мезенхимальное происхождение указывают и выявленные нами переходные клеточные формы между ними и МСК. Предполагаемые предшественники имели такие же крупные размеры и подобные гисто- и иммуногистохимические характеристики, но функциональная активность у них была менее выражена. В их цитоплазме отсутствовали вакуоли, но было больше свободных рибосом и полисом, присутствовало несколько хорошо выраженных комплексов Гольджи с вытянутыми мембранными структурами и многочисленными пузырьками около них. Ультраструктура описанных нами секреторных макрофагов очень схожа с таковой плацентарных макрофагов (клетки Кащенко-Гофбауэра), выполняющих важную роль в росте и дифференциации клеток и стромы ворсин хориона при беременности, т. е. в физиологических условиях (Шатилова И. Г., 1999; Castellucci M. et al., 1980; Khan S. et al., 2000; Anteby E.Y. et al., 2005). Установленное нами мезенхимальное происхождение выявленных макрофагов также сближает их – существуют данные, что камбиальным элементом для плацентарных макрофагов служат мезенхимальные клетки стромы ранних ворсин хориона (Шатилова И.Г. с соавт., 1997; Castellucci M., Zaccaria D., 1989; Demir R. et al., 1989). J.M.Barker и W.Th.Daems (1981) полагают, что в отличие от моноцитов и макрофа-

гов воспалительных экссудатов, фиксированные макрофаги воспроизводятся *in situ* и имеют мало-дифференцированных мезенхимных предшественников в тканях. Фибробласты и выявленные секреторные макрофаги в соединительной ткани кожи, в отличие от происходящих из моноцитов крови фагоцитарных макрофагов, по всей вероятности имеют единого предшественника – мезенхимную стволовую клетку (Шарифуллина С.З. с соавт., 2004; Badiavas E.V. et al., 2003; Fathke C. et al., 2004).

Морфофункциональная характеристика описанных нами секреторных макрофагов позволяет предположить, что они интенсивно синтезируют (или ресинтезируют) гликозаминогликановый или протеогликановый компонент новообразующихся коллагеновых волокон, а также определяют тип синтезируемого коллагена в зоне имплантации, так как именно с ними формировали межклеточные контакты активные фибробласты (Серов В. В., Шехтер А. Б., 1981; Шатилова И. Г., 1999; Castellucci M. et al., 1980; Khan S. et al., 2000; Anteby E.Y. et al., 2005). Вышеперечисленные морфо-функциональные особенности и предполагаемая физиологическая роль выявленных макрофагов в зоне имплантации аллогенного биоматериала дают нам основание для выделения их в отдельную субпопуляцию «матриксформирующих» макрофагов.

На 14 сутки при некотором снижении общего количества клеток в месте введения АДБ выявлялись макрофаги со структурой, характеризующей функционально активные зрелые формы, как фагоцитарного, так и секреторного типа. Общее количество макрофагов составляло $25,65\% \pm 17,5$ ($p < 0,05$). Через месяц в месте введения частиц АДБ у крыс

не выявлено, структура рыхлой соединительной ткани соответствовала норме, а из популяции макрофагов в тканях выявлялись лишь гистиоциты с типичной для них ультраструктурой. Количество мононуклеарных фагоцитов составило $20,55\% \pm 4,8$ ($p < 0,05$), а через 6 месяцев численность гистиоцитов составляла $7,6\% \pm 2,5$.

Результаты иммуногистохимических и гистохимических исследований тканей в зоне имплантации аллогенного биоматериала

Иммуногистохимические исследования

Через 2 суток после введения индуктор фиброза цитокин TGF- β 1 в тканях вокруг частиц практически не определяется и экспрессируют его лишь $3,11\% \pm 0,12$ клеток ($p < 0,05$), а фактор некроза опухоли – TNF- α обнаруживается в $20,01\% \pm 0,2$ (при $p < 0,05$) макрофагов (рис.2). На 4 сутки TGF- β 1 в соединительной ткани в зоне введения АДБ обнаруживается в $7,12\% \pm 0,01$ клеток (при $p < 0,05$). Интенсивно выявляется TNF- α , как внутриклеточно ($40,03\% \pm 0,11$ при $p < 0,05$), так и внеклеточно. Через 7 суток – эндогенная экспрессия TGF- β 1 проявляется довольно слабо и составляет $12,31\% \pm 0,32$ ($p < 0,05$) от общего количества клеток. Экспрессия цитокина TNF- α несколько ослабляется по сравнению с предыдущим сроком эксперимента ($30,12\% \pm 0,1$ при $p < 0,05$). Через 2 недели – количество экспрессирующих TGF- β 1 клеток в тканях увеличивается до $16,01\% \pm 0,21$ ($p < 0,05$). Цитокин выявляется как внутриклеточно в макрофагах и фибробластах, так и в соединительнотканном матриксе. Клетки, содержа-

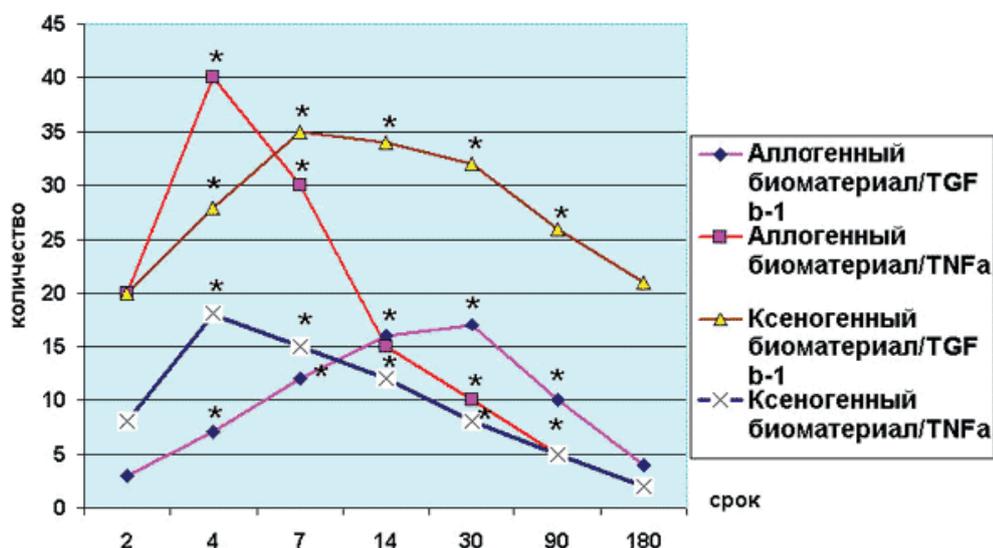


Рис.2. Экспрессия цитокинов клетками TGFb1 и TNFa в зоне введения аллогенного и ксеногенного биоматериалов (%). * Различия значимы при $p < 0,05$ (в сравнении с данными до введения биоматериалов)

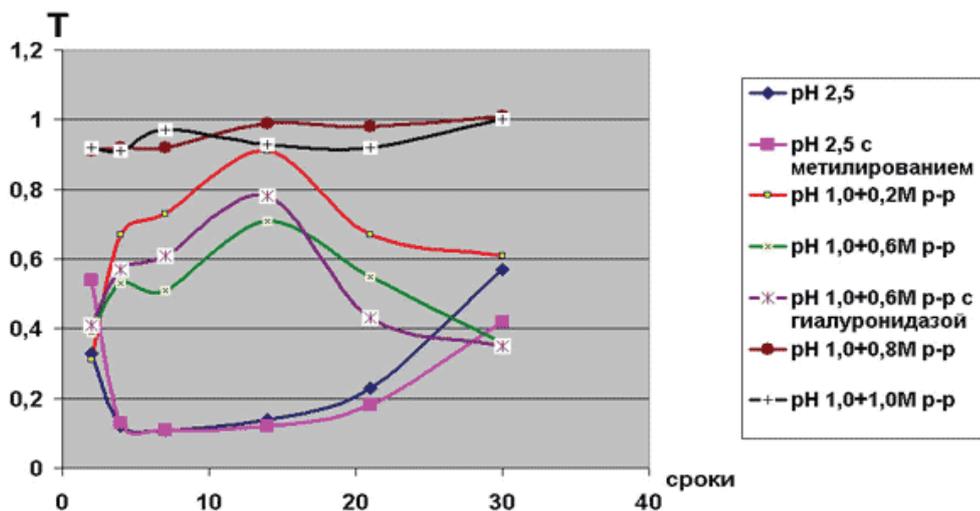


Рис. 3. Изменение величины пропускания T -монохроматического света через препараты при имплантации АДБ (окраска альциановым синим)

щие TNF- α выявляются в количестве $15,06 \pm 0,01\%$ (при $p < 0,05$ относительно контрольной группы). Спустя 30 суток возле новообразованных коллагеновых волокон определяется $17,11\% \pm 1,01$ ($p < 0,05$) клеток, экспрессирующих TGF- $\beta 1$. TNF- α в тканях в данный срок обнаруживается в $10,27\% \pm 1,2$ ($p < 0,05$) клетках. Через 6 месяцев в соединительной ткани крыс цитокины TGF- $\beta 1$ и TNF- α не выявляются.

При определении клеток мезенхимального происхождения с применением моноклональных антител к виментину на препаратах поместились следующие клетки: МСК, все клетки фибробластического ряда, начиная от малодифференцированных мезенхимных клеток и заканчивая зрелыми формами, секреторные макрофаги и их предполагаемые предшественники. При определении пролиферирующих клеток с применением моноклональных антител к PCNA метились ядра фибробластоподобных клеток и фибробластов в начальные сроки имплантации биоматериала (2-14 сутки).

Гистохимическая идентификация гликозамингликанов

Уже на 2-4 сутки в зоне имплантации АДБ при окраске по методу Хейла фрагменты биоматериала, подвергающиеся лизису и резорбции макрофагами, по краям окрашивались в ярко-голубой цвет. С 4 суток с возрастанием клеточности в зоне введения наблюдались изменения тинкториальных свойств частиц биоматериала. После обработки материала альциановым синим ГАГ в виде зернистого осадка выявлялись непосредственно на фибриллах. Спустя 7 суток реакция Хейла была интенсивнее, и ГАГ определялись не только по периферии частиц ДАБ, но и в центре. Грануляционная ткань также ярко

окрашивалась по Хейлу. Альцианоположительные гранулы ГАГ определялись между фибриллами новообразованных волокон. На 14 – 21 сутки количество частиц биоматериала несколько уменьшалось. Наряду с активной резорбцией их макрофагами в очаге имплантации происходило формирование зрелой грануляционной ткани, интенсивно окрашивающейся по Хейлу. Через 30 суток под кожей у крыс на месте частиц АДБ определялся тонкий пленчатый рыхлый регенерат, умеренно окрашивающийся по Хейлу на ГАГ и почти не отличающийся по структуре от окружающей ткани.

Видовая идентификация ГАГ при окраске альциановым синим показала, что при pH 2,5 начиная с 4-х и почти до 21 суток наблюдалось снижение величины пропускания монохроматического света T через препарат, связанное с повышением общего содержания ГАГ (рис. 3). При pH 2,5 после метилирования срезов кривая величин пропускания света T на диаграмме почти повторяла кривую общего содержания ГАГ, свидетельствуя о повышенном содержании в ткани гиалуроновой кислоты (ГК). При окраске альциановым синим в 0,2 М р-ре $MgCl_2$, выявляющем сульфатированные ГАГ, с 4-х и до 21 суток наблюдалось повышение величины пропускания света T , что говорило об уменьшении сульфатированных ГАГ в процессе резорбции частиц ДАБ. При окраске в 0,6 М р-ре $MgCl_2$ после обработки среза гиалуронидазой было выявлено, что большую часть сульфатированных ГАГ составлял дерматан-сульфат, содержание которого к 30 суткам несколько повышалось (наблюдалось снижение величины пропускания света T). При окраске в 0,8 М и 1,0 р-рах $MgCl_2$ величина пропускания света T была все время высокой, что свидетельствова-

ло об отсутствии или ничтожно малом количестве кератан-сульфата.

Выявленное нами в зоне замещения аллогенного биоматериала присутствие значительного количества ГАГ является одним из важных аспектов полноценной регенерации соединительной ткани. Известно, что кроме выполнения функции связывания коллагеновых фибрилл гликозаминогликаны, активно влияя на пролиферацию клеток и синтез фибробластами коллагена, участвуют в воспалительных реакциях и репаративных процессах (Mast B.A. et al., 1992; Mast B.A. et al., 1993; Muldashev E.R. et al., 1994; Jenkins R.H. et al., 2004). Проведенные нами гистохимические исследования соединительной ткани в зоне имплантации аллогенного биоматериала показали количественное преобладание гиалуроновой кислоты (ГК), которая, по нашему предположению, вероятно, частично накапливается в результате интенсивного лизиса макрофагами частиц аллогенного биоматериала и частично – в результате синтеза и экзосекреции ее «матриксформирующими» макрофагами.

Известно, что ГК содержится в большом количестве в эмбриональной ткани, характеризующейся отсутствием процессов классического воспаления и образования рубцовой ткани при ее повреждении (Krummel T.M. et al., 1987; DePalma R.L. et al., 1989; Frantz F.W. et al., 1992; Alaish S.M. et al., 1994; Kennedy C.I. et al., 2000). Установлено, что именно ГК запрещает скопление тромбоцитов и выпуск цитокинов тромбоцитарного фактора роста PDGF, с которого обычно начинается каскад воспалительных реакций, в том числе и экспрессия клетками индуктора фиброза трансформирующего фактора роста TGF- β (Haynes J.H., 1994; Olutoye O.O., 1996; 1997; Campbell J.S. et al., 2005). В силу этого в регенерации участвует очень малое количество фибробластов и коллаген при этом не депонируется. Предполагается, что ответ на рану в эмбриональной ткани может быть процессом более близко напоминающим «истинную» регенерацию или рост, а не репарацию с образованием рубца (Krummel T.M., Michna B.A., 1988; Mast B.A. et al., 1991; Alaish S.M. et al., 1994). Выявленные нами особенности регенераторного процесса соединительной ткани при имплантации аллогенного биоматериала – присутствие «матриксформирующих» макрофагов мезенхимального происхождения; большое количество гиалуроновой кислоты в зоне замещения биоматериала; слабо выраженная воспалительная реакция; низкая экспрессия клетками индуктора фиброза – транс-

формирующего фактора роста; умеренно выраженная пролиферативная реакция клеток фибробластического ряда, приводящая к образованию структурно полноценного регенерата позволили нам провести аналогию с репаративной регенерацией в эмбриональной ткани, где заживление раны идет с полноценным восстановлением стромы (Krummel T.M., 1988; DePalma R.L., 1989; Mast B.A., 1991; Alaish S.M., 1994).

Дифференциация клеток фибробластического ряда в соединительной ткани при стимуляции макрофагов аллогенным биоматериалом

На 2-4 сутки кроме небольшого количества сегментоядерных лейкоцитов, юных и зрелых макрофагов, единичных лимфоцитов, фиброцитов в тканевом ложе, представленном рыхлой волокнистой соединительной тканью – фасциальной прослойкой, большей частью вокруг сосудов, выявлялись немногочисленные мезенхимальные клетки (МК). Иммуногистохимически они метились на наличие в цитоплазме белка промежуточных филаментов – виментина (маркера клеток мезенхимального происхождения). МК были представлены мелкими звездчатыми формами (7-10 мкм) с несколькими отростками различной длины. Ядерно-цитоплазматическое соотношение было в пользу ядра. Ядро, богатое эухроматином, содержало 1-2 плотных ядрышка. В тонком светлом ободке цитоплазмы изредка выявлялись мелкие единичные митохондрии, слабовыраженный аппарат Гольджи, немного коротких каналов ГЭР и многочисленные свободные рибосомы. Ультраструктурные характеристики выявленных МК совпадают с данными других исследователей, изучавших мезенхимальные стволовые клетки (МСК) кожи в культуре (Шарифуллина С.З. с соавт., 2004; Badiavas E.V. et al., 2003; Fathke C. et al., 2004). При иммунофенотипировании клеток с использованием FITC-меченых моноклональных антител против CD45 антигена крыс и PE-меченых моноклональных антител против Thy-1 (CD90) антигена крыс в суспензии, полученной путем вымывания из алло- и ксеноимплантантов, извлеченных из организма крыс, Н.Н.Курчатовой с соавторами (2005) было установлено, что в очаг имплантации биоматериалов происходит миграция CD45-CD90+ клеток, которые рассматриваются как стволовые клетки мезенхимального происхождения (Ростовская М.С. с соавт., 2004; Tsai M.S. et al., 2004). Также в зоне имплантации АДБ выявлялись крупные фибробластоподобные клетки – предшественники

юных фибробластов. На гистологических срезах они были представлены несколько вытянутыми отростчатыми светлыми клетками с большим округлым или вытянутым также светлым ядром с одним или двумя крупными ядрышками. Ультраструктурно в цитоплазме определялось множество свободных рибосом и полисом, слабовыраженный аппарат Гольджи, немногочисленные короткие каналы ГЭР. Кроме того, изредка встречались зрелые активные фибробласты, более мелкие, веретеновидной формы, с большим количеством умеренно расширенных каналов ГЭР в цитоплазме. Они формировали контакты с секреторными макрофагами или располагались вблизи них. Рядом с фибробластами выявлялось небольшое количество тонких фибрилл новообразованных коллагеновых волокон.

Спустя 7 суток наряду с фибробластоподобными клетками определялись юные и зрелые фибробласты. Юные фибробласты были двух типов. Первый тип – это округлые клетки с крупным овальным ядром с конденсированным по периферии гетерохроматином, содержащим одно или два ядрышка. В узкой цитоплазме выявлялось небольшое количество коротких цистерн ГЭР, множество свободных рибосом и полисом, редкие мелкие лизосомы с нежноволокнистым и мелкозернистым содержимым, везикулы, в которых были видны агрегаты параллельно ориентированных нитей, а также гранулы гликогена. Цитоскелет был представлен немногочисленными микрофиламентами и микротрубочками, расположенными в непосредственной близости от ядра. Второй тип юных фибробластов – это овальные или несколько удлиненные клетки с более широкой и темной электроплотной цитоплазмой, которая содержала хорошо выраженную ГЭР с умеренно расширенными параллельными вытянутыми цистернами, пластинчатый комплекс Гольджи, удлиненные митохондрии с темным матриксом. Соотношение ядра к цитоплазме чаще всего было больше 1.

Зрелые фибробласты представляли преимущественно мелкие (от 10 до 15 мкм в длину), веретеновидной формы с небольшим вытянутым ядром клетки. Наличие в цитоплазме развитых умеренно расширенных каналов ГЭР, удлиненных каналов пластинчатого комплекса Гольджи, свободных рибосом и полисом в их цитоплазме позволяет данные фибробласты отнести к коллагенобластам I типа (Серов В. В., Шехтер А. Б., 1981). Выявленные многочисленные макрофагально-фибробластические

контакты между ними и секреторными «матриксформирующими» макрофагами свидетельствовали об их взаимодействиях (Серов В.В., Шехтер А.Б., 1981; Mimura T. et al., 2004; Fitzgerald S.M. et al., 2004). Ориентиром или «матрицей» для фибриллогенеза, как известно, служит рельеф клеточной поверхности, который обеспечивает направленную сборку коллагеновых фибрилл (Серов В. В., Шехтер А. Б., 1981). Вдоль относительно прямой наружной клеточной плазмалеммы фибробластов определялись ровные коллагеновые фибриллы с четкой поперечной исчерченностью, равномерно формирующиеся в «правильные» пучки. В тканевом ложе выявлялись начальные признаки формирования грануляционной ткани со специфическими особенностями. Между деградирующими частицами АДБ обнаруживались фуксинофильные новообразованные коллагеновые волокна, в которых на ультраструктурном уровне определялось наличие четкой регулярной поперечной исчерченности. Местами формирование новообразованных коллагеновых фибрилл шло по ходу распадающихся фибрилл биоматериала. Выявлялись редкие новообразованные кровеносные сосуды мелкого калибра с удлиненными веретеновидными эндотелиальными клетками. Вокруг частиц биоматериала выявлялся относительно узкий клеточный вал макрофагально-фибробластического происхождения.

Через 14 суток наряду с активной резорбцией частиц биоматериала макрофагами продолжалось формирование соединительной ткани в очаге имплантации. Обнаруживались зрелые коллагеновые волокна, о чем свидетельствовали выраженная фуксинофилия и темно-коричневая окраска по Футу (коллаген I типа). В образовавшемся регенерате определялась макрофагально-фибробластическая инфильтрация с преобладанием фибробластов, которые выявлялись в виде упорядоченных однонаправленных отдельных клеток среди новообразованных коллагеновых фибрилл и имели уплощенную форму и широкие плоские цитоплазматические отростки. В цитоплазме у них обнаруживались крупные удлиненные митохондрии, умеренно расширенные, довольно развитые каналы ГЭР, несколько пластинчатых комплексов Гольджи, множество пиноцитозных пузырьков на внутренней стороне плазмалеммы, свидетельствующих о высокой функциональной деятельности клеток. У редко встречающихся, относительно небольших размеров, миофибробластов большая часть цито-

плазмы была заполнена тонкими актиновыми филаментами, располагающимися параллельно друг другу, а каналы ГЭР занимали небольшую площадь их цитоплазмы, что свидетельствовало об их слабой синтетической активности.

В дальние сроки (30 суток) под кожей у крыс на месте частиц аллогенного биоматериала определялся тонкий пленчатый рыхлый регенерат. Продолжалась ремодуляция новообразованной соединительной ткани в более зрелую. В состав клеточного инфильтрата входили преимущественно клетки фибробластического ряда: фибробласты, фиброкласты, немногочисленные миофибробласты. Наряду с ними определялось небольшое количество гистиоцитов. Фибробласты были с признаками умеренной функциональной активности. Они имели веретеновидную или овальную форму, хорошо развитые узкие каналы ГЭР, в просвете которых выявлялось мелкозернистое или гомогенное просветленное содержимое. Возле этих клеток обнаруживались тонкие разрозненные коллагеновые фибриллы. Фиброкласты отличались менее развитым ГЭР, наличием в цитозоле небольшого количества мелких лизосом, вакуолей с кусочками поперечно исчерченных волокон. Цитоплазматическая мембрана клеток образовывала короткие инвагинации и псевдоподии, участвующие в захвате волокнистых структур. Новообразованные коллагеновые волокна представляли собой плотные оформленные пучки, окрашивающиеся по Ван-Гизону в интенсивный розовый цвет. Они располагались под углом относительно друг друга и содержали умеренное количество аморфного основного вещества. При электронномикроскопическом исследовании фибриллы коллагеновых волокон имели регулярную поперечную исчерченность. В новообразованной соединительной ткани выявлялись признаки урежения капиллярной сети. Признаков застоя и сладжирования форменных элементов крови в них обнаружено не было. Подобное строение указывало на формирование регенерата соединительной ткани с полноценной гистоархитектоникой. Через 6 месяцев после введения крысам АДБ ни визуально, ни гистологически регенерат в тканевом ложе не определялся. Структура тканевого ложа была полностью схожа с таковой контрольных животных.

Таким образом, при замещении частиц АДБ во все сроки эксперимента в инфильтрате выявляется умеренное количество МК и дифференцирующихся из них клеток фибробластического дифферона.

Низкая клеточная плотность в зоне имплантации биоматериала объясняется присутствием значительного количества свободных ГАГ, снижающих пролиферативную клеточную активность, в том числе и клеток фибробластического ряда (Yamagata M. et al., 1989; Muldashev E.R. et al., 1994). Миофибробласты при имплантации АДБ встречались редко. Ввиду того, что каналы ГЭР занимали небольшую площадь их цитоплазмы, можно было говорить об их относительно низкой функциональной активности. Все это указывало на отсутствие выраженной контракции соединительной ткани в зоне введения биоматериала. При имплантации аллогенного биоматериала дифференциация МК в фибробласты, синтезирующие зрелый коллаген I типа, по видимости, является следствием секреции зрелыми макрофагами цитокина TNF- α , оказывающего прямое супрессорное действие на экспрессию индуктора фиброза TGF- β 1 (Abraham D.J., Shiwen X., 2000). При наличии в зоне имплантации большого количества ГАГ – второго важного компонента соединительной ткани, новообразованные коллагеновые фибриллы постепенно упаковываются в упорядоченные пучки волокон, формируя регенерат с полноценной фиброархитектоникой (Серов В.В., Шехтер А.Б., 1981).

Структурно-функциональная характеристика макрофагов, выявленных в зоне подкожного введения ксеногенного биоматериала

Динамика численности макрофагов, инициированная введением ксеногенного биоматериала, резко отличалась от реакции на аллогенный биоматериал. Процентное соотношение моноцитов/макрофагов к общему количеству клеток после ксеиноимплантации было значительно меньше. Подсчет клеток показал, что количество макрофагов через 2 и 4 суток в среднем составляет $22,05\% \pm 6,6$ и $21,85\% \pm 7,1$ соответственно ($p < 0,05$) (рис.1). На 7 сутки эксперимента оно составляло $17,35\% \pm 10,8$ ($p < 0,05$), на 14 сутки – $30,0\% \pm 5,9$ ($p < 0,05$). Спустя 30 суток численность макрофагов находилась в пределах $11,5\% \pm 4,7$ ($p < 0,05$). Через 6 месяцев наряду со снижением общего количества клеток в месте введения ксеногенного биоматериала пропорционально уменьшалось и количество фагоцитирующих клеток доходило до $4,8\% \pm 2,7$ ($p < 0,05$).

Хотя на 14 сутки и выявлялось небольшое увеличение численности макрофагов, результаты ультраструктурного исследования показали, что качественный состав клеток инфильтрата был со-

вершено иной, чем при применении аллогенного биоматериала: происходило накопление функционально ослабленных макрофагов. Существует точка зрения, рассматривающая именно в дефиците макрофагов причину незавершенного фагоцитоза и, как следствие, пролонгирования воспаления, принимающего затяжной вялотекущий характер (Кутина С.Н., Маянский Д.Н., 1981; Маянский Д.Н., 1991; Девис П., 1998). При имплантации КДБ мононуклеарные фагоциты выявлялись с признаками функционального истощения: перегруженная фагосомами и остаточными тельцами цитоплазма, сглаженность цитомембраны, округлая форма клеток, признаки снижения биосинтетических функций ядра, разрушение или недоразвитие органелл, задействованных в энергетическом обмене и секреторной деятельности. При поглощении макрофагами инертного или трудно лизирующегося материала теряется их подвижность, ослабляется как секреторная так и фагоцитарная функция (Маянский Д.Н., 1981; Розанова И.Б., 1999; Шехтер А.Б., Розанова И.Б., 1999; Davies P. et al, 1982). На снижение функций макрофагов указывало также отсутствие выраженных морфологических признаков лизиса и деструкции коллагеновых волокон имплантированного КДБ. Его частицы долго оставались целыми, в дальнейшем подвергаясь лишь слабому разрушению. На 7 – 14 сутки вокруг них выявлялись скопления эпителиоидных клеток, гигантские клетки инородных тел и клетки Пирогова-Лангханса, свидетельствующие о развитии гранулематозного воспаления (Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Шехтер А.Б., Розанова И.Б., 1999; Turk J.L., Narayanan R.B., 1981; Mackiewicz Z. et al., 2005). Гранулемы являются признаком дисрегенерации и приводят к хронизации воспалительного процесса (Маянский Д.Н., 1991; Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Шехтер А.Б., Розанова И.Б., 1999; Андреева Л.Д. с соавт., 1999; Turk J.L., Narayanan R.B., 1981).

При подкожной ксеноимплантации дефицит макрофагов и их фагоцитарная и секреторная несостоятельность в процесс по восстановлению структурно-функциональной целостности ткани привлекает другие клеточные популяции, такие, как Т-, В-лимфоциты, большое количество мезенхимальных клеток. Лимфоцитарная инфильтрация вокруг частиц КДБ, выявляющаяся уже в начальные сроки после введения, указывает на повышенную антигенность биоматериала и развитие иммунной реакции (Johnson K.L. et al., 1999). Эк-

прессорирующие лимфокины лимфоциты вносят значительный вклад в развитие фибропластической реакции: ускоряют дифференцировку фибробластов и усиливают синтез коллагена (Бабаева А.Г., 1985; Бобро Л.И., 1990; Johnson K.L., Ziff M., 1976; Postlethwaite A.E., 1995; Johnson K.L. et al., 1999). Наличие лимфо-макрофагальных комплексов в ткани свидетельствует об иммунной воспалительной реакции, протекающей по типу гиперчувствительности замедленного типа (Маянский Д.Н., 1991; Ройт А., 2000; Adams D.O., 1983). Такой ход событий в конечном итоге приводит к формированию грубоволокнистой соединительной (рубцовой) ткани, что и было выявлено нами при применении ксеногенного биоматериала.

Результаты иммуногистохимических и гистохимических исследований тканей в зоне имплантации ксеногенного биоматериала

Экспрессия клетками цитокинов TGF- β 1 и TNF- α при подкожной имплантации крысам КДБ представлена на рис.2. Если через 2 суток в соединительной ткани после введения ксеногенного биоматериала клеток, экспрессирующих трансформирующий фактор роста TGF- β 1 выявлялось в количестве 20,01% \pm 0,1 ($p < 0,05$), то на протяжении 4-7 суток данный цитокин довольно интенсивно экспрессировался и клетками мезенхимного ряда, и лейкоцитами и локализовался внутри клеток и в толще соединительнотканного матрикса. Количество положительно окрашивающихся клеток составляло 28,09 \pm 0,21 и 35,14% \pm 1,01 ($p < 0,05$) соответственно. Спустя 14 суток секреция TGF- β 1 шла на убыль (34,11% \pm 0,11 при $p < 0,05$) и к 6 месяцам он слабо выявлялся у 21,02 % \pm 0,01 клеток ($p < 0,05$). Иммуногистохимически цитокин – фактор некроза опухолей TNF- α – через 2 суток на препаратах определялся в виде следов и обнаруживался у 2,11% \pm 0,2 клеток ($p < 0,05$). К 4 суткам после введения биоматериала количество клеток с экспрессией цитокина увеличивалось до 18,43% \pm 1,1 ($p < 0,05$). После 7 суток экспрессия TNF- α постепенно снижалась (15,01% \pm 0,2 ($p < 0,05$) и через 30 суток он почти не выявлялся (8,12 % \pm 0,04 при $p < 0,05$).

При имплантации ДКБ во все сроки эксперимента процессы резорбции биоматериала макрофагами были слабо выражены, и реакция по Хейлу в частицах биоматериала была отрицательной. Только широкая соединительно-тканная капсула, образовавшаяся вокруг частиц уже на 7 сутки, давала слабое положительное окрашивание на сульфатирован-

ные ГАГ. На 14-21 сутки после имплантации сохранившиеся частицы КДБ также не окрашивались по Хейлу, что свидетельствовало об отсутствии процесса их деструкции и выхода из них свободных ГАГ. Вокруг частиц слабо окрашивались сульфатированные гликозаминогликаны. В дальнейшем происходило замещение частиц ДКБ фиброзной тканью, преобразующейся в рубец, в котором реакция на выявление свободных ГАГ также была отрицательной. Через 6 месяцев в месте имплантации под кожей определялся хорошо выраженный рубец. Идентификационный анализ с применением микроспектрофотометрии зоны имплантации при окраске альциановым синим при разных значениях pH показывал или отсутствие, или очень незначительное содержание ГАГ.

Дифференциация клеток фибробластического ряда в соединительной ткани после имплантации ксеногенного биоматериала

В ранние сроки наблюдения (2 суток) после подкожного введения крысам частицы КДБ наряду с гранулярными лейкоцитами: эозинофилами и нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами, тучными клетками инфильтрировались многочисленными фибробластоподобными клетками. Иммуногистохимически они метились на наличие в цитоплазме белка промежуточных филаментов – виментина (маркера клеток мезенхимального происхождения). На ультраструктурном уровне среди них выявлялись МК с типичным для них строением (Шарифуллина С.З. с соавт., 2004; Badiavas E.V. et al., 2003; Fathke C. et al., 2004). Фибробластоподобные клетки представляли крупные отростчатые клетки с большим округлым или вытянутым светлым ядром с одним или двумя крупными ядрышками. Их цитоплазма содержала множество свободных рибосом и полисом, слабовыраженный аппарат Гольджи, немногочисленные короткие каналы ГЭР. Иногда выявлялись и пучки тонких микрофиламентов. Описанные клетки мы отнесли к предшественникам миофибробластов, которые уже начали появляться в данный срок эксперимента. Вследствие выраженной секреции макрофагами противовоспалительного цитокина TGF- β 1 при имплантации ксеногенного биоматериала большинство привлекаемых в зону имплантации МК дифференцировались в миофибробласты (Desmouliere A. et al., 1993; Schmitt-Graff A. et al., 1994; Serini G. et al., 1998; Badid C. et al., 2000; Desmouliere A. et al., 2005; Cucoranu I. et al., 2005), и только небольшая часть – в фибро-

бласты, представленные очень крупными клетками. Последние характеризовались неправильной извилистой формой, наличием широкой цитоплазмы с большим количеством резко расширенных каналов ГЭР, свидетельствующих об усиленном синтезе коллагена. В.В.Серов и А.Б.Шехтер (1981) относят данные фибробласты к коллагенобластам II типа. На 4 сутки миофибробласты определялись в значительном количестве. По структуре и функциональной активности они резко отличались от таковых, выявленных при имплантации АДБ. Ультраструктурные признаки миофибробластических клеток в зоне введения КДБ: крупные размеры; наличие длинных извилистых отростков; выраженная извилистость, иногда даже ворсинчатость клеточной поверхности; большое количество рибосом и полисом в цитоплазме; сильно расширенные развитые каналы ГЭР; преобладание зухроматина в кариоплазме; глубокие инвагинации кариолеммы внутрь ядра; наличие очень крупных 1-3 ядрышка в кариоплазме, свидетельствовали об усиленной функциональной активности как ядерных, так и цитоплазматических компонентов. Посредством отростков миофибробласты между собой формировали множественные типичные для них щелевые контакты – нексусы. Значительную часть цитоплазмы занимали контрактильные структуры, особенно много было их по периферии цитоплазмы. Ультраструктурная характеристика описанных нами миофибробластов в зоне имплантации ксеногенного биоматериала совпадает с данными других исследователей, изучавших миофибробласты обычных и патологических рубцов (Серов В. В., Шехтер А. Б., 1981; Badid C. et al., 2000; Amadeu T.P. et al., 2003; Eyden B., 2003; Desmouliere A. et al., 2005). Вдоль неровной поверхности миофибробластов выявлялось множество беспорядочно ориентированных новообразованных тонких фибрилл коллагеновых волокон, которые вследствие интенсивного ускоренного синтеза не успевали собраться в упорядоченные пучки. Выраженная извилистость клеточной поверхности миофибробластов также благоприятствовала беспорядочной ориентации новообразованных фибрилл (Серов В. В., Шехтер А. Б., 1981; Goldberg B.D., 1974, 1982). При окраске по Футу фибриллы обнаруживались в виде тонких аргирофильных волокон черного цвета, что свидетельствовало о синтезе миофибробластами незрелого коллагена III типа, выявляющегося обычно в рубцах (Шехтер А.Б., Розанова И.Б., 1999; Gabbiani

G. et al., 1976, Podobed O.V. et al., 1996). Общепризнано, что миофибробласты играют ключевую роль в контракции соединительной ткани, которая имеет место при заживлении раны и развитии рубцовой ткани (Серов В. В., Шехтер А. Б., 1981; Shin D., Minn K.W., 2004; Desmouliere A. et al., 2005). Силы механического натяжения, которое они создают, имеют регулирующее влияние на направление роста клеток, биосинтез коллагена и ориентацию волоконных элементов, а в конечном итоге на архитектуру ткани (Шехтер А. Б. с соавторами, 1977; Desmouliere A. et al., 2005). Образованию на месте имплантированного КДБ рубцового регенерата, состоящего из плотно организованной соединительной ткани типа фиброзной с небольшим содержанием основного вещества между пучками коллагеновых волокон, способствовало также и низкое содержание ГАГ ввиду слабого лизиса макрофагами ксеногенного биоматериала и вероятно ввиду отсутствия «матриксформирующих» макрофагов.

Морфо-функциональные особенности макрофагов и морфологические изменения тканей десны при пародонтите

Исследования биопсий мягких тканей десны пациентов с пародонтитом выявили признаки хронического воспалительного процесса. В соединительнотканной пластинке десны обнаруживались признаки деструкции коллагеновых волокон в виде мукоидного набухания (слабо выраженная пикринофилия при окраске препаратов по Ван-Гизону). В сосочковом слое дермы выявлялись расширенные капилляры с признаками стаза эритроцитов. При средней степени на фоне инфильтрации сегментоядерными лейкоцитами преобладала лимфомакрофагальная, а при тяжелой – преимущественно лимфо-плазмоцитарная инфильтрация. На ультраструктурном уровне коллагеновые волокна теряли фибриллярную структуру. При тяжелой степени заболевания обнаруживались фрагментация и гоменизация коллагеновых волокон в большей части стромы, исчезновение поперечной исчерченности сохранившихся фибрилл. С другой стороны, при окраске гистологических препаратов по Маллори иногда выявлялись тонкие новообразованные коллагеновые волокна с хаотичной архитектурой. У пациентов с хронической формой заболевания определялся выраженный фиброз стромы, при котором признаки воспалительной клеточной инфильтрации ослабевали. В толще соединительнотканной пластинки десны выявлялись клетки с поврежденной плазмолеммой. Фибробласты имели хорошо вы-

раженную эндоплазматическую сеть с резко расширенными каналами. В просветах ГЭР определялось мелкозернистое содержимое. Подобное строение клеток указывало на усиление коллагенсинтетической функции и позволяло отнести их к коллагенобластам II типа. Базальная мембрана на границе соединительнотканной основы и эпителия слизистой оболочки либо не определялась совсем, либо имелись лишь ее небольшие фрагменты с размытыми нечеткими контурами, что создавало предпосылки для нерегулируемого роста эпителия – акантоза. При тяжелой степени пародонтита патологические изменения в эпителии были сильно выраженными. При иммуногистохимическом исследовании (PCNA) пролиферирующие эпителиоциты обнаруживались не только в базальном слое, но и в шиповатом, что свидетельствовало о нарушении процессов физиологической регенерации.

Полиморфные макрофаги выявлялись в небольшом количестве. Среди них некоторые клетки были с признаками фагоцитоза. Большею частью встречались очень крупные макрофаги с широким ободком цитоплазмы и округлым ядром с конденсированным хроматином вдоль кариолеммы и в виде глыбок в кариоплазме. Цитоплазма их содержала множество остаточных телец, фаголизосом и пластинчатых структур. Макрофаги с перегруженной цитоплазмой почти не образовывали эктоплазматических выростов и их поверхность казалась сглаженной. Они часто объединялись в симпласты – гигантские клетки инородных тел. Встречались и малодифференцированные незрелые формы гистиоцитов со светлой цитоплазмой. Среди малочисленных органелл выделялись мелкие лизосомы с темным содержимым, окаймленные одиночной мембраной, а также свободные рибосомы.

Иммуногистохимически в соединительной ткани выявлялась экспрессия TGF- β 1, выраженность которого коррелировала со степенью тяжести пародонтита. Если при легкой степени тяжести пародонтита цитокин выявлялся у 12,01% \pm 0,01 клеток ($p < 0,05$), то с прогрессированием болезни и развитием воспалительных процессов количество положительно окрашивающихся клеток при средней степени составляло 24,54% \pm 1,11 ($p < 0,05$), при средне-тяжелой 35,21% \pm 0,12 ($p < 0,05$), а при тяжелой 40,12% \pm 1,12 ($p < 0,05$) (рис. 4).

При тяжелой степени заболевания цитокин обнаруживался как внутри клеток, так и во внеклеточном матриксе. Цитотоксический фактор TNF- α при легкой степени пародонтита экспрессировал-

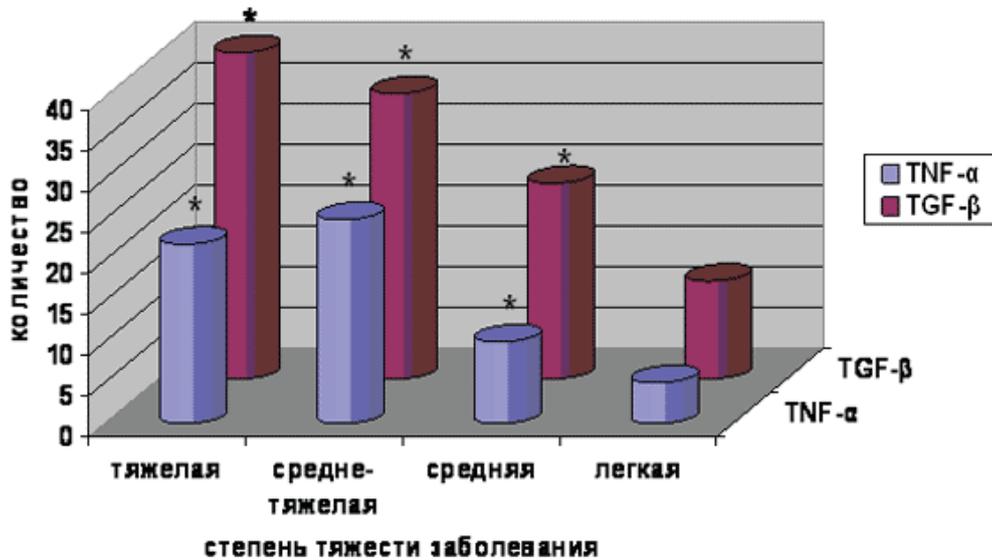


Рис.4. Количество клеток, экспрессирующих цитокины TGF-β1 и TNF-α при разной степени тяжести пародонтита. *Различия значимы при $p < 0,05$ (в сравнении с легкой степенью заболевания)

ся у $5,11\% \pm 1,12$ клеток ($p < 0,05$), при средней степени тяжести – $10,22\% \pm 1,4$ ($p < 0,05$), при средне-тяжелой – $25\% \pm 1,12$ ($p < 0,05$). А при тяжелой степени пародонтита при развитии фиброзных процессов клеток, секретирующих TNF-α было меньше ($22,01\% \pm 1,3$ при $p < 0,05$). Дефицит мононуклеарных фагоцитов и их ферментативная несостоятельность усугубляет течение заболевания и способствует хронизации воспаления и развитию аутоиммунного механизма повреждения тканей пародонта (Жяконис И.М., 1986; Глебская А.В., 2002). При развившейся патологии лимфоциты становятся «дирижерами клеточного ансамбля», они повышают митотическую активность фибробластов и индуцируют гиперсекрецию коллагеновых фибрилл (Бобро Л.И., 1990; Шехтер А.Б., Серов В.В., 1991). Заживление тканей десны при пародонтите заканчивается склерозом собственной пластинки. Признаки фиброза в ней усиливались соответственно тяжести заболевания. Об этом свидетельствовала и динамика экспрессии TGF-β1, выявленная в соединительнотканной пластинке слизистой. Повышение экспрессии TGF-β1 обычно коррелирует с развитием фиброза (LeRoy E.C. et al., 1990; Miyazono K., Heldin C.H., 1993; Rodemann H.P. et al., 1996). При продолжительном пребывании в месте повреждения TGF-β1, являясь промотором фиброгенеза (Diamond J.R., 1995; Rodemann H.P. et al., 1996; Demols A. et al., 2002), содействует иммунодепрессии макрофагов путем дезактивации их фагоцитарной функции (Зубова С. Г. с соавт., 1996). Цитолитические возможности макрофагов в тканях слизистой десен при пародонтите проявлялись слабо – TNF-α секретирувался

или в малом количестве, или не выявлялся вовсе. Низкая экспрессия цитокина способствовала несовершенному фагоцитозу макрофагами, направленного против инфекционных агентов и аутоиммунных комплексов (Фрейдлин И.С., 1995; Nathan C.F., Koot R.K., 1977; Okulov V.B. et al., 1992).

Функциональная морфология макрофагов и регенерация тканей десны при применении аллогенного биоматериала

После введения АДБ в ткани десны уже через 7-10 суток в соединительнотканной пластинке слизистой снижалась степень воспалительной инфильтрации лейкоцитами, лимфоцитами, фибробластами. Увеличивалось количество макрофагов. Выявлялись юные макрофаги по структуре близкие к моноцитам крови. Они характеризовались округлой формой, бобовидным или овальным плотным ядром с одним или двумя ядрышками. Хроматин в ядре был равномерно распределен. Некоторые клетки имели короткие выросты цитоплазмы, инвагинации и псевдоподии. Отношение ядра к цитоплазме было приближено к единице. Цитоплазма моноцитоидных макрофагов была относительно бедна органоидами. Встречались мелкие лизосомы, единичные митохондрии и большое количество свободных рибосом. Помимо юных макрофагов присутствовали и зрелые клетки фагоцитарного и секреторного типов. Профессиональные фагоциты содержали почковидное или глубоко расчлененное ядро, занимающее эксцентричное положение, имели ворсинчатую поверхность за счет длинных многочисленных цитоплазматических выростов. Цитоплазма гистиоцитов имела бо-

лее плотный вид, чем у моноцитов из-за большого количества органелл. Хорошо развитый ГЭР состоял из удлиненных цистерн с многочисленными рибосомами. Пластинчатый комплекс Гольджи был представлен плоскими цистернами и мелкими пузырьками. Возле цитоплазматической мембраны располагалось множество вакуолей с гомогенным содержимым, фаголизосомы и фагосомы с остаточными тельцами. Такое строение свидетельствовало об усилении фагоцитарной и биосинтетической функции клеток. Зрелые макрофаги контактировали с фибробластами, синтезирующими тонкие фибриллы коллагеновых волокон. В строме десен после введения АДБ наряду с вышеописанными макрофагами были обнаружены нетипичные для нормы секреторные макрофаги. Они отличались крупными размерами, овальной или удлиненной формой. В вытянутом ядре выявлялись крупные ядрышки, прилегающие к кариолемме. Периферические участки цитоплазмы были заполнены многочисленными крупными вакуолями с гомогенным светлым и мелкозернистым содержимым. Выявлялись овальные крупные удлиненные митохондрии с параллельными кристами, короткие каналы ГЭР с четкими рибосомами и вытянутые цистерны комплекса Гольджи. Цитоплазматическая мембрана образовывала многочисленные ворсинки, некоторые из которых ампульнообразно расширялись за счет содержащихся в них мелких везикул. Среди клеток фибробластического ряда в основном преобладали активные коллагенобласты I типа. Коллагенобласты имели светлую цитоплазму с умеренно расширенными цистернами гладкого и гранулярного эндоплазматического ретикулума. В просвете каналов ГЭР некоторых клеток обнаруживались секреторные пузырьки с гомогенным содержимым. Выявлялись макрофагально-фибробластические контакты. Изредка определялись фиброкласты и миофибробласты с тонкими миофибриллами в цитоплазме. Фиброкласты определялись по наличию в цитоплазме фаголизосом с фрагментами коллагеновых фибрилл.

После введения АДБ в десну уже на 7 сутки четко определялись контуры базальной мембраны между эпителиальным слоем и подслизистой основой ткани десны. В многослойном плоском эпителии уменьшался отек клеток и межклеточных пространств. Десквамация клеток рогового слоя была заметно снижена или исчезала вовсе. При электронномикроскопическом исследовании в эпите-

лиальных клетках шиповатого и зернистого слоев выявлялось увеличение количества пучков тоно- и микрофиламентов. Цитоплазма клеток базального слоя содержала большое количество свободных рибосом, развитую сеть гранулярного эндоплазматического ретикулума, комплекс Гольджи. Экспрессия PCNA в эпителии определялась только в клетках базального слоя. Причем количество данных клеток, находящихся в G₁ и S фазах клеточного цикла было значительно снижено по сравнению с эпителием десен до введения АДБ. Через 14 суток в сосочковом слое соединительнотканной основы десны обнаруживались новообразованные кровеносные сосуды с веретеновидными эндотелиальными клетками, ультраструктура которых явно указывала на усиление секреторной деятельности и интенсификацию трансэндотелиального обмена. Вдоль цитоплазматической мембраны выявлялось большое количество пиноцитозных пузырьков. Плазмалемма эндотелиоцитов образовывала ворсинки направленные в просвет сосуда, что увеличивало площадь соприкосновения клеток с жидкой средой. Признаки восстановления сосудистого русла свидетельствовали об улучшении трофики и метаболизма в тканях пародонта (об этом также можно было судить по исчезновению признаков гидропической, белковой и жировой дистрофии клеток). Известно, что макрофаги, помимо факторов миграции фибробластов, различных ростовых факторов, выделяют факторы ангиогенеза (Маянский Д.Н., 1981).

Через месяц после введения АДБ архитектоника и структура многослойного плоского эпителия полностью восстанавливались. Кардинальное отличие процесса регенерации эпителия после введения АДБ от патологических эпителиальных разрастаний заключается в том, что регенерация происходит исключительно за счет пролиферации эпителиоцитов базального слоя. Т.е., можно говорить о восстановлении физиологического характера регенерации эпителия, который характеризуется пролиферативной активностью именно клеток камбиального базального слоя (Улумбеков Э.Г. Челышев Ю.А, 1998; Быков В.Л., 1999; Баженов Д.В., 2001). О полноценности регенерации эпителия можно было судить также по восстановлению межэпителиальных мостиков, сужению межклеточных пространств и появлению зерен кератогалина в цитоплазме клеток, которые исчезали при патологии. В соединительнотканной основе

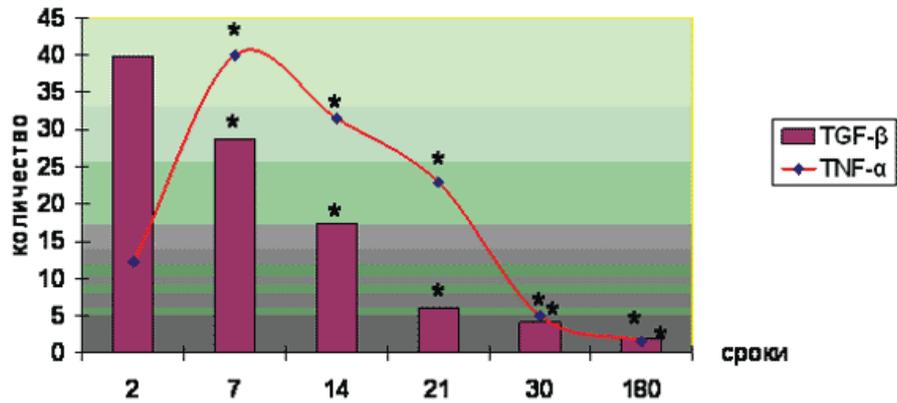


Рис.5. Содержание TGF-β1 и TNF-α в строме десны после введения АДБ (тяжелая степень пародонтита). *Различия значимы при $p < 0,05$ (в сравнении с количеством до введения АДБ)

очаги воспалительной инфильтрации не обнаруживались. Клеточный состав представляли преимущественно клетки фибробластического ряда: фибробласты и фиброциты. Выявлялись признаки урежения кровеносной сети. При серебрении препаратов по Футу в сосочковом слое выявлялись тонкие коллагеновые волокна, окрашивающиеся в желтовато-коричневый цвет, что указывало об их зрелости. В более глубоких слоях стромы определялись плотно упакованные, расположенные под углом относительно друг друга, фуксинофильные пучки коллагеновых волокон.

Повышение уровня экспрессии TNF-α в ткани служило подтверждением усиления макрофагами фагоцитарной активности (Pober J.S., Contran R.S., 1990; Войтенков Б.О., Окулов В.Б., 1995). Снижение уровня экспрессии TGF-β1 в тканях пародонта подтверждало исчезновение рубцовых изменений в соединительнотканной пластинке (рис. 5).

Если через 2 суток еще отмечалось повышенная экспрессия TGF-β1 ($39,90\% \pm 4,6$ клеток при $p < 0,05$), то уже спустя 7 дней, количество клеток, экспрессирующих TGF-β1 на срезах выявлялось в количестве $28,7\% \pm 1,9$ ($p < 0,05$). Через 14 суток цитокин выявлялся в $17,3\% \pm 2,9$ ($p < 0,05$), а через 21 день в $6,1\% \pm 0,03$ ($p < 0,05$) клетках. Спустя 30 суток эта величина составляла $4,1\% \pm 1,03$ клеток при $p < 0,05$. Противоположная картина наблюдалась при исследовании TNF-α в тканях десен после введения АДБ. Наиболее выраженная его экспрессия при тяжелой степени заболевания соответствовала развившейся в очаге поражения стадии макрофагальной инфильтрации и наблюдалась в сроки 2 суток у $12,20\% \pm 0,4$ ($p < 0,05$), 7 суток – $40,11\% \pm 5,01$ ($p < 0,05$), через 14 суток – $31,50\% \pm 2,01$ ($p < 0,05$) клеток. По мере развития стадии фибробластической инфильтрации в пораженных тканях через 21 день

экспрессия TNF-α выявлялась в $22,90\% \pm 2,04$ клетках ($p < 0,05$), а через 30 суток – $5,00\% \pm 0,05$ ($p < 0,05$) (рис. 5). Динамика интенсивности проявленных регенеративных потенциалов совпала с динамикой численности инфильтрирующих макрофагов, выявляемых как в месте введения биоматериала, так и в окружающих тканях.

Через 6 месяцев после введения АДБ в соединительнотканном матриксе оставались большей частью клетки фибробластического ряда. Плотные оформленные пучки коллагеновых волокон содержали умеренное количество основного вещества и при окраске по Ван-Гизон приобретали фуксинофильные свойства, свидетельствующие о полном восстановлении фибриллярной структуры. При исследовании десен после лечения с применением АДБ у больных при пародонтите различной степени тяжести через 8–10 месяцев наблюдалось сохранение структуры, архитектоники и тинкториальных свойств тканей. В тканях отсутствовала воспалительная инфильтрация, выявлялись базофилия базального слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия (при окраске гематоксилином и эозином). Факторы, экстрагируемые из АДБ и освобождающиеся при его деструкции, способствуют полноценному созреванию и активации макрофагов (Муслимов С.А., 2000), а также восстановлению местных ауторегуляторных механизмов. Вероятно, с помощью стимулирующих факторов после резорбции АДБ макрофагами происходит ауторегуляция активности системы мононуклеарных фагоцитов даже на относительно отдаленном расстоянии от места локализации введенного аллогенного биоматериала (Фрейдлин И.С., 1984, 1995).

Таким образом, результаты исследования биопсий, полученных в клинике от пациентов с пародонтитом, подтверждают данные экспериментальных

исследований о том, что в полноценной регенерации тканей, стимулированной аллагенным биоматериалом, главным регулирующим фактором являются макрофаги. В патологически измененных тканях десны после введения АДБ на фоне усиленной миграции макрофагов, их созревания и дифференциации происходит формирование нормального клеточного микроокружения. Выявленные клеточные кооперации способствуют адекватному коллагеногенезу и восстановлению микроциркуляции в соединительнотканной пластинке, регенерации базальной мембраны и эпителиального пласта, то есть восстановлению стромально-клеточных взаимоотношений и восстановлению межтканевых связей (между соединительнотканной пластинкой и эпителием слизистой десны).

Структурно-функциональные изменения звездчатых макрофагов печени при экспериментальной циррозе

Исследования показали, что в цирротически измененной печени кроликов количество активных ЗМФ резко уменьшается, по сравнению с показателями в группе интактных животных. Так если в III группе интактных кроликов оно составляло – $5,82 \pm 0,16$ клеток, то I группе животных через три месяца отравления тетрахлорметаном количество фагоцитирующих макрофагов было $2,34 \pm 0,10$ ($p < 0,001$) клеток на условное поле зрения (рис. 6). После прекращения воздействия на животных тетрахлорметана через 2, 7, 14, 30, 90 и 180 суток количество макрофагов в паренхиме печени кроликов I контрольной груп-

пы составляло соответственно $1,45 \pm 0,13$; $2,1 \pm 0,12$; $2,7 \pm 0,16$; $1,9 \pm 0,09$; $3,1 \pm 0,15$; $2,04 \pm 0,11$ на поле зрения, в то время как в печени интактных кроликов III контрольной группы – от $3,82 \pm 0,14$ до $5,02 \pm 0,14$. Все различия были достоверны при $p < 0,001$ (в сравнении с III контрольной группой).

При токсическом воздействии на живой организм ЗМФ печени, обладая большой фагоцитарной активностью, как клиринговые клетки первыми подвергаются деструктивным изменениям (Cuskey R.S., Cuskey P.A., 1990; Bogers W. et al., 1992; Lovdal T., Berg T., 2001; Nobes M.S. et al., 2002; Naito M. et al., 2004). При электронно-микроскопическом изучении цирротически измененной печени кроликов преобладающее большинство печеночных макрофагов имело морфологические признаки выраженного функционального истощения в виде деструкции внутриклеточных органелл и накопления остаточных телец в темной цитоплазме. ЗМФ были округлой формы, раздутые, часто гипертрофированные, в то время как макрофаги печени кроликов интактной группы имели отростчато-звездчатую несколько вытянутую форму. Цитолемма у патологически измененных клеток сглаживалась, отростки и псевдоподии отсутствовали. В цитоплазме органеллы не определялись, она была перегружена остаточными тельцами, различными вакуолями и уплотнена, выглядела электроноплотной. В некоторых макрофагах в цитоплазме выявлялись пластинчатые структуры – производные разрушенных мембран органелл клетки. В отдельных клетках идентифицировались

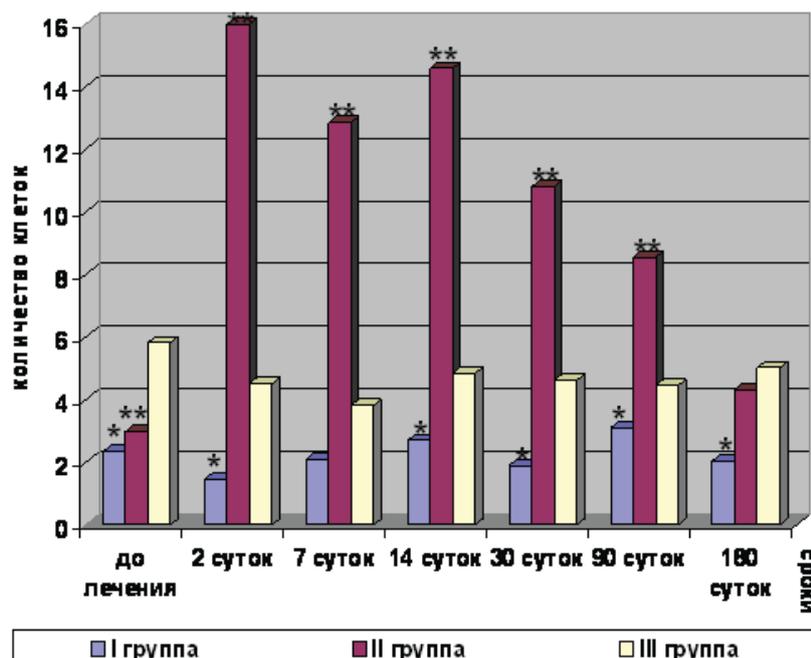


Рис.6. Количество ЗМФ (в поле зрения X100) при циррозе печени и после введения АДБ. *Различия значимы при $p < 0,001$ (в сравнении с III контрольной группой). **Различия значимы при $p < 0,001$ (в сравнении с I контрольной группой)

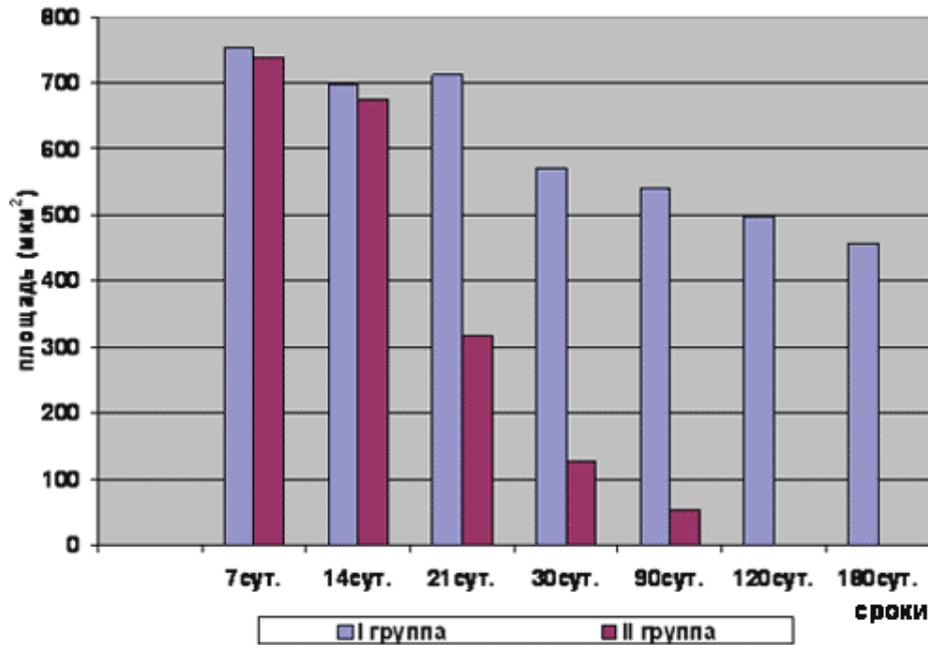


Рис.7. Площадь специфического окрашивания на срезе трансформирующего фактора роста TGF-β1 при экспериментальном циррозе и после введения АДБ

многочисленные липофусциновые гранулы в виде неоднородных по структуре включений. Их содержимое включало липидные капельки и разнообразные частицы и пластинки высокой электронной плотности. Ядра клеток уплотнялись, часто отмечалась фрагментация ядерного хроматина. Вблизи пучков коллагеновых волокон также изредка встречались неактивные формы ЗМФ со светлым ядром и относительно светлой цитоплазмой из-за присутствия в цитоплазме многочисленных светлых вакуолей. Определялись сильно набухшие или вакуолизированные митохондрии, миелиноподобные структуры, различные пузырьки, темные электроплотные округлые включения. Первичные лизосомальные гранулы отсутствовали. Клеточная плазмолемма частично разрушалась. Вероятно, такие клетки были в начальной стадии деструкции. О снижении функциональной активности ЗМФ свидетельствовали и косвенные признаки. Вблизи вышеописанных макрофагов не выявлено признаков выраженного лизиса и резорбции макрофагами коллагеновых пучков соединительной ткани, фибриллы в пучках коллагеновых волокон были четко очерчены, хорошо просматривалась поперечная исчерченность. Другой тип выявляющихся в цирротически измененной печени кроликов ЗМФ по ультраструктурным особенностям можно было охарактеризовать как активно фагоцитирующие макрофаги. Как показали количественные исследования, они встречались очень редко и имели

признаки выраженной функциональной активности, выражающейся в наличии многочисленных извилистых длинных и коротких отростков и присутствия в цитоплазме множества первичных лизосом, фагосом и остаточных телец. Ядра клеток были относительно крупные, вытянутые, с небольшими инвагинациями и с крупными скоплениями гетерохроматина на кариолемме. Иногда в кариоплазме определялось 1-2 небольших ядрышка.

У животных контрольной I группы через 2, 7, 14, 30, 90 и 180 суток после прекращения воздействия тетрахлорметана количество и структура ЗМФ печени не восстанавливались. Ультраструктурные особенности их организации в названные сроки эксперимента ничем не отличались от таковой у кроликов, выведенных из опыта сразу же после прекращения отравления. Большей частью определялись макрофаги с признаками функционального истощения с электроплотными ядрами и осмиофильной цитоплазмой, перегруженной фаголизосомами и остаточными тельцами. На гистологических препаратах они выявлялись в основном по краю толстых цирротических соединительнотканых прослоек в паренхиме печени или же в самой паренхиме.

Иммуногистохимические исследования показали, что индуктор фиброза трансформирующий фактор TGF-β1 определяется на значительной площади срезов цирротически измененной паренхимы печени (рис. 7). Через месяц после прекращения токсического воздействия в печени кроликов

контрольной группы площадь специфического окрашивания TGF- β 1 на препаратах уменьшалась незначительно.

Патоморфологические изменения гепатоцитов и других клеток печени при циррозе

Звездчатые макрофагоциты, секретировав различные ферменты, цитокины и другие вещества, модифицируют функции стромы и паренхимы печени и влияют на повреждение и регенерацию при развитии острых и хронических патологий (Маянский Д.Н., 1984, 1985; Вишневская Е.К., 1996; Ioannidis I., Groot H., 1993; Olynyk J.K. et al., 1994; Wang J.H. et al., 1995; Knolle P.A. et al., 1997; Armbrust T. et al., 2002; Prins H.A. et al., 2005; Xidakis C. et al., 2005; Lalaniel-N. et al., 2005). При исследовании цирротически измененной печени кроликов выявлены выраженные признаки дистрофии гепатоцитов различного характера, их некроза и замещения участков с некротизированными гепатоцитами тяжами соединительной ткани. Фиброзные прослойки различной толщины с более или менее развитой сосудистой сетью и лимфогистиоцитарными инфильтратами прорастали в основном по периферии долек по типу аннулярного цирроза, или же пронизывали паренхиму диффузно от портальных трактов внутрь печеночных долек в различных направлениях. «Ложные» дольки разных размеров состояли из полиморфных гепатоцитов, беспорядочно расположенных, полностью лишенных типичного трабекулярного построения, характерного для нормальной структуры печени. Цитоплазма большинства печеночных клеток была мелко- или крупновокуолизированной, часто с мелкими или крупными жировыми включениями. Гранулы гликогена в цитоплазме гепатоцитов отсутствовали, Шик-реакция была отрицательной. Ядра в клетках были различной величины, с неравномерным содержанием и распределением хроматина, часто в виде диффузного распыления в кариоплазме. Во многих ядрах ядрышки не определялись, или они уменьшались в размерах. В случае диффузного прорастания соединительной ткани в паренхиму гепатоциты также теряли трабекулярность строения. Они были полиморфны, с разной степенью выраженности дистрофических процессов от легкого набухания митохондрий до почти полного опустошения цитоплазмы клеток. Соединительная ткань наиболее интенсивно разрасталась вокруг портальных трактов, которые выделялись венозным полнокровием и холестазом. Наряду с дистрофией, некрозом, фибропластическими процессами

и перестройкой печеночных долек, наблюдались признаки слабовыраженной регенераторной активности гепатоцитов. Она выражалась в гипертрофии гепатоцитов и наличии небольшого количества двуядерных клеток при диффузном прорастании паренхимы соединительной тканью, и единичных регенераторных гепатом – при образовании ложных долек.

Межклеточные пространства гепатоцитов были видоизменены и расширены, в них определялись коллагеновые фибриллы. Видимо как следствие снижения коллагеназной активности функционально истощенных ЗМФ – главных источников коллагеназы в печени (Рывняк В.В. с соавт., 1996; Roykind M., Kerschobich O., 1981; Okazaki I., Maruyama K., 1985), синусоиды и пространства Диссе заполняли коллагеновые фибриллы. В перисинусоидальных пространствах происходило отложение аморфных масс, которые формировали базальную мембрану в синусоидах, а эндотелиальные клетки подвергались деструкции. Среди коллагеновых фибрилл выявлялось большое количество фибробластов и миофибробластов с признаками функциональной активности, макрофагов, активных клеток Ито с большими «таящими» липидными каплями в цитоплазме и расширенными каналами ГЭР, лимфоцитов, плазматических клеток. Уцелевшие эндотелиальные клетки уплотнялись, вакуолизировались и имели вид узких полос, в них невозможно было отдифференцировать органеллы. Ядра дефрагментировались или были однородно осмиофильными, разбухшими. В таких эндотелиоцитах редко выявлялись пиноцитозные пузырьки – показатели трансэндотелиального обмена.

Итогом нарушения баланса между синтезом и распадом коллагена в результате функционального ослабления ЗМФ является формирование толстых соединительнотканых прослоек в паренхиме печени (Okazaki I., Maruyama K., 1985; Herbst H., 1992), которые мы и наблюдали у экспериментальных животных. Грубые тяжи разделяли паренхиму на «ложные» дольки и нарушали нормальную структуру органа. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые также установили, что цирротическая трансформация печени является результатом развития фибропластических процессов, вышедших из под контроля звездчатых макрофагоцитов (ЗМФ) в результате уменьшения их количества и снижения коллагенолитической активности (Маянский Д.Н. с соавт., 1988; Hamazaki K. et al., 1994; Shiratori Y. et al., 1996).

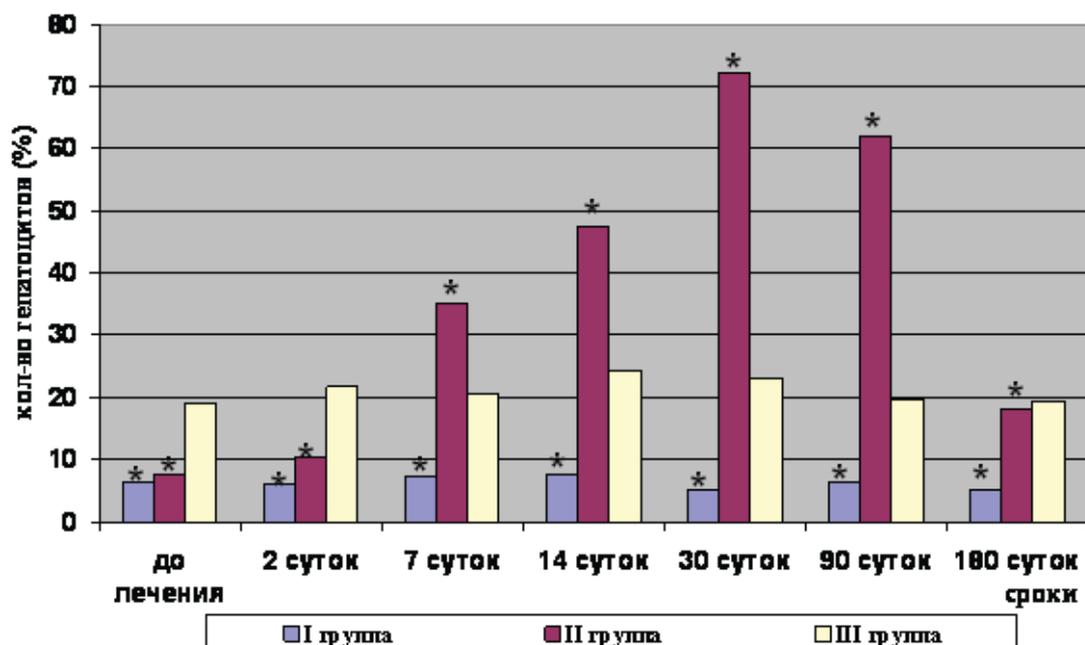


Рис.8. Относительное количество гепатоцитов, экспрессирующих PCNA (%) при циррозе печени и после введения в нее АДБ. * Различия значимы при $p < 0,01$ (в сравнении с III контрольной группой)

Относительное количество двуядерных гепатоцитов значительно уменьшалось как сразу после прекращения интоксикации тетрахлорметаном, так и спустя 2, 7, 14, 30, 90 и 180 суток. Количество их сразу после прекращения интоксикации составляло $5,3 \pm 0,7\%$ (у интактных кроликов III группы – $21,5 \pm 0,3$), через 2 суток после прекращения действия CCl₄ – $7,7 \pm 0,6\%$ (III группа – $20,7 \pm 0,4\%$), через 7 суток – $4,6 \pm 0,5\%$ (III группа – $22,1 \pm 0,3\%$), через 14 суток – $7,3 \pm 0,5\%$ (III группа – $21,7 \pm 0,2\%$), 30 суток – $6,5 \pm 0,5\%$ (III группа – $22,0 \pm 0,7\%$), 90 суток – $4,9 \pm 0,6\%$ (III группа – $21,1 \pm 0,6\%$) и через 180 суток оно составило $8,5 \pm 0,9\%$ (III группа – $23,1 \pm 0,3\%$). Все значения достоверны при $p < 0,001$ (при сравнении с контрольной интактной группой).

Иммуногистохимическое выявление гепатоцитов, экспрессирующих PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) показало, что индекс пролиферации гепатоцитов (ИП) в цирротически измененной печени также резко снижается (рис. 8).

В различные сроки после прекращения интоксикации от 2 суток до 6 месяцев ИП варьировал от 0,05 до 0,06, в то время как ИП гепатоцитов в печени интактных кроликов III группы варьировал от 0,19 до 0,24. Измерение размеров ядер гепатоцитов у кроликов I группы показало, что их средняя площадь сразу после прекращения действия токсического фактора достоверно составляло $113,4 \pm 1,9 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,001$ при сравнении с контрольной интактной группой). В различные сроки после прекращения

интоксикации от 2 суток до 6 месяцев площадь ядер гепатоцитов уменьшалась от $121,6 \pm 1,8 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,001$) до $87,7 \pm 1,3 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,001$), в то время как средняя площадь ядер гепатоцитов в печени интактных кроликов III группы варьировала от $59,9 \pm 1,0 \text{ мкм}^2$ до $63,7 \pm 0,70 \text{ мкм}^2$. Размеры ядер гепатоцитов обусловлены различной степенью их полиплоидизации, т.е. различным содержанием ДНК (Рябинина З.А., Бенюш З.А., 1973). Усиление процессов полиплоидизации в печени при воздействии CCl₄, которое мы наблюдали, достигается путем значительных изменений в соотношении количества гепатоцитов разных классов плоидности (Завадская Е.Э., 1989; Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н., 1996). При этом в печени млекопитающих обычно отмечается падение относительного числа 2с- и (2с x 2)-гепатоцитов и появление высокоплоидных гепатоцитов, не характерных для нормального органа (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981). В нормальной печени взрослых крыс рост и физиологическая регенерация осуществляется в основном за счет пролиферации гепатоцитов, а не за счет их полиплоидизации (Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н., 1996).

Прекращение гепатотоксического воздействия на печень ослабляло некротические и воспалительные процессы в паренхиме, но не приводило к восстановлению ее структуры. Склероз печеночных синусоидов, сопровождающий их капилляризацию при циррозе, полностью нарушая важнейшую клеточную кооперацию между гепатоцитом,

ЗМФ, эндотелиоцитом и другими клетками печени, не может способствовать нормальному гомеостазу в ткани. Поэтому нельзя ожидать, что репаративная регенерация в цирротически измененной печени без восстановления фенотипической популяции макрофагов печени, главных источников коллагеназы и регуляторов клеточного микроокружения, закончится восстановлением структуры органа.

Восстановление популяции звездчатых макрофагов печени при стимуляции аллогенным биоматериалом

Уже через 2 суток после введения АДБ в паренхиму цирротически измененной печени биоматериал активно резорбировался макрофагами. Из ближайших сосудов наблюдался выход моноцитов крови, которые дифференцировались в юные моноцитоподобные макрофаги с первичными лизосомами и большим количеством рибосом и полисом в цитоплазме и активные зрелые макрофаги. Последние во множестве определялись в синусоидах, вдоль коллагеновых волокон соединительнотканых прослоек печени. Это были отростчатые клетки крупных размеров, содержащие в цитоплазме большое количество лизосом и фаголизосом, вакуолей, остаточных телец. Одним из нескольких факторов, предопределяющих ход процессов, возникающих в паренхиме цирротически измененной печени после его введения АДБ, является низкая антигенность биоматериала (Muldashev E.R., 1998). Моноциты, элиминирующиеся из сосудов, не «находя» антигенных детерминант биоматериала, в синусоидах окружающей ткани созревают в фагоцитирующие макрофаги, полноценно выполняющие свои функции (Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1983; van Furth R., 1980). Очевидно, что АДБ, продукты его деструкции и резорбции обладают стимулирующим влиянием на макрофаги. Об этом свидетельствует резкое увеличение количества макрофагов и повышение их функциональной активности, а также прогрессивное усиление инволютивных процессов соединительной ткани в печени после введения биоматериала. Подсчет количества ЗМФ в печени кроликов опытной группы показал резкое повышение их числа уже через 2 суток после введения АДБ в паренхиму ($15,98 \pm 0,18$ при $p < 0,001$) (рис.6). Этот уровень почти не менялся в течение месяца, и снизился вдвое только к 90 суткам ($8,55 \pm 0,17$ при $p < 0,001$), а через 180 суток количество активных макрофагов было примерно одинаковым с таковым показателем животных интактной группы ($4,32 \pm 0,14$ при $p < 0,001$). Обращало на себя

внимание диффузное распределение моноцитов и макрофагов в паренхиме печени, а не скопление в гранулемы. Макрофаги, характеризующиеся значительным полиморфизмом, выявлялись на всех дальнейших этапах исследований. Иногда обнаруживались клетки с большим количеством липидных включений в цитоплазме в виде округлых липидных капель или разнородных включений липофусцина. Встречались юные макрофаги, содержащие в цитоплазме только первичные лизосомы и большое количество полисом и мембраносвязанных рибосом. Ядра у клеток были крупные, округлые, иногда с довольно крупными ядрышками.

Большей частью определялись макрофаги крупных размеров с увеличенным числом и размерами псевдоподий, содержащих в цитоплазме большое количество вторичных лизосом и фаголизосом, множество вакуолей с различным содержимым, остаточные тельца. Ядра их были с крупными ядрышками и глыбками гетерохроматина на внутренней ядерной мембране. Особенности ультраструктуры макрофагов позволяли отнести их к активно фагоцитирующим. О повышении функциональной активности макрофагов свидетельствовали и косвенные признаки. Уже на 7-14 сутки после введения АДБ в паренхиму цирротически измененной печени в соединительнотканых прослойках наблюдались структурные изменения, выражающиеся в дезорганизации внеклеточного матрикса и разрушении фибробластов. Определялось набухание и пикринофилия отдельных волокон соединительной ткани. На ультраструктурном уровне выявлялось изменение строения коллагеновых волокон, потеря ими поперечной исчерченности. Фибриллы были разных диаметров, с размытыми контурами, между ними выявлялся хлопьевидный материал, вероятно, продукты их лизиса. Эти аморфные массы активно резорбировались макрофагами. Деструкция коллагеновых волокон особенно была выражена вблизи макрофагов. Коллагеновые фибриллы в пространстве Диссе также были с размытыми контурами и в виде хлопьевидного материала. В синусоидах определялись вакуолизованные фибробласты с разрушающейся плазматической мембраной.

Через 30 суток после введения АДБ в цирротически измененную печень кроликов электронно-микроскопически продолжали выявляться признаки повышения функциональной активности макрофагов, в том числе – прогрессирующий распад коллагеновых волокон: разрыхление, дезинте-

грация, потеря поперечной исчерченности, снижение контраста, фрагментация и лизис коллагеновых волокон. На гистологических препаратах обнаруживалось выраженное истончение соединительнотканых прослоек между печеночными дольками и вокруг порталных трактов. Количество фибробластов и коллагеновых фибрилл в синусоидах заметно уменьшалось. В эндотелиоцитах, как свидетельство улучшения трансэндотелиального обмена, отмечалось увеличение количества пиноцитозных пузырьков и появление фенестр в отростках. Фиксированные ЗМФ с типичной структурой стали встречаться к 90 суткам, когда в большинстве перисинуидальных пространств Диссе и в синусоидах коллагеновые фибриллы не выявлялись и восстанавливалась структура синусоидных капилляров. Это были выступающие в просвет синусоида удлиненные клетки с крупными ядрами и умеренным количеством псевдоподий. В цитоплазме определялись кольчатые структуры, образованные ГЭР, свободные рибосомы, полисомы, множество пузырьков и везикул, первичных лизосом. Особенности ультраструктуры позволяли отнести их к фиксированным ЗМФ – зрелым макрофагам печени.

Иммуногистохимические исследования показали, что цитокин трансформирующий фактор роста TGF- β 1 уже через 30 дней после введения аллогенного биоматериала в печень экспрессируется лишь на незначительной площади срезов паренхимы печени, а в дальнейшем не определяется вообще (рис. 7).

Регенерация гепатоцитов и восстановление структуры паренхимы печени после стимуляции ЗМФ аллогенным биоматериалом

После введения частиц АДБ в паренхиму цирротически измененной печени кроликов уже через 2 суток наряду с признаками дистрофии клеток и фибропластических процессов наблюдали выраженные признаки регенераторной активности гепатоцитов в виде увеличения количества двуядерных клеток. Проведенные исследования показали, что пролиферативная активность гепатоцитов возрастает прямо пропорционально количеству активных макрофагов. Этот факт свидетельствует в пользу опосредованной стимуляции пролиферации дифференцированных гепатоцитов через активированные макрофаги (Маянский Д.Н., Щербатов В.И., 1980; Маянский Д.Н., 1981; Hamazaki K. et al., 1994; Shiratori Y. et al., 1996; Ogura Y. et al., 2001). Относительное количество двуядерных гепатоцитов в паренхиме цирротически измененной пече-

ни кроликов II группы после введения АДБ имело тенденцию прогрессивного увеличения до 30 суток включительно, оно увеличивалось от $5,30 \pm 0,4\%$ до $63,7 \pm 0,9\%$. К 90 суткам это количество составляло $39,6 \pm 0,7\%$, а через 180 суток несколько уменьшалось – $24,7 \pm 0,3\%$ (значения достоверны при $p < 0,001$ по сравнению с контрольной I группой кроликов). Средняя площадь ядер гепатоцитов до введения биоматериала в печень составляла – $109,6 \pm 1,1 \text{ mkm}^2$, после введения в сроки 2, 7, 14, 30, 90 и 180 суток она составила $107,2 \pm 1,7 \text{ mkm}^2$, $85,6 \pm 0,9 \text{ mkm}^2$, $74,6 \pm 1,0 \text{ mkm}^2$, $66,7 \pm 0,6 \text{ mkm}^2$, $67,5 \pm 0,9 \text{ mkm}^2$, $61,4 \pm 0,5 \text{ mkm}^2$ соответственно (значения достоверны при $p < 0,001$ в сравнении с I контрольной группой), что свидетельствовало об уменьшении количества полиплоидных гепатоцитов. Гепатоциты имели крупные ядра с одним или двумя ядрышками, богатые гранулярным веществом, хроматин концентрировался вдоль ядерной мембраны в виде фестонов. В цитоплазме выявлялись развитые удлиненные цистерны ГЭР и округлые митохондрии, хотя указанная сеть была мелковакуолярно расширена, заполнена содержимым средней электронной плотности и умеренно дегранулирована. Она плотными слоями располагалась вокруг ядра.

Через 7 суток после введения АДБ в печень кроликов об усилении процессов регенерации свидетельствовало увеличение числа гепатоцитов, экспрессирующих PCNA. ИП возрастал до $0,35 \pm 0,04$ (рис.8). Спустя 14 суток среди беспорядочно расположенных гепатоцитов выявлялись зоны с рядами пролиферирующих гепатоцитов, отличающихся малыми размерами и хорошо окрашиваемым ядром и цитоплазмой. Электронно-микроскопические исследования выявили гиперплазию ГЭР и митохондрий в этих клетках. По мере усиления регенерации гепатоцитов исчезали участки жировой дистрофии паренхимы. Приток «зрелой» функционально активной популяции макрофагов создает условия для нормализации стромально-паренхиматозных взаимоотношений в печени (Shiratori Y., 1996; Kim T.H. et al., 1997).

Двуядерные гепатоциты и гепатоциты, ядра которых экспрессировали PCNA обнаруживались преимущественно в печеночных дольках вокруг порталных трактов. PCNA экспрессировали и отдельные клетки эпителия желчных протоков. Через 30 суток после введения АДБ в паренхиму печени у кроликов II группы на гистологических срезах печени частицы биоматериала не обнаруживались. В этот срок определялась наибольшая

пролиферативная активность гепатоцитов – ИП составил $0,72 \pm 0,03$. При заметном истончении фиброзных прослоек между печеночными дольками и вокруг портальных трактов уже прослеживалась тенденция восстановления структуры паренхимы печени с образованием балок, хотя полиморфизм гепатоцитов в некоторых участках еще сохранялся, а общая структура паренхимы имела признаки атипичности, дольки были неодинаковых размеров с одной или двумя эксцентрично расположенными центральными венами.

В течение последующих 90 суток после введения АДБ в печень кроликов на гистологических препаратах печени продолжали выявляться признаки регенерации гепатоцитов и восстановления структуры паренхимы. Соединительнотканые прослойки между дольками почти полностью исчезали, а те, которые еще сохранялись, были сильно истончены, что едва определялись. Отличительной особенностью этого периода являлась регенерационная гиперплазия печеночных клеток: интенсивно размножающиеся гепатоциты теснили друг друга от портальных трактов в сторону центральных вен, где они подвергались дегенерации. Вокруг портального тракта выявлялись клетки с плотной, зернистой, интенсивно окрашивающейся цитоплазмой. В направлении к периферии зернистость цитоплазмы уменьшалась, клетки становились светлыми и безъядерными. Вокруг центральных вен располагались зоны, содержащие светлые гепатоциты с признаками деструкции и фигурами апоптоза, которые были представлены резко очерченными уплотнениями ядерного хроматина, прижатыми к внутренней ядерной мембране. Ядро распадалось на дискретные фрагменты, а цитоплазматические протуберанцы разделялись плазматической мембраной. Окруженные мембраной апоптозные тельца были различного размера, плотно упакованные органеллы в них выглядели интактными. При применении антитела FAS-L, связывание которого с рецепторными молекулами FAS вызывает агрегацию последних, впоследствии приводящих к апоптозу – программированной клеточной смерти (Ройт А. с соавт., 2000), экспрессия определялась также в зоне, окружающей центральные вены. Иммуногистохимические исследования при изучении экспрессии гепатоцитами PCNA подтвердили, что при стимуляции ЗМФ аллогенным биоматериалом после истончения цирротических соединительнотканых прослоек в паренхиме печени процесс пролиферации гепатоцитов происходит за счет дифференцированных клеток вокруг портальных трактов.

Аналогичный процесс зафиксирован исследователями в нормальной печени при росте паренхимы, когда рост паренхимы происходит за счет деления дифференцированных гепатоцитов вокруг портальных трактов (Романов Ю.А., Савченко Т.В., 1986; Geisler A. et al., 1994; Volk A., Michalopoulos G., 1995), а вокруг центральных вен гепатоциты подвергаются процессу апоптоза, который является интегральной частью цикла клеточного обновления и участвует в поддержании стационарного состояния тканей (Kerr J.F. R. et al., 1972; Bursch W.C. et al., 1990). Такой тип клеточной гибели является физиологическим процессом и происходит постоянно при нормальной регуляции жизнедеятельности клеток и тканей. К 90 суткам после введения в печень АДБ нормализовались межклеточные контакты гепатоцитов и структура желчных капилляров. На васкулярном полюсе микроворсинки гепатоцитов тесно контактировали с перисинусоидальной поверхностью эндотелиоцитов. В цитоплазме эндотелиоцитов выявлялись пиноцитозные везикулы разных размеров, митохондрии, рибосомы. В длинных отростках клеток определялись многочисленные фенестры. В отдаленные сроки (180 суток) вокруг портальных трактов и центральных вен обнаруживались полностью сформированные печеночные балки с типичной структурой составляющих их гепатоцитов. Определялись четко выраженные синусоиды с синусоидными клетками. Местами сохранялись морфологические признаки некоторой атипичности паренхимы, проявляющиеся в эксцентричном расположении центральных вен или их присутствия в дольке в количестве двух. Однако цирротические ложные дольки полностью исчезали, также как и соединительнотканые прослойки, замещающие погибшие гепатоциты. Ультраструктура клеток цирротически измененной печени кроликов не отличалась от структуры клеток печени интактных кроликов.

Регенерация цирротически измененной печени человека после стимуляции диспергированным биоматериалом Аллоплант

Результаты гистологического исследования биопсии пациента с циррозом печени подтверждают данные о стимулирующем влиянии аллогенного биоматериала на макрофаги печени. Так, у больного С. через 1,5 года после введения в печень стимулятора регенерации (аллогенный диспергированный биоматериал), хотя и патогистологический диагноз «макронодулярный цирроз печени» не был полностью снят, были обнаружены регенераторные признаки в виде множественных очагов регенерации

с 2-х ядерными клетками и с характерными для пролиферирующих мелких гепатоцитов светлыми округлыми ядрами с 1-2 ядрышками. Ядра пролиферирующих гепатоцитов экспрессировали PCNA. В расширенных синусоидах выявлялись звездчатые ретикулоэндотелиоциты в виде крупных амeboобразной формы клеток с эозинофильной или светлой цитоплазмой и крупными бобовидными или веретенообразными базофильными ядрами. Крупные размеры клеток и распластывание многочисленными отростками почти по всей ширине синусоида указывали на их повышенную функциональную активность. В отдельных участках мелкие гепатоциты с равномерно интенсивно окрашенной розовой цитоплазмой уже составляли типичные для нормы балочные структуры. Относительное большое количество ядер гепатоцитов экспрессировало PCNA. Выявленная морфологическая картина свидетельствовала об активации звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и стимуляции регенераторного процесса гепатоцитов.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что введение диспергированного аллогенного биоматериала в цирротически измененную печень способствует восстановлению главного звена в нарушенной цепочке механизма ауторегуляции тканевого гомеостаза печени – фенотипа и количества звездчатых макрофагоцитов за счет привлечения предшественников – моноцитов крови, их созревания и выраженной стимуляции. Поэтому процесс регенерации гепатоцитов (в виде их пролиферации) приобретает физиологические очертания в отличие от других методов стимуляции регенерации, когда репаративные процессы осуществляются за счет гипертрофии клеток и органа, приводящих к быстрому, но временному улучшению функциональных показателей, но не восстановлению строения паренхимы (Солопаев Б.П. с соавт., 1985; Ахунджанов Б.А., 1991; Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н., 2005; Hwang T.L. et al., 1995; Hashimoto M., Watanabe G., 1999; Ogura Y., 2001), или полиплоидизации гепатоцитов, которая ускоряет «старение» тканей (Заварзин А. А., 1967). Приток «зрелой» функционально активной популяции макрофагов создает условия для нормализации стромально-паренхиматозных взаимоотношений в печени. Одновременно протекающие в паренхиме печени процессы усиленной резорбции соединительной ткани макрофагами и регенерации гепатоцитов в конечном итоге приводят к восстановлению структуры органа. Вероятно, неспецифическая

стимуляция макрофагов аллогенным биоматериалом запускает ауторегуляцию системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), которая была нарушена в цирротически измененной печени вследствие уменьшения численности ЗМФ и ослабления их активности. Результатом стимулирующего действия на СМФ является возобновление фенотипической популяции ЗМФ, главных регуляторов тканевого гомеостаза в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При регенерации тканей, индуцированной биоматериалами, в межклеточных и стромально-клеточных взаимодействиях основную регулирующую роль играют макрофаги. Характер течения воспалительного процесса и последующих за ним процессов регенерации или дисрегенерации в соединительной ткани (в зависимости от вида имплантированного биоматериала) определяет разная выраженность макрофагальной стадии, отличающаяся количественным и качественным составом макрофагов и их активностью. Имплантация аллогенного биоматериала вызывает активацию только первичного звена иммунитета – макрофагов. При этом создаются условия для полного созревания разных субпопуляций макрофагов, в том числе и «матриксформирующих», отличающихся выраженной секреторной активностью и экзоцитозом. Являясь главным фактором, влияющим на процессы синтеза коллагена фибробластами и структурного оформления регенерата, макрофаги в условиях полноценного микроокружения (продукты дегградации биоматериала – коллаген, протеогликаны, гликопротеины, гликозаминогликаны и отсутствие лимфоцитов в инфильтрате) с помощью цитокинов оказывают регуляторное влияние на дифференциацию и функциональную активность других клеточных популяций, препятствуя фиброзу и способствуя формированию структурно адекватного регенерата. Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу о существовании двухкомпонентного механизма формирования новообразованной соединительной ткани на месте имплантации биоматериала Аллоплант. Согласно ей коллагеновые фибриллы синтезируются фибробластами, а гликозаминогликановый или протеогликановый компонент – «матриксформирующими» макрофагами. При применении нерезорбирующегося ксеногенного биоматериала в отсутствие «матрик-

сформирующих» макрофагов привлеченные в очаг имплантации мезенхимальные клетки дифференцируются в миофибробласты, в избыточном количестве синтезирующие коллаген характерный для рубца, а также способствующие его контракции.

Неспецифическая активация макрофагов аллогенным биоматериалом мобилизует специализированные и прогениторные клетки. Восстановление характерных для нормального тканевого гомеостаза клеточных коопераций, управляемых макрофагами, способствует восстановлению не только стромально-клеточных, но и межтканевых связей (взаимоотношения между соединительнотканной пластинкой и эпителием слизистой, стромально-паренхиматозные взаимоотношения в паренхиматозных органах). Вероятно, различные факторы, выделяющиеся при стимуляции макрофагов, воздействуют на региональные и кроветворные стволовые клетки и стимулируют частичную рекапитуляцию эмбриогенеза. Регенерирующие клетки реципиента восстанавливают нарушенный молекулярный и клеточный гомеостаз, приводящий к возобновлению тканей, структура которых очень близка к таковой тканей реципиента.

Таким образом, фенотипическое созревание и неспецифическая активация макрофагов при использовании аллогенных биоматериалов способствуют восстановлению нарушенных при патологии клеточных механизмов управления регенерацией тканей, ведущих к их полноценной репарации, протекающей на основе закономерностей физиологической регенерации и постнатального гистогенеза.

ВЫВОДЫ

Стимуляция регенерации тканей аллогенными биоматериалами обеспечивает фенотипическое созревание макрофагов и оптимизацию их регуляторного влияния на дифференциацию и функцио-

нальную активность других клеточных популяций, что способствует формированию структурно адекватного регенерата.

Повышенная экспрессия макрофагами фактора некроза опухолей-альфа при низком уровне экспрессии трансформирующего фактора роста-бета1 в соединительной ткани в зоне введения аллогенного биоматериала способствует дифференциации фибробластов с умеренной продукцией коллагена.

При введении ксеногенного биоматериала не происходит его резорбции; макрофаги трансформируются в эпителиоидные клетки и гигантские клетки инородных тел, что приводит к хронизации процесса воспаления и формированию грубоволокнистой соединительной ткани, отграничивающей зону имплантации.

Выраженная экспрессия трансформирующего фактора роста-бета1 и низкий уровень экспрессии фактора некроза опухолей-альфа в соединительной ткани при имплантации ксеногенного биоматериала приводит к дифференциации миофибробластов и фибробластов с избыточной продукцией коллагена и фиброзу.

Одним из основных факторов полноценной регенерации соединительной ткани, стимулированной аллогенным биоматериалом, является созревание «матриксформирующих» макрофагов с выраженной секреторной активностью, связанной с экзоцитозом гликозамингликанового компонента новообразованной соединительной ткани.

Регенерация соединительной ткани, инициированная стимуляцией макрофагов аллогенным биоматериалом, сопровождается повышенным содержанием в регенерате гиалуроновой кислоты, что обеспечивает полноценное восстановление структуры ткани.

Возобновление популяции звездчатых макрофагоцитов в цирротически измененной печени после введения в нее аллогенного диспергированного биоматериала способствует инволюции соединительной ткани и регенерации гепатоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нигматуллин Р.Т., Мулдашев Э.Р., Захваткина К.А., Мусина Л.А. Структурные и гистохимические преобразования аллотрансплантатов, применяемых в офтальмохирургии // В сб. «Актуальные проблемы физиологии, биохимии и фармакологии функциональных систем». – Уфа, 1985. – С.139-141.
2. Муслимов С.А., Захваткина К.А., Мусина Л.А. Стимуляция регенерации печени с помощью аллогенных биоматериалов. Мат. Межд. конф. «Структурные преобразования органов и тканей на этапах онтогенеза в норме и при воздействии антропогенных факторов. Проблемы экологии в медицине», – Астрахань, 1996. – С.130.
3. Мулдашев Э.Р., Родионов О.В., Мусина Л.А., Галимова В.У., Султанов Р.З., Муслимов С.А. Морфологическая оцен-

- ка операции ревазуляризации хориоидеи на модели экспериментального гемофтальма. Матер. Всерос. научно-практ. конф. «Ерошевские чтения». – Самара, 1997. – С.227-230.
4. Мусина Л.А. Восстановление ультраструктуры цирротически измененной печени при введении биоматериала Аллоплант. Сб. науч. тр. «Фундаментальные и прикладные аспекты современной морфологии». – Санкт-Петербург, 1997. – Т.2. – С.4-6.
 5. Муслимов С.А., Мулдашев Э.Р., Галимова В.У., Мусина Л.А., Мустафин М.М., Родионов О.В. Ультраструктурные изменения в сетчатке глаза при экспериментальном гемофтальме и его хирургической коррекции. Сб. науч. тр. «Фундаментальные и прикладные аспекты современной морфологии». Санкт-Петербург, 1997. – Т.2. – С.6-8.
 6. Мусина Л.А., Мингазов Р.С., Муслимов С.А., Захваткина К.А.. Морфологические изменения в цирротически измененной печени при введении диспергированного биоматериала Аллоплант. Мат. Всерос. науч. конф. «Закономерности морфогенеза и регуляция тканевых процессов в нормальных, экспериментальных и патологических условиях». – Тюмень, 1998. – С.78.
 7. Мусина Л.А., Мингазов Р.С., Муслимов С.А., Захваткина К.А.. Морфологическая оценка коррекции цирроза печени с применением биоматериала Аллоплант // Морфология. – 1998. – Т.113, N3. – С.83.
 8. Киреев В.Л., Мусина Л.А., Муслимов С.А., Шумкин А.М. Аллогенный резорбируемый внеклеточный матрикс: влияние на активность гепатоцитов и звездчатых ретикулоэндотелиоцитов печени. Материалы Респ. научно-практ. конф. «Актуальные проблемы хирургии и морфологии». – Уфа, 1998. – С.132-134.
 9. Muldashev E.R., Sibiryak S.V., Muslimov S.A., Kurchatova N.N., Musina L.A., Khasanov R.A., Kireev V.L.. Pulverulent Alloplant as a new bioimmunomodulator. Archives of Pharmacology. 125th. Anniversary. Supplement 2 to XIIIth International Congress of Pharmacology. – Munchen, Germany, 1998. – V.358, N1. – P.729.
 10. Муслимов С.А., Надольская С.Н., Мусина Л.А., Киреев В.Л. Функциональная морфология стромальных меланоцитов радужки глаза // Российские морфологические ведомости. – 1999, № 1-2, – С.104-105.
 11. Muldashev E. R., Muslimov S. A., Nigmatullin R. T., Kiiko Y. I., Galimova V. U., Salikhov A. Y., Selsky N. E., Bulatov R. T., Musina L. A. Basic research conducted on Alloplant biomaterials // European Journal of Ophthalmology. 1999. – Vol. 9, № 1. – P.8-13.
 12. Муслимов С.А., Мусина Л.А. Внутриклеточная регенерация нейронов сетчатки и пигментного эпителия при использовании биоматериалов Аллоплант в ревазуляризирующих операциях // Матер. VII съезда офтальмологов России. Часть 1. Москва, 2000. – С.466.
 13. Мустафин А.Х., Мусина Л.А., Чингизова Г.Н. Стимуляция регенераторных процессов в печени при ее резекции в эксперименте // Здравоохранение Башкортостана, 2000. – №1–2. – С.45–50.
 14. Мулдашев Э.Р., Муслимов С.А., Нигматуллин Р.Т., Мусина Л.А. Биологические основы применения биоматериалов Аллоплант в офтальмологии // Мат. научно-практ. конф.- Абакан, 2000. – С.105-110.
 15. Муслимов С.А., Мусина Л.А. Восстановление ультраструктуры нейронов сетчатки глаза при применении диспергированного биоматериала Аллоплант // Мат. III межд. симп. «Современные проблемы нейробиологии. Исследования висцеральных систем и их регуляции в возрастном аспекте». – Саранск, 2001. – С.115-116.
 16. Мусина Л.А., Мингазов Р.С., Аристова А.И. Роль звездчатых ретикулоэндотелиоцитов в патогенезе цирроза печени и ее регенерации, стимулированной введением биоматериала Аллоплант // Мат. 5 межрег. научно-практ. конф. патологоанатомов Урала и Западной Сибири «Актуальные вопросы патологической анатомии» – Челябинск.- 2001.- С. 104-106.
 17. Хунафин С.Н., Кулавский В.А., Мусина Л.А. Профилактика брюшных спаек // Здравоохранение Башкортостана, 2001. – Т.6, № 1. – С.49-52.
 18. Галимова В.У., Мусина Л.А. Трансплантация аллогенных биоматериалов в эксперименте при фотодегенерации // Сб. науч.тр. «Офтальмология на рубеже». – Санкт-Петербург, 2001. – С. 303-304.
 19. Галимов И.И., Мусина Л.А. Возможности профилактики печеночной недостаточности при резекции печени // Вятский рад.вестник, 2002. – №1. – С.25-26.
 20. Салихов А.Ю., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Динамика морфологических изменений биоматериала Аллоплант после хирургического лечения рака век // Морфология, 2002. – № 2-3. – С.138.
 21. Muslimov S.A., Muldashev E.R., Musina L.A., Khasanov R.A.. The morphological basis of the dispersed alloplant biomaterial application in the hepatic cirrhosis treatment // 11th International Conference on Tissue Banking and EATB Annual Meeting «Past, Present and Future of Tissue Banking». – SUZA, Bratislava, Slovak Republic, 2002. – P.78.
 22. Аристова А. И., Мусина Л.А., Булгакова А. И., Гизатуллина Э.Р. Регенерация тканей десны при коррекции пародонтита биоматериалом «Аллоплант» // Электронный журнал «Регенеративная хирургия». www.Alloplant.ru.- Уфа.- 2002.
 23. Нартайлаков М.А., Мулдашев Э.Р., Мингазов Р.С., Муслимов С.А., Сафин И.А., Мусина Л.А., Ахиярова Г.Р. Регенеративная хирургия при хронических активных гепатитах и циррозах печени // Мат. Всерос. конфер. Хирургов – Тюмень, 2003. – С.196-198.
 24. Нартайлаков М.А., Мулдашев Э.Р., Мингазов Р.С., Нигматуллин Р.Т., Муслимов С.А., Мустафин А.Х., Соколов В.П., Мусина Л.А. Достижения и перспективы хирургии печени и желчных путей // Вестник Академии наук РБ. – Уфа, 2003. – Т.8, № 3. – С.38-45.
 25. Аристова А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Морфофункциональные изменения макрофагов в условиях применения диспергированного биоматериала Аллоплант и ксеногенного биоматериала в эксперименте у крыс // Сб. науч. тр. «Актуальные проблемы морфологии». / Под редакцией проф. Н.С.Горбунова. – Красноярск, 2003.- С. 12-13.

26. Муслимов С. А., Мусина Л.А., Аристов А.И. Ультраструктурные особенности субпопуляции макрофагов, выявленных при имплантации биоматериала «Аллоплант». Мат. док. Всерос. науч. конф. «Реактивность и пластичность гистологических структур в нормальных, экспериментальных и патологических условиях» // Морфология. – Оренбург, 2003. – №5. – С.64.
27. Мусина Л.А., Султанов Р.З., Мулдашева И.Э., Нураева А.Б., Салихов Э.А. Морфологическая характеристика и особенности замещения биоматериалов «Аллоплант» при пластике посттравматических дефектов орбиты // Мат. XIV Российской научно-практ. конф. «Новые технологии микрохирургии глаза». – Оренбург, 2003. – С.176-179.
28. Muslimov S.A., Muldashev E.R., Nigmatullin R.T., Musina L.A. Alloplant: Principles of allogenic tissue selection, treatment and surgery application // Abstracts 12th international congress of the European association of tissue banking. – Brugge, Belgium. – 2003. – P.78.
29. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Динамика экспрессии цитокинов TGFβ1 и TNF-α после введения алло- и ксеногенного биоматериалов // Морфология. – 2004. – Т.126. – № 4. – С.70.
30. Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Зыков О.В. Роль макрофагов в регенерации соединительной ткани при имплантации биоматериалов // «Актуальные вопросы патологии». – Здравоохранение Башкортостана. – 2004. – № 4. – С.146-149.
31. Биоматериалы Аллоплант для регенеративной хирургии // Методические рекомендации. – Москва – Уфа. – 2004. 40 с.
32. Янгиров И.В., Мингазов Р.С., Мусина Л.А. Стимуляция регенерации печени при ее диффузных заболеваниях // Сб. мат. Республиканской научн. конф. «Вопросы теоретической и практической медицины». – Уфа. – 2005. – С.136.
33. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Musina L.A., Nigmatullin R.T., Lebedeva A.I., Shangina O.R., Khasanov R.A. et al. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials // Cell Tissue Bank. – 2005. – Vol.6, N2. P.99-107.
34. Musina L., Muslimov S., Lebedeva A. Ultrastructure of the macrophages revealed in Alloplant biomaterial implantation // Abstracts 4-th Asian-Pacific International Congress of Anatomists. – Kusadasi, Turkey, 2005. – P.215.
35. Шангина О.Р., Мусина Л.А. Экспериментальная пересадка радиационно стерилизованных биоматериалов // Сб. науч. тр.: «Биомедицинские технологии. Репродукция тканей и биопротезирование». – М., 2006. – Вып. 24. – С. 111-115.
36. Мусина Л. А., Муслимов С. А., Лебедева А. И., Волгарева Е. А. Ультраструктура макрофагов, выявляемых при имплантации аллогенного биоматериала Аллоплант // Морфология. – 2006. – №1. С.53-56.
37. Мусина Л.А. Роль звездчатых макрофагоцитов в регенерации цирротически измененной печени при стимуляции аллогенным биоматериалом // Технологии живых систем. – М: «Радиотехника». – 2006. – Т.3, №2. – С. 64-70.
38. Мусина Л.А. Дифференциация стволовых мезенхимальных клеток при подкожной имплантации различных биоматериалов // Морфологические ведомости. – 2006. – № 1-2. – С.113-116.
39. Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Хасанов Р.А. Идентификация гликозамингликанов в соединительной ткани при имплантации различных биоматериалов // Морфологические ведомости. – 2006. – №1-2, приложение № 1. – С.194-196.
40. Муслимова С.Ю., Мусина Л.А., Волгарева Е.А. Динамика морфологических изменений в яичнике при имплантации биоматериала Аллоплант® (экспериментальное исследование) // Морфологические ведомости. – 2006. – №1-2, приложение № 1. – С.196-197.
41. Нартайлаков М.А., Мингазов Р.С., Янгиров И.В., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Батанов А.Н. Влияние фетальных тканей печени и биоматериала Аллоплант на регенеративные процессы при экспериментальном циррозе печени // Морфологические ведомости. – 2006. – №1-2, приложение № 1. – С.208-213.
42. Мусина Л.А., Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гизатуллина Э.Р. Морфофункциональные изменения макрофагов при пародонтите и его коррекции аллогенным биоматериалом // Морфология. – 2006. – Т.129, № 4. – С.88.
43. Мусина Л.А., Лебедева А.И., Муслимов С.А. Влияние имплантированных алло- и ксеногенных биоматериалов на клетки Лангерганса кожи // Морфология. – 2006. – Т.129. – № 4. – С.88.
44. Муслимова С.Ю., Мусина Л.А. Регенерация стромы яичника при имплантации биоматериала Аллоплант (экспериментальное исследование) // Морфология. – 2006. – Т.129, № 4. – С.88.
45. Мусина Л.А. Морфо-функциональные аспекты регуляции регенерации тканей при применении биоматериалов Аллоплант // Морфологические ведомости. Приложение к журналу ВНОАГЭ. Ежегодник Российской ассоциации клинических анатомов. «Клиническая анатомия и экспериментальная хирургия». – Оренбург, 2006. – Вып.6. – С.86-91.
46. Мусина Л.А., Шангина О.Р., Мулдашева И.Э., Султанов Р.З. Структурные преобразования аллотрансплантатов при пластике посттравматических дефектов орбиты. Вестник ОГУ. – Оренбург, 2006. – №11. – С.222-223.

ИЗОБРЕТЕНИЯ, ПАТЕНТЫ

1. Мулдашев Э.Р., Сельский Н.Е., Булатов Р.Т., Салихов А.Ю., Малоярославцев В.Д., Мусина Л.А. Авторское свидетельство № 1568303 на изобретение «Аллотрансплантат для опорно-контурной пластики».
2. Мулдашев Э.Р., Муслимов С.А., Галимова В.У., Нигматуллин Р.Т., Шангина О.Р., Мусина Л.А. и др. Патент «Биоматериалы Аллоплант для регенерационной хирургии» № 2189257 от 20 сентября 2002 г.