

АВТОФАГІЯ У ДИНАМІЦІ КЛІТИННОЇ СМЕРТІ В ТИМУСІ ПРИ ОПІКОВІЙ ХВОРОБИ ТА ЇЇ ЛІКУВАННІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

В.М.Благодаров, Е.В.Черкасов, ¹О.В.Благодарова

Кафедри патоморфології (зав. – проф. В.М.Благодаров) Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця, ¹анатомії, фізіології та шкільної гігієни (зав. – проф. О.І.Плиська) Національного педагогічного університету ім. М.П.Драгоманова, м. Київ

Резюме. Наведені дані про динаміку різноманітних типів клітинної смерті (апоптоз, некроз, мітотична катастрофа, автофагія, зроговіння) у тимусі шурів при опіковій хворобі та її лікуванні. Одержані результати вказують на те, що автофагія інгібує такі типи клітинної загибелі в тимусі, як апоптоз та некроз. Проте вона також може бути складовою каскаду подій, що призводять до клітинної смерті.

Ключові слова: опікова хвороба, тимус, автофагія, світлова та електронна мікроскопія.

Загально визнано [1], що в основі патогенезу опікової хвороби (ОХ) лежить генералізована катаболічна реакція в осередку травми та всіх внутрішніх органах. Доведено, що наслідком подібних катаболічних реакцій є клітинна смерть, серед 11 типів якої чільне місце посідає автофагія, яку визнано особливим типом запрограмованої смерті клітини [2]. Актуальність даного дослідження зумовлена тим, що й досі вивчення динаміки різних типів клітинної загибелі при ОХ не було предметом спеціальних досліджень.

Мета дослідження: вивчити морфологічні прояви автофагії у динаміці різних типів клітинної смерті в тимусі при експериментальній ОХ.

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження морфологічних змін у тимусі при ОХ (гострий період через 1, 3 та 7 діб) та за умов дії інфузійних колоїдно-гіперосмолярних препаратів НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом (ЛПС) виконано на 63 щурах-самцях лінії Вістар масою 155-160 г. Розчин НАЕС-LX-5% містить гідроксіетилкромаль з ММ 130000 Дальтон, ксилітол, натрію лактат, солі: натрію хлорид, калію хлорид, кальцію хлорид та магнію хлорид. Теоретична осмолярність препарату – 890 мОсм/л. ЛПС – це інфузійний препарат, який містить альбумін (5%), сорбітол (6%), натрію лактат (2,1%), а також електроліти в збалансованих кількостях. Теоретична осмолярність препарату – 1020 мОсм/л.

Утримання та маніпуляції з тваринами проводили відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Київ,

2001), рекомендацій "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985) і "Правил доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)". Тварини розділені на 7 груп: I – інтактні тварини, II, III, IV – щури без термічної травми, яким проводили окрему інфузію 0,9% розчину NaCl, НАЕС-LX-5% та ЛПС відповідно у дозі 10 мл/кг; V, VI, VII – тварини з опіком, яким за аналогічною схемою і в такому ж дозовому режимі проводили окреме введення досліджуваних речовин.

Опік (після відповідної премедикації) викликали шляхом прикладання до бічних поверхонь тулуба тварин чотирьох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом 6 хв у воді з постійною температурою 100°C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси становила 21-23% при експозиції 10 с, що є достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку (колишній IIIA ступінь) та розвитку шокового стану середнього ступеня тяжкості.

Досліджувані розчини вводили внутрішньовенно протягом 5-6 хв у дозі 10 мл/кг. Інфузію проводили в нижню порожнисту вену, для чого виконували її катетеризацію в асептичних умовах через стегнову вену. Катетер, установлений у стегновій вені, підшивали під шкіру. Його просвіт по всій довжині заповнювали титрованим розчином гепарину (0,1 мл гепарину на 10 мл 0,9% розчину NaCl) після кожного введення

ня речовин. Перше введення розчинів здійснювали через годину після моделювання патологічного стану, наступні інфузії – 1 раз на добу.

Забір матеріалу проводили під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин грудної порожнини і вирізали за допомогою леза маленькі шматочки тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою. Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі "LKB", вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи фарбували толуїдиновим синім, вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Олутрис Vx15.

Експеримент проведений на базі Науково-дослідного центру (дир. – проф. І.В.Гунас) ВНМУ ім. М.І.Пирогова. Електронно-мікроскопічне дослідження виконано на базі відділу електронної мікроскопії (наук. кер. – проф. Л.О.Стеченко) Інституту проблем патології НМУ ім. О.О.Богомольця.

Результати дослідження та їх аналіз. Установлено, що на етапах розвитку ОХ частина клітин тимуса гине шляхом апоптозу, некрозу, автофагії, зроговіння та мітотичної катастрофи. Введення НАЕС-LX-5% і ЛПС гальмує структурні прояви клітинної загибелі та сприяє ефективній репродукції тимоцитів (зокрема, шляхом запобігання розвитку мітотичної катастрофи). У порівнянні з нормою тимоцити (лімфоцити тимуса або Т-лімфоцити), що перебувають у стані мітозу (у пізній профазі, метафазі та анафазі, коли ядерце та каріолема зникають, а каріоплазма "змішується" з цитоплазмою) за умов розвитку ОХ вирізняються характерними морфологічними ознаками: 1) реактивними та деструктивними змінами органел (у першу чергу мітохондрій); 2) мозаїчним підвищенням електронної щільності та нерівномірним розподілом ядерного матеріалу в цитоплазмі. При ОХ мітохондрії вирізняються різним ступенем пошкодження матриксу, крист, внутрішньої мембрани (до перетворення цієї органели у вакуоль). Іноді високий ступінь вакуолізації цитоплазми мітотичних тимоцитів супроводжується появою дефектів зовнішньої мембрани вакуольно трансформованих мітохондрій, ділянковим пошкодженням цілісності цитолемі, різким зниженням електронної щільності цитоплазматичного матриксу (набряк), що є проявами некрозу, який завершується повною руйнацією (лізисом) клітини. Наслідком вищеописаних структурних змін

мітотичних клітин є те, що в телофазі навколо нерівномірно розподілених у цитоплазмі конденсованих хромосом поновлюється каріолема і відбуваються типові для мітотичної катастрофи морфологічні зміни, що включають мікронуклеацію (тобто формування мікроядер) і мультинуклеацію, тобто утворення множинних ядер (двох чи більше, однакового чи різного розміру). Зазначений дефект реконструкції ядер не завершується перешнуровкою цитоплазми (цитотомією) і утворенням дочірних клітин. У результаті цього характерною для тимуса тварин з ОХ є поява багатоядерних (здебільшого дво-ядерних) тимоцитів і тимоцитів з мікроядрами.

Тимоцити з мультинуклеацією в подальшому гинуть шляхом некрозу або апоптозу, що деякі дослідники [3] називають "клітинною смертю з попередньою мультинуклеацією". Особливості апоптозних змін у клітинах з мультинуклеацією полягають у тому, що суперконденсація ядерного матеріалу відбувається в першу чергу саме в мікроядрі, яке потім разом з прилеглою ділянкою цитоплазми відшнуровується, що призводить до утворення апоптозного тіла. Останнє має цілісну цитолему і каріолему. При цьому "материнський" тимоцит позбавляється мікроядра і одночасно зберігає неушкоджене друге ядро та прилеглу ділянку цитоплазми (парціальний характер апоптозу). Якщо апоптозу підлягає багатоядерний тимоцит з приблизно однаковими за розмірами ядрами, апоптозні (конденсація цитоплазми та каріоплазми) або некротичні зміни мають рівномірний характер (тотальний апоптоз або некроз). Введення при ОХ колоїдно-гіперосмолярних розчинів гальмує апоптоз і некроз звичайних одноядерних тимоцитів та зберігає від загибелі багатоядерні тимоцити з приблизно однаковими за розміром ядрами.

При ОХ епітеліоретикулоцити тимуса гинуть переважно шляхом апоптозу, некрозу та автофагії. Характерною особливістю епітеліоретикулоцитів мозкової речовини тимуса при ОХ є те, що вони гинуть шляхом зроговіння. В результаті нашарування апоптозно змінених епітеліоретикулоцитів мозкової речовини утворюються структури, що нагадують "перлини зроговіння". В центрі (ядрі) цих структур виявляються апоптозно та некротично змінені тимоцити, некротично змінені епітеліоретикулоцити та макрофаги. Є всі підстави вважати, що саме таким чином формуються і поступово збільшуються за розмірами тимічні тільця (тільця

Гассалія), ядро яких найчастіше утворене клітинним детритом, пронизаним залишками кера-
тинізованих епітеліоретикулоцитів, зокрема їх
зміненими тонофіламенатами.

Частина епітеліоретикулоцитів тимуса при
ОХ (навіть за умов здійсненого лікування) під-
лягає автофагії. Цей тип клітинної смерті відбу-
вається за відсутності конденсації хроматину,
але супроводжується масованою автофагійною
вакуолізацією цитоплазми (рис. 1-3). На проти-
вагу апоптозу і некрозу клітини, що гинуть з
морфологічними ознаками автофагії, не асо-
ційовані з макрофагами. Автофагія характери-
зується секвестрацією цитоплазматичного ма-
теріалу в автофагосоми. Останні є двомембран-
ними структурами, які містять органели, що
руйнуються, та/чи цитозолі. Злиття автофаго-
сом з лізосомами призводить до утворення ав-
тофаголізосом з наступним руйнуванням вмісту
порожнини і внутрішньої мембрани. Варто під-
креслити, що в певних межах автофагія є
нормальним процесом, що забезпечує видален-
ня ушкоджених органел і ділянок цитоплаз-
матичного матрикса, і, на думку деяких авторів,
нерідко сприяє виживанню клітин. У зв'язку з
цим Е. Eskelinen назвала одну із своїх публі-
кацій "Доктор Джекіл і містер Хайд: автофагія
здатна сприяти одночасно клітинному виживан-
ню та клітинній смерті" [4].

Розрізняють три типи автофагії: 1) макро-
автофагія (або власне автофагія), при якій
складники цитоплазми, призначені до руйну-
вання, оточуються внутрішньоклітинною мем-
браною і ця структура поступово перетворюєть-
ся в автофагосому діаметром до 1 мкм; 2) мік-
роавтофагія, при якій фрагменти цитоплазми
безпосередньо оточуються лізосомною мембра-
ною шляхом внутрішньоклітинного ендосито-
зу; 3) шаперон-залежна автофагія за участю
спеціальних рецепторів на лізосомній мембра-
ні; ці рецептори зв'язують комплекси клітинних
білків із цитозольним шапероном й опосередко-
вують її транспортування до лізосом [2]. У на-
уковій літературі описані селективні форми ав-
тофагії: 1) автофагія мітохондрій або мітофагія
[5]; 2) автофагія ендоплазматичної сітки або
ретикулофагія [2]; 3) автофагія рибосом [6].

У контексті динаміки типів клітинної за-
гибелі зрозуміло, що мітофагія зруйнованих мі-
тохондрій певним чином гальмує мітохондрі-
альний шлях трансдукції апоптозного сигналу
[6]. З другого боку, інтенсивна мітофагія сприяє

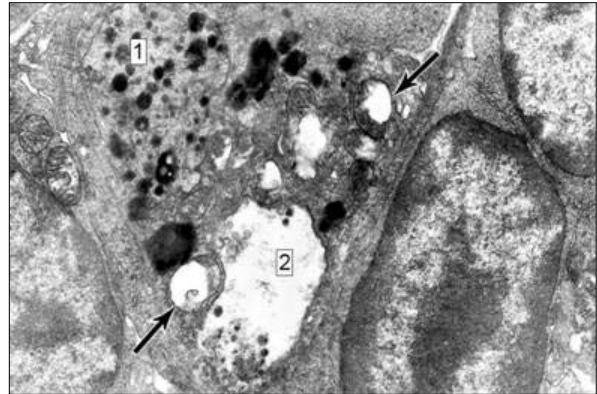


Рис. 1. Автофагічні зміни епітеліоретикулоцита в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Велика автофаголізосома зі збереженням (1) та зруйнованим (2) вмістом. Стрілочками позначені автофагосоми. Зб. 20000 \times .

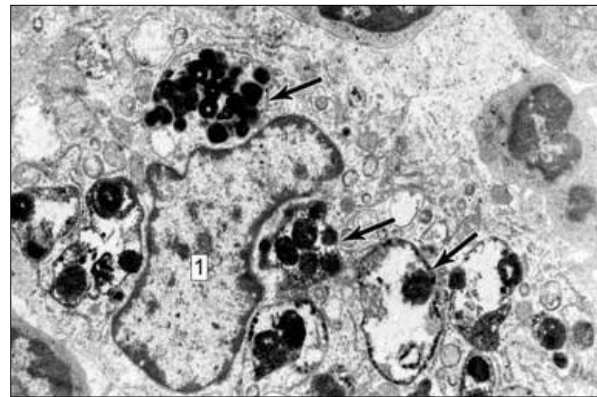


Рис. 2. Автофагічні зміни епітеліоретикулоцита в тимусі щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Ядро автофагічного епітеліоретикулоцита (1). Стрілочками позначені автофагосоми. Зб. 15000 \times .

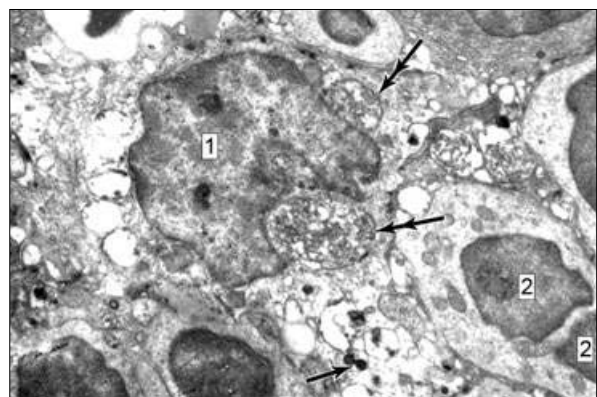


Рис. 3. Автофагічні зміни епітеліоретикулоцита в тимусі щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення препарату HAES-LX-5%. Ядро автофагічного епітеліоретикулоцита (1) та двоядерного тимоцита (2). Одинарною стрілочкою позначені лізосоми, подвійними – автофагосоми. Зб. 15000 \times .

активації каспаз і клітинній загибелі із залученням лізосомальних/автолізосомальних ензимів, автофагія рибосом призводить до порушень процесу трансляції генетичної інформації.

Нами в епітеліоретикулоцитах тимуса відмічена автофагія, яка полягає у формуванні різних за розміром і вмістом автофаголізосом. Можна передбачити, що подальша доля кожного епітеліоретикулоцита (виживе він чи загине) залежить саме від розмірів і вмісту автофаголізосом. Окремо слід підкреслити, що автофагія в тимусі всіх тварин з ОХ (лікованих і нелікованих) є постійною ознакою катаболічної реакції (внутрішньоклітинного розпаду складних органічних сполук) тимуса і морфологічним показником ступеня її зворотності/незворотності. Загалом автофагія, незалежна від кінцевих наслідків (смерть чи виживання клітини), подовжує життя епітеліоретикулоцитів і є запобіжником швидкої клітинної загибелі всіх клітин їх мікрооточення внаслідок апоптозу чи некрозу.

Висновки та перспективи наукового пошуку. 1. На етапах розвитку опікової хвороби (ОХ) частина клітин тимуса гине шляхом апоптозу, некрозу, автофагії, зроговіння та мітотичної катастрофи. 2. Мітотична катастрофа є ха-

рактерною особливістю реакції частини тимоцитів на опікову травму. Більшість тимоцитів, які зазнали мітотичної катастрофи, характеризуються мультинуклеацією та нагромадженням мікроядер. Ці порушення, врешті-решт, призводять до наступного тотального або парціального апоптозу та/або некрозу тимоцитів. 3. Внутрішньовенне введення колоїдно-гіперосмолярних препаратів (НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом) гальмує структурні прояви загибелі клітин тимуса при ОХ та сприяє ефективній репродукції тимоцитів (зокрема, шляхом запобігання розвитку мітотичної катастрофи). 4. Автофагія є характерною і стійкою реакцією частини епітеліоретикулоцитів тимуса на опікову травму, що зберігається навіть за умов лікування. 5. Автофагія епітеліоретикулоцитів тимуса при ОХ є постійною ознакою катаболічної реакції в клітинах тимуса і морфологічним показником її зворотності/незворотності. 6. Перспектива подальших досліджень у даному напрямку полягає в детальному якісному та кількісному вивченні за допомогою проточної цитометрії клітинного циклу, плідності та фрагментації ДНК в клітинах тимуса на етапах розвитку ОХ та її лікування.

Література

1. Григорьева Т.Г. Ожоговая болезнь / Т.Г.Григорьева // *Международ. мед. ж.* – 2000. – Т. 6, № 2. – С. 53-60.
2. Hoyer-Hansen M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium / M.Hoyer-Hansen, M.Gatta // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14. – P. 1576-1582.
3. Valkifahmetoglu H. Death through a tragedy: mitotic catastrophe / H.Valkifahmetoglu, M.Olsson, B.Zhivotovsky // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 15. – P. 1153-1162.
4. Eskelinen E. Doctor Jekyll and mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death / E.Eskelinen // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – P. 1468-1472.
5. Scherz-Shouval R. ROS, mitochondria and regulation of autophagy / R.Scherz-Shouval, Z.Elazar // *Trends Cell Biol.* – 2007. – Vol. 17. – P. 422-427.
6. Van der Vaart A. A picky eater: exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies / A. Van der Vaart, M.Mari, F.Reggiori // *Traffic.* 2008. – Vol. 9. – P. 281-289.

АВТОФАГИЯ В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ В ТИМУСЕ ПРИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ И ЕЕ ЛЕЧЕНИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. Приведены данные о динамике различных типов клеточной смерти (апоптоз, некроз, митотическая катастрофа, аутофагия, ороговение) в тимусе крыс при ожоговой болезни и её лечении. Полученные результаты свидетельствуют о том, что автофагия ингибирует такие типы клеточной смерти в тимусе, как апоптоз и некроз. Однако она также может быть частью каскада событий, которые приводят к клеточной смерти.

Ключевые слова: ожоговая болезнь, тимус, аутофагия, световая и электронная микроскопия.

AUTOPHAGY IN THE DYNAMICS OF CELL DEATH IN THE THYMUS UNDER THE CONDITIONS OF BURN DISEASE AND ITS TREATMENT IN EXPERIMENT

Abstract. The paper presents data in relation to the dynamics of different types (apoptosis, necrosis, mitotic catastrophe, autophagy, cornification) of cell death in the rat thymus under the condition of burn disease and its treatment. The results obtained indicate that autophagy such types of cell death in the thymus as apoptosis and necrosis. However, it can also be a component part of a cascade of events that lead to cell death.

Key words: burn disease, thymus, autophagy, light and electronic microscopy.

O.O.Bohomolets National Medical University,
M.P.Dragomanov National Medical University (Kyiv)

Надійшла 29.04.2011 р.

Рецензент – проф. М.П.Барсуков (Сімферополь)