© Е.В. Черкасов, 2011

УДК:616.31-001.17:678.048:611.36

Е.В. ЧЕРКАСОВ
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, медичний факультет №1, кафедра патоморфології, Київ

АПОНЕКРОЗ В ТИМУСІ ЩУРІВ ПРИ ОПІКОВІЙ ХВОРОБІ ТА ЇЇ ТЕРАПЕВТИЧНОМУ ЛІКУВАННІ

У статті наведені дані щодо динаміки різних типів клітинної смерті (апоптоз, некроз, мітотична катастрофа, автофагія, зроговіння, апонекроз) в тимусі щурів при опіковій хворобі та її терапевтичному лікуванні. Апонекротична смерть клітини має морфологічні ознаки як апоптоза, так і некроза. Наші дані вказують на те, що апонекроз – процес який передує наступному некрозу апоптозних тимоцитів.

Ключові слова: опікова хвороба, тимус, апонекроз, світлова та електронна мікроскопія

Вступ. Загальновизнано [1], що в основі патогенезу опікової хвороби лежить генералізована катаболічна реакція в осередку травми і в усіх внутрішніх органах. Роботами останніх років доведено, що наслідком подібних катаболічних реакцій є клітинна смерть, серед різновидів якої зазначений апонекроз, який визнаний особливим альтернативним інваріантом запрограмованої смерті клітини [3, 7]. Актуальність даного дослідження обумовлена тим, що до цього часу вивчення динаміки різних типів клітинної загибелі при опіковій хворобі не було предметом спеціальних досліджень.

Мета дослідження. Вивчити морфологічні прояви апонекроза в динаміці різних типів клітинної смерті в тимусі щурів при опіковій хворобі та її терапевтичному лікуванні.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження морфологічних змін в тимусі при опіковій хворобі (гострий період через 1, через 3 та через 7 діб) та за умов дії інфузійних колоїдно-гіперосмолярних препаратів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом було виконано на 63 щурах-самцях лінії Вістар масою 155-160 г. Розчин HAES – LX-5% містить гідроксиетилкрохмаль з ММ 130000 Дальтон, ксилітол, натрію лактат, солі: натрію хлориду, калію хлориду, кальцію хлориду та магнію хлориду. Теоретична осмолярність препарату-890 мОсм/л. Лактопротеїн з сорбітолом (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 у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), також керувалися рекомендаціями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) і положеннями «Правил до клінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)».

Тварини були розділені на 7 груп: I — інтактні тварини, II, III, IV — щури без термічної травми, яким проводилась окрема інфузія 0,9% розчину NaCl, HAES- LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом відповідно у дозі 10 мл/кг; V; VI; VII — тварини з опіком, яким за аналогічною схемою та у 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 шести хвилин у воді з постійною температурою 100 °С. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складала 21-23% при експозиції 10 сек., що є достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку (колишній III А ступінь) та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості.

Досліджувані розчини вводили внутрішньовенно протягом 5-6 хв. у дозі 10 мл/кг маси тіла. Інфузію проводили у нижню порожнисту вену, для чого виконували її катетеризацію в асептичних умовах через стегнову вену. Катетер, встановлений 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 речовин. Перше введення розчинів здійснювали через 1 годину після моделювання патологічного стану, наступні інфузії виконували 1 раз на добу.

Забір матеріалу проводився під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин грудної порожнини і вирізали за допомогою леза невеликі шматочки тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою.

Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі «LKB», і вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Olympus Bx15.

Експеримент проведено на базі Науково-дослідного центру (директор – професор І.В.Гунас) Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова. Електронно-мікроскопічне дослідження виконано на базі відділу електронної мікроскопії (науковий керівник – професор Л.О.Стеченко) Інституту проблем патології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця.

Результати досліджень та їх обговорення. Нами встановлено, що на етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, некроза, автофагії, зроговіння, мітотичної катастрофи і апонекроза З'ясовано також, що введення HAES- LX-5% і лактопротеїну з сорбітолом 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 мітоза (у пізній профазі, метафазі та анафазі, коли ядерце та каріолема зникають, а каріоплазма «змішується» з цитоплазмою) за умов розвитку опікової хвороби відрізняються характерними морфологічними ознаками. Такими ознаками є: по-перше, реактивні та деструктивні зміни органел (у першу чергу мітохондрій); по-друге, мозаїчне підвищення електронної щільності та нерівномірний розподіл ядерного матеріалу в цитоплазмі.

При опіковій хворобі мітохондрії відрізняються різним ступенем пошкодження матрикса, крист, внутрішньої мембрани (до перетворення цієї органели у вакуоль). Іноді висока ступінь вакуолізації цитоплазми мітотичних тимоцитів супроводжується появою дефектів зовнішньої мембрани вакуольно трансформованих мітохондрій, ділянковим пошкодженням цілісності цитолеми, різким зниженням електронної щільності цитоплазматичного матрикса (набряк), що є проявами некрозу, який завершується повною руйнацією (лізисом) клітини.

Наслідком описаних вище структурних змін мітотичних клітин стає те, що у телофазі навколо нерівномірно розподілених в 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 дочірніх клітин. У результаті цього характерною для тимуса тварин з опіковою хворобою є поява багатоядерних (головним чином, двоядерних) тимоцитів і тимоцитів з мікроядрами.

Тимоцити з мультинуклеацією у подальшому гинуть шляхом некрозу або апоптозу, таку смерть деякі дослідники [5] називають «клітинною смертю з попередньою мультинуклеацією». Апоптозні зміни у клітин з мультинуклеацією мають особливості, які полягають у тому, що суперконденсація ядерного матеріалу відбувається, у першу чергу, саме у мікроядрі, яке потім разом з прилеглою ділянкою цитоплазми відшнуровується, що призводить до утворення апоптозного тіла. Таке апоптозне тіло має цілісну цитолему і каріолему. При цьому «материнський» тимоцит позбавляється мікроядра і, одночасно, зберігає неушкоджене друге ядро та прилеглу до нього ділянку цитоплазми (що дозволяє говорити про парціальний характер апоптоза).

У випадку, коли апоптозу підлягає багатоядерний тимоцит з приблизно однаковими за розмірами ядрами, апоптозні (конденсація цитоплазми та каріоплазми) або некротичні зміни мають рівномірний характер, що дозволяє говорити про тотальний апоптоз або некроз.

Введення при опіковій хворобі колоїдно-гіперосмолярних розчинів гальмує апоптоз та некроз звичайних одноядерних тимоцитів та зберігає від загибелі багатоядерні тимоцити з приблизно однаковими за розміром ядрами.

При опіковій хворобі епітеліоретикулоцити тимуса гинуть, переважно, шляхом апоптоза, некроза та автофагії. Характерною особливістю епітеліоретикулоцитів мозкової речовини тимуса при опіковій хворобі 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 усі підстави вважати, що саме таким чином формуються і поступово збільшуються за розмірами тимічні тільця (тільця Гассаля), ядро яких, найчастіше, утворене клітинним детритом, що пронизаний залишками кератинізованих епітеліоретикулоцитів, у тому числі їх зміненими тонофіламентами.

Частина епітеліоретикулоцитів тимуса при опіковій хворобі (навіть за умов здійсненого терапевтичного лікування) підлягає автофагії. Цей тип клітинної смерті відбувається за відсутності конденсації хроматину, але супроводжується масованою автофагійною вакуолізацією цитоплазми. На противагу апоптозу і некрозу клітини, що гинуть з морфологічними ознаками автофагії, не асоційовані з макрофагами. Автофагія характеризується секвестрацією цитоплазматичного матеріалу в автофагосоми. Автофагосоми є двомембранними структурами, які містять органели, що руйнуються, та/чи цитозолі. Злиття автофагосом з лізосомами призводить до утворення автофаголізосом з наступним руйнуванням вмісту порожнини і внутрішньої мембрани. Варто підкреслити, що в певних межах автофагія є нормальним процесом, що

забезпечує видалення ушкоджених органел і ділянок цитоплазматичного матрикса, і, на думку деяких авторів, нерідко сприяє виживанню клітин [2, 6]. У зв'язку з цим E. Eskelinen [2] назвала одну зі своїх наукових публікацій «Доктор Джекіл і містер Хайд: автофагія здатна сприяти разом клітинному виживанню та клітинній смерті».

Типовою для тимуса щурів з опіковою хворобою є наявність в кірковій та мозковій речовині апоптозних тимоцитів, що на напівтонких та ультра – тонких зрізах характеризуються ущільненням ядра, конденсацією та зморшкуватістю цитоплазми. Значне ущільнення ядра супроводжується звивистістю його контурів, появою булавоподібних випинань,рідше перетинок. Відзначається агрегація хроматину у вигляді брилок різноманітної форми та розмірів. Морфологічні зміни у частині описаних тимоцитів відбуваються (за умов збереження цілісної цитолеми і каріолеми) за сценарієм розвитку класичного апоптоза і закінчуються утворенням апоптозних тіл, що підлягають фагоцитозу.

У частині апоптозних тимоцитів відбувається локальна ділянкова (і, в решті – решт, субтотальна чи тотальна) деструкція каріолеми та вихід ядерного матеріалу в цитоплазму (рис. 1, 2). Спостерігається проникнення мітохондрій в каріоплазму через дефекти каріолеми, злиття каріолеми з мембранами вакуольно трансформованих мітохондрій, пошкодження цитолеми, потрапляння вмісту цитоплазми у позаклітинний простір. Така клітинна загибель (що починається як апоптоз, а закінчується як некроз) одержала назву «апонекроз» [3, 7]. Слід підкреслити, що апонекроз (первинною ознакою якого є руйнація каріолеми апоптозного ядра) за умов розвитку опікової хвороби є характерним як для звичайних одноядерних тимоцитів, так і для багатоядерних тимоцитів. У останьому випадку він може починатися з руйнації каріолеми апоптозного мікроядра (рис.2).

У науковій літературі питання про морфологічну та біохімічну сутність апонекроза є предметом дискусії [3, 7], але є підстави вважати, що апонекроз є альтернативним інваріантом клітинної загибелі, що поєднує в собі властивості некроза та апоптоза. Дуалізм процесу апонекроза, зокрема, полягає у тому, що він починається як запрограмована клітинна смерть шляхом апоптоза (не викликає запального процесу), а продовжується як некроз (викликає запальний процес і випадковим незапрограмованим чином залучає до нього інші клітини, які також вторинно піддаються некротичним змінам).

Аналіз наукової літератури та одержані нами дані дозволяють стверджувати, що загальним проявом катаболічної реакції (внутрішньоклітинного розпаду складних органічних сполук) в тимусі є клітинна смерть, яка відбувається шляхом розгортання визначених типів запрограмованої клітинної загибелі (апоптоз, мітотична катастрофа, автофагія, зроговіння). Але особливістю деструктивних процесів в тимусі за умов розвитку опікової звороби є те, що для частини клітин усі сценарії клітинної смерті фатально закінчуються некрозом. У контексті цього варто погодитися з Zong W., Thompson C. [7], які визначають некроз роком (нездоланною і неминучою долею) для кожної (навіть апоптозної) клітини ("necrotic death is a cell fate").

Для тимуса апоптоз є звичайним нормальним процесом, що забезпечує негативну селекцію автореактивних тимоцитів [4]. Некроз апоптозних тимоцитів (як кінцева стадія апонекроза) є, щонайменше, свідченням змін характеру та швидкості негативної селекції (перехід від контрольованих запрограмованих подій до випадкових незапрограмованих, прискорення смерті апоптозних клітин), та показником зриву компенсаторно – пристосувальних реакцій в тимусі.

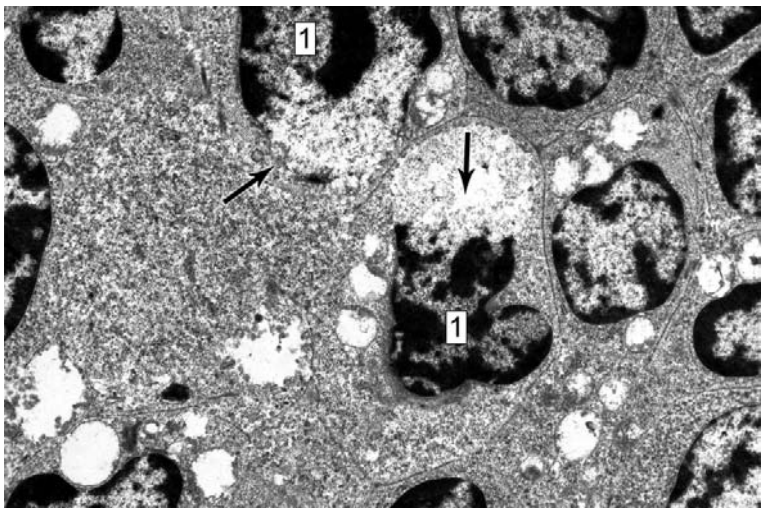

Рис. 1. Апонекротичні зміни тимоцитів в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Стрілочками відмічені локуси деструкції каріолеми та виходу ядерного матеріалу в цитоплазму. 1– ядро апонекротичного тимоцита. Зб.: х10000.

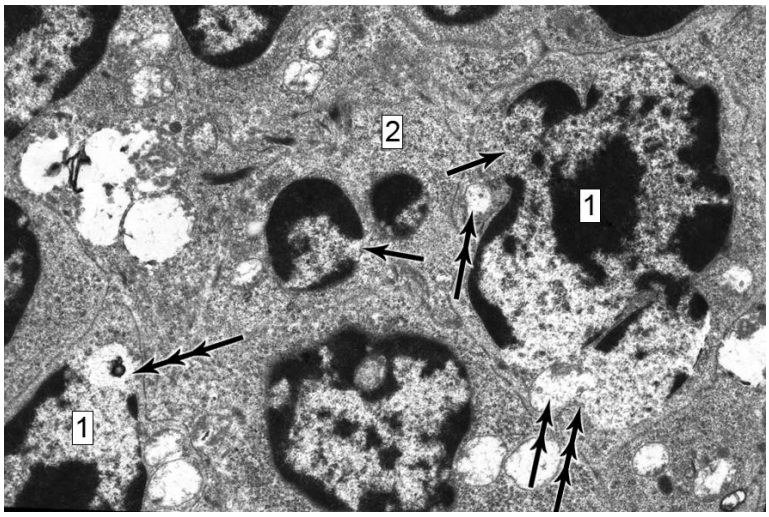

Рис. 2. Апонекротичні зміни тимоцитів в тимусі щура через 7 діб розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Одинарними стрілочками відмічені локуси деструкації каріолеми та виходу ядерного матеріалу в цитоплазму. Подвійними стрілочками відмічені проникнення вакуольно трансформованих мітохондрії. Потрійними стрілочками відмічені проникнення вакуольно трансформованих мітохондрій через локуси деструкції каріолеми в каріоплазму. 1 – ядро апонекротичного тимоцита; 2 – цитоплазма тимоцита з мікроядрами. Зб.: х10000.

Висновки. 1. На етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, некроза, автофагії, зроговіння, мітотичної катастрофи і апонекроза.

2. Мітотична катастрофа є характерною особливістю реакції частини тимоцитів на опікову травму. Більшість тимоцитів, які зазнали мітотичної катастрофи, характеризуються мультинуклеацією та накопиченням мікроядер. Ці порушення, в кінцевому випадку, призводять до наступного тотального або парціального апоптоза та/або некроза тимоцитів.

3. Внутрішньовенне введення колоїдно-гіперосмолярних препаратів (HAES- LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом) гальмує структурні прояви загибелі клітин тимуса при опіковій хворобі та сприяє ефективній репродукції тимоцитів (зокрема, шляхом запобігання розвитку мітотичної катастрофи).

4. Автофагія є характерною і стійкою реакцією частини епітеліоретикулоцитів тимуса на опікову травму та зберігається навіть за умов застосування терапевтичного лікування.

5. Автофагія епітеліоретикулоцитів тимуса при опіковій хворобі є постійною ознакою катаболічної реакції в клітинах тимуса і морфологічним показником її зворотності / незворотності.

6. Особливістю деструктивних процесів в тимусі за умов розвитку опікової хвороби є те, що для частини клітин усі сценарії клітинної смерті (апоптоз, автофагія, зроговіння, мітотична катастрофа) фатально закінчується некрозом.

7. Апонекроз тимоцитів є інваріантом клітинної смерті, яка початково характеризується морфологічними ознаками апоптоза, а закінчується як некроз (повною руйнацією клітини).

8. Апонекроз тимоцитів є свідченням змін характеру та швидкості негативної селекції автореактивних тимоцитів та показником зриву компенсаторно – пристосувальних реакцій в тимусі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Григорьева Т.Г. Ожоговая болезнь / Т.Г. Григорьева // Междун. мед. журн. — 2000. — Т. 6, № 2. — С. 53—60.
2. Eskelinen E. Doctor Jekyl end Mister Hydeutophagy can promote both cell survival and cell death / E. Eskelinen // Cell Death Differ. — 2005. — Vol.12. — P.1468—1472.
3. Kroemer G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele [et al.] // Cell Death Differ. — 2009. — Vol. 16. — P. 1—3.
4. Sohn S. J. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes / S.J. Sohn, J. Thompson // Current Opinion in Immunology. — 2007. — Vol. 19. — P. 1—6.
5. Valkifahmetoglu H. Death through a tragedy: mitotic catastrophe / H. Valkifahmetoglu, M. Olsson, B. Zhivotovsky // Cell Death Differ. — 2009. — Vol. 15. — P. 1153—1162.
6. Yang Z. Eaten alive: a history of macroautophagy / Z. Yang, D.G. Klionsky // Nat. Cell Biol. — 2010. — Vol. 12. — P. 814—822.
7. Zong W. Necrotic death as a cell fate / W. Zong, C. Thompson // Genes Dev. — 2006. — Vol. 20. — P. 1— 15.

Стаття надійшла до редакції 24.03.2011 року

E.V. CHERKASOV

O.O.Bogomolets National Medical University, Faculty of Medicine №1, Department of Pathomorphology, Kyiv

APONECROSIS IN THE RAT THYMUS UNDER THE CONDITION OF BURN DISEASE AND ITS THERAPEUTIC TREATMENT

The article presents data in relation to the dynamics of different types (apoptosis, necrosis, mitotic catastrophe, autophagy, cornification, aponecrosis) of cell death in the rat thymus under the condition of burn disease and its therapeutic treatment. Aponecrotic cell death has both apoptotic and necrotic morphological features. Here, we present evidance indicating that aponecrosis is a process precending necrosis of apoptotic thymocytes.

Key words: burn disease, thymus, aponecrosis, light and electronic microscopy