

Е.В. ЧЕРКАСОВ

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

СЕЛЕКТИВНІСТЬ АВТОФАГІЇ В ЕПІТЕЛІОРЕТИКУЛОЦИТАХ ТИМУСА ТА ЇЇ РОЛЬ У КЛІТИННОМУ ВИЖИВАННІ І КЛІТИННІЙ СМЕРТІ В ТИМУСІ ПРИ ОПІКОВІЙ ХВОРОБІ

У статті наведені дані щодо динаміки різних типів клітинної смерті в тимусі щурів при експериментальній опіковій хворобі та її лікуванні шляхом інфузії комбінованих гіперосмолярних розчинів. Селективність автофагії стосовно мітохондрії (мітофагія), рибосоми (рибофагія) або ендоплазматичної сітки (ретикулофагія) може бути механізмом, який обмежує ураження епітеліоретикулоцитів при опіковій хворобі.

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

Вступ. Роботами останніх років показано [2], що в основі патогенезу опікової хвороби лежить генералізована катаболічна реакція в осередку травми та в усіх внутрішніх органах, морфологічним проявом якої, зокрема, є загибель клітин тимуса [1, 3]. Актуальність даного дослідження обумовлена тим, що до цього часу роль селективності автофагії в забезпеченні виживання та смерті клітин тимуса при опіковій хворобі не була предметом спеціальних досліджень.

Мета дослідження. Вивчити морфологічні прояви селективності автофагії в динаміці різних типів клітинної смерті в тимусі щурів при опіковій хворобі та її лікуванні комбінованими гіперосмолярними розчинами.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження морфологічних змін у тимусі при опіковій хворобі (через 1, 3, 7, 14, 21 і 30 діб) та за умов дії інфузійних колоїдно-гіперосмолярних препаратів дезінтоксикаційної, реологічної, енергетичної, протишокової дії НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом було виконано на 90 щурах-самцях лінії Вістар масою 155–160 грамів.

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, НАЕС- 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 ту-

луба 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 (количинній 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 щоденно впродовж 7 діб. Забір матеріалу проводився під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин грудної порожнини вирізали за допомогою леза невеликі шматочки тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою.

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

Експеримент виконано на базі Науково-дослідного центру (директор – професор І.В. Гунас) Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Електронно-мікроскопічне дослідження проведено 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, апонекроза, автофагії, зроговіння і мітотичної катастрофи. З'ясовано також, що введення НАЕС- LX-5% і лактопротеїну з сорбітолом гальмує структурні прояви клітинної загибелі та сприяє ефективній репродукції тимоцитів.

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 виявляють-

ся 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 Гассала), 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 (рис. 1, 2, 3).

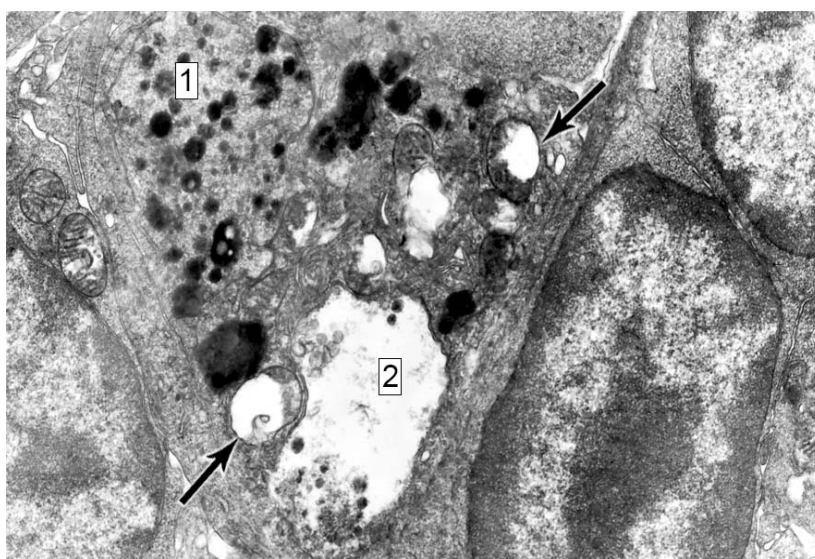


Рис. 1. Автофагічні зміни епітеліоретикулоцита в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Стрілками вказано автофагосоми. 1 – велика автофаголізосома зі збереженим вмістом; 2 – велика автофаголізосома зі зруйнованим вмістом. 3б. x20000.

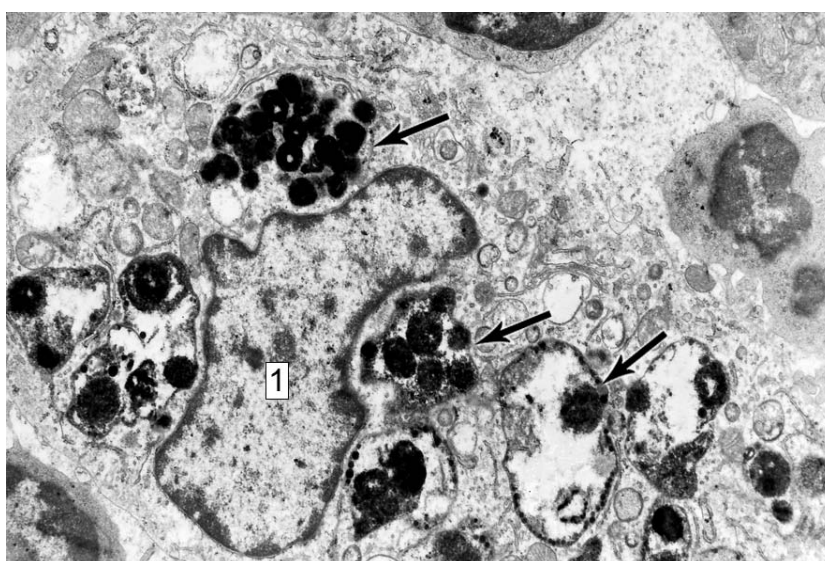


Рис. 2. Автофагічні зміни епітеліоретикулоцита в тимусі щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Стрілками вказано автофаголізосоми. 1 – ядро автофагічного епітеліоретикуцита. 3б. x15000.

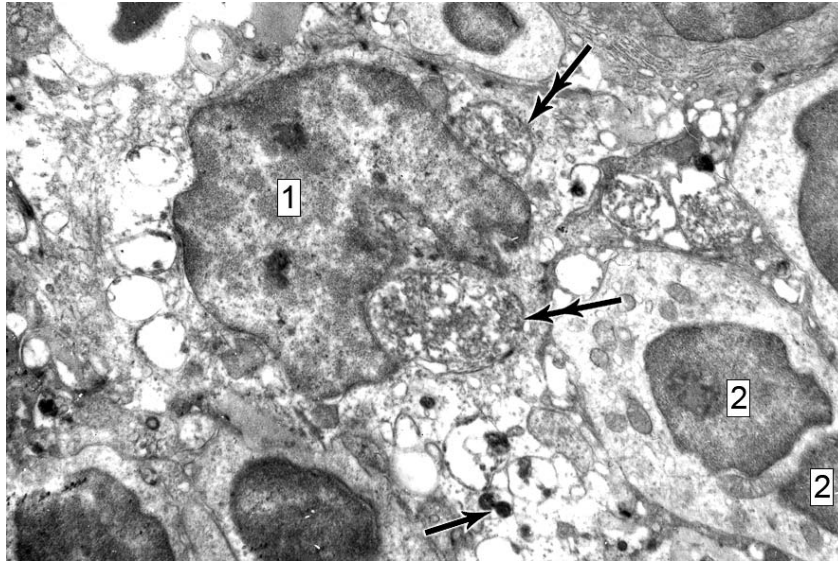


Рис.3. Автофагічні зміни епітеліоретикулоцита в тимусі щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення препарату HAES-LX-5%. Одиною стрілкою вказано лізосоми. Подвійними стрілками вказані автофагосоми. 1 – ядро автофагічного епітеліоретикулоцита; 2 – ядро двоядерного тимоцита. 3б. x15 000.

Морфологічною подією, що свідчить про ініціацію автофагії, є оточення та секвестрація клітинних органел і локусів ущільнення дрібногранулярного цитоплазматичного матрикса (агрегованих протеїнів?) подвійною ізолюючою мембраною (фагофором). Потенційними джерелами утворення фагофорів є мембрани комплексу Гольджі, ендосом, мітохондрій та плазмолема. Найтипівшим та розповсюдженим варіан-

том утворення фагофорів є (рис. 4) концентричне групування каналців гранулярної ендоплазматичної сітки навколо «ядра» (агрегованих протеїнів, ушкоджених мітохондрій та каналців ендоплазматичної сітки). Канальці ендоплазматичної сітки з'єднуються своїми кінцями і утворюють концентричні кола (від одного до чотирьох). Врешті-решт, утворюється замкнена автофагосома.

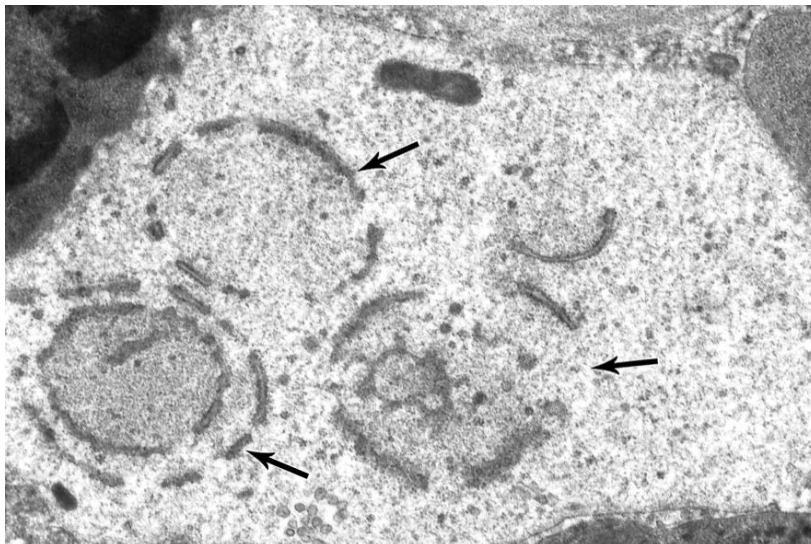


Рис.4. Автофагосоми (вказані стрілками) на різних фазах утворення в цитоплазмі епітеліоретикулоцита тимуса через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. 3б. x30000.

Як свідчать одержані нами дані, автофагосоми в епітеліоретикулоцитах підлягають послідовному процесу розвитку, що включає їх об'єднання з лізосомами та утворення автофаголізосом. Останнє забезпечує ізольований контакт секвестрованого цитоплазматичного вмісту з лізосомальними ком-

понентами, їх злиття та деградацію. Узагальнюючи, можна зазначити, що процес автофагії епітеліоретикулоцитів є послідовним, упорядкованим і складається з наступних фаз: 1) ініціація – утворення «ядра» (ушкоджені органели та ділянки цитоплазматичного матрикса), навколо якого почи-

нають концентрично групуватися потенційні джерела ізолюючої мембрани; 2) замикання ізолюючої мембрани з формуванням автофагосоми; 3) дозрівання, що включає злиття автофагосоми з лізосомами і утворення автофаголізосоми; 4) деградація (руйнація) та/або екструзія вмісту автофаголізосоми.

Нами в епітеліоретикулоцитах (в залежності від вмісту «ядра» автофагосоми) виявлені селективні форми автофагії (точніше мікроавтофагії): 1) автофагія мітохондрій або мітофагія; 2) автофагія рибосом або рибофагія; 3) автофагія ендоплазматичної сітки або ретикулофагія.

В контексті динаміки типів клітинної загибелі [4] зрозуміло, що мітофагія зруйнованих мітохондрій, певним чином, гальмує мітохондріальний шлях трансдукції апоптозного сигналу. З іншого боку, інтенсивна мітофагія сприяє активації каспаз і клітинній загибелі з залученням лізосомальних/автолізосомальних ензимів; автофагія рибосом призводить до порушень процесу трансляції генетичної інформації. Ретикулофагія може допомагати здійснювати гомеостатичний контроль у клітині зумовлений акумуляцією спотворених та/чи невірних синтезованих протеїнів, що знаходяться у просвіті каналців гранулярної ендоплазматичної сітки. Ретикулофагія також є механізмом, внаслідок якого відбувається редукція відгалужених та розширених ділянок ендоплазматичної сітки. Крім того ретикулофагія може бути запобіжником апоптоза.

Одержані в результаті проведеного нами дослідження дані дозволяють погодитися з точкою зору про те, що процеси життєдіяльності клітини є результатом контрольованого балансу синтезу (анаболізма) та руйнації (катаболізма) і здійснюються завдяки взаємодії її компонентів. З'ясовано [5, 6], що системи клітинної дегратації, залучаючись до циклу деструкція/репарація, реагують на руйнацію органічних речовин та/або органел поповненням резерву вільних амінокислот, що підтримують синтез протеїнів навіть за відсутності нутрієнтів. Нездатність протеолітичних систем забезпечити остаточне перетравлення деградованих субстратів або невдале використання деградованих складових клітин для її власних потреб призводить до ураження клітинного гомеостаза та порушень енергетичного балансу і сприяють акумуляції пошкоджених компонентів у вигляді певним чином структурованих накопичень, що підлягають генетичнокерованій автофагії.

У останні роки відбувається перегляд та постійна зміна точок зору на біологічну сутність

автофагії, але, на сьогодні, визнається [6], що автофагія: 1) забезпечує кількісний контроль вмісту клітинних компонентів; 2) є внутрішньоклітинним джерелом енергії; 3) забезпечує клітинне та тканинне ремоделювання, а також клітинний захист; 4) є генетично запрограмованим типом клітинної смерті. Здатність автофагії вилучати протеїни, ліпіди, нуклеїнові кислоти з певних структур певних компартаментів клітини та повертати ці конституентні (структуроутворюючі) елементи назад у цитозоль (відновлення одних структур за рахунок інших) є ідеальним механізмом внутрішньоклітинної репарації.

Нами в епітеліоретикулоцитах тимуса відзначена 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 опіковою хворобою (лікованих і нелікованих) є постійною ознакою катаболічної реакції (внутрішньоклітинного розпаду складних органічних сполук) тимуса і морфологічним показником ступеня її зворотності/незворотності. Загалом автофагія, незалежно від кінцевих наслідків (смерть чи виживання клітини) подовжує життя епітеліоретикулоцитів і є запобіжником швидкої клітинної загибелі усіх клітин їх мікрооточення внаслідок апоптоза чи некроза.

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

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

3. Селективність автофагії стосовно мітохондрії (мітофагія), рибосоми (рибофагія) або ендоплазматичної сітки (ретикулофагія) може бути механізмом, який обмежує ураження епітеліоретикулоцитів при опіковій хворобі.

4. Є усі підстави вважати, що морфологічно підтверджена спроможність селективних форм автофагії (мікроавтофагії) ефективно та з найменшими втратами вилучати деградовані субстрати одних компартаментів клітини на відновлення інших, є проявом діяльності механізму клітинного захисту та внутрішньоклітинної репарації в тимусі при опіковій хворобі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Благодаров В. М. Типи клітинної смерті в тимусі щурів при опіковій хворобі та її терапевтичному лікуванні / В. М. Благодаров, Е. В. Черкасов, О. В. Благодарова // *Biochemical and Biosocial Antropology*. — 2011. — №16. — С. 64—68.
2. Григорьева Т.Г. Ожоговая болезнь / Т.Г. Григорьева // *Междун. мед. журн.* — 2000. — Т. 6, № 2. — С. 53—60.

3. Черкасов Е. В. Апонекроз в тимусі щурів при опіковій хворобі та її терапевтичному лікуванні / Е. В. Черкасов // Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина». — 2011. — Вип. 40. — С. 170—174.
4. 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.
5. Scarletti F. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? / F. Scarletti, R. Granata, A. G. Meijer, P. Codogno // Cell Death Differ. — 2009. — Vol. 16. — P. 12—20.
6. Yang Z. Eater alive: a history of macroautophagy / Z. Yang, D. G. Klionsky // Nat. Cell Biol. — 2010. — Vol. 12. — P. 814 — 822.

E. V. CHERKASOV

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

THE SELECTIVITY OF AUTOPHAGY IN THYMIC EPITHELIORETICULOCYTES AND ITS ROLE IN THYMIC CELL SURVIVAL AND CELL DEATH DURING BURN DISEASE

The article presents data to the dynamics of different types of cell death in the rat thymus during experimental burn disease and its treatment by the infusion of combined hypreosmolar solutions. The selectivity of autophagy toward mitochondria (mitophagy), ribosome (ribophagy) or endoplasmatic reticulum (reticulophagy) can serve as mechanism that limits the epithelioreticulocyte damage induced by burn disease.

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

Стаття надійшла до редакції: 27.10.2011 р.