

УДК:616.31-001.17:678.048:611.36

© Черкасов Е. В., 2011

РЕТИКУЛОФАГІЯ В МАКРОФАГАХ ТИМУСА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ХВОРОБИ У ЩУРІВ

Черкасов Е. В.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Вступ. Роботами останніх років показано [1], 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 [2, 3]. На теперішній час також доведено [7], що макрофаги є антиген-представляючими клітинами в тимусі і відіграють провідну роль у негативній селекції, яка здійснюється шляхом апоптоза автореактивних тимоцитів. Актуальність даного дослідження обумовлена тим, що до цього часу автофагія макрофагів тимуса при опіковій хворобі не була предметом спеціальних досліджень.

Мета дослідження. Вивчення морфологічних проявів автофагії макрофагів тимуса щурів при опіковій хворобі та її лікуванні комбінованими гіперосмолярними розчинами.

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

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 °C. 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 щоденно загалом впродовж 7 діб.

Проведені нами попередні дослідження показали (табл. 1), що щури-самці без будь-якої фармакокорекції на фоні опікової травми шкіри гинули всі на 9-у добу експерименту, а на 7-у добу летальність складала 80%, в зв'язку з чим (враховуючи питання біоетики), практично неможливим було набрати коректну, у кількісному відношенні, групи контролю з чистим опіком шкіри без лікування. Тому задля контролю лікувальної дії гіперосмолярних розчинів ми спиралися на групу тварин, які на фоні опіку шкіри отримували 0,9 % розчин NaCl.

Таблиця 1. Летальність щурів після опікової травми шкіри без введення будь-яких фармакологічних розчинів

Кількість щурів	Термін спостереження (доба)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n=10	n=3	n=1	n=2	n=0	n=1	n=0	n=1	n=0	n=2

У групі тварин з опіковою травмою шкіри, яким вводили 0,9% розчин NaCl, виявлене (табл. 2) прогресуюче збільшення показника летальності від 5% через 1-у добу до 11% у проміжку від 4-ї до 7-ї доби з наступним поступовим зменшенням величини даного показника до 3 % у проміжку від 22-ї до 30-ї доби після опіку шкіри. Загальний

показник летальності в групі щурів самців, яким після опіку шкіри вводили 0,9% NaCl склав 43,5%. Окрема лікувальна курсова терапія щурів з опіковою травмою шкіри розчином HAES-LX-5% подібно до такої розчином лактопротеїну з сорбітолом суттєво перешкоджала загибелі тварин упродовж усього спостереження.

Таблиця 2. Вплив фармакотерапії розчинами 0,9 % NaCl, лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5 % на показники летальності щурів з опіковою травмою шкіри

Умови досліджу	Летальність тварин (n- %)					
	Термін спостереження (доба)					
	1	2-3	4-7	8-14	15-21	22-30
Опік + 0,9 % NaCl (n=200)	n=10 (5 %)	n=21 (10,5 %)	n=22 (11 %)	n=17 (8,5 %)*	n=11 (5,5 %)	n=6 (3 %)
Опік + HAES-LX-5 % (n=120)	n=2 (1,7 %)	n=4 (3,3 %)*	n=5 (4,2 %)*	n=4 (3,3 %)#	n=2 (1,7 %)	n=1 (0,8 %)
Опік + лактопротеїн з сорбітолом (n=120)	n=1 (0,8 %)*	n=4 (3,3 %)*	n=3 (2,5 %)*	n=3 (2,5 %)*	n=1 (0,8 %)*	n=3 (1,7 %)

Примітки: * - достовірна різниця відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl); # - тенденція різниці відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl).

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 ультрамикро-томі «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 був здійснений на базі Науково-дослідного центру (директор – професор І.В. Гунас) Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова. Електронномікроскопічне дослідження виконано на базі відділу електронної мікроскопії (науковий керівник – професор Л.О. Стеченко) Інституту проблем патології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця.

Результати дослідження та їх обговорення. Нами виявлено, що на етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, некроза, апонекроза, автофагії, зрговіння і мітотичної катастрофи. З'ясовано також, що введення HAES-LX-5% і лактопротеїну з сорбітолом гальмує структурні прояви клітинної загибелі та сприяє ефективній репродукції тимоцитів.

Результати проведеного дослідження свідчать, що в тимусі в нормі та за умов розвитку опікової хвороби апоптозні клітини та їх апоптозні тіла (обмежені плазматичною мембраною фрагменти цитоплазми та ядра) поглинаються макрофагами. Макрофаги вирізняються наявністю чисельних фагосом, фаголізосом, залишкових тіл. Частина фагоцитованого матеріалу характеризується високою щільністю і за розмірами та консистенцією може бути ідентифікована як залишки ядерної складової апоптозних тіл та апоптозних тимоцитів, цитоплазматична складова яких підлягає швидкоплинному лізису (Рис. 1).

Частина макрофагів тимуса при опіковій хворобі (навіть за умов здійсненого терапевтичного лікування) підлягає автофагії. Кульмінацією автофагійних змін іноді є масована автофагійна вакуолізація цитоплазми (Рис. 2), що закінчується загибеллю макрофага (Рис. 3).

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).

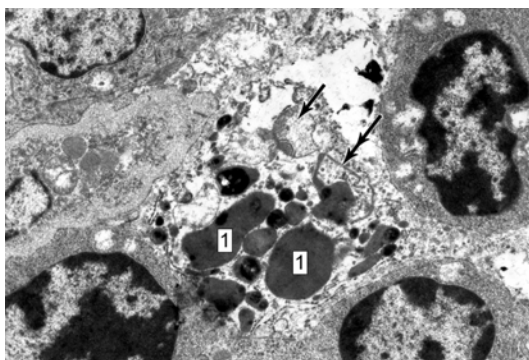


Рис. 1. Макрофаг тимуса щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Одиною стрілочкою відмічена автофагосома. Подвійною стрілочкою відмічений фагофор, просвіт якого заповнений вмістом фаголізосоми. 1- фаголізосома. Зб. 12000.

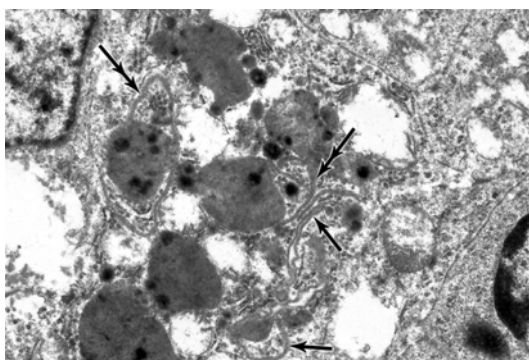


Рис. 2. Цитоплазма макрофага тимуса щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Одианними стрілочками відмічені канали гранулярної ендоплазматичної сітки з електронно-щільним вмістом. Подвійними стрілочками відмічені місця злиття фаголізосом з каналами гранулярної ендоплазматичної сітки. Зб. 20000.

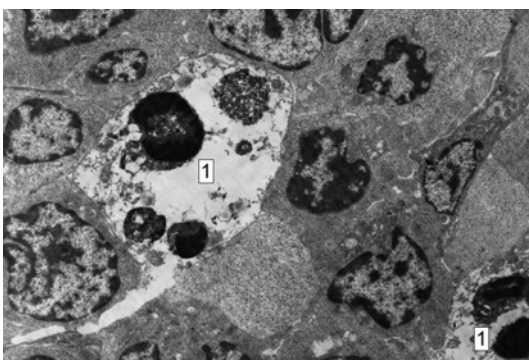


Рис. 3. Загибель макрофагів тимуса щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl з утворенням дрібних осередків (1), заповнених залишками фагоцитованого макрофагами матеріалу. Зб. 8000.

Найбільш типовим та розповсюдженим варіантом утворення фагофорів в цитоплазмі макрофагів є 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 коло замкненого навколо автофагосоми, фагофора.

Крім зазначеного «типового» варіанту розвитку автофагійних змін, які можна визнати проявами її селективності, нами вперше морфологічно зареєстрований факт злиття фаголізосом та каналців гранулярної ендоплазматичної сітки (Рис. 1,2) з утворенням замкнених кільцеподібних та/або розгалужених вакуольно-каналцевих структур з електроннощільним вмістом. Якщо перше явище можна розцінити як процес об'єднання фаголізосом/автофаголізосом з автофагосомами, то друге варто розглянути як розповсюджену (але все ж таки селективну) автофагію гранулярної ендоплазматичної сітки, а саме – ретикулофагію. Про останнє свідчить заповнення (в деяких випадках тотальне) просвіту каналців гранулярної ендоплазматичної сітки електроннощільним вмістом фаголізосом і утворенням єдиного «вакуольно-каналцевого комплексу», етапом розвитку якого (при повному дієвому перетравленні або екструзії вмісту) є масована автофагійна вакуолізація цитоплазми макрофага, а кінцевою стадією – його клітинна загибель. Загибель макрофагів призводить до утворення в тимусі різних за розміром осередків (кист ?), заповнених залишками фагоцитованого макрофагами матеріалу.

В контексті динаміки типів клітинної загибелі [5] зрозуміло, що ретикулофагія може допомагати здійснювати гомеостатичні контроль у клітині за рахунок акумуляції спотворених та/чи невірно синтезованих протеїнів, що знаходяться у просвіті каналців гранулярної ендоплазматичної сітки. Ретикулофагія також є механізмом, за рахунок 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 синтеза (анаболізма) та руйнації (катаболізма) і здійснюються завдяки взаємодії її компонентів. З'ясовано [6, 8], що системи клітинної деградації, залучаючись до циклу деградації/репарації, 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 деградо-

ваних складових клітин для її власних потреб призводить до ураження клітинного гомеостазу та порушень енергетичного балансу і сприяє акумуляції пошкоджених компонентів у вигляді певним чином структурованих накопичень, що підлягають генетично керованій автофагії.

У останні роки відбувається перегляд та постійна зміна точок зору на біологічну сутність автофагії, але, на сьогодні, визнається [6, 8], 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 компартментів клітини та повертати ці конститuentні (структуроутворюючі) елементи назад в цитозоль (відновлення одних структур за рахунок інших) є ідеальним механізмом внутрішньоклітинної репарації.

Нами в макрофагах тимуса відмічена автофагія, яка полягає у формуванні різних за розміром і вмістом автофагосом, їх злитті з фаголізосомами, автофаголізосомами та каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки (у останньому випадку ендоплазматична сітка відіграє роль ефективного посередника внутрішньоклітинного поширення автофагії). Можна передбачити, що подальша доля кожного макрофага (виживе він чи загине) залежить саме від розмірів описаного вище «вакуольно-каналцевого комплексу». 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 за певних зазначених умов автофагія (і, зокрема, ретикулофагія) має діяти як захисник більшості потенційно здатних до некрозу макрофагів від несприятливої дії на компоненти цитоплазматичного матрикса і на органели агресивних, незапрограмованих стимулів (цитотоксичні агенти). Якщо ретикулофагія не може завадити прогресивній деструкції і зневілювати непередбачену ситуацію, вона робить свій внесок в клітинну загибель макрофагів тимуса при опіковій хворобі.

Враховуючи усе зазначене вище варто наголосити, що макрофаги тимуса при опіковій хворобі гинуть за рахунок реалізації своєрідної (*sui generis*) послідовності морфологічних змін, яку можна визначити окремим типом клітинної смерті – ретикулонекрозом. Цей тип клітинної загибелі суттєво відрізняється від усіх інших, що зазначені у останньому переліку [5] Номенклатурного комітету з клітинної смерті.

Загальновідомо [7], що (за рахунок проліфе-

рації) щоденний приріст кількості тимоцитів в нормі складає 25%, з них 95-98% гине в тимусі шляхом апоптозу в процесі селекції. У теперішній час [4] визнається, що макрофаги забезпечують селекцію тимоцитів у якості клітин, що здійснюють представлення антигену, а також елімінацію апоптотичних клітин та апоптотичних тіл. Зрозуміло, що описаний нами ретикулонекроз макрофагів тимуса при опіковій хворобі призводить до порушення «репертуарного» представництва різних клонів тимоцитів (впливає на селекцію та, ймовірно, на рівень проліферації тимоцитів). З огляду на зазначене динаміка процесу автофагії (селективна мікроавтофагія/макроавтофагія), що забезпечує виживання та смерть макрофагів тимуса, відіграє провідну роль в компенсаторно-приспосувальних процесах в тимусі при опіковій травмі шкіри.

Висновки: На етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, апонекроза, некроза, автофагії, зговіння і мітотичної катастрофи. Автофагія є

характерною і стійкою реакцією макрофагів тимуса на опікову травму. В деяких макрофагах тимуса при опіковій хворобі відбувається ретикулографія (за рахунок злиття каналців гранулярної ендоплазматичної сітки з фаголізосомами). Ретикулофагія в макрофагах може бути обмеженою (утворення замкнених кільцеподібних вакуольно-каналцевих структур з електроннощільним вмістом) або розповсюдженою (утворення розгалужених вакуольно-каналцевих структур з електроннощільним вмістом). У останньому випадку це призводить до некрозоподібної загибелі відповідного макрофага і свідчить про трансформацію селективної обмеженої автофагії (мікроавтофагії) у макроавтофагію. Перспектива подальших досліджень у даному напрямку полягає у детальному якісному та кількісному вивченні за допомогою проточної цитометрії клітинного циклу, плідності та фрагментації ДНК в клітинах тимуса на етапах розвитку опікової хвороби та її терапевтичного лікування.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Григорьева Т.Г. Ожоговая болезнь/Т. Г. Григорьева // Междун. мед. журн. – 2000. – Т. 6, № 2 – С. 53-60.
2. 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.
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. – випуск 40. – С. 170-174.
4. Iwasaki A. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // Science. – 2010. – Vol. 327. – P. 291-295.
5. 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.
6. Scarlett F. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? / F. Scarlett, R. Granata, A. G. Meijer, P. Codogno // Cell Death Differ. – 2009. – Vol. 16 –P. 12-20.
7. Sohn S. G. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes / S.G. Sohn, G. Thompson // Current Opinion in Immunology. – 2007. – Vol. 19. – P. 1-6.
8. Yang Z. Eater alive: a history of macroautophagy / Z. Yang, D. G. Klionsky // Nat. Cell Biol. – 2010. – Vol. 12. – P. 814 – 822.

Черкасов Е.В. Ретикулофагія в макрофагах тимуса при експериментальній опіковій хворобі у щурів // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 217-220.

У статті наведені дані щодо динаміки автофагії (ретикулофагії) в макрофагах тимуса. Ретикулофагія є процесом, що включає селективне утворення автофагосом з залученням ендоплазматичної сітки, але при експериментальній опіковій хворобі у щурів ретикулофагія може мати летальні наслідки для макрофагів тимуса.

Ключові слова: опікова хвороба, тимус, ретикулофагія, електронна мікроскопія.

Черкасов Э.В. Ретикулофагия в макрофагах тимуса при экспериментальной ожоговой болезни у крыс // Украинский медицинский альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 217-220.

В статье приведены данные о динамике автофагии (ретикулофагии) в макрофагах тимуса. Ретикулофагия является процессом, который включает селективное образование автофагосом с вовлечением эндоплазматической сети, но при экспериментальной ожоговой болезни у крыс ретикулофагия может иметь летальные последствия для макрофагов тимуса.

Ключевые слова: ожоговая болезнь, тимус, ретикулофагия, электронная микроскопия.

Cherkasov E.V. Reticulophagy in thymic macrophages during experimental burn disease in rat // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 217-220.

The article presents data in relation of the dynamics of autophagy (reticulophagy) in thymic macrophages. Reticulophagy is a process involving the selective formation of autophagosomes using the endoplasmic reticulum but under the condition of experimental burn disease it can have lethal consequences for thymic macrophages.

Key words: burn disease, thymus, reticulophagy, electronic microscopy.

Надійшла 07.09.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін