

ТЕОРЕТИЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК:616.31-001.17:678.048:611.36

Благодаров В.М.,
Черкасов Е.В.¹,
Благодарова О.В.²

МІТОТИЧНА КАТАСТРОФА В ТИМУСІ ЩУРІВ ПРИ ОПІКОВІЙ ХВОРОБИ ТА ЇЇ КОНСЕРВАТИВНОМУ ЛІКУВАННІ

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ)

² Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова (м. Київ)

Резюме. В статті наведені дані щодо динаміки мітотичної катастрофи в тимусі щурів при опіковій хворобі та її консервативному лікуванні. На підставі морфологічного дослідження тимоцитів мітотична катастрофа описана як затримана форма репродуктивної клітинної смерті. Більшість тимоцитів, які зазнали мітотичної катастрофи, характеризуються мультиякернацією та накопичення мікроядер. Ці порушення, в кінцевому випадку, можуть призвести до клітинної загибелі. Наші дані вказують на те, що асоційована з клітинною смертю мітотична катастрофа — процес, який передує наступному апоптозу та/або некрозу тимоцитів.

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

Вступ

Питання, пов'язані з критеріями зворотності та незворотності патологічних змін клітини, її старінням і смертю більше 100 років викликають зацікавленість дослідників в галузі біології та медицини, так як мають принципове значення для адекватного трактування явищ, що відбуваються в організмі тварин і людини. В останні роки в галузі досліджень механізмів загибелі клітини було досягнуто значного прогресу. У зв'язку з цим в 2009 році з'явився [1] новий варіант рекомендацій Номінального комітету з клітинної смерті (The Nomenclature Committee on Cell Death — NCCD), в якому серед різновидів клітинної смерті зазначена мітотична катастрофа. Мітотичну катастрофу в теперішній час розглядають [2] як шлях клітинної загибелі, що спричинена передчасним або неналежним вступом клітин у мітози у наслідок негативного впливу хімічних або фізичних чинників.

Процеси клітинної загибелі та клітинного оновлення в органах і тканинах при опіковій хворобі викликають прискіпливу увагу клініцистів [3], але вивчення мітотичної катастрофи при опіковій хворобі не було предметом спеціальних досліджень.

Метою даного дослідження стало вивчення

морфологічних аспектів мітотичної катастрофи в тимусі щурів при опіковій хворобі та за умов її терапевтичного лікування.

Матеріали і 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 грам. 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 за-

хист 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 с, що є достатнім для формування опіку III-го ступеня та викликання 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 вирізували за допомогою леза невеликі шматочки тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою.

Ультратонкі зрізи готували на ультрамікроскопі "LKB", і вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Olympus B x15.

Експеримент був здійснений 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 та їх обговорення

Нами встановлено, що на етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, некроза, 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 (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 ядрце та каріолема зникають, а каріоплазма "змішується" з цитоплазмою) за умов розвитку опікової хвороби відрізняються характерними морфологічними ознаками. Такими ознаками (Рис. 1; Рис. 2) є: а — реактивні та деструктивні зміни органел (у першу чергу мітохондрій); б — 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 цитолемі, різким зниженням електронної щільності цитоплазматичного матрикса (набряк), що є проявами некроза (Рис. 3), 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 (Рис. 4) багатоядерних (головним

чином, двоядерних) тимоцитів і тимоцитів з мікроядрами (Рис. 5).

Тимоцити з мультиядерною ядраною у подальшому гинуть шляхом некрозу або апоптозу, таку смерть деякі дослідники [1] називають "клітинною смертю з попередньою мультиядерною ядраною". Апоптозні зміни у клітин з мультиядерною ядраною мають особливості, які полягають у тому, що суперконденсація ядерного матеріалу відбувається, у першу чергу, саме у мікроядрі (Рис. 6), яке потім разом з прилеглою ділянкою цитоплазми відшнуровується (Рис. 7), 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 (Рис. 8).

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 (Рис. 9). У цьому випадку мультиядерною ядраною варто розглядати як компенсаторно-приспосовальну реакцію і згадати відому фразу про те, що "основний сенс розвитку поліплоїдії полягає у підсиленні активності клітини" [4].

Виявлені нами структурні прояви некроза тимоцитів під час їх мітозу, тотальний та



Рис. 1. Деструкція мітохондрій (відмічені стрілочками) в цитоплазмі мітотичного тимоцита в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 3б. 10000

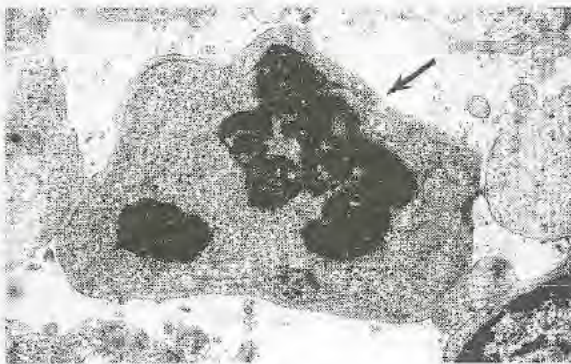


Рис. 2. Нерівномірна електронна щільність і нерівномірний розподіл ядерного матеріалу в цитоплазмі мітотичного тимоцита (відмічений стрілочкою) в тимусі щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 3б. 20000

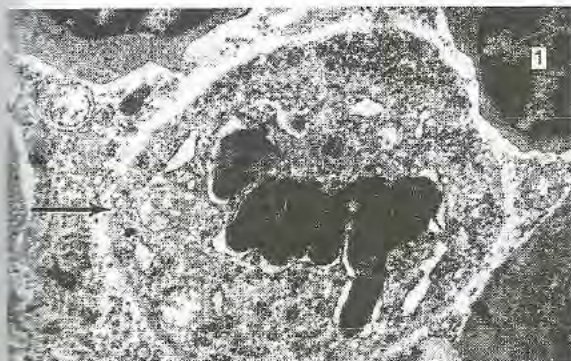


Рис. 3. Некроз мітотичного тимоцита (відмічений стрілочкою) в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 1 — ядро тимоцита. 3б. 20000

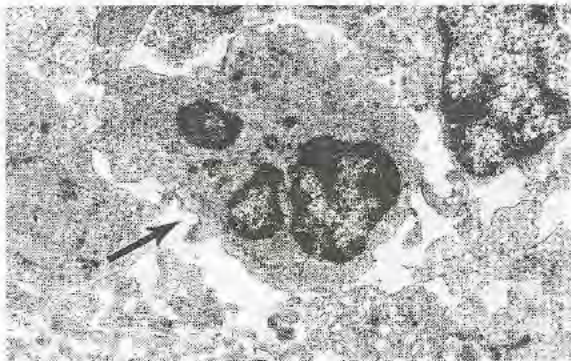


Рис. 4. Багатоядерний тимоцит (відмічений стрілочкою) в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 3б. 15000

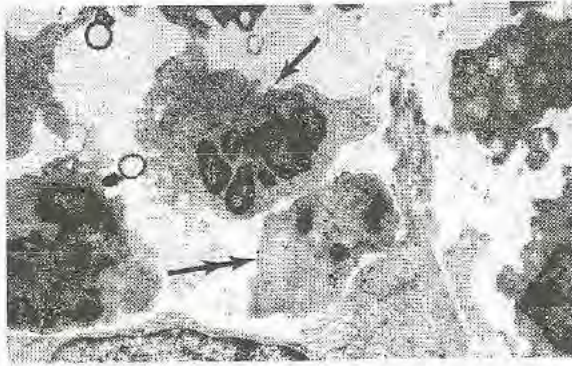


Рис. 5. Тимоцит з мікроядрами (відмічений оди-нарною стрілочкою) в тимусі щура через 7 діб роз-витку опікової хвороби за умов введення 0,9% роз-чину NaCl. Подвійною стрілочкою відмічена ділянка цитоплазми тимоцита з групою мікроядер. 3б. 12000

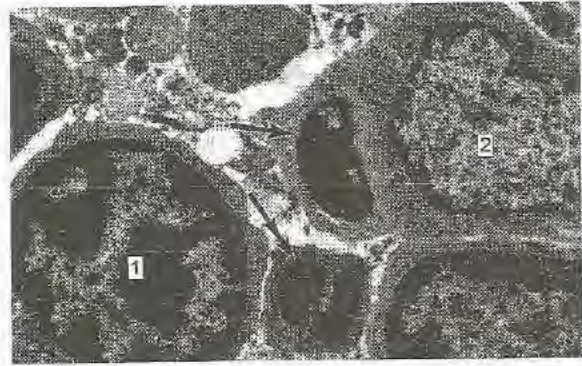


Рис. 6. Апоптозні зміни у мікроядрі (відмічені оди-нарною стрілочкою) багатоядерного тимоцита в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хворо-би за умов введення 0,9% розчину NaCl. Подвійною стрілочкою відмічене вільне апоптозне тіло. 1 – ядро тимоцита; 2 – ядро багатоядерного тимоцита. 3б. 15000

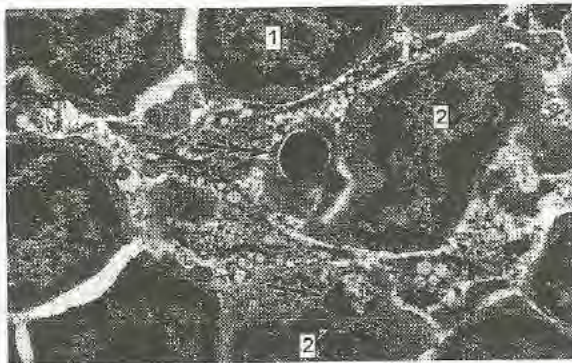


Рис. 7. Відділення апоптозного мікроядра (відмі-чене подвійною стрілочкою) разом з прилеглою ділянкою цитоплазми від багатоядерного тимоци-та в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Оди-нарною стрілочкою відмічене мікроядро в ба-гатоядерному тимоциті. 1 – ядро тимоцита; 2 – яд-ро багатоядерного тимоцита. 3б. 15000

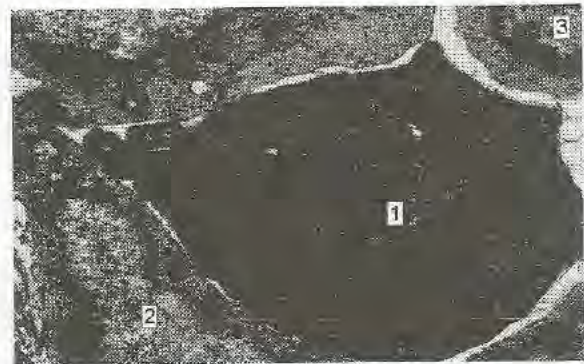


Рис. 8. Тотальний апоптоз багатоядерного тимо-цита в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 1 – апоптозний тимоцит; 2 – ядро субкапулярно-го епітеліоретикулоцита; 3 – ядро тимоцита. 3б. 20000

парціальний апоптоз тимоцитів з характерни-ми морфологічними змінами (що включають мікронуклеацію та мультинуклеацію) свідчать про суттєві порушення клітинного циклу тимо-цитів і підпадають під сучасне визначення та-кого явища як мітотична катастрофа. Слід од-нак зазначити, що термін "мітотична катастро-фа" ("МК") не використовували до 1986 року, коли він був вперше застосований [5] при спробі ілюстрації генетично трансформованих дріжджів. Летальний фенотип цього виду дріжджів не був викликаний передчасним вступом в мітоз, а, здавалося, був викликаний відхиленням у виконанні мітозу, особливо що-до поділу хромосом і формування мембран [6].

В даний час, мітотична катастрофа — це термін, який використовується, щоб пояснити механізм затриманої та пов'язаної з мітозом за-гибель клітин, яка є результатом передчасного або неналежного вступу клітин у мітоз і може бути викликаною хімічним або фізичним впли-вом. [2]. Ретроспективний аналіз літератури показує, що перші спостереження МК були зроблені в кінці 1930-х і початку 1940-х років, коли клітини у фазі росту зазнали впливу радіації [7]. Було відзначено, що частина клітин в мітотичній стадії (у відповідь на опромінен-ня), відразу ж припинила мітоз, який не віднов-лювався упродовж кількох годин після дії радіації. Мікроскопічні дослідження показали,

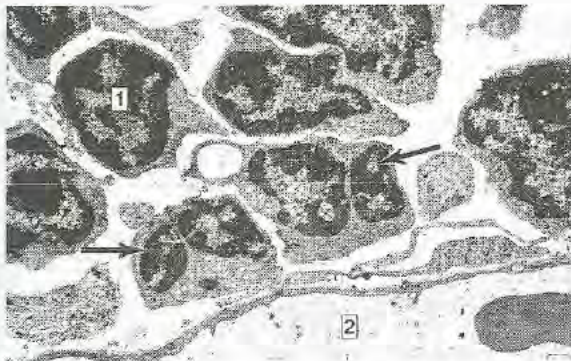


Рис. 9. Багатоядерні тимоцити (відмічені стрілочками) в тимусі щура через 7 діб розвитку опікової хвороби за умов введення препарату HAES-LX-5%. 1 – ядро тимоцита; 2 – просвіт кровоносного капіляра. Шк. 8000

що клітини почали вмирати після опромінення під час або після першого мітотичного піку (поява мітотичних клітин), а також засвідчили ненормальні конфігурації і просторові перебудови хромосом. Відповідно, ця смерть називається мітотичною або "смертю поділу" (ця назва вказує на зв'язок з мітотичним поділом клітини), або "затриманою смертю" (в цій назві підкреслюється факт появи мертвих клітин через кілька годин після опромінення).

Пізніше, мітотична катастрофа була описана як відхиляюча форма мітозу, пов'язана з різними морфологічними та біохімічними змінами. Дослідники підкреслювали, що заключний етап МК майже завжди характеризується утворенням ядерних оболонок навколо кожної групи відокремлених хромосом. МК також асоціювали з неповним синтезом ДНК і передчасною конденсацією хромосом (ПКХ). Спочатку, ПКХ не пов'язували з фазами мітозу, оскільки поява багатоядерних клітин з "розсіяними" хромосомами, була показана, коли інтерфазні і мітотичні клітини досліджували за умов дії вірусу Сендай [8]. При цьому було з'ясовано, що інтерфазний хроматин конденсується в дискретні одиниці, визначені як ПКХ. Згодом був описаний інший тип ПКХ, який з'являвся тільки в частині метафазних хромосом [9]. Пов'язана з метафазою ПКХ, яка також називається спонтанною ПКХ, з'являється в клітині з мікроядром як результат неповного синтезу ДНК, викликаного радіацією [9]. Цікаво, що апоптоз характеризується також конденсацією хроматину, проте, апоптоз, на відміну від МК, супроводжується конденсацією ("зморщуванням") цитоплазми та ядерною фрагментацією.

Докази того, що порушення в клітинному циклі і мітозі, в кінцевому підсумку, можуть призвести до загибелі клітин, дозволили визначити МК в морфологічних термінах, як механізм клітинної загибелі, що спрацьовує під час або після мітозу, який відхиляється від норми [10].

Крім того, МК класифікують не як спосіб клітинної смерті, а як особливий тип апоптозу. Ця думка ґрунтується на тому, що МК має загальні біохімічні риси з апоптозом, а саме: збільшення проникності мітохондріальної мембрани і активацію каспаз [10]. Проте, до цих пір незрозуміло, чи спричиняє МК смерть, яка вимагає каспазо-залежних або каспазо-незалежних механізмів [11]. Є приклади, які визначають МК як механізм виживання пухлинних клітин [12,13]. Крім того, МК може бути механізмом, який дозволяє клітині переключатися з неправильного до мітотичного клітинного циклу [14]. Можливо, внаслідок цих різних точок зору в даний час немає загальноприйнятої класифікації МК. Наші дані показують, що при опіковій хворобі пов'язана зі смертю МК — процес дуалістичний і може бути розцінений як "передстадія" до некрозу або апоптозу тимоцитів, а також як процес своєрідного відтермінування клітинної загибелі.

Висновки

1. На етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, некроза, автофагії, зроговіння і мітотичної катастрофи.
2. 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).

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.

МИТОТИЧЕСКАЯ КАТАСТРОФА В ТИМУСЕ КРЫС ПРИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ И ЕЁ КОНСЕРВАТИВНОМ ЛЕЧЕНИИ

В.Н. Благодаров, Э.В. Черкасов, Е.В. Благодарова

Резюме. В статье приведены данные о динамике митотической катастрофы в тимусе крыс при ожоговой болезни и её консервативном лечении. На основании морфологического исследования тимоцитов, митотическая катастрофа описана как задержанная форма репродуктивной клеточной смерти. Большинство тимоцитов, которые подверглись митотической катастрофе, характеризуются мульти-нуклеацией и накоплением микроядер. Эти нарушения, в конечном итоге, могут привести к клеточной гибели. Наши данные свидетельствуют, что ассоциированная с клеточной смертью митотическая катастрофа — процесс, который предшествует последующему апоптозу и/или некрозу тимоцитов.
Ключевые слова: ожоговая болезнь, тимус, митотическая катастрофа, световая и электронная микроскопия.

MITOTIC CATASTROPHE IN THE RAT THYMUS UNDER THE CONDITION OF BURN DISEASE AND ITS CONSERVATIVE TREATMENT

V.N. Blagodarov, E.V. Cherkasov, H.V. Blagodarov

Abstract. The article presents data in relation to the dynamics of mitotic catastrophe in the rat thymus under the condition of burn disease and its therapeutic treatment. Mitotic catastrophe are generally characterized by formation of multinucleated cells and accumulation of multiple micronuclei. This abnormalities in mitosis eventually lead to cell death. Here, we present evidence indicating that cell death-associated mitotic catastrophe is a process preceding apoptosis and/or necrosis of thymocytes.
Key words: burn disease, thymus, mitotic catastrophe, light and electronic microscopy.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // Cell Death Differ. - 2009. - Vol. 16. - P.1-3.
2. Valkifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe // Cell Death Differ. - 2009. - Vol. 15. - P.1153-1162.
3. Григорьева Т.Г. Ожоговая болезнь // Междун. мед. журн. - 2000. - Т. 6, № 2. - С. 53-60.
4. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). - СПб.: СОТИС, 2000. - 520 с.
5. Russell P, Nurse P. cdc25+functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast//Cell - 1986.-Vol 45. -P. 145-153.
6. Molz L, Booher R, Young P, Beach D. cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes// Genetics.- 1989.Wol. 122.-P. 773-782
7. Spear FG, Glucksmann A. The effect of gamma-radiation on cells in vivo. Part III// Br J Radiol.- 1941.-Vol. 14.-P. 65-77.
8. Kato H, Sandberg AA. Chromosome pulverization in human cells with micronuclei// J Nati Cancer Inst -1968.-Vol. 40.-P. 165-179.
9. Obe G, Beek B. The human leukocyte test system. VII. Further investigations concerning micronucleus derived premature chromosome condensation// Humangenetik. - 1975.-Vol. 30.-P 143-154.
10. Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis// J Soc Biol .-2004.-Vol. 198.-P. 97-103.
11. Mansilla S, Priebe W, Portugal J. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms// Cell Cycle.-2006.-Vol. 5.-P. 53-60.
12. Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Kuninaka S, Marumoto T et.al. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents// Oncogene .-2004.-Vol. 23.- P. 6548-6558.
13. Erenpreisa J, Kalejs M; Anzini F, Kosmacek EA, Mackey MA, Emzinsh D. et al. Segregation of genomes in polyploidy tumor cells following mitotic catastrophe// Cell Biol Int.-2005.-Vol. 29.-P. 1005-1011.
14. Erenpreisa J, Cragg MS. Cancer: a matter of life cycle?// Cell Biol Int,- 2007.-Vol. 31.-P. 1507-1510.