

Е.В. Черкасов

## УЛЬТРАСТРУКТУРА МАКРОФАГІВ І ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ТИМУСА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ХВОРОБИ У ЩУРІВ

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

*Резюме:* За умов експериментальної опікової хвороби у щурів велика кількість тимоцитів гине шляхом мітотичної катастрофи, апоптоза, некроза та апонекроза. Негативна селекція, проявом якої є апоптоз потенційно автореактивних тимоцитів, пов'язана, ймовірно, з активністю макрофагів та дендритних клітин в тимусі. Однак, значення макрофагів і дендритних клітин у динаміці клітинної смерті залишається остаточно нез'ясованим. Загалом, наші дані свідчать, що роль макрофагів і дендритних клітин в патоморфологічних змінах тимуса є більш глибокою і не обмежується тільки презентацією антигенів та/або апоптозом тимоцитів.

*Ключові слова:* опікова хвороба, тимус, клітинна смерть, електронна мікроскопія.

### Вступ

На теперішній час доведено [2,3,4], що макрофаги та дендритні клітини 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 роль структурних змін макрофагів і дендритних клітин у динаміці клітинної смерті в тимусі при опіковій хворобі не була предметом спеціальних досліджень.

**Мета дослідження** полягає у вивченні ультраструктурних змін макрофагів і дендритних клітин тимуса при експериментальній опіковій хворобі у щурів.

### 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 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 с, що є достатнім для формування опіку II ступеня – дермального

поверхневого опіку (колишній III A 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 ультрамікромі "LKB", і вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Olympus Vx15.

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 дослідження та їх обговорення

Нами встановлено, що на етапах розвитку опікової хвороби частина тимоцитів гине шляхом апоптозу, некрозу, мітотичної катастрофи і апонекрозу. З'ясовано також, що введення НАЕС- 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 ядрець та каріолема зникають, а каріоплазма "змішується" з цитоплазмою) за умов розвитку опікової хвороби відрізняються

характерними морфологічними ознаками. Такими ознаками є: а – реактивні та деструктивні зміни органел (у першу чергу мітохондрій); б – мозаїчне підвищення електронної щільності та нерівномірний розподіл ядерного матеріалу в цитоплазмі.

Наслідком описаних вище структурних змін деяких 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".

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 [1, 6].

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 цитолемі і каріолемі) за сценарієм розвитку класичного апоптозу і закінчуються утворенням апоптозних тіл, що підлягають фагоцитозу.

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

У науковій літературі питання про морфологічну та біохімічну сутність апонекроза є предметом дискусії [1,7], 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 зап-

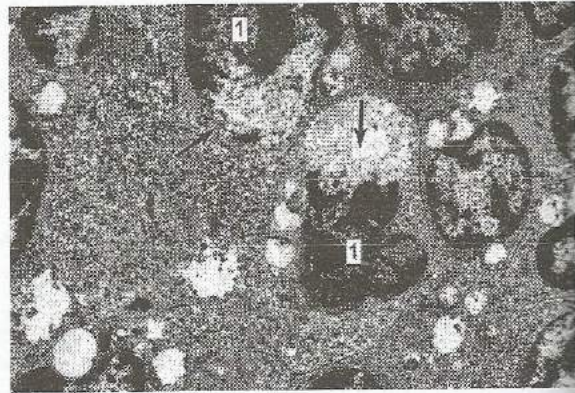


Рис. 1. Апонекротичні зміни тимоцитів в тимусі щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Стрілочками відмічені локуси деструкції каріолемі та виходу ядерного матеріалу в цитоплазму. 1 – ядро апонекротичного тимоцита. Зб. 10000

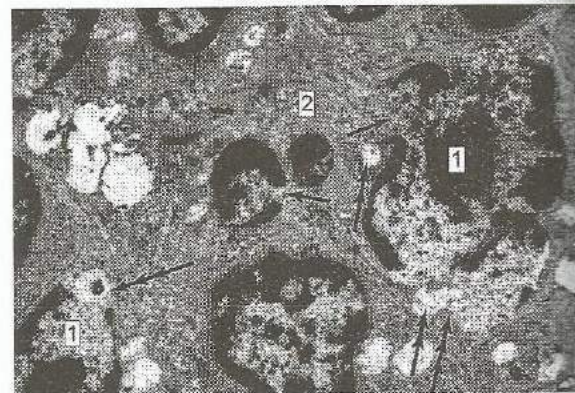


Рис. 2. Апонекротичні зміни тимоцитів в тимусі щура через 7 діб розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Одинарними стрілочками відмічені локуси деструкції каріолемі та виходу ядерного матеріалу в цитоплазму. Подвійними стрілочками відмічені вакуольно трансформовані мітохондрії. Потрійними стрілочками відмічені проникнення вакуольно трансформованих мітохондрій через локуси деструкції каріолемі в каріоплазму. 1 – ядро апонекротичного тимоцита; 2 – цитоплазма тимоцита з мікроядрами. Зб. 10000

рограмованої клітинної загибелі (апоптоз, мітохондріальна катастрофа, автофагія, зроговіння). Але особливістю деструктивних процесів в тимусі за умов розвитку опікової хвороби 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

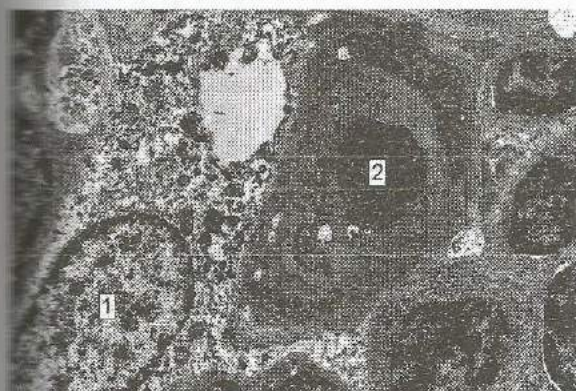


Рис. 3. Некротичні зміни макрофага тимуса щура через три доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 1 – ядро макрофага з некротичними змінами; 2 – еритроцит у просвіті кровеносного капіляра. Зб. 8000

(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 апоптоза) є, щонайменше, свідченням змін характеру та швидкості негативної селекції (перехід від контрольованих запрограмованих подій до випадкових не запрограмованих, прискорення смерті апоптозних клітин), та показником зриву компенсаторно – пристосувальних реакцій в тимусі.

Нами встановлено, що в нормі та за умов розвитку опікової хвороби апоптозні тимоцити та їх апоптозні тіла (обмежені плазматичною мембраною фрагменти цитоплазми та ядра) поглинаються макрофагами. Макрофаги вирізняються наявністю чисельних фагосом, фаголізосом, залишкових тілець. Фагоцитований матеріал характеризується високою щільністю і за розмірами та консистенцією може бути ідентифікований як матеріал ядерного компонента апоптозних тіл та апоптозних тимоцитів, цитоплазматичний компонент яких підлягає швидкоплинному лізису.

В тимусі тварин з опіковою хворобою для багатьох макрофагів характерною є різна ступінь некротичного ушкодження клітинної мембрани та органел (Рис. 3). Відмічене також (Рис. 4) злиття фаголізосом з каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки, що можна розцінити як специфічний варіант селективної форми автофагії – ретикулофагії або автофагії ендоплазматичної сітки [6].



Рис. 4. Ретикулофагія в цитоплазмі макрофага тимуса щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Оди-нарними стрілочками відмічені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки з електроннощільним вмістом. Подвійними стрілочками відмічені місця злиття фаголізосом з каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки. Зб. 20000

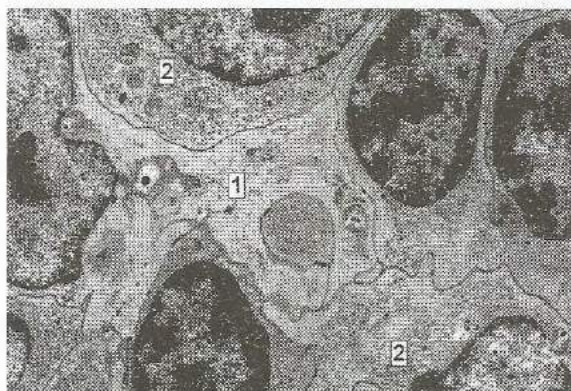


Рис. 5. Дендритні клітини тимуса щура через 3 доби розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. 1 – інтердигітальні відростки дендритних клітин; 2 – цитоплазма дендритної клітини. Зб. 12000

На відміну від макрофагів, дендритні клітини, що розташовані у мозковій речовині часточок тимуса, мають практично неушкоджену цитоплазму і ядро. Відсутність десмосом і тонofilamentів дозволяє доволі легко відрізнити їх від епітеліоретикулоцитів. Дендритні клітини характеризуються рясною електроннопрозорою цитоплазмою з довгими численними відростками, що проникають між сусідніми клітинами і глибоко вп'ячуються у цитоплазму (рис. 5).

Одержані дані свідчать, що з двох антиген – представляючих клітин (макрофагів і дендрит-

них клітин), що забезпечують негативну селекцію тимоцитів (індукуючи апоптоз автоспецифічних клонів), більш стійкими до дії негативних впливів катаболічної реакції при опіковій хворобі є дендритні клітини. Логічним буде припустити, що за умов гіпертрофії дендритних клітин негативна селекція прискорюється і охоплює значну кількість потенційно автореактивних тимоцитів, що зазнають апоптозних змін. Автофагійна смерть макрофагів призводить до порушення фагоцитозу апоптозних тимоцитів, який в нормі має "випереджаючий" [4] характер. Процес апоптозу тимоцитів, за таких умов, ніби "розтягується у часі". Апоптозні тимоцити та їх апоптозні тіла не підлягають фагоцитозу, а, натомість, підлягають некрозу. Саме таким чином, на нашу думку, за рахунок балансу/дисбалансу процесу "клітинна смерть макрофагів/виживання дендритних клітин" змінюється динаміка типів клітинної смерті тимоцитів при опіковій хворобі: мітотична катастрофа апоптоз/некроз; апоптоз апонекроз; апонекроз некроз; некроз.

#### Висновки

1. На етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса гине шляхом апоптоза, некроза, автофагії, 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. Апонекроз тимоцитів є інваріантом клітинної смерті, яка початково характеризується морфологічними ознаками апоптоза, а закінчується як некроз (пов-

ною руйнацією клітини). Апонекроз тимоцитів є свідченням змін характеру та швидкості негативної селекції автореактивних тимоцитів та показником зриву компенсаторно-приспосувальних реакцій в тимусі.

4. В деяких макрофагах тимуса при опіковій хворобі відбувається ретикулофагія (за рахунок злиття каналців гранулярної ендоплазматичної сітки з фаголізосомами). Ретикулофагія в макрофагах може бути обмеженою (утворення замкнених кільцеподібних каналцевих структур з електроннощільним вмістом) або розповсюдженою (утворення розгалужених каналцевих структур з електроннощільним вмістом). У останньому випадку це призводить до некрозоподібної загибелі відповідного макрофага.
5. Автофагійна та, безпосередньо, некротична смерть макрофагів призводить до порушення своєчасного фагоцитозу апоптозних тимоцитів та їх апоптозних тіл, які, натомість, підлягають наступним некротичним змінам. У той же час виживання дендритних клітин забезпечує збереження пускових механізмів апоптозного каскаду негативної селекції тимоцитів при опіковій хворобі.

#### Перспективи наукового пошуку

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.

## УЛЬТРАСТРУКТУРА МАКРОФАГОВ И ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ У КРЫС

Э. В. Черкасов

*Резюме:* При экспериментальной ожоговой болезни у крыс большое количество тимоцитов гибнет путем митотической катастрофы, апоптоза, некроза и апонекроза. Негативная селекция, проявлением которой является апоптоз потенциально аутореактивных тимоцитов, связана, очевидно, с активностью макрофагов и дендритных клеток тимуса. Однако, значение макрофагов и дендритных клеток в динамике клеточной смерти остается окончательно невыясненным. В целом, наши данные свидетельствуют, что роль макрофагов и дендритных клеток в патоморфологических изменениях тимуса является более глубокой и не ограничивается только презентацией антигенов и /или апоптозом тимоцитов.

*Ключевые слова:* ожоговая болезнь, тимус, клеточная смерть, электронная микроскопия.

## ULTRASTRUCTURE OF THYMIC MACROPHAGES AND DENDRITIC CELLS DURING EXPERIMENTAL BURN DISEASE IN RAT

Э. В. Черкасов

*Abstract.* Under the condition of experimental burn disease in rat, a large number of thymocytes die through mitotic catastrophe, apoptosis, necrosis and aponecrosis. Negative selection, which results in the apoptosis of potentially autoreactive thymocytes, is believed to be associated both macrophages and dendritic cells activity in the thymus. Still, the significance macrophages and dendritic cells in dynamics of cell of death is not fully understood. Collectively, our results suggest that the role of macrophages and dendritic cells in the pathomorphologic changes of thymus could be more profound and not restricted only to the presentation of antigens and/or apoptosis of thymocytes.

*Key words:* burn disease, thymus, cell death, electronic microscopy.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Sabbatte J. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function//J. Sabbatte, J. Maggini, K. Mahmud [et al.]//Cytokine and Growth Factor Reviews. - 2007. - Vol. 18. - P. 5-17.
3. Samms M. Circulating macrophages as well as developing thymocytes are enclosed within thymic nurse cells/M. Samms, M. Martinez, S. Fousse [et al.]// Cellular Immunology. - 2001. - Vol. 212. - P. 16-23.
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.