

лимфоидными клетками всех структур почек (сосудистых клубочков, извитых канальцев, кровеносных сосудов) и дистрофические изменения в эпителии извитых канальцах нефронов.

Литература

1. Ермаков С.П. Морфофизиология мочевыделительного и полового аппаратов у животных. – Барнаул: Изд-во АГАУ, 2001. – С. 9–15.
2. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота: метод. рекомендации / П.Н. Смирнов [и др.] // РАСХН. Сиб. отд-ние, ИЭВС и ДВ. – Новосибирск, 2000. – 21 с.
3. Гулюкин М.И. Система мониторинга лейкоза крупного рогатого скота в Российской Федерации // Ветеринарный консультант. – 2007. – № 17. – С. 5–18.
4. Болезни почек нефрология. Поражение почек при лейкозах. http://thetherapy.ru/porazhenie_pochek_pri_zabolevaniyah_krovi/porazhenie_pochek_pri_lejkozax.html.
5. Ветеринарный энциклопедический словарь / гл. ред. В.П. Шишков. – М.: Сов. энцикл., 1981. URL: http://veterinary.academic.ru/2956/ЛЕЙКОЗЫ_МЛЕКОПИТАЮЩИХ#sel=.
6. Bilateral primary renal Burkitt lymphoma in a child presenting with acute renal failure / M. Sieniawska [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 1997. – № 12. – P. 1490–1492.



УДК 576.314.38+577.352.5

Ю.А. Успенская

ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПРИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Исследовано цитотоксическое действие доксорубина в клетках костного мозга мышей in vitro и in vivo, регистрируемое по индукции процессов блеббинга клеточной мембраны и апоптоза клеток, культивируемых в диффузионных камерах.

Ключевые слова: мышь, костный мозг, состояние, блеббинг, апоптоз, доксорубин.

Yu.A. Uspenskaya

EVALUATION OF MICE BONE MARROW CELLS MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE UNDER CYTOTOXIC INFLUENCE

Doxorubicin cytotoxic influence in mice bone marrow cells in vitro and in vivo that is registered according to the plasma membrane blebbing induction and cells apoptosis, cultivated in diffusion chambers is researched.

Key words: mouse, bone marrow, condition, blebbing, apoptosis, doxorubicin.

Введение. Основными механизмами поражения костного мозга, возникающего при действии цитостатиков, являются миелосупрессия в результате глубокого подавления пролиферативной деятельности костного мозга, связанного с гибелью значительной части пролиферирующих клеток и блокированием митотического цикла гемопоэтических элементов, а также свободнорадикальные механизмы, приводящие к индукции окислительного стресса, повреждению липидов и белков мембран и цитоскелета [1, 4].

Одним из ключевых проявлений токсического поражения кровяных клеток, а также одним из обязательных компонентов морфологической картины запрограммированной и патологической клеточной смерти является феномен блеббинга (пузырения) плазматической мембраны. Развитие блеббинга связывают с нарушением мембран-цитоскелетных взаимодействий, окислением функциональных групп мембранных белков и белков цитоскелета, изменением активности протеинкиназ и протеаз, а также нарушением энергетиче-

ского и ионного гомеостаза в примембранной области клетки [5, 8–10]. Блеббинг плазматической мембраны развивается, как правило, в начальной стадии клеточного повреждения и носит при этом обратимый характер. Однако он может стать причиной лизиса клетки или высвобождения во внеклеточную среду мембранных микрочастиц, обладающих прокоагулянтной и антигенной активностью, что имеет важное патогенетическое значение.

Несмотря на многочисленные исследования клеточного механизма повреждающего действия цитостатиков (в частности, доксорубицина) на клетки с высокой репопуляционной способностью, некоторые его аспекты остаются окончательно неизученным. Недостаточно выясненным остается патогенез нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий на ранних этапах обратимого и необратимого повреждения клеток при цитотоксическом воздействии ксенобиотиков антрациклинового ряда.

Цель исследований. Изучение особенностей индукции блеббинга в клетках костного мозга мышей при действии миелотоксического ксенобиотика доксорубицина *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на белых беспородных мышамсамцах массой 20–25 г, по 5 животных в каждой серии.

Регистрация блеббинга плазматической мембраны клеток костного мозга осуществлялась методом фазово-контрастной микроскопии. Под иммерсией (увеличение $\times 900$) анализировалось по 200 клеток в каждом препарате, приготовленном через 5, 15, 30, 45 и 60 мин инкубации клеток костного мозга в концентрации 1×10^6 /мл среды 199 при плюс 37°C . По морфологии цитоплазматической мембраны дифференцировали: интактные клетки (морфологически неизмененные клетки), клетки в состоянии начального блеббинга (образование небольших пузырей на поверхности мембраны), клетки в состоянии терминального блеббинга (образование крупных пузырей), некротические клетки (в 1,5–2 раза крупнее интактных клеток, отсутствует свечение по периметру клетки, имеют неровную мембрану).

Изучение процессов апоптоза клеток, культивируемых в диффузионных камерах, проводилось методом световой микроскопии. Под иммерсией ($\times 900$) анализировалось по 200 клеток на каждом фильтре, окрашенном гематоксилин-эозином. При этом морфологическими признаками апоптоза считали наличие «карликовых» клеток, кариопикноз, кариорексис, наличие апоптотических телец.

Изучение токсического влияния доксорубицина («Ферейн», Россия) на клетки костного мозга *in vitro* производилось при совместной инкубации суспензии клеток костного мозга с ксенобиотиком ($5 \times 10^{-7} \cdot 10^{-6} - 5 \times 10^{-6}$ М) в течение 60 мин при плюс 37°C , а также при последующем культивировании (5 суток) в диффузионных камерах в перитонеальной полости животных-реципиентов.

Исследование влияния доксорубицина на клетки костного мозга *in vivo* проводилось при остром однократном введении мышам в максимально переносимой дозе (6 мг/кг) внутривнутрибрюшинно в физиологическом растворе, а также подостром внутривнутрибрюшинном введении в дозе $1/10$ LD₅₀ (0,95 мг/кг) в течение 10 дней с интервалом 24 ч.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Ранее мы обнаружили, что острое введение доксорубицина мышам *in vitro* и *in vivo* оказывает апоптоз-индуцирующий эффект, выявленный по оценке экспрессии фосфатидилсерина на наружной стороне мембраны с помощью FITC-меченого аннексина [2, 3]. Коль скоро известно, что процессы апоптоза сопровождаются блеббингом плазматической мембраны, развивающимся в клетках при токсическом действии ряда ксенобиотиков [11–13], представлялось интересным изучение закономерностей развития данного феномена в условиях цитотоксического действия доксорубицина *in vitro* и *in vivo*.

В краткосрочной культуре клеток костного мозга происходила индукция спонтанного блеббинга плазматической мембраны. До 86 % клеток демонстрировали жизнеспособность в течение всего периода инкубации. Инкубирование костномозговых клеток с доксорубицином в концентрациях 5×10^{-7} М, 10^{-6} М, 5×10^{-6} М приводило к динамическим изменениям плазматической мембраны, проявляющимся образованием мелких пузырькоподобных выпячиваний по периметру клетки (начальный блеббинг) и формированием более крупных пузырей (терминальный блеббинг). В концентрации 5×10^{-7} М доксорубицин индуцировал процессы начального блеббинга с первых минут воздействия, тогда как при увеличении концентрации ксенобиотика наибольшей интенсивности блеббинг достигал после 30–45 мин инкубации. Максимальным мембранотоксическим эффектом (регистрируемым по начальному блеббингу плазматической мембраны), но не проявляющим значительного цитолитического действия обладала концентрация доксорубицина 10^{-6} М (рис. 1).

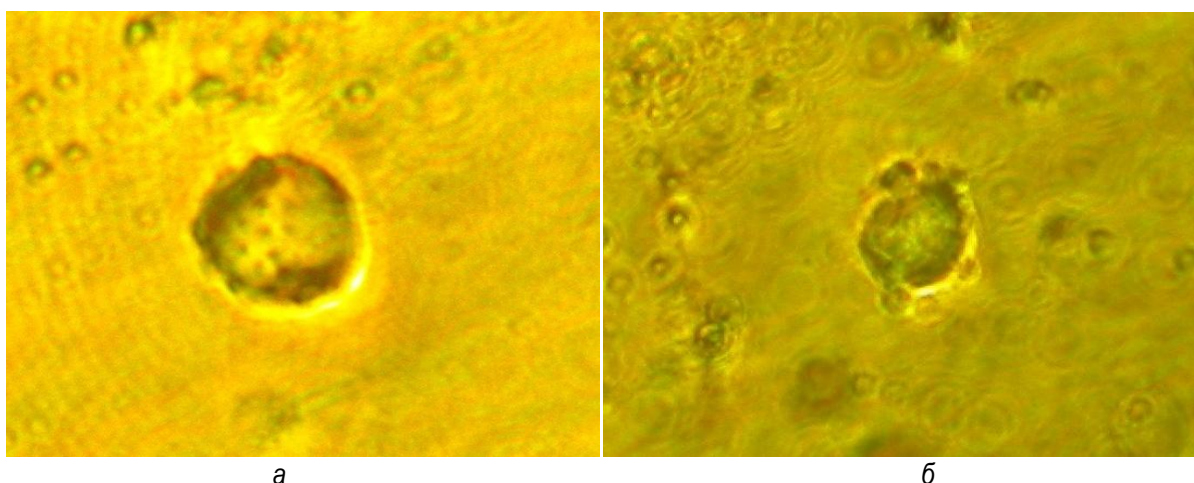


Рис. 1. Индукция начального и терминального блеббинга плазматической мембраны клеток костного мозга при инкубации с доксорубицином (10^{-6} М, 1 ч): а – 15-я минута инкубации – клетка в состоянии начального блеббинга; б – 45-я минута инкубации – клетка в состоянии терминального блеббинга $\times 900$

Интересно, что процессы терминального блеббинга более отчетливо проявлялись при низких дозах доксорубицина, а с увеличением концентрации ксенобиотика их интенсивность значительно снижалась. В максимальной из тестируемых концентрации (5×10^{-6} М) доксорубицин оказывал выраженное цитотоксическое действие, проявляющееся развитием некроза (табл.), что согласуется с тем, что умеренное цитотоксическое воздействие индуцирует блеббинг, носящий обратимый характер, а выраженное цитотоксическое воздействие вызывает интенсивный блеббинг и некроз клеток [6, 7].

Мембранотоксичность доксорубицина в отношении клеток костного мозга *in vitro* и *in vivo*, % от общего количества клеток

Серия	Показатель	Время инкубации, мин				
		5	15	30	45	60
Контроль	Начальный блеббинг	1,50 ± 0,0	1,50 ± 1,06	6,33 ± 0,82	1,88 ± 0,79	1,0 ± 0,47
	Терминальный блеббинг	0,50 ± 0,33	1,25 ± 0,29	2,50 ± 0,35	2,0 ± 0,53	1,58 ± 0,43
	Некроз	7,38 ± 1,57	8,38 ± 0,92	10,17 ± 1,14	10,25 ± 1,46	11,50 ± 1,55
ДОК, 5×10^{-7} М	Начальный блеббинг	5,0 ± 0,91***	6,13 ± 1,38*	6,33 ± 0,89	6,63 ± 1,26**	13,0 ± 1,64****
	Терминальный блеббинг	1,40 ± 0,33	1,50 ± 0,31	2,10 ± 0,45	2,0 ± 0,25	1,75 ± 0,27
	Некроз	19,0 ± 2,83**	20,17 ± 3,21**	20,67 ± 2,68*	21,0 ± 3,74*	21,50 ± 2,27**
ДОК, 10^{-6} М	Начальный блеббинг	10,38 ± 3,25*	11,20 ± 2,04***	14,10 ± 1,83***	22,10 ± 1,90****	13,90 ± 1,60****
	Терминальный блеббинг	1,08 ± 0,26	1,25 ± 0,31	1,92 ± 0,33	1,92 ± 0,17	1,42 ± 0,30
	Некроз	14,90 ± 1,02***	15,0 ± 1,79**	15,60 ± 1,01**	17,10 ± 1,18***	17,60 ± 1,83*
ДОК, 5×10^{-6} М	Начальный блеббинг	7,0 ± 1,41**	5,67 ± 0,41*	9,33 ± 0,74	5,67 ± 0,54**	5,17 ± 0,89***
	Терминальный блеббинг	0,83 ± 0,41	1,0 ± 0,35	1,50 ± 0,35	0,67 ± 0,20	0,67 ± 0,54
	Некроз	40,67 ± 2,27****	41,0 ± 2,55****	42,17 ± 0,89****	44,0 ± 0,35****	44,17 ± 0,41****
ДОК, 24 ч	Начальный блеббинг	17,0 ± 1,27****	13,38 ± 0,86****	12,75 ± 1,71**	11,75 ± 1,67***	8,50 ± 0,85****
	Терминальный блеббинг	2,38 ± 0,36***	2,25 ± 0,37	3,63 ± 0,76	3,25 ± 0,50	1,38 ± 0,28
	Некроз	17,38 ± 1,53****	18,50 ± 1,78****	20,63 ± 0,98****	21,63 ± 1,26****	21,88 ± 1,26***
ДОК, 10 дней	Начальный блеббинг	10,50 ± 2,21**	9,27 ± 1,81**	7,34 ± 1,24	5,11 ± 0,41**	4,83 ± 0,89**
	Терминальный блеббинг	1,33 ± 0,74	1,15 ± 0,20	1,49 ± 0,37	1,72 ± 0,54	1,83 ± 0,74
	Некроз	24,17 ± 1,08****	25,35 ± 1,58****	26,89 ± 1,83****	28,77 ± 2,06****	30,33 ± 1,08****

Примечание. Достоверность отличий по сравнению с контролем: * $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,001$.

Острое и подострое введение доксорубина мышам *in vivo* также сопровождалось индукцией начального блеббинга и некроза, причем максимум начального блеббинга регистрировался на 5-й минуте инкубации с последующим снижением количества блеббингующих клеток при 1- и 10-дневных инъекциях ксенобиотика. Аналогичным образом индукция терминального блеббинга более отчетливо проявлялась на 5-й минуте инкубации. Число клеток с морфологическими признаками некроза оставалась достоверно повышенным на протяжении всего периода инкубации с преобладанием интенсивности некроза при подостром воздействии доксорубина (см. табл.).

Блеббинг-индуцирующий эффект доксорубина коррелировал с увеличением относительного количества гемопоэтических клеток с морфологическими признаками апоптоза при культивировании их в диффузионных камерах. При этом ксенобиотик проявлял дозозависимый эффект. Максимальная индукция апоптоза отмечалась при использовании доксорубина в наименьшей концентрации (5×10^{-7} М) (рис. 2). Это соответствует имеющимся сведениям о том, что чем выше концентрация в клетке молекул с прооксидантной активностью, вызывающих накопление преимущественно нерепарабельных повреждений биомакромолекул клеток, тем выше вероятность индукции не апоптотических, а некротических процессов как варианта пассивной гибели клетки [6].

Таким образом, нами установлен факт наличия дозовой зависимости в характере цитоповреждающего действия ксенобиотика антрациклинового ряда в клетках костного мозга: увеличение дозы доксорубина сопровождалось наименьшим потенцированием клеточной гибели по пути апоптоза, и, наоборот, применение ксенобиотика в наименьшей концентрации приводило к появлению максимального количества клеток с морфологическими признаками апоптоза.

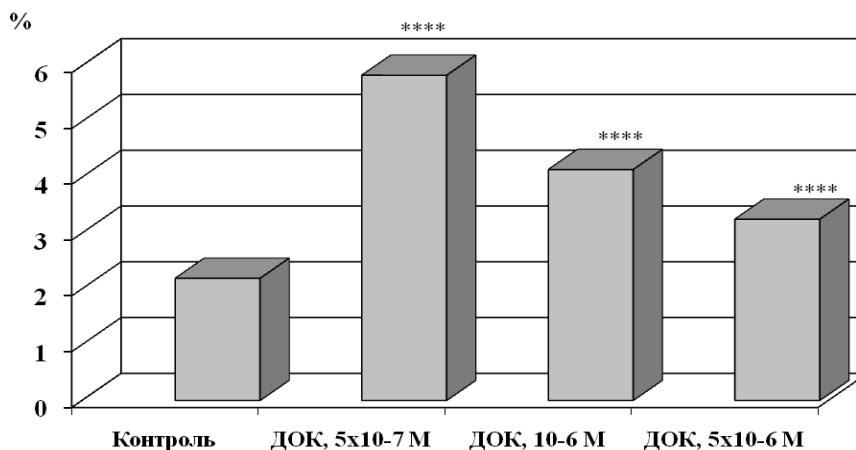


Рис. 2. Влияние доксорубина на процессы запрограммированной клеточной смерти: по оси абсцисс: ДОК – инкубация с доксорубином в концентрации 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} М; по оси ординат – относительное количество клеток с признаками апоптоза

Выявленное цитотоксическое действие доксорубина сопровождалось потенцированием клеточной гибели по пути апоптоза и динамическими изменениями плазматической мембраны клеток костного мозга (блеббингом), отражающими степень выраженности нарушений мембран-цитоскелетных взаимодействий, и – при увеличении дозы ксенобиотика – разрушением мембраны (некроз).

Дальнейший прогресс в понимании тонких механизмов нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий создаст базу для разработки новых фармакологических подходов в терапии злокачественных заболеваний системы крови, а также значительно расширит наши представления о биологии клеточного повреждения и регуляции функциональной активности клеток.

Литература

1. Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В. Противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда и система крови. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1986. – 240 с.
2. Индукция апоптоза в клетках костного мозга опосредуется активностью пуринергических рецепторов / Ю.А. Успенская [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2004. – Т. 138. – № 8. – С. 135–138.
3. Успенская Ю.А., Салмина А.Б. Роль нарушений экспрессии коннексинов в развитии апоптоза клеток костного мозга при действии миелотоксического ксенобиотика // Сиб. мед. журн. – 2007. – № 1. – С. 51–54.

4. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity / G. Minotti [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2004. – Vol. 56. – P. 185–229.
5. Charras G.T. A short history of blebbing // J. Microsc. – 2008. – Vol. 231. – № 3. – P. 466–478.
6. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines / J.M. Dypbukt [et al.] // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269. – № 48. – P. 30553–30560.
7. Doonan F., Cotter T.G. Morphological assessment of apoptosis // Methods. – 2008. – Vol. 44. – № 3. – P. 200–204.
8. Gough N.R. When repair is suicide // Sci. Signal. – 2009. – Vol. 2. – № 85. – P. 283.
9. Hagmann J., Burger M.M., Dagan D. Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton // J. Cell Biochem. – 1999. – Vol. 73. – № 4. – P. 488–499.
10. Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation / R.G. Deschesnes [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2001. – Vol. 12. – № 6. – P. 1569–1582.
11. Lane J.D., Allan V.J., Woodman P.G. Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells // J. Cell Sci. – 2005. – Vol. 118. – P. 4059–4071.
12. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I / M.L. Coleman [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2001. – Vol. 3. – № 4. – P. 339–345.
13. Shiratsuchi A., Mori T., Nakanishi Y. Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells // J. Biochem. – 2002. – Vol. 132. – P. 381–386.



УДК 619:616-091.8:636.52/58

Е.Г. Турицына

МОРФОЛОГИЯ ОРГАНОВ ИММУНОГЕНЕЗА КУР ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ НЕИНФЕКЦИОННОЙ ЭТИОЛОГИИ

Изучена морфологическая характеристика органов иммунной системы кур при экстремальных состояниях неинфекционной этиологии – транспортном и низкотемпературном стрессе, механической травме конечностей, алиментарном истощении.

Установлено развитие акцидентальной инволюции в тимусе, степень которой зависит от характера экстремального фактора и длительности его воздействия. В фабрициевой бурсе и селезенке определена преждевременная инволюция лимфоидных структур.

Ключевые слова: куры, морфология, иммуногенез, тимус, фабрициева Bursa, селезенка, экстремальные состояния.

Е.Г. Turitsyna

HENS IMMUNOGENESIS ORGANS MORPHOLOGY IN EXTREME CONDITIONS OF NON-INFECTIOUS AETIOLOGY

Henimmune organs morphological characteristics in extreme conditions of non-infectious aetiology – transport and low-temperature stress, limbs mechanical trauma, alimentary cachexia is studied in the article. The development of thymus accidental involution which degree depends on the extreme factor character and its influence duration is established. Lymphoid structures premature involution in bursa of Fabricius and spleen is defined.

Key words: hens, morphology, immunogenesis, thymus, bursa of Fabricius, spleen, extreme conditions.

В условиях промышленных птицеводческих предприятий организм птиц нередко находится в экстремальном состоянии, обусловленном факторами инфекционной и неинфекционной этиологии, что ведет к развитию дисбаланса иммунной системы птиц. Экстремальные состояния возникают, прежде всего, при нарушениях технологической дисциплины на всех этапах производственного цикла, начиная с процессов инкубации [3, 4, 7].

Истощение лимфоидной ткани при различных видах хронических стрессов у лабораторных животных и человека отмечено многими авторами [2, 5, 8]. В то же время сведения о влиянии стрессовых факторов неинфекционной этиологии на иммунную систему кур противоречивы и требуют уточнения, так как большин-