

Ю.Е. Квачева

ЭМПЕРИПОЛЕЗ И МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТРАДИАЦИОННОЙ АПЛАЗИИ МЕГАКАРИОЦИТАРНОГО РОСТКА ГЕМОПОЭЗА

Yu.E. Kvacheva

Emperipolesis and Mechanism of Post-Irradiation Megakaryocytopoietic Aplasia

РЕФЕРАТ

Цель: Изучить эмпериполез мегакариоцитов костного мозга при остром радиационном воздействии на организм (в условиях эксперимента).

Материал и методы: Осуществлено патоморфологическое исследование костного мозга 28 собак, облученных в минимальной абсолютно летальной дозе LD_{100/45} 4 Гр. В стандартно приготовленных гистологических срезах, окрашенных с применением рутинных и специальных (ISEL, In Situ End Labeling) методик, оценивали параметры парциальной мегакариоцитогаммы, а также учитывали мегакариоцитарный эмпериполез (%), подсчитывая мегакариоциты с внедрившимися в пределы их цитоплазмы и на «территорию» ядра гемопоэтическими элементами.

Результаты: Изменения со стороны мегакариоцитопоэза, прослеживаемые *in situ*, имели двухфазовый характер. В течение первых 24 ч общее число мегакариоцитов в костном мозге собак достоверно возрастало при одновременном формировании большей популяции зрелых форм. В дальнейшем количество мегакариоцитарных клеток быстро снижалось: к окончанию третьих суток в 3 раза и более, а к седьмым суткам мегакариоциты в костном мозге не встречались. В процессе убывания их численности не удается выявить морфологические признаки апоптотической гибели (среди морфологически распознаваемых мегакариоцитов не идентифицировались ISEL-позитивные клетки, подобные наблюдаемым в красном и белом ростках), а также повышенного расходования пула мегакариоцитарных элементов на «производство» кровяных пластинок. Указанные количественные и качественные изменения популяции мегакариоцитов сопровождались увеличением интенсивности эмпериполеза при наличии морфологических признаков цитоллиза мегакариоцитарных элементов костного мозга.

Заключение: Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что в условиях острого радиационного поражения организма усиление мегакариоцитарного эмпериполеза влечет за собой негативные последствия: гибель зрелых клеток мегакариоцитарного ряда на фоне прекращения его «подпитки» из популяции коммитированных предшественников. Это дает основание считать, что рассматриваемый феномен может вносить самостоятельный вклад в развитие аплазии мегакариоцитарного ростка.

Ключевые слова: эмпериполез, мегакариоциты, пострадиационная аплазия, кровотворение, костный мозг

ABSTRACT

Purpose: To investigate the phenomenon of megakaryocytic emperipolesis (the interrelations between megakaryocytes and hemopoietic cells) *in situ* in the bone marrow of dogs under conditions of acute radiation injury.

Material and methods: Pathomorphologic study of the bone marrow samples of 28 animals exposed to external gamma-irradiation with a single dose of 4 Gy (LD_{100/45}) was undertaken. The indices of partial megakaryocytopoiesis and incidence of emperipolesis (%) were assessed in sections of the spinal vertebra stained with routine and special (In Situ End Labeling, ISEL) histological methods.

Results: As a result of this study it was established that irradiation causes two-phase alterations in the total megakaryocytes (MKs) cellularity. Within the first 24 h (the 1st phase) there was an obvious increase of MKs number along with radiation-induced acceleration of committed precursors and accumulation of mature megakaryocytic cells. Within the 2nd post-exposure phase (3–7 days after irradiation) the total MKs cellularity was decreasing rapidly. This process was not found to be associated with bone marrow megakaryocytic apoptosis (MKs negativity to ISEL-staining). In addition there were no morphologic features of extensive platelet budding, and the number of naked MKs was not apparently increased. At the same time megakaryocytic emperipolesis was shown to be increased in all bone marrow slides studied and was revealed to be occurring via both non-cytolytic and cytolytic (28–35 %) morphologic variants.

Conclusion: On the basis of the results obtained here the phenomenon of megakaryocytic emperipolesis is suggested to be an independent mechanism of postirradiation aplasia of megakaryocytic lineage.

Key words: emperipolesis, megakaryocytes, post-irradiation aplasia, hemopoiesis, bone marrow

Введение

Механизмы формирования пострадиационной аплазии мегакариоцитарного ростка гемопоэза во многом остаются неясными. С одной стороны, в силу полиплоидной природы мегакариоцитов их приня-

то относить к клеточным элементам с высокой (т.н. «абсолютной») радиорезистентностью [1]. С другой стороны, хорошо известно, что для острых радиационных поражений характерно быстрое исчезновение мегакариоцитов из костного мозга без прямых морфологических свидетельств их гибели [2]. Можно

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: ulia_kvacheva@mail.ru

Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. E-mail: ulia_kvacheva@mail.ru

предположить, что такое состояние рассматриваемой проблемы во многом является следствием недостаточной изученности пострадиационного мегакариоцитопоза в аспекте морфологии *in situ*. В частности, одним из нерешенных остается вопрос о возможной патогенетической роли мегакариоцитарного эмпериполеза [3, 4].

Термин «эмпериполез» (*emperipolesis*, греч. *em* — в, вовнутрь; *peri* — вокруг; *poleomai* — странствовать, блуждать, т.е. буквально «странствие вовнутрь и вокруг») был предложен в 1956 г. для обозначения морфологического феномена проникновения и временного пребывания одних клеток внутри других. В оригинальном описании Humble J.G. et al. [5] высказали предположение, что подобные межклеточные взаимоотношения, в отличие от фагоцитоза, имеют характер «мирного сосуществования» (симбиоз), т.е. не причиняют вреда ни одной из клеток-участниц. Впоследствии, однако, было установлено, что исходом эмпериполетического взаимодействия может стать гибель клетки-реципиента (например, цитоллиз гепатоцитов вследствие интериоризации лимфоцитов при хроническом активном гепатите [6]). И «мирный», и цитолитический (иногда именуемый также патологическим или цитотоксическим [4]) варианты эмпериполеза остаются предметом интенсивного изучения, в т.ч. в отношении мегакариоцитов костного мозга.

Ранее проведенные исследования костного мозга здоровых собак [7] показали, что наблюдаемые *in situ* взаимоотношения мегакариоцитов с клетками гемопоэза (преимущественно полинуклеарными лейкоцитами и лимфоцитами) характеризуются определенной этапностью развития и завершаются гибелью части морфологически распознаваемых клеточных элементов мегакариоцитарного роста, соответствуя, таким образом, варианту цитолитического эмпериполеза. На основании анализа морфологической картины, прослеженной в нескольких анатомических локализациях костного мозга, был постулирован системный характер рассматриваемого явления и высказано предположение о его физиологической целесообразности, связанной с нормальной регуляцией количественного и/или качественного состава популяции костномозговых родоначальников тромбоцитов (неэффективный мегакариоцитопоз).

В связи со сказанным представляет интерес изучение мегакариоцитарного эмпериполеза в условиях острого радиационного поражения организма, сведения о котором, представленные в литературе, крайне ограничены и противоречивы. Это и стало целью настоящего исследования.

Материал и методы

Группу подопытных животных составили 28 собак обоего пола в возрасте 1,5–2 лет, массой тела 10–12 кг, подвергнутых однократному тотальному воздействию равномерного γ -облучения Co^{60} на установке ЭГО-2 в минимальной абсолютно летальной дозе ($\text{LD}_{100/45}$) 4 Гр при мощности дозы 2,5 Гр/мин (продолжительность облучения составляла 93 с). Животных умерщвляли электротокком, осуществляя забор материала с «коротким шагом» между сроками наблюдения: через 30 мин, 3, 6, 18, 24 ч, 3 и 7 суток после радиационного воздействия. На каждый срок исследовали 4 собаки. Для гистологического исследования материал (костный мозг тела поясничного позвонка) фиксировали в 10 %-ом растворе нейтрального формалина, заливали в целлоидин-парафин. Кости декальцинировали в 25 %-ом растворе трилона Б (EDTA). Изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, окрашивание которых проводили с применением рутинных (азурII-эозин) и специальных (ISEL, *In Situ End Labeling*, т.н. концевое мечение *in situ*) методик. В последнем случае использовали коммерческий набор реагентов TACS TdT Kit (R&D Systems, Великобритания); подробности изложены в работе [8]. В каждом из изученных случаев учитывали мегакариоцитарные элементы, определяемые в общей сложности в 200 произвольно выбранных (т.н. случайных) полях зрения микроскопа, подразделяя обнаруживаемые клетки в соответствии с общепринятыми критериями [9] на мегакариобласты, промегакариоциты и зрелые мегакариоциты (парциальная мегакариоцитограмма). Помимо этого, учитывали мегакариоцитарный эмпериполез (%), подсчитывая мегакариоциты костного мозга с внедрившимися в пределы их цитоплазмы и на «территорию» ядра гемопоэтическими элементами [7]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Контролем служили необлученные животные (10) того же возраста и веса.

Результаты и обсуждение

Установлено, что динамика количественных изменений популяции морфологически определяемых элементов мегакариоцитопоза, прослеженная *in situ* в гистологических срезах костного мозга облученных в минимальной абсолютно летальной дозе 4 Гр собак, имела двухфазовый характер. В течение первых 24 ч (1-я фаза) общее содержание мегакариоцитов костного мозга (из расчета $M \pm m$ на 10 полей зрения микроскопа) достоверно возросло (таблица).

При этом поступление клеток в мегакариоцитарный рост из пула предшественников многократно снижалось, на что указывало прогрессирувавшее к 24

ч уменьшение абсолютного числа мегакариобластов. В то же время формировалась бóльшая популяция зрелых форм: к окончанию первых суток увеличилось абсолютное содержание мегакариоцитарных элементов, морфологически идентифицированных как промегакариоциты и зрелые мегакариоциты; в соотношении с мегакариобластами доли первых и вторых возрастали на порядок (с 1:1,5:9,1 в контроле до 1:22,0:86,7 к 24 часам). Такая динамика показателей парциальной мегакариоцитограммы, очевидно, являлась отражением продолжавшегося «наращивания» плоидности гигантоядерных клеток костного мозга и свидетельствовала об их ускоренном созревании.

Тем не менее, несмотря на обнаруживаемое в течение первых суток после облучения в дозе 4 Гр увеличение общего содержания мегакариоцитов в костном мозге, в дальнейшем (2-я фаза) их численность быстро снижалась (таблица): к окончанию третьих суток — более, чем в 3 раза ($11,8 \pm 0,1$ против $39,6 \pm 0,6$ в контроле, $p < 0,05$), а к исходу недельного наблюдения (7-е сутки) родоначальники тромбоцитов в гистологических срезах костного мозга практически не встречались.

Основываясь на анализе морфологической картины костного мозга, причину этого явления трудно связать с повышенным расхождением мегакариоцитов на «отшнуровывание» пластинок (т.е. усилением костномозгового тромбоцитопоеза) или с их гибелью.

В частности, в миелоидной ткани облученных собак не наблюдалось интенсификации клазматоза (отщепления мегакариоцитами цитоплазматических фрагментов, формирующих тромбоциты) и увеличения содержания т.н. «голаядерных» (т.е. лишившихся своей цитоплазмы вследствие названного процесса) мегакариоцитарных клеток. Напротив, их среднее число в соотношении с нормальными (без признаков редукции цитоплазмы) мегакариоцитами костного мозга оставалось на уровне контроля (1–3 «голых ядра» на 10 нормальных клеток). Примечательно, что в эти же сроки наблюдения (первые 24 ч) «голые» ядра клеток-гигантов (в количестве 1–2 в стандартном поле зрения микроскопа при большом увеличении) обнаруживались в легких подопытных животных, что может свидетельствовать об усилении т.н. «легочно-го» тромбоцитопоеза (т.е. выработки кровяных пластинок в сосудистом русле легких [10]).

В равной мере на материале наших наблюдений не представляется возможным связать убыль мегакариоцитов с их пострadiационной гибелью (ранним некробиозом). Насколько известно из доступных источников литературы, и ранее предпринимавшиеся попытки обнаружить некробиотические изменения мегакариоцитов у подвергшихся острому радиационному воздействию людей и экспериментальных жи-

вотных оказывались безуспешными [2]. В настоящем исследовании, выполненном с использованием методики концевой мечения *in situ* в целях идентификации интрамедуллярного апоптоза, ISEL-позитивные клеточные элементы не определялись среди морфологически распознаваемых клеток мегакариоцитарного ряда, в отличие от демонстрировавших ISEL-позитивность клеточных представителей эритроидного и миелоидного ростков кроветворения.

В этой связи интересны указания авторов работы [11] на особый характер апоптоза зрелых мегакариоцитов (без *ядерно*-соматического дробления). Другие исследователи [12] применительно к клеткам мегакариоцитарного роста предлагают использовать термин *para-apoptosis* (т.е. нечто похожее, напоминающее или близкое), отмечая, что в отсутствии характерных морфологических признаков апоптоза доступными для регистрации оказываются лишь отдельные биохимические реакции каскада каспаз.

В рамках дискуссии по данному вопросу полагаем возможным высказать собственное предположение. Апоптотическая самодеструкция клеток, как известно, требующая значительных энергетических затрат на деградацию ядерной ДНК, весьма «неэкономична», а поэтому малоприемлема для полиплоидных клеточных гигантов, у 2/3 из которых содержание ДНК от 8 до 16 раз превышает таковое в обычных диплоидных клетках. Логично поэтому предположить, что для разрушения мегакариоцитов могут задействоваться другие пути, одним из которых, возможно, является эмпериполез. В условиях стабильного кроветворения, как было сказано выше, этот механизм может выступать в качестве инструмента неэффективного мегакариоцитопоеза, по сути (но не по форме!) являясь аналогом неэффективного поэза в других кроветворных ростках, реализуемого путем апоптоза. В то же время при экстремальных воздействиях на организм эмпериполез, очевидно, может быть причастен к патогенезу мегакариоцитарных дис- и аплазий. На это косвенно указывают данные, полученные в настоящем исследовании.

В охваченный наблюдением период времени (с 30 мин до 24 ч) в костном мозге собак, облученных в LD_{100/45}, установлено возрастание интенсивности мегакариоцитарного эмпериполеза (таблица). Одной из вероятных причин этого явления, на наш взгляд, может быть связанная с радиационным воздействием цитокиновая «какофония», поскольку известно, что нарушение баланса гемопозитических факторов способствует его усилению [13].

Bobik R. и Dabrowski Z. [3], также обнаружившие возрастание интенсивности мегакариоцитарного эмпериполеза (с 15 % в контроле до 34 % в опыте) при изучении цитологических препаратов костного мозга

Таблица

Количество мегакариоцитов и отдельные параметры мегакариоцитограммы в костном мозге собак в различные сроки после общего внешнего гамма-облучения в дозе 4 Гр (LD_{100/45})

Время после облучения	Кол-во МГКЦ*	Параметры мегакариоцитограммы (пределы колебаний)			Эмпериполез (%)
		Мегакариобласты	Промегакариоциты	Мегакариоциты	
30 мин	48,7 ± 0,4**	3,1 (1,5–4,7)	8,7 (5,6–12,6)	36,9 (30,0–41,8)	36,5 ± 2,0**
3 ч	55,4 ± 0,5**	5,0 (3,3–6,5)	12,7 (8,5–17,7)	37,8 (28,0–43,1)	37,2 ± 2,6**
6 ч	55,1 ± 0,4**	4,5 (2,5–8,3)	15,0 (11,2–18,3)	35,6 (32,5–39,3)	34,7 ± 1,8**
18 ч	37,9 ± 0,3	1,7 (1,4–1,9)	6,3 (3,1–8,2)	29,9 (23,8–37,8)	35,8 ± 1,9**
24 ч	45,0 ± 0,3**	0,4 (0–0,8)	8,8 (6,2–13,4)	34,5 (30,9–41,9)	36,1 ± 2,1**
3 сут	11,8 ± 0,1**	0,03 (0–0,1)	0,2 (0,05–0,25)	11,6 (10,4–12,6)	13,8 ± 3,7**
7 сут	0	0	0	0	—
Контроль	39,0 ± 0,6	28,2 ± 1,8	4,7 ± 1,4	3,1 ± 0,1	30,4 ± 0,8

Примечание:

* $M \pm m$ мегакариоцитов (МГКЦ) на 10 полей зрения микроскопа;

** – достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$

сублетально облученных мышей, высказали мнение о его ассоциации с ранней перераспределительной реакцией клеток костномозгового резерва, объясняя этот феномен их форсированным, но «мирным» преодолением стенок синусоидных сосудов, в тесном контакте с которыми располагаются мегакариоциты. Возможно, это суждение справедливо применительно к конкретным условиям облучения и объекту экспериментальных исследований авторов упомянутой работы.

Вместе с тем в наших наблюдениях, выполненных на гистологических срезах костного мозга крупных лабораторных животных (собак), при помощи светооптической микроскопии удавалось выделить несколько морфологических вариантов межклеточного взаимодействия мегакариоцитов с клетками костного мозга, представленных следующими образцами.

Первый вариант характеризовался аккумуляцией клеток гемопоэза (преимущественно полинуклеарных гранулоцитов, среди которых нередко можно было видеть и лимфоидные элементы) в непосредственной близости от цитоплазматической мембраны мегакариоцита с внедрением в периферийные зоны его цитоплазмы (рис. 1, а). Преодолевая клеточную оболочку, «клетки-гости» (число которых в наших случаях варьировало от 1–2 до 15–20) проникали внутрь мегакариоцита, будучи окружены светлыми зонами.

Другой морфологический вариант эмпериполетического взаимодействия был представлен мегакариоцитами, у которых вторжение «пришельцев» распространялось также на «территорию» ядра (рис. 1, б). В этом случае по мере увеличения численности за-

полнявших мегакариоцит гранулоцитов и лимфоцитов, площадь первого многократно увеличивалась, границы становились неразличимыми, а от ядра оставались лишь небольшие разрозненные фрагменты (рис. 1, с). В конечном итоге на месте мегакариоцита обнаруживались локальные скопления гранулоцитов и лимфоцитов, напоминавшие «решето» (рис. 1, d), т.е. имел место мегакариоцитарный цитоллиз.

Обозначенные выше морфологические варианты мегакариоцитарного эмпериполеза, по-видимому, представляют собой этапы его морфогенеза, поэтому установить их реальное количественное соотношение достаточно затруднительно. По нашим ориентировочным оценкам, морфологические признаки второго (разрушительного) варианта межклеточного взаимодействия прослеживались у 28–35 % клеток от общего числа мегакариоцитов, демонстрировавших эмпериполез в костном мозге облученных собак. У контрольных животных доля таких мегакариоцитарных элементов, по нашим наблюдениям, не превышала 10–12 %.

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют предположить, что в условиях острого радиационного поражения организма усиление мегакариоцитарного эмпериполеза влечет за собой негативные последствия: гибель зрелых клеток мегакариоцитарного ряда на фоне прекращения его «подпитки» из популяции коммитированных предшественников. Это дает основание считать, что рассматриваемый феномен может вносить самостоятель-

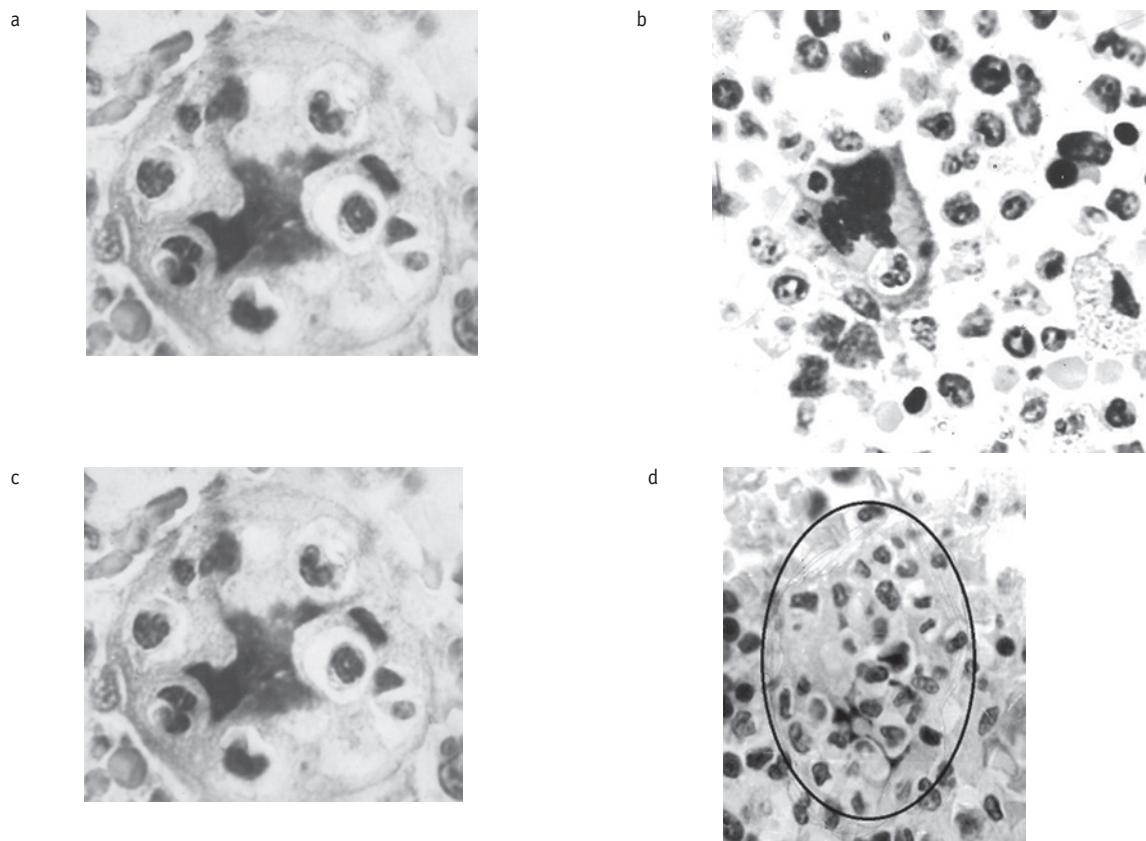


Рис. 1. а, b, с, d. Мегакариоцитарный эмпериполез в костном мозге собаки, облученной в дозе 4 Гр. Микрофотография (комментарии в тексте)

ный вклад в развитие аплазии мегакариоцитарного ростка, влияя, по-видимому, и на его восстановление. Так, в костном мозге людей с острой лучевой болезнью, скончавшихся спустя 4–14 недель после острого радиационного воздействия в результате аварии на Чернобыльской АЭС, при наличии морфологических признаков миелоидной регенерации интенсивность мегакариоцитарного эмпериполеза составляла 20–30 % [14]. Это согласуется с данными Calvo W. et al. [4], полученными в эксперименте на крупных лабораторных животных.

С указанным обстоятельством, по-видимому, может быть связано некоторое запаздывание по времени, в сравнении с другими кроветворными ростками, пострадиационного восстановления численности популяции мегакариоцитов. Из литературы [13, 15] известны в определенной степени обнадеживающие попытки терапевтической коррекции интенсивности данного феномена с положительной динамикой тромбоцитопении при ряде гематологических заболеваний, что создает теоретические предпосылки для поиска путей воздействия на цитолитический эмпериполез и в условиях лучевой патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Груздев Г.П., Чистопольский А.С., Суворова Л.А. Радиочувствительность и пострадиационная кинетика мегакариоцитарного роста костного мозга (анализ по данным последствий аварии на ЧАЭС). // Радиационная биология. Радиоэкология, 1996, **36**, Вып. 2, С. 250–263.
2. Иванов А.Е., Куршакова Н.Н., Шиходыров В.В. Патологическая анатомия лучевой болезни. — М.: Медицина, 1981, 303 с.
3. Bobik R., Dabrowski Z. Emperipolesis of marrow cells within megakaryocytes in the bone marrow of sublethally irradiated mice. // Ann. Haematol., 1995, **70**, No. 2, P. 91–95.
4. Calvo W., Alabi R., Nothdurft W., Flidner T.M. Cytotoxic immigration of granulocytes into megakaryocytes as a late consequence of irradiation. // Radiat. Res., 1994, **138**, No. 2, P. 260–265.
5. Humble J.G., Jayne W.H., Pulvertaft R.J. Biological interaction between lymphocytes and other cells. // Brit. J. Haematol., 1956, **2**, No. 3, P. 283–294.
6. Bechtelsheimer H., Gedgik P., Muller R., Klein H. Aggressive emperipolesis in chronic hepatitis. // Klin. Wochenschr., 1976, **54**, No. 3, P. 137–140.

7. Власов П.А., Квачева Ю.Е. Эмпериполез и взаимоотношения между мегакариоцитами и нейтрофильными гранулоцитами в костном мозге здоровых собак (морфологические аспекты). // Гематол. и трансфузиол., 1998, **43**, № 5, С. 23–25.
8. Квачева Ю.Е. Апоптотическая гибель клеток костного мозга в восстановительном периоде острой лучевой болезни и ее роль в патогенезе гематологического синдрома. // Мед. радиол. и радиац. безопасность, 2002, **47**, №5, С. 17–22.
9. Соболева Т.Н., Владимирская Е.Б. Морфология клеток крови в нормальном кроветворении (методические рекомендации для врачей-лаборантов и гематологов). — М.: Издательство «Лабпресс», 2001, 32 с.
10. Zucker-Franklin D., Philipp C.S. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultra-structural evidence for an old concept. // Amer. J. Pathol., 2000, **157**, No. 1, P. 69–74.
11. Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Буторина Е.В. Тромбоцитопоз. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2007, С. 47–48.
12. Houwerzijl E.J., Blom N.R., van der Want J.J. et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. // Blood, 2004, **103**, No. 2, P. 500–506.
13. Migita M., Fukunaga Y., Watanabe A. et al. Emperipolesis of neutrophils by megakaryocytes and thrombocytopenia observed in a case of Kostmann's syndrome during intravenous administration of high-dose rhG-CSF. // Brit. J. Haematol., 1992, **80**, No. 3, P. 413–415.
14. Квачева Ю.Е., Власов П.А. Патоморфологическое исследование органов кроветворения погибших от острой лучевой болезни в результате аварии на Чернобыльской АЭС. // Мед. радиол. и радиац. безопасность, 1994, **39**, № 3, С. 12–14.
15. Aslan D. Emperipolesis in immune thrombocytopenic purpura. // Ind. J. Pathol. Microbiol., 2009, **52**, No. 2, P. 289–290.

Поступила: 07.04.2014

Принята к публикации: 18.06.2014