

БИОХИМИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 611.37

ИССЛЕДОВАНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ МОЛОДЫХ И СТАРЕЮЩИХ КРЫС

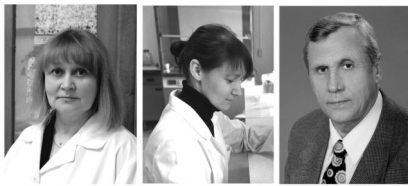
Е.С.Петрова¹ - к.б.н., с.н.с.; Е.А.Колос¹ - м.н.с.; Е.И.Чумасов^{1,2} - д.б.н., профессор

¹Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

²Кафедра биологии, экологии и гистологии ФГБОУ ВО СПбГАВМ

Ключевые слова: тучные клетки, поджелудочная железа, крысы, старение

Key words: mast cells, pancreas, rats, aging.



РЕФЕРАТ

Тучные клетки способны синтезировать множество биологически активных веществ (гистамин, простаноиды, нейропептиды, протеазы и ряд цитокинов и хемокинов), участвующих в регуляции различных процессов в органах и тканях в норме и патологии. Актуальность исследования тучных клеток поджелудочной железы связана с их участием в заболеваниях поджелудочной железы млекопитающих различной этиологии: при амилоидозе, сахарном диабете, панкреатите. Вопрос о морфологических и функциональных особенностях возрастных изменений тучных клеток до сих пор остается малоизученным. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование тучных клеток в поджелудочной железе молодых и стареющих крыс. Крыс-самцов Вистар в возрасте 3 мес и 18-19 мес (n=8) умерщвляли в парах этилового эфира, выделяли поджелудочную железу и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида. Приготавливали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Тучные клетки выявляли с помощью окраски гистологических препаратов толуидиновым синим. Показано, что большинство тучных клеток в поджелудочной железе локализуется в соединительной ткани оболочки и интерстиции долек. Присутствие тучных клеток в дольках в области расположения ацинусов незначительно. В местах расположения выводных протоков, а также в островках Лангерганса тучные клетки практически не встречались. Единичные клетки обнаруживались вблизи островков, на границе с экзокринной частью железы. У трехмесячных и стареющих крыс был проведен подсчет тучных клеток на единицу площади в соединительной ткани междольковой области. Показано, что при старении плотность гранулярных тучных клеток в междольковой области поджелудочной железы крысы уменьшается приблизительно в 1,5 раза. По-видимому, уменьшение тучных клеток связано со снижением общего иммунного статуса организма при старении.

ВВЕДЕНИЕ

Тучные клетки (мастоциты, лаброциты) – клетки соединительной ткани, вырабатывающие многие биологически активные вещества и выполняющие многочисленные функции в органах и тканях. Известно, что они способны регулировать воспаление, врожденный иммунитет, аллергические реакции [7, 16]. Отмечена роль тучных клеток (ТК) при аутоиммунных заболеваниях [21]. Под влиянием антигенов, аллергенов, супероксидов, липопротеинов и др. ТК активируются. После активации они экспрессируют гистамин, лейкотриены и простаноиды, нейропептиды, а также протеазы и множество цитокинов и хемокинов [2, 16]. Актуальность исследования тучных клеток поджелудочной железы связана с их участием в заболеваниях поджелудочной железы различной этиологии: при амилоидозе, сахарном диабете, панкреатите [9, 13, 19, 20]. При развитии панкреатита у лабораторных животных наблюдается активация ТК в междольковых областях ПЖ [17]. Что касается морфофункциональных особенностей тучных клеток поджелудочной железы, проявляющихся с возрастом, то они остаются малоизученными. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование тучных клеток в поджелудочной железе молодых и стареющих крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы половозрелые крысы-самцы Вистар разного возраста: крысы в возрасте 3 мес (n=4) и стареющие крысы в возрасте 18-19 мес (n=4). При содержании и умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977г.). У животных выделяли поджелудочную железу и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [6]. После соответствующей обработки материал заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5 мкм, депарафинировали и окрашивали известным для избирательной окраски тучных клеток, методом - толуидиновым

синим (BioVitrum, Россия). Препараты исследовали под микроскопом Leica DM750, фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Подсчет тучных клеток проводили в междольковой области ПЖ. Измерение площади междольковой соединительной ткани и подсчет активированных и неактивированных ТК на единицу площади осуществляли с помощью программы ImageJ. Полученные данные пересчитывали на площадь 1 мм². Различия оценивали по t-критерию и считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У молодых животных на препаратах ПЖ, окрашенных толуидиновым синим, отчетливо различаются структурные элементы экзокринной и эндокринной частей железы: соединительнотканная капсула, выводные протоки, ацинусы выводных протоков, состоящие из экзокринных клеток, островки Лангерганса (ОЛ), крупные и мелкие сосуды: артериолы, венулы, капилляры, элементы междольковой соединительной ткани. ТК были идентифицированы по наличию характерных гранул в цитоплазме и по их окрашиванию в фиолетовый цвет. Толуидиновый синий проявляет эффект метакромазии при связывании его с содержащимися в гранулах тучных клеток протеогликанами. В нашей работе мы проводили анализ только тех тучных клеток, которые содержали в цитоплазме гранулы. Полностью дегранулированные клетки при гистологической окраске не идентифицируются. Были изучены ТК в неактивированном состоянии (когда гранулы располагаются компактно вблизи ядра) и в состоянии активации – выделения гранул из цитоплазмы ТК в близлежащие ткани. Установлено, что доля активированных ТК составляет 30-40%.

Большинство ТК располагается в ПЖ в междольковой области. Они выстраиваются в виде цепочки или группами в рыхлой соединительной ткани вдоль кровеносных сосудов. Часть из них находится в состоянии активации (рис. 1,а). В дольках ПЖ, среди эпители-

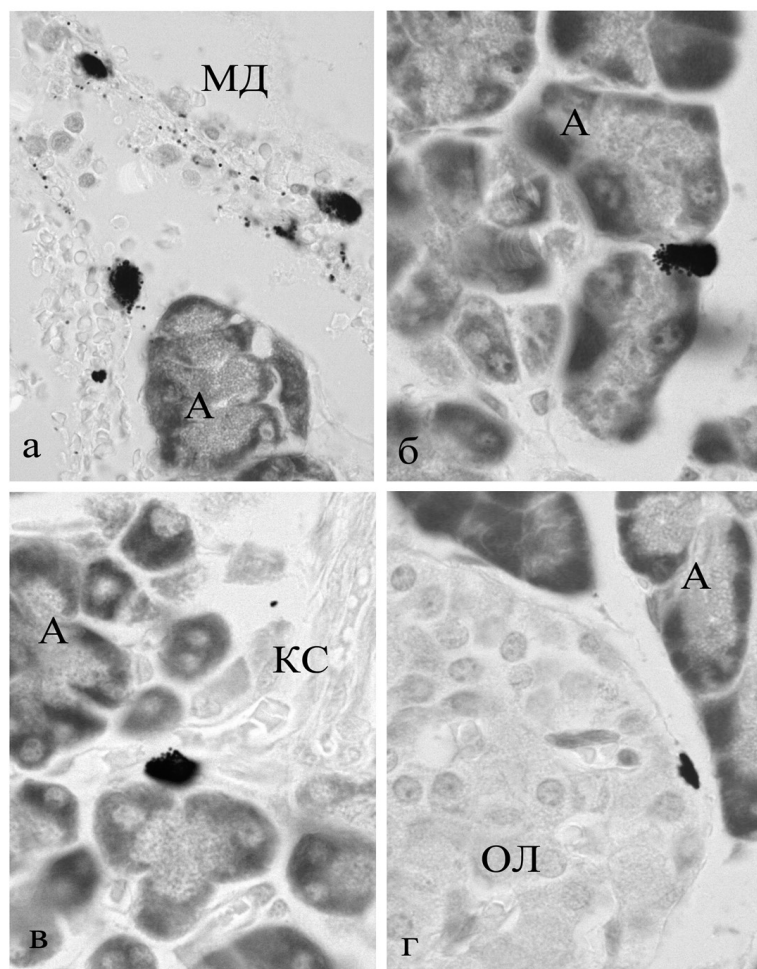


Рис. 1 - Тучные клетки в поджелудочной железе крысы: а - ТК в состоянии дегрануляции, б, в – локализация ТК в дольках, г – ТК вблизи островка Лангерганса. А – ацинусы, КС – кровеносный сосуд, ОЛ – островок Лангерганса, МД – междольковая соединительная ткань. Окраска толуидиновым синим. Ув.: x1000.

альных клеток ацинусов, обнаружить ТК удавалось редко (рис. 1, б), большинство из них располагалось вблизи микрососудов (рис.1, в). Небольшое число ТК встречается и в междольковой соединительной ткани, очень редко - вблизи ОЛ. В области выводных протоков ТК практически отсутствовали.

Исследование ТК в поджелудочной железе у стареющих крыс позволило вы-

явить ряд важных особенностей. Установлено, что в ПЖ крыс в возрасте 18-19 мес количество ТК в междольковых пространствах снижается по сравнению с молодыми животными приблизительно в 1,5 раза. Так, у молодых животных число ТК на единицу площади составило $52,34 \pm 1,16$ клеток, а у стареющих крыс – $32,02 \pm 0,50$ клеток ($p < 0,05$). В области

ацинусов у стареющих крыс встречаются ТК, морфология и топография которых сходна с клетками молодых животных. В единичных случаях нам удалось выявить гранулярные ТК вблизи ОЛ (рис. 1, г). Они были значительно мельче гранул ТК, локализующихся в соединительной ткани оболочки и междольковой области ПЖ и, как правило, располагались вблизи мелких кровеносных сосудов, наблюдающихся на периферии островков. В некоторых случаях у стареющих крыс на срезе можно было видеть только выделенные тучной клеткой в соединительную ткань гранулы, в то время как тело самой клетки не идентифицировалось. Такие картины изредка наблюдались в области соединительнотканной капсулы ПЖ, а также вокруг небольших артерий. Доля активированных ТК в соединительной ткани ПЖ стареющих животных не отличалась от молодых.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы оценивали количество ТК в соединительной ткани междольковой области ПЖ, используя классический метод окраски толуидиновым синим. В настоящее время нередко для выявления ТК применяют различные гистохимические и иммуногистохимические методы. К гистохимическим относится метод окраски альциановым голубым и сафранином [4, 5]. С помощью антител ТК идентифицируют по выявлению ряда ферментов, которые содержатся в гранулах ТК (триптазы, химазы, протеазы) [4, 10]. Сравнительные исследования классического метода окраски ТК толуидиновым синим и ряда гистохимических и иммуногистохимических методов показали, что в некоторых тканях в зависимости от чувствительности метода выявлялось разное число ТК [10]. В случае исследования соединительной ткани было показано, что порой более чувствительным [10] оказывается именно метод окраски толуидиновым синим. Однако мы полагаем, что в дальнейших исследованиях правомочно применять и другие методы. Особенно иммуногистохимические, позволяющие выявить не только морфологию и динамику процесса дегра-

нуляции ТК, но и состав, биохимическую природу, синтезируемых в них гранул. Широкое использование этих методов позволит также определить степень уровня дифференцировки ТК (от клеток предшественников до зрелых дегранулированных форм).

Вопрос об изменении количества ТК при старении носит дискуссионный характер. Нет ясности о прямом влиянии старения на плотность ТК [15]. Установлено, что в периферическом нерве [11], тимусе [3] и слюнной железе [18] грызунов при старении число ТК увеличивается по сравнению с молодыми животными. В то же время показано, что плотность ТК в дерме мышей имеет тенденцию снижаться с возрастом [14]. Сравнительное исследование количества тучных клеток в сосудистом сплетении человека в возрасте от 21 до 88 лет показало, что с возрастом их число и активность снижаются [8]. В настоящем исследовании установлено, что в междольковой соединительной ткани ПЖ крыс при старении наблюдается снижение числа ТК на единицу площади (1 мм²) приблизительно в 1,5 раза. Это может быть связано с тем, что с возрастом наблюдается снижение общего иммунного статуса организма, уменьшается и число иммунокомпетентных (в частности, тучных) клеток.

В настоящей работе была изучена локализация ТК в различных частях ПЖ. Мы практически не наблюдали ТК в области ОЛ. Некоторые авторы, изучающие ТК в ПЖ человека, отмечают их присутствие в толще островков как в норме, так и при патологии [20]. Нам удалось лишь в двух случаях обнаружить мелкие ТК, располагающиеся на периферии островков. Возможно, ТК островков находятся в дегранулированном состоянии и не визуализируются при окраске толуидиновым синим. Для уточнения этого необходимы дальнейшие исследования с использованием иммуногистохимического выявления специфических маркеров.

В настоящем исследовании показано, что в толще долек ТК наблюдаются редко и находятся, как правило, рядом с кро-

веносными сосудами. В ранее выполненных исследованиях было отмечено, что ТК располагаются в различных органах и тканях в непосредственной близости от кровеносных сосудов [4, 15]. По-видимому, это связано с функциональными особенностями ТК. Широкий спектр вырабатываемых ими биологически активных веществ оказывает не только местное влияние, но и более широкое влияние на другие органы. Выделяемые ТК факторы попадают в кровоток через близлежащие кровеносные сосуды. Показано, что при остром панкреатите наиболее глубокие изменения происходят на уровне микроциркуляторного русла [1]. Этим объясняется корреляция патологических изменений ПЖ и изменений, происходящих в других органах, при остром панкреатите. Есть мнение, что ТК, как один из регуляторных факторов эндотелия микрососудов, принимают участие в развитии патологических изменений в тканях [12].

Таким образом, в настоящей работе изучено распределение ТК в ПЖ крысы. Показано, что ТК располагаются, главным образом, в междольковой соединительной ткани. Присутствие ТК в дольках среди ацинусов, выводных протоков, а также вблизи островков, незначительно. Выявлено снижение плотности гранулярных ТК в междольковой области поджелудочной железы крысы при старении.

Comparative study of the mast cells in the pancreas of young and aged rats. Petrova E.S., Kolos E.A., Chumasov E.I.
ABSTRACT

Mast cells are able to synthesize many biologically active substances (histamine, prostanoids, neuropeptides, proteases, some cytokines and chemokines) involved in regulation of various processes in organs and tissues in norm and pathology. If damaged, mast cells are activated and secrete the factors they produce in surrounding tissues. The relevance of the study of the pancreatic mast cells is associated with their regulatory function, which is manifested in such socially important diseases of the pancreatic gland as amyloidosis, diabetes mellitus, and pan-

creatitis. The question of the direct effect of aging on the morphofunctional features of mast cells is still poorly understood. In different organs and tissues, the occurrence of mast cells can either increase or decrease with age. The purpose of this study was a comparative investigation of mast cells in the pancreas of young and aging rats. In Wistar male rats aged 3 months and 18-19 months (n = 8), pancreas was isolated and fixed in a zinc-ethanol-formaldehyde fixative. Paraffin sections 5 µm wide were prepared and stained with toluidine blue to reveal the mast cells. Majority of mast cells were found in the interlobular spaces of the pancreas. They were rarely seen at the acini of lobules. At the locations of the excretory ducts, as well as in the islets of Langerhans, mast cells were practically absent. Single cells were found near the islets, on the border with the exocrine part of the gland. In 3 month-old and aged rats, number of mast cells per square unit were counted in the connective tissue of interlobular space. The density of granular mast cells in the interlobular region of the pancreas of the rat were shown to decrease with aging by approximately 1.5 times. Apparently, the decrease in mast cells is associated with a decrease in the overall immune status of the body during aging.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева С.Д., Кирилловых А.С. Ультрамикроскопическое строение микроциркуляторного русла поджелудочной железы при остром деструктивном панкреатите // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 30-32.
2. Быков В.Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток // Морфология. - 1999. - Т. 155, №2. - С. 64-70.
3. Гусельникова В.В. Возрастные изменения популяции тучных клеток тимуса мыши // Медицинский академический журнал. - 2016. - Т. 16. № 4. - С. 72-73.
4. Гусельникова В.В. Морфофункциональная характеристика популяции тучных клеток тимуса мыши: Автореф. дис. канд. биол. наук. - СПб: ФГБНУ ИЭМ. - 2016 - 24с.

5. Ерохина И.Л., Оковитый С.В., Куликов А.Н., Казаченко А.А., Мартынова М.Г., Моисеева О.М., Шуленин С.Н., Емельянова О.И. Плотность тучных клеток в миокарде и перикарде крыс при сердечной недостаточности, индуцированной изопротеренолом // Цитология. - 2008. - Т. 50. № 2. - С. 113-117.
6. Коржевский Д.Э. Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И. П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А., Гиляров А.В. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. СПб., СпецЛит. - 2014. - 119 с.
7. Кутукова Н.А., Назаров П.Г. Тучные клетки: роль в воспалении, восстановлении тканей и развитии фиброза // Цитокины и воспаление. - 2014. - Т. 13. № 2. - С. 11-20.
8. Турыгин В.В., Бабик Т.М., Бояков А.А. Характеристика тучных клеток сосудистых сплетений желудочков головного мозга человека при старении // Морфология. - 2004. - Т. 126. № 6. - С. 61.
9. Чумасов Е.И., Майстренко Н.А., Довганюк В.С., Коржевский Д.Э. Взаимоотношения тучных клеток с нервными и эндокринными элементами в поджелудочной железе при хроническом панкреатите // Морфология. - 2014. - Т. 145. № 3. - С. 216-217.
10. Atiakshin D., Samoilova V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification // Histochem Cell Biol. - 2017. - V. 147. No. 6. - P. 683-694.
11. Ceballos D., Cuadras J., Verdú E., Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve // J Anat. 1999. - V. 195. Pt. 4. - P. 563-576.
12. Dib M., Zhao X., Wang X., Andersson R. Mast cells contribute to early pancreatitis-induced systemic endothelial barrier dysfunction // Pancreatol. - 2002. - V. 2. № 4. - P. 396-401.
13. Geoffrey R, Jia S, Kwitek AE, Woodliff J, Ghosh S, Lernmark A, Wang X, Hessner MJ. Evidence of a functional role for mast cells in the development of type 1 diabetes mellitus in the BioBreeding rat // J Immunol. 2006. - V. 177. № 10. - P. 7275-7286.
14. Hart P.H., Grimbaldston M.A., Hosszu E.K., Swift G.J., Noonan F.P.
15. Finlay-jones J.J. Age-related changes in dermal mast cell prevalence in BALB/c mice: functional importance and correlation with dermal mast cell expression of Kit // Immunology. - 1999. - V. 98. - P. 352-356
16. Jarido V., Kennedy L., Hargrove L., Demieville J., Thomson J., Stephenson K., Francis H. The emerging role of mast cells in liver disease // Am J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. - 2017. - V.313: G89-G101.
17. Krishnaswamy G.,Ajitawi O.,Chi D.S. The human mast cell: an overview // Methods Mol. Biol. - 2006 - V. 315 - P. 13-34.
18. Lopez-Font I, Gea-Sorlí S, de-Madaria E, Gutiérrez LM, Pérez-Mateo M, Closa D. Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis // 19. World J. Gastroenterol. - 2010. - V. 16. № 27. - P. 3411-3417.
20. Mahay S, Pariente JA, Lajas AI, Adeghate E, Rolph CE, Singh J.
21. Effects of ageing on morphology, amylase release, cytosolic Ca²⁺ signals and acyl lipids in isolated rat parotid gland tissue // Mol. Cell Biochem. - 2004. - V. 266, № 1-2. P. 199-208.
22. Martino L, Masini M, Bugliani M, Marselli L, Suleiman M, Boggi U, Nogueira TC, Filippini F, Occhipinti M, Campani D, Dotta F, Syed F, Eizirik DL, Marchetti P, De Tata V. Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes // Diabetologia. - 2015. - V. 58. № 11. - P. 2554-2262.
23. Mlac M., Melato M., Marin G. Mast cells in the islets of Langerhans. A study of their behaviour in connection with diabetes and with insular amyloidosis // Virchows Arch. A Pathol. Anat Histol. - 1975 - V. 365, № 3. - P. 213-220.
24. Walker M.E., Hatfield J.K., Brown M.A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? // Biochim. Biophys Acta. - 2012. - V. 1822. - P. 57-65.