

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

© О. С. Арташян,¹ Б. Г. Юшков, Е. А. Мухлынина

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург;

¹ *электронный адрес: art@cynos.utnet.ru*

Ответ тучных клеток на стресс носит системный характер и наблюдается как в органах, определяющих развитие стресс-реакции (тимус, костный мозг, надпочечники, желудок, двенадцатиперстная кишка), так и в органах, не участвующих в ней (кожа, печень). Реакция мастоцитов проявляется в виде тотальной дегрануляции. Секреция тучных клеток носит отчетливо выраженный регуляторный характер и проявляется направленным к клеткам-мишеням выделением биологически активных веществ. В органах, формирующих стресс-реакцию, наряду с процессами дегрануляции имеет место процесс миграции, приводящий к перераспределению тучных клеток.

Ключевые слова: тучные клетки (мастоциты), дегрануляция.

Принятые сокращения: КД — коэффициент дегрануляции, ИС — иммобилизационный стресс.

Тучные клетки, или мастоциты, привлекают все большее внимание исследователей, обусловленное тем, что этот тип клеток широко представлен практически во всех органах и тканях; они участвуют в развитии воспалительных, иммунных, аллергических реакций и многих других патологических процессов, секретируя разнообразные биологически активные вещества. В последние годы накопились данные о том, что тучные клетки не только играют важную роль в регуляции различных физиологических функций организма и патогенезе многих заболеваний, но также участвуют в его адаптации к действию экстремальных факторов, что позволяет высказать гипотезу о возможности образования ими единой, самостоятельной регуляторной системы.

Впервые на возможную роль участия мастоцитов в стресс-реакции обратил внимание создатель учения об адаптационном синдроме Ганс Селье (Selye, 1966). Несмотря на интенсивное изучение тучных клеток и накопленный материал об их происхождении, развитии, фенотипической и функциональной гетерогенности, роль мастоцитов разных тканей в физиологических условиях и при действии на организм экстремальных факторов не раскрыта до сих пор.

В настоящей работе проведено изучение морфофункционального состояния тучных клеток в различных органах крыс в условиях иммобилизационного стресса.

Материал и методика

Работа выполнена на 35 белых беспородных крысах-самцах массой 150—200 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе.

Иммобилизационный стресс вызывали классическим способом, фиксируя крыс на спине на 6 ч. Материал для исследования получали сразу после окончания иммобилизационного стресса и через 2 сут после него. Животных умертвляли передозировкой эфира.

Для гистологического исследования и оценки морфофункциональной активности тучных клеток у животных забирали печень, кишечник, желудок, кожу, надпочечники, тимус и костный мозг. При выборе органов для исследования руководствовались тем, что при стрессе наибольшие изменения отмечаются в тимусе (инволюция тимико-лимфатического аппарата), костном мозге (лимфоцитарная инфильтрация костного мозга), надпочечниках (гипертрофия коры надпочечников), а также в желудочно-кишечном тракте (глубокие язвы желудка и двенадцатиперстной кишки). Контрольной тканью была выбрана кожа как орган, в котором не происходит заметных изменений во время стресс-реакции, но в то же время она богата тучными клетками. В качестве контроля были использованы соответствующие органы интактных крыс, умерщвленных передозировкой эфира.

Материал фиксировали 10%-ным нейтральным формалином, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и в хлороформе, затем пропитывали парафином и готовили парафиновые блоки. Толщина гистологических срезов составляла 5 мкм. Срезы подвергали депарафинированию, окрашивали толуидиновым синим (2 мин) или азуром II (5 мин), промывали дистиллированной водой, просветляли спиртом (2 мин), затем смесью карбола и ксилола (2 мин) и ксилолом (2 мин), после чего заключали в кедровый балзам.

Плотность тучных клеток определяли с помощью светового микроскопа при увеличении 400×. Подсчет клеток и их типирование производили в 20 полях зрения

с последующим перерасчетом на единицу площади ($S = 0.01 \text{ мм}^2$).

Функциональную активность тучных клеток (дегрануляцию) оценивали как отношение числа полностью дегранулированных клеток к общему числу анализируемых клеток, выраженное в процентах.

Обработку результатов проводили на основе методов вариационной статистики с применением параметрических критериев, используя компьютерную программу Microsoft Excel. Достоверность различий сравниваемых величин определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента ($P < 0.05$).

Использованные реактивы: эфир диэтиловый (Кузбассоргхим, Россия); формалин и ксилол (Биомедхим, Башкортостан); спирт этиловый (Пермфармация, Россия); хлороформ стабилизированный очищенный (Компонент-Реактив, Россия); парафиновая заливка Гистомикс, кедровый бальзам, толуидиновый синий и Азур II (Биовитрум, Россия).

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что популяция тучных клеток у интактных крыс характеризуется относительно небольшой величиной, морфологическим и функциональным разнообразием, а также неравномерностью их распределения в различных органах организма (рис. 1).

Наибольшее количество мастоцитов на единицу площади содержится в соединительной ткани кожи. В основном мастоциты располагаются вблизи кровеносных сосудов. Выделяя в межклеточное пространство биологически активные вещества, они влияют на микроциркуляторное русло, участвуя тем самым в регуляции различных физиологических процессов в коже (терморегуляции, изменении водно-солевого баланса и др.) (Вержибская, Кромин, 1981). Сравнительно высокое содержание тучных клеток отмечается также в тимусе и костном мозге, поскольку эти органы являются для мастоцитов местом образования и депонирования. Кроме того, в последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о влиянии тучных клеток на процессы кроветворения (Юшков и др., 2004). В соединительнотканной капсуле надпочечников тучных клеток в норме содержится мало. В основном клетки представлены неактивными, зрелыми формами. Предполагается, что тучные клетки наряду с макрофагами и эндотелиальными клетками играют важную роль в регуляции функции коры надпочечников, осуществляя «настройку» ее реакции на стресс (Pignatelli et al., 1998). В органах пищеварения (печени, кишечнике и желудке) тучные клетки распределены неравномерно и представлены разными формами. В печени мастоциты мелкие, неправильной формы, располагаются в портальной зоне и вдоль синусоидов. В слизистой оболочке кишечника и желудка тучные клетки слабо окрашиваются, содержат небольшое количество гранул. В подслизистом слое они располагаются в основном вблизи кровеносных сосудов, крупные, с богатой гранулами цитоплазмой.

При иммобилизационном стрессе в исследованных органах наблюдаются значительные изменения. Стресс влияет на количество тучных клеток в тканях, которое зависит от морфофункциональных особенностей последних и исходного содержания мастоцитов в них (рис. 2).

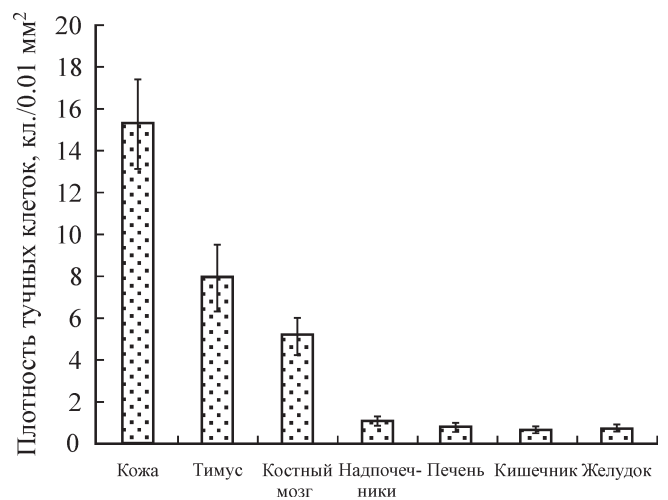


Рис. 1. Распределение тучных клеток в органах интактных крыс.

В соединительной ткани кожи при физиологически нормальных условиях содержание тучных клеток на единицу площади достаточно высокое (15.26 ± 2.33) и после иммобилизационного стресса не изменяется (17.31 ± 2.25). Однако в результате дегрануляции уже после 2 сут наблюдается резкое уменьшение общего количества тучных клеток в органе (7.11 ± 1.45).

В результате иммобилизационного стресса в тканях тимуса и костного мозга количество тучных клеток снижается (в костном мозге — с 5.20 ± 0.88 до 1.69 ± 0.20 через 6 ч и до 1.76 ± 0.05 через 2 сут, в тимусе — с 7.98 ± 1.60 до 5.07 ± 0.42 через 6 ч и до 4.64 ± 1.12 после 2 сут). Этот процесс затрагивает в основном функционально неактивные клетки (с насыщенной гранулами цитоплазмой), число которых уменьшается при иммобилизации.

В надпочечниках после 6-часового стресса количество мастоцитов увеличивается с 1.06 ± 0.17 до 3.96 ± 0.57 . На более поздних сроках количество тучных клеток продолжает расти и составляет 5.42 ± 0.97 .

В печени число тучных клеток возрастает с 0.83 ± 0.19 до 1.49 ± 0.19 непосредственно после стресса, и высокий уровень тучных клеток сохраняется до 2 сут (2.51 ± 0.94).

В кишечнике и желудке после 6-часовой иммобилизации наблюдается увеличение количества тучных клеток (в кишечнике — с 0.68 ± 0.07 до 14.53 ± 0.87 , в желудке с 0.67 ± 0.14 до 7.89 ± 1.55), но после 2 сут уменьшение количества тучных клеток наблюдается и здесь: в кишечнике — до 2.74 ± 0.49 , в желудке — 5.92 ± 0.97 .

Поскольку, как известно, мастоциты в тканях крайне редко пролиферируют, процессы увеличения количества тучных клеток на единицу площади после стресса можно объяснить их активной миграцией. Перераспределение подвижных клеток между тканями при стрессе можно рассматривать в качестве важного компонента адаптационного синдрома. Так, работами акад. Горизонтова (1983) показано, что в стресс-реакции существенное место занимает миграция лимфоцитов из лимфоидных органов в костный мозг. Согласно данным нашего исследования, в результате воздействия на организм экстремального фактора тучные клетки, по-видимому, осуществляют миграционные процессы в противоположном направле-

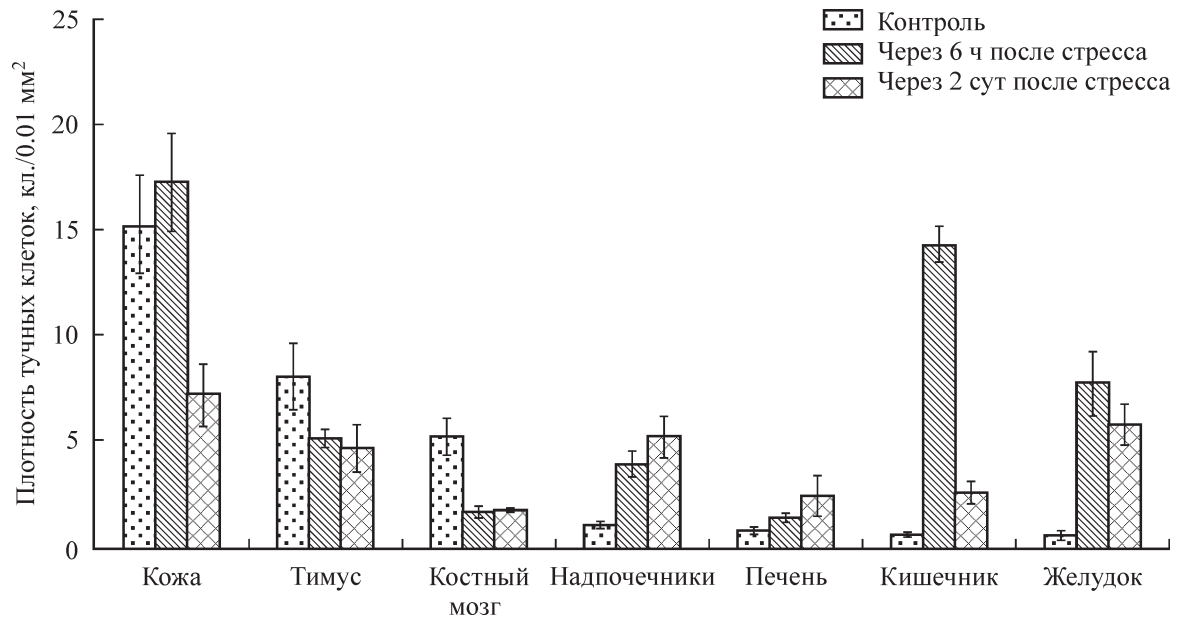


Рис. 2. Изменение плотности тучных клеток в органах крыс в результате иммобилизационного стресса.

нии — из костного мозга и тимуса в периферические ткани и органы. В результате в печени, кишечнике, желудке и надпочечниках количество тучных клеток увеличивается, исключение составляет кожа, где ответ на стресс, как будет показано ниже, выражается только в дегрануляции мастоцитов.

Наряду с количественными изменениями мастоциты разных тканей характеризуются различной степенью дегрануляции (рис. 3). В норме наибольшая степень дегрануляции тучных клеток отмечается в костном мозге, тимусе и печени. В надпочечниках, кишечнике и желудке она выражена слабее, а в коже — минимальная. Типичной реакцией мастоцитов на стресс, согласно морфометрическим данным, является усиление их дегрануляции, особенно в ранние сроки после воздействия, выраженность которой определяется их локализацией (рис. 3).

Наибольшие изменения качественного состава тучных клеток по сравнению с контролем происходят в

коже. В норме в этой ткани тучные клетки характеризуются слабой дегрануляцией ($2.6 \pm 0.72 \%$), однако непосредственно после окончания иммобилизации наблюдается увеличение количества дегранулированных клеток ($46.48 \pm 4.33 \%$), а на более поздних сроках имеет место тенденция к восстановлению исходного состояния мастоцитов ($15.23 \pm 4.54 \%$).

Высокая степень дегрануляции тучных клеток после окончания иммобилизации наблюдается в костном мозге и тимусе (в костном мозге увеличивается с 18.02 ± 3.21 до $87.31 \pm 5.34 \%$, а в тимусе — с 11.52 ± 4.06 до $42.99 \pm 3.82 \%$). Реакция тучных клеток на экстремальное воздействие проявляется здесь выбросом в межклеточное пространство кислых гликозаминогликанов и других биологически активных веществ, содержащихся в их гранулах. Возможно, посредством этого механизма тучные клетки и оказывают регулирующее влияние на кровяные клетки на тканевом уровне, (Юшков и др.,

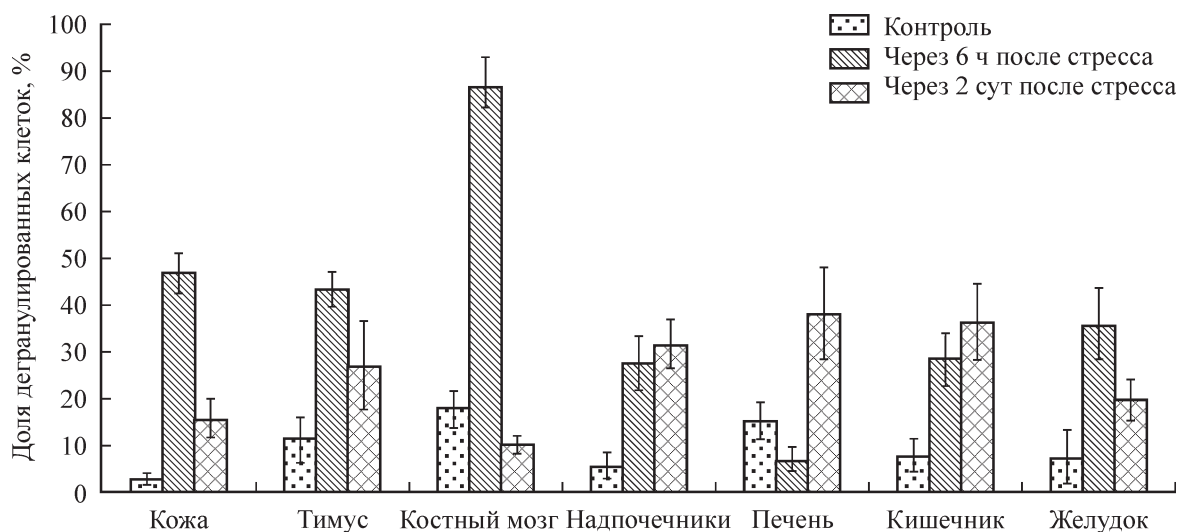


Рис. 3. Дегрануляция тучных клеток в органах крыс в результате иммобилизационного стресса.

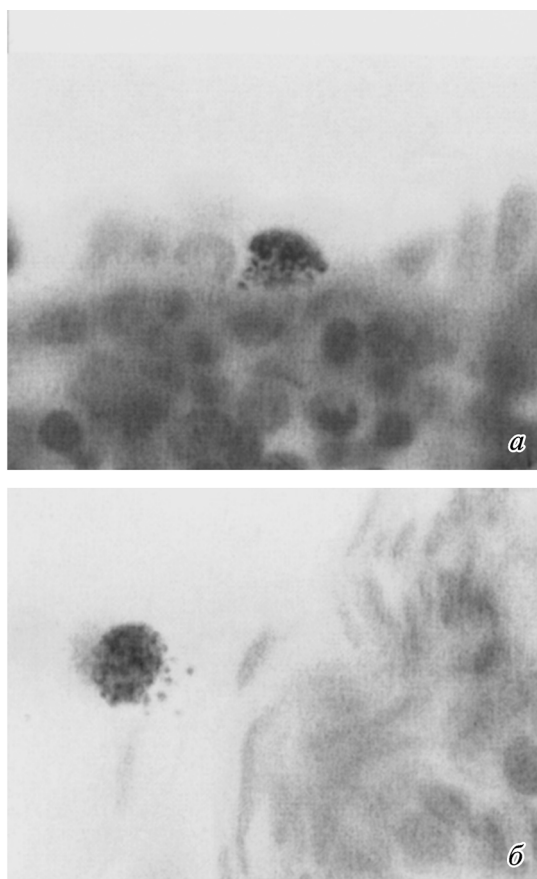


Рис. 4. Дегрануляция тучных клеток в тимусе (а) и в капсуле надпочечника (б) крысы.

Окраска азуром II. Об. 100×, ок. 10×.

1999). К концу 2-х сут количество дегранулированных клеток в этих органах уменьшается, приближаясь к физиологической норме (в костном мозге 10.22 ± 1.54 , в тимусе — 26.54 ± 9.36 %).

В капсуле надпочечников при иммобилизационном стрессе клетки также реагируют активной дегрануляцией (изменяется с 5.66 ± 0.02 до 27.27 ± 5.86 %), которая сохраняется на высоком уровне на протяжении 2 сут (31.69 ± 5.38 %).

После 6-часовой иммобилизации в кишечнике и желудке также наблюдается дегрануляция мастоцитов (в кишечнике изменяется непосредственно после окон-

чания иммобилизации с 7.71 ± 3.64 до 28.43 ± 5.31 %, в желудке — с 7.78 ± 5.43 до 36.43 ± 7.51 %; к концу 2-х сут в кишечнике — 36.49 ± 7.77 %, в желудке — 20.18 ± 4.67 %). Реакция тучных клеток печени при иммобилизационном стрессе имеет свои особенности. Там процессу дегрануляции предшествует накопление секрета в цитоплазме, за счет чего коэффициент дегрануляции уменьшается в 1.5 раза (с 15.29 ± 4.10 до 7.38 ± 2.39 %). Через 2 сут процессы дегрануляции возрастают в 5 раз (38.25 ± 9.93 %).

Кроме того, морфологические исследования свидетельствуют о том, что тучные клетки секретируют биологически активные вещества направленно в сторону клеток-мишеней (рис. 4).

Таким образом, реакция тучных клеток на иммобилизационный стресс универсальна и проявляется в виде тотальной дегрануляции как в органах, определяющих стресс-реакцию, так и в органах, не принимающих участия в ней (кожа). Секреция тучных клеток носит отчетливо выраженный регуляторный характер и сопровождается направленной дегрануляцией биологически активных веществ в сторону клетки-мишени. В органах, формирующих стресс-реакцию, наряду с процессами дегрануляции имеет место процесс миграции, приводящий к перераспределению тучных клеток между ними.

Список литературы

- Вержбицкая Н. И., Кромин А. А. 1981. Морфофункциональные параметры точек акупунктуры и связанных с ними внутренних органов в разных условиях эксперимента. В кн.: Теория и практика рефлексотерапии. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 56—60.
- Горизонтов П. Д., Белоусова О. И. 1983. Стресс и система крови. М.: Медицина. 339 с.
- Юшков Б. Г., Климин В. Г., Кузьмин А. И. 2004. Сосуды костного мозга и регуляция кроветворения. Екатеринбург: НИСО УрО РАН. 148 с.
- Юшков Б. Г., Климин В. Г., Северин М. В. 1999. Система крови и экстремальные воздействия на организм. Екатеринбург: НИСО УрО РАН. 203 с.
- Pignatelli D., Magalhaes M. M., Magalhaes M. C. 1998. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm. Metab. Res.* 30 : 464—474.
- Selye H. 1966. The mast cells. Butterworth Heinemann. Washington. 443 p.

Поступила 27 XII 2005

A STUDY OF MAST CELL FUNCTIONAL ACTIVITY AT IMMOBILIZATIVE STRESS

O. S. Artashyan,¹ B. G. Yushkov, E. A. Mukhlynina

Institute of Immunology and Physiology the Ural Branch of RAS, Ekaterinburg; ¹ e-mail: art@cynos.utnet.ru

Response of mast cells to stress has a systemic character, being observed in organs both determining development of stress reaction (thymus, bone marrow, adrenals, stomach, duodenum) and not participating in this process (skin, liver). The reaction of mastocytes is manifested as a total degranulation. Mast cell secretion is regulatory by its nature, and biologically active compound are released directly on the target cells. Along with degranulation, which is observed in organs participating in stress reaction formation, migration of mast cells takes place, resulting in their redistribution.