

В. С. Гордова, Е. П. Иванова, В. Е. Сергеева

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ОКРАСКЕ ТОЛУИДИНОВЫМ СИНИМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Приведены морфометрические характеристики тучных клеток тимуса крыс при поступлении с питьевой водой кремния в течение двух месяцев ad libitum в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Показано, что при данном виде воздействия в междольковых корковых перегородках тимуса количество тучных клеток не изменяется, однако наблюдается увеличение доли тучных клеток с полной дегрануляцией, а также доли тучных клеток с высокой степенью метахромазии. Отмечается, что при этом средние размеры тучных клеток уменьшаются.

The article gives morphometric characteristics of thymic mast cells of rats supplied with drinking water for 10 months in a concentration of 10 mg/l in correlation to silicon. It has been shown that the amount of mast cells does not change in interlobular cortical thymus septa with this type of exposure, however, the percentage of mast cells with complete degranulation increases, as well as the proportion of mast cells with a high degree of metachromasia. In this case, the average size of mast cells decreases.

Ключевые слова: тучные клетки, силикаты, тимус, адаптация.

Keywords: mast cells, silicates, thymus, adaptation.

Введение

Тучные клетки (ТК) представлены в организме человека гетерогенной популяцией и поэтому могут быть классифицированы в зависимости от локализации (в слизистых оболочках и соединительных тканях), наличия ферментов (химаза и триптаза), степени наполнения гранулами, количества содержащихся биогенных аминов [8; 12; 21; 22]. Каждая из этих классификаций в той или иной степени отражает функциональные способности тучных клеток.

Представление о роли ТК в организме обычно сводится к их участию в реакциях, связанных с действием гистамина и серотонина, биогенных аминов, которые накапливаются в гранулах тучных клеток и секретируются при иммунном ответе. Благодаря секреции гистамина ТК регулируют проницаемость сосудов, участвуют в поддержании биоаминного гомеостаза в ходе обмена веществ [5; 12; 17; 21]. Тучные клетки принимают участие в процессах опухолевого роста, а также в развитии многих воспалительных и аутоиммунных заболеваний [19; 21; 22].

На поверхности ТК находятся образраспознающие рецепторы, причем активация через рецепторы TLR2 сопровождается их дегрануляцией и синтезом IL-4, IL-6, IL-5, IL-13, TNF; активация же через рецепторы TLR4 ведет к синтезу IL-6, IL-1 β , IL-13, TNF, но не сопровождается дегрануляцией [2]. Таким образом, ТК являются полноправными участниками



реакций неспецифического иммунного ответа, обусловленного образ-распознающими рецепторами. Цитокины тучных клеток поддерживают «иммунное отклонение» в дифференцировке субпопуляций Т-лимфоцитов в пользу ПЛ-2, ПЛ-13, поэтому ТК также выступают непосредственными участниками и специфического иммунного ответа [18; 19; 22].

Тучные клетки вполне справедливо относят к одноклеточным железам внутренней секреции и рассматривают их как компоненты дисперсной эндокринной системы [18]. В ТК с помощью люминесцентно-гистохимических методов были обнаружены катехоламины, гистамин и серотонин. Контактруя с адренергическими нервными волокнами, макрофагами, они выполняют в лимфоидных органах роль посредников между нервной и иммунной системами [17]. Благодаря способности накапливать нейромедиаторные биогенные амины и выделять эти вещества при недостатке их в микроокружении, реагируя на незначительные изменения содержания, тучные клетки являются регуляторами тканевого гомеостаза и необходимым звеном в общей реакции адаптации на клеточном уровне [6–8], и популяция ТК в лимфоидных органах в той или иной степени претерпевает изменение при любых воздействиях [3].

Так, были опубликованы данные о морфологических характеристиках тучных клеток тимуса при поступлении водорастворимых солей кремния; при этом для визуализации ТК использовались два метода окраски — по Унна и по Гимза, а для характеристики тучных клеток — методика, предложенная Линднер и соавт. [11; 13]. Это исследование показало, что изменяются размеры тучных клеток и насыщенность их кислыми гликозаминогликанами.

Размеры и тинкториальные свойства тучных клеток [5; 7; 8; 18; 21] отражают их функциональную активность, но насколько они могут быть связаны между собой при воздействии соединения кремния?

Цель исследования — изучить тучные клетки тимуса при воспроизведении на лабораторных крысах эксперимента [11] с поступлением в организм водорастворимого соединения кремния в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний в течение двух месяцев.

Задачи исследования:

- 1) описать изменения свойств тучных клеток (размер, различия по степени окраски толуидиновым синим) при поступлении в организм кремния;
- 2) сравнить полученные данные с данными воспроизводимого эксперимента;
- 3) соотнести свойства тучных клеток с их размерами в зависимости от поступления в организм соединения кремния.

Материал и методы исследования

Объектом исследования стали тучные клетки тимуса 20 белых нелинейных крыс-самцов одного возраста и сходной массы (150–200 г). Животные содержались в обычных условиях вивария. Первая (контрольная) группа — 10 крыс — получала *ad libitum* питьевую воду, соот-



ветствующую требованиям ГОСТа Р 52109-2003 и СанПиНа 2.1.4.1116-02 [9; 10]. Вторая (подопытная) – 20 крыс – получала ad libitum ту же воду с добавлением метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Ежедневно животные получали с питьевой водой в среднем 0,4–0,6 мг/кг кремния; через два месяца они были выведены из эксперимента. У крыс извлекали тимус, помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина с последующей заливкой в парафин. Срезы тимуса после депарафинирования окрашивали полихромным толуидиновым синим по методу Унна [1].

В 30–50 полях зрения светового микроскопа МИКМЕД-5 при увеличении объектива 90 и окуляра 10 в каждом срезе подсчитывали количество тучных клеток в междольковых корковых перегородках тимуса, находили среднеарифметические значения для каждого случая. Размеры тучных клеток определяли после фотографирования препаратов при увеличении объектива 90 и окуляра 10 (световой микроскоп МИКМЕД-5) с применением демоверсии программы «SigmaScanPro 5.0». Характеристики каждой тучной клетки заносили в таблицу, где каждую тучную клетку характеризовали по нескольким признакам: степень дегрануляции, степень метахромазии, визуализация гранул и ядра, размеры тучной клетки [18]. По степени окрашивания выделяли ортохромные (голубые, содержат несulfатированные гликозаминогликаны), β -метахроматичные (чернильно-фиолетовые, гликозаминогликаны sulfатированы в разной степени), γ -метахроматичные (пурпурные, содержащие высокосulfатированный гепарин) [8; 11; 17].

Для оценки статистической значимости различий полученных средних величин ($p \leq 0,05$) проводилась проверка вариационных рядов на нормальность распределения. Если гипотеза о нормальности распределения отвергалась, применяли непараметрический критерий Манна – Уитни; если подтверждалась, то с помощью программы Microsoft Office Excel через статистические методы ТТЕСТ, при установке хвосты = 2 (использовалось двустороннее распределение), тип = 3 (для неравных отклонений) определяли t-критерий Стьюдента. Чтобы оценить различия между качественными признаками и относительными величинами, применяли z-критерий [14]. Средние величины (M) в тексте приводятся со стандартной ошибкой среднего значения (m).

Результаты собственных исследований

При окраске тимуса полихромным толуидиновым синим по методу Унна корковое вещество долек тимуса приобретает голубой цвет, мозговое вещество при этом окрашивается в голубой очень слабо, соединительная ткань корковых перегородок тимуса практически не окрашивается. Количество ТК в корковых перегородках тимуса животных контрольной группы при иммерсионном увеличении ($\times 900$) составило в среднем $2,32 \pm 0,19$ клетки в поле зрения, для опытной группы – $2,19 \pm 0,21$ клетки, при этом тинкториальные свойства и размеры тучных клеток тимуса существенно отличаются.



При изучении ТК после окраски срезов тимуса полихромным толуидиновым синим по Унна у животных контрольной группы выявляются ТК с различной степенью метахромазии, преимущественно β_2 -метахроматичные клетки. Тучных клеток, содержащих зрелый гепарин, в тимусе животных обеих групп обнаружено не было.

В таблице 1 сравниваются полученные нами результаты с результатами наблюдений, проведенных ранее [11].

Таблица 1

Распределение (в %) ортохромных и метахроматичных тучных клеток в междольковых корковых перегородках тимуса (сравнение двух исследований)

Показатель характеристики ТК	Данные исследования 1 [11]		Собственные данные	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Ортохромные	0	0	14,6	13,7
Метахроматичные β_1	21,7	12,2*	25,9	10,8*
Метахроматичные β_2	78,3	63,3*	36,2	31,6
Метахроматичные β_3	0	24,5*	23,3	43,9*

Примечание. * Различия с контрольной группой статистически значимы, ($p < 0,05$).

Данные таблицы красноречиво свидетельствуют о том, что, во-первых, кремний, поступающий с питьевой водой, увеличивает долю ТК с высокой степенью метахромазии, и, во-вторых, что результаты эксперимента, моделирующего поступление с питьевой водой кремния, достаточно полно воспроизводятся — по крайней мере, на уровне такого регуляторного звена организма, как тучные клетки.

Разница в количестве ортохромных тучных клеток может быть объяснена тем, что ТК тимуса крыс имеют сезонные особенности, имеющие отношение к зимней спячке грызунов [5]. Кремний способен ускорять синтез высокосульфатированных гликозаминогликанов, наличие которых прямо пропорционально степени метахромазии ТК [4; 5; 22].

Доля тучных клеток с плотным расположением гранул составила для контрольной и опытной групп 30,9 и 24,7 %, с рыхлым расположением гранул — 19,3 и 47,5 % соответственно ($p < 0,001$); клеток, в которых гранулы не визуализировались, оказалось 40,3 и 6,3 % ($p < 0,001$) соответственно. В тучных клетках тимуса можно было увидеть ядро, оно визуализировалось не во всех клетках, а преимущественно в тех, в которых гранулы располагались рыхло. Доля тучных клеток с полной дегрануляцией и нарушением целостности мембраны у животных, получавших кремний, составила 21,0 % (у контрольных — 9,4 %, $p < 0,05$).

Эксперимент, проведенный ранее, также обнаружил уменьшение доли клеток с плотными гранулами, не выходящими за пределы клетки (26,1 % в контрольной группе и 6,1 % в опытной), и увеличение доли клеток, подвергшихся тотальной дегрануляции (43,5 % в контрольной группе и 57,2 % в опытной) [11].



Наш повторно проведенный эксперимент полностью подтвердил отсутствие различий в количестве тучных клеток в поле зрения у животных, получавших и не получавших с питьевой водой кремний, а также уменьшение средних размеров обнаруженных ТК в тимусе в 1,1 раза ($p < 0,05$). Взаимосвязь между свойствами ТК и их размерами представлена в таблице 2.

Таблица 2

Взаимосвязь между размерами тучных клеток и их свойствами

Признак ТК		Размер ТК, мкм ²	
		Контроль	Опыт
Степень метахромазии	Ортохромные	68,17 ± 4,45	53,83 ± 4,39*
	β1	73,67 ± 2,67	81,22 ± 6,20
	β2	76,47 ± 2,54	74,50 ± 3,45
	β3	69,18 ± 4,11	64,11 ± 5,64
Расположение гранул	Плотное	71,13 ± 1,83	66,16 ± 2,58*
	Рыхлое	76,57 ± 3,31	73,03 ± 2,91
Визуализация ядра	Визуализируется	79,50 ± 2,13	75,19 ± 2,52
	Не визуализируется	63,17 ± 2,35	52,74 ± 3,02*

101

Примечание. * Различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,05$.

У крыс, получавших водорастворимый кремний, ортохромные тучные клетки тимуса меньше по размеру; со степенью увеличения метахромазии площадь тучных клеток несколько увеличивается, а потом, с переходом с β₂- на β₃-метахромазии, несколько уменьшается, однако изменения в размерах не являются статистически значимыми.

Интересные результаты получены при измерении размеров клеток с видимым и не видимым ядром: меньшие размеры имеют клетки, в которых ядро не визуализируется, и этот факт сам по себе не зависит от воздействия кремния. Однако при сравнении размеров ТК, в которых ядро не выявляется, обнаруживается, что поступление кремния с питьевой водой приводит к уменьшению их среднего размера. Вне зависимости от расположения гранул ТК тимуса животных, получавших с питьевой водой кремний, имеют меньшие размеры по сравнению с ТК животных контрольной группы.

Следует подчеркнуть, что окраска срезов тимуса азуром по Гимза дает прямо противоположный результат при выявлении степени дегрануляции [4; 11], и именно этот метод преимущественно используется зарубежными коллегами для визуализации тучных клеток. В связи с этим наши данные, полученные при поступлении в организм водорастворимого соединения кремния, не только не противоречат результату (уменьшение количества дегранулирующих ТК, выявленных в окраске по Гимза), но хорошо согласуются с данными, полученными *in vitro* при воздействии на популяцию тучных клеток диоксидом кремния [16; 20].

Обобщая полученные результаты, можно отметить, что у животных, употреблявших с питьевой водой соединение кремния, наблюда-



ется уменьшение размеров тучных клеток, изменение содержания в них кислых гликозаминогликанов (и, соответственно, нейромедиаторных биогенных аминов, так как их количество напрямую связано с содержанием в ТК гепарина [12; 22]) и увеличение количества дегранулирующих форм ТК. Все эти факты могут свидетельствовать об усилении метаболизма биогенных аминов в тимусе при участии тучных клеток. Существует мнение, что при патологии любого генеза возможно замещение нормальной популяции ТК незрелыми тучными клетками с совершенно другими цитофизиологическими признаками [12]. Вполне вероятно, что уменьшение размеров ТК при поступлении в организм с питьевой водой кремния может быть косвенным свидетельством появления новой популяции.

На данном этапе изучения тучных клеток при поступлении в организм водорастворимого кремния дать адекватную оценку изменениям функциональной активности ТК не представляется возможным, так как она не исчерпывается биогенными аминами и мукополисахаридами, а включает в себя также экспрессию тучноклеточных рецепторов и цитокинов, но то, что эта активность изменяется, несомненно, поскольку затрагивается и обмен биогенных аминов, и обмен гликозаминогликанов.

Выводы

1. Поступление в организм водорастворимого соединения кремния отражается на тинкториальных свойствах тучных клеток, окрашенных толуидиновым синим (ведет к росту метахромазии), увеличивает степень их дегрануляции и приводит к уменьшению их размеров.

2. Результаты эксперимента, моделирующего поступление с питьевой водой кремния, достаточно полно воспроизводятся на уровне популяции тучных клеток тимуса, что свидетельствует о возможном системном действии водорастворимого соединения кремния.

3. Статистически значимые различия в уменьшениях размеров тучных клеток крыс, получавших с питьевой водой кремний, наблюдаются для ортохромных (в 1,26 раза, $p < 0,05$) тучных клеток и для тучных клеток, в которых ядро не визуализируется (в 1,19 раза, $p < 0,05$)

Список литературы

1. Артюшевский А. А., Леонтьев А. С., Слука Б. А. Гистология с техникой гистологических исследований. Минск, 1999.

2. Ахматова Н. К., Киселевский М. В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противомикробный. М., 2008.

3. Гордова В. С., Шатских О. А., Смирнова Т. Л. и др. К вопросу о характеристике тучноклеточной популяции при перераспределении гистамина в лимфоидных органах лабораторных животных // Аллергология и иммунология. 2013. Т. 14, №3. С. 191.

4. Гордова В. С. Характеристика тучных клеток селезенки лабораторных крыс при поступлении кремния с питьевой водой : сб. науч. тр. Чебоксары, 2013. С. 7–11.



5. Гордон Б. М. Цитобиоаминная система тимуса и адаптация. Чебоксары, 2000.
6. Гордон Д. С., Сергеева В. Е., Зеленова И. Г. Нейромедиаторы лимфоидных органов. Л., 1982.
7. Гордон Д. С. Тинкториальные параллели тучных клеток // Макро-микроструктура тканей в норме, патологии и эксперименте. Чебоксары, 1981. С. 97–101.
8. Гордон Д. С. Тучные клетки в эксперименте : метод. указ. Чебоксары, 1982.
9. ГОСТ Р 51232-98 (2002). Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества. М., 2002.
10. ГОСТ Р 52109-2003. Вода питьевая, расфасованная в емкости. Общие технические условия. М., 2003.
11. Дьячкова И. М., Сергеева В. Е., Сапожников С. П. Исследование популяции тучных клеток тимуса при длительном воздействии соединений кремния и кальция // Вестник Чувашия государственного педагогического университета им. И. Я. Яковлева. 2010. №4 (68). С. 50–55.
12. Кондашевская М. В. Тучные клетки и гепарин — ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах // Вестник РАМН. 2010. №6. С. 49–54.
13. Линднер Д. П., Поберий И. А., Розкин М. Я., Ефимов В. С. Морфометрический анализ популяции тучных клеток // Архив патологии. 1980. Т. 42, №6. С. 60–64.
14. Медик В. А., Токмачёв М. С., Фишман Б. Б. Статистика в медицине и биологии. Т. 1 : Теоретическая статистика. М., 2000.
15. СанПиН 2.1.4.1116-02. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества. М., 2002.
16. Челомбитко М. А., Федоров А. В., Ильинская О. П. и др. Роль активных форм кислорода в дегрануляции тучных клеток (обзор) // Биохимия. 2017. Т. 82, №1. С. 19–34.
17. Швалев В. Н. Развитие морфоклинических представлений о нейротканевых связях: роль тучных клеток в нервной трофике // Казанский медицинский журнал. 2010. Т. 91, №5. С. 687–689.
18. Ялалетдинова Л. Р., Гордова В. С., Ястребова С. А., Сергеева В. Е. Нейроиммунотенулирующие свойства хорионического гонадотропина. Чебоксары, 2016.
19. Brown M. A., Hatfield J. K. Mast cells are important modifiers of autoimmune disease: with so much evidence, why is there still controversy? // Front. Immun. 2012. Vol. 3. P. 147.
20. Brown J. M., Swindle E. J., Kushnir-Sukhov N. M. et al. Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors // Am J Respir Cell Mol Biol. 2007. Vol. 36. P. 43–52.
21. Da Silva E., Jamur M., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell // J. Histochem. Cytochem. 2014. Vol. 62. P. 698–738.
22. Rönnberg E., Melo F. R., Pejler G. Mast cell proteoglycans // Histochem. Cytochem. 2012. Vol. 60, №12. P. 950–962.
23. Theoharides T. C., Alysandratos K.-D., Angelidou A. et al. Mast cells and inflammation // Biochim Biophys Acta. 2012. Vol. 1822, №1. P. 21–33.

Об авторах

Валентина Сергеевна Гордова — канд. мед. наук, доц., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: VGordova@kantiana.ru



Елена Петровна Иванова — врач-офтальмолог, Новочебоксарский медицинский центр Минздрава Чувашии, Россия.

E-mail: kaf-biology@yandex.ru

Валентина Ефремовна Сергеева — д-р биол. наук, проф., Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, Россия.

E-mail: kaf-biology@yandex.ru

The authors

Dr. Valentina Gordova — Associate Professor, the Department of Fundamental Medicine, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: crataegi@rambler.ru

Elena Ivanova — ophthalmologist, Medical Center of the Ministry of Health of Chuvashia, Novocheboksarsk, Russia

E-mail: kaf-biology@yandex.ru

Prof. Valentina Sergeeva, Professor, I.N. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

E-mail: kaf-biology@yandex.ru