

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ТИМУСА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Кострова О. Ю., Меркулова Л. М., Стручко Г. Ю., Михайлова М. Н., Москвичев Е. В.

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», Чебоксары, Россия (428015, Чебоксары, Московский проспект, 15), e-mail: evkbiz@yandex.ru

С помощью иммуногистохимических, люминесцентно-гистохимических и общегистологических методов исследован тимус нелинейных лабораторных крыс-самцов через 1, 2, 3 и 4 месяца после окончания введения канцерогена. Установлено, что на фоне роста аденокарциномы толстой кишки наблюдаются значительные морфофункциональные изменения тучных клеток тимуса. При этом изменения более выражены на последнем сроке исследования – через 4 месяца после окончания курса инъекций. Выявлено, что в тучных клетках на этом сроке исследования уровень серотонина, катехоламинов и гистамина снижается. При этом соотношение (серотонин + гистамин)/катехоламины увеличивается, что свидетельствует о подавлении функциональной активности тучных клеток тимуса на этом сроке исследования. Установлено, что введение 1,2-диметилгидразина приводит к увеличению количества тучных клеток, в основном за счет дегранулированных форм. С помощью иммуногистохимического метода выявлено увеличение количества тучных клеток, положительных к триптазе.

Ключевые слова: тимус, тучные клетки, канцерогенез.

MAST THYMUS CELLS ON THE BACKGROUND OF COLON ADENOCARCINOMA

Kostrova O. YU., Merkulova L. M., Struchko G. YU., Mikhaylova M. N.,
Moskvichev E. V.

FGBOUVPO "Chuvash State University, I. N. Ulyanov", Cheboksary, Russia (428015, Cheboksary, Moscow Avenue, 15), e-mail: evkbiz@yandex.ru

Using immunohistochemistry, luminescent-histochemical and general histologic methods the thymus of nonlinear laboratory male rats at 1, 2, 3 and 4 months after the introduction of a carcinogen was studied. Found that on the background of colon adenocarcinoma observed significant morphological changes of mast cells of the thymus. The changes were more pronounced in the last term of study - 4 months after the end of injection. There were revealed that at mast cells reduced serotonin, catecholamines and histamine on this term study. The ratio (serotonin + histamine) / catecholamines increases indicate the suppression of the functional activity of mast cells of the thymus in this period of the study. The administration of 1,2-dimethylhydrazine increases the number of mast cells, mainly due to degranulated forms. By immunohistochemistry revealed an increase in the number of tryptase positive mast cells.

Keywords: thymus, mastcells, carcinogenesis

Тучные клетки – это мультипотентные гранулярные клетки, встречающиеся в коже, дыхательных путях, желудочно-кишечном тракте, органах мочеполовой системы, эндокринной и нервной системе и располагающиеся вблизи кровеносных и лимфатических сосудов, в тесном контакте с нервными окончаниями вегетативной нервной системы [5,1]. В работах многих авторов описано, что гранулы тучных клеток содержат большую группу биологически активных веществ: гистамин, серотонин, дофамин, гепарин, цитокины, хемокины, монокины, интерлейкины, протеазы, протеогликаны, ростовые факторы и др. [1, 7].

Традиционно считается, что тучные клетки являются ключевыми клетками аллергической реакции I типа и воспаления [6]. В настоящее время известно, что эти клетки

принимают активное участие в опухолевых процессах, а именно, сформировалось понимание их роли в регуляции ангиогенеза [2, 10]. Однако в литературе имеются лишь единичные сведения, посвященные изучению взаимосвязи популяции тучных клеток с гистологическим типом новообразования при злокачественном росте.

Известно, что тучные клетки могут воздействовать на ангиогенез различными путями: через факторы VEGF, bFGF, TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, нейтральные протеазы, гепарин, гистамин и др.

В данное время многими учеными разрабатываются способы воздействия на тучные клетки для терапии рака [8,9].

Поэтому детальное изучение тучных клеток тимуса в условиях развития опухоли является актуальным и перспективным направлением и может быть использовано при разработке новых подходов к лечению злокачественных новообразований.

Цель исследования – изучение морфофункционального состояния тучных клеток тимуса в динамике на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, индуцируемой 1,2-диметилгидразином.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на 103 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–220 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 2 группы. Первая – интактные крысы, которым для контроля вводили изотонический раствор хлорида натрия. Вторая группа – животные с внутрибрюшинным введением канцерогена (1,2-диметилгидразина) из расчета 20 мг/кг 1 раз в неделю в течение четырех недель. Выведение животных из эксперимента проводилось через 1, 2, 3 и 4 месяца после окончания введения канцерогена. Объектом исследования служил тимус. При патоморфологическом исследовании учитывались частота развития новообразований у крыс, их локализация, морфологические особенности.

В работе использовались следующие методы:

1. Иммуногистохимический метод с использованием антител на триптазу тучных клеток.
2. Люминесцентно-гистохимические методы Фалька – Хилларпа – для избирательного выявления катехоламинов (КА) и серотонина (СТ) и Кросса, Эвена, Роста – для избирательного выявления гистамина (ГСТ) в тучных клетках тимуса. Уровень биоаминов определяли с помощью микроскопа ЛЮМАМ-4 с использованием спектрофлуориметрической насадки ФМЭЛ-1А. Для оценки суммарно-направленного действия биогенных аминов использовалось соотношение (СТ+ГСТ)/КА, увеличение которого косвенно свидетельствует о подавлении функциональной активности клеток, снижение – о стимуляции.
3. Метод окраски полихромным толуидиновым синим по Унна для избирательного окрашивания тучных клеток тимуса.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами установлено, что изолированное введение канцерогена в 55,4 % случаев приводит к формированию от одной до трех макроскопически визуализирующихся опухолей толстой кишки размером от 0,3 до 1 см. Гистологически новообразования имеют структуру высокодифференцированной аденокарциномы [4]. Развитие опухоли сопровождается значительными изменениями морфологии и функционального состояния клеток тимуса.

У интактных крыс при люминесцентной микроскопии тимуса определяются тучные клетки (ТК) овальной или округлой формы с хорошо заметным темным ядром в середине цитоплазмы, в котором различимы люминесцирующие желтоватые гранулы. С помощью цитоспектрофлуориметрии установлено, что гранулы этих клеток содержат биогенные амины (БА): ГСТ, СТ и КА, преобладающим среди них является гистамин. Интенсивность люминесценции ГСТ в тучных клетках у интактных животных составила $223,35 \pm 7,9$ у.е.; СТ – $99,85 \pm 2,5$ у.е.; КА – $35,2 \pm 0,5$ у.е.

На срезах, окрашенных полихромным толуидиновым синим, в междольковых промежутках обнаруживаются тучные клетки, что подтверждается иммуногистохимическим методом. По степени дегрануляции преобладают слабодегранулированные формы (72 %), недегранулированные и полностью распавшиеся тучные клетки встречаются с одинаковой частотой и составляют 13 % и 14 % соответственно.

При люминесцентной микроскопии через 1 месяц после окончания курса инъекций выявляются скопления тучных клеток, которые располагаются группами по 3–4. Содержание моноаминов по сравнению с интактными крысами достоверно увеличивается, а уровень гистамина уменьшается в 1,2 раза (рисунок 1). За счет этого соотношение (СТ+ГСТ)/КА в тучных клетках снижено на 50 %.

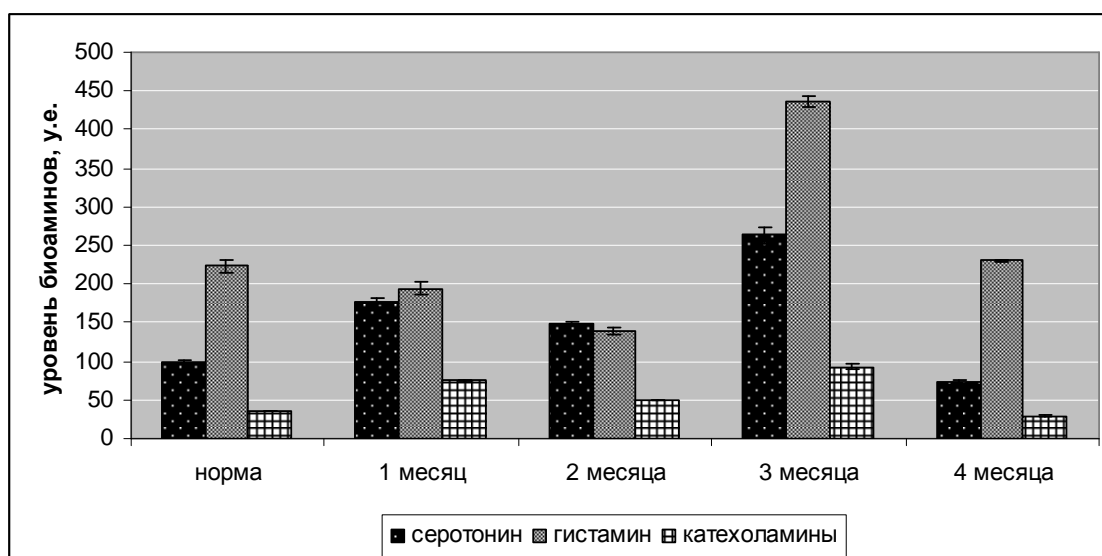


Рисунок 1. Интенсивность свечения биогенных аминов (у.е.) в тучных клетках в норме и после введения канцерогена

Через 2 месяца уровень БА по сравнению с предыдущим сроком достоверно снижается: СТ – в 1,2, ГСТ – в 1,4, КА – в 1,5 раза, что приводит к увеличению соотношения (СТ+ГСТ)/КА.

Через 3 месяца после окончания курса инъекций содержание биогенных аминов в ТК по сравнению с предыдущим сроком возрастает, особенно резко – уровень гистамина, который достигает на этом сроке максимальных значений. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА при этом увеличивается, но все же не достигает нормы (рисунок 2).

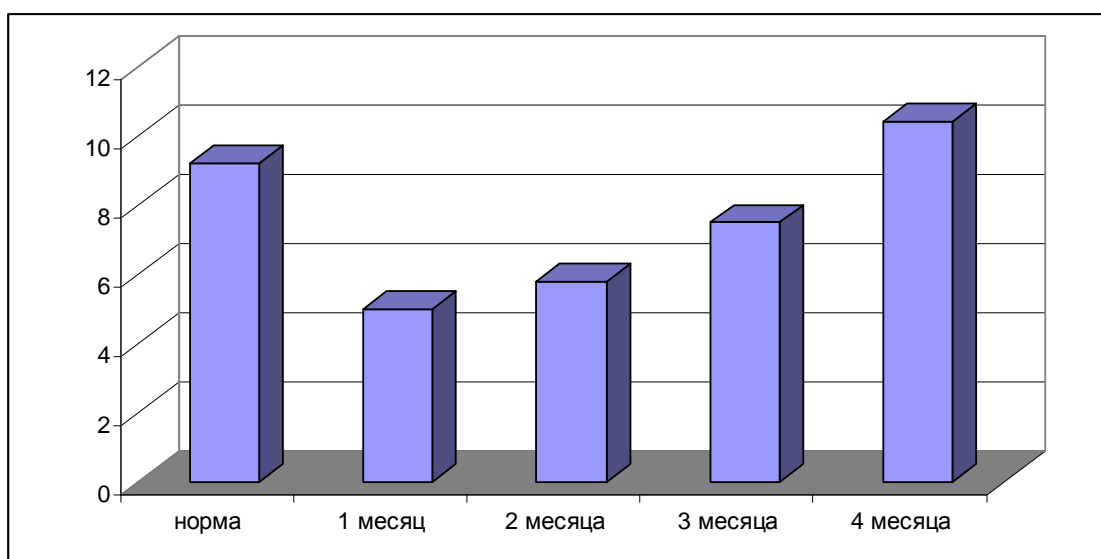


Рисунок 2. Динамика изменений соотношения (СТ+ГСТ)/КА в норме и через 1-4 месяца после окончания курса инъекций канцерогена

Через 4 месяца после введения канцерогена содержание серотонина, катехоламинов, гистамина падает, а соотношение, наоборот, увеличивается и даже превышает показатели интактных крыс. Возможно, это свидетельствует о подавлении функциональной активности клеток тимуса на этом сроке.

При окраске срезов тимуса полихромным толуидиновым синим через 1 месяц после окончания введения канцерогена выявлено достоверное увеличение дегранулированных форм тучных клеток на 28 % (рисунок 3). При этом иммуногистохимическая реакция также дает достоверные отличия в количестве клеток по сравнению с интактными крысами.

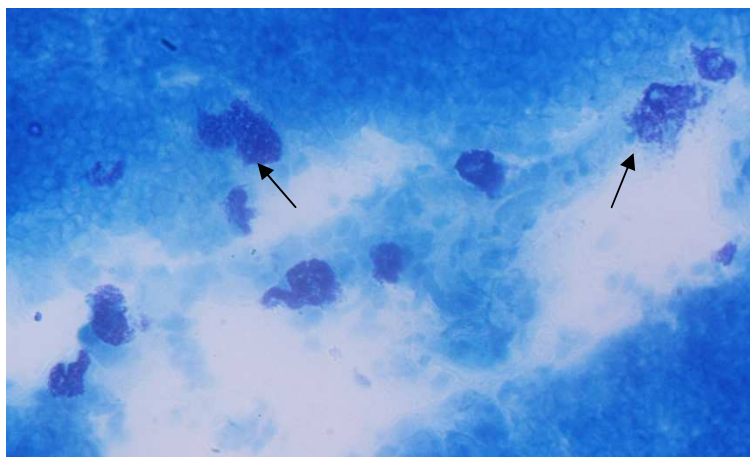


Рисунок 3. Тимус. Увеличение числа тучных клеток за счет дегранулированных форм через 1 месяц после окончания введения канцерогена. Окраска по Унна. МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Ув. 400х

Через 2 месяца после курса инъекций на срезах, окрашенных полихромнымтолуидиновым синим, по сравнению с крысами в первый месяц исследования в междольковых промежутках отмечается уменьшение количества тучных клеток. Параллельная постановка иммуногистохимических реакций показывает, что количество этих клеток уменьшается на 40 %.

Через 3 месяца после окончания введения канцерогена отмечается увеличение в 1,5 раза количества тучных клеток, что определяется с помощью окраски органа полихромных толуидиновым синим и иммуногистохимическим методом на триптазу тучных клеток (рисунок 4).

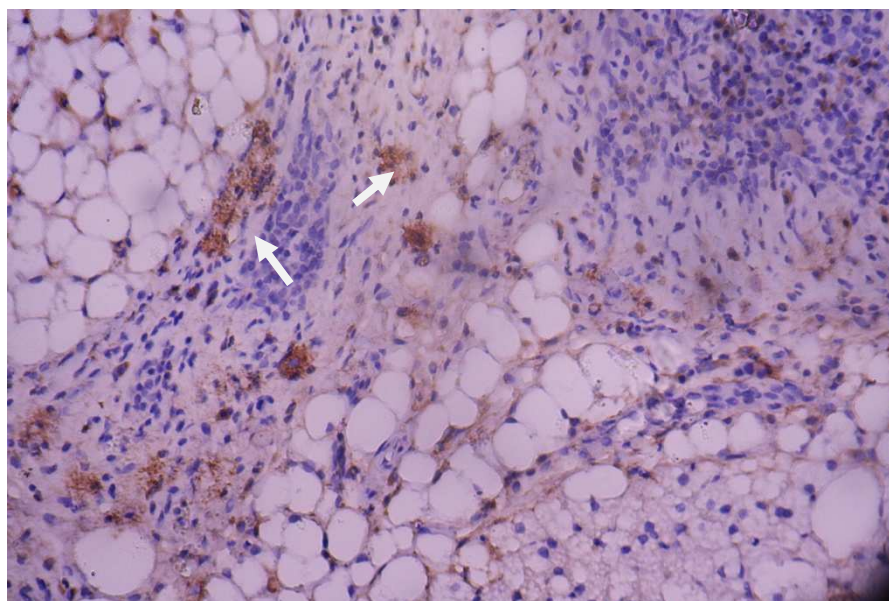


Рисунок 4. Тимус. Увеличение тучных клеток, положительных к триптазе. 3 месяца после окончания курса инъекций канцерогена. МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Ув.400х

Через 4 месяца после окончания курса инъекций на срезах, окрашенных полихромным толуидиновым синим, по сравнению с предыдущим сроком количество тучных клеток увеличивается в 1,5 раза за счет дегранулированных форм. Использование моноклональных антител на триптазу также дает достоверное увеличение количества тучных клеток.

Таким образом, наши исследования показали, что развитие аденокарциномы толстой кишки, индуцируемой 1,2-диметилгидразином, влияет на тучноклеточную популяцию тимуса. На это указывает выявленный дисбаланс уровня биогенных аминов, изменение соотношения (СТ+ГСТ)КА и количества тучных клеток, положительных к триптазе. В наших предыдущих работах было показано, что введение 1,2-диметилгидразина приводит к развитию акцидентальной инволюции тимуса [3]. Выявленное при этом увеличение количества тучных клеток, особенно дегранулированных форм, может быть связано с их повышенной миграцией в тимус, а изменение их биоаминного обеспечения и степени дегрануляции – участием в инволютивных процессах. При этом данные изменения напрямую зависят от срока исследования. По литературным данным известно, что плотность распределения тучных клеток увеличивается с прогрессией злокачественного новообразования [6]. По нашему мнению, данные изменения могут быть связаны со способностью ТК экспрессировать триптазу. Есть данные, что по мере злокачественной трансформации и прогрессии опухолевого процесса количество клеток, экспрессирующих триптазу, возрастает, что и наблюдается в нашем эксперименте.

Список литературы

1. Кондашевская М. В. Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах / М. В. Кондашевская // Вестник Российской АМН. – 2010, №6. – С. 49-54.
2. Лазарев А. Ф. Тучные клетки и опухолевый рост / А. Ф. Лазарев, И. П. Бобров, Т. М. Черданцева, В. В. Климачев и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2011, № 4 (46). – С.59-63.
3. Михайлова М. Н. Участие дендритных и нейроэндокринных клеток тимуса в развитии его инволюции при формировании экспериментальной опухоли толстой кишки / М. Н. Михайлова, Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, О. Ю. Кострова и др. // Вестник Чувашского университета. – Чебоксары, 2011. – №3. – С. 377-383.
4. Стручко Г. Ю. Исследование особенностей развития злокачественной опухоли при различном иммуноэндокринном статусе / Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, Е. В. Москвичев и др. // Материалы научно-практической конференции, Чебоксары, 2011. – С.174-177.

5. Яглова Н. В. Тучные клетки и врожденный иммунитет / Н. В. Яглова // Иммунология. – 2009, №2. – С.139-143.
6. Crivellato E. Mast cell contribution to tumor angiogenesis: a clinical approach / E. Crivellato, B. Nico, D. Ribatti // Eur. Cytokine Netw. – 2009. – Vol. 20 (4). – P. 197-206.
7. He S. H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease / S. H. He // Wld J / Gastroenterole. – 2004. – 10 (3). – P. 309-318.
8. Galinsky D. S. Mast cells and cancer – no longer just basic sciens / D. S Galinsky, H. Nechushtan // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2008. – Vol. 68 (2). – P. 115-130.
9. Maltby S. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodeling and immunomodulation / S. Maltby, K. Khazaie, K.M. McNagny // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1796 (1). – P. 19-26.
10. Moon T. C. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function / T. C. Moon, C.D. Laurent, K.E. Morris et al. // Mucosal. Immunol. – 2010. – Vol. 3 (2). – P. 111-128.

Рецензенты:

Суворова Галина Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Минздравсоцразвития РФ, г. Самара.

Корсакова Надежда Витальевна, доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры офтальмологии и оториноларингологии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», г. Чебоксары.