

УДК 57.086: 576.3

¹Бекетова А. А., ²Безнин Г. В., ²Разенкова В. А., ²Федорова Е. А.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЯИЧНИКА КРЫСЫ

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Аннотация. Целью работы является исследование срезов яичников беременных самок крыс с целью визуализации тучных клеток, определения их локализации и тинкториальных особенностей.

Методика работы заключается в анализе гистологических препаратов яичников, окрашенных тремя красителями: толуидиновым синим, метиленовым зеленым, альциановым синим в сочетании с ядерным прочным красным.

Основные результаты работы показали, что тучные клетки располагаются преимущественно в мозговом веществе яичника крысы и его брыжейке. Зарегистрированы единичные случаи локализации тучных клеток вокруг желтых тел и атретических фолликулов, однако данный вопрос является дискуссионным в научном сообществе. Отмечен успешный опыт окрашивания тучных клеток метиленовым зеленым, сопоставимый по результату с окрашиванием толуидиновым синим. Окрашивание альциановым синим было менее информативным.

Ключевые слова: тучные клетки, яичник, гистохимия.

¹Beketova A. A., ²Beznin G. V., ²Razenkova V. A., ²Fedorova E. A.

MAST CELLS IN THE RAT OVARY

¹Saint Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

²Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the work is to study sections of rat ovaries on the 18th day of pregnancy in order to visualize mast cells and determine their localization and tinctorial features.

The methodology of the work consists in the analysis of histological preparations of ovaries stained with three dyes: toluidine blue, methylene green, and alcian blue in combination with nuclear fast red.

The main results of the work showed that mast cells are located mainly in the ovarian medulla and mesentery. Individual cases of mast cells localization around the corpus luteum and tertiary follicles have been registered, but this issue is still debatable. A successful experience of methylene green staining for mast cells, which is comparable with toluidine blue staining, was noted. Alcian blue staining was less informative.

Keywords: mast cells, ovary, histochemistry.

ВВЕДЕНИЕ

Яичник является половой железой, выполняющей гаметообразующую и эндокринную функции. В ходе эстрального цикла яичник претерпевает структурные и функциональные изменения, сопровождаемые колебанием концентрации гормонов, изменением микроциркуляции и ремоделированием соединительной ткани. Показана ключевая роль матриксных металлопротеиназ [1] в ремоделировании матрикса яичника, активация которых происходит путем ограниченного гидролиза неактивных предшественников, — промателлопротеиназ, которые являются субстратом протеаз тучных клеток (ТК) [2]. В свою очередь ТК (мастоциты), которые являются резидентными клетками соединительной ткани, участвуют не только в ее ремоделировании, но и в регуляции микроциркуляции, ангиогенезе и во многих других процессах, обеспечивающих как нормальное, так и патологическое функционирование яичника.

В первую очередь исследователи посвящают свои работы характеристике ТК и характеристике их распределения в яичнике в зависимости от возраста крысы и фазы эстрального цикла. Не меньший интерес вызывает изучение числа и степени зрелости ТК в яичнике при моделировании таких состояний, как синдром поликистозных яичников и свинцовая интоксикация [3]. В данных исследованиях ТК используют как маркер состояния яичника, оценивая их общее количество и количество мастоцитов разных типов («дегранулировавших/недегранулировавших», «зрелых/незрелых»). Большинство исследователей окрашивает препараты толуидиновым синим и/или альциановым синим и сафранином [4, 5].

Вопрос локализации ТК в яичнике остается дискуссионным. Ученые сходятся во мнении, что ТК располагаются в мозговом веществе яичника и его воротах, окружая сосуды [5, 6], а также в брыжейке яичника [6]. Некоторые авторы отмечают расположение ТК в капсуле яичника и его строме, во внешней теке фолликулов и желтых тел [7], хотя относительно последнего утверждения есть опровергающие работы [5]. Идет спор и о колебании количества ТК в течение эстрального цикла: большинство авторов утверждает, что в проэструс количество ТК минимально [4, 5], но есть и противоположное мнение [6]. До сих пор не решен вопрос о распределении ТК при беременности.

С учетом значимости ТК для характеристики функционального состояния яичника, целью данного исследования явилась визуализация ТК в яичнике беременной крысы и определение их микроанатомической локализации и тинкториальных особенностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись половозрелые самки крыс Вистар возрастом 7–8 месяцев. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово». При содержании и эвтаназии животных соблюдали принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986) и Правила надлежащей лабораторной практики (Приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016). Материалом исследования служили препараты яичников данных животных. Взятие материала проводили на 18-й день гестации. Яичники фиксировали в цинк-формалине с последующей проводкой и заливкой в парафин по стандартной методике. С парафиновых блоков на ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США)

были изготовлены срезы толщиной 7 мкм. Монтирование производили на стекла двух видов: с адгезивным покрытием MICRO SLIDES New Silane IV 5116-20F и стекла с оригинальным адгезивным покрытием (патент № RU 2386137C1). Все срезы обеспарафинивали единообразно.

Окрашивание срезов проводили различными гистологическими красителями: метиленовым зеленым, толуидиновым синим, альциановым синим.

Окрашивание метиленовым зеленым проводили при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего проводили дифференцировку в растворе 96%-ного этанола и/или подкисленного 96%-ного этанола. Необходимость дифференцировки была обусловлена интенсивным окрашиванием стромы и паренхимы яичников.

Окрашивание толуидиновым синим проводили при комнатной температуре в течение 7 минут с последующей дифференцировкой под микроскопом в 96%-ном этаноле.

Окрашивание альциановым синим проводилось тремя способами. Способ 1: после депарафинизации срезы опускались в 3%-ный водный раствор уксусной кислоты на 3 минуты, после чего на них наносили краситель и укладывали во влажную камеру для инкубации в термостате при 27,5 °C в течение 40 минут, затем срезы докрашивали ядерным прочным красным в течение 4 минут. Способ 2 (прогрессивное окрашивание альциановым синим в малых концентрациях на ТК, патент № RU 2798117C1): срезы окрашивали в растворе альцианового синего малой концентрации в 5%-ном растворе уксусной кислоты. Способ 3 аналогичен второму, но вместо 5%-ного раствора уксусной кислоты использовали 10%-ный раствор. За окрашиванием препаратов следовали (единые для всех срезов) обезвоживание в изопропанол, просветление в ортоксилале и заключение в перманентную среду Bio Mount HM (Bio-Optica, Италия).

Фотографирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Leica PM750, камеры ICC50 и программного обеспечения Leica LAS EZ (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ препаратов яичников показал, что ТК располагаются преимущественно в мозговом веществе яичника, как вокруг сосудов, так и между волокнами соединительной ткани. О расположении ТК в воротах яичника нельзя высказать однозначное предположение, так как на срезы эта область не попала. Мастоциты, окружавшие сосуды крупного и среднего калибров, имели округлую форму или форму полукруга (на срезе), диаметр которого обращен в сторону стенки сосуда. Они располагались одиночно либо малыми группами (по две клетки). Среди них были замечены дегранулирующие клетки: их гранулы, выброшенные в интерстиций, явно определялись при окраске метиленовым зеленым и толуидиновым синим. Примечательно, что дегрануляция проходила в ограниченном участке цитоплазмы, о чем свидетельствует расположение гранул в интерстиции близ ТК. Данные сведения свидетельствуют в пользу участия ТК в регуляции овариального кровотока [4], а также подтверждают сообщения о локальном выбросе ТК медиаторов в ответ на внешний сигнал [9]. Кроме того, близкое расположение ТК к сосудам может обеспечивать их быстрое реагирование на гуморальные факторы. С другой стороны, такая локализация позволяет ТК осуществлять регуляторное действие на клетки ткани яичника (выброс содержимого гранул в кровь). Однако нами было отмечено расположение ТК вблизи сосудов

крупного и среднего калибра, а не сосудов микроциркуляторного русла, поэтому выдвигать такое предположение безосновательно. Против данного предположения свидетельствуют другие исследования, в которых показано, что лишь некоторые ТК располагаются вокруг артериол и капилляров, и большинство — вокруг венул [4].

ТК, располагавшиеся в строме мозгового вещества, имели овальную или вытянутую форму и были ориентированы своей длинной осью параллельно волокнам соединительной ткани. Вытянутая форма может свидетельствовать о хемотаксисе ТК в пределах яичника. В свою очередь, миграция ТК может быть одним из механизмов изменения распределения ТК в различные фазы эстрального цикла [6].

Стоит отметить, что единичные ТК обнаруживались в соединительной ткани, окружавшей желтые тела, на границе с мозговым веществом. Также был зарегистрирован единственный случай расположения ТК в соединительной ткани, окружавшей атретический фолликул со стороны мозгового вещества. Такое расположение может свидетельствовать в пользу участия ТК в развитии желтого тела (за счет гепарина) [5] и овуляции (при участии гистамина) [8].

В строме коркового вещества яичника, между желтыми телами и фолликулами, ТК нами обнаружено не было. Данный результат (отсутствие ТК в корковом веществе) может быть связан с фазой эстрального цикла [5]. В капсуле яичников мастоцитов мы не наблюдали, однако в брыжейке яичника они замечены были.

Большая часть информации была получена при анализе срезов, окрашенных толуидиновым синим и метиленовым зеленым, дающими высокую контрастность ТК и их гранул с окружающими тканями яичника. При большом увеличении можно было наблюдать зернистость цитоплазмы и просветленную область ядра, но не во всех клетках. Окрашивание альциановым синим было менее информативным вследствие малой контрастности ТК по отношению к тканям яичника и малом количестве выявляемых с помощью этой методики ТК. Однако при рассмотрении отдельных клеток при большом увеличении объектива ($\times 100$) методика окрашивания альциановым синим в сочетании с ядерным прочным красным обеспечивала более четкое изображение ядра.

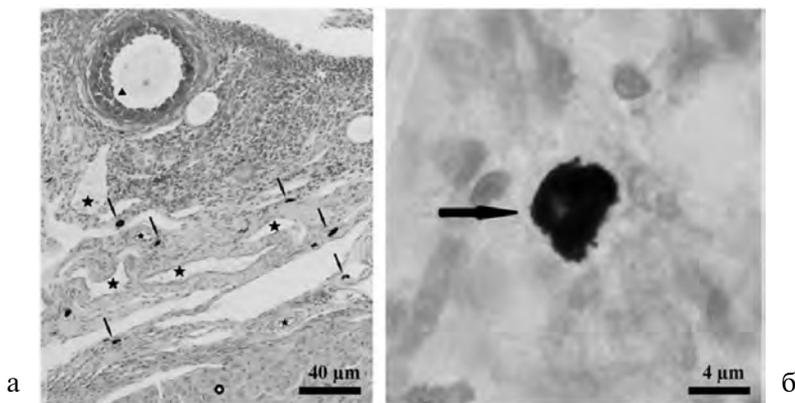


Рис 1. Яичник крысы. Окрашивание толуидиновым синим: а — увеличение объектива $\times 10$, треугольником обозначена полость атретического фолликула, звездами — просветы сосудов, кольцом — желтое тело, стрелками указаны тучные клетки; б — увеличение объектива $\times 100$. Стрелкой указана тучная клетка

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных нами результатов и проанализированной литературы можно достоверно утверждать, что ТК при беременности располагаются в мозговом веществе яичника. Иное расположение ТК в яичнике требует более тщательного исследования, которое бы охватывало и другие фазы эстрального цикла, и более широкий спектр содержимого гранул ТК, и иные плоскости срезов. О функциях ТК в яичнике мы можем судить лишь косвенно по их локализации и данным литературы, из которых наиболее убедительным кажется обеспечение регуляции кровоснабжения. Также хотим отметить, что метиленовый зеленый не уступает толуидиновому синему в удобстве выявления ТК.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по теме FGWG-2022-0012.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ny T., Wahlberg P., Brändström I. J. Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 187(1–2): 29–38. DOI: 10.1016/s0303-7207(01)00711-0
2. Saarinen J., Kalkkinen N., Welgus H. G., Kovanen P. T. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem.* 1994; 269(27): 18134–18140.
3. Karaca T., Simşek N. Effects of spirulina on the number of ovary mast cells in lead-induced toxicity in rats. *Phytother Res.* 2007; 21(1):44–46. DOI: 10.1002/ptr.2015
4. Jones R. E., Duvall D., Guillette L. J. Jr. Rat ovarian mast cells: distribution and cyclic changes. *Anat Rec.* 1980; 197(4):489–493. DOI: 10.1002/ar.1091970410
5. Aydin Y., Tunçel N., Gürer F., Tuncel M., et al. Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: cyclic changes and contribution to tissue histamine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1998; 120(2):255–262. DOI: 10.1016/s1095-6433(98)00027-0
6. Gaytan F., Aceitero J., Bellido C., Sánchez-Criado J. E., Aguilar E. Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biol Reprod.* 1991; 45(1):27–33. DOI: 10.1095/biolreprod45.1.27
7. Karaca T., Yörük M., Uslu S. Distribution and quantitative patterns of mast cells in ovary and uterus of rat. *Arch Med Vet.* 2007; 39(2):135–139. DOI: 10.4067/S0301-732X2007000200006
8. Schmidt G., Owman C., Sjöberg N. O. Cellular localization of ovarian histamine, its cyclic variations, and histaminergic effects on ovulation in the rat ovary perfused in vitro. *J Reprod Fertil.* 1988; 82(2):409–417. DOI: 10.1530/jrf.0.0820409
9. Lehman M., Silver R. CSF signaling in physiology and behavior. *Prog Brain Res.* 2000; 125:415–433. DOI: 10.1016/S0079-6123(00)25029-2