

© Л. М. Яковлева, О. А. Соркина, 2016
УДК 611.316-018:613.81:599.323.4

Л. М. Яковлева, О. А. Соркина

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ОКОЛОУШНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЕ НА ХРОНИЧЕСКУЮ АЛКОГОЛЬНУЮ ИНТОКСИКАЦИЮ

Кафедра нормальной и патологической физиологии (зав. — проф. С. В. Куприянов), Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, г. Чебоксары

Цель работы — изучение локализации и структурно-функциональных особенностей тучных клеток (ТК) в околоушной слюнной железе при хронической алкогольной интоксикации. Исследование проведено на 15 белых взрослых беспородных крысах-самцах, получавших 20% раствор этилового спирта в качестве единственного источника питья в течение 2 мес. Контрольную группу составили 10 интактных животных. Структурные изменения околоушной слюнной железы изучали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином — эозином. ТК выявляли на криостатных срезах, окрашенных по Унна; учитывали их топографию, дегрануляцию и подсчитывали количество в поле зрения. Содержание серотонина оценивали количественно с помощью люминесцентной микроскопии и цитоспектрофлуориметрии. При хронической алкогольной интоксикации отмечена вариабельность формы концевых отделов и размеров железистых клеток, в которых часто обнаруживались неокрашенные вакуоли. Междольковые выводные протоки неравномерно расширены, их клетки имеют разную высоту. Число ТК в соединительнотканых прослойках около междольковых выводных протоков и кровеносных сосудов увеличено, около 60% из них находятся в состоянии дегрануляции. Однако содержание серотонина в этих участках значительно не меняется по сравнению с таковым в контроле, предположительно, вследствие того, что серотонин, выделяемый ТК при дегрануляции, активно взаимодействует с многочисленными расположенными здесь волокнами и терминалями автономной нервной системы, быстро захватываясь ими. Внутри долек содержание ТК увеличено в меньшей степени, чем в области междольковых протоков, однако 80% из них находятся в состоянии резко выраженной дегрануляции, часто с полным распадом цитоплазмы. Эти клетки, очевидно, служат источниками серотонина, содержание которого значительно увеличивается в области концевых секреторных отделов. Предполагается, что повышенное содержание медиатора в области концевых отделов указывает на то, что в железе под влиянием алкогольной интоксикации активируются дополнительные паракринные механизмы регуляции, которые способствуют повышению ее функциональной активности, направленной на ускоренное выведение из организма этанола и токсических продуктов его метаболизма.

Ключевые слова: околоушная слюнная железа, тучные клетки, серотонин, алкогольная интоксикация, крыса

Известно, что хронические интоксикации, в частности алкогольная, вызывают разнообразные изменения структуры и функции органов полости рта, однако основное внимание при их изучении было уделено распространенности и интенсивности заболеваний слизистой оболочки полости рта, кариеса зубов, болезней пародонта [15, 18, 19, 23]. Получены также отдельные сведения о том, что употребление алкоголя сопровождается нарушением функции слюноотделения, а также структуры слюнных желез, однако эти данные разрознены, неоднозначны, а иногда противоречивы [6, 9, 13, 15, 17, 20]. В частности, состояние тучных клеток (ТК) в крупных слюнных железах в условиях хронической алкогольной интоксикации организма остается практически неизученным, несмотря на установленную роль этих клеток в регуляции различных физиологических и патологических процессов, влияние на кровенос-

ные сосуды, иммунную и нервную систему [1, 4, 8, 11, 14].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение воздействия алкоголя на состояние ТК в околоушной железе на модели хронической алкогольной интоксикации крысы.

Материал и методы. Исследование проведено на белых беспородных крысах-самцах массой 170–200 г, которые были разделены на 2 группы: контрольную — интактные животные (n=10) и подопытную (n=15). Крысы подопытной группы в качестве источника питья получали 20% раствор этилового спирта в течение 2 мес. Все действия, предусматривавшие контакт с лабораторными животными, осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) и Федерального Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. На проведение настоящего исследования получено разрешение этического комитета университета (протокол № 3 от 16.11.2015 г.).

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под общим эфирным ингаляционным наркозом. Объектом

Сведения об авторах:

Яковлева Любовь Максимовна (e-mail: 28Lybov@mail.ru), кафедра нормальной и патологической физиологии, Соркина Ольга Александровна, кафедра челюстно-лицевой хирургии и стоматологии, Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, 428015, г. Чебоксары, пр. Московский, 15

исследования была околоушная слюнная железа. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином — эозином. Для люминесцентно-гистохимического выявления серотонина, из материала, замороженного до -15°C в микротоме-криостате МК-25 (Технолог, СССР), получали срезы толщиной 10 мкм. Далее срезы, смонтированные на предметных стеклах, обрабатывали по методу Фалька—Хилларпа [10]. Метод основан на реакции конденсации серотонина парами формальдегида в течение 1 ч при 80°C , при котором образуется 1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин, люминесцирующий в желто-оранжевой области ($\lambda_{\text{max}}=525\text{ нм}$), светофильтр № 8 измерительной насадки ФМЭЛ-1А (ЛОМО, Россия). Содержание серотонина количественно оценивали с помощью цитоспектрофлуориметрии на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-4 (ЛОМО, Россия) с насадкой при об. 40, ок. 10; диаметр рабочего зонда — 0,5 мм. В каждом срезе производили не менее 20 измерений интенсивности свечения в области секреторных клеток концевых отделов и междольковых выводных протоках; результаты выражали в условных единицах люминесценции (усл. ед.) по шкале регистрирующего прибора-усилителя. В последующем криостатные срезы использовали для окраски по Унна, заменив полихромный метиленовый синий полихромным толуидиновым синим. Этот метод использован для качественной и количественной характеристики ТК. Препараты изучали при об. 40, ок. 10 с помощью микроскопа «Биомед-1» (ЛОМО, Россия). В указанном поле зрения производили подсчет ТК. При этом определяли также индекс дегрануляции (А) по формуле: $A=C/B$, где С — количество дегранулирующих клеток, В — общее число проанализированных ТК.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием стандартного программного обеспечения «Statistica 6.0» на персональном компьютере. Для оценки значимости цифровых данных применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $P<0,05$.

Результаты исследования. При исследовании срезов околоушной железы животных контрольной группы наблюдается нормальная структурная организация органа, образованного железистыми дольками и междольковыми соединительнотканными прослойками, содержащими междольковые выводные протоки, а также междольковые кровеносные сосуды (артерии и вены), лимфатические сосуды и небольшие нервные стволы. Основной объем долек занят компактно расположенными концевыми секреторными отделами (ацинусами), имеющими сравнительно одинаковые размеры. Концевые отделы образованы железистыми эпителиоцитами (сероцитами) пирамидной формы сходных размеров с центрально расположенным ядром, по периферии окруженными уплощенными миоэпителиальными клетками. Внутريدольковые выводные протоки в околоушной железе у крыс развиты умеренно и включают вставочные и исчерченные. Междольковые протоки выстланы однослойным многорядным столбчатым эпителием, местами — двухслойным эпителием. Их просветы не расширены. При окра-

ске гематоксилином — эозином и полихромным толуидиновым синим по Унна отмечаются нормальные тинкториальные особенности концевых секреторных отделов и выводных протоков.

На срезах, окрашенных по Унна, отчетливо выявляются ТК за счет интенсивного метахроматического окрашивания их цитоплазматических гранул толуидиновым синим в ярко-фиолетовый цвет. Данные клетки в основном сосредоточены группами вблизи междольковых протоков и кровеносных сосудов в количестве $4,5\pm 0,7$ в поле зрения. Клетки характеризуются довольно крупными размерами — около 10–25 мкм. Выявляемые ТК — преимущественно без признаков дегрануляции, они имеют овальную или удлинённую форму, края их четко контурируются, цитоплазма заполнена плотно расположенными метахроматическими гранулами, ядро не прослеживается. Встречаются также клетки с признаками частичной дегрануляции. Они имеют нечеткие границы, разную величину, неправильную форму. Цитоплазма менее интенсивно окрашена за счет рыхло расположенных хорошо различимых гранул. За пределами данных клеток содержится большое количество гранул. Индекс дегрануляции составляет 0,3.

Внутри долек около концевых отделов, вставочных и исчерченных протоков встречаются единичные ТК в количестве 1–2 (в среднем — $1,20\pm 0,13$) в поле зрения. Их цитоплазма плотно заполнена метахроматическими гранулами, а ядро неразлично. Индекс дегрануляции составляет 0,4. При люминесцентно-гистохимическом исследовании срезов на серотонин выявляется светлосинее свечение. Его содержание практически одинаково в области концевых секреторных отделов и зоне междольковых протоков, составляя $1,52\pm 0,22$ и $1,57\pm 0,17$ усл.ед соответственно.

У подопытных животных, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации, значительных нарушений общей структурной организации концевых секреторных отделов и выводных протоков не выявлено. Между тем, часто отмечались изменения формы концевых отделов и вариабельность размеров образующих их железистых клеток, среди которых встречались и очень крупные. В цитоплазме многих клеток наблюдались круглые неокрашенные вакуоли, которые предположительно соответствуют жировым включениям. В кровеносных сосудах отмечается застой крови. Междольковые выводные протоки неравномерно расширены, их клетки имеют разную высоту. Содержание ТК в железе увеличено. В соединительнотканых перегородках около междольковых протоков они образуют группы, где их число

достигает $8,7 \pm 0,7$ в поле зрения. ТК без признаков дегрануляции единичны, основная их часть находится в стадии дегрануляции, соответственно индекс дегрануляции достигает 0,6. Наблюдается также увеличение числа ТК, дегранулирующих с тотальным распадом цитоплазмы. Полностью разрушенные ТК со светлой цитоплазмой и небольшим количеством разбросанных метахроматически окрашенных гранул составляют до $\frac{1}{3}$ от числа дегранулированных. Несколько повысилось также и содержание ТК, расположенных внутри долек, около концевых отделов, вставочных и исчерченных выводных протоков (до $1,50 \pm 0,16$ в поле зрения), причем все они характеризуются высокой степенью активности, под которой подразумевается усиленное созревание и выделение гранул ТК. Индекс дегрануляции в указанной зоне составляет 0,8.

Примечательно, что при хронической алкогольной интоксикации наблюдается существенное повышение содержания серотонина в зоне концевых секреторных отделов, вставочных и исчерченных протоков до $2,50 \pm 0,18$ усл. ед., что значимо ($P < 0,01$) превышает уровень в контрольной группе. В то же время, в области междольковых протоков этот показатель равен лишь $1,64 \pm 0,08$ усл. ед., причем его значение значимо не отличается от такового в контроле ($P > 0,05$).

Обсуждение полученных данных. Как известно, ТК обнаружены практически во всех органах, они особенно многочисленны около кровеносных и лимфатических сосудов, периферических нервов и нервных волокон [1–7]. Результаты наших исследований полностью согласуются со сведениями о преимущественной локализации этих клеток в тканях и органах. Так, установлено, что большее число ТК в виде групп располагаются в непосредственной близости от исчерченных, междольковых выводных протоков околоушной слюнной железы, и практически всегда прослеживается их дегрануляция. Единичные клетки встречаются во внутريدольковых прослойках соединительной ткани между концевыми секреторными отделами.

Как известно, ТК весьма чувствительны к действию различных гормонов, токсинов, ионов, продуктов перекисного окисления липидов: они восприимчивы к незначительным изменениям их концентрации в сыворотке крови и межклеточном веществе [5]. ТК реагируют на изменения микроокружения, при этом они способны не только самостоятельно синтезировать биологически активные вещества [2, 8], но и захватывать извне и накапливать нейромедиаторы эффекторных окончаний автономного отдела нервной системы.

Тем самым ТК определяют направленность и интенсивность биохимических процессов, запускающих механизмы адаптации структурных компонентов органа.

Дегранулирующие клетки выбрасывают в межклеточное пространство большое количество биологически активных веществ, таких как гистамин, серотонин, цитокины, факторы роста, протеазы и др., благодаря чему они являются основными регуляторами тканевого гомеостаза [2, 3, 8, 11]. Многообразие медиаторов обуславливает участие данных клеток не только в физиологических адаптационных механизмах регенерации, ангиогенеза, дифференцировки клеток, но и в патологических процессах, причем их дисфункция способствует дистрофическим и воспалительным изменениям органов [2–4]. Воздействуя на эндотелий сосудов, ТК совместно с автономной нервной системой [16], в частности холин- и адренергическими нервными волокнами, по-видимому, играют важную роль в регуляции секреторной функции околоушной железы.

При хронической алкогольной интоксикации выявляется отчетливая тенденция к увеличению числа ТК в околоушной слюнной железе, особенно в соединительнотканых прослойках возле выводных протоков, что согласуется с данными литературы, которые указывают на увеличение содержания этих клеток в различных органах при воздействии алкоголя [14]. Увеличение популяции ТК и усиленное созревание молодых ТК в местах их локализации в основном регулируются цитокинами [2, 3]. Между тем, известно, что этанол способен индуцировать выработку ряда цитокинов, таких как интерлейкин-6 и -10, фактор некроза опухолей [14, 21, 22].

Слюнные железы являются органами, экскретирующими этанол и его метаболит ацетальдегид. Воздействие данных неспецифических раздражителей на ТК, видимо, ускоряет процесс их дегрануляции и выброса медиаторов, в частности, серотонина. Учитывая параллельное увеличение количества дегранулирующих и тотально распадающихся ТК, можно предположить, что в данном случае именно они являются источником серотонина в тканях. Можно предположить, что повышенное содержание медиатора в области концевых отделов указывает на то, что в железе под влиянием алкогольной интоксикации активируются дополнительные паракринные механизмы регуляции, которые способствуют повышению ее функциональной активности, направленной на ускоренное выведение из организма этанола и токсических продуктов его метаболизма.

На основе полученных данных можно заключить, что этанол оказывает токсическое действие на популяцию ТК околушной железы. В результате клетки формируют микроокружение с повышенным содержанием медиаторов. Значимое увеличение содержания серотонина в области концевых секреторных отделов, вставочных и исчерченных протоков, вероятно, связано с его накоплением и сравнительно низким уровнем метаболического распада. Меньшее накопление серотонина, отмеченное нами около междольковых выводных протоков и кровеносных сосудов, объясняется, предположительно, тем, что серотонин, выделяемый ТК при дегрануляции, активно взаимодействует с многочисленными расположенными здесь волокнами и терминалями автономной нервной системы и быстро захватывается ими. Возможно также, что это связано с большей скоростью метаболизма серотонина в этой зоне.

Как известно, в метаболическом распаде серотонина участвует не только моноаминоксидаза, но и алкогольдегидрогеназа [12, 13]. Очевидно, при алкогольной интоксикации активность последней в значительной степени направлена на разрушение этанола, в связи с чем возникает ее конкурентная недостаточность при метаболической деградации серотонина, и это сопровождается накоплением медиатора возле концевых отделов. При активном участии ТК паракринное воздействие серотонина, вероятно, провоцирует развитие дисфункции сероцитов и миоэпителиальных клеток слюнной железы. Это подтверждается как собственными наблюдениями, так и данными литературы, поскольку при хронической алкогольной интоксикации в слюнных железах отмечена гиперплазия ацинусов, расширение протоков, дистрофия их эпителия [6]. Получены также данные, что хроническое алкогольное воздействие непосредственно вызывает усиление выработки фактора некроза опухолей и апоптоз клеток слюнных желез [21].

Подводя итог проведенному исследованию и рассматривая полученные результаты с учетом данных литературы, можно заключить, что ТК являются важным звеном, опосредующим влияние различных воздействий на структуру и функцию органов и тканей при любых формах адаптации и патологических процессах. Таким образом, изменение цитофизиологического состояния ТК при хронической алкогольной интоксикации представляется важной составляющей неспецифического адаптивного ответа слюнной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аминова Г.Г., Григоренко Д.Е. Возрастные особенности распределения тучных клеток в стенке пищевода человека // Морфология. 2015. Т. 147, вып. 1. С. 42–47.

2. Быков В.Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток // Морфология. 1999. Т. 115, № 2. С. 64–72.

3. Быков В.Л. Развитие и гетерогенность тучных клеток // Морфология. 2000. Т. 117, вып. 2. С. 86–92.

4. Гусельникова В.В., Бекоева С.А., Коржевская В.Ф. и др. Гистохимическая и иммуногистохимическая идентификация тучных клеток миокарда человека // Морфология. 2015. Т. 147, вып. 2. С. 80–86.

5. Козлов А.В., Бусова О.С. Тучноклеточная популяция почки и почечной капсулы. М.: Щербинская типография, 2009.

6. Пиголкин Ю.И., Должанский О.В., Мамсурова Т.С., Чертовских А.А. Судебно-медицинская диагностика хронической алкогольной интоксикации по гистологическим изменениям мягких тканей полости рта и слюнных желез // Суд.-мед. эксперт. 2011. № 3. С. 10–12.

7. Яковлева Л.М., Любовцева Л.А. Динамика содержания нейромедиаторов в структурах тощей кишки крыс при хронической алкогольной интоксикации // Бюл. exper. биол. 2013. Т. 155, № 1. С. 36–40.

8. da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell // J. Histochem. Cytochem. 2014. Vol. 62, № 10. P. 698–738.

9. Dutta S.K., Orestes M., Vengulekur S., Kwo P. Ethanol and human saliva: effect of chronic alcoholism on flow rate, composition, and epidermal growth factor // Am. J. Gastroenterol. 1992. Vol. 87, № 3. P. 350–354.

10. Falck B., Hillarp N.A., Thieme G., Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde // J. Histochem. Cytochem. 1962. Vol. 10. P. 348–354.

11. Galli S.J., Nakae S., Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune Responses // Nat. Immunol. 2005. Vol. 6, № 2. P. 35–42.

12. Karamanakis P.N., Pappas P., Boumpa V.A. et al. Pharmaceutical agents known to produce disulfiram-like reaction: effects on hepatic ethanol metabolism and brain monoamines // Int. J. Toxicol. 2007. Vol. 26, № 5. P. 423–432.

13. Maier H., Born I.A., Veith S. et al. The effect of ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat // Alcohol. Clin. Exp. Res. 1988. Vol. 10. P. 425–429.

14. Mendes L.O., Amorim J.P., Teixeira G.R. et al. Mast cells and ethanol consumption: interactions in the prostate, epididymis and testis of UChB rats // Am. J. Reprod. Immunol. 2011. Vol. 66, № 3. P. 170–178.

15. Riedel F., Goessler U.R., Hörmann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat // Dig. Dis. 2005. Vol. 23, № 3–4. P. 195–203.

16. Sabino-Silva R., Ceroni A., Koganezawa T. et al. Baroreceptor-mediated activation of sympathetic nerve activity to salivary glands // J. Physiol. Behav. 2012. Vol. 107, № 3. P. 390–396.

17. Sagatelian M.A., Fravel J., Gallo S.H. et al. Do parotid duct abnormalities occur in patients with chronic alcoholic pancreatitis? // Am. J. Gastroenterol. 1998. Vol. 93, № 2. P. 197–200.

18. Saini G.K., Gupta N.D., Prabhat K.C. Drug addiction and periodontal diseases // J. Indian Soc. Periodontol. 2013. Vol. 17, № 5. P. 587–591.

19. Scott J. Oral effects of chronic alcoholism. Br. J. Addict. 1990. Vol. 85, № 12. P. 1664–1665.

20. Scott J., Berry M.R., Woods K. Effects of acute ethanol administration on stimulated parotid secretion in the rat // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1989. Vol. 13, № 4. P. 560–563.
21. Slomiany B.L., Piotrowski J., Slomiany A. chronic alcohol ingestion enhances tumor necrosis factor-alpha expression and salivary gland apoptosis // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1997. Vol. 21, № 8. P. 530–533.
22. Steiner J.L., Pruznak A.M., Navaratnarajah M., Lang C.H. Alcohol differentially alters extracellular matrix and adhesion molecule expression in skeletal muscle and heart // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2015. Vol. 39, № 8. P. 1330–1340.
23. Waszkiewicz N., Zalewska A., Szulc A. et al. The influence of alcohol on the oral cavity, salivary glands and saliva // *Pol. Merkur. Lekarski.* 2011. Vol. 30. P. 69–74.

Поступила в редакцию 18.02.2016
Получена после доработки 20.03.2016

REACTION OF PAROTID GLAND MAST CELLS TO CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

L.M. Yakovleva, O.A. Sorkina

The goal of this study was to examine the localization and the structural and functional features of mast cells (MC) in the parotid gland in chronic alcohol intoxication. The study was conducted on 15 adult outbred albino male rats receiving 20% ethanol solution as the sole source of drinking for 2 months. The control group included 10 intact animals. Structural changes in parotid salivary glands were studied in paraffin sections, stained with hematoxylin–eosin. MC were demonstrated in cryostat sections stained by Unna's method; their topography, degranulation

were evaluated and their number per field of vision was counted. Serotonin content was assessed quantitatively by using fluorescent microscopy and cytospectrophotometry. In chronic alcohol intoxication, marked variability was demonstrated in the shape of the secretory portions and the size of their glandular cells, which often showed unstained vacuoles. Interlobular ducts are unevenly dilated, their cells had variable height. The number of MC in the connective tissue layer around the interlobular excretory ducts and blood vessels was increased, most of them were in a state of degranulation. However, the content of serotonin in these areas was not changed significantly compared with that in the control group, presumably due to the fact that serotonin released from MC during degranulation, was actively interacting with numerous fibers and terminals of the autonomic nervous system located here, and was quickly trapped by them. Within the lobules, the amount of MC was increased to a lesser extent than in the area of interlobular ducts, but 80% of them were in a state of pronounced degranulation, often with complete disintegration of the cytoplasm. These cells apparently served as the sources of serotonin, the number of which significantly increased in the area of secretory portions. It is suggested that the increased concentrations of serotonin in the area of the secretory portions indicates that under the influence of alcohol intoxication the additional paracrine regulatory mechanisms were activated in the gland, which contributed to its functional activity, aimed at accelerating the excretion of ethanol and its toxic products of metabolism.

Key words: *parotid salivary gland, mast cells, serotonin, alcohol intoxication, rat*

Department of Normal and Pathological Physiology,
I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary