

© А. Л. Зашихин, А. Ю. Любезнова, Ю. В. Агафонов, 2015
УДК 611.366.018.6:599.324

А. Л. Зашихин, А. Ю. Любезнова, Ю. В. Агафонов

ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАХАЛЯ В СОСТАВЕ ГЛАДКОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ И ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. Л. Зашихин), Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

Интерстициальные клетки Кахаля (ИКК) в желчном пузыре и в различных отделах желчевыводящих путей выявляли у взрослых морских свинок с помощью иммуноцитохимической реакции на специфический маркер этих клеток — рецепторную тирозинкиназу c-kit (CD117) и электронно-микроскопического анализа. Показано, что c-kit-позитивные клетки локализованы в составе мышечного компонента стенки желчного пузыря и различных отделов желчных протоков. В стенке желчного пузыря плотность их расположения выше, чем в желчных протоках. ИКК имеют многочисленные отростки, характеризуются отсутствием компонентов сократительного аппарата и обладают способностью формировать плотные мембранные контакты с гладкими миоцитами.

Ключевые слова: гладкая мышечная ткань, интерстициальные клетки Кахаля, желчный пузырь, желчные протоки

В настоящее время в литературе появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что в регуляции функциональной деятельности гладкой мышечной ткани органов пищеварительного тракта [1, 9], репродуктивной [10], дыхательной [3] и мочевыделительной систем [4] важная роль принадлежит интерстициальным клеткам Кахаля (ИКК). До настоящего времени цитологические признаки и специфика их функциональной деятельности остаются предметом дискуссии. Показано, что периодичность сократительной активности гладкой мышечной ткани в органах обеспечивается наличием специфических водителей ритма, которые могут располагаться в ней диффузно [12] или формировать специальные зоны пейсмекерной активности [7]. Данный тип клеток описан в составе мышечной ткани желчного пузыря [8], тем не менее, вопрос об их структурной организации, распределении в различных отделах желчевыводящих путей остается открытым. Актуальность данного вопроса обусловлена также тем, что их дискинезия связана с нарушением функциональной деятельности гладкой мышечной ткани, входящей в состав их стенки. Цель настоящей работы — сравнительный анализ клеточных элементов гладкой мышечной ткани желчного пузыря и желчевыводящих путей.

Материал и методы. Исследование выполнено на 15 лабораторных морских свинках-самцах массой 600–900 г в возрасте 6–7 мес с соблюдением «Правил проведения работ

с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Изучены фрагменты стенки желчного пузыря и желчных протоков. ИКК идентифицировали, применяя иммуноцитохимическую реакцию выявления маркера c-kit-рецепторной тирозинкиназы (CD117) [11]. Для оценки экспрессии c-kit материал фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS, Sigma, США) при pH 7,4 и заливали в парафин, затем готовили срезы толщиной 5–7 мкм, которые депарафинировали, инкубировали в PBS с добавлением 0,6% перекиси водорода, 1% раствора Тритона X-100 и 5% козьей сыворотки (Vector Laboratories, Inc, США). Использовали поликлональные кроличьи антитела к белку c-kit (CD-117) (SantaCruz Biotechnology) в разведении 1:100 (экспозиция в течение 2 ч при комнатной температуре). Визуализацию реакции проводили с помощью вторичных моноклональных кроличьих антител, конъюгированных с люминесцентным флюорохромом в разведении 1:100 (Alexa Fluor 568 красный, IgG, Molecular Probes, Inc) в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток докрашивали ядерным красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол, Molecular Probes, Inc.). Контроль реакции осуществляли на срезах без специфических первичных антител. Результаты окрашивания оценивали с помощью флюоресцентного микроскопа Olympus BX43 (Olympus, Япония).

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) в течение 2 ч с последующей фиксацией в течение 1 ч в 2% растворе четырехоксида осмия при температуре 5 °С. Кусочки промывали в буфере, затем проводили обезвоживание в ацетоне возрастающей концентрации (50, 70, 90, 100%), контрастировали в 70% спирте и 1% уранилацетате в течение 12 ч и заливали в смесь эпон-аралдита. Для обеспечения прицельного электронно-

Сведения об авторах:

Зашихин Андрей Леонидович (e-mail: zashihin2@atknnet.ru), Любезнова Анастасия Юрьевна, Агафонов Юрий Витальевич (e-mail: profALZ@yandex.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Северный государственный медицинский университет, 163000, г. Архангельск, пр-т Троицкий, 51

микроскопического анализа со всех блоков получали серийные полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм, которые окрашивали 1% раствором метиленового синего. После идентификации необходимых объектов блоки затачивали, и прицельные ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция), подвергали двойному контрастированию в 2,5% растворе уранилацетата и 0,3% растворе цитрата свинца по Рейнольдсу, рассматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100 CX (JEOL, Япония).

Результаты исследования. В различных отделах желчного пузыря, в стенке пузырного и общего желчного протока (рис. 1, а, б) были выявлены клетки, дающие позитивную реакцию на с-kit-рецепторную тирозинкиназу. В теле и шейке желчного пузыря (см. рис. 1, а) они локализуются в мышечной оболочке, а также в слизистой оболочке, где характеризуются более диффузным расположением.

В стенке общего желчного протока сравнительно небольшое количество с-kit-позитивных клеток обнаружено вблизи циркулярно ориентированных пучков гладких миоцитов. Единичные клетки расположены в субэпителиальной области. ИКК, интегрированных в сетчатую структуру, нам не удалось обнаружить ввиду того, что срезы протоков были сделаны в поперечной плоскости, но возможность наличия продольно ориентированной сети ИКК по ходу протоков

исключить нельзя. Плотность расположения с-kit-позитивных клеток в стенке различных отделов желчного пузыря была выше, чем в составе желчных протоков.

Электронно-микроскопический анализ показал, что ИКК в стенке желчного пузыря и желчных протоков имеют вытянутую форму и характеризуются значительным количеством цитоплазматических отростков различной протяженности, которые формируют тесные мембранные контакты с близлежащими гладкими миоцитами (рис. 2, 3).

В области контактов в цитоплазме отростков наблюдается скопление митохондрий. Ядра располагаются в центре, имеют вытянутую форму, содержат умеренное количество гетерохроматина, который в основном локализован под ядерной оболочкой. Органеллы распределены равномерно, комплекс Гольджи развит умеренно, при этом доминирует хорошо развитая агранулярная эндоплазматическая сеть, в периферических зонах располагаются значительное количество вакуолей, лизосомы и отдельные свободные рибосомы. Базальная мембрана у ИКК имеет различную степень развития, кавеолы аналогичны таковым в гладких миоцитах. В ИКК не удалось выявить плотные полосы и плотные тельца. В цитоплазме

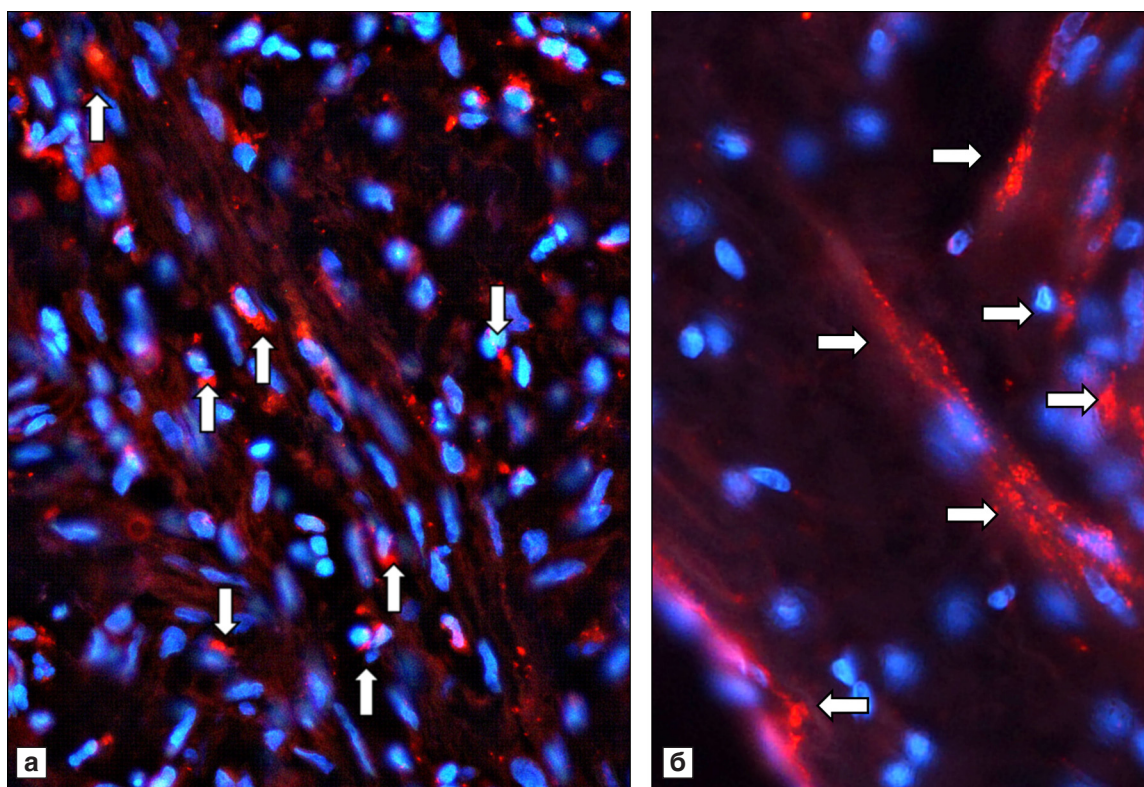


Рис. 1. Гладкая мышечная ткань в желчном пузыре и различных отделах желчевыводящих путей у морской свинки.

а — с-kit-позитивные клетки в составе тела желчного пузыря (стрелки); б — интерстициальные клетки Кахаля (стрелки) в составе дистального отдела общего желчного протока. Иммуноцитохимическая реакция с антителами к с-kit (CD117). а — об.40, ок.10; б — об.80, ок.10

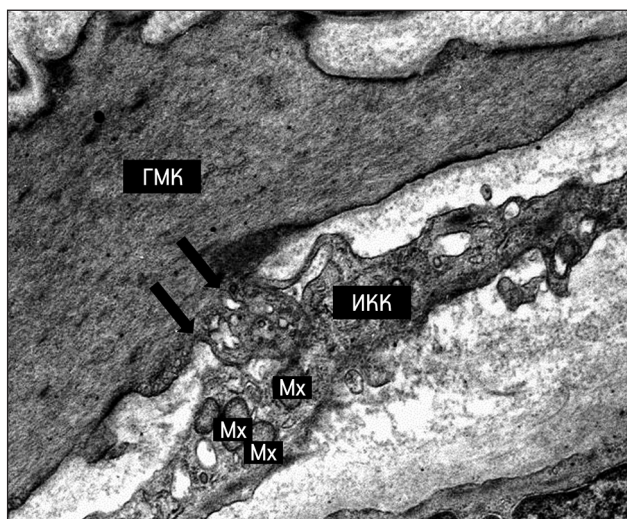


Рис. 2. Контакт отростка интерстициальной клетки Кахаля (ИКК) и гладкой мышечной клетки (ГМК) стенки желчного пузыря морской свинки.

Мх — митохондрии; стрелки — область контакта ГМК и ИКК. Ув. 12 000

отсутствуют элементы организованного сократительного аппарата. Тонкие филаменты (5 нм) встречаются крайне редко и располагаются на периферии цитоплазмы. Отмечаются единичные микровыросты плазмолеммы. Другой характерной особенностью ИКК является наличие в цитоплазме крупных вакуолей. Они могут иметь гомогенную структуру или содержать материал различной электронной плотности.

Обсуждение полученных данных. В последние годы понимание механизмов функционирования гладкой мышечной ткани висцеральных органов значительно расширилось благодаря исследованию ИКК. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти клетки являются источником генерации медленных волн [7] и ответственны за спонтанное ритмическое сокращение мышечной ткани пищеварительного тракта [9]. По мнению ряда авторов, спонтанные ритмические сокращения мышечной ткани желчных протоков также обусловлены функциональной активностью ИКК [5]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что с-kit-позитивные клетки являются постоянным компонентом стенки различных отделов желчевыводящих путей. При этом они не только инкорпорированы в состав мышечной ткани желчного пузыря и желчных протоков, но локализуются и в субэпителиальной зоне слизистой оболочки. Сведения о вероятной локализации и концентрации с-kit-позитивных клеток в желчном пузыре и различных отделах желчевыводящих путей противоречивы. Ряд авторов отмечают увеличение концентрации ИКК в стенке дистального отдела

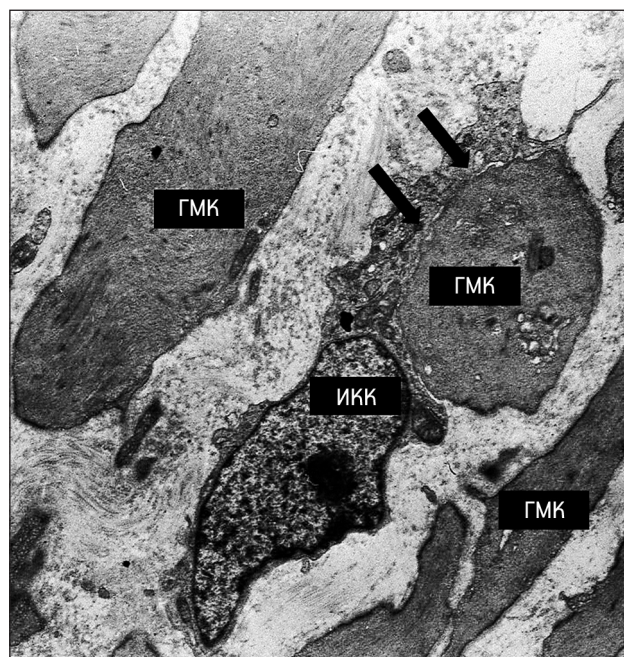


Рис. 3. Интерстициальная клетка Кахаля (ИКК) и гладкой мышечной клетки (ГМК) в составе мышечной ткани стенки проксимальной части общего желчного протока у морской свинки.

Стрелки — область контакта ГМК и ИКК. Ув. 8000

общего желчного протока [5]. Однако нам не удалось выявить существенных отличий в распределении ИКК в различных отделах желчных протоков. Ультраструктурный анализ, проведенный в нашей работе, позволяет говорить о наличии в мышечной ткани желчевыводящих путей клеток, имеющих характеристики ИКК [12] и формирующих тесные мембранные контакты с гладкими миоцитами. Вопрос об их точной цитологической идентификации является открытым. До настоящего времени не существует единой точки зрения о типах ИКК и их структурно-функциональных характеристиках. Рядом авторов, на основании ультраструктурных параметров, описаны от 3 [2, 11] до 5 [12] типов ИКК, при этом показано, что ультраструктура ИКК аналогичного типа может варьировать в зависимости от биологического вида изучаемого объекта. Данная классификация не является общепризнанной, но используется для анализа ИКК в составе различных органов. Интерпретация полученных данных представляется сложной в связи с тем, что предполагается возможность существования органных особенностей субпопуляций ИКК, обусловленных спецификой функциональной деятельности различных систем [6].

Дальнейший анализ детальных характеристик ИКК в желчном пузыре и желчных протоках у млекопитающих позволит раскрыть морфолунк-

циональные механизмы дисфункций желчевыводящих путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобрышев Ю.В., Тран Д., Киллингворс М.С. и др. Межклеточные контакты интерстициальных клеток Кахаля в зоне ауэрбахова сплетения в пищеводе человека // Механизмы функционирования висцеральных систем. СПб.: изд. Ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2009. С. 62–63.
2. Зашихин А.Л., Селин Я. Висцеральная гладкая мышечная ткань. Архангельск: Умео; М.: изд. СГМУ, 2001.
3. Зашихин А.Л., Селин Я., Агафонов Ю.В. Морфофункциональная характеристика пейсмекеров в гладкой мышечной ткани // Морфология. 1999. Т. 115, вып. 2. С. 46–50.
4. Hashitani H., Lang R.J. Functions of ICC-like cells in the urinary tract and male genital organs // J. Cell. Mol. Med. 2010. Vol. 14, № 6A. P. 1199–1211.
5. Huang Y., Meia F., Yua B. et al. Distribution of the interstitial Cajal-like cells in the gallbladder and extrahepatic biliary duct of the guinea-pig // Acta Histochem. 2009. Vol. 111, № 2. P. 157–165.
6. Huizinga J.D., Faussone-Pellegrini M.S. About the presence of interstitial cells of Cajal outside the musculature of the gastrointestinal tract // J. Cell. Mol. Med. 2005. Vol. 9, № 2. P. 468–473.
7. Kito Y., Ward S.M., Sanders K.M. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2005. Vol. 288, № 3. P. 710–720.
8. Lavoie B., Balemba O.B., Nelson M.T. et al. Morphological and physiological evidence for interstitial Cell. of Cajal-like cells in the guinea pig gallbladder // J. Physiol. 2007. Vol. 579 (Pt. 2). P. 487–501.
9. Lee H.T., Henning G.W., Fleming N.W. et al. The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine // Gastroenterology. 2007. Vol. 132, № 5. P. 1852–1865.
10. Popescu L.M., Ciontea S.M., Cretoiu D. et al. Novel type of interstitial Cell. (Cajal-like) in human fallopian tube // J. Cell. Mol. Med. 2005. Vol. 9, № 2. P. 479–523.
11. Torihashi S., Gerthoffer W.T., Kobayashi S., Sanders K.M. Identification and classification of interstitial cells in the canine proximal colon by ultrastructure and immunocytochemistry // Histochemistry. 1994. Vol. 101, № 3. P. 169–183.
12. Rumessen J.J., Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal in human small intestine. Ultrastructural identification and organization between the main smooth muscle layers // Gastroenterology. 1991. Vol. 100, № 5 (Pt. 1). P. 1417–1431.

Поступила в редакцию 11.01.2015

Получена после доработки 15.04.2015

INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN THE SMOOTH MUSCLE TISSUE OF THE GALLBLADDER AND BILE DUCTS

A.L. Zashikhin, A.Yu. Liubeznova, Yu. V. Agafonov

Interstitial cells of Cajal (ICC) in the gallbladder and in different parts of the biliary tract were identified in adult guinea pigs by means of immunocytochemical reactions to specific marker of these cells — C-kit receptor tyrosine kinase (CD117) and electron microscopic analysis. It was shown that C-kit-positive cells were localized in the muscular component of the gallbladder wall and the various parts of the bile ducts. In the gallbladder wall their density was higher than in the bile ducts. ICC have numerous processes, and are characterized by the absence of the components of the contractile apparatus. They possess the capacity to form tight membrane contacts with smooth myocytes.

Key words: *smooth muscle, interstitial cells of Cajal, gallbladder, bile ducts*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Northern State Medical University, Arkhangel'sk