

ВОРОНЕЖСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ПРЕДУНИВЕРСАРИЙ ВГМА
ИМ.БУРДЕНКО

МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ЛИЦЕЙ №1»,

МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ ДЕТЕЙ ДВОРЕЦ ТВОРЧЕСТВА ДЕТЕЙ И МОЛОДЁЖИ

Органоспецифические особенности тучных клеток

Выполнили: учащаяся 10 кл. МБОУ «Лицей №1»

Новикова София

учащаяся 9 кл. МБОУ «Лицей №1»

Четверикова Дарья

Руководители:

Либина И.И.

Павленко Е.В.

Ткаченко Г.Е.

Научный консультант:

Самойленко Т.В. –

научный сотрудник НИИ ЭБМ, к.б.н.

Воронеж, 2019

Содержание

	Стр.
Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	4
Глава 2. Материалы и методика исследований	6
Глава 3. Результаты исследования	8
Выводы и рекомендации	10
Список использованной литературы	11

Введение

Тучные клетки были открыты Паулем Эрлихом более ста лет назад, и к нашему времени они найдены практически во всех органах. Если рассматривать систему тучных клеток как местные регуляторы, необходимо признать, что тогда они должны иметь конкретные особенности структурно-функциональной организации в различных органах. Правильное представление о тучных клетках как о единой системе поможет по-новому рассмотреть на развитие различных болезней и создать теоретическую основу для улучшения методов их лечения. Хоть литературы, посвящённой тучным клеткам довольно много, данные всё равно скучные и противоречивые, что может привести к неоднозначным оценкам их важности.

Цель работы: выявить органоспецифические особенности тучных клеток.

В рамках исследования в работе были поставлены следующие задачи:

1. Изучить органные особенности морфологии тучных клеток кожи, печени, сердца.
2. Оценить количественный состав популяции тучных клеток различных органах.
3. Изучить численность, локализацию, секреторную активность тучных клеток и их межклеточное взаимодействие в различных органах и тканях.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Тучные клетки (мастоциты, лаброциты) – высокоспециализированные иммунные клетки соединительной ткани позвоночных животных, аналоги базофилов крови.

Содержимое тучной клетки представлено ядром и цитоплазмой с органеллами, которые не видны из-за множества гранул. На поверхности клеточной мембраны находятся особые рецепторы – участки, к которым прикрепляются иммуноглобулины класса Е. Несмотря на небольшой размер клеток, рецепторов на них очень много – от 50 до 300 000.

В цитоплазме располагаются гранулы с биологически активными вещества: гистамином, гепарином, протеазами, интерлейкинами и др. [1, 2]

1.2. Функции тучных клеток

Регуляторная: тучные клетки поддерживают постоянство соединительной ткани, медленно выделяя небольшие дозы биологически активных веществ, которые способны воздействовать на проницаемость и тонус сосудов и поддержание баланса жидкости в тканях;

Защитная: при появлении воспаления быстро и локально выделяются медиаторы воспаления, которые привлекают лейкоцитов?;

Участие в аллергических реакциях: при контакте с аллергеном, соответствующий этому аллергену иммуноглобулин Е (IgE) с помощью собственного рецептора взаимодействует с тучной клеткой и стимулирует её выделять медиаторы, например, гистамин, что запускает аллергический ответ.

В тучных клетках содержится более 100 биологически активных веществ [2].

1.3. Происхождение клеток

Тучные клетки формируются в костном мозге от плюрипотентных предшественников, затем в незрелых формах перемещаются вместе с кровотоком в периферические ткани. Дифференцируются под действием локальных специфических для тканей факторов в местах своего окончательного постоянного пребывания.

Основная масса тучных клеток располагается под кожей и слизистыми, в местах контакта организма с окружающей средой, куда часто попадают различные антигены, инфекционные возбудители, и появляются тканевые повреждения [2].

1.4. Состав гранул

Вещества, которые содержат тучные клетки, делятся на пресинтезированные, которые готовы высвободиться в любой момент, и вырабатываемые дополнительно после поступления активационного сигнала. Пресинтезированные провоцируют острую, но обратимую реакцию, другие

фиксируют изменения, обеспечивают их долгосрочность и устойчивость. В состав гранул входят протеогликаны (гепарин), гистамин, интерлейкины и нейтральные протеазы. При дегрануляции (к примеру, при аллергической реакции) тучные клетки высвобождают содержимое гранул в окружающую ткань [3].

1.5. Гистологическое строение изучаемых органов

Наружный слой стенки – сердечная сумка – состоит из соединительной ткани. Средний – миокард – из мышечной ткани. Внутренний слой образован эпителиальной тканью.

Поверхность *печени* покрыта соединительнотканной оболочкой. Паренхима образована печеночными дольками, структурно-функциональными единицами печени [4].

В *коже* выделяют три слоя: наружный – эпидермис, средний – дерму, внутренний – подкожную клетчатку. Эпидермис образован многослойным эпителием. Дерма (составлено из кожи) состоит из соединительной ткани, содержащей множество упругих волокон, которые придают ей эластичность [5].

Глава 2. Материалы и методика исследований

2.1. Протокол окрашивания по Гимзе для срезов фиксированных тканей [6]:

1. Депортировать срезы и регидратировать до дистиллированной воды.
2. Разбавить базовый раствор Гимзы 50 объёмам дистиллированной воды. Окрашивать свежеприготовленным раствором Гимзы 2-12 часов. (Промыть в дистиллированной воде).
3. Если синий цвет слишком интенсивный, дифференцировать срезы в 0,1-0,5%-ном водном растворе ледяной уксусной кислоты. Быстро дегидратировать в трёх сменах абсолютного этанола.
4. Просветлить в ксилоле и заключить в монтажную среду.

2.2. Методика настройки освещения по Келеру [6]:

1. Положить микропрепарат на предметный столик. При начале работы использовать объектив x10. Настроить резкость изображения.
2. Перевести полевую диафрагму в наиболее закрытое положение таким образом, чтобы в поле зрения были видны границы её отверстия.
3. Отрегулировать высоту конденсора с помощью винта до тех пор, пока границы полевой диафрагмы не окажутся в фокусе и не станут наиболее чётко визуализируемыми.
4. Используя винты для центрирования конденсора, перевести изображение, ограниченное полевой диафрагмой, в центр поля зрения.
5. Полевую диафрагму открывать до тех пор, пока её границы не окажутся вне поля зрения.

2.3. Работа со световым микроскопом [7]:

1. Вращая макрометрический винт, приподнять объективы на 2–3 см от поверхности предметного столика.
2. Проверить установку объектива малого увеличения (10×) «на щелчок»
3. Переместить конденсор в среднее положение и полностью открыть диафрагму.

4. Глядя в окуляр, настроить яркость источника света.
5. Положить микропрепарат на предметный столик покровным стеклом вверх.
6. Глядя со стороны, макрометрическим винтом опустить объектив так, чтобы его линза оказалась на расстоянии примерно 0,5 см от поверхности покровного стекла препарата.
7. Глядя в окуляр и медленно вращая макрометрический винт «на себя», получить чёткое изображение объекта.
8. Перевести объектив малого увеличения ($10\times$) на объектив большого увеличения($40\times$) «на щелчок»
9. Изучить объект. Перемещение препарата под объективом производить с помощью координатных винтов столика.

2.4. Расчёт тучных клеток в срезах препаратов

Расчёт тучных клеток в срезах производить по формуле:

$$X = (\sum t_k \times 1000000) / (\sum S_{cp})$$

где \sum - сумма тучных клеток в срезе, штук

$\sum S_{cp}$ – суммарная площадь среза, мкм

Глава 3. Результаты исследования

Исследование проводилось на базе Научно-исследовательского института экспериментальной медицины и биологии (структурное подразделение ВГМУ им.Бурденко).

Объектом исследования являлись тучные клетки кожи, печени, сердца крыс линии Wistar, фрагменты которых фиксировали в 10% нейтральном формалине при комнатной температуре. После фиксации (спустя 24–48 ч.) биоматериал подвергали стандартной процедуре пробоподготовки для заливки образцов органов в парафин. На роторном микротоме Accu-Cut SRM 200 из подготовленных блоков изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм. Для детекции тучных клеток при окрашивании использовали раствор Гимза. Исследование микропрепараторов проводили на микроскопе «PRIMO STAR» Zeiss при использовании объектива x40 для визуальных наблюдений и для приготовления микрофотографий. Подсчет клеток производили на полях зрения, с последующим пересчетом на единицу площади ($S=1 \text{ мм}^2$). Статистическую обработку результатов проводили, используя компьютерные программы «Статистика» и «Microsoft Excel».

Для гистологического исследования и оценки моррофункциональной активности тучных клеток был проанализирован биоматериал от 5 животных (крыс линии Wistar). Результаты исследования представлены в Таблице 1 (см. Приложение).

3.1. Результаты исследования микропрепараторов сердца

При изучении микропрепараторов сердца мы выявили, что тучные клетки представлены в исследуемых срезах относительно широко (4,43 на 1 мм^2). Среднее количество дегранулированных клеток - 3,70 на 1 мм^2 . Средняя частота солокализации составила 0,23 на 1 мм^2 . По большей части это были клетки овальной или веретеновидной формы. Располагались они небольшими группами вокруг сосудов и в прослойках соединительной ткани.

В Приложении к работе представлены фотографии проведенного исследования микропрепараторов сердца крыс - особенности морфологии, межклеточного взаимодействия (рис.1, рис.2)

3.2. Результаты исследования микропрепараторов кожи

В коже тучные клетки представлены наиболее широко. Показатель их среднего количества составил 25,99 на 1 мм^2 . Среднее количество дегранулированных клеток - 24,06 на 1 мм^2 . Количество межклеточных взаимодействий - 1,23 на 1 мм^2 . Тучные клетки в этом органе в основном веретеновидные, встречаются также овальные. Клетки располагаются большими группами или поодиночке в прослойках соединительной ткани. Основная часть тучных клеток находится в глубоких отделах дермы; единичные недегранулированные располагаются возле волосяных фолликулов и потовых желёз.

В Приложении к работе представлены фотографии проведенного исследования микропрепараторов кожи крыс - особенности морфологии, межклеточного взаимодействия (рис.3, рис.4)

3.3. Результаты исследования микропрепараторов печени

В печени тучные клетки были веретеновидной формы и небольших размеров. Показатель их среднего количества оказался минимальным и составил 2,08 на 1 мм^2 . Находились они в соединительно-тканной оболочке органа, в области портальных трактов, а также вокруг кровеносных сосудов. Клетки в основной массе дегранулированные (2,03 на 1 мм^2). Количество межклеточных взаимодействий - 0,07 на 1 мм^2 .

В Приложении к работе представлены фотографии проведенного исследования микропрепараторов кожи крыс - особенности морфологии (рис.5, рис.6).

Все полученные результаты исследования сведены в диаграмму (Приложение, диаграмма 1).

Выводы и рекомендации

В работе мы изучили органные особенности морфологии тучных клеток и оценили их количественный состав в тканях различных органов организма.

Тучные клетки явля

ются обязательной составной частью органов и прямо заинтересованы в их структурной целостности, путем контроля за состоянием тканей внутренней среды.

В ходе исследования мы выявили зависимость морфологических и количественных характеристик тучных клеток от места их дислокации.

Меньше всего тучных клеток находится в печени, далее по возрастанию идут миокард и кожа.

Среднее количество дегранулированных тучных клеток относительно их общего количества наибольшее в печени (98%), далее кожа (93%) и наименьшее в сердце (84%).

Солокализация чаще встречалась в миокарде (5,2%), чуть меньше в коже (4,7%), ещё меньше в печени (3,3%).

Таким образом, мастоциты в различных органах образуют многофункциональную клеточную популяцию. Реакция тучных клеток в дальнейшем определяет ход таких процессов как регенерация, изменение микроциркуляторного русла, восстановление микроокружения, что важно для регуляции процессов, как в физиологических условиях, так и для выработки адаптационных механизмов под воздействием стрессоров. Очевидно, что в каждом органе тучные клетки обладают некоторыми различиями, связанные с функциональными особенностями каждого органа.

Список использованной литературы

1. Тучная клетка: сайт. URL: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1151115> (дата обращения: 09.01.2020). – Текст: электронный.
2. Тучные клетки: сайт. URL: <https://transferfaktory.ru/tuchnyie-kletki> (дата обращения: 09.01.2020). – Текст: электронный.
3. Анатомия и физиология человека: книга. URL: https://ragulina.ucoz.com/_ld/0/2_-__.pdf (дата обращения: 09.01.2020). – Текст: электронный.
4. Атякин, Д.А., Тиманн М. Гистохимия ферментов: методическое пособие/ Д.А.Атякин, И.Б.Бухвалов, М.Тимман – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2016г. – 120с.
5. Бухвалов, И.Б., Атякин, Д.А., Павлова, Т.В., Тиманн, М. Гистохимия: учебно-методическое пособие / И.Б. Бухвалов, Д.А. Атякин, Т.В. Павлова, М. Тиманн – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2018г. – 240с.
6. Триптаза как полифункциональный компонент секретома тучных клеток/ Д.А.Атякин, А.С.Бурцева, Н.Т.Алексеева – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н.Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж, Россия – 11с. – URL:<https://elibrary.ru/item.asp?id=28839953&> (дата обращения: 09.01.2020) – Текст: электронный.
7. Органная гетерогенность тучных клеток в норме и при воздействии постоянных магнитных полей/ Туриева-Дзодзикова Маргарита Эльбрусовна – Москва,1999 г. – 25с. – URL: [http://medical-diss.com/medicina/organnaya-geterogenost-tuchnyh-kletok-v-norme-i-pri-vozdeystvii-postoyannyh-magnitnyh-poley](http://medical-diss.com/medicina/organnaya-geterogennost-tuchnyh-kletok-v-norme-i-pri-vozdeystvii-postoyannyh-magnitnyh-poley) (дата обращения: 09.01.2020) – Текст: электронный.
8. Тучные клетки человека и животных в процессе развития рака молочной железы/ Дзодзикова Маргарита Эльбрусовна – Москва, 2005. – 6с. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/17638187> (дата обращения: 09.01.2020) – Текст: электронный.

9. Система тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов/
Арташян Ольга Сергеевна – Екатеринбург, 2006. – 190 с. - URL:
<http://netess.ru/3biologiya/458798-1-sistema-tuchnih-kletok-pri-deystvii-organizm-ekstremalnih-faktorov.php> (дата обращения: 09.01.2020) – Текст:
электронный.
- 10.Колесов, Д.В., Маш, Р.Д., Беляев, И.Н. Биология: Человек. 8 класс учебник/
Колесов Д.В., Маш Р.Д., Беляев И.Н. – М, Издательство «Дрофа», 2018 г. –
406с.

Органоспецифические особенности тучных клеток

Подготовили: ученицы МБОУ «Лицей №1»

Новикова София, 10 класс

Четверикова Дарья, 9 класс

Воронежский медицинский Предуниверсарий ВГМА им.Бурденко;

МБУДО ДТДиМ; МБОУ «Лицей №1»

Руководители: Либина Ирина Ивановна (начальник Воронежского медицинского
предуниверсария ВГМА им.Бурденко)

Ткаченко Галина Евгеньевна (учитель биологии МБОУ «Лицей №1»)

Павленко Елена Васильевна (педагог дополнительного образования в МБУДО ДТДиМ)

Научные консультанты: Атякшин Дмитрий Андреевич (директор НИИ ЭБиМ, руководитель
лаборатории молекулярной морфологии имунной гистохимии, к.м.н.)

Самойленко Татьяна Валерьевна (научный сотрудник НИИ ЭБиМ)

Цель: выявить органоспецифические особенности тучных клеток.

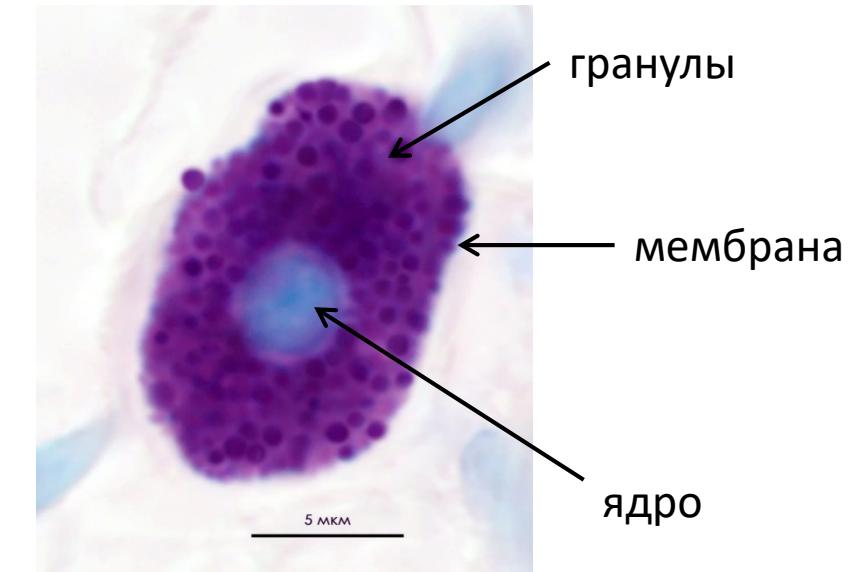
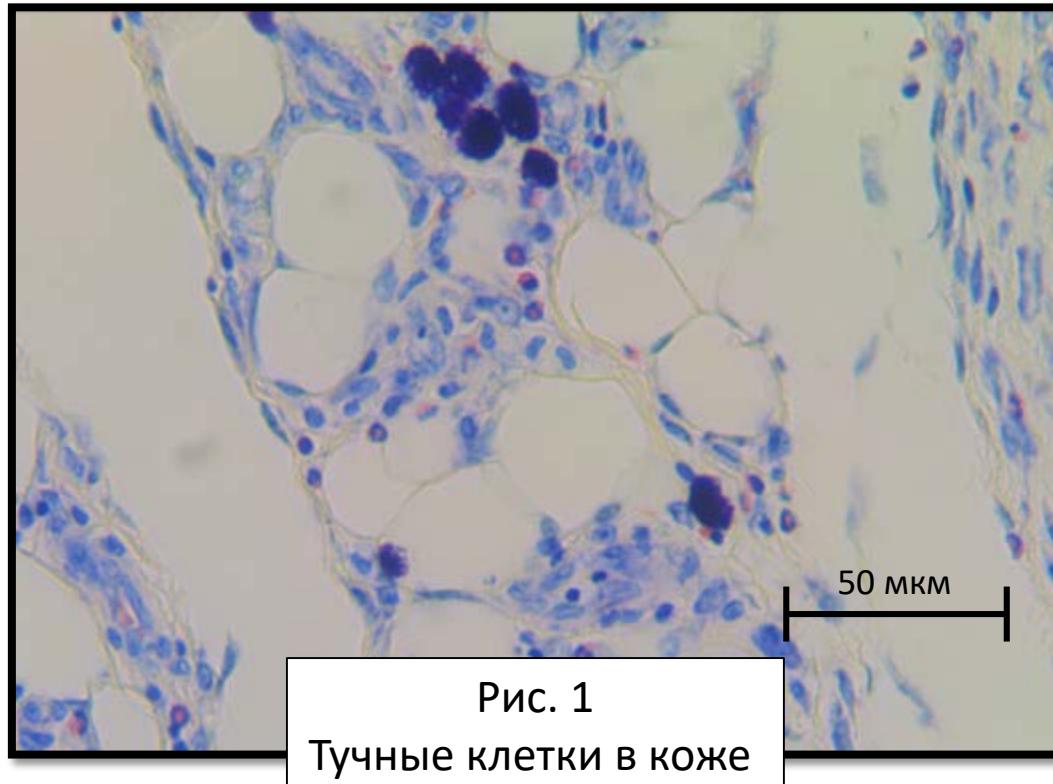
Задачи:

1. Изучить органные особенности морфологии тучных клеток кожи, печени, сердца.
2. Оценить количественный состав популяции тучных клеток различных органах.
3. Изучить локализацию, степень дегрануляции тучных клеток и их межклеточное взаимодействие в различных органах и тканях.



Теоретическая
часть

Тучные клетки - высокоспециализированные иммунные клетки соединительной ткани позвоночных животных, аналоги базофилов крови.

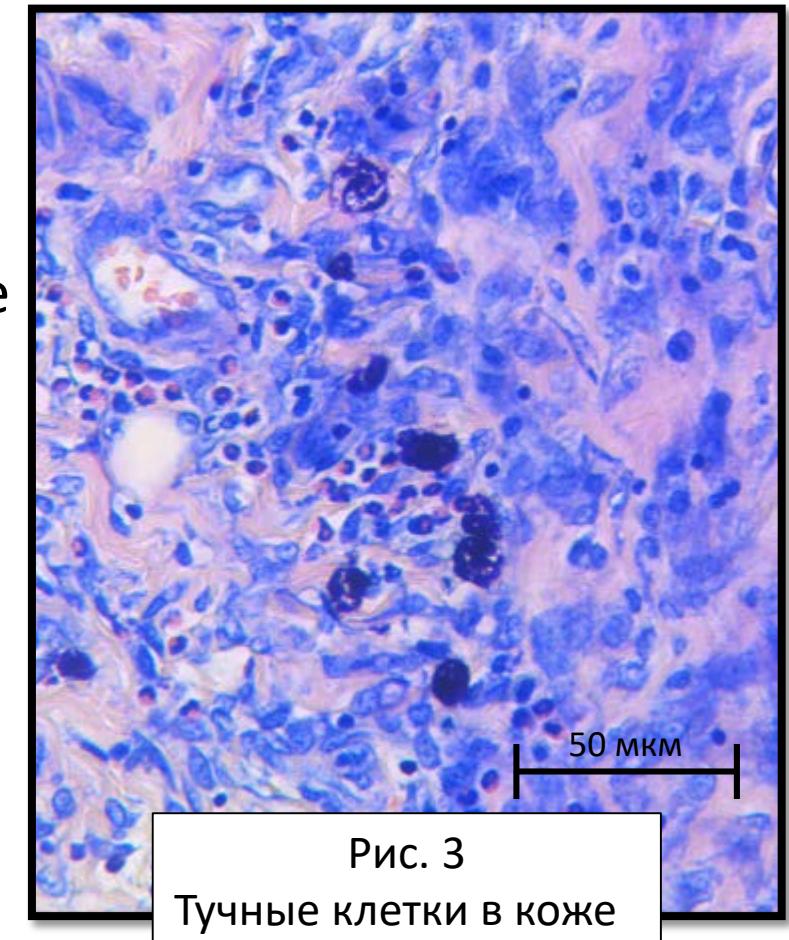


ФУНКЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Регуляторная: поддержание гомеостаза соединительной ткани, сосудистых сетей

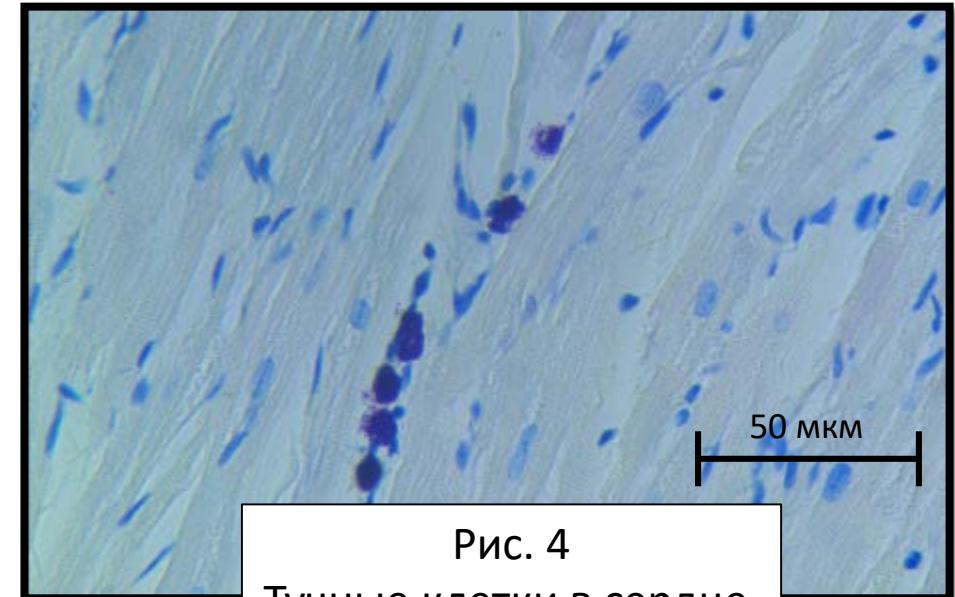
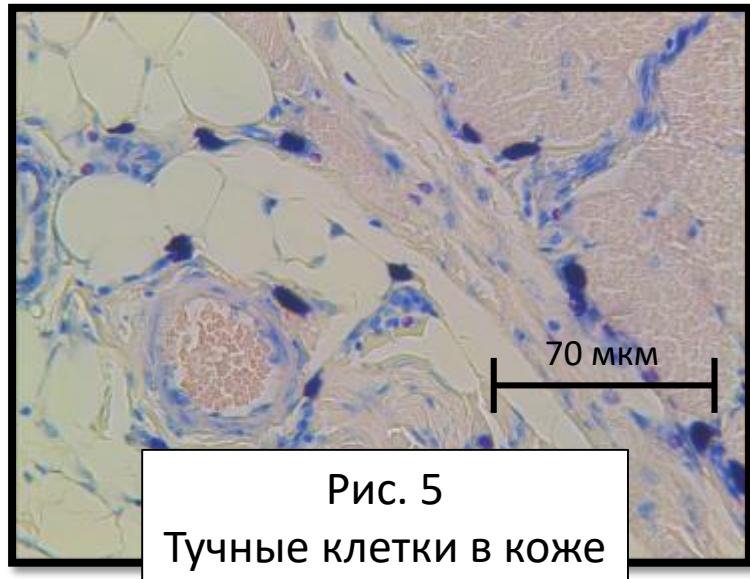
Защитная (иммунная): быстрое, локальное выделение медиаторов воспаления

Участие в аллергических реакциях При контакте с аллергеном, специфический к нему иммуноглобулин Е взаимодействует с тучной клеткой через рецепторы на её мембране, стимулируя её выделять медиаторы, например, гистамин, для запуска аллергического ответа



Происхождение тучных клеток

Тучные клетки берут свое начало от плюрипотентных предшественников в костном мозге, и в виде незрелых форм мигрируют через кровоток в ткани



Тучные клетки, по существу, являются клетками крови, хотя в норме зрелые формы ТК в циркуляции не встречаются.



Практическая
часть

Подготовка биоматериала

- Фрагменты сердца, печени и кожи фиксировали при комнатной температуре в 10% нейтральном формалине.
- Спустя 24–48 часов после момента фиксации биоматериал подвергали стандартной процедуре пробоподготовки для заливки образцов органов в парафин.
- Из подготовленных блоков для окрашивания готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм.



Окрашивание

На стадии окрашивания, использовали одну из методик Романовского, которая применяется для визуализации тучных клеток – окрашивание по Гимзе.

Результаты окрашивания	
Структура	Цвет
Ядра	От тёмно-синего к фиолетовому
Цитоплазма	Светло-голубые оттенки
Коллаген, мышечная ткань, кость	Бледно-розовый
Тучные клетки	Фиолетовый

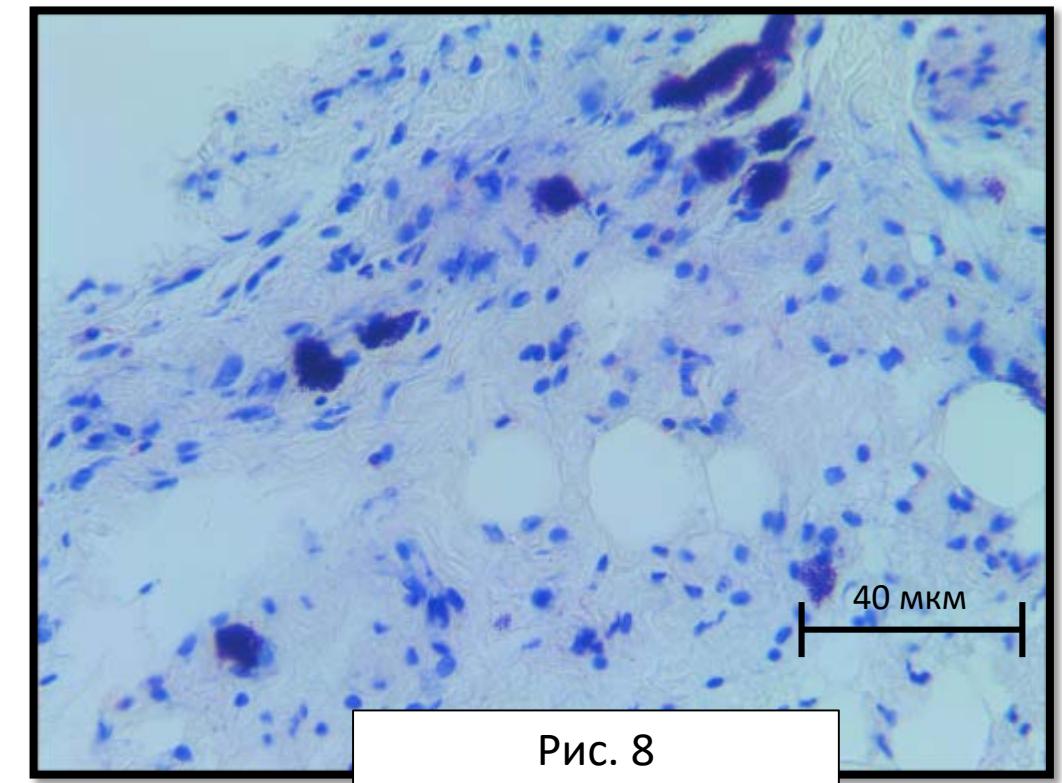


Рис. 8
Тучные клетки в коже

Настройка микроскопа

Микроскоп настраивали в соответствии с методикой, разработанной немецким учёным Августом Келером в 1893 году. Данная методика помогает подобрать оптимальную контрастность и разрешение, формируя фокусировку и центрирование световых пучков равномерно по полю зрения.

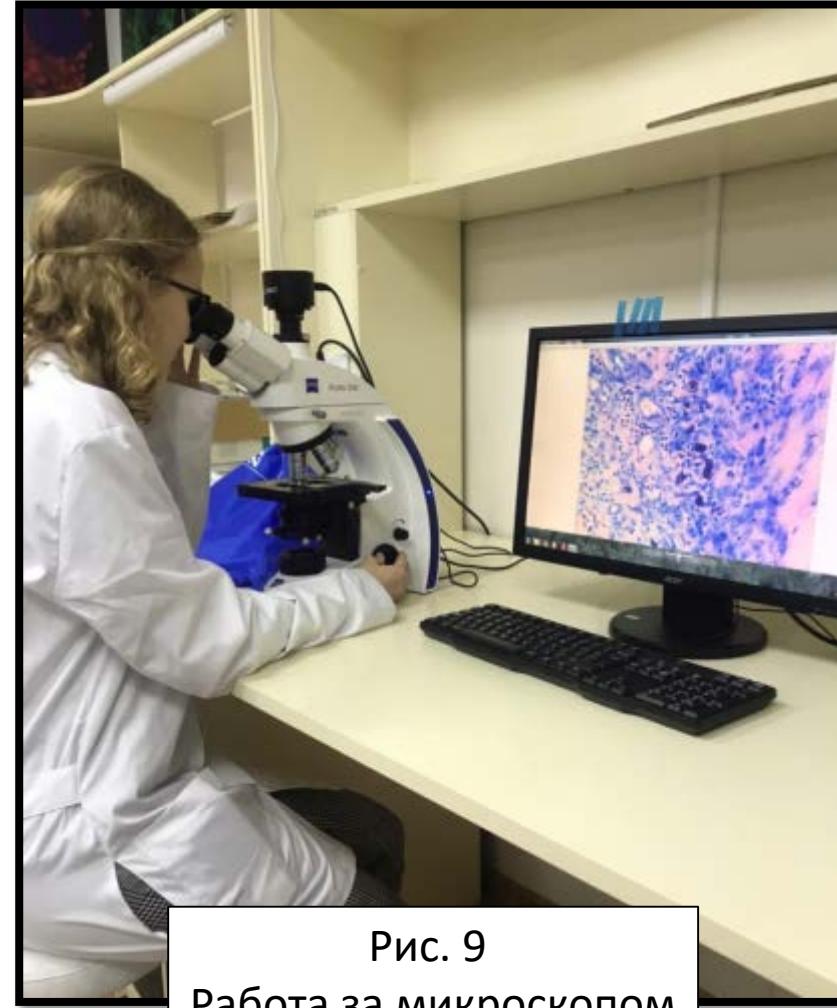
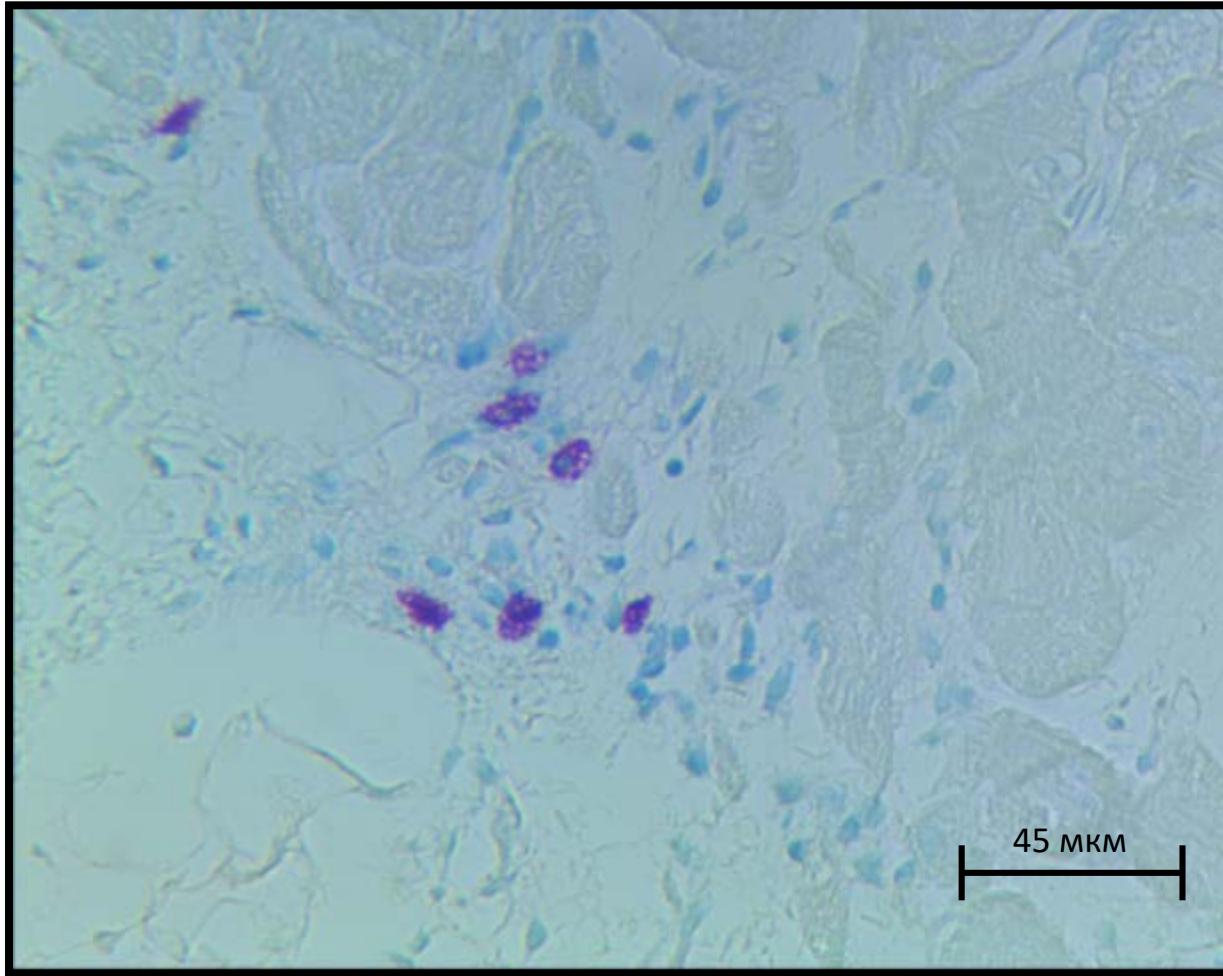
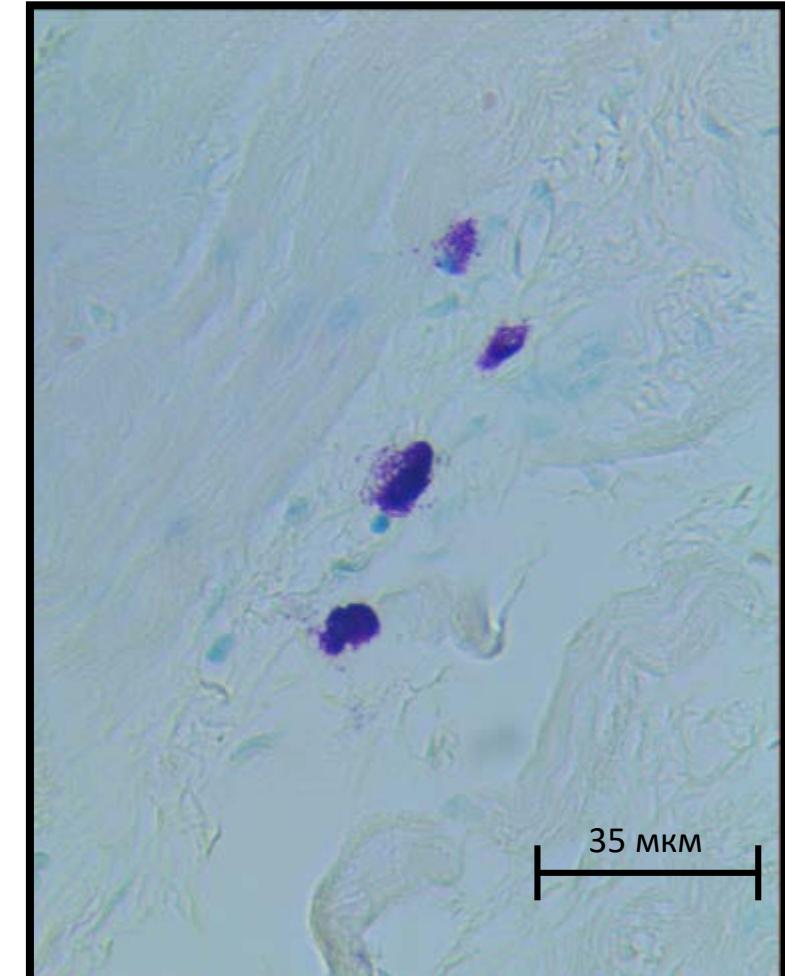


Рис. 9
Работа за микроскопом

Микропрепараты сердца



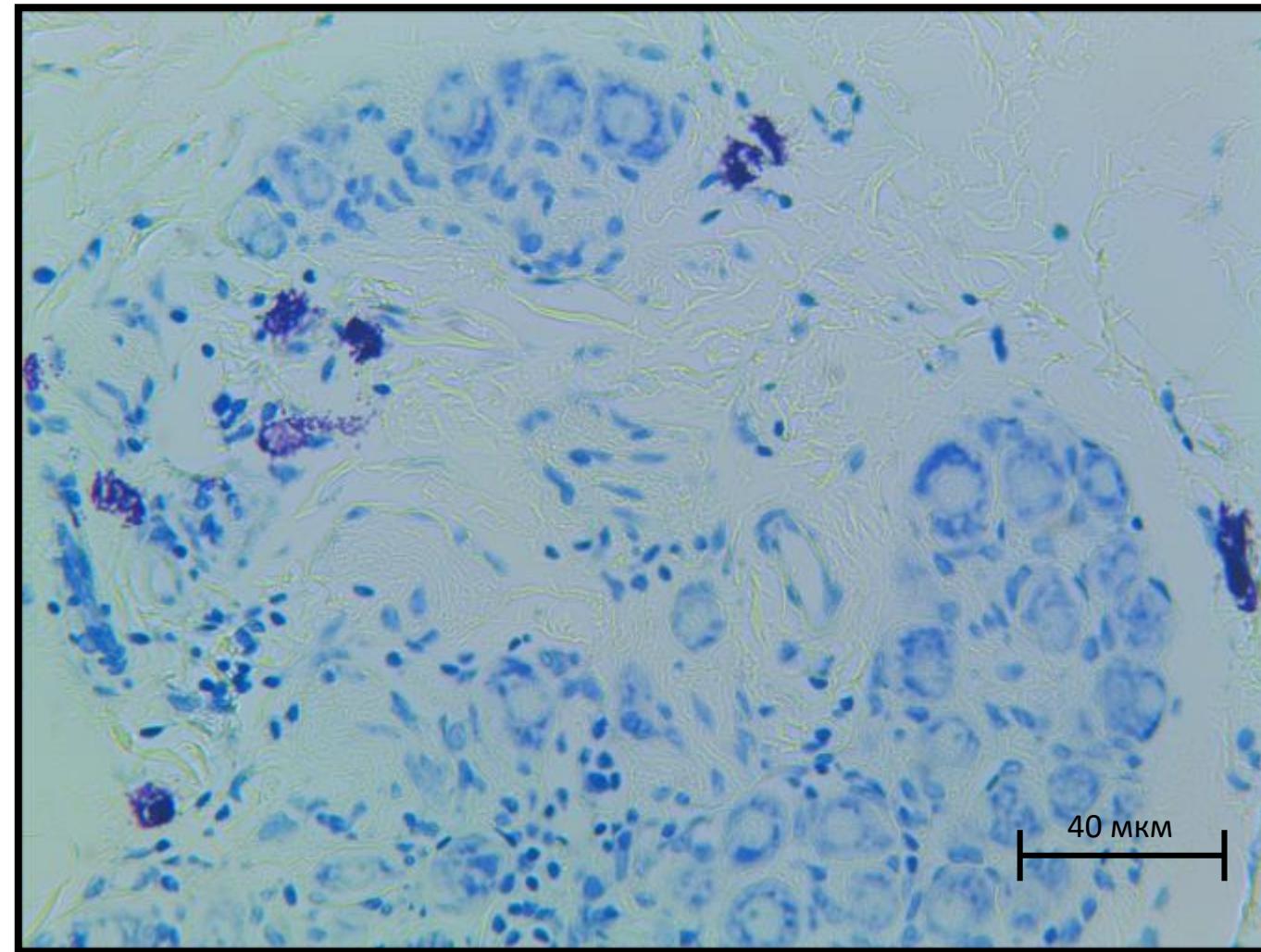
45 мкм



35 мкм

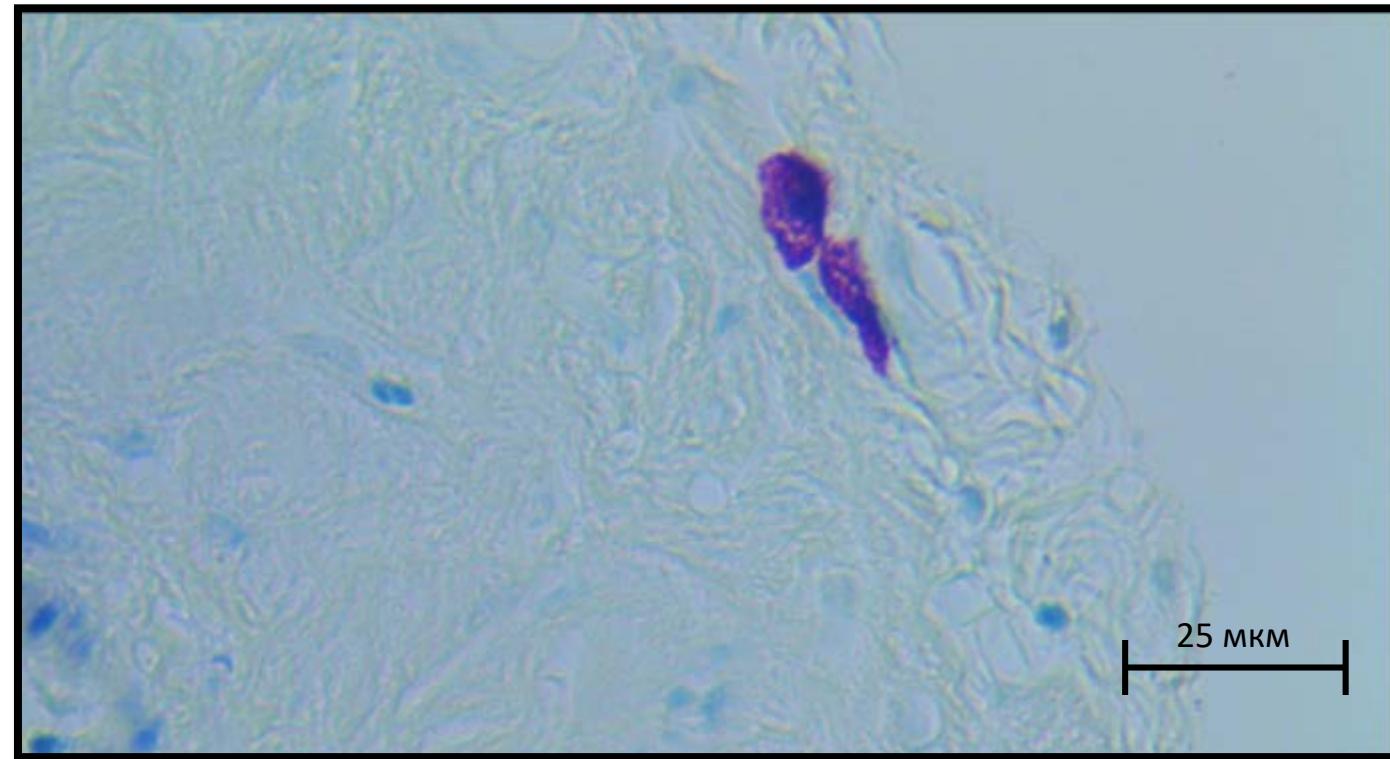
Количество тучных клеток – 4,43 на 1 мм²

Микропрепараты сердца



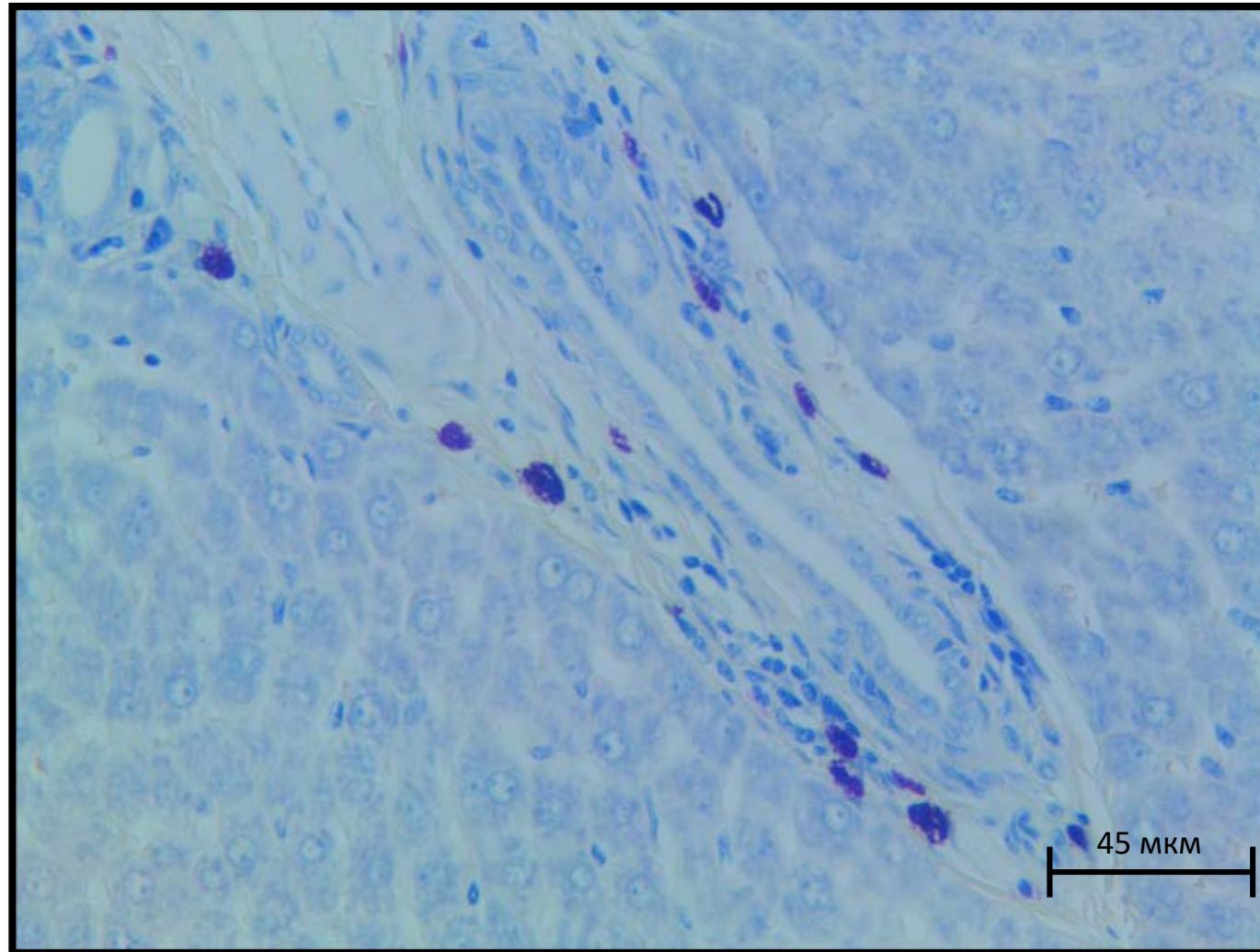
Среднее количество дегранулированных тучных клеток – 3,70 на 1 мм²

Микропрепараты сердца



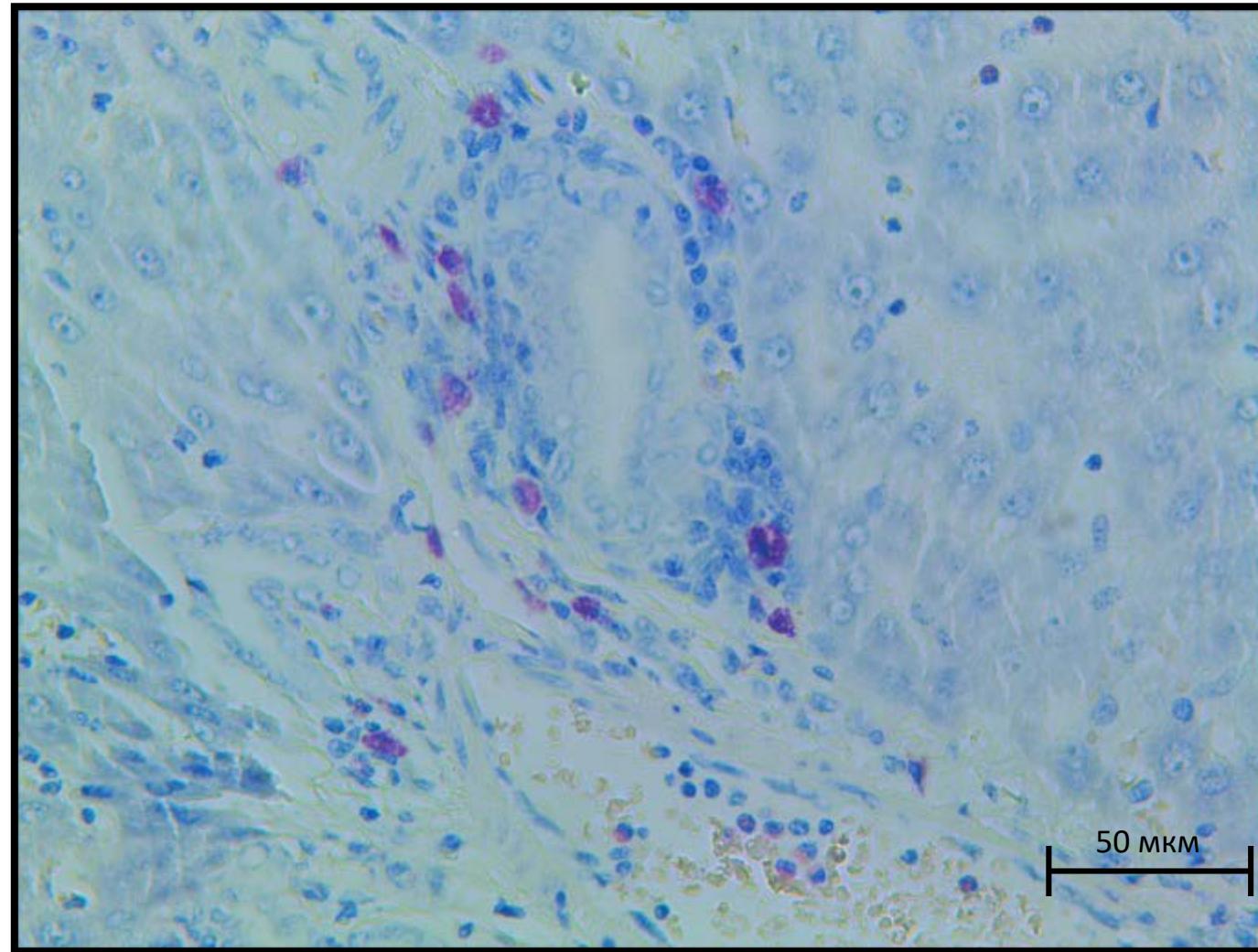
Средняя частота солокализации – 0,23 на 1 мм²

Микропрепараты печени



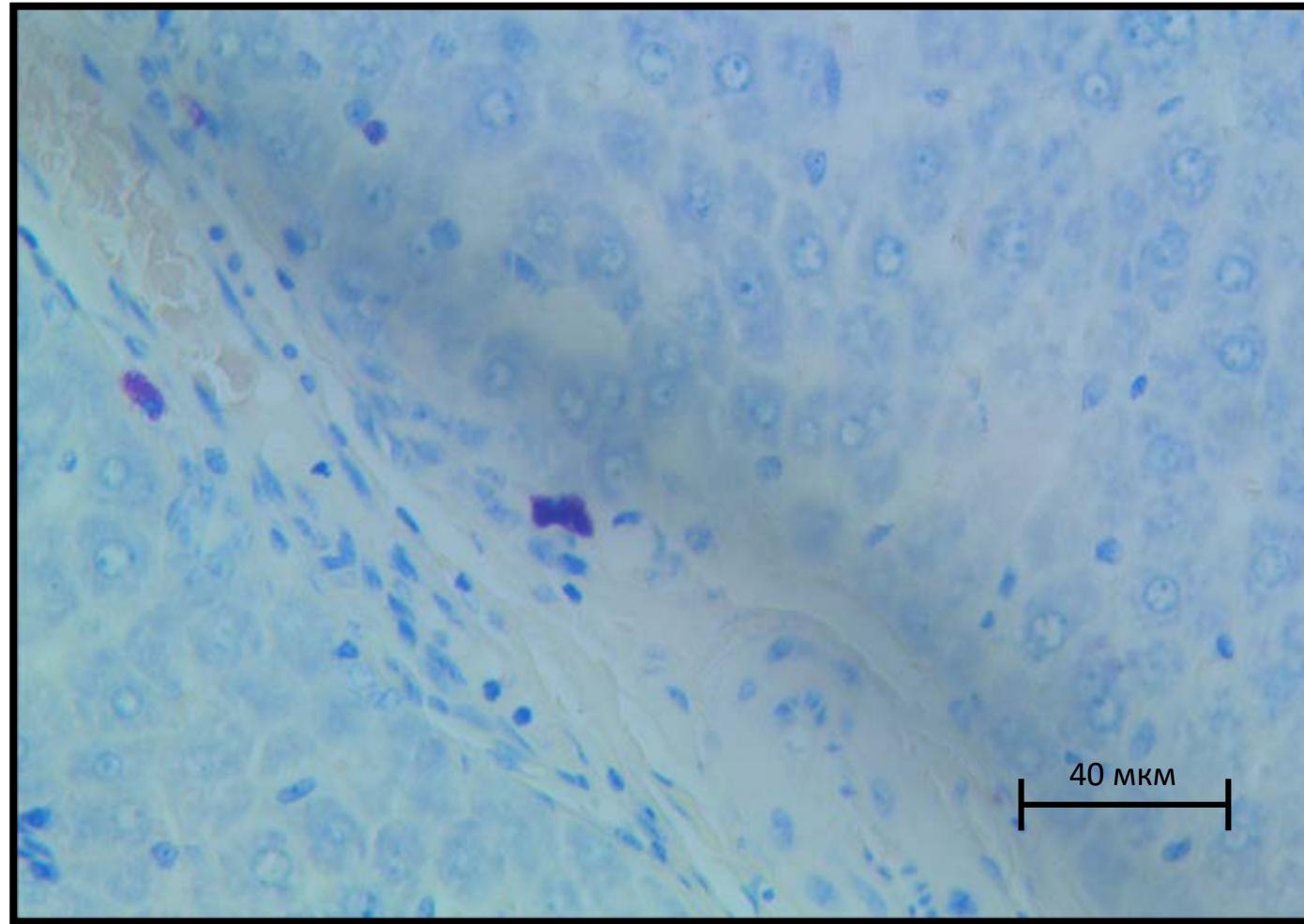
Среднее количество тучных клеток – 2,08 на 1 мм²

Микропрепараты печени



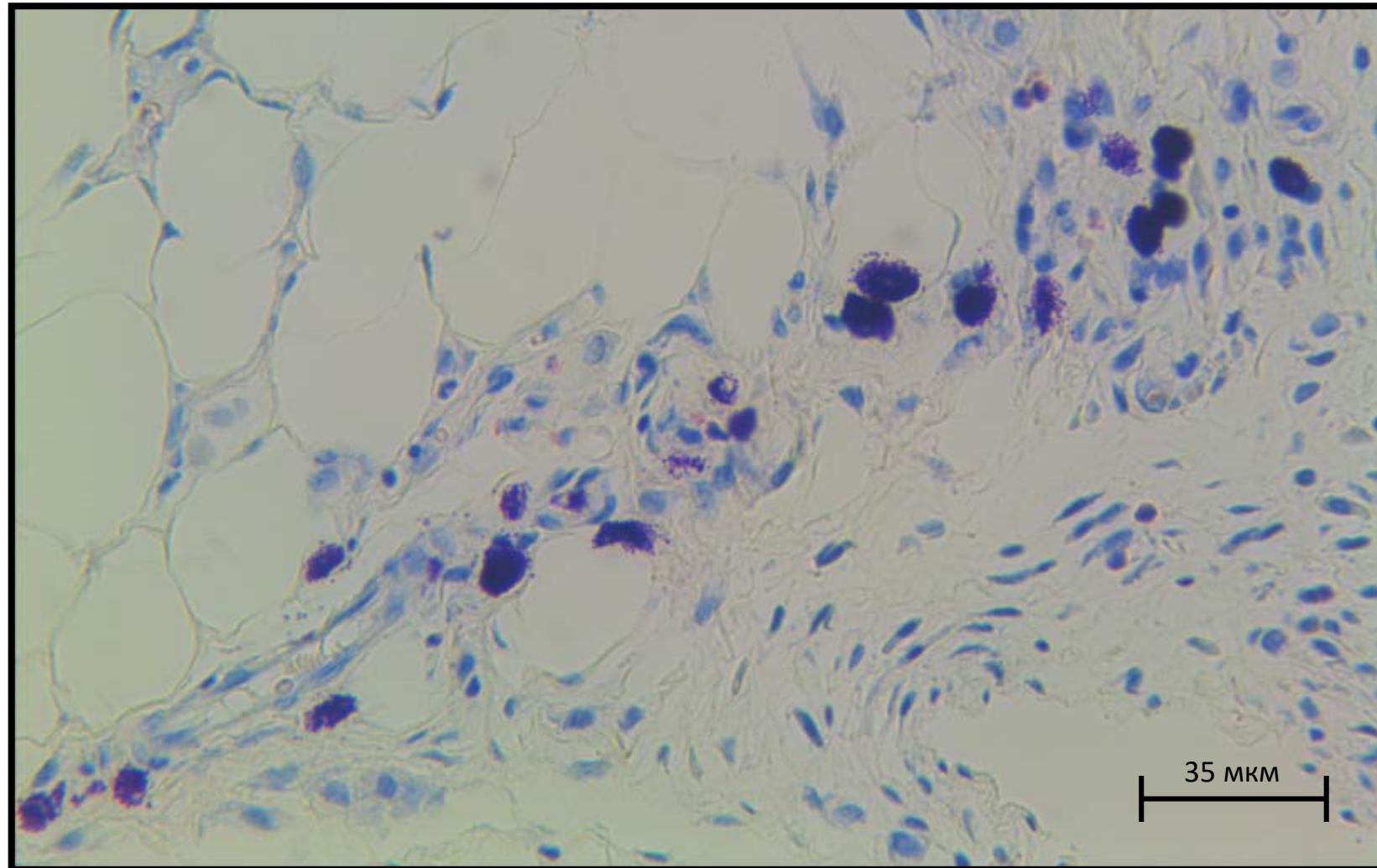
Среднее количество дегранулированных тучных клеток – 2,03 на 1 мм²

Микропрепараты печени



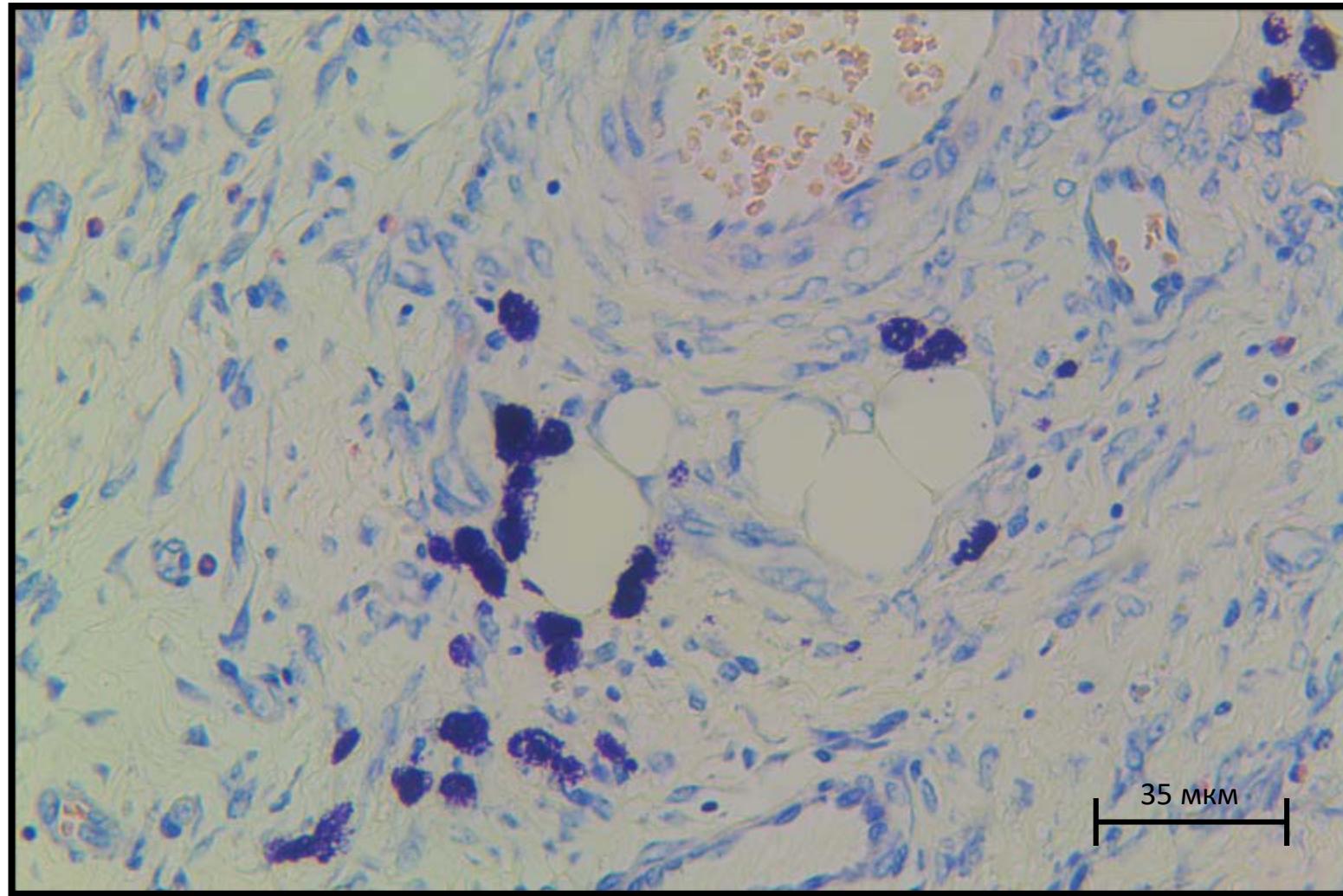
Средняя частота солокализации – 0,07 на 1 мм²

Микропрепараты кожи



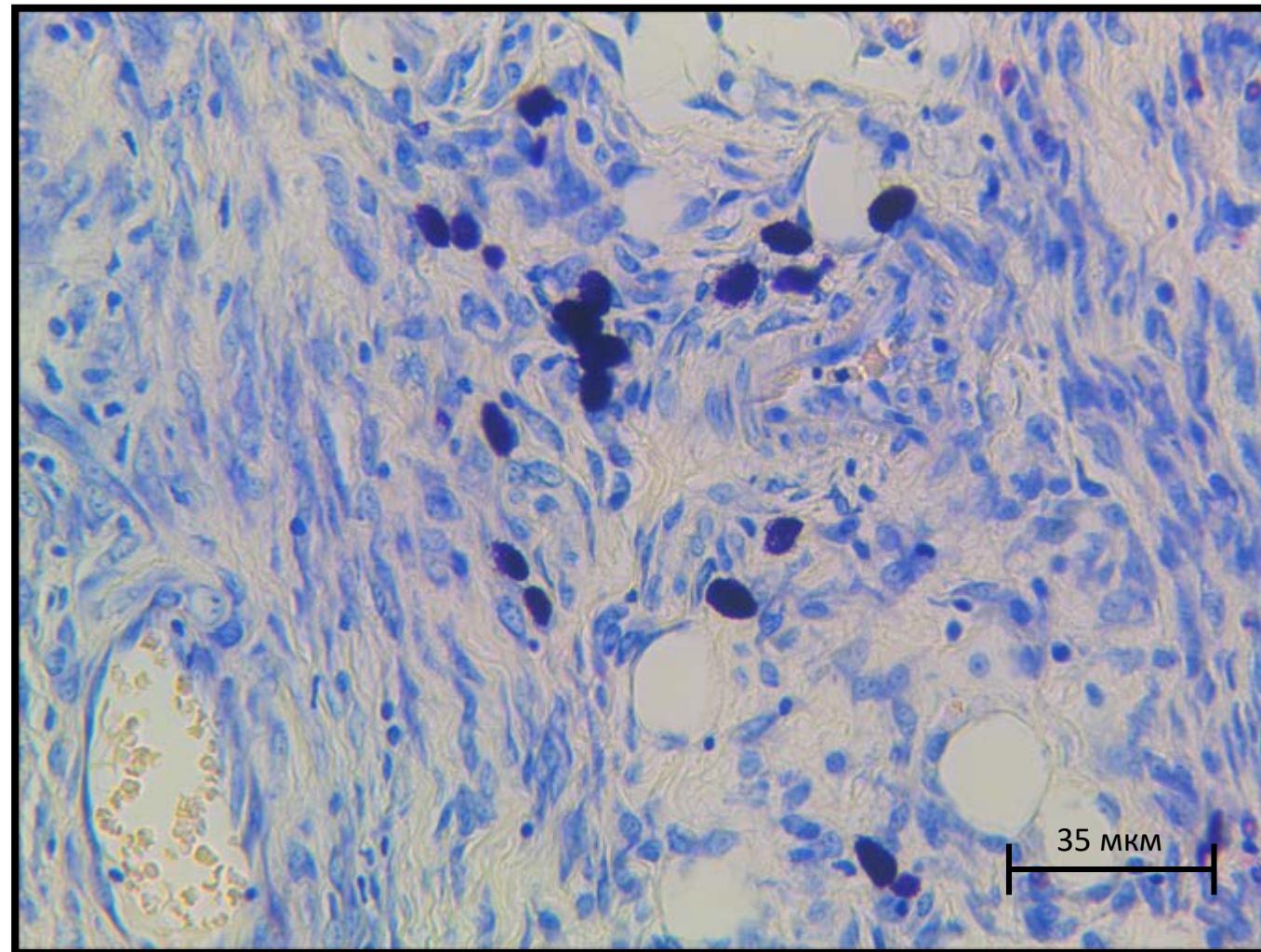
Среднее количество тучных клеток – 25,99 на 1 мм^2

Микропрепараты кожи



Среднее количество дегранулированных тучных клеток – 24.06 на 1 мм²

Микропрепараты кожи



Средняя частота солокализации – 1,23 на 1 мм²

Результаты исследования органоспецифических особенностей тучных клеток

	Печень	Сердце (миокард)	Кожа
Количество клеток на 1мм ²	2,08	4,43	25,99
Процент дегранулированных клеток	98%	84%	93%
Процент солокализаций	6,7%	10,4%	9,5%
Форма	Веретеновидные	Овальные, веретеновидные	Овальные, веретеновидные
Локализация	в соединительно-тканной оболочке органа и вокруг сосудов, в области портальных трактов	в прослойках соединительной ткани миокарда, вокруг кровеносных сосудов	В дерме, вокруг сосудов
Функции*	Регуляторная	Регуляторная	Регуляторная
Состав гранул*	Гистамин, простогландины, цитокины, протеазы и др.	Гистамин, простогландины, цитокины, протеазы и др	Гистамин, простогландины, цитокины, протеазы и др
Рецепторы*	FcεRI, C5a, C4a, C3a	FcεRI, C5a, C4a, C3a	FcεRI, C5a, C4a, C3a

* на основании: Надеин К. А. Тучные клетки как фактор развития воспалительных процессов в соединительной ткани // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2012. — Т. 10, №1. — С. 22–27.

Выводы

1. Изучая органные особенности морфологии тучных клеток кожи, печени и сердца мы пришли к выводу о том ,что тучные клетки кожи овальной, но чаще веретеновидной формы , тучные клетки печени в основном веретеновидной формы, в сердце также в основном - это клетки веретеновидной, реже овальной формы. Все они содержат рецепторы Fc ϵ RI, C5a, C4a, C3a.

Выводы

2. Оценили количественный состав тучных клеток в тканях различных органов и пришли к выводу о том , что меньше всего тучных клеток находится в печени($2,08$ на 1 мм^2), далее по возрастанию идут миокард ($4,43$ на 1 мм^2) и кожа ($25,99$ на 1 мм^2).

Выводы

3. Среднее количество дегранулированных тучных клеток относительно их общего количества наибольшее в печени (98%), далее кожа (93%) и наименьшее в сердце (84%).

Солокализация чаще встречалась в миокарде (10,4%), чуть меньше в коже (9,5%), ещё меньше в печени (6,7%).

Анализируя локализацию тучных клеток можно выявить, что в коже основная их масса располагается в дерме и вокруг сосудов. В сердце – в прослойках соединительной ткани миокарда, вокруг кровеносных сосудов. В печени – в соединительно-тканной оболочке органа и вокруг сосудов, в области портальных трактов.

Список литературы

1. Тучная клетка: сайт. URL: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1151115> (дата обращения: 09.01.2020). – Текст: электронный.
2. Тучные клетки: сайт. URL: <https://transferfaktory.ru/tuchnyie-kletki> (дата обращения: 09.01.2020). – Текст: электронный.
3. Д.А. Атякин, , М. Тиманн Гистохимия ферментов: методическое пособие/ Д.А. Атякин, И.Б. Бухвалов, М. Тимман – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга»,2016г. – 120с.
4. И.Б. Бухвалов, Д.А. Атякин, Т.В. Павлова, М. Тиманн Гистохимия: учебно-методическое пособие / И.Б. Бухвалов, Д.А. Атякин, Т.В. Павлова, М. Тиманн – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга»,2018г. – 240с.
5. Триптаза как полифункциональный компонент секретома тучных клеток/ Д. А. Атякин, А. С. Бурцева, Н. Т. Алексеева – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н.Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж, Россия – 11с. – URL:<https://elibrary.ru/item.asp?id=28839953&> (дата обращения: 09.01.2020) – Текст: электронный.
6. Надеин К. А. Тучные клетки как фактор развития воспалительных процессов в соединительной ткани // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2012. – Т. 10, №1. – С. 22–27. URL:<https://cyberleninka.ru/article/n/tuchnye-kletki-kak-faktor-razvitiya-vospalitelnyh-protsessov-v-soedinitelnoy-tkani/viewer>(дата обращения: 09.01.2020) – Текст: электронный.
7. Колесов Д.В., Маш Р.Д., Беляев И.Н. Биология: Человек. 8 класс учебник/ Колесов Д.В., Маш Р.Д., Беляев И.Н. – издательство Дрофа, 2018 г. – 406с.

Спасибо за внимание!