

РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Шишкина В.В.^{1,2}, Атыкшин Д.А.³, Есауленко Д.И.¹, Герасимова О.А.¹,
Самодурова Н.Ю.^{1,2}, Самойленко Т.В.¹

¹Научно-исследовательский институт экспериментальной биологии и медицины
ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко;

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России;

³Центр коллективного пользования ФГАОУ ВО «РУДН»
4128069@gmail.com

Abstract

THE ROLE OF MAST CELLS IN REMOVAL OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF THE SKIN'S DERMIS IN EXPERIMENT

Shishkina V.V., Atyakshin D.A., Esaulenko D.I., Gerasimova O.A., Samodurova N.Yu., Samoilenko T.V.

Background: mast cells are the target of numerous studies in various areas of biomedicine, including space medicine, being a multifunctional component of a specific tissue microenvironment.

Material and methods: the experiment was carried out in 2017 on 40 male C57BL / 6J mice at the age of 9-12 weeks. The skin of the lateral thigh was studied. The significance of differences was assessed by the Student's t-test in the case of a normal distribution of the sample; in its absence, the nonparametric statistical U-Mann-Whitney test was used. Histochemical detection was performed by staining with Giemsa solution. Planimetric analysis of micropreparations of the skin of mice was carried out using a ZEISS Axio Imager microscope. A2

Results: the MC control groups were similar to each other in most of the parameters of the morphological and functional state. This concerned both their quantitative representation in the skin and secretory activity. MCs of the dermis were large in size and contained well-defined metachromatic secretory material packed in granules of various sizes, reaching 1 µm. According to the morphofunctional state, MCs with signs of granule secretion prevailed, while the number of non-degranulated forms was approximately the same and accounted for a quarter of the total population.

Conclusions: The unique experimental methodology and sampling of biomaterials in orbital flight provided new opportunities for studying and understanding the molecular mechanisms of fibrillogenesis, revealing in more detail the role of MCs in remodeling the extracellular matrix of the skin dermis.

Key words: mast cells, experiment, space medicine, readaptation.

Актуальность

Тучные клетки (ТК) являются мишенью многочисленных исследований в различных направлениях биомедицины, в том числе космической медицины, представляя собой полифункциональный компонент специфического тканевого микроокружения [3]. Адаптивные реакции организма, возникающие на изменение уровня гравитационного стимула изучаются в различных органах и системах. Однако, состоянию интраорганной соединительной ткани, обладающей важной биологической миссией в обеспечении деятельности внутренних органов, уделяется гораздо меньшее внимание [1].

В связи с увеличением длительности пребывания человека в условиях невесомости и возрастанием ряда неблагоприятных физиологических эффектов на организм, перспективным направлением является изучение морфофункциональных основ механизмов реадaptации соединительной ткани в условиях измененной гравитационной среды [5].

Материалы и методы

Эксперимент проведен в 2017 году на 40 самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 9-12 недель. Изучалась кожа латеральной поверхности бедра. Грызуны в группе V получали питьевую воду и питание ad libitum.

Мыши группы В сразу после старта космического корабля SpaceX10 подвергались эвта-

назии. Находившиеся в наземной экспериментальной камере по имитации условий содержания животных на МКС (Космический центр им. Джона Кеннеди, США), мышцы группы G повторяли по времени пребывания полетный эксперимент. Животные группы F находились в космическом полете в течение 21-24 суток.

Проведение эвтаназии осуществлялось непосредственно в условиях невесомости, на борту МКС, что явилось важной и уникальной методической особенностью биоматериала полетной группы. Далее материал подвергался криофиксации и содержался в пакетах со льдом. Временной интервал между эвтаназией и замораживанием биоматериала составлял 2 мин.

В соответствии с протоколом НАСА-Роскосмос "Utilization Sharing Plan on-board ISS" полученные пробы были доставлены в Россию на сухом льду без разморозки.

Пробоподготовка кожи включала в себя фиксацию в 10% нейтральном формалине, обезживание, заливку в парафин, приготовление срезов толщиной 5 мкм, окрашивание гематоксилином и эозином. Гистохимическая детекция ТК проводилась с помощью окрашивания раствором Гимза.

Для одновременного изучения коллагеновых волокон дермы кожи, в т.ч. ретикулярных, окрашивание раствором Гимза комбинировалось с импрегнацией серебром [4]. Планиметрический анализ микропрепаратов кожи мышей проводился на микроскопе ZEISS Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Germany).

Для фотодокументирования изучали не менее 25 полей зрения в каждом микропрепарате при использовании объектива x20. Площадь поля зрения измерялась в мкм².

Проводили количественный анализ обнаруженных тучных клеток, гранулированных и дегранулированных форм, а также свободно лежащие гранулы ТК для каждого экспериментального животного.

Кроме того, учитывалась частота прилегания ТК друг к другу, а также солокализация ТК с фиброцитами и фибробластами. При получении числового массива данных для повышения объективности проводимого исследования в аспекте определения объема популяции тучных клеток в дерме кожи из полученных для анализа микрофотографий вручную удаляли площадь, содержащую волосы, волосяные фолликулы и сальные железы.

Достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента в случае нормального распределения выборки, при его отсутствии использовался непараметрический статистический U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Группы контролей ТК по большинству параметров морфофункционального состояния были схожи друг с другом. Это касалось как их количественного представительства в коже, так и секреторной активности.

ТК дермы имели крупные размеры и содержали хорошо различимый метахроматичный секреторный материал, упакованный в гранулы различных размеров, достигая 1 мкм.

По морфофункциональному состоянию преобладали ТК с признаками секреции гранул, в то время как численность недегранулированных форм была примерно одинаковой и составляла четверть от объема всей популяции.

Морфофункциональный кластер «тучная клетка – фибробласт» находился примерно в одинаковом статусе у животных всех контрольных групп.

Тучные клетки часто выявлялись в непосредственной близости с фибробластами и фиброцитами.

Условия орбитального полета не приводили к достоверному изменению численности популяции ТК кожи, обращали на себя внимание показатели дегрануляционной активности ТК, свидетельствовавшие об интенсификации выведения секреторных гранул в межклеточный матрикс.

Присутствующий в цитоплазме секреторный материал был упакован в гранулы меньшего размера, с отсутствием количества крупных метахроматических гранул размерами более 1 мкм, в отличие от групп контроля.

Возможно этот факт является свидетельством активного расходования продуктов биогенеза и снижения запасов преформированных медиаторов для реадaptации к измененной гравитации [1,3].

Полученные данные свидетельствуют об изменении частоты солюкализации ТК с клетками фибробластического дифферона в условиях микрогравитации. В частности, в коже животных группы космического полета после окрашивания раствором Гимза и импрегнацией серебром ТК реже прилежали к фибробластам и фиброцитам по сравнению с группами базального, виварийного и наземного контролей. В местах солюкализации ТК с фибробластическим диффероном отмечалось редкое выявление ретикулярных волокон по сравнению с группами контроля.

Интенсивность высвобождения компонентов секрета ТК в специфическом тканевом микроокружении кожи возрастала. Создавалось впечатление более «рыхлого» внешнего вида тучных клеток, занимавших большую площадь в дерме кожи, с большим ареалом распространения гранул при их секреции.

Морфологическим свидетельством ослабления активности участия ТК в фибриллогенезе под влиянием невесомости стало уменьшение количества преколлагеновых волокон, прилежащих к ТК или отходящих от них в различных направлениях внеклеточного матрикса.

Стоит предположить, что следствием этого явилось и интегральное снижение числа импрегнированных волокон в дерме кожи у мышей полетной группы по сравнению с животными контрольных групп, свидетельствуя о торможении фибриллогенеза в условиях невесомости.

Выводы

Является очевидным, что условия микрогравитации могут приводить к изменению условий фибриллогенеза. Также можно говорить о развитии гемодинамических изменений, приводящих к дополнительным модификациям специфического тканевого микроокружения.

Снижение эффективности экстрацеллюлярной сборки волокнистых коллагенов в межклеточном матриксе может быть обусловлено изменением уровня pH, содержанием белков аморфной фазы внеклеточного матрикса, воды и др [2,3].

В следствии этого, формирование коллагенового волокна будет происходить в измененных условиях содержания воды, концентрации тропоколлагена и других протеинов, осмотического давления, ионной силы и других факторов. Очевидно, что в условиях космического полета механизмы физиологической регенерации волокнистого компонента не могут быть воплощены в полном объеме в связи с определенными, специфичными для невесомости изменениями ряда показателей интегративно-буферной метаболической среды внутренних органов. С точки зрения практической значимости, важно принимать во внимание риск повреждения кожи во время регенерационных процессов в условиях профессиональной деятельности космонавтов на борту МКС. В этих условиях процессы фибриллогенеза особенно активны, и могут наблюдаться важные изменения, связанные с образованием волокнистого компонента внеклеточного матрикса.

Уникальная методология эксперимента и взятие биоматериала в условиях орбитального полета предоставило новые возможности для изучения и понимания молекулярных механизмов фибриллогенеза, более детально раскрывая роль ТК в ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса дермы кожи.

Литература

1. Атякшин Д.А., Алексеева Н.Т., Клочкова С.В., Никитюк Д.Б. Состояние коллагеновых волокнистых структур экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани желудка и кишечника мышей после 30-суточного орбитального полета // Вопросы питания. 2019. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sostoyanie-kollagenovyh-voloknistyh-struktur-ekstratsellyulyarnogo-matriksa-soedinitelnoy-tkani-zheludka-i-kishechnika-myshey-posle> (15.09.2020).
2. Атякшин Д.А., Никитюк Д.Б., Клочкова С.В., Алексеева Н.Т., Бурцева А.С. Участие тучных клеток в адаптации желудка монгольских песчанок к гравитационному фактору. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018;7(1):14-26. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-1-14-26>
3. Шишкина В.В., Атякшин Д.А. Тучные клетки и фибрилlogenез коллагена в условиях невесомости. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019;8(3):79-88. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-3-79-88>
4. Buchwalow I.B. Immunohistochemistry: Basics and Methods, 1st Edition / I.B. Buchwalow, W. Boecker ed. // London, New York: Springer. 2010. p.158.
5. Crivellato E., Travan L., Ribatti D. The Phylogenetic Profile of Mast Cells. Mast Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2015; 1220:11-27.

