Н.П. ПАШТАЕВ, В.Е. СЕРГЕЕВА, Н.В. КОРСАКОВА

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ГИСТАМИНПОЗИТИВНЫХ СТРУКТУР ХРУСТАЛИКА

Конспект лекции

Чебоксары 2006

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
Государственное образовательное учреждение
«Институт усовершенствования врачей»

Н.П. Паштаев, В.Е. Сергеева, Н.В. Корсакова

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ГИСТАМИНПОЗИТИВНЫХ СТРУКТУР ХРУСТАЛИКА

Конспект лекции

Чебоксары 2006

УДК 611.84.018

Паштаев Н.П. Метод изучения гистаминпозитивных структур хрусталика: Конспект лекции / Н.П. Паштаев, В.Е. Сергеева, Н.В. Корсакова; ИУВ. – Чебоксары, 2006. – 8 с.

Представлена методика выявления гистамина в хрусталике, приведена детальная качественная и количественная характеристика гистаминпозитивных структур хрусталика интактных животных, дано подробное описание особенностей распределения гистамина в различных структурах хрусталика.

Предлагаемый метод позволяет с высокой точностью идентифицировать гистаминсодержащие структуры хрусталика, а также определить концентрацию гистамина с использованием цитоспектрофлуориметрии.

Для слушателей Института, аспирантов и врачей-офтальмологов.

Ответственный редактор: д-р мед. наук Н.П. Паштаев.

Утверждено Методическим советом Института.

© Н.П. Паштаев. В.Е. Сергеева,
Н.В. Корсакова, 2006

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

В последние десятилетия повсеместно отмечается значительное повышение уровня заболеваемости катарактой, которая становится одной из наиболее частых причин слепоты. Наличие такой тенденции отягощается отсутствием эффективных консервативных методов лечения или предотвращения помутнения хрусталика, что связано с малой изученностью как причин возникновения данной патологии, так и процессов, протекающих в хрусталике в этих условиях.

Известна определенная роль гуморальной системы в регуляции функционирования эпителиальных клеток хрусталика. В частности, показано, что как избыток, так и недостаток некоторых гормонов, например глюкокортикоидов, сопровождается помутнением хрусталика. Важное значение эндокринной системы в регуляции различных характеристик клеток хрусталика подтверждается еще и тем, что эти клетки экспрессируют рецепторы к глюкокортикоидам, а также рецепторы к гистамину. Вместе с тем возможная роль гуморальной системы в регуляции различных структурно-функциональных характеристик тканей хрусталика практически не исследована.

Еще одним мало изученным аспектом гуморальной регуляции функционирования хрусталика является обеспеченность его биогенными аминами. Изучение их возможной роли особенно актуально, если учесть уже описанную роль биоаминов, например гистамина, в регуляции транспорта ионов кальция через клеточные мембраны, избыток которого в клетках хрусталика, как известно, способен инициировать развитие одной из форм катаракты. Поскольку биогенные амины, являясь универсальными гормонами-медиаторами нервной, эндокринной и иммунной систем, участвуют в огромном количестве регуляторных процессов в организме, то они, безусловно, участвуют и в регуляции различных структурно-функциональных характеристик клеток хрусталика, хотя механизм таких влияний практически не исследован.

Распределение гистамина в организме

Можно считать установленным, что гистамин – постоянная составная часть почти всех органов, тканей, жидких сред и выделений организма животных и человека. Он обнаруживается в крови, плазме, желудочном (но не в панкреатическом) соке, моче, желчи, слюне, поте, слизистых выделениях носа, в жидкости волдырей, мокроте, а также в экссудатах.

Областью наиболее высокой концентрации гистамина являются кожа, желудочно-кишечный тракт и легкие, т. е. ткани, соприкасающиеся с внешней средой. Кожа человека содержит в среднем 8,5 мкг/г. Наи-

большее его количество обнаруживается в коже век (до 30,3 мкг/г), головы, шеи, наименьшее – в коже живота.

Следующее место по содержанию гистамина занимает кишечный тракт, но и в нем он распределен неравномерно. По направлению к нижней части кишечника количество гистамина уменьшается и в толстых кишках его относительно немного. Установлено также, что слизистая оболочка кишечника содержит значительно больше гистамина, чем мышечный слой.

Третье место наиболее высокого накопления гистамина – легкие. Уровень гистамина в легких не зависит от пола и повышается с возрастом.

Незначительное количество гистамина находится в мышцах, селезенке, почках, матке, семенных пузырьках, панкреатической и щитовидной железах, надпочечнике, сердце, соединительной и жировой ткани.

Участие гистамина в жизнедеятельности организма

Из общей массы метаболитов, циркулирующих во внутренней среде и принимающих участие в коррекции процессов жизнедеятельности организма, современная наука выделила значительное число специфических соединений определенной химической структуры. Они обладают теми или другими выраженными, им одним свойственными, биологическими особенностями и вызывают строго очерченные физиологические эффекты. Особое внимание в последние годы уделяется роли медиаторов в регуляции функций различных систем организма. Среди этих соединений гистамин занимает одно из ведущих мест. Диапазон его влияния на функции организма широк и многообразен. Это и тканевой гормон, и медиатор, и фармакологический препарат, и стимулятор, и ингибитор внутриклеточных, тканевых, органных превращений.

Гистамин участвует в нейрогуморальной регуляции жизненно важных функций организма животного. Можно считать доказанным, что гистамин стимулирует гипофизарно-надпочечниковую систему, вызывая процесс возбуждения в различных структурах мозга – гипоталамус, мозжечок.

Подробно изучено влияние гистамина на желудочную секрецию, регуляцию микроциркуляции крови. Участие гистамина в возникновении определенных патологических состояний (аллергия, воспаление, коллапс, шок) считается общепризнанным. При этом наибольшие споры вызывают вопросы о его роли в нормальной деятельности клеток, органов, тканей, целостного организма. Особого внимания заслуживает проблема внутриклеточно-образующегося гистамина и его значения для регенерации тканей, заживления ран, эмбрионального роста.

Гистамин в тканях хрусталика

Роль гуморальной системы в регуляции различных структурно-функциональных характеристик тканей хрусталика практически не исследована. Важное значение гистамина для процессов функционирования клеток хрусталика подтверждается наличием в них рецепторов к гистамину.

На количественное содержание гистамина также протестированы радужка, цилиарное тело, сосудистая оболочка, сетчатка, склера и зрительный нерв. Максимальные концентрации гистамина обнаружены в сосудистой оболочке, минимальные – в сетчатке. Зарегистрировано увеличение уровня гистамина в тканях глаза при некоторых видах его патологии – эндофтальмит, глаукома, проникающее ранение глаза. На хрусталике человеческого глаза проведены исследования по определению типа преобладающего гистаминного рецептора. Продемонстрировано, что порожденная гистамином мобилизация ионов кальция в цитоплазме хрусталиковых эпителиальных клеток блокируется трипролидином (Н1-блокатор), но не изменяется под действием Н2- и Н3-антагонистов. Данный факт позволяет утверждать, что клетки хрусталика несут на своей поверхности преимущественно Н1-рецепторы.

Изучение местных различий в локализации функциональных рецепторов к биоаминам (гистамин, ацетилхолин) в интактном человеческом хрусталике продемонстрировало наличие функциональных отличий между центральными передними и экваториальными эпителиальными клетками. Уровень функциональной активности оценивался по изменению концентрации эпителиального фактора роста (epithelial growth factor, EGF). Авторы свидетельствуют о значительном увеличении концентрации данного фактора в ответ на введение гистамина как в центральных передних, так и в экваториальных эпителиальных клетках хрусталика. Введение ацетилхолина сопровождается значительным повышением уровня EGF в центральных передних эпителиальных клетках, в то время как экваториальные клетки остаются безучастны. Описанные выше реакции упразднялись блокаторами Н1-, М1-, Р2У(2)- рецепторов, что свидетельствует о наличии упомянутых рецепторов на поверхности хрусталиковых эпителиальных клеток. Приведенные сведения иллюстрируют моделирующее влияние биоаминов, в том числе гистамина, на показатели роста клеток хрусталика. Интенсивность их роста связана со степенью мобилизации цитоплазматического кальция, которую стимулирует введенный гистамин. Поэтому гистамин считается одним из интрацеллюлярных кальций-мобилизующих агентов.

Уровень гистамина в хрусталике очень вариабелен и зависит от многих факторов. Например, даже незначительное превышение нор-

мальной концентрации ионов кальция в хрусталиковых эпителиальных клетках приводит к увеличению в них уровня гистамина – происходит активация кальций-мобилизующих агонистов. Действием, ингибирующим высвобождение гистамина, обладает глютатион хрусталика.

Общеизвестен метод экспериментального воссоздания катаракты с использованием инкубации хрусталика в кальций-насыщенной среде. Высокое содержание ионов кальция приводит к синтезу de novo высокомолекулярных полимеров и молекул бета-кристаллина (M=55000), которые не встречаются в нормальном хрусталике. Показано, что образование упомянутого патологического белка (бета-кристаллина) блокируется гистамином.

Таким образом, современные сведения, характеризующие роль гистамина в обменных процессах хрусталика, свидетельствуют как о его участии в ходе патологического процесса, так и о важности свойств гистамина, направленных на предотвращение развития патологии хрусталика (борьба с катарактогенезом).

Структурные реакции тканей глаза на различные воздействия изучались многократно. Однако эти работы являются регистрацией лишь конечной фазы процесса, так как выявляют устойчивую структурную перестройку, обеспечивающую адаптацию к действию повреждающих факторов. Начальные этапы адаптации в форме создания временной («запускающей») функциональной системы морфологами изучены недостаточно.

Среди современных методов исследования в морфологии наиболее адекватными для решения подобного рода задач являются методы, выявляющие перемещения и количественные изменения нейрогуморальных компонентов тканевых систем, в том числе нейромедиаторных биогенных аминов: моноаминов – катехоламины и серотонин, а также диаминов – гистамин. Наибольшее распространение получили методы с использованием специфических флуоресцирующих и нефлуоресцирующих антител.

Однако эти методы не дают возможности количественного определения исследуемого в тканях вещества. Многие ученые до настоящего времени применяют в своих исследованиях предложенные ранее люминесцентно-гистохимические методы выявления моно- и диаминов (Cross S.A. et al., 1971; Falk B. et al., 1962), благодаря изобретению которых реализовалась потребность в измерении количества биогенных аминов (у.е.).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДИКИ

Предлагаемая методика предназначена для изучения состояния гистаминного профиля различных структур хрусталика глаза.

Материально-техническое обеспечение методики

1) α-ортофталевый альдегид
2) криостат, нож для криостата
3) два термостата для поддержания температурного режима 70 и 100°С
4) две стеклянные емкости с крышкой одинакового объема
5) люминесцентный микроскоп
6) насадка ФМЭЛ-1А для люминесцентного микроскопа
7) предметные стекла

ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

В целях идентификации гистаминсодержащих структур свежие криостатные срезы хрусталика обрабатывают **люминесцентно-гистохимическим методом Кросса, Эвена, Роста** (Cross et al., 1971).

Метод основан на реакции паров ортофталевого альдегида с гистамином, в ходе которой образуются флуоресцирующие соединения производных имидазолилэтиламина. Под люминесцентным микроскопом образовавшийся комплексный продукт дает при большом содержании гистамина – желтое, при среднем – зеленое, при малом – голубое свечение.

Срезы хрусталика обрабатывают в предварительно разогретой камере парами ортофталевого альдегида в термостате при температуре 100°С в течение 10 секунд. Затем срезы при той же температуре на 2 мин помещают в другую камеру, содержащую пары воды. Далее срезы высушивают в термостате при 70°С в течение 5 мин, после чего заключают в полистирол.

Препараты изучают в течение 2 часов с момента постановки реакции.

Количественные концентрации гистамина в гистаминсодержащих структурах хрусталика оценивают с помощью **метода цитоспектрофлуориметрии** (Юденфренд С., 1965; Карнаухов В.Н., 1978). Для этого на люминесцентный микроскоп устанавливают насадку ФМЭЛ-1А при выходном напряжении 900 В. Свет от люминесцирующего препарата, попадая в приставку, проходит через специальное отверстие-зонд диаметром 0,5 мм, вырезающий в плоскости препарата область, свет от которой идет на интерференционный светофильтр с определенной длиной волны. Для выяснения интенсивности свечения гистамина используется светофильтр №7 (длина волны 515 нм). Замер интенсивности свечения производится в единицах флуоресценции (условные единицы по шкале регистрирующего прибора-усилителя).

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Эпителиальные клетки хрусталика лабораторных крыс-самцов содержат гистамин, большая часть которого присутствует в ядрах.

С помощью люминесцентной микроскопии срезов, обработанных парами ортофталевого альдегида по методу Кросса, в хрусталике хорошо визуализируются ядро хрусталика и ядра хрусталиковых эпителиальных клеток. Люминесценция данных структур умеренно выраженная, желто-зеленая, но очень быстро гаснущая.

Максимальной люминесценцией обладает область ядра хрусталика. Ее значение в среднем составляет 734,1±2,75 у.е. Свечение в данной области можно охарактеризовать как самое интенсивное и яркое на срезе.

Цитоплазма хрусталиковых эпителиальных клеток имеет очень слабое, бледное желто-зеленое свечение. Клеточные мембраны не выявляются. Уровень цитоплазматического гистамина в клетках определяли по интенсивности фонового свечения во всех изучаемых областях хрусталика.

Ядра эпителиальных клеток обладают интенсивным желто-зеленым свечением. Среди них максимальной люминесценцией характеризуются ядра экваториальной зоны хрусталика (401,5±2,2 у.е.). Замечено, что клеточные ядра центрального эпителия обладают менее выраженным свечением (105,55±0,75 у.е.).

В области расположения хрусталиковых клеток-волокон проведенное исследование в зависимости от уровня содержания гистамина и степени конденсации ядерного хроматина выявило присутствие двух типов клеточных ядер: А-тип – ядра, характеризующиеся высоким уровнем гистамина и высокой степенью конденсации ядерного хроматина (данный тип клеточного ядра также характерен и для клеток переднего эпителия хрусталика); Б-тип – ядра, содержащие незначительные концентрации гистамина и имеющие низкую степень конденсации хроматина.

Выявлено, что у интактных животных данные типы ядер представлены почти в равных количествах, лишь с небольшим преобладанием числа ядер Б-типа. Тот факт, что ядра с пониженной степенью конденсации хроматина (Б-тип) встречаются лишь в области расположения хрусталиковых клеток-волокон, иллюстрирует преимущественную локализацию зоны синтеза специфических хрусталиковых белков именно в этой области.

Прежде чем рассмотреть функциональное значение описанных выше типов клеточных ядер, необходимо вспомнить о таком процессе как клеточный цикл. Клетки центральной зоны переднего эпителия, являясь материнскими клетками хрусталика, находятся в G_2-периоде интерфазы. Клетки экваториальной зоны переднего эпителия (зона

роста хрусталика), обладающие митотической активностью, непрерывно пребывают в состоянии митоза. Следовательно, главной функцией клеток переднего эпителия хрусталика является непрерывное пополнение путем митотического деления популяции основных хрусталиковых клеток (клеток-волокон), для осуществления которого необходима высокая степень конденсации ядерного хроматина (по этой причине ядра эпителиальных клеток соответствуют характеристикам А-типа клеточного ядра). Клетки экваториальной зоны переднего эпителия, окончившие митотическое деление, вступают в процесс формирования молодых клеток-волокон (А-тип клеточного ядра), также содержащих высококонденсированный хроматин, так как данные клетки только что навсегда покинули клеточный цикл для выполнения своей специализированной функции (построения основной хрусталиковой клетки – клетки-волокна, а также синтеза специфических хрусталиковых белков, обеспечивающих его прозрачность).

Вероятно, по мере того, как в клетках-волокнах активизируются процессы синтеза белков, в их клеточных ядрах происходит необходимая для этого деконденсация ядерного хроматина. По этой причине клеточные ядра клеток-волокон, активно выполняющих синтетическую функцию, на срезе характеризуются морфологическими особенностями Б-типа клеточных ядер.

Следует отметить, что в современной офтальмологии за последние годы появилась тенденция к изучению иммуногистохимических основ обмена веществ нормального и катарактально измененного хрусталика. Внимание ученых, изучающих обменные процессы хрусталика, в основном привлечено к особенностям структурной и функциональной организации мембран клеток и волокон хрусталика – рецепторное обеспечение, кальциевая проницаемость, пространственное расположение липидов. Огромное значение кальциевой перегрузки хрусталика для инициации процессов катарактогенеза подчеркивает необходимость дальнейшего детального исследования реакций внутриклеточной системы кальций-мобилизующих агонистов (гистамин, АТФ, карбахол, сера) и антагонистов (ионы калия, тапсигаргин, некоторые микроэлементы – цинк, никель, магний). В литературе встречаются лишь единичные исследования относительно содержания различных кальций-мобилизующих агонистов, в том числе и гистамина, в интактном хрусталике животных. При этом оценка уровня гистамина в структурах хрусталика дана только качественная и без учета его динамических изменений.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.Вайсфельд И.Л., Кассиль Г.Н. Гистамин в биохимии и физиологии. – М.: Наука, 1981. – 80 с.

2.Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Зеленова И.Г. Нейромедиаторы лимфоидных органов. – Л.: Наука, 1982. – 128 с.

3.Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978. – 208 с.

4.Коган М.З. Биологическое назначение гистамина // Лаб. дело. – 1987. – № 9. – С. 712-714.

5.Корсакова Н.В., Сергеева В.Е. Топографические особенности распределения гистамина в структурах интактного хрусталика // Вестник офтальмологии. – М.: Медицина, 2006. – Т. 122, № 3. – С. 9-11.

6.Успенский В.И. Гистамин. – М.: Медицина, 1963. – С. 3-25.

7.Хэм А., Кормак Д. Гистология: Фундаментальная монография: В 5 т. /Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – Т. 5. – 294 с.

8.Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине.– М.: Мир, 1965. – 484 с.

9.Cross S.A., Even S.W., Rost F.W. A study of methods available for cyto-chemical localization of histamine by fluorescence induced with o-phtaldehyde or acetaldehyde // Histochem. J. – 1971. – V. 3 – N. 6. – P. 471-476.

10.Gupta V., Wagner B.J. Expression of the functional glucocorticoid receptor in mouse and human lens epithelial cells // Jnvest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2003. – V. 44. – N. 5. – P. 2041-2046.

11.Lorand L., Conrad SM., Velasco PT. Formation of a 55 000-weight cross-linked beta crystallin dimer in the Ca2+-treated lens. A model for cataract // Biochemistry. – 1985. – V. 24. – V. 6. – P. 1525-1531.

12.Nowak J.Z., Nawrocki J. Histamine in the human eye // Ophthalmic. Res. – 1987. – V. 19. – N. 2. – P. 72-75.

СОДЕРЖАНИЕ

Общие сведения 1

Использование методики 4

Описание методики 5

Результаты применения методики 6

Список рекомендуемой литературы 8

Учебное издание

Паштаев Николай Петрович
Сергеева Валентина Ефремовна
Корсакова Надежда Витальевна

Метод изучения гистаминпозитивных структур хрусталика

Конспект лекции

Подписано в печать 31.08.06 г. Формат 60x84/16.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать оперативная.
Усл. печ. л. 0,46. Уч.-изд. л. 0,4. Тираж 100 экз. Заказ № 13.

ГОУ «Институт усовершенствования врачей» Минздравсоцразвития Чувашии
428003, Чебоксары, Красная площадь, 3.