

УДК: 616.831-001,,137*

Г.В. Лукьянцева, Г.Н. Копылова *, Б.А. Умарова *, Е.А. Смирнова, В.А. Пастухова
ДИНАМИКА БАЗАЛЬНОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ АМИЛИНА

*Национальный Университет Физического Воспитания и Спорта Украины; *Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова*

Лукьянцева Г.В., Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Смирнова Е.А., Пастухова В.А. Динамика базальной и стимулированной секреторной активности тучных клеток под влиянием амилина // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, № 3. – С. 95-97.

In vitro амилин существенно снижает активирующее влияние ацетилхолина и брадикинина на секреторную активность тучных клеток, однако не оказывает заметного влияния на их базальную секрецию. Стабилизацию амилином активированных тучных клеток, вероятно, можно рассматривать как один из механизмов протекторного действия амилина при язвообразовании.

Ключевые слова: амилин, тучные клетки, брадикинин, ацетилхолин.

Лук'янцева Г.В., Копилова Г.Н., Умарова Б.А., Смирнова Е.А., Пастухова В.А. Динаміка базальної та стимульованої секреторної активності тучних клітин під впливом аміліну // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 3. – С. 95-97.

In vitro амілін суттєво знижує активуючий вплив ацетилхоліну та брадікініну на секреторну активність тучних клітин, однак не має помітного впливу на їх базальну секрецію. Стабілізацію аміліном активованих тучних клітин, вірогідно, можна розглядати як один з механізмів протекторної дії аміліну при утворенні виразок.

Ключові слова: амілін, тучні клітини, брадікінін, ацетилхолін.

Lukjantseva G.V., Kopylova G.N., Umarova B.A., Smirnova E.A., Pastukhova V.A. Dynamics of basal and stimulated secretory activity of mast cells under the influence of amylin // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, № 3. – С. 95-97.

In vitro amylin significantly reduces the activating effect of acetylcholine and bradykinin on the secretory activity of mast cells, but has no appreciable effect on their basal secretion. Stabilization of amylin activated mast cells can probably be regarded as one of the mechanisms of the protective action of amylin with ulceration

Key words: amylin, mast cells, bradykinin, acetylcholine.

Язвенная болезнь желудка - широко распространенное системное заболевание сложной этиологии, основным проявлением которого является образование поврежденной слизистой оболочки различной степени выраженности - от эрозий до прободных язв. Повышение активности агрессивных факторов в полости желудка (гиперсекреция кислоты и пепсина), также как и ослабление системы защиты (снижение выработки и нарушение качественного состава желудочной слизи, уменьшение секреции бикарбонатов, ухудшение кровоснабжения и ослабление процессов регенерации) способствуют возникновению поврежденной слизистой оболочки желудка (СОЖ) и развитию язвенной болезни.

Поддержание оптимального баланса между агрессивными и защитными механизмами обеспечивается сложной системой нервных и гуморальных регуляторных механизмов, многие из которых до сих пор остаются недостаточно изученными. В то же время знание этих механизмов является необходимым условием для создания превентивных рекомендаций и разработки стратегии терапевтических мероприятий.

Одним из эндогенных регуляторов, участвующих в поддержании гомеостаза СОЖ, является пептидный гормон поджелудочной железы - амилин (панкреатический островковый полипептид), относящийся к надсемейству кальцитонин-ген-родственных пептидов [1]. Он секрети-

руется и выделяется β -клетками островков Лангенгарса в одних секреторных гранулах совместно с инсулином, и представляет собой активный фактор, причастный к поддержанию гомеостаза глюкозы в крови. Он снижает эвакуацию химуса из желудка, способствуя тем самым замедлению всасывания глюкозы в кровь. Кроме того, амилин обладает выраженным противоязвенным действием, снижает базальную [2] и стимулированную раздражением блуждающего нерва [3] секрецию соляной кислоты в желудке.

Известно, что в регуляции функциональной активности париетальных клеток слизистой оболочки желудка, секреторирующих соляную кислоту, принимает участие гистамин, продуцируемый тучными (энтерохромафинными) клетками (ТК). Взаимодействуя с H_2 -рецепторами на поверхности париетальных клеток, гистамин стимулирует секрецию кислоты, а также повышает проницаемость капилляров, что ведет к развитию отеков и нарушениям микроциркуляции в слизистой оболочке желудка [4; 5]. Кроме гистамина, тучные клетки продуцируют целый ряд провоспалительных медиаторов (серотонин, протеазы тучных клеток, цитокины и т.д.) [6]. Применение различных стабилизаторов тучных клеток уменьшает повреждение слизистой оболочки желудка [4, 5].

Ранее нами было показано стабилизирующее влияние амилина на секреторную активность популяции тучных клеток *in vivo* [7],

однако, полученные результаты не дают возможности окончательно судить о том, действует ли амилин непосредственно на ТК. Амилиновые рецепторы обнаружены в различных органах и тканях, включая структуры головного мозга [8, 9], и при введении *in vivo* конечный эффект амилина на состояние ТК может быть опосредован рядом промежуточных процессов. Для выяснения возможности непосредственного влияния амилина на тучные клетки были выполнены эксперименты *in vitro*.

Материал и методы. У самцов лабораторных крыс после декапитации извлекали образцы брыжейки или подкожной клетчатки, которые инкубировали в течение 15 мин. в растворах амилина или в физиологическом растворе (контроль). В другой серии опытов препараты инкубировали 10 мин. в физиологическом растворе плюс 10 мин. в активаторе тучных клеток или 10 мин. в амилине ($2 \cdot 10^{-9}$ М) плюс 10 мин. в активаторе. В качестве активаторов использовали ацетилхолин и брадикинин. Контрольные образцы ткани помещали соответственно на 20 мин в физиологический раствор.

Затем готовили пленочные препараты и оценивали секреторную активность тучных клеток методом морфометрического анализа [10]. О секреторной активности ТК судили по индексу дегрануляции - отношению числа дегранулированных клеток к общему числу проанализированных клеток. Дегрануляция оценивалась по степеням - слабая (I), умеренная (II), сильная (III). Слабая - за пределами клетки 1-3 гранулы; умеренная - гранул за пределами клетки больше, можно увидеть ядро; сильная - вся клетка окружена гранулами, ядро хорошо видно. На каждом препарате оценивали около 200 тучных клеток в 20 полях зрения.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов образцы брыжейки инкубировали в растворе амилина с концентрацией 10^{-8} М и 10^{-9} М, а контрольные препараты - в физиологическом растворе. Результаты данных опытов представлены на рисунке 1. Эксперимент показал, что 15 минутная инкубация образцов в растворе амилина в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М не изменила физиологического состояния тучных клеток. Достоверных отличий не обнаружено ни в величине индекса дегрануляции, ни в соотношении числа клеток с разной степенью дегрануляции.

Таким образом, можно предположить, что в условиях *in vitro*, также как и *in vivo*, пептид не оказывает сколько-нибудь заметного действия на спонтанную (базальную) секреторную активность тучных клеток.

В следующей серии экспериментов мы выясняли, может ли амилин при непосредственном действии на тучные клетки снижать их реактивность, то есть уменьшать ответ на действие активаторов. Поскольку в опытах *in vivo* амилин предотвращал активирующий эффект блуждающего нерва, медиатором которого

является ацетилхолин (Ацх), мы исследовали влияние амилина при непосредственном действии ацетилхолина на ТК.

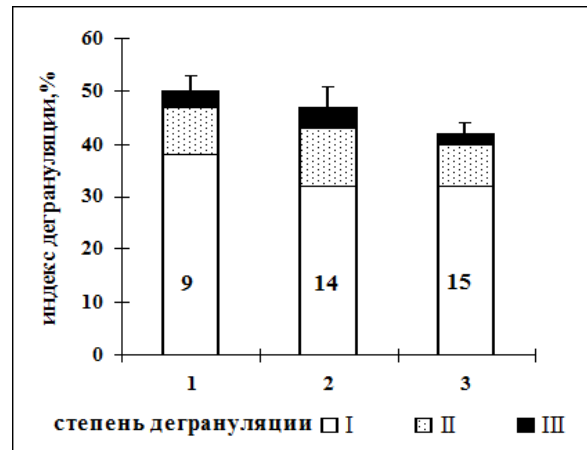


Рис. 1. Влияние амилина на спонтанную секрецию тучных клеток брыжейки *in vitro*. 1 – контроль (физ. р-р), 2 – амилин 10^{-8} М, 3 – амилин 10^{-9} М цифры в столбиках – количество препаратов

Для этого образцы брыжейки и подкожной клетчатки инкубировали:

1 группа (контроль) - 20 мин. в физиологическом растворе;

2 группа - 10 мин в физиологическом растворе, затем 10 мин. в растворе ацетилхолина (10^{-6} М);

3 группа - 10 мин. в растворе амилина (10^{-9} М), затем 10 мин. в растворе ацетилхолина. Результаты представлены на рисунке 2.

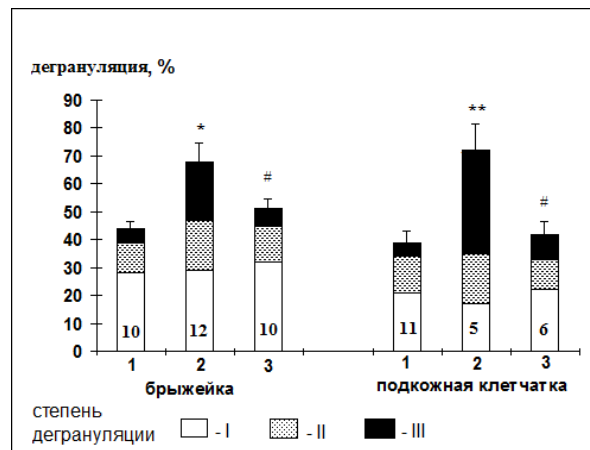


Рис. 2. Стабилизирующий эффект амилина при стимуляции секреторной активности тучных клеток ацетилхолином (*in vitro*). 1 - контроль (физ. р-р), 2 - ацетилхолин 10^{-6} М, 3 - ацетилхолин на фоне амилина 10^{-9} М. * $P < 0,01$ к контролю, ** $P < 0,001$ к контролю, # $P < 0,01$ к группе 2; цифры в столбиках - количество препаратов.

Для тучных клеток как брыжейки, так и подкожной клетчатки ацетилхолин является стимулятором секреции - это видно по резко возросшему индексу дегрануляции ТК во второй группе. Для тучных клеток брыжейки он возрос с 43,2% (контроль) до 67,5% (физиологический раствор+ацетилхолин), а для подкожной клетчатки с 39 до 72%. Рост идет в основном за счет

увеличения количества клеток с сильной (третьей) степенью дегрануляции.

Преинкубация образцов в растворе амилина (группа 3) достоверно предотвращала стимулирующее действие ацетилхолина. Общий индекс дегрануляции ТК брыжейки и подкожной клетчатки достоверно не отличался от контроля. В основном уменьшалось количество клеток со второй и третьей степенью дегрануляции. Т.о., амилин снижает реактивность тучных клеток и в опытах *in vitro*.

Однако результаты этих опытов не позволяют решить вопрос о том, уменьшает ли амилин реактивность ТК на различные активирующие влияния (в том числе и на ацетилхолин), или он обладает холинолитическими свойствами и тем самым ослабляет само активирующее воздействие ацетилхолина. Для проверки этих предположений мы использовали другой известный стимулятор тучных клеток - брадикинин. Брадикинин - вещество пептидной природы из семейства кининов, его неактивный предшественник циркулирует в крови. Брадикинин участвует в воспалительных и болевых реакциях [11]. Схема эксперимента повторяла предыдущую.

Результаты представлены на рисунке 3. При 20 минутной инкубации препарата в физиологическом растворе индекс дегрануляции составлял 43,6% для брыжейки и 39% для подкожной клетчатки. Брадикинин значительно стимулировал секреторную активность ТК. Индекс дегрануляции при этом значительно возрос и достигал 75% в брыжейке и 80% в подкожной клетчатке, при этом резко возрастало количество клеток с сильной (III) степенью дегрануляции.

После 10-минутной инкубации препаратов в растворе амилина (10^{-9} М) активирующий эффект брадикинина оказался значительно уменьшенным. Общий индекс дегрануляции ТК брыжейки практически не отличался от контроля. Существенно не изменилось и количество клеток с сильной степенью дегрануляции.

В ТК подкожной клетчатки индекс дегрануляции на фоне амилина также ниже, чем без предварительной инкубации в растворе амилина (группа 2), хотя и несколько превышает контрольное значение.

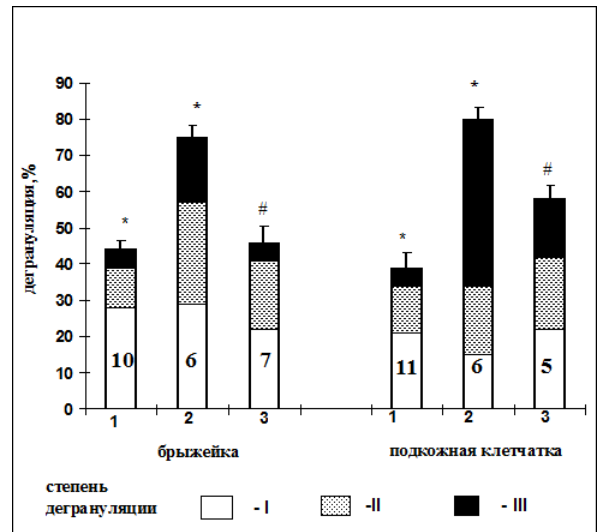


Рис. 3. Стабилизирующий эффект амилина при стимуляции секреторной активности тучных клеток брадикинином (*in vitro*). 1 - контроль (физ. р-р), 2 - брадикинин $3,2 \cdot 10^{-5}$ М, 3 - брадикинин на фоне амилина 10^{-9} М; *P<0,01 к контролю, #P<0,01 к группе 2; цифры в столбиках - количество препаратов

Кроме того, пептид предотвратил резкое нарастание количества клеток с третьей степенью дегрануляции по сравнению с группой 2.

Проведенные опыты дают возможность сделать вывод, что амилин подавляет реакцию тучных клеток на действие, по крайней мере, двух разных активаторов с различными рецепторами. Этот стабилизирующий эффект амилина, по-видимому, связан с его влиянием непосредственно на тучные клетки или их ближайшее окружение.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. / [Westermark P., Werstedt C., Wilander E., Sletten K.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1986. - Vol. 3, №140. - P. 827-831.
2. Панкреатический гормон амилин и целостность слизистой оболочки желудка / [С.В. Герман, С.Е. Жуикова, Ф.И. Комаров и др.] // Вестник Росс. Акад. Мед.наук. - 2001. - №12. - С. 34-38.
3. Вплив панкреатичного гормону амліліну на стимульовану кислоту секрецію шлунку. / [Г.Н. Копилова, Г.Е. Самоніна, Г.В. Лукьянцева та ін.] // Український морфологічний альманах. - 2012. - Т.10, №2. - С.44-45.
4. Beaven M.A. Histamine. / M.A. Beaven M.A // N.Engl. J. Med. - 1976. - Vol. 1, №294. - P. 30-36.
5. Cho C.H. Cholinergic-mediated gastric mast cell degranulation with subsequent histamine H1- and H2-receptor activation in stress ulceration in rats. / C.H. Cho, C.W. Ogle // Eur. J. Pharmacol. - 1979 - Vol. 1, №55 - P. 23-33.
6. Takeuchi K. Cytoprotective action of mast cell stabilizers against ethanol-induced gastric lesions in rats. / K. Takeuchi, H. Nishiwaki, S. Okabe // Jpn. J. Pharmacol. - 1986. - Vol. 2, №42. - P.297-307.
7. Влияние амилина на базальную и стимулированную секреторную активность тучных клеток. / [Г.В. Лукьянцева, Г.Н. Копылова, В.А. Пастухова и др.] // Український морфологічний альманах. - 2013. - Т.11, №2. - С.64-66.
8. Beament K. High affinity amylin binding sites in rat brain. / [K. Beament, M. Kenney, A. Young, T. Rink] // Mol. Pharmacol. - 1993. - Vol. 3, №44. - P.493-497.
9. Guidobono F. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. / F. Guidobono, F. Pagani, C. Ticozzi C. et al] // Br. J. Pharmacol. - 1997. - Vol. 4, №120. - P. 581-586.
10. Линднер Д.П. Тучные клетки как регулятор тканевого гомеостаза и их место в ряду биологических регуляторов. / [Д.П. Линднер, Э.М. Коган] // Архив патологии - 1997. - Т.8, №42. - С.1-5.
11. Серов В.В. Воспаление. / [В.В. Серов, В.С. Пауков] // М., Медицина. - 1995. - 235 с.

Надійшла 16.03.2013 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін