

**АВИДИН-ПОЗИТИВНЫЕ ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО КРЕМНИЯ В ТЕЧЕНИЕ
ДЕВЯТИ МЕСЯЦЕВ**

Е.А. Григорьева¹,
В.С. Гордова²,
В.Е. Сергеева¹,
А.Т. Смородченко³,
Н.В. Смирнова¹

¹ ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова,
Чебоксары, Россия

² ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта,
Калининград, Россия

³ Медицинская школа Берлина – Университет здоровья и медицины, Берлин,
Германия

**AVIDIN-POSITIVE MAST CELLS OF THE LIVER WHEN EXPOSED TO
WATER-SOLUBLE SILICON FOR NINE MONTHS**

Е.А. Grigoreva¹,
V.S. Gordova²,
V.E. Sergeeva¹,
A.T. Smorodchenko³,
N.V. Smirnova¹

¹ IN Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

³ Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

Резюме

Тучные клетки за счет содержащихся в них медиаторов – активные участники различных процессов, происходящих в организме. Изучена реакция авидин-позитивных тучных клеток печени на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

Эксперимент проведен на лабораторных нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на две группы: контрольная получала питьевую бутилированную воду с концентрацией кремния 10 мг/л, опытная – ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия, которая использовалась для доведения общей концентрации кремния в питьевой воде до 20 мг/л. Массовая концентрация кремния в воде контрольной и опытной групп была определена с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES. Через девять месяцев животные были выведены из эксперимента, печень извлечена и помещена в 10% нейтральный формалин для последующей заливки в парафин. Срезы печени толщиной 6 мкм после депарафинизации инкубировались 30 минут с авидином, меченным флуоресцентной меткой зеленого цвета (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Germany). Препараты анализировались под люминесцентным микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм.

По результатам исследования в печени крыс опытной группы обнаружено увеличение количества авидин-позитивных тучных клеток за счет слабо флуоресцирующих, а также увеличение медианы их площади и интенсивности флуоресценции. Выявлено, что изменение медианы площади авидин-позитивных тучных клеток в печени крыс опытной группы идет за счет уменьшения количества клеток малого размера и увеличения количества клеток среднего и большого размера. Установлены прямая сильная и прямая средняя корреляционные связи между площадью клетки и ее интенсивностью в контрольной и опытной группах соответственно.

Таким образом, проведенное исследование позволило расширить данные о воздействии водорастворимого кремния на печень и косвенно

предположить о возникновении воспалительных процессов в изучаемом органе.

Ключевые слова: тучные клетки, авидин-позитивные клетки, кремний, печень, силикаты, гепарин

Abstract

Mast cells, due to the mediators contained in them, are active participants in various processes occurring in the body. The reaction of avidin-positive mast cells of the liver to the intake of silicon with drinking water at a concentration of 20 mg/l for nine months was studied.

The experiment was conducted on laboratory nonlinear male rats, which were divided into two groups: the control group received bottled drinking water with a silicon concentration of 10 mg/l, the experimental group received the same water, but with the addition of sodium metasilicate nine-hydrate, which was used to adjust the total concentration of silicon in drinking water to 20 mg/l. The mass concentration of silicon in the water of the control and experimental groups was determined using an inductively coupled plasma emission spectrometer 5110 ICP-OES. After nine months the animals were sacrificed, the liver was extracted and fixed in 10% neutral formalin, processed and embedded in paraffin. After deparaffinization, 6- μ m-thick liver sections were incubated for 30 minutes with green fluorescent-labeled avidin (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Germany). The preparations were analyzed under a fluorescence microscope at an exciting light wavelength of 495 nm.

According to the results of the study, an increase in the number of avidin-positive mast cells due to weakly fluorescent ones was found in the liver of rats of the experimental group, as well as an increase in the median of their area and fluorescence intensity. It was revealed that the change in the median of area of avidin-positive mast cells in the liver of rats of the experimental group is due to a decrease in the number of small cells and an increase in the number of medium and

large cells. Positive strong and positive average correlations were established between the cell area and its intensity in the control and experimental groups, respectively.

Thus, the study made it possible to expand the data on the effect of water-soluble silicon on the liver and indirectly suggest the occurrence of inflammatory processes in the organ under study.

Keywords: mast cells, avidin-positive cells, silicon, liver, silicates, heparin

Введение.

Актуальность. Тучные клетки – многофункциональные клетки, задействованные во многих физиологических и патологических процессах, происходящих в организме [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Ранее нами было обнаружено, что хроническое поступление с питьевой водой кремния приводит к изменению микроморфологического строения печени лабораторных крыс, а также увеличению средней площади тучных клеток, выявляемых толуидиновым синим [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окраска толуидиновым синим позволяет оценить степень зрелости гепарина визуально, его количество можно рассчитать только с помощью индекса сульфатированности [0]. В то же время авидин связывается с гепарином и его флуоресценция прямо пропорциональна количеству гепарина в гранулах тучных клеток [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Гепарин – гликозаминогликан, являющийся матриксом для обеспечения оптимального расположения, хранения и регуляции экспорта синтезируемых в клетке медиаторов, в отношении к которым он проявляет регуляторные свойства. Кроме того, гепарин, связываясь со многими белками, может препятствовать рекрутированию провоспалительных клеток, адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам сосудов [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Таким образом, **целью** работы явилось изучение реакции авидин-позитивных тучных клеток печени на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на белых нелинейных крысах-самцах, находившихся в обычных условиях вивария при естественном освещении. Животные (n = 6) были разделены на две группы: контрольную (n = 3), которая получала питьевую бутилированную воду; опытную (n = 3), получавшую ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Определение массовой концентрации растворенных форм кремния проводилось с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES.

31 Так, в питьевой воде, получаемой животными контрольной группы,
32 содержалось 10 мг/л кремния, а в воде, получаемой опытной группой, – 20
33 мг/л.

34 Через девять месяцев животные были выведены из эксперимента, печень
35 извлечена и помещена в 10% нейтральный формалин для последующей
36 заливки в парафин. Срезы печени толщиной 6 мкм после депарафинизации
37 инкубировались 30 минут с авидином, меченным флуоресцентной меткой
38 зеленого цвета. Рабочий раствор готовился из готового меченого авидина
39 (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Germany) и 0,1 М фосфатного
40 буфера в соотношении 1:200. Раствор авидина сливался, срезы тщательно
41 промывались в фосфатном буфере. После промывки в фосфатном буфере
42 срезы заключались под покровное стекло в раствор, содержащий фосфатный
43 буфер и глицерин (1:1). Препараты анализировались под люминесцентным
44 микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм [Ошибка! Источник
45 ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.].

46 Микрофотографии с полей зрения, полученные при увеличении
47 объектива $\times 40$, обрабатывали в программе AmScore: подсчитывали среднее
48 количество авидин-позитивных клеток, измеряли площадь и интенсивность
49 флуоресции клеток с помощью функции *цветной куб* в автоматическом
50 режиме.

51 В целях определения взаимосвязи между площадью клетки и ее
52 интенсивностью флуоресценции рассчитывали коэффициент ранговой
53 корреляции Спирмена (r_s). При этом сила корреляционной связи считалась
54 слабой при $0 < r_s < 0,29$, средней – при $0,3 < r_s < 0,69$, сильной – при $0,7 < r_s <$
55 $1,0$.

56 Полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность
57 распределения с использованием критериев Шапиро – Уилка и Колмогорова –
58 Смирнова. Данные имеющие нормальное распределение представляли как
59 среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения, в виде
60 $M \pm m$. Статистическую значимость отличий определяли с помощью t-
Russian Journal of Immunology (Russia)

критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок данные представлялись как медиана (Me) и интерквартильный размах (L25; U75). В этом случае для определения статистической значимости использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия в обоих случаях считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Авидин-позитивные тучные клетки обладали зеленой флуоресценцией и преимущественно располагались в области портальных зон печени. Визуальная оценка обнаружила увеличение их количества в печени крыс, получавших водорастворимый кремний в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, особенно за счет клеток со слабой флуоресценцией, которые, вероятно, содержали слабо сульфатированный гепарин. Также отмечалось увеличение числа дегранулированных клеток в печени крыс опытной группы. Подсчитывали среднее количество клеток в области портальных зон печеночной дольки, так в контрольной группе их количество составило $15 \pm 1,41$, а в опытной группе – $17,6 \pm 0,71$ клеток ($p = 0,156$). При этом в контрольной группе 26,7% клеток имели слабую флуоресценцию, в опытной – 31,8%. С помощью функции *цветной куб* определяли медиану площади флуоресцирующих клеток, которая составила 14,66 (5,37; 34,17) и 20,73 (9,5; 48,73) для контрольной и опытной группы соответственно ($p = 0,001$). Площади клеток распределяли с помощью гистограммы на три группы: малые по размеру ($< 38,62 \text{ мкм}^2$), средние ($38,62 - 74,80 \text{ мкм}^2$) и большие ($> 74,80 \text{ мкм}^2$) по размеру. Так, в контрольной группе распределение составило 77, 13 и 10%, а в опытной – 67, 21 и 12%. То есть медиана площади тучных клеток изменялась за счет уменьшения количества клеток малого размера и увеличения количества клеток среднего и большого размера. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции среди малых, средних и больших клеток, так в контрольной группе их интенсивность составила $40,94 \pm 2,88$ у. е., $60,34 \pm 6,54$ у. е. и $79,54 \pm 6,07$ у.е, а в опытной – $78,28 \pm 3,83$ у. е., $118,25 \pm 5,17$ у. е. и $103,21 \pm 4,68$ у. е. соответственно.

Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие прямой сильной

корреляционной связи между площадью клетки и ее интенсивностью в контрольной группе ($r_s = 0,73$; $p < 0,05$) и прямой средней силы корреляционной связи в опытной ($r_s = 0,67$; $p < 0,05$) группе.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что в печени крыс, наряду с увеличением площади авидин-позитивных тучных клеток, происходит увеличение количества гепарина; возрастает количество гепарина в тучных клетках печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной.

Таким образом, можно сделать вывод, что кремний, поступающий с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, приводит к увеличению медианы площади авидин-позитивных тучных клеток в печени, интенсивности их флуоресценции, а также их количества в области портальных зон за счет клеток со слабой флуоресценцией.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Григорьева Евгения Александровна – ассистент кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Название учреждения – ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

Почтовый адрес для переписки: 428015, Чувашская Республика, г.
Чебоксары, Московский пр., 45

Тел.: +79603139995

e-mail: shgrev@yandex.ru

Grigoreva Evgeniia Alexandrovna – Assistant of the Department of Medical Biology with a course of Microbiology and Virology, IN Ulyanov Chuvash State University.

IN Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

428015, Chuvash Republic, Cheboksary, Moskovsky Prospect, 45.

+79603139995

e-mail: shgrev@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Гордова Валентина Сергеевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины медицинского института Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта.

Gordova Valentina Sergeevna – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Fundamental Medicine of the Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University.

Сергеева Валентина Ефремовна – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Sergeeva Valentina Efremovna – Dr. Sci. Biol., Professor, Department of Medical Biology with a course of Microbiology and Virology, IN Ulyanov Chuvash State University.

Смородченко Алина Тихоновна – доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии Медицинской школы Берлина – Университета здоровья и медицины.

Smorodchenko Alina Tikhonovna – Dr. Sci. Med., Professor, Anatomy Department, Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

Смирнова Надежда Владимировна – заведующая кафедрой медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова

Smirnova Nadezhda Vladimirovna – Head of the Department of Medical Biology with a course in Microbiology and Virology of the I.N. Ulyanov Chuvash State University

Блок 3. Метаданные статьи

АВИДИН-ПОЗИТИВНЫЕ ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО КРЕМНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ДЕВЯТИ МЕСЯЦЕВ

AVIDIN-POSITIVE MAST CELLS OF THE LIVER WHEN EXPOSED TO WATER-SOLUBLE SILICON FOR NINE MONTHS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Тучные клетки печени в эксперименте
Liver mast cells in the experiment

Ключевые слова: тучные клетки, авидин-позитивные клетки, кремний, печень, силикаты, гепарин

Keywords: mast cells, avidin-positive cells, silicon, liver, silicates, heparin

Раздел Объединенный иммунологический форум 2024

Количество страниц текста – 4

Количество таблиц – 0

Количество рисунков – 0

Дата поступления: 01.04.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi
1	Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Современные технологии визуализации тучных клеток для биологии и медицины (обзор) // Современные технологии в медицине. – 2021. – Т. 13, № 4. – С. 93–109.	Grigor'ev I.P., Korzhevskii D.E. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). <i>Sovremennye tehnologii v medicine</i> , 2021, Vol. 13, no. 4, pp. 93-107.	https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10
2	Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е. Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературным данными) //	Grigor'eva E.A., Gordova V.S., Sergeeva V.E. The effect of silicon nanoparticles and water-soluble silicates on the liver (comparison of our own research results with literature data). <i>Acta Medica Eurasica</i> , 2022, Vol. 4, pp. 108–120.	https://doi.org/10.47026/2413-4864-2022-4-108-120

	Acta Medica Eurasica. – 2022. – № 4. – С. 108–120.		
3	Количественная оценка сульфатирования тучных клеток / Л. Ю. Ильина, С. П. Сапожников, В. А. Козлов [и др.] // Acta Medica Eurasica. – 2020. – № 2. – С. 43–53.	Il'ina L.Yu., Sapozhnikov S.P., Kozlov V.A., D'yachkova I.M., Gordova V.S. Quantitative evaluation of mast cells sulfation. <i>Acta medica Eurasica</i> , 2020, no. 2, pp. 43–53.	https://acta-medica-eurasica.ru/single/2020/2/6/
4	Кондашевская М.В. Гепарин тучных клеток — новые сведения о старом компоненте (обзор литературы) // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. – №2. – С. 149–158.	Kondashevskaya M.V. Mast Cells Heparin — New Information on the Old Component (Review). <i>Annals of the Russian Academy of Medical Sciences</i> , 2021, Vol. 76, no. 2, pp. 149–158.	https://doi.org/10.15690/vramn1284
5	Тимофеева Н.Н. Методы визуализации тучных клеток (обзор литературы) / Н.Ю. Тимофеева, Н.В. Бубнова, И.С. Стоменская [и др.] // Acta medica Eurasica. – 2023. – № 1. – С. 160–170.	Timofeeva N.Yu., Bubnova N.V., Stomenskaya I.S., Struchko G.Yu., Kostrova O.Yu. Methods of visualization of mast cells (literature review). <i>Acta medica Eurasica</i> , 2023, Vol. 1, pp. 160–170.	https://doi.org/10.47026/2413-4864-2023-1-160-170