

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

Григорьева Е.А.¹, Гордова В.С.², Сергеева В.Е.¹, Смородченко А.Т.³,
Смирнова Н.В.¹

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

² ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

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

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, Германия). 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

Адрес для переписки:

Григорьева Евгения Александровна
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет
имени И.Н. Ульянова»
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары,
Московский пр., 45.
Тел.: 8 (960) 313-99-95.
E-mail: shgrev@yandex.ru

Address for correspondence:

Evgeniia A. Grigoryeva
I.N. Ulyanov Chuvash State University
45 Moskovsky Ave
Cheboksary, Chuvash Republic
428015 Russian Federation
Phone: +7 (960) 313-99-95.
E-mail: shgrev@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Григорьева, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева,
А.Т. Смородченко, Н.В. Смирнова «Авидин-
позитивные тучные клетки печени при воздействии
водорастворимого кремния в течение девяти месяцев»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 2. С. 157-160.
doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

© Григорьева Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Grigoryeva, V.S. Gordova, V.E. Sergeeva,
A.T. Smorodchenko, N.V. Smirnova “Avidin-positive mast
cells of the liver when exposed to water-soluble silicon for
nine months”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 157-160.
doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

© Grigoryeva E.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

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

Grigoryeva E.A.^a, Gordova V.S.^b, Sergeeva V.E.^a, Smorodchenko A.T.^c, Smirnova N.V.^a

^a I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

^b Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^c Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

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 excitation 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

Тучные клетки – многофункциональные клетки, задействованные во многих физиологических и патологических процессах, происходящих в организме [1, 5]. 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 [2]. Окраска толуидиновым синим позволяет оценить степень зрелости гепарина визуально, его количество можно рассчитать только с помощью индекса сульфатированности [3]. В то же время avidin связывается с гепарином и его флуоресценция прямо пропорциональна количеству гепарина в гранулах тучных клеток [1]. Гепарин – гликозаминогликан, являющийся матриксом для обеспечения оптимального расположения, хранения и регуляции экспорта синтезируемых в клетке медиаторов, в отношении которых он проявляет регуляторные свойства. Кроме того,

гепарин, связываясь со многими белками, может препятствовать рекрутированию провоспалительных клеток, адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам сосудов [4]. Таким образом, целью работы явилось изучение реакции avidin-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. Так, в питьевой воде, получаемой животными контрольной группы, содержалось 10 мг/л кремния, а в воде, получаемой опытной группой, – 20 мг/л.

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. Рабочий раствор готовился из готового меченого авидина (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Германия) и 0,1 М фосфатного буфера в соотношении 1:200. Раствор авидина сливался, срезы тщательно промывались в фосфатном буфере. После промывки в фосфатном буфере срезы заключались под покровное стекло в раствор, содержащий фосфатный буфер и глицерин (1:1). Препараты анализировались под люминесцентным микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм [1, 5].

Микрофотографии с полей зрения, полученные при увеличении объектива $\times 40$, обрабатывали в программе AmScore: подсчитывали среднее количество авидин-позитивных клеток, измеряли площадь и интенсивность флуоресценции клеток с помощью функции «цветной куб» в автоматическом режиме.

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

Полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность распределения с использованием критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Данные имеющие нормальное распределение представляли как среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения, в виде $M \pm m$. Статистическую значимость отличий определяли с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок данные представлялись как медиана (Me) и интерквартильный размах ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$). В этом случае для определения статистической значимости использовали U -критерий Манна–Уитни. Различия в обоих случаях считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

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 ($< 38,62$ мкм²), средние (38,62–74,80 мкм²) и большие ($> 74,80$ мкм²) по размеру. Так, в контрольной группе распределение составило 77%, 13% и 10%, а в опытной – 67%, 21% и 12%. Т. е. 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.

Заключение

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.

Список литературы / References

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. [Grigoryev I.P., Korzhevskii D.E. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). *Sovremennyye tehnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2021, Vol. 13, no. 4, pp. 93-107. (In Russ.)]
2. Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е. Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературными данными) // Acta medica Eurasica, 2022. № 4. С. 108-120. [Grigoryeva 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). *Acta Medica Eurasica = Acta Medica Eurasica*, 2022, Vol. 4, pp. 108-120.
3. Ильина Л.Ю., Сапожников С.П., Козлов В.А., Дячкова И.М., Гордова В.С. Количественная оценка сульфатирования тучных клеток // Acta Medica Eurasica, 2020. № 2. С. 43-53. [Ilyina L.Yu., Sapozhnikov S.P., Kozlov V.A., Dyachkova I.M., Gordova V.S. Quantitative evaluation of mast cells sulfation. *Acta medica Eurasica = Acta Medica Eurasica*, 2020, no. 2, pp. 43-53.
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). *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2021, Vol. 76, no. 2, pp. 149-158.
5. Тимофеева Н.Ю., Бубнова Н.В., Стоменская И.С., Стручко Г.Ю., Кострова О.Ю. Методы визуализации тучных клеток (обзор литературы) // 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). *Acta medica Eurasica = Acta Medica Eurasica*, 2023, Vol. 1, pp. 160-170.

Авторы:

Григорьева Е.А. – ассистент кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Гордова В.С. – к.м.н., доцент кафедры фундаментальной медицины медицинского института ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Сергеева В.Е. – д.б.н., профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Смородченко А.Т. – д.м.н., профессор кафедры анатомии, Медицинская школа Берлина – Университет здоровья и медицины, Берлин, Германия

Смирнова Н.В. – заведующая кафедрой медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Authors:

Grigoryeva E.A., Assistant Professor, Department of Medical Biology with a Course of Microbiology and Virology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Gordova V.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Fundamental Medicine of the Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Sergeeva V.E., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Medical Biology with a Course of Microbiology and Virology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Smorodchenko A.T., PhD, MD (Medicine), Professor, Anatomy Department, Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

Smirnova N.V., Head, Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Поступила 01.04.2024

Отправлена на доработку 03.04.2024

Принята к печати 05.04.2024

Received 01.04.2024

Revision received 03.04.2024

Accepted 05.04.2024