

УДК 612.46+572.7:616.6-003.821.001  
ББК 58

Л.Ю. ИЛЬИНА, С.П. САПОЖНИКОВ, В.А. КОЗЛОВ,  
И.М. ДЬЯЧКОВА, В.С. ГОРДОВА

### КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СУЛЬФАТИРОВАНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

**Ключевые слова:** тучные клетки, индекс дегрануляции, индекс сульфатирования, коэффициент согласованности, печень, почка, селезенка, амилоидоз.

Актуальность исследования заключается в разработке нового способа оценки сульфатирования гепарина в тучных клетках (ТК), основанного на расчете двух новых относительных показателей, в отличие от используемого в настоящее время способа представления данных эксперимента в виде результатов прямого подсчета ТК с различными вариантами метахромазии (Гордон Д.С., 1981), являющегося слишком громоздким и сложным для восприятия. Кроме того, известный способ не позволяет получать сопоставимые данные, получаемые на разных видах живых объектов (как животных, так и отдельных органов) вследствие значительных количественных различий числа ТК у разных видов животных и в разных органах животных одного вида.

На основании статистической обработки численного материала ряда ранее опубликованных статей, посвященных изучению тинкториальных свойств ТК в условиях различных экспериментальных воздействий на двух видах животных (лабораторные белые мыши и крысы) разработан способ объективного рангового метода оценки степени сульфатирования ТК. Он заключается в том, что в гистологических препаратах, предварительно окрашенных метахроматичным красителем, связывающимся с гепарином, подсчитывается количество ТК с разной степенью сульфатирования, выявляемой по степени метахромазии. Подсчитанное количество ТК используется для вычисления индекса сульфатирования (ИС) по разработанной авторами формуле:  $ИС = (\alpha \times 0 + \beta_1 \times 1 + \beta_2 \times 2 + \beta_3 \times 3 + \gamma \times 4) / n$ , где  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$  – число  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -,  $\gamma$ -ТК, соответственно;  $n$  – суммарное число проанализированных ТК. ИС является пределом частного от деления суммы нессульфатированных и сульфатированных ТК на сумму всех ТК при обнулении числа нессульфатированных ТК в числителе:  $ИС = \lim_{S \rightarrow 0} (NS \times 0 + S) / (NS + S) = 0$ , где ИС – индекс сульфатирования;  $NS$  – число нессульфатированных ТК;  $S$  – число сульфатированных ТК. Он может меняться в пределах от 0 до 4: чем выше индекс, тем больше степень сульфатирования гепарином. Полученный индекс может использоваться для получения производного коэффициента согласованности (КС) процессов секреции и сульфатирования у ТК (КС) путем получения частного от деления индекса дегрануляции (ИДГ, Линднер и др. (1980)) на индекс сульфатирования по формуле:  $КС = ИДГ / ИС$ , где ИДГ – индекс дегрануляции, ИС – индекс сульфатирования. Значение КС, равное « $1 \pm \sigma$ », означает численное равенство индексов. Это значение КС будет иметь следующий физический и биологический смысл – гранулы секретируют зрелые ТК. В противном случае при  $КС > 1 \pm \sigma$  ТК секретируют незрелый (несульфатированный или не полностью сульфатированный) гепарин и, возможно, находятся под антигенным воздействием. При  $КС < 1 \pm \sigma$ , по-видимому, можно говорить о торможении секреторной активности ТК.

Предложенный метод оценки активности ТК позволяет сопоставить степень зрелости гепарина и выход биологически активных веществ в среду как в каждой отдельной клетке, так и в популяции ТК структуры, органа, ткани вне зависимости от изучаемого органа или группы органов и вида животных.

Цель исследования – обоснование применимости новых расчетных индексов, сопоставимых вне зависимости от вида животных или изучаемых органов, для оценки статуса популяции ТК как в эксперименте, так и в патогистологических и фармакологических исследованиях на людях. Независимая

от вида животных и изучаемого органа объективная оценка влияния лекарственных средств, методов лечения, ксенобиотиков и внешних факторов среды на статус тучных клеток в биоптатах тканей больных при аутопсии и в экспериментальных исследованиях является актуальной задачей. Объективная оценка статуса тучных клеток необходима при разработке антигистаминных и других противоаллергических лекарственных средств, оценке токсичности и аллергогенности лекарственных средств, изделий легкой, пищевой, химической, парфюмерной промышленности, в ряде случаев необходима при выявлении причин заболеваний или смерти.

Тучные клетки в гистологических препаратах, как правило, выявляются с помощью связывания полианионной молекулы гепарина с катионными красителями, такими как толуидиновый синий, а также полихромный метиленовый синий, азуран А, альциановый синий, сафранин О [1, 13]. Поскольку анионность гепарина в тучных клетках зависит от степени его сульфатирования, тинкториальные свойства тучных клеток меняются в зависимости от сульфатирования, что определяет зрелость тучных клеток и позволяет их морфологически типировать [3, 19]. Кроме того, тучные клетки могут быть типированы по степени их дегрануляции. Дегранулированность тучных клеток Д.П. Линднер и др. (1980) предложили оценивать с помощью индекса дегрануляции (ИДГ):

$$\text{ИДГ} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + V \times 2 + \Gamma \times 3}{n},$$

где А – неактивные клетки; В – слабо дегранулирующие клетки; В – клетки с умеренной дегрануляцией; Г – клетки с сильной дегрануляцией;  $n$  – общее число клеток [15].

Поскольку дегранулированность тучных клеток отражает их секреторную активность по степени выделения созревших, насыщенных гепарином гранул в окружающую среду, ИДГ позволяет объективировать насыщенность популяции тучных клеток гепарином. По Д.П. Линднер и др. (1980), тучные клетки, предварительно окрашенные водным раствором толуидинового синего, делят на четыре группы в зависимости от количества гранул и степени их метахромазии: 1-я – очень темные клетки, цитоплазма которых так плотно заполнена метахроматическими гранулами, что становятся неразличимыми ни отдельные гранулы, ни клеточное ядро; 2-я – темные клетки, плотно заполненные метахроматическими гранулами, но различимы отдельные гранулы, а клеточное ядро частично визуализируется; 3-я – светлые клетки, рыхло заполненные хорошо различимыми гранулами с менее интенсивной метахромазией, ядро визуализируется; 4-я – очень светлые клетки с небольшим количеством слабометахроматических гранул и опустошенные клетки с единичными гранулами и со слабой метахромазией цитоплазмы [15].

По степени сульфатирования гепарина Д.С. Гордон (1981) предложила типировать тучные клетки следующим образом:  $\alpha$ -ортохроматические (цитоплазма окрашена в голубой цвет, гепарин несulfатированный),  $\beta_1$ -метахроматические (в цитоплазме гранулы фиолетового цвета с более sulfатированным, незрелым гепарином),  $\beta_2$ -метахроматические (в цитоплазме гранулы фиолетового цвета с красноватым оттенком, гепарин sulfатированный, созревающий),  $\beta_3$ -метахроматические (красно-фиолетовые гранулы с почти зрелым sulfатированным гепарином) и  $\gamma$ -метахроматические (пурпурные гранулы с полностью sulfатированным, зрелым гепарином). Данный способ, позволяющий полу-

чить объективные данные, тем не менее, неудобен, поскольку при его реализации получаются громоздкие трудночитаемые таблицы, что является недостатком способа. К другим недостаткам можно отнести сложности статистической обработки полученного материала в тех случаях, когда тучных клеток мало, они представлены одной или двумя метахроматическими группами. Нулевые значения в группах сравнения не позволяют применить некоторые статистические методы анализа, особенно многомерной статистики, поскольку присутствие в матрице даже одного нулевого значения обнуляет всю матрицу. Также возникают сложности при сопоставлении данных, полученных от разных видов животных, в связи с тем, что в зависимости от видовой принадлежности встречается иногда очень разное количество тучных клеток в тех или иных органах. Более того, разные красители, применяемые для выявления тучных клеток в тканях, могут давать визуально различающиеся результаты, что вносит дополнительную ошибку в интерпретацию результатов.

**Материалы и методы исследования.** Для проверки информативности предложенного индекса были выбраны два вида животных – белые лабораторные беспородные мыши и крысы. Объектом исследования были печень, селезенка и левая почка 9 белых мышей самцов в возрасте 2 месяцев массой 21,0–25,0 г, а также тимус 45 половозрелых крыс самцов массой 150,0–160,0 г. Мыши были разделены на две группы: интактную, в которой животные находились на обычном содержании вивария, имели свободный доступ к воде и пище, и мыши, которым моделировали амилоидоз ранее описанным методом с помощью парентерального введения водного раствора соевого заменителя сливок [9]. Крысы были разделены на интактную (группа грызунов получала *ad libitum* стандартизованную питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02.) и две опытные группы: первая группа получала *ad libitum* ту же питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02 с добавлением химически чистого девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний), и вторая группа получала кремний (с добавлением хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в пересчете на кальций). Различные формы тучных клеток по степени метахромазии и степени дегрануляции подсчитывали в капсуле и паренхиме органов в каждом препарате при иммерсионном увеличении в десяти полях зрения. Индекс дегрануляции рассчитывали по формуле клеток Д.П. Линднера и др. (1980), индекс сульфатирования тучных клеток и коэффициент согласованности (КС) секреторной активности тучных клеток со степенью сульфатирования гепарина – по предложенным нами формулам.

Кроме того, для расчета тех же индексов и КС использован статистически обработанный численный материал ранее опубликованных статей ряда авторов [5, 10–12, 14, 16–18, 20], в которых были представлены результаты изучения тинкториальных свойств тучных клеток в условиях различных экспериментальных воздействий на двух видах животных (лабораторные белые мыши и крысы).

Способ оценки сульфатирования гепарина в тучных клетках, разработанный Д.С. Гордон (1981) нами был формализован по аналогии с вычислением индекса дегрануляции Д.П. Линднера и др. (1980). При этом подсчитанное по способу Д.С. Гордон количество тучных клеток, предварительно выяв-

ленных с помощью метахроматического красителя, используется для вычисления рангового индекса сульфатирования (ИС) по формуле

$$ИС = \frac{\alpha \times 0 + \beta_1 \times 1 + \beta_2 \times 2 + \beta_3 \times 3 + \gamma \times 4}{n},$$

где  $\alpha$  – число  $\alpha$ -ортохроматических тучных клеток;  $\beta_1$  – число  $\beta_1$ -метахроматические тучных клеток;  $\beta_2$  – число  $\beta_2$ -метахроматических тучных клеток;  $\beta_3$  – число  $\beta_3$ -метахроматических тучных клеток;  $\gamma$  – число  $\gamma$ -метахроматических тучных клеток;  $n$  – суммарное число проанализированных тучных клеток.

То есть идеология построения этой формулы близка к идеологии построения формулы Д.П. Линднера и др. (1980), но применяется для достижения другого технического результата – вычисления индекса сульфатирования гепарина, а не индекса дегрануляции тучных клеток. Соответственно, предлагаемая нами формула оценивает зрелость тучных клеток, тогда как формула Д.П. Линднера оценивает функциональную активность тучных клеток. Вычисляемый индекс сульфатирования может меняться в пределах от 0 до 4: чем выше индекс, тем больше степень сульфатирования гепарином. Значение «0» индекс будет принимать в том случае, если тучных клеток с сульфатированным гепарином в препарате нет. Значение «4» – если все тучные клетки содержат сульфатированный  $\gamma$ -метахроматический гепарин. Значения в интервале от 0 до 4 будут соответствовать степени сульфатированности гепарина тучных клеток в препарате в целом.

Введение в формулу нулевого множителя при количестве  $\alpha$ -ортохроматических тучных клеток оправдано тем, что в этом случае увеличивается различие между сравниваемыми группами (табл. 1).

Таблица 1

**Зависимость величины различий сравниваемых групп по количеству разных форм тучных клеток в зависимости от множителя при количестве  $\alpha$ -ортохроматических тучных клеток**

Тип тучных клеток и множитель при количестве $\alpha$ -ортохроматических тучных клеток	Капсула почки, Zn		Капсула почки, Cu					
	контроль	опыт	контроль	опыт				
Множитель при количестве $\alpha$ -ортохроматических тучных клеток	0	1	0	1	0	1	0	1
$\alpha$ -ортохроматические тучные клетки	0	0	0	0	0	15	0	14
$\beta_1$ -метахроматические тучные клетки	22	43	12	24	26	52	11	22
$\beta_2$ -метахроматические тучные клетки	157	235	127	190	72	109	63	95
$\beta_3$ -метахроматические тучные клетки	0	0	74	98	40	93	132	176
$\gamma$ -метахроматические тучные клетки	2	3	2	3	1	3	2	3

Табл. 1 содержит результат пересчета данных, полученных на крысах, В.А. Козлова и О.С. Бусовой [10, 11] в хроническом эксперименте с водным потреблением избытка двухвалентной меди в концентрации 50 мг/л. Из данных табл. 1 явным образом следует, что если количество  $\alpha$ -ортохроматических тучных клеток умножить на 1, то это уменьшает различия между опытом и контролем, особенно там, где их реальное количество отлично от нуля, что может искусственно увеличивать ошибку первого рода. Поэтому в формулу более рационально при аргументе « $\alpha$ -ортохроматические тучные клетки» ввести множитель «0», уничтожающий абсолютные значения нессульфатированных клеток. В знаменателе, тем не менее, количество нессульфатированных тучных клеток

учитывается, поскольку это позволяет оценить долю сульфатированных клеток в формировании индекса сульфатирования.

Поскольку в знаменателе учитывается число всех тучных клеток – и сульфатированных и несulfатированных, возможно группирование полученных данных в разных группах в области медианных значений, характерных для данной группы, т.е. ранжирование подопытных групп по интервалам, критически различающимся минимумом и экстремумом. Индекс сульфатирования будет стремиться к значению «0», чем больше несulfатированных тучных клеток. Таким образом, индекс сульфатированных тучных клеток можно выразить как предел частного от деления суммы несulfатированных и сульфатированных клеток на сумму всех тучных клеток при обнулении числа несulfатированных клеток в числителе:

$$ИС = \lim_{S \rightarrow 0} \frac{(NS \times 0 + S)}{(NS + S)} = 0,$$

где ИС – индекс сульфатирования; NS – число несulfатированных тучных клеток; S – число сульфатированных тучных клеток.

Поскольку полученный нами ИС представляет собой безразмерное число, меняющееся в интервале от 0 до 4, его допустимо считать ранговым критерием. Данное обстоятельство позволяет использовать данный индекс как статистическую величину при обработке результатов исследований непараметрическими методами вычислительной статистики.

Поскольку при вычислении ИДГ и ИС объект подсчета один и тот же – тучные клетки, группируемые в первом случае по морфологическим свойствам, а во втором – по тинкториальным, для описания статуса тучных клеток допустимо введение дополнительной статистической величины – коэффициента согласованности секреторной активности тучных клеток со степенью сульфатирования гепарина (КС):

$$КС = \frac{ИДГ}{ИС},$$

где ИДГ – индекс дегрануляции; ИС – индекс сульфатирования.

Физический и биологический смысл КС можно интерпретировать следующим образом. Как следует из описанных выше свойств этих индексов, значение  $КС = 1 \pm \sigma$  означает численное равенство индексов, т.е. гранулы секретируют зрелые тучные клетки. В противном случае ( $КС > 1 \pm \sigma$ ) тучные клетки секретируют незрелый (несulfатированный или не полностью сульфатированный) гепарин и, возможно, находятся под антигенным воздействием. При  $КС < 1 \pm \sigma$  можно говорить о торможении секреторной активности тучных клеток. Очевидно, что КС является непрерывной величиной.

*Методы статистического анализа.* Для обоснования применимости новых расчетных показателей статуса тучных клеток численный материал обработан методами вариативной и дескриптивной статистики. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – средняя,  $SD$  – стандартное отклонение. Различия средних величин определены с помощью z-теста.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Информативность предложенного индекса была оценена как на новых данных, полученных в эксперименте, так и на материале ранее опубликованных статей. При анализе данных литературы были суммированы количественные показатели тучных клеток у интактных мышей (всего 70 наблюдений) и крыс (40 наблюдений).

У мышей индекс дегрануляции составил  $1,42 \pm 0,62$ . Коэффициент вариации этой выборки –  $43,31 \pm 0,22\%$ , асимметрия –  $-1,16 \pm 0,75$ , коэффициент эксцесса –  $-0,55 \pm 1,48$ . Из полученного результата следует, что вариабельность данной выборки значительная.

У крыс индекс дегрануляции составил  $0,75 \pm 0,25$ . Коэффициент вариации этой выборки –  $32,92 \pm 0,08\%$ , асимметрия  $0,35 \pm 0,75$ , коэффициент эксцесса –  $-1,74 \pm 1,4$ . То есть, как и в группе мышей, вариабельность этой выборки высокая.

Индекс сульфатирования у мышей получился равным  $1,33 \pm 0,29$ , коэффициент вариации –  $22,11 \pm 0,11\%$ , асимметрия –  $1,15 \pm 0,79$ , коэффициент эксцесса –  $-1,51 \pm 1,59$ , – вариабельность высокая. Соответственно,  $КС = 0,31 \pm 0,11$ , коэффициент вариации –  $34,65 \pm 0,08$ .

Индекс сульфатирования у крыс –  $2,15 \pm 0,86$ , коэффициент вариации –  $39,8 \pm 0,38\%$ , асимметрия –  $-0,65 \pm 0,91$ , коэффициент эксцесса –  $-2,13 \pm 2,0$ , – вариабельность также высокая.  $КС = 0,37 \pm 0,05$ , коэффициент вариации –  $12,86 \pm 0,03$ , вариабельность средняя.

Результат статистического анализа данных литературы нами был поверен анализом результатов недавно завершеного эксперимента. В табл. 2 представлены результаты расчета исследуемых индексов на основании материала изучения интактных мышей. Во всех случаях коэффициент вариации оказался менее 10%.

Таблица 2

Индекс дегрануляции (ИД) и индекс сульфатирования (ИС)  
тучных клеток в паренхиматозных органах интактных мышей

Индекс	Селезенка		Печень		Почка	
	капсула	паренхима	капсула	паренхима	капсула	паренхима
ИД	$0,02 \pm 0,02$	0	$0,44 \pm 0,29$	$0,38 \pm 0,19$	$0,90 \pm 0,11$	$0,58 \pm 0,09$
ИС	$0,02 \pm 0,02$	0	$0,44 \pm 0,29$	$0,57 \pm 0,2$	$1,15 \pm 0,16$	$0,52 \pm 0,08$
КС	1,0	0	1,0	0,67	0,78	1,12

Как видим, у интактных животных ИД и ИС количественно совпадают, они аутентичны аналогам в капсулах селезенки и печени и различаются в пределах стандартной ошибки аналогичных индексов в остальных объектах исследования.

В популяции тучных клеток селезенки мышей с экспериментальным амилоидозом по сравнению с ТК интактных мышей зафиксировано увеличение степени дегрануляции и степени зрелости гепарина во всех органах [6–8]. Отмечается совпадение значений ИД и ИС в большинстве органов (табл. 3). То есть предлагаемый нами индекс позволяет соотнести секреторную активность тучных клеток со степенью зрелости гепарина, содержащегося в секреторируемых гранулах. Данный результат является дополнительным неожиданным свойством предлагаемого индекса.

Таблица 3

Индекс дегрануляции (ИД) и индекс сульфатирования (ИС) тучных клеток  
в паренхиматозных органах мышей с экспериментальным амилоидозом

Индекс	Селезенка		Печень		Почка	
	капсула	паренхима	капсула	паренхима	капсула	паренхима
ИД	$0,08 \pm 0,08$ $P = 0,488$	$1,99 \pm 0,34$ $P = 0,004$	$0,22 \pm 0,22$ $P = 0,578$	$0,39 \pm 0,20$ $P = 0,963$	$1,12 \pm 0,20$ $P = 0,389$	$0,15 \pm 0,1$ $P = 0,03$
ИС	$0,08 \pm 0,08$ $P = 0,488$	$1,99 \pm 0,34$ $P = 0,004$	$0,22 \pm 0,22$ $P = 0,578$	$0,39 \pm 0,20$ $P = 0,542$	$1,35 \pm 0,21$ $P = 0,503$	$0,15 \pm 0,1$ $P = 0,04$
КС	1,0	1,0	1,0	1,0	0,83	1,0



В другом эксперименте объектом исследования были тучные клетки тимуса сорока пяти половозрелых крыс самцов. Как видим, произошло значительное изменение расчетных индексов по сравнению с аналогами у интактных животных (табл. 4).

Таблица 4

Индекс дегрануляции (ИД) и индекс сульфатирования (ИС) тучных клеток в тимусе крыс при употреблении с водой кальция и кремния

Индекс	Интактные		Кремний		Кальций	
	капсула	паренхима	капсула	паренхима	капсула	паренхима
ИД	0,71±0,87	1,13±1,27	1,75±0,91 <i>P</i> = 0,149	0,91±1,04 <i>P</i> = 0,382	1,38±1,13 <i>P</i> = 0,804	1,44±0,34 <i>P</i> = 0,649
ИС	1,61±0,16	1,42±0,48	1,73±0,65 <i>P</i> = 0,721	1,24±0,87 <i>P</i> = 0,731	1,82±0,54 <i>P</i> = 0,476	1,46±0,62 <i>P</i> = 0,912
КС	0,44	0,8	1,01	0,73	0,76	0,99

У крыс, употреблявших с водой кремний, отмечается повышение степени зрелости гепарина и степени дегрануляции ТК в капсуле органа по сравнению с таковыми у интактных крыс и снижение этих же показателей в паренхиме органа. У крыс, употреблявших кальций с водой, степень зрелости гепарина и степень дегрануляции ТК как в капсуле, так и в паренхиме выше тех же показателей у интактных животных. Приведенные в виде ИД и ИС данные соответствуют выводам, опубликованным в наших ранних работах [2, 4, 6–8].

Несомненным достоинством индексирования степени сульфатирования гепарина тучных клеток является то, что групповой экспериментальный результат может быть представлен в виде единственного числа, объективного отражающего зрелость гепарина в исследуемой популяции, не зависящего от количества тучных клеток в срезах, индивидуальных либо видовых различий количества тучных клеток, тинкториальных свойств красителя и т.п.

Во всех приведенных примерах независимо от условий эксперимента и вида животных получены численно сопоставимые результаты оценки степени сульфатирования гепарина, значения которых, несмотря на различия вычислительных формул, нередко совпадают.

Кроме того, расчет этих индексов, возможно, позволяет оценить состояние интактной группы животных. Кажется очевидным, что у интактных животных КС должен быть близок к значению «1», как мы это видим в данных табл. 2, поскольку это должно означать, что животные не испытывают антигенного воздействия на популяцию тучных клеток. Однако в эксперименте над крысами и при анализе данных литературы получены значительно вариабельные результаты, сильно отличающиеся от «1». Как известно, существует значительная вариабельность морфофизиологического статуса лабораторных животных, которая до сегодняшнего дня не может быть оценена наглядно. Возможно, что такой оценкой является расчет ИС и КС, результат которого позволяет предположить, была ли группа животных, отобранных в эксперимент, здоровой или кроме экспериментального воздействия животные находились под влиянием каких-либо других факторов, возможно связанных с дефектами содержания в виварии, вырождения в связи с инбридингом и т.п.

Предложенные индексы представляются весьма интересной статистической величиной, но для ее дальнейшего практического применения требуется значительный объем работ по физиологическому нормированию.

Таким образом, предложенный метод оценки активности тучных клеток позволяет сопоставить степень зрелости гепарина и выход биологически активных веществ в среду как в каждой отдельной клетке, так и в популяции ТК структуры, органа, ткани вне зависимости от изучаемого органа или группы органов и вида животных.

#### Литература

1. *Артишевский А.А., Леонтьев А.С., Слук Б.А.* Гистология с техникой гистологических исследований. Минск: Высш. шк., 1999. 236 с.
2. *Гордова В. С., Дьячкова И. М., Сергеева В. Е., Ефейкина Н. Б., Московская О. И.* Реакция тучных клеток на поступление химических элементов с питьевой водой // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. URL: [www.science-education.ru/](http://www.science-education.ru/) 128-21918.
3. *Гордон Д.С.* Тинкториальные параллели тучных клеток. Макро-микроструктура тканей в норме, патологии и эксперименте. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та. 1981. С. 97–101.
4. *Дьячкова И.М., Гордова В.С., Сергеева В.Е., Сапожников С.П.* Некоторые адаптационные реакции тимуса на поступление кальция и кремния с питьевой водой. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та. 2014. 140 с.
5. *Дьячкова И.М., Сергеева В.Е., Сапожников С.П.* Исследование популяции тучных клеток тимуса при длительном воздействии кремния и кальция // Вестник Чувашского государственного педагогического университета им. И.Я. Яковлева. 2010. № 4(68). С. 50–55.
6. *Ильина Л.Ю., Ефейкина Н.Б.* Состояние популяции тучных клеток почек белых мышей при экспериментальном амилоидозе [Электронный ресурс] // Acta Medica Eurasica. 2018. № 2. С. 50–60. URL: [http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2018/06/AME\\_2018\\_2\\_str\\_-50\\_60.pdf](http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2018/06/AME_2018_2_str_-50_60.pdf).
7. *Ильина Л.Ю., Козлов В.А., Сапожников С.П.* Реакция тучных клеток печени мышей на экспериментальный амилоидоз [Электронный ресурс] // Acta Medica Eurasica. 2019. № 1. С. 33–43. URL: [http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2015/07/AME\\_2019\\_1\\_s.33-43.pdf](http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2015/07/AME_2019_1_s.33-43.pdf).
8. *Ильина Л.Ю., Козлов В.А., Сапожников С.П.* Тучные клетки печени мышей при экспериментальном амилоидозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 168, № 7. С. 17–20. DOI: 10.1007/s10517-019-04635-5.
9. *Козлов В. А., Сапожников С.П., Карышев П.Б.* Модель системного амилоидоза у молодых мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 162, № 10. С. 523–527. DOI: 10.1007/s10517-017-3652-у.
10. *Козлов В.А., Бусова О.С.* Миграция тучных клеток в почке // Вестник Чувашского государственного педагогического университета им. И.Я. Яковлева. 2010. № 1(65). С. 40–45.
11. *Козлов В.А., Бусова О.С.* Тучноклеточная популяция почки и почечной капсулы. М.: ОАО Щербинская типография, 2009. 104 с.
12. *Козлов В.А., Глазырина О.С., Толмачева А.Ю.* Водная депривация влияет на экстракраниальный медиаторный пул почек белых крыс и почечную популяцию тучных клеток // Нефрология. 2003. Т. 7, № 2. С. 76–81.
13. *Кондашевская М.В.* Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах // Вестник РАМН. 2010. № 6. С. 49–54.
14. *Кострова О.Ю., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н., Москвичев Е.В.* Тучные клетки тимуса на фоне развития аденокарциномы толстой кишки // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2. С. 43.
15. *Линднер Д.П., Поберин И.А., Розкин М.Я., Ефимов В.С.* Морфометрический анализ популяции тучных клеток // Архив патологии. 1980. № 6. С. 60–64.
16. *Любовцева Л.А., Голубцова Н.Н., Гурьянова Е.А., Московский А.В., Агацкин С.А., Любовцева Е.В.* Количественный анализ гранулярных люминесцирующих и тучных клеток в органах иммунной и неиммунной систем // International Journal on Immunorehabilitation. 2000. Т. 2, № 2. С. 53.
17. *Наумова Е.М., Сергеева В.Е.* Гистохимический анализ популяции тучных клеток тимуса мышей при введении АКГГ1-24 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137, № 7. С. 107–110.
18. *Стручко Г.Ю.* Участие тучных клеток в ранней фазе иммунного ответа тимуса на введение растворимого антигена // Иммунология. 1997. Т. 18, № 6. С. 55–56.
19. *Юрина Н.А., Радостина А.И.* Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани. М.: Изд-во УДН, 1990. 398 с.
20. *Ялалетдинова Л.Р., Гордова В.С., Ястребова С.А., Сергеева В.Е.* Нейроиммунотулирующие свойства хорионического гонадотропина. Чебоксары. Изд-во Чуваш. ун-та, 2016. 148 с.



ИЛЬИНА ЛИЛИЯ ЮРЬЕВНА – старший преподаватель кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (lileaseae@rambler.ru).

САПОЖНИКОВ СЕРГЕЙ ПАВЛОВИЧ – доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (adaptogon@mail.ru).

КОЗЛОВ ВАДИМ АВЕНИРОВИЧ – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (rooh12@yandex.ru).

ДЬЯЧКОВА ИРАИДА МИХАЙЛОВНА – кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (iraida-djachkova@rambler.ru).

ГОРДОВА ВАЛЕНТИНА СЕРГЕЕВНА – кандидат биологических наук, доцент кафедры фундаментальной медицины, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Россия, Калининград (crataegi@rambler.ru).

Liliya Yu. ILYINA, Sergey P. SAPOZHNIKOV, Vadim A. KOZLOV,  
Iraida M. DYACHKOVA, Valentina S. GORDOVA

#### QUANTITATIVE EVALUATION OF MAST CELLS SULFATION

**Key words:** mast cells, degranulation index, sulfation index, consistency coefficient, liver, kidney, spleen, amyloidosis.

The relevance of the study is to develop a new method for evaluating heparin sulfation in mast cells (MCs), based on the calculation of two new relative indicators, in contrast to the currently used method of presenting experimental data in the form of results of MCs direct calculation with various metachromasy variants (Gordon D. S., 1981), which is too cumbersome and difficult to perceive. In addition, the well-known method does not allow to get comparable data obtained on different types of living objects (both animals and individual organs) due to significant quantitative differences in the number of MCs in different species of animals and in different organs of animals of the same species.

Based on statistical processing of numerical material contained in a number of previously published articles devoted to the study of MCs tinctorial properties under various experimental effects on two types of animals (laboratory white mice and rats), a method for an objective ranking method for evaluating the degree of MCs sulfation has been developed. It consists in the fact that in histological preparations pre-stained with a metachromatic dye that binds to heparin, the number of MCs with different degrees of sulfation is calculated by the degree of sulfation detected by the degree of metachromasia. The calculated number of MCs is used to calculate the sulfation index (SI) according to the formula developed by the authors:  $SI = (\alpha \times 0 + \beta_1 \times 1 + \beta_2 \times 2 + \beta_3 \times 3 + \gamma \times 4) / n$ ; where  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$  – the number of  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -,  $\gamma$ -MC, respectively;  $n$  – the total number of analyzed MCs. SI is the limit of the quotient obtained by dividing of the sum of non-sulfated and sulfated MCs by the sum of all MCs when setting to zero the number of non-sulfated MCs in the numerator:  $SI = \lim_{S \rightarrow 0} (NS \times 0 + S) / (NS + S) = 0$ , where SI is sulfation index; NS – the number of non-sulfated MCs; S – the number of sulfated MCs. It can vary from 0 to 4: the higher the index, the greater is the degree of heparin sulfation. The resulting index can be used to obtain a derivative of consistency coefficient for secretion and sulfation processes in MCs (CS) by obtaining a quotient of the degranulation index (IDG, Lindner et al. (1980)) by the sulfation index according to the formula:  $CS = IDG / SI$ , where IDG is the degranulation index, SI is the sulfation index. A CS value equal to "1±σ" indicates numerical equality of the indexes. This CS value will have the following physical and biological meaning – the granules secrete mature MCs. Otherwise, at  $CS > 1 \pm \sigma$  MCs secrete immature (non-sulfated or not fully sulfated) heparin and may be under antigenic influence. At  $CS < 1 \pm \sigma$ , it seems that we can talk about inhibition of secretory activity in MCs.

The proposed method of evaluating the activity of MCs makes it possible to compare the degree of heparin maturity and the discharge of biologically active substances into the environment both in each individual cell and in MCs population in a structure, an organ, tissue, regardless of the organ under study or a group of organs and animal species.

## References

1. Artishevskii A.A., Leontyuk A.S., Sluka B.A. *Gistologiya s tekhnikoi gistologicheskikh isledovaniy* [Histology with histological research techniques]. Minsk, Vysshaya Shkola Publ., 1999, 236 p.
2. Gordon D.S. *Tinktorial'nye paralleli tuchnykh kletok. Makro-mikrostruktura tkanei v norme, patologii i eksperimente* [Tinctorial Parallels of mast cells. Macro-microstructure of tissues in norm, pathology and experiment]. Cheboksary, Chuvash State Univesity Publ., 1981, pp. 97–101.
3. Gordova V.S., D'yachkova I.M., Sergeeva V.E., Efeikina N.B., Moskovskaya O.I. *Reaktsiya tuchnykh kletok na postuplenie khimicheskikh elementov s pit'evoi vodi* [The reaction of mast cells to the receipt of chemical elements with drinking water]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2015, no. 5. URL: [www.scince-tbucation.ru/128-21918](http://www.scince-tbucation.ru/128-21918)
4. D'yachkova I.M., Gordova V.S., Sergeeva V.E., Sapozhnikov S.P. *Nekotorye adaptatsionnye reaktsii timusa na postuplenie kal'tsiya i kremniya s pit'evoi vodi* [Some adaptive reactions of the thymus to the intake of calcium and silicon with drinking water]. Cheboksary, Chuvash State Univesity Publ., 2014, 140 p.
5. D'yachkova I.M., Sergeeva V.E., Sapozhnikov S.P. *Issledovanie populyatsii tuchnykh kletok timusa pri dlitel'nom vozdeistvii kremniya i kal'tsiya* [Study of the population of thymus mast cells under prolonged exposure to silicon and calcium] *Vestnik Chuvashskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. I.Ya. Yakovleva*, 2010, no. 4(68), pp. 50–55.
6. Il'ina L.Yu., Efeikina N.B. *Sostoyanie populyatsii tuchnykh kletok pochek belykh myshei pri eksperimental'nom amiloidoze* [State of the population of white mouse kidney mast cells in experimental amyloidosis]. *Acta Medic Eurasica*, 2018, no. 2, pp. 50–60. Available at: [http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2018/06/AME\\_2018\\_2\\_str.-50\\_60.pdf](http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2018/06/AME_2018_2_str.-50_60.pdf).
7. Il'ina L.Yu., Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. *Reaktsiya tuchnykh kletok pecheni myshei na eksperimental'nyi amiloidoz* [Reaction of fat cells to the liver of mice experimental amyloidosis]. *Acta Medic Eurasica*, 2019, no. 1, pp. 33–43. Available at: [http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2015/07/AME\\_2019\\_1\\_s.33-43.pdf](http://acta-medica-eurasica.ru/wp-content/uploads/2015/07/AME_2019_1_s.33-43.pdf).
8. Il'ina L.Yu., Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. *Tuchnye kletki pecheni myshei pri eksperimental'nom amiloidoze* [Mast cells in the liver of mice with experimental amyloidosis]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2019, vol. 168, no. 7, pp. 17-20. DOI: 10.1007/s10517-019-04635-5.
9. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B. *Model' sistemnogo amiloidoza u molodykh myshei* [Model of systemic amyloidosis in young mice]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2016, vol. 162, no. 10, pp. 523–527. DOI: 10.1007/s10517-017-3652-y.
10. Kozlov V.A., Busova O.S. *Migratsiya tuchnykh kletok v pochke* [Migration of mast cells in the kidney]. *Vestnik Chuvashskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. I.Ya. Yakovleva*, 2010, no. 1(65), pp. 40–45.
11. Kozlov V.A., Busova O.S. *Tuchnokletochnaya populyatsiya pochki i pochechnoi kapsuly* [Mast cell population of the kidney and renal capsule]. Moscow, Shcherbinskaya tipografiya, 2009, 104 p.
12. Kozlov V.A., Glazyrina O.S., Tolmacheva A.Yu. *Vodnaya deprivatsiya vliyaet na ekstraneironal'nyi mediatorny pul pochek belykh krysi i pochechnuyu populyatsiyu tuchnykh kletok* [Water deprivation affects extraneuronal mediator pool of the kidneys of white rats and of renal population fat cells]. *Nefrologiya*, 2003, vol. 7, no. 2, pp. 76–81.
13. Kondashevskaya M.V. *Tuchnye kletki i geparin – klyuchevye zven'ya v adaptivnykh i patologicheskikh protsessakh* [Mast cells and heparin are key links in adaptive and pathological processes]. *Vestnik RAMN*, 2010, no. 6, pp. 49–54.
14. Kostrova O.Yu., Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Mikhailova M.N., Moskvichev E.V. *Tuchnye kletki timusa na fone razvitiya adenokartsinomy tolstoi kishki* [Thymus mast cells against the background of colon adenocarcinoma development]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2013, no. 2, p. 43.
15. Lindner D.P., Poberin I.A., Rozkin M.Ya., Efimov V.S. *Morfometricheskii analiz populyatsii tuchnykh kletok* [Morphometric analysis of the mast cell population]. *Arkhiv patologii*, 1980, no. 6, pp. 60–64.
16. Lyubovtseva L.A., Golubtsova N.N., Gur'yanova E.A., Moskovskii A.V., Agatskin S.A., Lyubovtseva E.V. *Kolichestvennyi analiz granulyarnykh lyuminesiruyushchikh i tuchnykh kletok v organakh immunnoi i neimmunnoi sistem* [Quantitative analysis of granular luminescent and mast cells in the immune and non-immune systems] *International Journal on Immunorehabilitation*. 2000, vol. 2, no. 2, p. 53.
17. Naumova E.M., Sergeeva V.E. *Gistokhimicheskii analiz populyatsii tuchnykh kletok timusa myshei pri vvedenii AKTG1-24* [Histochemical analysis of the population of mouse thymus mast cells with the introduction of ACTH1-2]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2004, vol. 137, no. 7, pp. 107–110.

18. Struchko G.Yu. *Uchastie tuchnykh kletok v rannei faze immunnogo otveta timusa na vvedenie rastvorimogo antigena* [Participation of mast cells in the early phase of the thymus immune response to the introduction of a soluble antigen]. *Immunologiya*, 1997, vol. 18, no. 6, pp. 55–56.

19. Yurina N.A., Radostina A.I. *Morfofunktsional'naya geterogennost' i vzaimodeistvie kletok soedinite'noi tkani* [Morphological and functional heterogeneity and interaction of connective tissue cells]. Moscow, 1990, 398 p.

20. Yalaletdinova L.R., Gordova V.S., Yastrebova S.A., Sergeeva V.E. *Neuroimmunomoduliruyushchie svoistva khorionicheskogo gonadotropina* [Neuroimmunomodulatory properties of human chorionic gonadotropin]. Cheboksary, Chuvash State Univesity Publ., 2016, 148 p.

---

**LILIYA Yu. ILYINA** – Senior Lecturer, Department of Medical Biology with a course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (lileaceae@rambler.ru).

**SERGEY P. SAPOZHNIKOV** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (adaptogon@mail.ru).

**VADIM A. KOZLOV** – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (pooh12@yandex.ru).

**IRAIDA M. DYACHKOVA** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (iraida-djachkova@rambler.ru).

**VALENTINA S. GORDOVA** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Fundamental Medicine, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia, Kaliningrad (crataegi@rambler.ru).

---