

# Морфофункціональний стан тучних клітин при гіпергепаринемії у щурів

С.Г. Котюжинська, А.І. Гоженко, Д.О. Уманський

Одеський національний медичний університет; e-mail: sveta67kot@mail.ru

*Виявлено чіткий взаємозв'язок функціонального стану тканинних базофілів і вмістом гепарину в плазмі крові при експериментальній гіперліпідемії у щурів. Показано, що тривале ліпідне навантаження призводить до підвищення секреторної активності тканинних базофілів у 1,27 раза та збільшення їх кількості. Доведена здатність тучних клітин депонувати гепарин при надлишковому його надходженні до організму, про що свідчило збільшення кількості клітин з високим ступенем насичення ( $59,16 \pm 3,42$  щодо  $33,54 \pm 3,27$  %) з одночасним зниженням кількості клітин з помірним ступенем (на  $40,63$  %) при паралельному збільшенні індексу насичення ( $3,54 \pm 0,62$  щодо  $1,94 \pm 0,54$  ум. од.) щодо контрольної групи.*

*Ключові слова: тучні клітини; гепарин; експериментальна гіперліпідемія.*

## ВСТУП

Тучні клітини є однією з ключових ланок, яка регулює метаболічні зміни при різних формах адаптації та патологічних процесах [1,2]. Відомо, що мастоцити активно залучаються до захисно-приспосувальної функції при запаленні, будучи джерелом низки їх медіаторів (гістаміну, нейтральних протеаз, простагландинів, лейкотрієнів), вони здатні ініціювати і підтримувати запальні реакції [3–5].

При вивченні впливу стресогенного компоненту на стан популяції тканинних базофілів у щурів показано, що абсолютне число тучних клітин не змінювалося, тоді як, індекс дегрануляції вірогідно зростав у групі експериментальних тварин порівняно з контролем [6–8]. Таким чином, зміна цитофізіологічного стану мастоцитів являє собою неспецифічну відповідь периферичного відділу багатьох функціональних систем, задіяних в адаптивних процесах. Відомо, що активовані тучні клітини, виділяючи велику кількість медіаторів, зокрема гепарин, сприяють гідролізу ліпопротеїнів низької

щільності та утворенню колагену, можуть мати вагоме значення в розвитку атеросклерозу [9,10]. Нині дослідники все частіше висловлюють думку, що при запальних та алергічних реакціях, при регенерації і новоутвореннях, а також інших патологічних процесах, значно змінюються фенотип і функції популяції тучних клітин [11–13].

У нормі повністю дегранульовані мастоцити залишаються життєздатними і через деякий час відновлюють пул медіаторів, тоді як при патології різного генезу спостерігається зниження кількості тканинних базофілів, їх дегрануляції, а у важких випадках – заміщення нормальної популяції цих клітин незрілими лаброцитами з абсолютно іншими цитофізіологічними ознаками [1,4,14]. Причини зміни фенотипу і подальших відмінностей функціонування тучних клітин при фізіологічних і патогенетичних процесах поки не встановлені.

Гепарин – ключовий компонент гранул мастоцитів, визнаний головним гуморальним агентом у підтримці властивостей реології крові, в модуляції клітинних відповідей при запальних та імунних процесах, але

дуже мало уваги приділяється його ролі в адаптивних і патологічних реакціях організму та його впливу на мастоцити [15,16].

Мета нашої роботи – вивчення морфофункціонального стану тучних клітин у тварин при експериментальній гіперліпідемії на тлі гіпергепаринемії.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 50 білих статевозрілих щурах-самцях (3–4 міс) масою 200–230 г. Для вивчення функціонального стану тучних клітин було відтворено експериментальну модель гіперліпідемії (1-ша група, n=25), де тваринам одноразово щодобово, протягом 21 доби вводили внутрішньощлунково атерогенну харчову суміш, яка містила 30 % соняшникової олії, 2,5 % холестерину і 0,12 % метилурацилу (з розрахунку 1 мл жирового навантаження на 100 г маси тіла) [17]. Тваринам 2-ї групи (n=25) на тлі гіперліпідемії, моделюючи штучну гіпергепаринемію, тривало вводили (21 добу) водний розчин гепарину («Біолік», Україна), внутрішньом'язово, в дозі 50 МОд./кг [18]. Контрольні тварини (n=30) отримували 0,9 %-й розчин хлориду натрію в об'ємі доз експериментальних груп і знаходилися на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до їжі та води.

Вміст гепарину в плазмі крові визначали за реакцією з толуїдиновим синім за методом [19]. Гістологічні препарати брижі щурів готували за загальноприйнятою методикою, фарбували толуїдиновим синім (0,1 %-м водним розчином, рН 2,0) [20]. Досліджували тучні клітини в 10 полях зору під мікроскопом МБС-6, (ок. х 10, об. х 20). Морфофункціональний стан тканинних базофілів включав визначення їх секреторної активності (індексів насиченості та дегрануляції) [21].

Результати обробляли статистично з визначення середніх арифметичних значень і їх помилки ( $M \pm m$ ) за допомогою пакета

програм «Microsoft Excel-2000». Критичний рівень вірогідності відмінностей між середніми значеннями в групах досліджували за t-критерієм Стьюдента.

Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Результати макроскопічного дослідження тучних клітин при ендогенній гіпергепаринемії виявили в полі зору тучні клітини з яскраво інтенсивним забарвленням, переважно зрілих форм, з великою, а деякі – з дуже великою кількістю включень. Водночас у популяції тучних клітин при гіперліпідемії в основному були поодинокі клітини чималих розмірів, округлої форми з великими «соковитими» ядрами на відміну від інтактних тварин, де зустрічалися скупчення з 2–4 великих клітин овальної форми навколо судин брижі.

Аналіз субпопуляційного складу мастоцитів у тварин контрольної групи виявив переважно клітини з сильним (тип А) і помірним ступенем грануляційного насичення (тип Б), у той час як число клітин зі слабким ступенем (тип С) було вірогідно нижчим (табл. 1). Мінімальну частку в субпопуляції тучних клітин становили клітини з дуже слабким ступенем насичення (типу Д). Слід зазначити, що в основному в популяції зустрічалися мастоцити зі слабким та помірним ступенем дегрануляції.

У разі гіперліпідемії у тварин вірогідно збільшилася (в 1,27 раза) кількість клітин з підвищеним вмістом гепарину (тип А) при одночасному зниженні на 16,39 % популяції клітин з малим вмістом гранул (тип С) порівняно з інтактними тваринами. При цьому морфологічних перебудов з боку популяції тучних клітин типів Б та Д не спостерігали.

Аналіз ступеня дегрануляції мастоцитів

Таблиця 1. Якісний склад (%) популяції тучних клітин в дослідних групах, (M ± m)

Схема досліджу	тип А	тип Б	тип С	тип Д
Контроль	33,54±3,27	32,45±2,48	26,53±2,17	7,48±1,33
Атерогенна дієта	42,46±3,15*	30,98±2,71	19,63±1,92*	6,93±1,48
Атерогенна дієта і гепарин	59,16±2,16*	10,97±1,54*	27,74±2,35	2,13±1,17

\* P ≤ 0,05 відносно контролю.

свідчив про процеси активного синтезу гепарину. При цьому відзначали збільшення в 1,42 раза кількості клітин з неактивним ступенем дегрануляції порівняно з контролем, в той час як клітини зі слабким, помірним і сильним ступенем дегрануляції були в межах контрольних значень (табл. 2).

Однак на тлі підвищення активності тучних клітин констатували дефіцит гепарину в плазмі крові, що може бути зумовлено тривалим ліпідним навантаженням (рис. 1). Встановлено також, що зміни ліпопротеїнового складу крові потребують надмірної ліпопротеїноліпазної активності, котра, як відомо, регулюється гепарином.

Таке співвідношення тучних клітин позначалося на індексів насичення, який становив 1,94±0,54 ум. од. у контрольній групі тварин (рис. 2). Індекс дегрануляції при цьому був 1,23±0,06 ум. од.

Отримані нами результати вказують на те, що збільшення випадків тотальної дегрануляції мастоцитів у відповідь на штучну гіперліпідемію є одним із механізмів регуляції ліпідного обміну тучними клітинами з морфологічною перебудовою їх популяції [22]. Тривале ліпідне навантаження призводить до підвищення секреторної

активності тканинних базофілів та збільшення їх кількості. Це можна розглядати як компенсаторно-приспосувальну реакцію на надлишковий вміст ліпідів у крові, оскільки значна секреція триптазо- та/або хімазо-гепаринового комплексів з гранул тучних клітин сприяють зв'язуванню ліпопротеїдів низької щільності, що є одним з антиатерогенних механізмів [5,11,13]. З іншого боку, саме зміни ліпопротеїнового складу крові потребують надмірної ліпопротеїноліпазної активності, яка регулюється гепарином, що і спричинює зміни в функції мастоцитів.

Слід зазначити, що при експериментальній гіпергепаринемії на тлі атерогенної дієти морфофункціональний аналіз виявив збільшення кількості тучних клітин типу А на 23,62 %. При цьому відмічали тенденцію до збільшення кількості клітин зі слабким ступенем гранулярного насичення (тип С) на тлі зниження числа клітин з помірним ступенем насичення (тип Б) майже на 40,63 % відносно значень контрольної групи. Число клітин з дуже слабким ступенем насичення було нижчим від контролю в 3,5 раза.

Збільшення індексу насичення на 147,27 % у групі тварин з гіперліпідемією на тлі незмінного індексу дегрануляції порівняно

Таблиця 2. Характеристика (%) тучних клітин у популяції залежно від ступеня дегрануляції в дослідних групах (M ± m)

Схема досліджу	Ступінь дегрануляції			
	0	1	2	3
Контроль	18,86±1,36	45,82±2,43	23,75±1,57	11,57±0,67
Атерогенна дієта	26,73±1,27*	42,69±1,75	20,15±1,13	10,43±0,54
Атерогенна дієта і гепарин	35,75±2,14*	26,71±2,18 */**	30,16±1,04 **	7,38±0,33*

\*P ≤ 0,05 відносно показників контролю; \*\* P < 0,05 між іншими групами.

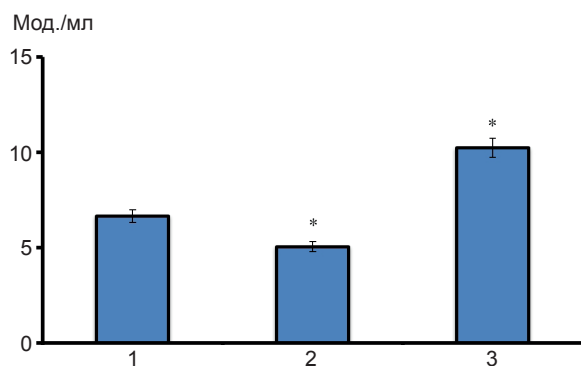


Рис. 1. Вміст гепарину в крові дослідних тварин: 1 – контроль, 2 – атерогенна дієта, 3 – атерогенна дієта і гепарин; \*  $P \leq 0,05$

з інтактними тваринами, на наш погляд, було підтвердженням активного синтезу біологічно активних амінів, а саме гепарину. Індекс насичення збільшувався в 1,8 раза (див. рис. 2).

Виявлено вірогідне зменшення майже в 2 рази тучних клітин зі слабким та на 36,22 % з високим ступенем дегрануляції порівняно з інтактними тваринами (див. табл. 2). Одночасно з цим спостерігали збільшення неактивних клітин майже в 2 і в 1,27 раза клітин з помірним ступенем дегрануляції порівняно з контролем. При цьому концентрація гепарину в крові була вірогідно вищою на 46,47 % за контрольні значення, що дало змогу говорити про розвиток стійкої гіпергепаринемії в дослідній групі тварин (рис. 1). Водночас індекс дегрануляції був у межах контрольних значень –  $1,12 \pm 0,63$  щодо  $1,23 \pm 0,10$  ум. од.

Підвищення кількості мастоцитів з високим ступенем насиченості при гіпергепаринемії довело, що вони мають можливість депонувати гепарин при надлишковому надходженні до організму, що підтверджує існуюче припущення [5, 8, 16]. Отже, він секретується у відповідь на харчове ліпідне навантаження і є незалежним чинником, який посилює ліполіз внаслідок вивільнення в кровообіг ліпопротеїнліпази з ендотелію судин [10, 22].

Слід зауважити, що синтез біологічно активних речовин і дегрануляції є енер-

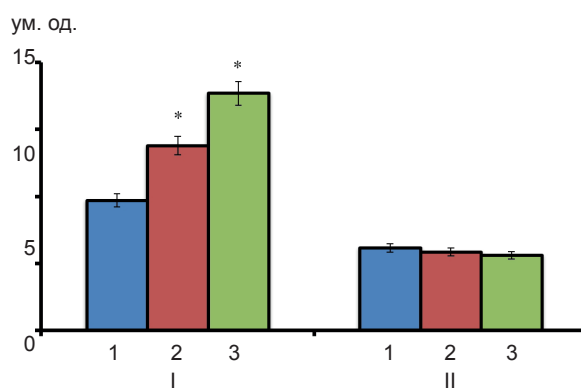


Рис. 2. Динаміка індексів насичення (I) та дегрануляції (II) тучних клітин в дослідних групах тварин: 1 – контроль, 2 – атерогенна дієта, 3 – атерогенна дієта і гепарин; \*  $P \leq 0,05$

госмними процесами, які стимулюють тучні клітини до споживання кисню, що при його нестачі спричинює пригнічення функції тучних клітин, і як наслідок – до зниження адаптаційних можливостей [6, 7, 12]. Тому підвищений синтез гепарину в умовах тканинної гіпоксії тучними клітинами з можливим подальшим виснаженням цієї системи призводить також до порушень ліпідного обміну на тканинному рівні, що є одним з патогенетичних механізмів атеросклерозу.

Таким чином, показано, що при експериментальній гіпергепаринемії компенсаторно збільшується число тучних клітин, в яких процеси секреції гепарину вже стимульовані. Виявлений чіткий взаємозв'язок функціонального стану тканинних базофілів і вмісту гепарину при експериментальній гіперліпідемії у щурів. Так, зменшення кількості зрілих тучних клітин при блокаді гепарину було зворотно пропорційне різкому підвищенню їх функціональної активності. Збільшення випадків тотальної дегрануляції та одночасне зменшення індексу насиченості свідчило про декомпенсацію адаптаційних можливостей мастоцитів, що зумовлювало зниження вмісту гепарину. Підвищення числа мастоцитів з високим ступенем насиченості при експериментальній гіпергепаринемії свідчило, що тучні клітини депонують ге-

парин при надлишковому його надходженні до організму. Ми вважаємо, що саме природна посилена секреторна активність тучних клітин та підвищений вміст гепарину в плазмі крові зумовлюють адаптацію щурів до харчових ліпідних навантажень, що не дає змоги відтворити в експерименті адекватну клініці модель атеросклерозу у цих тварин. Пошук хімічних і фізичних засобів впливу на популяцію тучних клітин для захисту і відновлення пулу гепарину – дуже привабливий і продуктивний напрямок майбутнього. Одним з перспективних природних речовин, що захищають популяції тучних клітин від виснаження пулу гепарину, може бути екзогенний гепарин, який вводять у малих дозах з можливим використанням його попередників.

**С.Г. Котюжинская, А.И. Гоженко,  
Д.А. Уманский**

#### **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ГИПЕРГЕПАРИНЕМИИ У КРЫС**

Выявлена четкая взаимосвязь функционального состояния тканевых базофилов и содержанием гепарина в плазме крови при экспериментальной гиперлипидемии у крыс. Показано, что длительная липидная нагрузка приводит к повышению секреторной активности тканевых базофилов в 1,27 раза и увеличению их количества. Доказана способность тучных клеток депонировать гепарин при избыточном его поступлении в организм, о чем свидетельствовало увеличение числа клеток с высокой степенью насыщения ( $59,16 \pm 3,42$  относительно  $33,54 \pm 3,27\%$ ) с одновременным снижением числа клеток с умеренной степенью на  $40,63\%$  при параллельном увеличении индекса насыщения ( $3,54 \pm 0,62$  относительно  $1,94 \pm 0,54$  усл. ед.) относительно показателей контрольной группы.

Ключевые слова: тучные клетки; гепарин; экспериментальная гиперлипидемия.

**S. Kotiuzhynska, A. Gozhenko, D. Umanskyi**

#### **MORPHOFUNCTIONAL STATE OF MAST CELLS IN HYPERHEPARINEMIA IN RATS**

A clear relationship between the functional state of mast cells and the heparin level in plasma in experimental hyperlipidemia in rats has been revealed. It was shown that long-term lipid load increases the activity and number of secretory mast

cells. We show the ability of mast cells to deposit the excess of heparin when it is in the organism, that is evidenced by an increase in the number of cells with high saturation level ( $59,16 \pm 3,42\%$  vs  $33,54 \pm 3,27\%$ ) with the simultaneous decline in the number of cells with moderate saturation level (by  $40,63\%$ ) with the simultaneous increase of saturation index. Relative to control group.

*Key words:* mast cells, heparin, experimental hyperlipidemia.

*Odessa National Medical University*

#### **REFERENCES**

1. Ilyin DA. Relevant aspects of the study of mast cells in vitro. *Mod World, Nat Peop: Coll Sci. Work. Tomsk*, 2011; 2 (1): 74-7.
2. Kryzhanovsky GN. Fundamental research in the system of medico-biological sciences. *Herald Rus Acad Med Sci*. 2006; 3: 31-3.
3. Bykov VL. Development and heterogeneity of mast cells. *Morphology* 2010; 127(2): 86-92.
4. Gafarova RK. Reaction of mast cells on ischemia. *Med Immunol*. 2009; 11(4-5): 306-7.
5. Santos EA., Rocha LR., Pereira NM. et al. Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusc *Anomalocardia brasiliana*. In situ characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration *Histochem J*. 2013; 44: 553-8.
6. Artashyan OS. Yushkov B G., Khramtsova YS. The morphological aspects of involvement of mast cells in the formation of General adaptation syndrome. *Taurid Med Biol Bull*. 2012; 15(3): 22-8.
7. Gavrishcheva HA. Fat cells of the heart in norm and at a pathology: a review. *Cardiology*. 2015; 55(6): 59-65.
8. Sun J., Sukhova GK., Wolters PJ. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med*. 2015; 19: 719-24.
9. Kondashevskaya MV. Mast cells and heparin - key links in adaptive and pathological processes. *Bull Rus Acad Med Sci*. 2010; 6: 49-54.
10. Kotyuzhinskaya S. Functional status of mast cells with experimental hypoheparinemia. *Pharm Innovat J*. 2014; 3(4): 67-71.
11. Kim LB, Kulikov YuV, Melnikov VN Role of heparin in the regulation of transcapillary exchange and lipid peroxidation in patients with coronary heart disease. *Bull Siber Branch Acad Med Sci*. 2010; 1: 72-7.
12. Kotiuzhynska SG., Gozhenko AI. Heparin: regulation of hemostasis and megamastoides. *Circul Hemostas*. 2006; 2: 11-7
13. He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 10: 309-18
14. Khalil M., Ronda J., Weintraub M. et al. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Res* 2014; 26(1171): 18-29.
15. Kordenko AN, Alekseeva NT., Anokhina JA. Specific

- features of the structure of the fat cells of the skin. J. Anatom Histopathol. 2014; 3 (4): 36-8.
16. Yushkov BG., Chereshnev VA., Klimin VG., Artesian OS. Mast cells. Physiology and pathophysiology. Moscow: Medicine, 2011.
  17. Ryzhov EV., Makarov VG. Methodical instructions to study the hypolipidemic and antiatherosclerotic action of pharmacological substances. Manual on experimental (preclinical) study of pharmacological substances: edited by RY. Khabrieva. – Moscow: Med, 2005.
  18. Ulyanov AM., Tarasov YuA. Insular system of animals in chronic deficiency of heparin. Probl Med Chem. 2000; 46(2): 149-54.
  19. Berkovsky AL., Sergeeva EV., Suvorov AV., Kozlov AA. Methods for determining the activity of heparin – Moscow: Print, 2013.
  20. Sarkisov DS. Perov YuI. Microscopic technique. Moscow: Med, 1996.
  21. Linder DP., Poberii IA., Roskin MJ. Morphometric analysis of populations of mast cells. Arch Pathol. 1980; 6: 21-3.
  22. Kotiuzhynska SG. Lipoprotein lipase activity lipid-transport system at hyperheparinemia. Med Chem. 2014; 16 (1): 17-20.

*Матеріал надійшов до  
редакції 07.11.2016*