УДК 616-091.8

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ГИСТОЛОГИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ

^{1,2}Шурыгина И.А., ¹Шурыгин М.Г.¹ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, e-mail: iscsst@mail.ru;²Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Известно, что тучные клетки играют большую роль в управлении поддержанием состояния соединительной ткани. Функция этих клеток заключается в поддержании структурной, биохимической и функциональной стабильности микроокружения. Цель исследования: разработка способа идентификации тучных клеток на гистологических срезах, обеспечивающего специфическое окрашивание тучных клеток. Образцы ткани окрашивали иммуногистохимическим методом. В качестве первичных антител использовали антитела анти-VEGFR1 (Sigma). Окрашивание сравнивали с окраской гематоксилином и эозином по эффективности выявления тучных клеток. Тучные клетки четко и специфично окрашивались на препаратах различных тканей, выявлялись как клетки, заполненные специфическими гранулами, так и дегранулирующие клетки. При оценке эффективности выявления тучных клеток на препаратах, окрашенных предложенным методом, и окрашенных гематоксилином и эозином, установлено достоверное повышение количества выявляемых клеток при использовании оригинального способа – $9,87 \pm 0,91$ и $2,52 \pm 0,22$ соответственно ($p < 0,001$). Таким образом, предлагаемая технология позволяет четко выявлять тучные клетки на гистологическом препарате. Может быть использована в области патоморфологии, судебной медицины, а также при проведении научных исследований. Технология хорошо адаптирована с методиками, применяемыми при патологоанатомическом исследовании.

Ключевые слова: тучные клетки, иммуногистохимическое исследование, VEGF, анти-VEGFR1, дегрануляция тучных клеток

MAST CELL IDENTIFICATION METHOD FOR HISTOLOGICAL STUDY

^{1,2}Shurygina I.A., ¹Shurygin M.G.¹Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, e-mail: iscsst@mail.ru;²Siberian State Medical University, Tomsk

Mast cells are regulators of local connective tissue homeostasis. The function of these cells is to maintain the structural, biochemical and functional stability of the microenvironment. Objective: to develop a method for the identification of mast cells on histological sections, which allows you to identify specific staining of mast cells. Tissue samples were stained by immunohistochemical method. Anti-VEGFR1 antibodies (Sigma) were used as primary antibodies. Staining was compared with hematoxylin and eosin staining for mast cell detection. Mast cells were clearly and specifically stained on preparations of various tissues; cells filled with specific granules and degranulating cells were detected. When evaluating the efficiency of detecting mast cells on sections stained by the proposed method and stained with hematoxylin and eosin, a significant increase in the number of detected cells using the original method was found to be 9.87 ± 0.91 and 2.52 ± 0.22 , respectively ($p < 0.001$). Thus, the proposed technology allows to clearly and differentially stain mast cells on a histological section. It can be used in the field of pathomorphology as well as in conducting research. The technology is well adapted with the methods used in pathological studies.

Keywords: mast cells, immunohistochemical study, VEGF, anti-VEGFR1, mast cell degranulation

Известно, что тучные клетки играют большую роль в управлении поддержанием состояния соединительной ткани. Тучные клетки, как часть иммунной системы, играют ключевую роль в защите хозяина от нескольких патогенных микроорганизмов и в инициации аллергического иммунного ответа [1].

Во время дегрануляции тучные клетки секретируют определенный набор медиаторов, включая предварительно сформированные медиаторы, которые уже были синтезированы клеткой и содержатся в цитоплазматических гранулах. В эту группу входят сериновые протеазы, в частности химаза и триптаза [2]. Биологическая значимость химазы зависит от механизмов дегра-

нуляции и характеризуется избирательным воздействием на клеточные и неклеточные компоненты специфического тканевого микроокружения. Известно, что химаза тесно связана с механизмами воспаления и аллергии, ангиогенеза и онкогенеза, ремоделирования внеклеточного матрикса соединительной ткани и изменениями в гистоархитектонике органов [3].

При гистологическом исследовании применяют различные способы выявления тучных клеток на препаратах. Эти способы базируются на способности стандартных гистологических красителей метакроматично окрашивать гранулы, находящиеся в тучных клетках. Так, Enerback L. et al. (1986) с данной целью применяли 1 % под-

кисленный водный раствор толудинового синего [4].

Показано, что по критерию контраста тучных клеток на фоне соединительной ткани лучшие результаты демонстрирует окрашивание по Мей-Грюнвальду, на втором месте по эффективности среди классических гистологических окрасок оказался метод окрашивания толудиновым синим, поскольку он занимает меньше времени [5].

Однако перечисленные способы приводят к окраске не исключительно тучных клеток, но и других клеток, которые находятся на гистологическом срезе. Данное обстоятельство влияет на идентификацию тучных клеток.

Более специфичными способами являются приемы, основанные на специфическом выявлении биологически активных субстанций, содержащихся в гранулах тучных клеток. Например, гистамина, мелатонина и серотонина [6]. Однако данный метод требует одновременного применения окрашивания трех серийных срезов, что приводит к повышению трудоемкости работы и требует существенных финансовых затрат.

Еще более трудоемким является способ сочетания окрашивания на биологически активное вещество серотонин с одновременным исследованием полутонких срезов ткани [7]. Необходимость использования дорогостоящего оборудования, не имеющего широкого применения в работе лечебно-профилактических учреждений – трансмиссионного электронного микроскопа, а также трудоемкость и длительность приготовления препаратов для электронной микроскопии существенно снижает доступность данного метода диагностики.

Предпринимались попытки использования иммуногистохимических методов окрашивания для выявления тучных клеток, основанные на визуализации результата взаимодействия антиген – антитело. В частности, применялось окрашивание гепарин-протеинового комплекса тучных клеток [8]. Однако данный способ апробирован только при исследовании тканей животных и не используется для выявления тучных клеток у человека.

Цель исследования: разработка способа идентификации тучных клеток на гистологических срезах, обеспечивающего специфическое окрашивание тучных клеток.

Материалы и методы исследования

Образцы различных тканей фиксировали в растворе 10% нейтрального забуференного формалина, дегидратировали, изготавливали парафиновые блоки. Гисто-

логические срезы помещали на стекла, обработанные поли-L-лизин (Thermo scientific). Проводили иммуногистохимическое окрашивание препаратов по методике, описанной нами ранее и показавшей хорошую стабильность при окраске на эндотелин [9, 10], маркеры дифференцировки фибробластов [11, 12].

Для иммуногистохимического окрашивания использовали первичные антитела, в качестве которых использовали антитела к рецептору фактора роста эндотелия сосудов 1 типа (анти-VEGFR1) (Sigma), в рабочем разведении 1:50. Затем наносили вторичные антитела, меченные пероксидазой. Срезы докрашивали 0.02% раствором гематоксилина. Оценивали наличие специфической окраски на гистологических препаратах [13]. Параллельно парные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Сравнивали количество положительно окрашенных клеток на препаратах. Различия между методами окраски оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящем исследовании мы окрашивали препараты разработанным нами способом. Всего исследования подвергались 75 препаратов различных тканей, преимущественно соединительной и мышечной ткани, в том числе в разных партиях повторно исследовались идентичные препараты. В результате проведенного исследования установлено, что предложенным нами способом тучные клетки хорошо выявляются на гистологических срезах соединительной ткани (рис. 1). Не менее эффективно данные клетки обнаружены нами в мышечной ткани (рис. 2) за счет яркого специфического окрашивания. При визуализации гистологических препаратов тучные клетки представляют собой клетки с неровной поверхностью, четко видны мелкие шарикообразные гранулы, ярко окрашенные. На части препаратов обнаружена дегрануляция тучных клеток, при этом гранулы четко видны в прилегающих к месту расположения клетки пространстве, таким образом дополнительно можно оценить активности дегрануляции тучных клеток в изучаемых образцах (рис. 3).

Очень характерно, что на препаратах специфически окрашивались только тучные клетки. Окраски каких-либо других клеток нами не получено. При применении данного способа была выявлена хорошая стабильность получаемых результатов. Окрашивание срезов с одного и того же блока в разных партиях приводило к сопоставимым результатам.

Рис. 1. Ярко окрашенные тучные клетки в соединительной ткани. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к VEGFR1, докрасивание гематоксилином), ув. $\times 1000$. 1 – тучные клетки

Рис. 2. Ярко окрашенные тучные клетки в мышечной ткани. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к VEGFR1, докрасивание гематоксилином), ув. $\times 1000$. 1 – тучные клетки

Рис. 3. Дегрануляция тучной клетки в мышечной ткани. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к VEGFR1, докрасивание гематоксилином), ув. $\times 1000$. 2 – дегрануляция тучной клетки

Яркие преимущества показала предложенная методика в сравнении со стандартными методами, применяющимися в практике работы гистологических лабораторий, в частности в сравнении с использованием гематоксилина и эозина. Данное преимущество наглядно продемонстрировано на рис. 4 и 5: на рис. 4 представлена окраска гематоксилином и эозином; на рис. 5 – окрашивание препарата соединительной ткани предлагаемым способом.

Рис. 4. Тучные клетки в соединительной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$. 1 – тучная клетка

Рис. 5. Тучные клетки в соединительной ткани. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к VEGFR1, докрасивание гематоксилином), ув. $\times 400$. 1 – тучные клетки

При оценке эффективности выявления тучных клеток на препаратах, окрашенных предложенным методом и окрашенных гематоксилином и эозином, установлено достоверное повышение количества выявляемых клеток при использовании оригинального способа – $9,87 \pm 0,91$ и $2,52 \pm 0,22$ соответственно ($p < 0001$).

Как известно, тучные клетки человека продуцируют большое количество ангиогенных и лимфангиогенных молекул [14].

Тучные клетки человека экспрессируют рецептор к вазоэндотелиальному фактору роста (VEGFR-1) и 2 (VEGFR-2). Эти данные указывают на то, что тучные клетки человека могут участвовать в сложной сети, включающей воспалительный и опухолевый ангиогенез и лимфангиогенез [15]. С этим может быть связано обнаруженное нами большое количество рецепторов к вазоэндотелиальному фактору роста, выявленное нами на поверхности тучных клеток. При этом рецепторы выявлены не только на поверхности клетки, но и в содержимом секретируемых гранул.

Заключение

Таким образом, предлагаемая технология позволяет четко выявлять тучные клетки на гистологическом препарате. Может быть использована в области патоморфологии, судебной медицины, а также при проведении научных исследований. Технология хорошо адаптирована с методиками, применяемыми при патологоанатомическом исследовании.

Список литературы

1. Tsvilovskyy V., Solis-Lopez A., Ohlenschläger K., Freichel M. Isolation of peritoneum-derived mast cells and their functional characterization with Ca²⁺-imaging and degranulation assays. *J. Vis. Exp.* 2018. vol. 137. DOI: 10.3791/57222.
2. Gaur S., Sinha O.N., Bhushan A., Batni G., Jain M. Histological and histochemical observations on mast cell and glands in chronic tonsillitis. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2019. vol. 71. Suppl. 1. P. 32–37. DOI: 10.1007/s12070-015-0961-1.
3. Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem. Cell Biol.* 2019. vol. 152. no 4. P. 253–269. DOI: 10.1007/s00418-019-01803-6.
4. Enerback L., Miller H.R.P., Mayroffer G. Methods for the identification and characterization of mast cells by light microscopy. In *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity* / Ed. Befus A.D., Bienenstock J., Denburg J.A. N.Y.: Raven Press, 1986. P. 405–417.
5. Mutsaddi S., Kotrashetti V.S., Nayak R.S., Pattanshetty S.M. Comparison of histochemical staining techniques for detecting mast cells in oral lesions. *Biotech. Histochem.* 2019. vol. 94. no. 6. P. 459–468. DOI: 10.1080/10520295.2019.1597986.
6. Хайкин М.Б., Дмитриенко С.В., Осадчук М.А. Клинические и морфо-функциональные особенности течения воспалительных заболеваний пародонта у больных с гастродуоденальными язвами // *Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия.* 2006. Т. 46. № 6/2. С. 153–158.
7. Фомина Н.К. Действие ионизирующего излучения и пептидного биорегулятора эпителина на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М-1: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Обнинск, 2007. 17 с.
8. Michaloudi H.C., Papadopoulos G.C. Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. *J. Anat.* 1999. vol. 195. P. 577–586. DOI: 10.1046/j.1469-7580.1999.19540577.x.
9. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Каня О.В. Экспрессия эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации фибробластического и вазоэндотелиального факторов роста // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.* 2013. № 1 (89). С. 125–129.
10. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Каня О.В. Экспрессия эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации фибробластического и вазоэндотелиального факторов роста // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.* 2013. № 1. С. 125–129.
11. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Granina G.B., Zelenin N.V. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase. *Frontiers of Chemical Science and Engineering.* 2012. vol. 6. no. 2. P. 232–237. DOI: 10.1007/s11705-012-1286-1.
12. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Granina G.B., Zelenin N.V. Application of mitogen-activated protein kinase inhibitor SP 600125 for wound healing control. *Journal of Regenerative Medicine & Tissue Engineering.* 2013. vol. 2. DOI: 10.7243/2050-1218-2-9.
13. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Каня О.В. Способ идентификации тучных клеток на гистологическом препарате // Патент РФ № 2418065. Патентообладатель Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии Сибирского отделения РАМН (НЦРВХ СО РАМН). 2011. Бюл. № 13.
14. Wroblewski M., Bauer R., Cubas Córdova M., Udonta F., Ben-Batalla I., Legler K., Hauser C., Egberts J., Janning M., Velthaus J., Schulze C., Pantel K., Bokemeyer C., Loges S. Mast cells decrease efficacy of anti-angiogenic therapy by secreting matrix-degrading granzyme B. *Nat Commun.* 2017. vol. 8. No. 1. P. 269. DOI: 10.1038/s41467-017-00327-8.
15. Marone G., Varricchi G., Loffredo S., Granata F. Mast cells and basophils in inflammatory and tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 2016. vol. 778. P. 146–151. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.088.