

DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-4-84-89



УДК 611.018.1:611.018.74:616-001.4  
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология  
© Коллектив авторов, 2020

## Триптазный профиль популяции тучных клеток кожи крыс при раневом процессе

В. В. Шишкина<sup>1\*</sup>, С. В. Клочкова<sup>2, 3</sup>, Н. Т. Алексеева<sup>1</sup>, М. Ю. Соболева<sup>1</sup>,  
Д. И. Есауленко<sup>1</sup>, Л. Н. Антакова<sup>1</sup>, О. А. Герасимова<sup>1</sup>,  
Н. Ю. Самодурова<sup>1</sup>, Т. В. Самойленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко»  
Минздрава России, Воронеж, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

<sup>3</sup>ГАУЗ «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины ДЗМ», Москва, Россия

Тучные клетки циклически осуществляют синтез и выведение в экстрацеллюлярный матрикс широкого спектра продуктов биогенеза с различной биологической активностью и являются регуляторами местного гомеостаза как в норме, так и при патологии – воспалении, онкогенезе и др. Относительная специфичность классических гистохимических методов выявления тучных клеток по отношению к хромогенным субстратам вызывает определенные затруднения в селективном исследовании компонентов секретомы тучных клеток, например, гепарина, гистамина, химазы или триптазы. Поэтому большую популярность приобрели иммуноморфологические методики, выявляющие конкретные субстраты и позволяющие дифференцировать компоненты секретомы тучных клеток. Медиаторы, вырабатываемые тучными клетками, способствуют неоангиогенезу, фибриллогенезу и реэпителизации во время процесса репарации.

**Целью** нашей работы было изучение триптазного профиля популяции тучных клеток кожи крыс при раневом процессе с помощью оригинальной комбинированной методики иммуногистохимического окрашивания.

**Материал и методы.** В эксперименте приняли участие 12 крыс линии Wistar с разделением на две группы – интактную (n=6) и с имеющимся раневым процессом кожи в области холки (n=6). Триптазный профиль тучных клеток оценивали на 7-е сутки раневого процесса в сравнении с группой контроля.

**Результаты.** Полученные результаты показали существенное возрастание количества триптаза-позитивных тучных клеток на 7-е сутки раневого процесса в коже на фоне общего увеличения популяции тучных клеток. Достоверно повышался интрагранулярный резерв триптазы. В отличие от контроля, где тучные клетки с единичными триптаза-позитивными гранулами доминировали, при раневом процессе в коже практически не выявлялись клетки данного типа (43.69±2.9% и 8.55±0.9%). Уровень содержания триптаза-позитивных тучных клеток с полным заполнением цитоплазмы в контрольной группе и группе животных с раневым процессом составил 14.24±1.2% и 38.03±2.9% соответственно.

**Заключение.** Таким образом, при моделировании раны выявляется увеличение синтеза триптазы как в отдельно взятых ТК, так и внутри всей популяции ТК. Данный факт показывает, что протеазы тучных клеток могут стать потенциальной терапевтической мишенью для улучшения регенерации ран за счет коррекции иммуногенеза, воспаления и волокнообразования.

**Ключевые слова:** триптаза, тучные клетки, раны, регенерация.

### Tryptase Profile of the Rat Skin Mast Cell Population During the Wound Healing

© V. V. Shishkina<sup>1\*</sup>, S. V. Klochkova<sup>2</sup>, N. T. Alexeeva<sup>1</sup>, M. Yu. Soboleva<sup>1</sup>, D. I. Esaulenko<sup>1</sup>, L. N. Antakova<sup>1</sup>, O. A. Gerasimova<sup>1</sup>, N. Yu. Samodurova<sup>1</sup>, T. V. Samoilenko<sup>1</sup>, 2020

<sup>1</sup>N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

<sup>2</sup>Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Moscow Scientific and Practical Center for Medical Rehabilitation, Rehabilitation and Sports Medicine Moscow, Russia

Mast cells cyclically synthesize and excrete a wide range of biogenesis products with different biological activities into the extracellular matrix and are regulators of local homeostasis both in normal conditions and in pathology – inflammation, oncogenesis, etc. The relative specificity of classical histochemical methods for detecting mast cells in relation to chromogenic substrates causes certain difficulties in the selective study of the components of the secretome of mast cells, for example, heparin, histamine, chymase or tryptase. Therefore, immunomorphological techniques have become very popular, which identify specific substrates and allow differentiation of the components of the mast cell secretome. Mediators produced by mast cells promote neoangiogenesis, fibrillogenesis and re-epithelialization during the repair process.

**The aim** of our work was to study the tryptase profile of the mast cell population of rat skin during the wound process using an original combined method of immunohistochemical staining.

**Material and methods.** The experiment involved 12 Wistar rats divided into two groups – intact (n=6) and with the existing wound process of the skin in the withers (n=6). The tryptase profile of mast cells was assessed on the 7<sup>th</sup> day of the wound process in comparison with the control group.

**Results.** The results obtained showed a significant increase in the number of tryptase-positive mast cells on the 7<sup>th</sup> day of the wound process in the skin against the background of a general increase in the population of mast cells. Intragranular tryptase reserve was significantly increased. In contrast to the control, where mast cells with single tryptase-positive granules dominated, during the wound process, cells of this type were practically not detected in the skin (43.69±2.9% and 8.55±0.9%). The content of tryptase-positive mast cells with complete filling of the cytoplasm in the control group and the group of animals with a wound process was 14.24±1.2% and 38.03±2.9%, respectively.

**Conclusion.** Thus, when modeling a wound, an increase in tryptase synthesis is detected both in individual MCs and within the entire MC population. This fact indicates that mast cell proteases can become a potential therapeutic target for improving wound regeneration by correcting immunogenesis, inflammation and fiber formation.

**Key words:** tryptase, mast cells, wounds, regeneration.

\*Автор для переписки:

Шишкина Виктория Викторовна  
Воронежский государственный медицинский университет  
им. Н.Н. Бурденко, ул. Студенческая, 10, Воронеж,  
394036, Российская Федерация

\*Corresponding author:

Viktoriya Shishkina  
N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, ul.  
Studencheskaya, 10, Voronezh, 394036, Russian Federation  
E-mail: 4128069@gmail.com

## Введение

Тучные клетки (ТК) представляют собой повсеместно распространенный пул клеток соединительной ткани, наиболее часто встречающийся функционально значимых областях кожи, дыхательной системы и слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, для оптимального функционального взаимодействия с иммунокомпетентными и стромальными клетками, а также экстрацеллюлярными структурами специфического тканевого микроокружения [1, 12]. ТК представлены высоко гетерогенной популяцией клеток с зависимыми от подтипа различиями в морфологии, гистохимических свойствах, экспрессии протеаз и функции. ТК обладают широкими полифункциональными свойствами, связанными с высвобождением множества предварительно сформированных медиаторов, фагоцитозом, обработкой антигенов, продукцией цитокинов и др. [6–11, 14]. Известен факт накопления ТК и высвобождения провоспалительных и иммуномодулирующих медиаторов в месте раневого участка кожи [11,14]. ТК способны модулировать биосинтетическую активность фибробластов и кератиноцитов, участвующих в регенерации раневой поверхности [13]. В функцию раневого заживления в организме входит целый комплекс местных и общих реакций, которые включаются в момент получения раны и продолжаются до этапа ее заживления, характеризующийся скоординированными и перекрывающимися фазами воспаления, регенерации и ремоделирования [11, 14]. Медиаторы, вырабатываемые ТК, включая триптазу, трансформирующий ростовой фактор бета (TGF-β), фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов-2, фактор роста эндотелия сосудов

(VEGF), фактор роста нервов (NGF), интерлейкин -4; -8 способствуют неоангиогенезу, фибриллогенезу и реэпителизации во время процесса репарации [6, 11, 14, 15]. В зависимости от синтеза специфических сериновых протеаз у человека различают 3 группы ТК: химаза-позитивные, триптаза-позитивные и с одновременным проявлением химазы и триптазы [1, 4]. Эти протеазы участвуют в усилении дегрануляции ТК посредством аутокринного пути. Кроме того, увеличивают потенциал эозинофилов и нейтрофилов [6].

Одна из протеаз ТК – триптаза, которая обладает высоким биологическим действием, участвуя в процессах формирования специфического тканевого микроокружения [4, 6, 10, 16]. Современные исследования указывают на значимость данного фермента. Знания о функциональных возможностях триптаз растут и доказывают актуальность их исследований в экспериментальной практике и в лечении социально значимых заболеваний [16].

В связи с этим определение триптазного профиля органоспецифичных популяций ТК является важным показателем в фундаментальных исследованиях и основой для изучения вклада протеаз в различные патологические процессы.

## Материал и методы исследования

Материалом для исследования служила кожа крыс линии Wistar массой 230±20 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария в отдельных клетках. Работа выполнялась на базе НИИ экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Минздрава России в строгом соответствии с Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986), приказом Минздрава РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием лабораторных животных».

Первую группу составляли интактные крысы (n=6), вторую – с моделированием раны (n=6). Моделирование раны проводили по следующей схеме. На депилированном участке в области холки кожу крысы дважды обрабатывали 0.05% водным раствором хлоргексидина биглюконата и промывали физиологическим раствором. Под наркозом («Золетил-100» 7.5 мг/кг массы животного) в асептических условиях у фиксированных животных по трафарету скальпелем иссекали кожу и подкожную клетчатку вместе с поверхностной фасцией в виде эллипса диаметром 1.2 см и площадью – 1.13 см<sup>2</sup>. Заживление раны происходило естественным путем. Расчет площади поверхности тела крысы с учетом массы проводили по формуле М. Lee (1929):  $S=12.4 \times M^{0.66}$ , где S – площадь поверхности тела, а M – масса животного. У крыс массой 230±20 г площадь поверхности тела составляла 449–499 см<sup>2</sup>. Моделированная в ходе эксперимента рана площадью 1.13 см<sup>2</sup> составляла 0.25–0.4% от площади поверхности тела. Локализация в межлопаточной области выбрана исходя из невозможности самотравмирования в процессе жизнедеятельности животного. Измерение площади раневой поверхности проводили с использованием мобильного приложения «+WoundDesk» [5]. Вывод животных из эксперимента проводился на 7-е сутки путем эвтаназии с применением передозировки ингаляционным анестетиком.

Пробоподготовка для детекции ТК включала фиксацию биоматериала в нейтральном 10% забуференном формалине на протяжении 48 часов. Далее осуществляли гистологическую проводку по стандартному протоколу с использованием ряда спиртов, ксилола и парафина в гистопроцессоре карусельного типа MTP-120 (SLEE Medical, Германия) с последующей заливкой в парафиновые блоки на станции Tissue-Tek TEC 5 (Sakura, Япония). Из приготовленных парафиновых блоков изготавливали гистологические срезы толщиной 2 мкм на ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200 (Sakura, Япония).

Выявление ТК осуществляли в два этапа. На первом этапе проводили иммуногистохимическую детекцию триптазы согласно стандартному подходу [6]. Срезы инкубировали с мышиными моноклональными антителами (#ab2378, разведение 1:2000) в течение 12 часов. Затем наносили вторичные антитела, конъюгированные с HRP (Goat anti-Mouse IgG H&L, #AS-M1-HRP), которые выявляли реагентом ImmPACTTM DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4105) согласно инструкции компании производителя. По завершению первого этапа методики на микропрепаратах кожи выявлялись только триптаза-позитивные ТК, свободно лежащие гранулы либо фрагменты цитоплазмы. На втором этапе срезы дополнительно окрашивали толуи-

диновым синим или раствором Май-Грюнвальда по общепринятым протоколам [1, 3]. После этого срезы обезжизивали и заключали в постоянную монтажную среду.

Планиметрический анализ микропрепаратов содержал подсчет ТК на мм<sup>2</sup> с определением метрической площади и количества ТК. Структуры, в которых ТК не могли находиться (волосные фолликулы, просветы венул и др.), в расчет площади не включали. Среди ТК с метахромазией подсчитывали численность триптаза-негативных и триптаза-позитивных клеток. На следующем этапе, последние в зависимости от количества триптаза-содержащих гранул подразделялись на несколько групп: ТК с единичными гранулами; ТК с гранулами, занимающими 1/3, 2/3 или весь объем цитоплазмы. Полученные абсолютные значения переводили в относительные для процентного выражения пула ТК с различным содержанием триптазы.

Окрашенные срезы кожи изучали на микроскопе ZEISS Axio Imager.A2 с системой фотодокументирования изображений, включающей цветную цифровую камеру ZEISS Camera AxioCam 506 color (Carl Zeiss, Germany). Фотографии обрабатывали с помощью программы ZEN 2.3 (Carl Zeiss, Germany). Для выявления достоверности различий использовался t-критерий Стьюдента, поскольку полученный массив числовых данных представлял собой нормальное распределение.

## Результаты и их обсуждение

По данным морфометрического анализа кожи крыс контрольной группы выявлено, что большая часть метахроматических ТК не содержала гранул триптазы (рис.1, Б).

В сетчатом слое дермы кожи обнаруживались ТК большего размера с большим объемом цитоплазмы и насыщенным содержанием секреторных гранул в отличие от сосочкового слоя. Отмечалась тесная солокализация триптаза-позитивных и триптаза-негативных ТК. (рис.1, В). Некоторые участки дермы кожи содержали группы ТК с экспрессией триптазы, но чаще формировались кооперации ТК без нее. Так, содержание триптаза-негативных клеток с метахромазией в контрольной группе составило 60.1±3.2%, триптаза-позитивных клеток – 30.9±2.4% от общей популяции ТК кожи крыс (рис. 2).

На 7-е сутки эксперимента в коже на фоне общего увеличения ТК в структуре популяции в 2 раза увеличивалось количество триптаза-позитивных ТК. Доля триптаза-негативных клеток с метахромазией составляла 29.2±0.9%, триптаза-позитивных клеток – 70.8±4.1% от общей популяции ТК кожи крыс (рис. 2). Вместе с тем достоверно повышался резерв триптаза-позитивных гранул в ТК

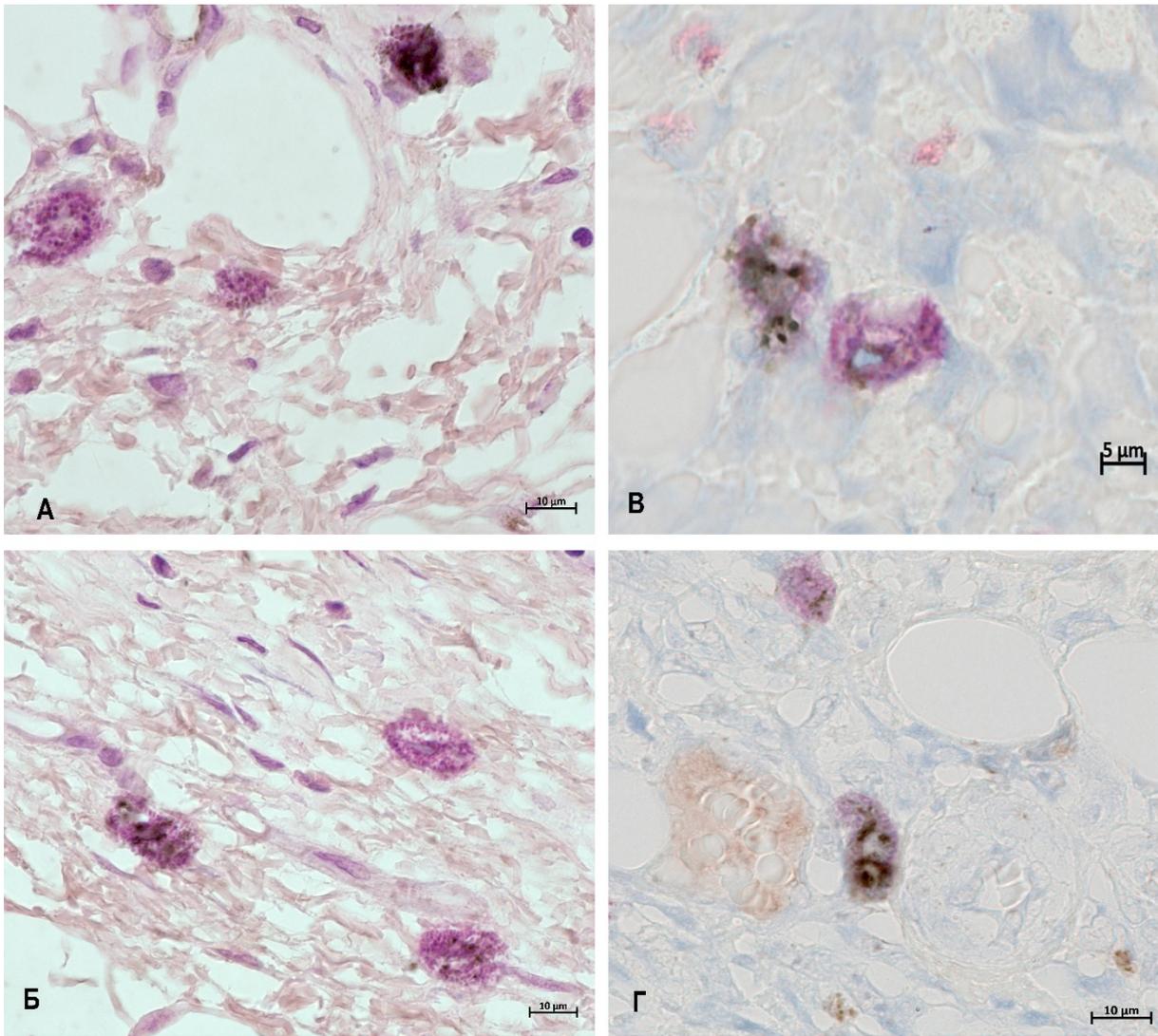


Рис. 1. Экспрессия триптазы тучных клеток кожи крыс. Фиксация – 10% нейтральный формалин. Иммуногистохимическое окрашивание на триптазу тучных клеток с докрасиванием раствором Май–Грюнвальда (А, Б) или толуидиновым синим (В, Г). Обозначения: Б, В – группа контроля; А, Г – 7-е сутки раневого процесса.

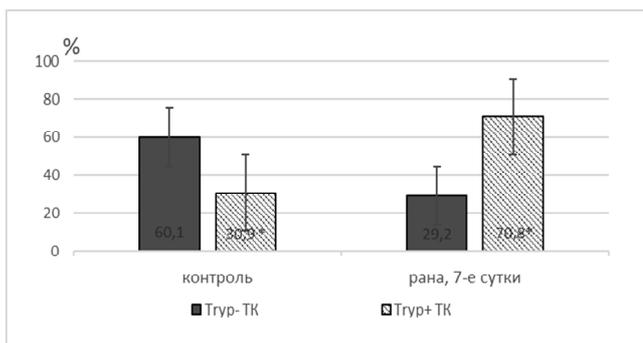


Рис. 2. Соотношение триптаза-позитивных (Tgr+ ТК) и триптаза-негативных (Tgr- ТК) клеток в популяции тучных клеток (ТК) кожи крыс (% от общего числа тучных клеток, \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой).

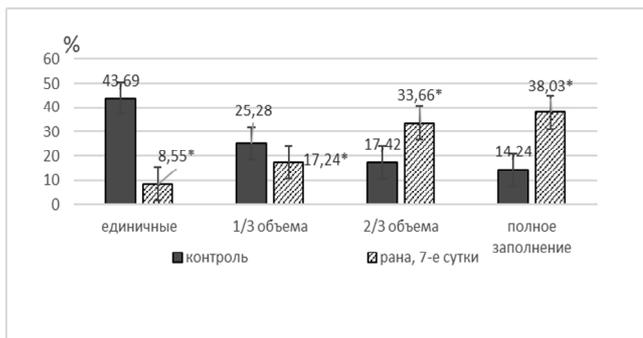


Рис. 3. Соотношение тучных клеток кожи крыс с различной экспрессией триптазы (% от общего числа триптаза-позитивных тучных клеток, \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой).

(рис. 1,А; рис. 3). При этом происходило увеличение размеров самих гранул (рис.1, Г).

При подсчете ТК с различным уровнем заполнения цитоплазмы триптазой обнаруживали зависимость содержания данной протеазы от раневого процесса. В отличие от контроля, где ТК с единичными гранулами доминировали, кожа раневого процесса практически не содержала клеток данного типа ( $43.69 \pm 2.9\%$  и  $8.55 \pm 0.9\%$  соответственно). Преобладающими становились ТК с заполнением  $2/3$  объема или полностью заполненной цитоплазмой триптаза-позитивными гранулами (рис. 3). По-видимому, раневой процесс активизировал биогенез триптазы в ТК с аккумуляцией в цитоплазме и дальнейшим выведением в межклеточный матрикс. Доля триптаза-позитивных ТК с полным заполнением цитоплазмы в контрольной группе и группе животных с раной от общего пула ТК кожи крыс составляла  $14.24 \pm 1.2\%$  и  $38.03 \pm 2.9\%$  соответственно. Таким образом, вызванный типовой патологический процесс при моделировании раны приводил к существенной активизации экспрессии триптазы как в отдельных ТК, так и на уровне всей интраорганной популяции.

Полученные результаты соотносятся с литературными данными об участии ТК в процессах регенерации ткани [7, 16].

### Заключение

Результаты исследования показали, что большая часть метахроматических тучных клеток в коже интактных животных не содержит гранул триптазы. Некоторые участки дермы кожи содержали скопления триптаза-позитивных клеток, но чаще формировались кооперации тучных клеток без протеазы. На 7-е сутки раневого процесса в коже происходило существенное возрастание триптазного профиля в структуре интраорганной популяции тучных клеток вместе с достоверным повышением резерва триптаза-позитивных гранул. Очевидно, изменения ткани, происходящие при раневом процессе, приводят к значительному увеличению экспрессии триптазы как в отдельно взятых клетках, так и во внутриорганной популяции. Следовательно, контроль активации тучных клеток и производимых медиаторов, является потенциальной терапевтической стратегией для улучшения регенерации ран за счет коррекции иммуногенеза, воспаления, волокнообразования и биосинтетических потенциалов клеток стромы в зоне альтерации.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

1. Атыакшин Д.А., Герасимова О.А., Мешкова В.Ю. и др. Новый гистохимический подход для оценки экспрессии триптазы в популяции тучных клеток. Журнал анатомии и гистопатологии. 2020;9(3):94–101 [Atyakshin DA, Gerasimova OA, Meshkova VY, Samodurova NYu, Samoilenko TV, Shishkina VV. Novel histochemical approach for evaluation of tryptase expression in the mast cell population. Journal of Anatomy and Histopathology. 2020 Oct 10;9(3):94–101. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-3-94-101] (in Russian).
2. Атыакшин Д.А., Бухвалов И.Б., Павлова Т.В., и др. Гистохимия: Учебно-методическое пособие. Воронеж: Научная книга; 2018 [Atyakshin DA, Bukhvalov IB, Pavlova TV, i dr. Gistokhimiya: Uchebno-metodicheskoe posobie. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2018] (in Russian).
3. Атыакшин Д.А., Бухвалов И.Б., Тиманн М. Протеазы тучных клеток в формировании специфического тканевого микроокружения: патогенетические и диагностические аспекты. Терапия. 2018; 6 (24): 128–40 [Atyakshin DA, Bukhvalov IB, Timann MT. Mast cell proteases in specific tissular microenvironment formation: pathogenetic and diagnostical aspects. Therapy. 2018 Nov 12;6\_2018(6):128–40] (in Russian).
4. Будневский А.В., Цветикова Л.Н., Андреев А.А., Карапитьян А.Р., Чуян А.О. Опыт применения мобильного приложения "+WOUNDDESK" для оценки динамики репарации экспериментальных ран. Моделирование, оптимизация и информационные технологии. 2017;1(16):1 [Budnevskiy AV, Andreev AA, Tsvetikova LN, Karapityan AR, Chuyan AO. The practice of use of +WOUNDDESK mobile application for evaluation of experimental wound repair dynamics. Modeling, Optimization and Information Technology. 2017;1(16):1] (in Russian).
5. Atiakshin D, Buchwalow I, SamoiloVA V, Tiemann M. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells. Histochemistry and Cell Biology. 2018 Mar 12;149(5):461–77. doi: 10.1007/s00418-018-1659-8
6. Atiakshin D, SamoiloVA V, Buchwalow I, Boecker W, Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. Histochemistry and Cell Biology. 2017 Feb 27;147(6):683–94. doi: 10.1007/s00418-017-1547-7/
7. Buchwalow IB, Boöcker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods. 1st ed. London: New York: Springer; 2010.
8. Farrington J, Seward EP, Peachell PT. Mast Cell Purification Protocols. Basophils and Mast Cells. 2020;49–56. doi: 10.1007/978-1-0716-0696-4\_3
9. Lyons DO, Pullen NA. Beyond IgE: Alternative Mast Cell Activation Across Different Disease States. International Journal of Molecular Sciences. 2020 Feb 22;21(4):1498. doi: 10.3390/ijms21041498
10. Katsoulis-Dimitriou K, Kotrba J, Voss M, Dudeck J, Dudeck A. Mast Cell Functions Linking Innate Sensing to Adaptive Immunity. Cells. 2020 Nov 25;9(12):2538. doi: 10.3390/cells9122538
11. Kim HS, Kawakami Y, Kasakura K, Kawakami T. Recent advances in mast cell activation and regulation. F1000Research. 2020 Mar 19;9:196. doi: 10.12688/f1000research.22037.1
12. Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A Review of the Contribution of Mast Cells in

- Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2019 Feb 7;58(3):298–312. doi: 10.1007/s12016-019-08729-w
13. *Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L*. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2019 Dec 12;58(3):342–65. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2
14. *Olivera A, Beaven MA, Metcalfe DD*. Mast cells signal their importance in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018 Aug;142(2):381–93. doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.034
15. *Varricchi G, Rossi FW, Galdiero MR, Granata F, Criscuolo G, Spadaro G, et al*. Physiological Roles of Mast Cells: Collegium Internationale Allergologicum Update 2019. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2019;179(4):247–61. doi: 10.1159/000500088
- 

Поступила в редакцию 1.10.2020  
Принята в печать 14.12.2020

Received 1.10.2020  
Accepted 14.12.2020

---

*Для цитирования:* Шишкина В.В., Ключкова С.В., Алексеева Н.Т., Соболева М.Ю., Есауленко Д.И., Антакова Л.Н., Герасимова О.А., Самодурова Н.Ю., Самойленко Т.В. Триптазный профиль популяции тучных клеток кожи крыс при раневом процессе. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2020; 9(4): 84–89. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-4-84-89  
*For citation:* Shishkina V.V., Klochkova S.V., Alexeeva N.T., Soboleva M.Yu., Esaulenko D.I., Antakova L.N., Gerasimova O.A., Samodurova N.Yu., Samoilenko T.V. Tryptase profile of the rat skin mast cell population during the wound healing. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020; 9(4): 84–89. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-4-84-89

---