

Гистохимические подходы к оценке участия тучных клеток в регуляции состояния волокнистого компонента межклеточного матрикса соединительной ткани кожи

Д. А. Атыкшин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, Воронеж, Россия

В статье представлены данные проведенного исследования эффективности различных комбинаций гистохимического окрашивания для выявления локализации тучных клеток с волокнистым компонентом соединительной ткани кожи лабораторных крыс линии Wistar. Наилучшие результаты получены при комбинации таких протоколов, как метахроматическая детекция тучных клеток в сочетании с импрегнацией серебром или пикрофуксином, окрашивание бриллиантовым зеленым с методикой ван Гизона или пикрофуксином, а также анилиновым синим с нейтральным красным. Предложенные варианты гистохимических протоколов могут быть использованы для анализа участия тучных клеток в ремоделировании межклеточного матрикса тканевого микроокружения при развитии адаптивных и патологических процессов. Полученные результаты способствуют расширению имеющихся в настоящее время научных представлений о закономерностях процесса фибриллогенеза в экстрацеллюлярном матриксе и предоставляют новые данные по таргетному участию компонентов секрета тучных клеток в молекулярных механизмах волокнообразования.

Ключевые слова: тучные клетки, межклеточный матрикс, коллагеновые волокна, фибриллогенез, гистохимия.

© D. A. Atyakshin, 2018

Voronezh N. N. Burdenko State Medical University, Voronezh, Russia

Histochemical Approaches to the Evaluation of the Participation of Mast Cells in the Regulation of the Fibrous Component of the Intercellular Matrix of Skin Connective Tissue

The article presents the data of study of the effectiveness of various combinations of histochemical staining to determine the co-location of mast cells with a fibrous component of the connective tissue of Wistar line laboratory rats skin. The best results are obtained with combination protocols such as metachromatically detection of mast cells in combination with the impregnation with silver or picrofuchsin, brilliant green coloring with the methodology of Van Gieson or picrofuchsin, and aniline blue neutral red. The proposed variants of histochemical protocols can be used to analyze the participation of mast cells in the remodeling of the cell matrix of tissue microenvironment in the development of adaptive and pathological processes. The obtained results contribute to the expansion of currently available scientific ideas about the laws of the process of fibrillogenesis in the extracellular matrix and provide new data on the targeted participation of the components of the mast cell secretome in the molecular mechanisms of fiber formation.

Key words: mast cells, intercellular matrix, collagen fibers, fibrillogenesis, histochemistry.

Введение

Вопросы регенерации элементов экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани издавна привлекали внимание исследователей. Совершенствование методических приемов позволяло постепенно выяснять новые закономерности функционирования интегративно-буферной метаболической среды как в физиологических, так и патологических условиях [2, 5, 8, 14, 16, 21, 26, 30]. Пионерские работы основоположников гистохимического направления в морфологии для выявления селективных компонентов межклеточного матрикса положили начало большому количеству исследований по детекции коллагеновых и эластических волокон, а также определению качественного состава аморфного компонента [4, 6, 9, 15]. Это позволило сделать многие гистохимические критерии со-

стояния экстрацеллюлярного матрикса диагностически значимыми для анализа адаптивных процессов и оценки развития патологических изменений тканей и органов. Использование электронной, сканирующей и конфокальной микроскопии открыло исключительные возможности в познании структурно-физиологических особенностей соединительной ткани на уровне надмолекулярных агрегатов [5, 21]. До сих пор проводимые работы в этом направлении предоставляют новые данные, расширяющие спектр вопросов регуляторных механизмов закономерностей обновления компонентов межклеточного матрикса [12, 21, 24]. Важным условием для решения этих задач является дальнейшая персонализация функций клеточного состава тканей в формировании состояния аморфного и волокнистого элементов. В частности, обсуждалась роль макрофагов в формировании ново-

Таблица

Варианты комбинаций протоколов гистохимического окрашивания

Номер комбинации, п. п.	Выявление компонентов межклеточного матрикса	Красители для детекции тучных клеток
1.	Импregnация серебром	Толуидиновый синий
2.	Пикрофуксин	Толуидиновый синий
3.	Методика ван Гизона	Толуидиновый синий
4.	Бриллиантовый зеленый*	Толуидиновый синий
5.	Анилиновый синий	Толуидиновый синий
6.	Пунцовый фуксин	Толуидиновый синий
7.	Эозин	Толуидиновый синий
8.	Методика ван Гизона	Бриллиантовый зеленый
9.	Анилиновый синий	Бриллиантовый зеленый
10.	Пикрофуксин	Бриллиантовый зеленый
11.	Эозин	Бриллиантовый зеленый
12.	Окрашивание по Вейгерту	Нейтральный красный
13.	Анилиновый синий	Нейтральный красный
14.	Бриллиантовый зеленый*	Нейтральный красный

Примечание: * – бриллиантовый зеленый может использоваться для окрашивания тучных клеток и волокнистых элементов соединительной ткани.

образованных коллагеновых волокон [31]. Одним из перспективных объектов местного гомеостаза в аспекте регуляции состояния межклеточного матрикса следует рассматривать тучные клетки (ТК), практически повсеместно распространенные в организме и формирующие органоспецифические популяции [11, 22]. Известно, что в коже ТК могут составлять 10% от представительства иммунокомпетентных клеток [19]. Функциональные особенности секрета позволяют ТК выступать в качестве индукторов и регуляторов важнейших физиологических и патологических процессов, среди которых координация гомеостаза тканевого микроокружения, реализация врожденного и адаптивного иммунитета, инициация и последующее развитие воспалительных и аллергических реакций, ангиогенез, клеточная пролиферация и др. [23, 32, 38]. Вместе с этим, многие секретируемые вещества, например, протеогликаны или протеазы, принимают как прямое, так и опосредованное участие в изменении структуры стромы внутренних органов, наделяя ТК особыми потенциями в аспекте ремоделирования межклеточного матрикса [10, 37]. Частая ассоциация показателей численности ТК с интенсивностью фиброзных изменений соответствующих органов позволила предположить их активную вовлеченность во внеклеточные этапы фибриллогенеза [18, 27, 33, 34]. Этим определяется важность разработки и внедрения в морфологическую практику методических приемов, способствующих конкретизации точек приложения селективных эффектов ТК в процессе образования коллагеновых волокон, а также более объективной оценке их вклада в развитие патологических процессов с прогрессирующим фиброзированием тканей. Однако использование отдельных гистохимических методик ограничивает потенциальную оценку локализации конкретных клеток соединительной ткани с волокнистым компо-

нентом, что значительно уменьшает информативность визуализируемых структур в отношении как понимания вопросов тканевой гистоархитектоники, так и интерпретации морфологических аспектов ремоделирования волокнистой матрицы тканевого микроокружения. В настоящей статье приводятся результаты комбинаций гистохимических протоколов для одновременной визуализации ТК с волокнистым компонентом межклеточного матрикса соединительной ткани кожи, некоторые из которых применены в морфологической практике впервые.

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлась кожа лабораторных крыс линии Wistar интактной группы и животных с моделированием ран мягких тканей с помощью иссечения кожи и подкожной клетчатки. Образцы кожи фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, обезжизивали, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200. В целях выявления ТК использовалось окрашивание толуидиновым синим, бриллиантовым зеленым и нейтральным красным. Для одновременной визуализации межклеточного матрикса соединительной ткани с ТК применялась методика импregnации серебром, окрашивание по ван Гизону, пикрофуксином и анилиновым синим [1, 3, 4, 7]. При этом выявление ТК предпочтительнее проводить после применения указанных красителей. Методика гистохимической детекции ТК и сопутствующих элементов межклеточного вещества с помощью бриллиантового зеленого (тетраэтил-4,4-диаминотрифенилметана оксалата) включала в себя окрашивание депарафинированных срезов кожи 1% раствором красителя с дальнейшим обезжизиванием в изопропанол, ксилоле и заключением в постоянную

монтажную среду. При окрашивании ядер гематоксилин Карацци необходимо использовать до бриллиантового зеленого в целях достижения лучшего качества микропрепарата. Изученные комбинации гистохимических методик представлены в таблице. Документирование полученных микропрепаратов выполнено на исследовательском микроскопе ZEISS Axio Imager.A2 с помощью цветной камеры Camera AxioCam 506 color.

Результаты и их обсуждение

Комбинация окрашивания толудиновым синим с импрегнацией серебром показала успешное сохранение метахроматического окрашивания ТК кожи крысы после реализации протокола по методу Фута (рис. 1). При этом выявление волокнистого компонента дермы сопровождается селективным контрастированием тонких ретикулярных или преколлагеновых волокон, окрашиваемых в черный цвет, тогда как более толстые и зрелые коллагеновые волокна приобретают различные оттенки коричнево-желтого цвета (рис. 1). Степень эффективности использования данного метода для оценки солокализации коллагеновых волокон с ТК зависит от гликозаминогликанов их секрета, количество и качественный состав которого определяет интенсивность метахромузии. В частности, данная комбинация оказалась более успешной при изучении лабораторных животных с моделированием раны кожи по сравнению с интактными крысами. Метахромузия ТК позволяла идентифицировать их прилегание к ретикулярным волокнам, содержащим коллаген III типа. Частота контактирования ТК с импрегнированными волокнами была различной и может представлять собой отдельную задачу морфологического анализа при изучении характеристик популяции ТК кожи. Часть ТК свободно располагалась в межклеточном матриксе, тогда как другая прилежала к импрегнированным волокнам, иногда образующим выраженную сеть (рис. 1-В, 1-Д). Обращал на себя внимание факт наличия на некоторых ТК тонких волокон, которые соприкасались с поверхностью плазмалеммы, либо начинались в микролюксе прилегания к клетке и продолжались в межклеточный матрикс тканевого микроокружения (рис. 1-Г, 1-Е). Аналогичные картины наблюдались и в случае формирования ТК обособленных многоклеточных групп, от цитолеммы которых отходили радиально и тангенциально ориентированные тонкие импрегнированные волокна (рис. 1-А, 1-Б). Кроме того, определенной закономерностью можно считать факт дегрануляции ТК механизмом экзоцитоза в области плазмалеммы, свободной от волокон (рис. 1-И). Иногда идентифицировались ТК, буквально вмонтированные в каркас ретику-

лярных волокон, охватывающий плазмалемму со всех сторон (рис. 1-В). Экзоцитоз гранул некоторых ТК сопровождался формированием минимального количества импрегнированных структур на поверхности клетки, отражая, возможно, морфологические проявления начальных этапов образования фибрилл из макрокомплексов тропоколлагена в межклеточном матриксе (рис. 1-Ж). В коже животных с моделированием раны по сравнению с интактной группой возрастала частота солокализации ТК с импрегнированными волокнистыми элементами.

Подходящей комбинацией оказалось окрашивание толудиновым синим и пикрофуксином благодаря достижению одновременного эффекта идентификации коллагеновых волокон в красных тонах и ТК в различных оттенках фиолетового цвета (рис. 2 А-Г). При этом толудиновый синий самостоятельно окрашивает ядра клеток, что позволяет одновременно визуализировать ТК не только с коллагеновыми волокнами, но и с ядрами других клеточных представителей тканевого микроокружения. Данное обстоятельство дает возможность оценивать солокализацию ТК с клетками фибробластического дифферона, прежде всего, фибробластами и фиброцитами (рис. 2-Б, 2-В). Следует отметить факт более частого прилегания ТК к фибробластам в коже животных с раневой поверхностью, что делает данную характеристику значимой для интерпретации активности ремоделирования межклеточного матрикса. Выполнение полного протокола метода ван Гизона с контрастированием ядер железным гематоксилином при комбинации с толудиновым синим приводило к более худшей визуализации ТК по сравнению с использованием пикрофуксина. Интересным наблюдением стало обнаружение гранул ТК после активного экзоцитоза, расположенных в форме направленной сети или разнообразных фигур, напоминая контурирование маршрутизации образования фибрилл в дерме кожи (рис. 2-Г). Сочетание толудинового синего с анилиновым синим предоставляло хорошие возможности детекции ТК на фоне элементов межклеточного матрикса (рис. 2-Д, Е). В то же время, несмотря на явную метахромузию цитоплазмы ТК, данную комбинацию не следует считать методом выбора по сравнению с другими протоколами в связи со слабым сродством анилинового синего к волокнистым элементам, а также ухудшением визуализации гранулярного компонента ТК. Комбинированное окрашивание с пунцовым фуксином характеризовалось излишним контрастированием межклеточного матрикса, однако было приемлемо для визуализации солокализации ТК с клетками фибробластического дифферона (рис. 2-Ж). Наименее подходящим оказалось совместное окрашивание срезов толудиновым синим и эозином.

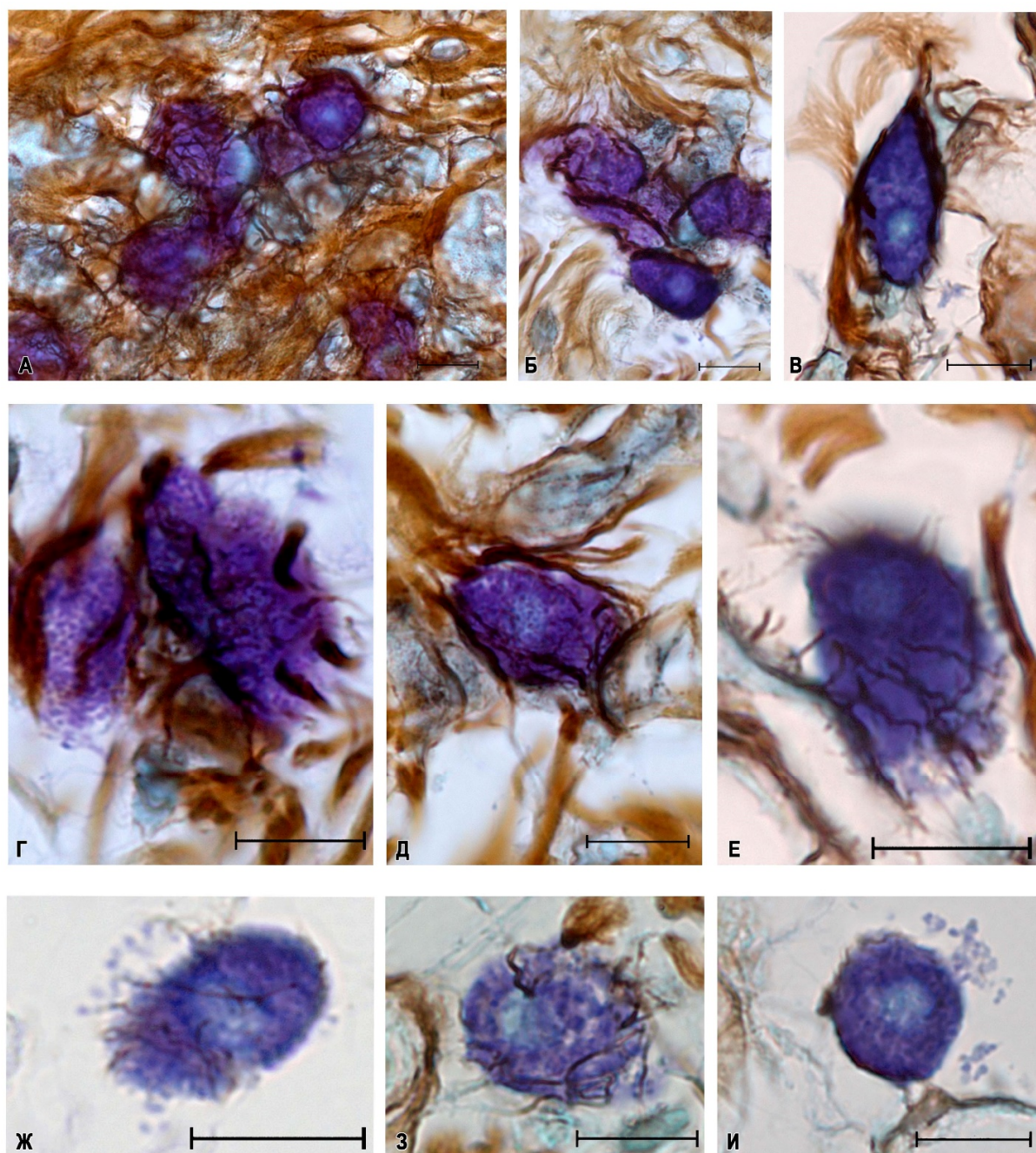


Рис. 1. Кожа крысы. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: комбинация импрегнации серебром с окрашиванием толуидиновым синим. Шкала – 10 мкм. А – формирование густой сети импрегнированных волокон в месте локализации тучных клеток; Б – преимущественная локализация импрегнированных волокон вокруг группы тучных клеток; В – тучная клетка плотно окружена ретикулярными волокнами, продолжающимися в коллагеновые; Г – разнокалиберные импрегнированные волокна, прилежащие к плазмалемме тучной клетки, часть из которых начинается от перицеллюлярной области межклеточного матрикса; Д – постепенный переход преколлагеновых волокон (черный цвет) в коллагеновые по направлению от тучной клетки; Е–З – начальные этапы фибрилlogenеза в межклеточном матриксе зоны регуляторного влияния секретома тучной клетки; И – дегрануляция тучной клетки механизмом экзоцитоза в области плазмалеммы, не соприкасающейся с волокнистым компонентом матрикса.

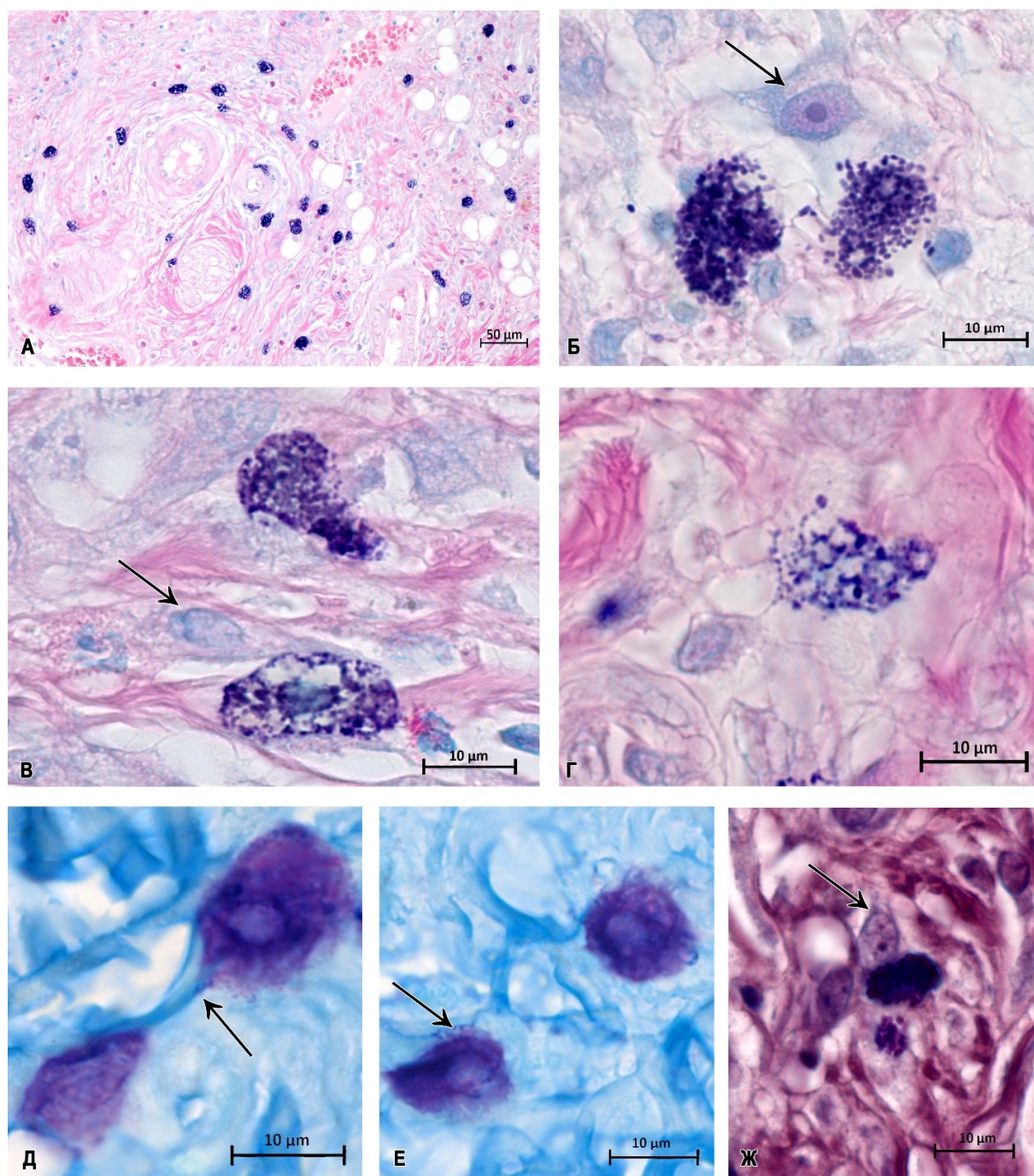


Рис. 2. Кожа крысы. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание толуидиновым синим в комбинации с пикрофуксином (А–Г), анилиновым синим (Д–Е) и пунцовым фуксином (Ж). А – общий вид тучных клеток на фоне волокнистого компонента межклеточного матрикса соединительной ткани кожи; Б – солокализация тучных клеток с фибробластом (отмечен стрелкой) и коллагеновыми волокнами (окрашены в красный цвет); В – прилегание тучной клетки к фиброциту (отмечен стрелкой); Г – создание индуктивного поля фибриллогенеза гранулами тучной клетки в виде ячеистой сети; Д–Е – солокализация тучных клеток с волокнистым компонентом дермы, экзоцитоз гранул с перифибриллярным расположением (отмечен стрелкой); Ж – прилегание тучной клетки к фибробласту (отмечен стрелкой).

Приступая к результатам окрашивания бриллиантовым зеленым в комбинации с другими гистохимическими протоколами следует отметить его высокую эффективность для визуализации ТК кожи (рис. 3-А). При контрастировании ядер гематоксилином Майера ТК хорошо визуализируются в бирюзовых тонах, количество которых на единицу площади ткани сопоставимо с результатами окрашивания толудиновым синим (рис. 3-Б). Использование комбинации пикрофуксина с бриллиантовым зеленым позволяет достичь успешного контрастирования ТК на фоне окрашенных в красный цвет коллагеновых волокон (рис. 3-В, Г). Поскольку бриллиантовый зеленый обладает слабым сродством к ядерным структурам и быстро вымывается при процедуре дифференцировки, лучше проводить его сочетание с классической методикой ван Гизона, при которой ядра окрашиваются железным гематоксилином Вейгерта (рис. 3-В). В то же время, при тщательном микроскопировании визуализация контуров ядер других клеток возможна и без докрасивания (рис. 3-Г). Тропность бриллиантового зеленого к структурам волокнистого компонента межклеточного матрикса создает методические условия для его комбинации с толудиновым синим и предоставляет дополнительную информацию при оценке солокализации ТК с волокнами (рис. 3-Д). Кроме того, данная комбинация может предоставлять сведения относительно качественного состава секрета, поскольку обнаружено различное сродство его компонентов к красителям (рис. 3-Е, Ж). В то же время, комбинация анилинового синего с бриллиантовым зеленым создавала затруднения в детекции бирюзовых ТК на окрашенных в голубые тона структурах межклеточного матрикса, что не позволяет считать данный протокол пригодным для использования в гистохимической практике. Аналогично, окрашивание бриллиантовым зеленым не оказалось эффективным в сочетании с эозином, вызывающим неселективное диффузное прокрашивание основных структур кожи.

Применение нейтрального красного в качестве самостоятельного реагента при выявлении ТК недостаточно удобно в связи с его способностью к контрастированию клеточных ядер, что несколько маскирует визуализацию окрашенных в аналогичные тона гранул. Однако в некоторых случаях это позволяет визуализировать солокализацию ТК с клетками фибробластического дифферона (рис. 4-А). Достаточно информативной показала себя комбинация окрашивания с анилиновым синим, позволяя оценивать солокализацию волокон с ТК кожи (рис. 4-Б–Г). Желательно избегать чрезмерного окрашивания срезов кожи анилиновым синим, приводящего к появлению трудно дифференцируемого нежелательного фона. Сочетание протокола методи-

ки по Вейгерту с нейтральным красным позволяет успешно визуализировать ТК и эластические волокна (рис. 4-Д, Е). Несмотря на малое содержание в дерме кожи эластических волокон по сравнению с коллагеновыми, некоторые ТК контактируют с ними. При исполнении отдельного протокола окрашивания по Вейгерту ТК также визуализируются в темно-фиолетовых тонах, однако докрасивание нейтральным красным позволяет существенно улучшить качество их выявления. Сочетание нейтрального красного и бриллиантового зеленого приводит к темному окрашиванию ТК вследствие сочетанного наложения красителей на секреторный материал.

Для оценки степени участия ТК в фибрилlogenезе, характерном для формирования волокон, содержащих коллагены I и III типов, необходимо принимать во внимание имеющиеся сведения о внутриклеточном и экстрацеллюлярном этапах их биогенеза. Полученные результаты использованных гистохимических протоколов, направленных на одновременное выявление ТК и межклеточных структур свидетельствуют как о возможности непосредственного индуктивного влияния ТК на клетки фибробластического дифферона соединительной ткани, так и их активном участии в процессе внеклеточной сборки коллагеновых волокон из тропоколлагеновых, микрофибриллярных и фибриллярных субъединиц. Начало биогенеза молекулярных субъединиц волокон происходит внутриклеточно (прежде всего, в фибробластах) в результате котрансляционных и посттрансляционных модификаций с формированием тройной спирали элементарной молекулы коллагена [5]. Дальнейший процессинг коллагеновых белков связан с перемещением проколлагена из ЭПС в комплекс Гольджи, откуда они секретируются в межклеточный матрикс. В то же время имеются отдельные работы, свидетельствующие о возможности внутриклеточного формирования микрофирилл в пределах грануляционной ткани при гиперпродукции коллагеновых белков [28]. В экстрацеллюлярном матриксе происходит последовательная сборка из мономерных субъединиц макромолекулярных комплексов коллагена с дальнейшим линейным и латеральным ростом волокна [39]. Первые этапы созревания коллагена за пределами цитоплазмы фибробласта для реализации фибрилlogenеза связаны с отщеплением amino- и карбокситерминальных пропептидов и формированием тропоколлагена. Объединение первичных агрегатов молекул тропоколлагена является точкой отсчета в образовании коллагеновых фибрилл, которые могут содержать макромолекулы разных типов. Например, коллаген III типа локализован на поверхности фибрилл, представленных коллагеном I типа [5]. Также известно, что коллаген V типа входит в цен-

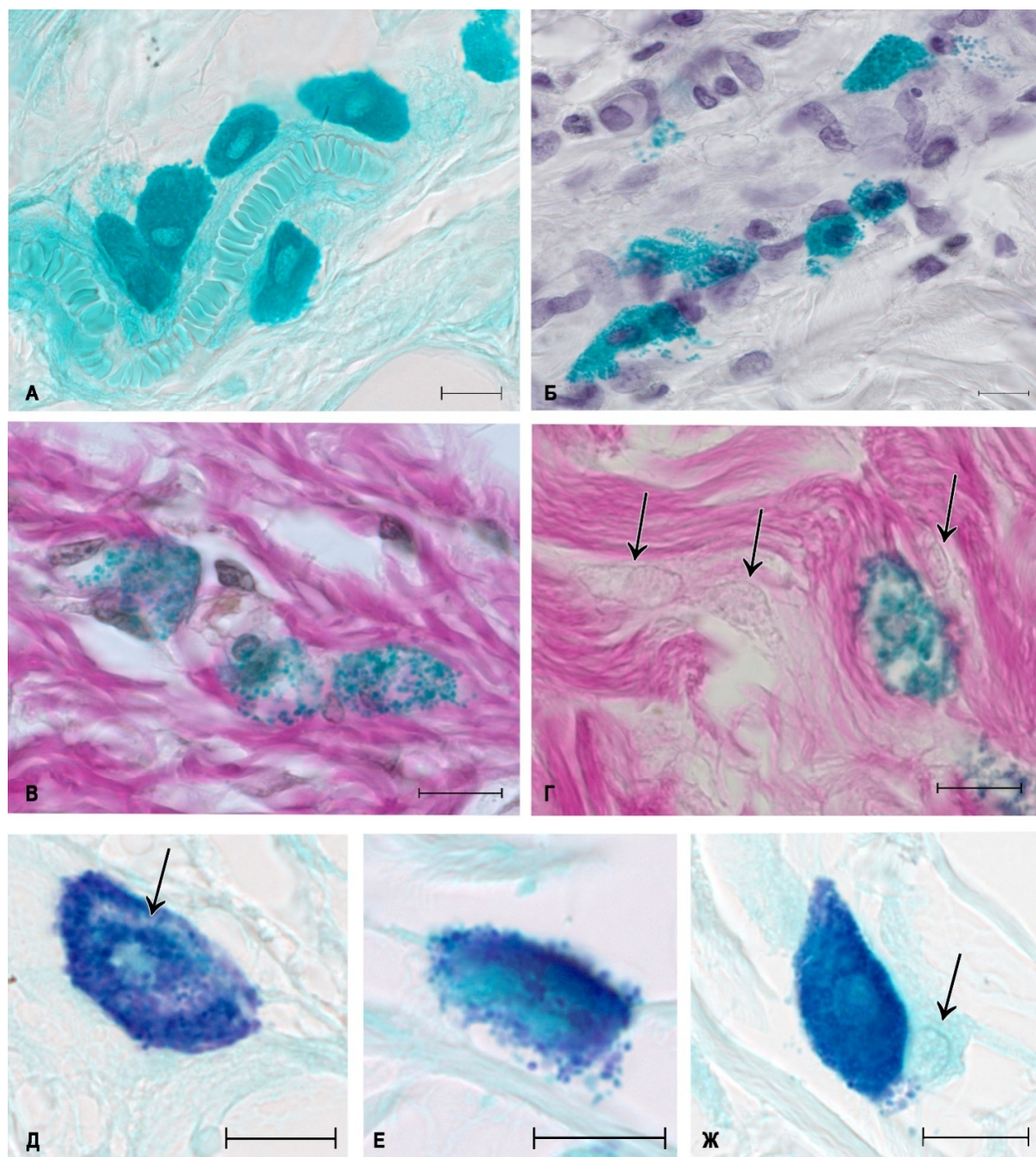


Рис. 3. Кожа крысы. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание бриллиантовым зеленым (А), комбинация окрашивания бриллиантовым зеленым с гематоксилином Майера (Б), методикой ван Гизона (В), пикрофуксином (Г), толуидиновым синим (Д–Ж). Шкала – 10 мкм. А – периваскулярная локализация тучных клеток; Б – тучные клетки хорошо визуализируются в дерме кожи после контрастирования ядер гематоксилином; В – тучные клетки окружены развитым волокнистым компонентом; Г – соприкосновение секретирующей тучной клетки с представителями фибробластического дифферона (отмечены стрелками); Д – в цитоплазме тучной клетки определяются контуры коллагенового волокна (отмечено стрелкой). Е – различное сродство секретора тучной клетки к бриллиантовому зеленому и толуидиновому синему. Ж – прилегание тучной клетки к фибробласту (отмечен стрелкой).

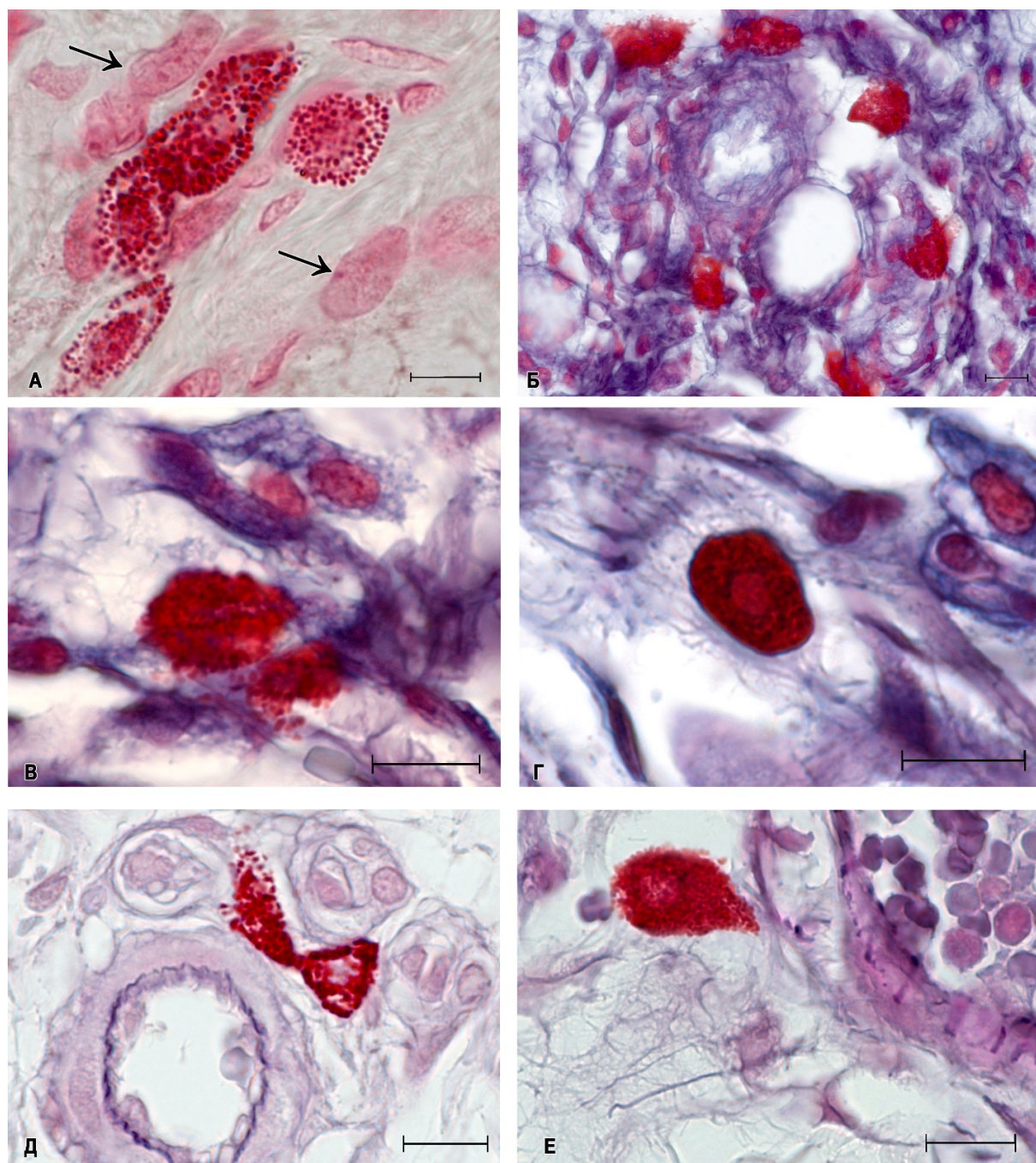


Рис. 4. Кожа крысы. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание нейтральным красным (А), комбинация окрашивания нейтральным красным с анилиновым синим (Б–Г) и методикой Вейгерта (Д–Е). Шкала – 10 мкм. А – сокоализация тучных клеток с клетками фибробластического дифферона (отмечены стрелкой); Б–В – различные варианты расположения тучных клеток и волокнистых элементов межклеточного матрикса; Г – наличие большого количества тонких волокнистых структур в перичеселлярном пространстве тучной клетки. Д–Е – одновременная идентификация тучных клеток и эластических волокон.

тральные области фибриллы, и отвечает за регуляцию роста волокна в латеральном направлении, определяя процессы утолщения [13]. Кроме того, на поверхности фибрилл должны присутствовать молекулы нефибриллярных коллагенов, которые необходимы для организации взаимодействия с другими структурными элементами межклеточного матрикса [24]. Вместе с ними на процесс формирования коллагеновых фибрилл оказывают существенную индукцию малые протеогликаны (декорин, бигликан, фибромодулин и др.), которые располагаются на поверхности волокон и участвуют в интеграции с компонентами основного вещества межклеточного матрикса [5] с формированием завершающих гистопографических параметров.

В проведенной работе получены убедительные морфологические свидетельства локализации некоторых ТК с фибробластами. Данный факт может являться одним из структурных критериев оценки регуляторного влияния ТК на фибробласты или фиброциты в аспекте биогенеза коллагена и других белков аморфного компонента межклеточного матрикса. Поскольку до настоящего времени остаются до конца неясными механизмы влияния клеток тканевого микроокружения на процессы фибрилlogenеза. Полученные в выполненном исследовании факты можно трактовать как подтверждение активного участия ТК в индуктивном изменении параметров тканевого микроокружения. Известно, что полимеризация тропоколлагеновых макромолекулярных комплексов в микрофибриллы, фибриллы и волокна в физиологических условиях начинает происходить автономно после достижения строго определенных молекулярных и химических параметров межклеточного матрикса. Большое значение в этом процессе играет электростатическая природа взаимодействия полипептидных цепей соприкасающихся макромолекул. Молекулы коллагена, покидающие цитоплазму фибробласта, имеют размеры около 300 нм и толщину около 1.4 нм, и располагаются перичеллюлярно, образуя молекулярные скопления – мезофазы. В данных микролокусах межклеточного матрикса молекулы расположены параллельно друг другу, разделены молекулами воды, формируя так называемые тактоиды или жидкие кристаллы [5, 24]. Молекулы тропоколлагена удалены друг от друга на десятки нанометров, сохраняя взаимное притяжение. Для формирования надмолекулярных агрегатов необходимо дальнейшее сближение молекул тропоколлагена, которое происходит по нескольким причинам. Во-первых, может существенно увеличиться концентрация тропоколлагена в межклеточной среде при возрастании биосинтетической активности фибробласта или других клеток. С другой стороны, в среде расположения так-

тоидов может повыситься концентрация гликозаминогликанов, которые способны изменять содержание воды и способствовать сближению молекул тропоколлагена до начала полимеризации. Кроме того, локально изменяются уровень рН, осмотическое давление, концентрация ионов-комплексобразователей и др. компонентов межклеточного вещества [5, 24, 25]. В результате, возникающие силы сцепления между молекулами тропоколлагена приводят к формированию надмолекулярных образований – протофибрилл, которые представляют собой нити из 4–5 молекул коллагена. Таким образом, прилегание ТК к фибробластам может свидетельствовать о наличии определенных потенциалов в изменении равновесного состояния, в частности, в инициации процесса фибрилlogenеза. Локализация ТК около волокон может свидетельствовать об участии секретируемых ими протеогликанов в утолщении фибрилл. Дегрануляция ТК может сопровождаться достижением необходимой концентрации сигнальных и структурных молекул в пределах строго ограниченного микролокуса. Кроме того, гранулы ТК могут становиться своеобразными «проводниками» точек инициации для полимеризации молекул коллагена (рис. 2-Г).

Микрофибриллы формируются путем объединения 4–5 протофибрилл, прилежащих друг к другу латеральными поверхностями, упорядоченность которых достигается чередованием участков с преобладанием положительных либо отрицательных зарядов. Такая закономерность помогает увеличивать толщину микрофибрилл. Следует также отметить, что селективная агрегация микрофибрилл в фибриллу происходит благодаря определенному взаимодействию с гликозаминогликанами, присутствию люмикана, декорина, дерматан сульфата и др. [5, 24]. В результате проведенного анализа электростатического взаимодействия между гепарином и коллагеном были показаны сайты полимеризации и предложен молекулярный механизм влияния гликозаминогликанов на морфологию коллагеновых фибрилл [29]. С учетом обилия протеогликанов в секрете ТК [37] можно предположить их активное участие в упорядоченном структурировании коллагеновых фибрилл. Разнообразные механизмы избирательной секреции компонентов секрета, включая протеогликаны, позволяют ТК принимать участие в молекулярных механизмах формирования объемных параметров элементов волокнистого компонента, в т.ч. утолщении, удлинении и гистопографических особенностей, что подтверждается морфологическими картинками (рис. 2Д, Е, 3-Д). Кроме того, сопровождение и регуляция состояния сосудов микроциркуляторного русла позволяют ТК принимать опосредованное участие в динамическом структурировании ткани [24].

В дальнейшем микрофибриллы аналогичным механизмом могут интегрироваться с образованием фибриллы. Протеогликаны с большой молекулярной массой участвуют в осмотическом удалении воды, разделяющей отдельные фибриллы, тогда как менее крупные способны связывать фибриллы в единый комплекс – волокно. В конечном итоге, величина волокна, его ультраструктурные и морфопографические характеристики (толщина, количество фибрилл в его составе, форма) зависят от условий тканевого микроокружения, биомеханической нагрузки на ткани органа, параметров местного гомеостаза, а также интегральных свойств комплексов коллагена и гликозаминогликанов. Коллагеновые волокна могут обладать размером от 0.5 до 20 мкм, тогда как их длина не определена [5].

Результаты проведенной работы свидетельствуют о тесной вовлеченности ТК в процесс фибриллогенеза, что особенно заметно в условиях регенерации раневой поверхности кожи. Информативной комбинацией для изучения вклада ТК в формирование фибрилл является окрашивание толудиновым синим и импрегнацией серебром. Очевидно активное участие ТК в изменении состояния тканевого микроокружения, в частности, секреции гликозаминогликанов, что способствует инициации фибриллогенеза с дальнейшим формированием волокна в соответствии с условиями динамического структурирования.

Таким образом, некоторые предложенные комбинации гистохимических протоколов являются достаточно информативными для исследования регуляторного механизма формирования коллагеновых волокон в экстрацеллюлярном матриксе с участием ТК. Следует обратить внимание, что секреторная активность ТК способна определять локализацию образуемого коллагенового волокна. В частности, следует говорить не только о росте волокна в толщину или длину, но и об индукции фибриллогенеза в необходимом направлении тканевого микроокружения. Данное явление «гистотопографической маршрутизации» может определяться локализацией ТК в строго определенной последовательности в ограниченном объеме ткани. Остается недостаточно ясным механизм синхронизации секреторной деятельности множества ТК в объеме ткани и строго упорядоченной локализацией формирующегося волокна в соответствии с морфогенетическими условиями. В качестве предположения можно предложить алгоритм детекции роста коллагенового волокна в длину и соответствующей дозированной секрецией компонентов ТК в межклеточное вещество. Уникальная регуляция секреторных механизмов ТК позволяет быстро и избирательно доставлять в экстрацеллюлярный матрикс необходимое количество продуктов биосинтетической активности

в соответствии с триггерными стимулами тканевого микроокружения, детектируемых соответствующим рецепторным аппаратом [35, 36]. При этом ТК способны адаптировать размер выделяемых гранул или экзосом в соответствии с активизацией типа и количества синапсов дегрануляции и проводить точную настройку масштаба секреции [20]. Морфологическим подтверждением такого механизма можно считать гранулы ТК, свободно локализованные в интегративно-буферной метаболической среде и обладающие автономностью существования в течение некоторого времени. Часть гранул может контактировать с волокнистыми структурами, что является свидетельством их участия в процессе ремоделирования при отсутствии самой ТК. Кроме того, можно предположить, что ТК способны активно проводить дезорганизацию волокнистых структур с помощью секреции матричных металлопротеиназ либо их активизации в экстрацеллюлярном матриксе с помощью протеаз, локализованных в секретоме. При этом экспрессия триптаза и химаза в ТК динамично меняется в соответствии с имеющимися задачами по ремоделированию межклеточного вещества [10, 17].

Заключение

Комбинация гистохимических методов, направленных на одновременную селективную детекцию тучных клеток и волокнистых элементов межклеточного матрикса, позволяет выявлять новые детали механизмов ремоделирования соединительной ткани кожи. Достаточная простота идентификации тучных клеток открывает исследователям широкие перспективы для изучения механизмов фибриллогенеза в тканевом микроокружении с участием клеточного компонента. Полученные результаты могут быть использованы как в оценке адаптивных процессов, так и в диагностике патологических состояний для определения степени их прогрессирования.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность

Автор благодарит лаборанта НИИ ЭБМ ВГМУ им. Н.Н. Бурденко В. Мешкову за практическое содействие в разработке воспроизводимых протоколов комбинированного окрашивания тучных клеток и структур соединительной ткани.

Список литературы

1. Атякин Д. А., Бухвалов И. Б., Тиманн М. Гистохимия ферментов. Воронеж; 2017. 120.
2. Елисеев В. Г. Соединительная ткань: гистофизиологические очерки. М.: Медгиз; 1961. 461.

3. Коржевский Д. Э. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство. СПб.; 2013. 127.
4. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия: пер. с англ. чл.-корр. АМН Португалова В.В., ред. М.: Мир; 1969. 845.
5. Омельяненко Н. П., Слуцкий Л. И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). Акад. РАН и РАМН Миронов С.П., ред. М.: Известия; 2009. 1: 380.
6. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и практическая: пер. с англ. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. 962.
7. Саркисов Д. С., Перов Ю. Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. 544.
8. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина; 1981. 312.
9. Фукс Б. Б., Фукс Б. И. Очерки морфологии и гистохимии соединительной ткани. Л.: Медицина; 1968. 216.
10. Atiakshin D., Buchwalow I., Samoilova V., Tiemann M. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells. *Histochem Cell Biol.* 2018; 149(5): 461–477.
11. Atiakshin D., Samoilova V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. *Histochem Cell Biol.* 2017; 147(6): 683–694.
12. Bancelin S., Decenciere E., Machairas V., Albert C., Coradin T., Schanne-Klein M. C., Aime C. Fibrillogenesis from nanosurfaces: multiphoton imaging and stereological analysis of collagen 3D self-assembly dynamics. *Soft Matter.* 2014; 10(35): 6651–6657.
13. Birk D. E., Fitch J. M., Babiarz J. P., Doane K. J., Linsenmayer T. F. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 1990; 95(4): 649–657.
14. Bornstein P., Sage E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology.* 2002; 14(5): 608–616.
15. Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. The contribution of Paul Ehrlich to histochemistry: a tribute on the occasion of the centenary of his death. *Virchows Arch.* 2015; 466: 111–116.
16. Byers P. H. Collagens: building blocks at the end of the development line. *Clinical genetics.* 2000; 58(4): 270–279.
17. Chen H., Xu Y., Yang G., Zhang Q., Huang X., Yu L., Dong X. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2017; 14(5): 4438–4442.
18. Conti P., Caraffa A., Mastrangelo F., Tettamanti L., Ronconi G., Frydas I., Kritas S. K., Theoharides T. C. Critical role of inflammatory mast cell in fibrosis: Potential therapeutic effect of IL-37. *Cell Prolif.* 2018; e12475. doi: 10.1111/cpr.12475.
19. Dwyer D. F., Barrett N. A., Austen K. F. Immunological Genome Project C: Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. *Nat Immunol.* 2016; 17: 878–887.
20. Espinosa E., Valitutti S. New roles and controls of mast cells. *Curr Opin Immunol.* 2018; 50: 39–47.
21. Fibrosis: Methods and Protocols. Edited by Laure Rittie. 2017. 530.
22. Frossi B., Mion F., Sibilano R., Danelli L., Pucillo C. E. M. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev.* 2018; 282(1): 35–46.
23. Galli S. J., Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci.* 2008; 49: 7–19.
24. Ghazanfari S., Khademhosseini A., Smit T. H. Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues. *Biomaterials.* 2016; 97: 74–84.
25. Harris J. R., Lewis R. J. The collagen type I segment long spacing (SLS) and fibrillar forms: Formation by ATP and sulphonated diazo dyes. *Micron.* 2016; 86: 36–47.
26. Hitchcock A. M., Yates K. E., Costello C. E., Zaia J. Comparative glycomics of connective tissue glycosaminoglycans. *Proteomics.* 2008; 8(7): 1384–1397.
27. Hügle T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. *Swiss Med Wkly.* 2014; 144: w13999. doi: 10.4414/sm.w.2014.13999.
28. Ina K., Kitamura H., Tatsukawa S., Miyazaki T., Abe H., Fujikura Y. Intracellular formation of collagen microfibrils in granulation tissue. *Exp Mol Pathol.* 2005; 79(3): 244–248.
29. Kulke M., Geist N., Friedrichs W., Langel W. Molecular dynamics simulations on networks of heparin and collagen. *Proteins.* 2017; 85(6): 1119–1130.
30. Loerakker S., Obbink-Huizer C., Baaijens F. P. A physically motivated constitutive model for cell-mediated compaction and collagen remodeling in soft tissues. *Biomech Model Mechanobiol.* 2014; 13(5): 985–1001.
31. Muldashev E. R., Muslimov S. A., Musina L. A., Nigmatullin R. T., Lebedeva A. I., Shangina O. R., Khasanov R. A. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank.* 2005; 6(2): 99–107.
32. Olivera A., Beaven M. A., Metcalfe D. D. Mast cells signal their importance in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142(2): 381–393.
33. Overed-Sayer C., Rapley L., Mustelin T., Clarke D. L. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? *Front Pharmacol.* 2014; 4: 174.
34. Pincha N., Hajam E. Y., Badarinath K., Batta S. P. R., Masudi T., Dey R., Andreasen P., Kawakami T., Samuel R., George R., Danda D., Jacob P. M., Jamora C. PA11 mediates fibroblast-mast cell interactions in skin fibrosis. *J Clin Invest.* 2018; 128(5): 1807–1819. doi: 10.1172/JCI99088.
35. Redegeld F. A., Yu Y., Kumari S., Charles N., Blank U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev.* 2018; 282(1): 87–113.
36. Robida P. A., Puzzovio P. G., Pahima H., Levi-Schaffer F., Bochner B. S. Human eosinophils and mast cells: Birds of a feather flock together. *Immunol Rev.* 2018; 282(1): 151–167.
37. Ronnberg E., Melo F. R., Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem.* 2012; 60: 950–962.
38. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14: 478–494.
39. Wu K., Li G. Investigation of the Lag Phase of Collagen Fibrillogenesis Using Fluorescence Anisotropy. *Appl Spectrosc.* 2015; 69(10): 1121–1128.

References

- Atyakshin D.A., Bukhvalov I.B., Timann M. Gistokhimiya fermentov [Histochemistry of enzymes]. Voronezh; 2017. 120 (in Russian).
- Eliseev V.G. Soedinitel'naya tkan': gisto-fiziologicheskie ocherki [Connective tissue: histophysiological essays]. Moscow: Medgiz; 1961. 461 (in Russian).
- Korzhevskii D.E. Morfologicheskaya diagnostika. Podgotovka materiala dlya gistologicheskogo issledovaniya i elektronnoi mikroskopii: rukovodstvo [Morphological diagnosis. Preparation of material for histological examination and electron microscopy: handbook]. Saint-Petersburg; 2013. 127 (in Russian).
- Lilli R. Patogistologicheskaya tekhnika i prakticheskaya gistokhimiya: per. s angl [Histopathological technique and practical histochemistry]. Portugalov V.V. ed. Moscow: Mir; 1969. 845 (in Russian).
- Omelyanenko N.P., Slutskii L.I. Soedinitel'naya tkan' (gistofiziologiya i biokhimiya) [Connective tissue (histophysiology and biochemistry)]. Mironov S.P. ed. Moscow: Izvestiya; 2009. 1: 380 (in Russian).
- Pirs E. Gistokhimiya. Teoreticheskaya i prakticheskaya: per. s angl [Histochemistry. Theoretical and practical]. Moscow: Izd-vo inostrannoi literatury, 1962. 962 (in Russian).
- Sarkisov D.S., Perov Yu.L. Mikroskopicheskaya tekhnika: rukovodstvo [Microscopic technique: handbook]. Moscow: Meditsina; 1996. 544 (in Russian).
- Serov V.V., Shekhter A.B. Soedinitel'naya tkan' (funktsional'naya morfologiya i obshchaya patologiya) [Connective tissue (functional morphology and General pathology)]. Moscow: Meditsina; 1981. 312 (in Russian).
- Fuks B.B., Fuks B.I. Ocherki morfologii i gistokhimii soedinitel'noi tkani [Essays on morphology and histochemistry of connective tissue]. Leningrad: Meditsina; 1968. 216 (in Russian).
- Atiakshin D., Buchwalow I., Samoilova V., Tiemann M. Trypsin as a polyfunctional component of mast cells. *Histochem Cell Biol.* 2018; 149(5): 461–477.
- Atiakshin D., Samoilova V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. *Histochem Cell Biol.* 2017; 147(6): 683–694.
- Bancelin S., Decenciere E., Machairas V., Albert C., Coradin T., Schanne-Klein M.C., Aime C. Fibrillogenesis from nanosurfaces: multiphoton imaging and stereological analysis of collagen 3D self-assembly dynamics. *Soft Matter.* 2014; 10(35): 6651–6657.
- Birk D.E., Fitch J.M., Babiarz J.P., Doane K.J., Linsenmayer T.F. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J CellSci.* 1990; 95(4): 649–657.
- Bornstein P., Sage E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology.* 2002; 14(5): 608–616.
- Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. The contribution of Paul Ehrlich to histochemistry: a tribute on the occasion of the centenary of his death. *Virchows Arch.* 2015; 466: 111–116.
- Byers P.H. Collagens: building blocks at the end of the development line. *Clinical genetics.* 2000; 58(4): 270–279.
- Chen H., Xu Y., Yang G., Zhang Q., Huang X., Yu L., Dong X. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *ExpTher Med.* 2017; 14(5): 4438–4442.
- Conti P., Caraffa A., Mastrangelo F., Tettamanti L., Ronconi G., Frydas I., Kritas S. K., Theoharides T. C. Critical role of inflammatory mast cell in fibrosis: Potential therapeutic effect of IL-37. *Cell Prolif.* 2018; e12475. doi: 10.1111/cpr.12475.
- Dwyer D. F., Barrett N. A., Austen K. F. Immunological Genome Project C: Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. *Nat Immunol.* 2016; 17: 878–887.
- Espinosa E., Valitutti S. New roles and controls of mast cells. *Curr Opin Immunol.* 2018; 50: 39–47.
- Fibrosis: Methods and Protocols. Edited by Laure Rittie. 2017. 530.
- Frossi B., Mion F., Sibilano R., Danelli L., Pucillo C. E. M. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev.* 2018; 282(1): 35–46.
- Galli S. J., Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci.* 2008; 49: 7–19.
- Ghazanfari S., Khademhosseini A., Smit T. H. Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues. *Biomaterials.* 2016; 97: 74–84.
- Harris J. R., Lewis R. J. The collagen type I segment long spacing (SLS) and fibrillar forms: Formation by ATP and sulphonated diazo dyes. *Micron.* 2016; 86: 36–47.
- Hitchcock A. M., Yates K. E., Costello C. E., Zaia J. Comparative glycomics of connective tissue glycosaminoglycans. *Proteomics.* 2008; 8(7): 1384–1397.
- Hügler T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. *Swiss Med Wkly.* 2014; 144: w13999. doi: 10.4414/sm.w.2014.13999.
- Ina K., Kitamura H., Tatsukawa S., Miyazaki T., Abe H., Fujikura Y. Intracellular formation of collagen microfibrils in granulation tissue. *ExpMol-Pathol.* 2005; 79(3): 244–248.
- Kulke M., Geist N., Friedrichs W., Langel W. Molecular dynamics simulations on networks of heparin and collagen. *Proteins.* 2017; 85(6): 1119–1130.
- Loerakker S., Obbink-Huizer C., Baaijens F. P. A physically motivated constitutive model for cell-mediated compaction and collagen remodeling in soft tissues. *Biomech Model Mechanobiol.* 2014; 13(5): 985–1001.
- Muldashev E. R., Muslimov S. A., Musina L. A., Nigmatullin R. T., Lebedeva A. I., Shangina O. R., Khasanov R. A. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank.* 2005; 6(2): 99–107.
- Olivera A., Beaven M. A., Metcalfe D. D. Mast cells signal their importance in health and disease. *J Allergy ClinImmunol.* 2018; 142(2): 381–393.
- Overed-Sayer C., Rapley L., Mustelin T., Clarke D. L. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? *Front Pharmacol.* 2014; 4: 174.
- Pincha N., Hajam E. Y., Badarinath K., Batta S. P. R., Masudi T., Dey R., Andreasen P.,

- Kawakami T., Samuel R., George R., Danda D., Jacob P. M., Jamora C. PAI1 mediates fibroblast-mast cell interactions in skin fibrosis. *J Clin Invest.* 2018; 128(5): 1807–1819. doi: 10.1172/JCI99088.
35. Redegeld F. A., Yu Y., Kumari S., Charles N., Blank U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev.* 2018; 282(1): 87–113.
36. Robida P. A., Puzzovio P. G., Pahima H., Levi-Schaffer F., Bochner B. S. Human eosinophils and mast cells: Birds of a feather flock together. *Immunol Rev.* 2018; 282(1): 151–167.
37. Ronnberg E., Melo F. R., Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem.* 2012; 60: 950–962
38. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14: 478–494.
39. Wu K., Li G. Investigation of the Lag Phase of Collagen Fibrillogenesis Using Fluorescence Anisotropy. *Appl Spectrosc.* 2015; 69(10): 1121–1128.

Сведения об авторе

Атякшин Дмитрий Андреевич – д-р мед. наук, доцент, директор НИИ экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10. E-mail: earth-mars38@yandex.ru

Поступила в редакцию 6.08.2018 г.

Для цитирования: Атякшин Д.А. Гистохимические подходы к оценке участия тучных клеток в регуляции состояния волокнистого компонента межклеточного матрикса соединительной ткани кожи. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2018; 7(3): 100–112. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-100-112.

For citation: Atyakshin D.A. Histochemical approaches to the evaluation of the participation of mast cells in the regulation of the fibrous component of the intercellular matrix of skin connective tissue. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2018; 7(3): 100–112. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-100-112.