

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ◊ ORIGINAL ARTICLE

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-14-24

УДК 616.718-002.4-018-07

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Д. А. Атыкшин, М. В. Аралова, А. А. Глухов, 2019

## Молекулярно-биологические особенности секретома тучных клеток кожи нижних конечностей при формировании трофических язв различной этиологии

Д. А. Атыкшин\*, М. В. Аралова, А. А. Глухов

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

**Целью** работы явилось исследование особенностей секретома тучных клеток (ТК) кожи нижних конечностей при формировании трофических язв различной этиологии.

**Материал и методы.** Проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследование фрагментов кожи пациентов с венозными, артериальными и нейротрофическими язвами. Применили окраску толуидиновым синим, по Романовскому-Гимзе, а также иммуногистохимические протоколы для детекции триптазы и химазы ТК, включая одновременное маркирование. Анализ молекулярно-биологических особенностей секретома ТК проводили на микроскопе ZEISS Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Germany).

**Результаты.** В коже пациентов с хронической артериальной и, в большей степени, венозной недостаточностью возрастила численность протеаза-содержащих ТК, в которых увеличивалась экспрессия химазы по сравнению с аналогичными показателями в норме. Активизация секреторных путей протеаз ТК проявлялась как посредством выведения отдельных триптаза- и химаза-позитивных гранул во внеклеточный матрикс, так и образованием отдельных фрагментов цитоплазмы. Группа пациентов с нейротрофическими язвами характеризовалась наиболее выраженным возрастанием объема популяции ТК в коже с увеличением их размеров, активности секреторных путей и развитием признаков полиморфизма. Инфильтрация дермы кожи ТК распространялась на эпидермис с интенсивной дегрануляцией в области плотных контактов и межклеточного матрикса базального и шиповатого слоев.

**Заключение.** Специфические протеазы секретома ТК могут быть использованы при хронических язвах нижних конечностей как информативный маркер степени прогрессирования воспаления кожи не только в диагностических целях и для мониторинга эффективности терапии, но и в качестве перспективной мишени фармакологических препаратов.

**Ключевые слова:** трофические раны, тучные клетки, триптаза, химаза, кожа.

### Molecular Biological Peculiarities of the Mast Cells Secretome of the Lower Limb Skin in Trophic Ulcers of Various Etiologies

© D. A. Atyakshin\*, M. V. Aralova, A. A. Glukhov, 2019

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

**The purpose** of this research was to study characteristics of the mast cell (MC) secretome of the skin of the lower extremities in patients with trophic ulcers of various etiologies.

**Material and methods.** The study included patients with venous, arterial and neurotrophic ulcers, as well as patients with the normal skin of the lower extremities. Skin specimens were stained by toluidine blue using histochemical techniques and Romanowsky-Giemsa staining; immunohistochemical protocols were used to detect MC tryptase and chymase, including the technology of multiple immune-labeling. Skin sections were studied using a ZEISS Axio Imager.A2 microscope (Carl Zeiss, Germany).

**Results.** In the skin of patients with chronic arterial and, especially, venous insufficiency, the number of protease-containing MCs and chymase expression in the skin increased compared with the similar indicators of the skin without pathological changes. Activation of the protease secretory pathways in MCs was manifested by the release of separate tryptase and chymase-positive granules, and by the formation of granule-containing fragments of the cytoplasm. The group of patients with neurotrophic ulcers was characterized by the most expressed growth in the volume of the MC population in the skin with the increase of their size, activity of the secretory pathways and signs of polymorphism. Infiltration of the skin by MC spread into the epidermis with intensive secretion of proteases into the area of tight junctions and the intercellular matrix of the basal and spinous layers.

**Conclusion.** MC specific proteases in chronic ulcers of the lower extremities of various etiologies may be used as an informative marker of inflammatory progression degree in the skin not only for diagnostic purposes and monitoring the effectiveness of the performed therapy but also as a promising target for pharmacological agents.

**Keywords:** trophic ulcer, mast cells, tryptase, chymase, skin.

**\*Автор для переписки:**

Атыкшин Дмитрий Андreeвич

НИИ экспериментальной биологии и медицины,  
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский  
университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России,  
ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394036, Российская  
Федерация.

E-mail: earth-mars38@yandex.ru

**\*Corresponding author:**

Dmitrii Atyakshin

Research Institute of Experimental Biology and Medicine,  
Voronezh N.N. Burdenko State Medical University, ul.  
Studencheskaya, 10, Voronezh, 394036, Russian  
Federation

E-mail: earth-mars38@yandex.ru

## Введение

Термин «трофическая язва» часто применяют ко всем длительно незаживающим ранам, исходя из общности клинических проявлений. Однако, количество заболеваний, сопровождающихся развитием трофических язв, довольно велико: хроническая венозная и артериальная недостаточность нижних конечностей, диабетическая периферическая полинейропатия, рожистое воспаление, заболевания и травмы нервной системы, повторяющаяся травма, ожоги, васкулиты, системные заболевания соединительной ткани и др. Лечение трофических язв зачастую обусловлено неэффективностью большинства общепринятых консервативных и хирургических методов лечения [3]. Становится очевидным, что на современном этапе развития хирургии прогресс в лечении трофических язв невозможен без выявления морфологических особенностей ран, исследования молекулярных механизмов формирования патологических изменений и детекции состояния ключевых сигнальных путей формирования тяжести и распространенности ишемического очага. Сегодня благодаря новым технологиям в проведении молекулярно-морфологических исследований продолжают изучаться закономерности цито- и гистогенеза, дивергенции, гетероморфии, гетерокинеза и гетерохронии, лежащие в основе формирования как адаптивных изменений, так и патологических состояний тканей. С этих позиций обращают на себя внимание тучные клетки (ТК), обладающие широкими возможностями в регуляции местного гомеостаза [4, 6, 8, 21, 26]. В пределах специфического тканевого микроокружения кожи ТК составляют около 10% от числа всех иммунокомпетентных клеток и при этом обладают уникальными свойствами регуляции проницаемости сосудов, развития аллергических и иммунных реакций, определения пролиферативной активности клеток, индукции апоптоза, фагоцитоза и т.д. [17, 18]. ТК принимают непосредственное участие в формировании патологических состояний посредством многочисленных компонентов секретома с высокой биологической активностью [20, 32, 33]. Учитывая известное селективное влияние

триптиазы ТК на главные патогенетические звенья реализации острого и хронического воспаления, исследование ее биологии в деятельности соединительной ткани кожи при имеющихся трофических нарушениях представляет особое значение в хирургии [7]. Другая специфическая протеаза ТК – химаза, обладает собственными молекулярными мишеньями в развитии воспаления и аллергии, реализации ангиогенеза и ремоделирования внеклеточного матрикса соединительной ткани [2]. Наконец, протеазы ТК как полифункциональные компоненты секретома представляют собой перспективную фармакологическую мишень [10, 27], обладающую высокой информативностью и важным диагностическим значением.

## Материал и методы исследования

Исследование выполнено на базе НИИ экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО «ВГМУ им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. Для морфологического анализа использовали фрагменты кожи пациентов с венозными (n=30), артериальными (n=21) и нейротрофическими (n=18) язвами, а также нормальной кожи нижних конечностей (n=21). До начала лечения с целью исключения малигнизации язвы или изъязвления опухоли под местной инфильтрационной анестезией производили поперечное иссечение края раны с захватом не измененной кожи. Размер кожного лоскута составлял 2×1×0.8 см. Фрагменты нормальной кожи для исследования брали в ходе плановых хирургических вмешательств на мягких тканях, суставах, костях. Исследование одобрено этическим комитетом при ВГМУ им. Н.Н. Бурденко. Все пациенты дали письменное согласие на проводимое вмешательство. Объектом исследования служили ТК кожи. После фиксации в нейтральном формалине образцы кожи подвергались стандартной процедуре пробоподготовки с изготовлением парафиновых срезов толщиной 5 мкм для гистохимического окрашивания и 2 мкм для иммуногистохимического анализа. Окрашивание толуидиновым синим или по Романовскому–Гимзе проводили в соответствии с используемыми протоколами [1]. Иммуногистохимическое окрашивание триптиазы с соблюдением необходимых требований [9] проводилось с помощью первичных мышиных антител Anti-Mast Cell Tryptase antibody (клон AA1, #ab2378, разведение 1:2000), химазы – моноклональными мышими антителами Anti-Mast Cell Chymase antibody (клон CC1, #ab2377, 1:1000). В качестве вторичных антител использовались козы антимышьиные антитела #AS-M1-HRP, визуализация которых проводилась реагентом ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4105) согласно инструкции произво-

Таблица 1

Объем популяции тучных клеток кожи (в 1мм<sup>2</sup>)

Характеристики	Норма	ХВН	ХАН	НТЯ
Метахромазия	12.8±1.3	25.5±2.8*	14.4±1.9	43.1±3.5*
Химаза-позитивные	9.7±3.9	45.8±10.4*	30.6±4.3*	75.6±6.3*
Триптаза-позитивные	11.2±3.8	51.6±8.7*	36.8±6.7*	66.4±5.4*

Примечание: ХВН – хроническая венозная недостаточность; ХАН – хроническая артериальная недостаточность; НТЯ – нейротрофические язвы; \* –  $p<0.05$  по сравнению с группой «норма».

Таблица 2

## Профиль экспрессии протеаз в тучных клетках кожи (по результатам множественного иммуномаркирования, в %)

Характеристики	Норма	ХВН	ХАН	НТЯ
Триптаза-позитивные	20.3±2.4	9.4±1.7*	13.7±0.9*	7.3±1.3*
Химаза-позитивные	15.7±1.4	7.2±0.9*	12.1±1.1*	4.3±0.9*
Одновременная экспрессия триптазы и химазы	67.0±3.8	83.4±10.2*	74.2±7.1*	88.4±7.2*

Примечание: ХВН – хроническая венозная недостаточность; ХАН – хроническая артериальная недостаточность; НТЯ – нейротрофические язвы; \* –  $p<0.05$  по сравнению с группой «норма».

дителя. Ядра докрашивали гематоксилином Майера, и срезы заключали в постоянную монтажную среду.

Для оценки профиля экспрессии протеаз ТК кожи применяли двойное иммуномаркирование [9]. При этом проводилось одновременное окрашивание первичными кроличьими моноклональными антителами Anti-Mast Cell Tryptase antibody [EPR9522] (ab151757, разведение 1:1000) и моноклональными мышиными антителами Anti-Mast Cell Chymase antibody (клон CC1, #ab2377, 1:1000) в соответствии со стандартным протоколом. Для детекции первичных антител использовались вторичные антитела Goat Anti-Mouse IgG H&L (ab97035) и Goat Anti-Rabbit IgG H&L (ab150077), коньюгированные с флюорохромами Су3 и Alexa Fluor 488 соответственно. Далее ядра докрашивали DAPI (5 мкг/мл PBS; Sigma) в течение 15 секунд, промывали фосфатным буфером и заключали срезы в антифлуоресцирующую монтажную среду.

Активность выведения протеаз ТК в экстрацеллюлярное пространство оценивалась с помощью морфологических критериев секреторных путей триптазы и химазы, с учетом поступления в экстрацеллюлярный матрикс отдельных гранул, смешанного экзоцитоза, пейсмекерной дегрануляции и формирования макровезикул [8]. При этом высчитывалась относительная частота встречаемости каждого пути секреции от общего количества ТК и выражалась в процентах. Кроме того, для оценки внутрипопуляционного взаимодействия ТК кожи учитывали их контактирование друг с другом и рассчитывали в процентах от общей численности популяции.

Срезы кожи изучали на микроскопе ZEISS Axio Imager.A2 с системой документирования изображений, включающей цветную цифровую камеру Camera Axiocam 506 color и монохромную камеру Camera Axiocam 503 mono. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZEN 2.3 (Carl Zeiss, Germany). Определение объема популяции ТК

кожи проводили в условиях поля зрения при использовании объектива  $\times 20$ , количество которых для получения репрезентативного массива данных составляло не менее 50. В случае неполного заполнения исследуемой тканью поля зрения ТК подсчитывали на имеющемся участке с дальнейшим пересчетом на размер стандартной площади. После проведенного планиметрического анализа для облегчения восприятия полученного цифрового массива результаты были адаптированы к площади кожи размером 1 мм<sup>2</sup>. Достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента в случае нормального распределения выборки, при его отсутствии использовался непараметрический статистический U-критерий Манна–Уитни [5].

## Результаты и их обсуждение

В коже пациентов без патологических изменений популяция ТК была неравномерно распределена. ТК, локализованные в сосочковом слое дермы, характеризовались меньшими размерами и небольшим содержанием секреторных гранул в цитоплазме. ТК, сопровождающие сосуды, концевые отделы желез и волосяные луковицы обладали большими размерами, количеством секреторного материала и преимущественно овальной формой (рис. 4 А–В). Часть ТК была солокализована с волокнистым компонентом внеклеточного матрикса дермы кожи. Преобладали ТК с одновременной экспрессией протеаз, меньший пул составляли ТК с изолированной секрецией триптазы либо химазы (табл. 2). Более половины протеаза-содержащих ТК морфологически представляли собой недегранулированные формы. Преобладающим механизмом выведения протеаз являлась постепенная дегрануляция, о чем свидетельствовала иммунопозитивность перицеллюлярного пространства на триптазу или химазу без видимых признаков секреции (табл. 3). Гораздо меньшее значение в секреторной активности ТК

Таблица 3

**Морфологические эквиваленты секреторных путей протеаз в тучных клетках кожи (в %)**

Формы секреторных путей	Норма	ХВН	ХАН	НТЯ
Триптиаза-позитивные тучные клетки				
Без признаков секреции	59.2±5.4	21.2±3.2*	18.4±2.1*	8.4±0.9*
Секреция отдельных гранул	13.0±1.8	23.4±2.8*	28.6±1.9*	39.2±4.7*
Смешанный экзоцитоз + постепенная дегрануляция	21.8±3.3	41.2±5.2*	40.7±4.6*	36.0±3.3*
Формирование макровезикул	6.0±1.2	14.2±2.3*	12.3±1.8*	16.4±1.4*
Химаза-позитивные тучные клетки				
Без признаков секреции	60.3±7.2	12.6±1.1*	19.2±1.5*	13.8±0.8*
Секреция отдельных гранул	8.4±0.9	15.4±1.6*	21.3±1.9*	33.4±3.5*
Смешанный экзоцитоз + постепенная дегрануляция	25.1±2.2	59.4±4.1*	43.3±3.8*	37.1±3.4*
Формирование макровезикул	6.2±0.5	12.6±0.9*	16.2±0.9*	15.7±2.0*

Примечание: ХВН – хроническая венозная недостаточность; ХАН – хроническая артериальная недостаточность; НТЯ – нейротрофические язвы; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «норма».

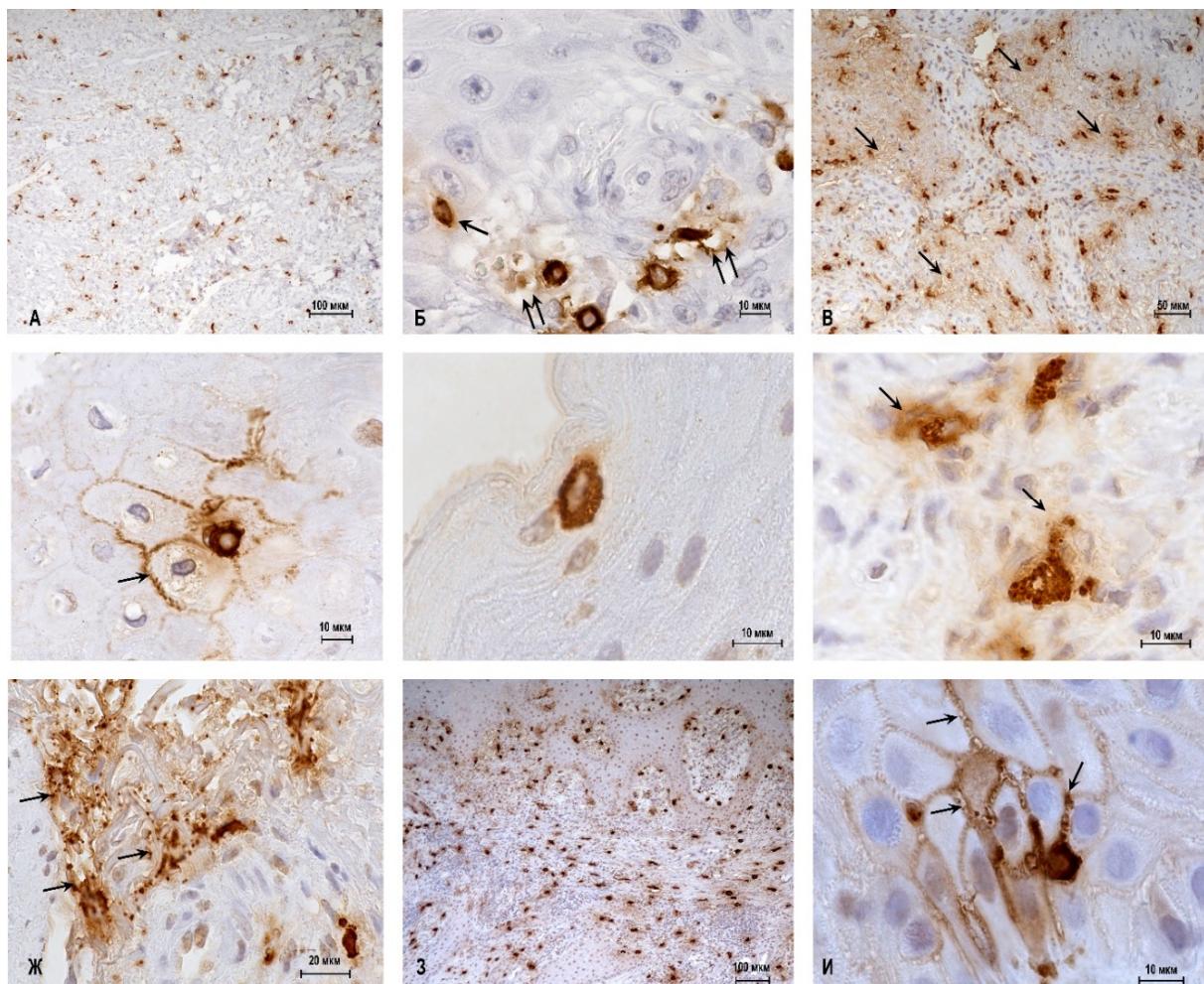


Рис. 1. Триптиаза-позитивные тучные клетки (ТК) в коже с трофическими язвами различной этиологии. Фиксация – 10% нейтральный формалин. Иммуногистохимическое окрашивание на триптиазу ТК. Обозначения: А–Б – хроническая артериальная недостаточность. А – увеличение численности ТК в коже. Б – ремоделирование ТК внеклеточного матрикса соединительной ткани сосочкового слоя кожи (указано стрелкой), миграция в базальный слой эпидермиса (указано двойной стрелкой). В–Ж – хроническая венозная недостаточность. В – увеличение объема популяции ТК, формирование обширных триптиаза-позитивных территорий в сетчатом слое дермы (указано стрелкой). Г – миграция ТК в шиповатый слой эпидермиса с активной секрецией триптиазы во внеклеточное пространство (указано стрелкой). Д – проникновение ТК в поверхностные слои эпидермиса. Е – накопление триптиазы в экстрапеллонярном матриксе с формированием протеаза-индуктивных зон (указаны стрелкой). Ж – дегрануляция ТК, в т.ч. механизмом экзоцитоза, высокое содержание триптиаза-позитивных гранул во внеклеточном матриксе (указано стрелкой), ремоделирование соединительной ткани дермы. З–И – нейротрофические язвы. Наиболее высокое количество ТК в коже (Ж), с активной миграцией в шиповатый слой эпидермиса и секрецией протеазы во внеклеточный матрикс (указано стрелкой) (И).

в норме составлял экзоцитоз отдельных протеаз-позитивных гранул ТК во внеклеточный матрикс, а также образование постклеточных компартментов, локализованных во внеклеточном матриксе (табл. 3).

У пациентов с хронической артериальной недостаточностью после окрашивания толуидиновым синим не происходило достоверных изменений численности метахроматичных ТК в поле зрения. В то же время, появлялись ТК небольших размеров (рис. 4 Г), достоверно увеличивалось число триптаза-позитивных ТК вместе с химаза-содержащими (табл. 1, рис. 1 А, 2 А). Численность триптаза-позитивных ТК в популяции кожи возрастало более чем в три раза, характеризуясь высокой достоверностью по сравнению с результатами обследования кожи без патологических изменений (табл. 1). При этом существенно возрастало количество ТК с одновременной экспрессией триптазы и химазы, тогда как пул ТК с содержанием исключительно триптазы или химазы сокращался (табл. 2, рис. 3 А). Наблюдалось формирование групп ТК в определенных локусах специфического тканевого микроокружения дермы кожи. Однако частота контактирования ТК друг с другом снижалась, свидетельствуя о формировании тенденции к разобщению их внутрипопуляционных взаимодействий. Активизация секреторных путей протеаз в ТК проявлялась как за счет выведения отдельных триптаза- и химаза-позитивных гранул во внеклеточный матрикс, так и с помощью образования гранулосодержащих фрагментов цитоплазмы, с большой частотой локализующихся в дерме кожи по сравнению с группой сравнения (табл. 3, рис. 1 Б, 2 Б, 2 В, 4 Г). Следует также отметить активизацию механизма смешанного экзоцитоза и пейсмекерной дегрануляции, о чем свидетельствовала высокая иммунопозитивность внеклеточного матрикса на специфические протеазы ТК в перицеллюлярных локусах. Интересной находкой стали спазмированные артерии, адвентиция которых была подвержена выраженной инфильтрации триптаза-позитивными гранулами ТК (рис. 3 Б).

При формировании хронической венозной недостаточности происходили более существенные изменения структуры популяции ТК по сравнению с группой контроля, размах которых превышал аналогичные показатели при артериальной недостаточности. В частности, в большей степени возрастала численность ТК. Достоверно увеличивалось содержание ТК не только после окрашивания толуидиновым синим, но и после иммуногистохимической идентификации протеаз, в несколько раз превышая объем популяции ТК в коже без патологических изменений (рис. 1 В, 2 Г, 2 Ж). При этом отмечалась особенно высокая численность химаза-позитивных ТК

(табл. 1). В специфическом тканевом микроокружении кожи при хронической венозной недостаточности часто выявлялась солокализация ТК с капиллярной сетью (рис. 2 Д). Определение профиля экспрессии протеаз показало практически полное исчезновение ТК с изолированным содержанием триптазы или химазы, подавляющее число ТК экспрессировало обе протеазы (табл. 2, рис. 3 А, 3 В). Возрастала частота химаза-позитивных ТК, прилежащих друг к другу. При солокализации некоторых ТК их кариолеммы практически соприкасались, что отчетливо визуализировалось при флуоресцентной микроскопии (рис. 2 Е, рис. 3 В, рис. 4 Д, Е).

Интенсифицировались секреторные пути продуктов биосинтеза ТК во внеклеточный матрикс, о чем свидетельствовало существенное сокращение представительства недегранулированных форм ТК (табл. 3). Отмечалось увеличение частоты выявления триптаза- и химаза-положительных макровезикул в дерме, достигающих в ряде случаев крупных размеров. Иногда химаза- и триптаза-позитивные гранулы, свободно локализующиеся во внеклеточном матриксе, создавали достаточно обширные поля, формируя протеаза-позитивные территории с соответствующими индуктивными эффектами (рис. 1 В, Ж). ТК обнаруживались в базальном и шиповатом слоях эпидермиса, при этом они осуществляли активную секрецию протеаз в межклеточное пространство (рис. 1 Г). Кроме того, ТК мигрировали в верхние слои эпидермиса, чего не наблюдалось в коже без патологических изменений или при хронической артериальной недостаточности (рис. 1 Д).

Группа пациентов с нейротрофическими язвами характеризовалась наиболее выраженным возрастанием объема популяции ТК в коже (табл. 1), а также приобретением ими наиболее крупных размеров. Кроме того, ТК обладали выраженным полиморфизмом, встречались как овальные, так и резко вытянутые клетки (рис. 4 Ж-И). ТК обильно инфильтрировали соединительную ткань дермы, что выявлялось при всех использованных протоколах окрашивания (рис. 1 З). Более того, триптаза-позитивные ТК обнаруживались в эпидермальном пласте, мигрируя в межклеточном пространстве. Обращает на себя внимание не только локализация ТК в толще эпидермиса, но и ее сочетание с интенсивной секрецией протеаз (табл. 3, рис. 1 И). Активная дегрануляция триптазы и химазы ТК приводила к разобщению клеток шиповатого слоя друг от друга, уменьшая барьерную функцию эпителиального пласта (рис. 1 И, 2 З). Кроме того, ТК локализовались между недифференцированными клетками базального слоя эпидермиса, что не наблюдалось в группе контроля. Увеличивалась частота встречаемости ТК, контактирующих с базаль-

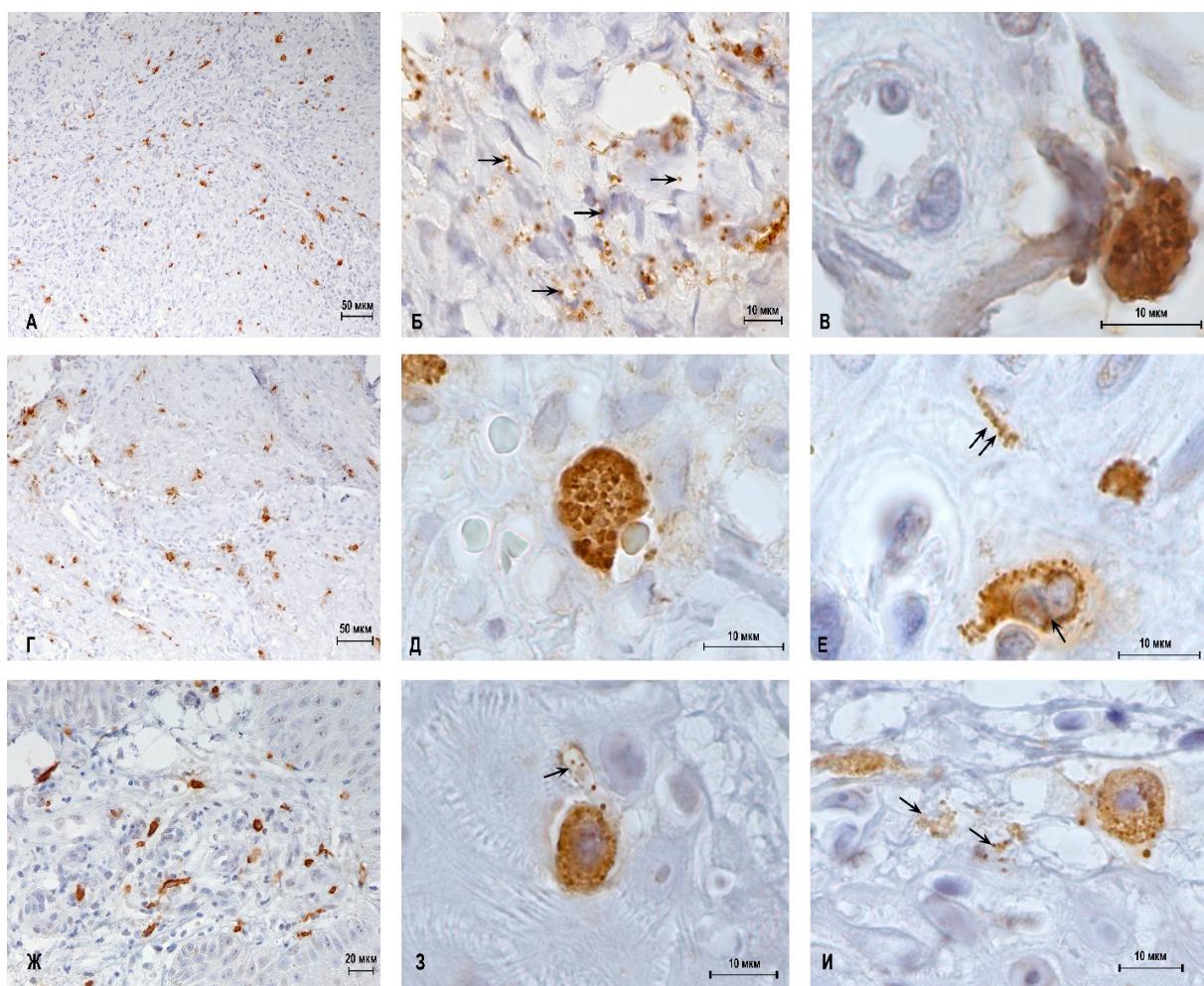


Рис. 2. Химаза-позитивные тучные клетки (ТК) в коже с трофическими язвами различной этиологии. Фиксация – 10% нейтральный формалин. Методика: иммуноhistохимическое окрашивание на химазу ТК. Обозначения: А–В – хроническая артериальная недостаточность. А – возрастание численности химаза-позитивных ТК в дерме кожи. Б – активная секреция химазы во внеклеточный матрикс дермы кожи механизмом экзоцитоза, определяются свободно лежащие гранулы (указано стрелкой). В – локализация секретирующей химазу ТК в области сосуда микроциркуляторного русла. Г–Ж – хроническая венозная недостаточность. Г – увеличение количества химаза-позитивных ТК в коже. Д – перикапиллярная локализация ТК. Е – контактирование химаза-содержащих ТК с близким расположением ядер друг к другу (указано стрелкой), химаза-позитивные гранулы и автономный фрагмент ТК в области базальной мембранны эпидермиса (указано двойной стрелкой). Ж – высокая численность химаза-позитивных ТК в сосочковом слое дермы кожи, активно секрецирующих протеазы. З–И – нейротрофические язвы. З – отмечается миграция ТК в шиповатый слой эпидермиса и активная секреция химазы (указано стрелкой), И – локализация ТК в области базальной мембранны эпидермиса, гранулы в межклеточном матриксе (указано стрелкой).

ной мембраной (рис. 2 И). В дерме возрастало количество отдельных протеаза-позитивных фрагментов ТК.

Вместе с изменением пула протеаза-содержащих ТК в дерме кожи происходил увеличение экспрессии протеаз в сторону одновременной продукции триптиазы и химазы (табл. 2, рис. 3 Г). Наблюдалось увеличение частоты солокализации химаза-позитивных ТК и урежение экспрессирующих триптиазу по сравнению с другими группами пациентов. При этом обнаруживались контактирующие ТК, ядра которых прилежали друг к другу, практически соприкасаясь кариолеммами.

Следует отметить, характерное увеличение объема популяции ТК в коже с трофиче-

скими нарушениями. С одной стороны, это может свидетельствовать о развитии адаптивных реакций при участии ТК с помощью секреции биологически активных веществ, в частности, гепарина. Гепарин представляет собой высокомолекулярное соединение класса кислых гликозаминогликанов, продуцируемое в пределах тканевого микроокружения преимущественно ТК [4]. Полианионность молекул гепарина позволяет выступать ему в качестве уникального регулятора местного гомеостаза посредством образования комплексов с различными веществами. В частности, известны такие эффекты гепарина, как иммуномодулирующие, антигистаминные и как следствие антиаллергические, противо-

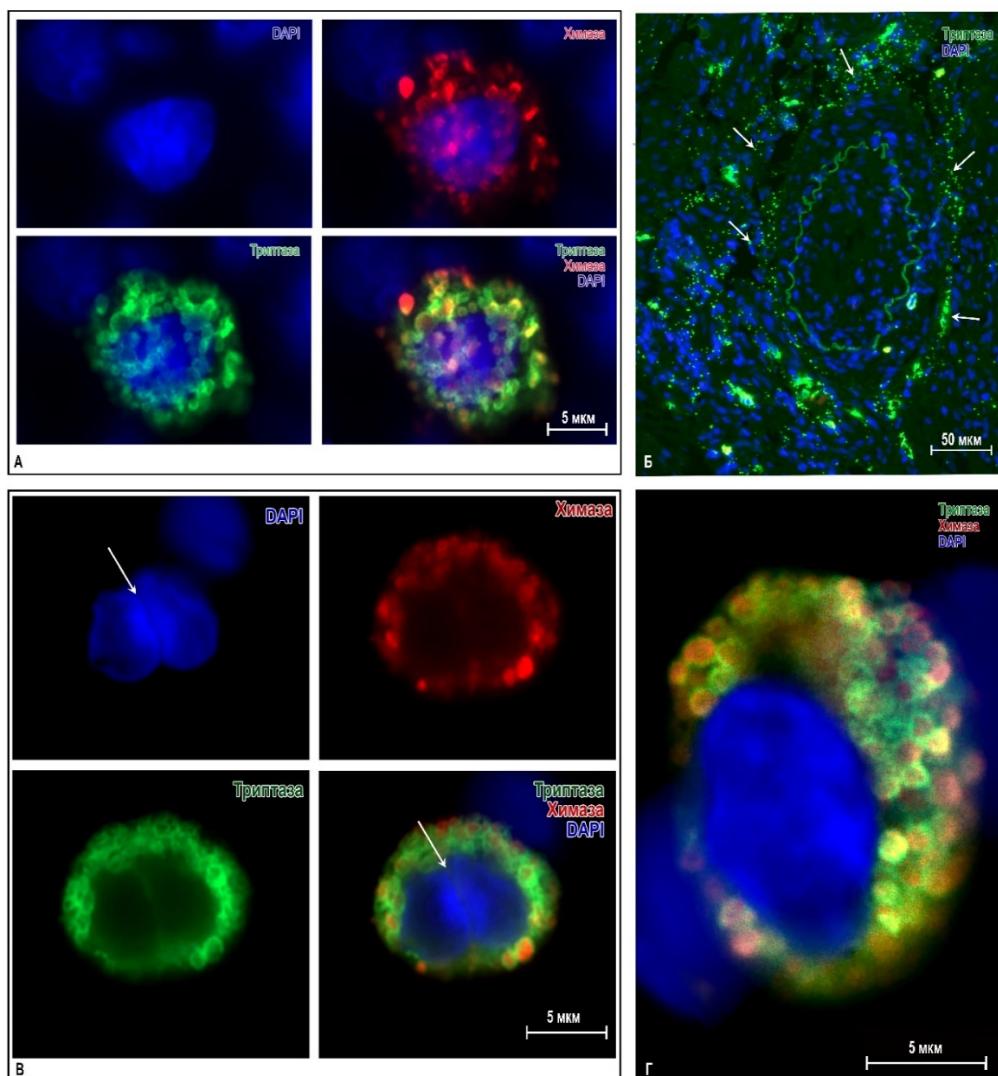


Рис. 3. Профиль экспрессии протеаз в ТК в коже с трофическими язвами различной этиологии. Фиксация – 10% нейтральный формалин. Методика: множественное иммуномаркирование на триптиазу и химазу тучных клеток. Обозначения: А–Б – хроническая артериальная недостаточность. А – ТК с одновременной экспрессией триптиазы и химазы. Протеазы могут быть локализованы в разных гранулах, часто встречается солокализация триптиазы и химазы в одних и тех же локусах гранул. Б – определяется секреция триптиазы ТК в периваскулярное пространство артерии, просвет которой практически отсутствует (указано стрелкой). В – хроническая венозная недостаточность. Тесная солокализация ТК с близким расположением ядер друг к другу (указано стрелкой). Г – нейротрофическая язва. Крупная ТК с одновременной экспрессией триптиазы и химазы. Обнаруживаются гранулы с химазой, триптиазой, а также с одновременным содержанием двух протеаз.

воспалительные, противоопухолевые, анти-токсические, противомикробные, антивирусные, антикоагулянтные и др. [4].

Однако, как следует из полученных результатов, эффективность детекции ТК по свойствам метахромазии, во многом обусловленной гепарином, в условиях патологии существенно снижается. Очевидно, при хронически текущих нарушениях кровообращения и длительной гипоксии формируется дефицит гепарина, ограничивая его адаптивный потенциал в дерме кожи, способствуя развитию антагонистических эффектов гистамина.

Кроме того, в рамках проведенной работы можно свидетельствовать об усилении биоэффектов специфических протеаз на структуры кожи. В частности, известна активность триптиазы по инициации вос-

паления посредством повышения проницаемости стенки капилляров, усиления направленной миграции эозинофилов, нейтрофилов, базофилов и макрофагов сквозь стенку элементов микроциркуляторного русла [21]. Триптиаза индуцирует эндотелий к биогенезу кининов, ИЛ-1 и ИЛ-8, а также белка межклеточной адгезии ICAM-1. Активация триптиазой секреции клетками тканевого микроокружения селективных цитокинов и хемокинов создает провоспалительные морфогенетические поля [13, 28]. В данном аспекте важнейшее значение имеет тропность триптиазы к рецепторам PAR-2, провоцирующая дальнейшее развитие воспалительной реакции [19, 30]. Рецепторы PAR-2 локализованы на разных клеточных типах специфичного тканевого микроокружения кожи. Активация этих ре-

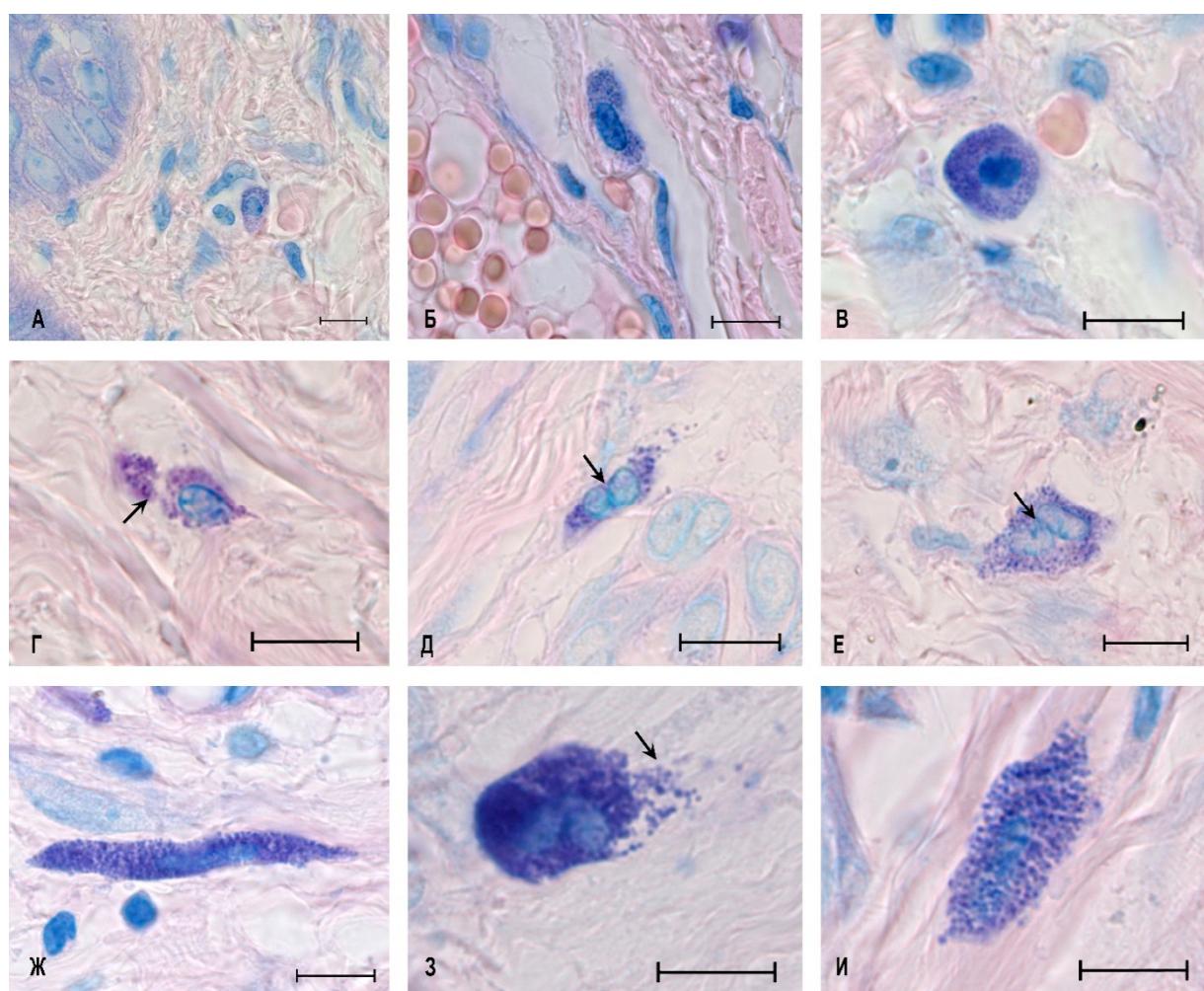


Рис. 4. Цитологические особенности тучных клеток (ТК) кожи. Фиксация – 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Романовскому–Гимзе. Шкала = 10 мкм. Обозначения: А–В – кожа без патологических изменений, ТК овальной формы, без видимых признаков секреторной деятельности, локализованы рядом с венозным отделом микроциркуляторного русла (Б) или капилляром (В). Г – хроническая артериальная недостаточность. ТК малого размера, отшнуровка макровезикулы (указано стрелкой). Д–Е – хроническая венозная недостаточность. Варианты контактирования ТК друг с другом, близкое расположением ядер (указано стрелкой). Ж–И – нейротрофические язвы. Крупные ТК веереноидной (Ж) и овальной (И) формы, признаки дегрануляции контактирующих ТК (указано стрелкой) (З).

цепторов на макрофагах приводит к их поляризации к первому типу, усиливая воспаление [12]. Триптаза опосредованно через активацию PAR-2 вовлечена в сигнальные пути развития отека и зуда. Локализация рецепторов PAR-2 на телах и отростках афферентных нейронов делает триптазу мощным индуктором нейрогенного воспаления. При этом провоспалительные механизмы триптазы не ограничиваются прямым воздействием на молекулы PAR-2, но усиливаются стимуляцией экспрессии данных рецепторных структур на других клетках, в том числе, нейрогенного происхождения. Таким образом, триптаза оказывается вовлеченной в ключевые механизмы длительного персистирования специфических условий местного гомеостаза, способствующих формированию нейротрофических язв кожи, что является мощным триггером в прогрессировании заболевания. В частности, известно, что увеличение экспрессии

PAR-2 в клетках мягких тканей после хирургических манипуляций существенно утяжеляет течение послеоперационного периода [13, 28, 30].

Следует учитывать также формирование патогенетического круга с участием триптазы и гистамина. Триптаза приводит к стимуляции высвобождения гистамина из других клеток, что, в свою очередь, провоцирует дальнейшее усиление секреции сериновой протеазы. В результате под влиянием гистамина в процесс дегрануляции вовлекаются новые ТК, расширяя территории эффектов провоспалительного медиатора в коже [25].

Одновременно увеличение численности триптаза-позитивных ТК можно в определенной степени соотнести с их влиянием на образование сосудов в дерме кожи при наличии тканевой гипоксии. Триптаза способствует новообразованию сосудов благодаря активному ремоделированию соединительной тка-

ни с деградацией компонентов экстрацеллюлярного матрикса [11]. Вместе с тем, триптаза приводит к усилению секреции клетками фибробластического дифферона факторов роста, хемокинов, цитокинов и матриксных металлопротеиназ (ММП). При этом триптаза обладает свойствами активировать в пределах тканевого микроокружения собственные ММП, а также синтезированные иными клетками соединительной ткани, включая ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-9 и ММП-13 [19, 31].

Триптаза способна вызывать миграцию клеток фибробластического дифферона вместе с активизацией в них продукции коллагеновых белков, что может создавать предпосылки к избыточному образованию внеклеточного компонента соединительной ткани кожи [23, 24, 31]. Обнаруженные у обследованных пациентов признаки повышенного содержания коллагеновых и ретикулярных волокон с помощью селективных методик гистохимического окрашивания подтверждают активность триптазы по отношению к усилению формирования внеклеточного матрикса и фиброзным изменениям, показанным в ряде работ.

В выполненном исследовании убедительно продемонстрировано возрастание экспрессии химазы у пациентов с хроническими язвами кожи. С точки зрения модулируемых эффектов химазы также необходимо указать на ее выраженные провоспалительные эффекты. Специфические сериновые протеазы ТК работают в эволюционно сложившейся паре, очевидно, взаимно дополняя друг друга в случае необходимости. Субстратами химазы являются компоненты внеклеточного матрикса, рецепторы, белки, цитокины и хемокины [27]. Химаза способна активировать ряд интерлейкинов: ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-18, а также нейтрофил-активирующий пептид 2, трансформирующий ростовой фактор  $\beta$  и др. Таким образом, химаза также, как и триптаза, способствует привлечению гранулоцитов и агранулярных лейкоцитов в очаг ишемии.

С терапевтической точки зрения важна способность химазы человека весьма активно гидролизовать ангиотензин I до ангиотензина II, участвуя как в локальных, так и системных механизмах регуляции артериального давления. Возможно, что усиление экспрессии и секреции химазы у больных с трофическими язвами вторично может отражаться на их уровне артериального давления. В свою очередь, ангиотензин II обладает собственными эффектами регуляции митотической активности, роста клеток, образования сосудов и ремоделирования тканей [16].

Химаза по сравнению с триптазой обладает более выраженным деструктивным потенциалом в отношении компонентов экстрацеллюлярного матрикса, несмотря на меньшую устойчивость к внутритканевой нейтра-

лизации с помощью соответствующих блокаторов пептидаз [27]. В частности, химаза способна к прямой деградации фибронектина, витронектина, ламинина и др. Кроме того, химаза способна активировать коллагеназу, ММП-2, ММП-9 и ингибиовать TIMP-1, что создает возможность к деградации значительных количеств субстратов внеклеточного матрикса при повышении секреции ТК данной протеазы. Химаза способна изменять состояние различных клеток специфического тканевого микроокружения кожи, в частности, усиливать биосинтетическую активность фибробластов и их митотическую активность. Вместе с потенцированием синтеза коллагеновых белков, химаза обладает уникальным свойством осуществлять ферментативную перестройку молекул проколлагена, что может ускорять процесс образования волокнистого компонента внеклеточного матрикса [2]. Таким образом, выявление высокого содержания волокнистого компонента в дерме кожи в области трофических язв может быть вызвано повышенной секрецией химазы ТК. Полученные в настоящей работе данные коррелируют с результатами исследования, показавшего значение химазы в образовании келоидных рубцов кожи [15].

С точки зрения адаптивного эффекта в ишемически сформированных локусах тканей возрастание уровня химазы может быть объяснено ее активным участием в процессах ангиогенеза. Как и триптаза, химаза принимает активное участие в молекулярных механизмах образования новых структурных единиц микроциркуляторного русла, что может способствовать прогрессированию онкологических заболеваний [14]. Кроме того, химаза может корректировать площадь ишемического очага, количество и гистоархитектонику интраорганных сосудов микроциркуляторного русла.

Длительное незаживление трофических ран и затруднение их эпителиализации также может быть обусловлено деградирующими эффектами химазы на структуры, обеспечивающие прикрепление клеток эпидермиса друг к другу и базальной мембране, что уменьшает разграничительную и защитную функции эпителия [27, 29]. Повышение проницаемости капилляров и венул кожи приводит к прогрессированию отечных явлений. При этом следует учесть, что химаза представляет собой мощный индуктор запуска механизма дегрануляции ТК, обеспечивая молекулярные механизмы активации поступления гистамина из внутриклеточного депо в межклеточный матрикс. Безусловно этим химаза способна приводить к созданию условий для хронизации раневого процесса. Более того, положение может усугубляться еще и тем, что химаза ответственна за формирование «пенистых клеток» в связи с угнетением метаболизма холестерола в макрофагах [22]. В ре-

зультате сериновая протеаза провоцирует прогрессирование атеросклероза, что может еще в большей степени усугублять нарушение трофики определенных регионов специфического тканевого микроокружения.

## Заключение

Таким образом, выявленные молекулярно-биологические особенности тучных клеток при хронических язвах кожи нижних конечностей различной этиологии открывают новые возможности в диагностике степени прогрессирования воспаления, оценке масштаба развития патологического процесса, мониторинге эффективности проводимой терапии и свидетельствуют о перспективности использования специфических протеаз тучных клеток в качестве мишени для фармакологических препаратов.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

1. Атиакшин Д. А., Бухвалов И. Б., Тиманн М. Гистохимия ферментов: методическое пособие. Воронеж: Научная книга; 2016. 120 [Atyakshin D, Buchvalov I, Timann M. Gistokhimiya fermentov: metodicheskoe posobie. Voronezh: Nauchnaya Kniga; 2016] (in Russian).
2. Атиакшин Д. А., Бухвалов И. Б., Тиманн М. Протеазы тучных клеток в формировании специфического тканевого микроокружения: патогенетические и диагностические аспекты. Терапия. 2018; 6(24): 128–140 [Atiakshin D, Bukhvalov I, Timann M. Mast cell proteases in specific tissular microenvironment formation: pathogenetic and diagnostical aspects. Therapy. 2018;6(24):128–40] (in Russian).
3. Глухов А. А., Арапова М. В. Патофизиология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса. Новости хирургии. 2015. Т 23.6. 673–679 [Gluhov AA, Aralova MV. Pathophysiology of Persistent Chronic and Current Methods of Stimulation of Wound Process. Novosti Khirurgii. 2015 Dec 5;23(6):673–9] (in Russian). doi: 10.18484/2305-0047.2015.6.673
4. Кондашевская М. В. Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах. Вестник российской академии медицинских наук. 2010; 6: 49–54 [Kondashhevskaya M. Mast cells and heparin: key links in adaptive and pathological processes. Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. 2010;6:49–54] (in Russian).
5. Орлов А. И. Прикладная статистика. М.: Экзамен; 2006. 671 [Orlov A. Prikladnaya statistika. Moscow: Ekzamen; 2006] (in Russian).
6. Федорова Е. А., Суфьевая Д. А., Григорьев И. П., Коржевский Д. Э. Тучные клетки эпифиза человека. Успехи геронтологии. 2018; 31(4): 484–489 [Fedorova E, Sufieva D, Grigorev I, Korzhevskii D. Mast cells of the human pineal gland. Uspekhi gerontologii. 2018;31(4):484–9] (in Russian).
7. 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
8. 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
9. Buchwalow IB, Boecker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods. 1st ed. London: New York: Springer; 2010.
10. Caughey GH. Mast cell proteases as pharmacological targets. European Journal of Pharmacology. 2016 May;778:44–55. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.04.045
11. Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. Immunological Reviews. 2007 Jun;217(1):141–54. doi: 10.1111/j.1600-065x.2007.00509.x
12. Chen L, Gao B, Zhang Y, Lu H, Li X, Pan L, et al. PAR2 promotes M1 macrophage polarization and inflammation via FOXO1 pathway. Journal of Cellular Biochemistry. 2018 Dec 14; doi: 10.1002/jcb.28260 [Epub ahead of print]
13. Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khatin LM, Caughey GH, et al. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. Journal of Clinical Investigation. 1997 Sep 15;100(6):1383–93. doi: 10.1172/jci119658
14. de Souza Junior DA, Santana AC, da Silva EZM, Oliver C, Jamur MC. The Role of Mast Cell Specific Chymases and Tryptases in Tumor Angiogenesis. BioMed Research International. 2015;2015:1–13. doi: 10.1155/2015/142359
15. Dell’Italia LJ, Collawn JF, Ferrario CM. Multi-functional Role of Chymase in Acute and Chronic Tissue Injury and Remodeling. Circulation Research. 2018 Jan 19;122(2):319–36. doi: 10.1161/circresaha.117.310978
16. Dong X, Geng Z, Zhao Y, Chen J, Cen Y. Involvement of mast cell chymase in burn wound healing in hamsters. Experimental and Therapeutic Medicine. 2012 Nov 27;5(2):643–7. doi: 10.3892/etm.2012.836
17. Dukek A, Köberle M, Goldmann O, Meyer N, Dukek J, Lemmens S, et al. Mast cells as protectors of health. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2018 Nov; doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.054 [Epub ahead of print]
18. Espinosa E, Valitutti S. New roles and controls of mast cells. Current Opinion in Immunology. 2018 Feb;50:39–47. doi: 10.1016/j.co.2017.10.012
19. Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. FEBS Journal. 2006 Apr 5;273(9):1871–95. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05211.x
20. Huber M, Cato ACB, Ainooson GK, Freichel M, Tsvilovskyy V, Jessberger R, et al. Regulation of the pleiotropic effects of tissue-resident mast cells. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019 Feb; doi: 10.1016/j.jaci.2019.02.004. [Epub ahead of print]
21. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. Frontiers in Immunology. 2016 Jan 6;6:1–12. doi:

- 10.3389/fimmu.2015.00620
22. Lee-Rueckert M, Silvennoinen R, Rotllan N, Judström I, Blanco-Vaca F, Metso J, et al. Mast Cell Activation In Vivo Impairs the Macrophage Reverse Cholesterol Transport Pathway in the Mouse. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2011 Mar;31(3):520–7. doi: 10.1161/atvaha.110.221069
23. Levi-Schaffer F, Piliponsky AM. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. Trends in Immunology. 2003 Apr;24(4):158–61. doi: 10.1016/s1471-4906(03)00058-9
24. Lombardo J, Broadwater D, Collins R, Cebe K, Brady R, Harrison S. Hepatic mast cell concentration directly correlates to stage of fibrosis in NASH. Human Pathology. 2019 Apr;86:129–35. doi: 10.1016/j.humpath.2018.11.029 [Epub ahead of print]
25. Molinari JF, Scuri M, Moore WR, Clark J, Tanaka R, Abraham WM. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1996 Sep;154(3):649–53. doi: 10.1164/ajrccm.154.3.8810600
26. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. Immunological Reviews. 2018 Feb 12;282(1):121–50. doi: 10.1111/imr.12634
27. Pejler G, Åbrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast Cell Proteases. Advances in Immunology. 2007;95:167–255. doi: 10.1016/s0065-2776(07)95006-3
28. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, et al. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. Endocrine Reviews. 2005 Feb;26(1):1–43. doi: 10.1210/er.2003-0025
29. Suttle M-M, Harvima IT. Mast cell chymase in experimentally induced psoriasis. The Journal of Dermatology. 2015 Dec 24;43(6):693–6. doi: 10.1111/1346-8138.13234
30. Uji H, Andoh T, Lee J-B, Nojima H, Kuraishi Y. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. European Journal of Pharmacology. 2006 Jan;530(1–2):172–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.11.021
31. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. Journal of Leukocyte Biology. 1997 Mar;61(3):233–45. doi: 10.1002/jlb.61.3.233
32. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. Nature Reviews Immunology. 2014 Jun 6;14(7):478–94. doi: 10.1038/nri3690
33. Wilcock A, Bahri R, Bulfone-Paus S, Arkwright PD. Mast cell disorders: From infancy to maturity. Allergy. 2018 Nov 28;74(1):53–63. doi: 10.1111/all.13657

Поступила в редакцию 1.02.2019  
Принята в печать 5.03.2019

Received 1.02.2019  
Accepted 5.03.2019

Для цитирования: Атыкшин Д.А., Аралова М.В., Глухов А.А. Молекулярно-биологические особенности секретома тучных клеток кожи нижних конечностей при формировании трофических язв различной этиологии. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8(1): 14–24. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-14-24.

For citation: Atyakshin DA., Aralova MV., Glukhov AA. Molecular biological peculiarities of the mast cells secretome of the lower limb skin in trophic ulcers of various etiologies. Journal of Anatomy and Histopathology. 2019; 8(1): 14–24. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-14-24.