

*Шишкина В.В., Антакова Л.Н., Самойленко Т.В.,
Герасимова О.А.*

СПОСОБЫ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФИБРИЛЛОГЕНЕЗА КОЛЛАГЕНА

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

Тучные клетки (ТК) участвуют во внеклеточном этапе фибриллогенеза коллагена. В этой связи количественный показатель пула ТК целесообразно анализировать при фиброзных изменениях. Проведя сравнительный анализ методов окрашивания мы определили подходящие варианты, соответствующие нашим задачам. Так, при контрастировании ядер гематоксилином Майера ТК хорошо визуализируются в бирюзовых тонах. Комбинация окрашивания толуидиновым синим с импрегнацией серебром показала успешное сохранение метакроматического окрашивания ТК кожи крысы после реализации протокола по методу Фута. Подходящей комбинацией оказалось толуидиновым синим и пикрофуксином.

***Ключевые слова:** тучные клетки, идентификация, толуидиновый синий, коллаген, фибриллогенез.*

Shishkina V. V., Antakova L. N., Samoylenko T. V., Gerasimova O. A. **METHODS VISUALIZATION OF MAST CELLS IN THE STUDY OF COLLAGEN FIBRILLOGENESIS**

*FSBEI HE « N.N. Burdenko Voronezh state medical university» of the
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Voronezh, Russia*

Mast cells (TC) are involved in the extracellular stage of collagen fibrillogenesis. In this regard, it is advisable to analyze the quantitative indicator of the TC pool for fibrotic changes. After conducting a comparative analysis of the staining methods, we identified suitable options for ourselves that correspond to our tasks. Thus, when contrasting the nuclei with Mayer hematoxylin, TC is well visualized in turquoise tones. The combination of toluidine blue staining with silver impregnation showed successful preservation of metachromatic staining of rat skin TC after the implementation of the Foot protocol. A suitable combination was the staining with toluidine blue and picrofuxin.

***Key words:** mast cells, identification, toluidine blue, collagen, fibrillogenesis.*

Тучные клетки (ТК) активно распространены в организме [5] и вовлечены во внеклеточные этапы фибриллогенеза [3-5]. Целью исследования явилось определение наиболее подходящего метода визуализации ТК в гистологической практике НИИ экспериментальной биологии и медицины ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, в частности, при исследовании влияния условий микрогравитации на тучные клетки и фибриллогенез коллагена [3-4].

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явилась кожа крысы (n=6), более подробно описано в работе нашего исследовательского коллектива [1]. Фиксация в 10% нейтральном формалине [1]. Пробоподготовку и окрашивание проводили по общепринятым методам и в их комбинациях [1- 2]. 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.

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 нормативными документами, регламентирующими правила работы с лабораторными животными.

Результаты исследования. Толуидиновый синий в комбинации с импрегнацией серебром позволяет визуализировать метахроматическую окраску ТК (рис.1А), что более подробно отражено в предыдущей работе [1].

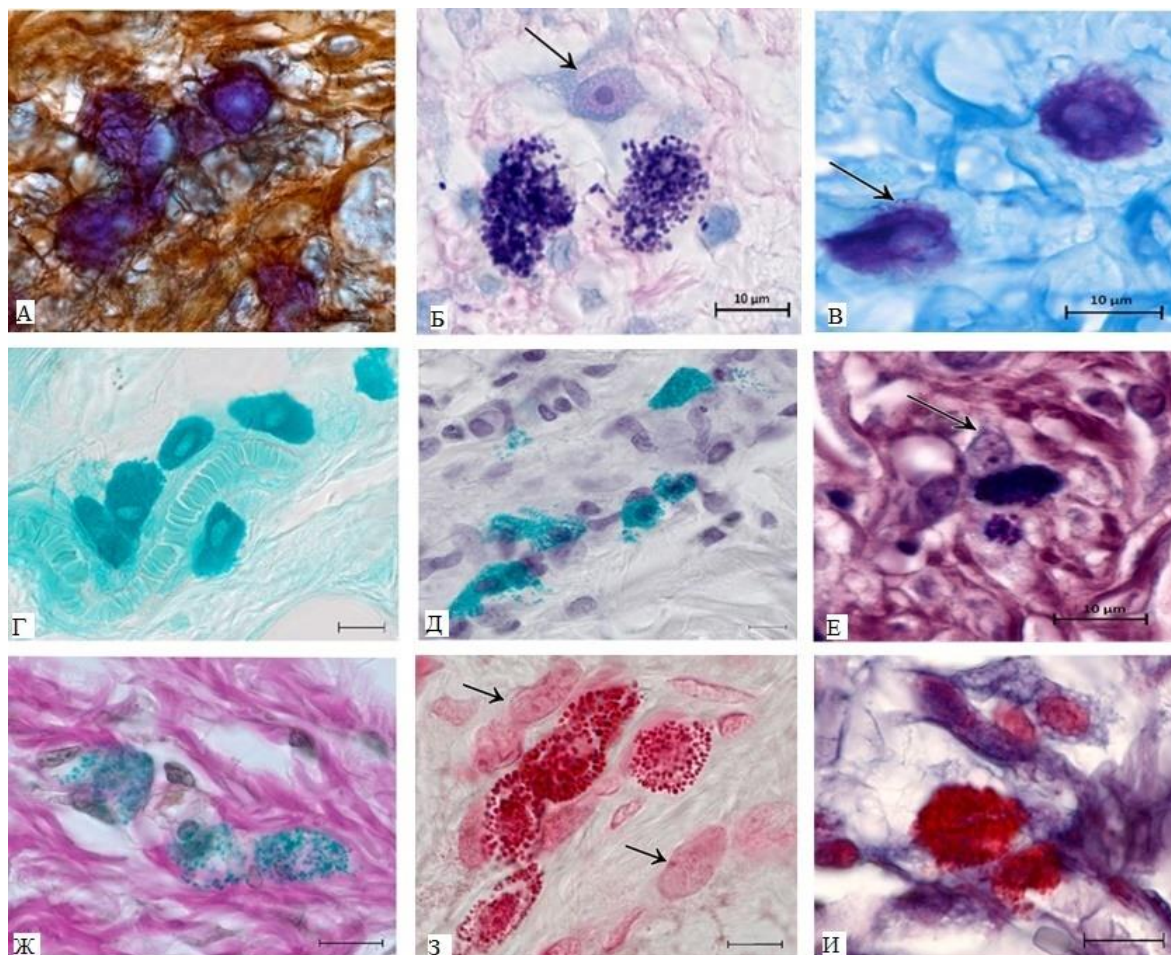


Рис.1.Кожа крысы. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Обозначения. Методика окрашивания: А) импрегнация серебром в комбинации (+) с толуидиновым синим (ТС); Б) ТС + пикрофуксин; В) ТС + анилиновый синий; Г) бриллиантовый зеленый; Д) бриллиантовый зеленый + гематоксилин Майера; Е) ТС + пунцовый фуксин; Ж) по ван Гизону; З) нейтральный красный; И) нейтральный красный +

анилиновый синий. Шкала = 10 мкм. *Визуализация:* А – формирование густой сети импрегнированных волокон в месте локализации тучных клеток. Б – солокализация тучных клеток с фибробластом (отмечен стрелкой) и коллагеновыми волокнами (окрашены в красный цвет). В – солокализация тучных клеток с волокнистым компонентом дермы, экзоцитоз гранул с перифибриллярным расположением (отмечен стрелкой). Г – периваскулярная локализация тучных клеток. Д – тучные клетки хорошо визуализируются в дерме кожи после контрастирования ядер гематоксилином. Ж – тучные клетки окружены развитым волокнистым компонентом. Е – прилежание тучной клетки к фибробласту (отмечен стрелкой). З – солокализация тучных клеток с клетками фибробластического дифферона (отмечены стрелкой). И – расположение тучных клеток и волокнистых элементов межклеточного матрикса.

Окрашивание толуидиновым синим в комбинации с пикрофуксином (рис. 1Б) позволяет визуализировать коллагеновые волокна в красных тонах и ТК в оттенках фиолетового цвета. Толуидиновый синий в комбинации с анилиновым синим дает хорошую картину ТК на фоне элементов межклеточного матрикса (рис. 1В). Окрашивание толуидиновым синим с пунцовым фуксином дает сильное контрастирование межклеточного матрикса (рис. 1Е). Использование комбинации пикрофуксина с толуидиновым синим (рис. 1 Б) предпочтительно, чем метод окрашивания по ван Гизону (рис. 1Ж).

Бриллиантовый зеленый в комбинации с другими гистохимическими протоколами (рис. 1Г, Д) дает высокую эффективность для визуализации ТК кожи. При контрастировании ядер гематоксилином Майера (рис. 1Д), ТК хорошо визуализируются в бирюзовых тонах, количество которых на единицу площади ткани сопоставимо с результатами окрашивания толуидиновым синим.

Применение нейтрального красного в качестве самостоятельного реагента при (рис. 1 З) выявлении ТК недостаточно удобно, в отличие от комбинации красителей нейтрального красного и анилинового синего (рис. 1И).

Наиболее предпочтительным для нашего исследовательского коллектива является комбинированный метод окрашивания толуидиновым синим с импрегнацией серебром, окрашивание толуидиновым синим с пикрофуксином для визуализации тучных клеток при исследовании фибриллогенеза коллагена, в частности, при исследовании влияния условий микрогравитации на тучные клетки и фибриллогенез коллагена.

ЛИТЕРАТУРА

1. *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. – Т. 7, № 3. – С.100-112. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-3-100-112>.

2. *Гистохимия: Учебно-методическое пособие /Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б., Павлова Т.В., и др.* Воронеж: «Научная книга», 2018. – 240 с.

3. *Индекс* содержания ретикулярных волокон в стенке желудка и кишечника мышей после 30-суточного полета на биологическом спутнике / Шишкина В.В.,

Антакова Л.Н., Герасимова О.А., Самойленко Т.В., Самодурова Н.Ю., Попов М.В. // В сборнике: Однораловские морфологические чтения. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием. – 2021. – С. 196-198.

4. Шишкина, В. В., Атякин Д.А. Оценка влияния условий микрогравитации на тучные клетки и фибриллогенез коллагена / Морфология. – 2020. – Т. 157., № 2-3. – С. 247.

5. *Is it time for a new classification of mast cells?* What do we know about mast cell heterogeneity? / В. Frossi, F. Mion, R. Sibilano [et al.] // Immunol Rev. –2018.– Vol. 282, No. 1. – P.35–46.