

*Атякишин Д. А., Бурцева А. С.*

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТУЧНЫХ  
КЛЕТОК ОРГАНОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ  
МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК: СРАВНЕНИЕ С МЕТОДИКАМИ  
МЕТАХРОМАТИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
АКТИВНОСТИ ХЛОРАЦЕТАТЭСТЕРАЗЫ**

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко,  
Научно-исследовательский институт экспериментальной биологии и медицины,  
г. Воронеж, Россия*

Тучные клетки (ТК) вездесущи в организме человека и животных. Обладая достаточно большой продолжительностью жизни, они циклически осуществляют синтез и выведение в экстрацеллюлярный матрикс веществ с высокой биологической активностью. Благодаря этой функции ТК считаются регуляторами местного гомеостаза, дирижерами внутри- и межтканевых процессов, среди ко-

торых состоянии и ремоделирование соединительной ткани, клеточная пролиферация, ангиогенез, проницаемость сосудов микроциркуляторного русла, модуляция чувствительности нервных окончаний, секреторной деятельности желез и др. ТК оказывают как непосредственное действие с помощью собственных секреторных продуктов, так и опосредованное путем регуляции других клеток [5].

ТК являются ключевыми звеньями в формировании аллергических реакций и принимают участие в развитии важнейших патофизиологических процессов — воспаления, заживления ран, ангиогенеза, онкогенеза и др. [4]. Сегодня протеазы тучных клеток рассматривают в качестве мишени фармакологических препаратов [4], а их экспрессию считают диагностическим критерием для оценки динамики различных патологических состояний [3].

Учитывая столь важное значение ТК в норме и патологии, мы посвятили настоящую работу изучению эффективности их идентификации в органах пищеварительной системы монгольских песчанок с помощью различных гистохимических методик. Данный подход позволяет сравнить удобство их применения не только в плане визуализации ТК, но и для получения объективных данных о гистофизиологическом состоянии их популяции. Однако до настоящего времени вопросы по иммуногистохимической характеристике протеаз ТК желудочно-кишечного тракта монгольских песчанок, а также сопоставление их результатов с методами метакроматического окрашивания и определения активности хлорацетатэстеразы в аспекте выявления объема популяции тучных клеток остаются открытыми.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на биоматериале желудка, тощей кишки и печени монгольских песчанок *Meriones unguiculatus*, которые представляют особый интерес для космической биологии [1]. Фрагменты желудка и тощей кишки животных длиной не менее 10 мм, а также печени фиксировали в растворе нейтрального формалина, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 1 мкм. Для изучения тучных клеток использовали методику метакроматического окрашивания толуидиновым синим. Ферментативная активность хлорацетатэстеразы детектировалась методом одновременной реакции азосочетания нафтол AS-D-хлорацетата в качестве субстрата и гексазония парарозанилина как связующего агента. Триптаза идентифицировалась с помощью иммуногистохимического маркирования мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (Anti-Mast Cell Tryptase antibody, AbCam, #ab2378, разведение 1 : 2000) согласно стандартному протоколу [2]. Аналогично выявлялась химаза кроличьими поликлональными антителами к химазе тучных клеток, конъюгированных с биотином (Mast cell Chymase/CHYMASE Antibody, Biotin Conjugated, Bioss, #bs-2353R-Biotin, разведение 1 : 500). Благодаря серийным срезам при использовании различных методик оценка популяции тучных клеток в каждом органе проводилась практически в идентичных полях зрения, при этом оцениваемые площади не перекрывали друг друга. Для получения репрезентативного объема ТК анализировали не менее 10 полей зрения в каждом срезе. В желудке и тощей кишке отдельно изучали субпопуляцию атипичных ТК, локализованных в собственной пластинке слизистой оболочки, и субпопуляцию типичных ТК, расположенных в соединительной ткани других оболочек. Количественное содержание тучных клеток выявляли с помощью микроскопа

Zeiss Axio Imager Z1 на полях зрения размером  $700 \times 500$  мкм, полученных при работе с объективом  $\times 20$ . Количественные данные статистически обрабатывались в программном пакете Statistica 6.0.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного исследования показано, что у монгольских песчанок эффективность метакроматического окрашивания ТК в слизистой оболочке желудка не уступала иммуногистохимической идентификации триптазы (табл.). Гинкториальные свойства ТК характеризовались главным образом  $\beta$ -метахромазией. При выявлении хлорацетатэстеразы ТК обнаруживались преимущественно в строме подслизистой и мышечной оболочек желудка (табл.), тогда как в слизистой оболочке встречались единичные клетки. Химаза-положительные ТК чаще обнаруживались в соединительнотканной субпопуляции, однако их количество было невелико (табл.).

**Характеристика популяции тучных клеток монгольских песчанок в органах пищеварительной системы (на поле зрения)**

Орган	Хлорацетатэстераза-позитивные тучные клетки		Толуидиновый синий (метахромазия)		Триптаза-позитивные тучные клетки		Химаза-позитивные тучные клетки	
	ММС	СТМС	ММС	СТМС	ММС	СТМС	ММС	СТМС
Желудок	$1,1 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	Единичные	$1,1 \pm 0,2$
Тощая кишка	$22,4 \pm 1,7$	$1,7 \pm 0,1$	$39,7 \pm 3,1$	$3,2 \pm 0,2$	$39,6 \pm 2,2$	$2,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$	Единичные
Печень	*	$1,5 \pm 0,2$	*	$4,3 \pm 0,2$	*	$3,2 \pm 0,4$	*	Единичные

Примечание: \* — субпопуляция тучных клеток не представлена в органе. ММС — субпопуляция атипичных тучных клеток, локализованная в слизистой оболочке желудка и тощей кишки; СТМС — субпопуляция типичных тучных клеток, локализованная в соединительной ткани подслизистой и мышечной оболочек желудка и тощей кишки.

В тощей кишке монгольских песчанок была обнаружена наиболее многочисленная популяция ТК. ТК хорошо идентифицировались толуидиновым синим, обладали ярко выраженной  $\gamma$ -метахромазией, преимущественно локализуясь в межкрипталльной строме слизистой оболочки. Здесь ТК часто формировали группы из нескольких клеток, которые находились в различном функциональном состоянии — недегранулированные, лизированные, в состоянии экзоцитоза, что отражало совместную и сбалансированную секрецию продуктов биосинтеза в межклеточный матрикс. Гораздо меньшее число ТК визуализировалось в подслизистой и мышечной оболочках. Аналогичное количество и гистотопография ТК обнаруживались с помощью иммуногистохимической идентификации триптазы, и меньшая численность ТК выявлялась при определении активности хлорацетатэстеразы. Наиболее редко визуализировались химаза-позитивные тучные клетки (табл.). В печени ТК располагались преимущественно в строме портальных триад и соединительной ткани, окружающей собирательные вены. Они были хорошо заметны при окрашивании толуидиновым синим, обладали  $\gamma$ -метахромазией, часто наблюдалась либерализация секреторных гранул в экстраклеточный

матрикс механизмом экзоцитоза. Аналогичной гистотопографией в печени характеризовались и триптаза-позитивные тучные клетки. Химаза-содержащие тучные клетки были единичными (табл.).

**Выводы.** Таким образом, каждый из изученных органов пищеварительной системы монгольских песчанок обладал индивидуальной структурой популяции ТК, которая формировалась соотношением численности ТК с определенными признаками и экспрессией протеаз. Для объективной характеристики популяции ТК желудочно-кишечного тракта монгольских песчанок необходимо проводить процедуру иммуногистохимического окрашивания. Результаты выполненной работы могут быть использованы для изучения структуры популяции ТК при исследовании адаптивных или патологических состояний в органах пищеварительной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Эксперимент с монгольскими песчанками в полете космического аппарата «Фотон-М3»* / Е. А. Ильин [и др.] // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2009. Т. 43, № 4. С. 21–25.
2. *Buchwalow, I. B. Immunohistochemistry : basics and methods* / I. B. Buchwalow, W. Boecker ed. London, New York : Springer, 2010. P. 158.
3. *Mast cells in human health and disease* / E. J. DeBruin [et al.] // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1220. P. 93–119.
4. *Development of Mast Cells and Importance of Their Tryptase and Chymase Serine Proteases in Inflammation and Wound Healing* / J. Douaiher [et al.] // *Adv. Immunol.* 2014. Vol. 122. P. 211–252.
5. *Silva, E. Z. M. Mast cell function : a new vision of an old cell* / E. Z. M. Silva, M. C. Jamur, C. Oliver // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014. Vol. 62, № 10. P. 698–738.

*Atyakshin D. A., Burtseva A. S.*

#### **Immunohistochemical identification of mast cells of Mongolian gerbils' digestive system: a comparison with the procedure metachromatic staining and definitions enzyme activity of chloroacetyl esterase**

*Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko,  
Research Institute of Experimental Biology and Medicine, Russia*

A comparative analysis of the effectiveness of histochemical methods (toluidine blue staining and determination enzyme activity of chloroacetyl esterase) and immunohistochemical methods (identifying tryptase and chymase) was conducted for exploring the population of mast cells in the digestive organs of Mongolian gerbils. It is shown that staining of mast cells with toluidine blue does not concede on the objectivity of tryptase immunohistochemical identification. The combination of detection of chymase-positive and tryptase-positive mast cells in conjunction with the metachromatic methods and definition the enzyme activity of chloroacetyl esterase significantly expands the possibilities functional interpretation of mast cells population in digestive tract.

**Key words:** mongolian gerbils, digestive system, mast cells, immune histochemistry, proteases.