

# МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2015  
УДК 611.127.018

*В.В.Гусельникова<sup>1,2</sup>, С.А.Бекоева<sup>4</sup>, В.Ф.Коржевская<sup>4</sup>, Е.А.Федорова<sup>1</sup>, Д.Э.Коржевский<sup>1,3</sup>*

## ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup> Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д.Э.Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup> кафедра цитологии и гистологии (зав. — проф. А.Д.Харазова), <sup>3</sup> кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н.Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет; <sup>4</sup> кафедра судебной медицины (зав. — проф. Е.С.Мишин), Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург

В работе проанализирована возможность использования различных методов гистохимической и иммуногистохимической окраски тучных клеток (ТК) миокарда человека после фиксации материала в формалине и заливки в парафин. Показано, что оптимальным для описания их строения являются методы окраски толуидиновым синим и красителем Гимзы, в то время как окраска альциановым синим среди использованных гистохимических методик является лучшей для подсчета ТК, а в сочетании с иммуногистохимическим выявлением синаптофизина может быть использована для идентификации сочетанной локализации ТК и нервных терминалей в миокарде. Комбинированная окраска ТК альциановым синим—сафранином не является подходящей при изучении миокарда человека, фиксированного в формалине. Иммуногистохимические методы идентификации триптазы и химазы ТК оказываются более чувствительными по сравнению с гистохимическими методиками и позволяют количественно наиболее полно описать популяцию ТК миокарда человека.

**Ключевые слова:** тучные клетки, миокард человека, гистохимия, иммуногистохимия, конфокальная лазерная микроскопия

Несмотря на достигнутые в последние десятилетия успехи в профилактике и лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, изучение механизмов, лежащих в основе их развития, по-прежнему остается актуальным. Показано, что в ряде случаев важную роль в патологических процессах в сердце могут играть тучные клетки (ТК) [4, 17, 20]. В организме млекопитающих они располагаются преимущественно вблизи кровеносных и лимфатических сосудов, в тесном контакте с нервными окончаниями автономной нервной системы. Характерной особенностью ТК является наличие в их цитоплазме многочисленных гранул, содержащих широкий спектр биологически активных веществ, таких как гепарин, нейтральные протеазы (триптаза, химаза), гистамин, серотонин, хондроитинсульфаты, цитокины, факторы роста и др. При активации ТК в ответ на действие различных стимулов содержимое гранул поступает в межклеточное пространство путем дегрануляции [1, 2]. Разнообразие секретируемых медиаторов и многонаправленность их действия обуславливают полифункциональность ТК. В настоящее время открываются новые аспекты их участия в поддержании процессов регенерации и гомеостаза, заживлении ран, ангиогенезе [5], а также в развитии ряда патологических состояний, в том числе различных вариантов патологии сердца. Так, известно, что количество ТК значительно выше у пациентов с инфарктом миокарда, миокардитом, ишемической и дилатационной

кардиомиопатией, чем у людей без сердечно-сосудистой патологии [11, 21, 22]. Показана активация ТК сердца при кардиомиопатиях, сердечной недостаточности, инфаркте и гипертрофии миокарда [14,19].

Изучение роли ТК сердца в регуляции функционального состояния миокарда как в норме, так и при развитии патологических процессов требует хорошо отработанных методик идентификации и оценки их функциональной активности. Существующие различия в фенотипе ТК у представителей разных видов [23] ограничивают использование животных моделей для данных исследований. При изучении тканей человека возникают ряд трудностей, которые связаны, прежде всего, со сроками взятия и особенностями фиксации материала. Проблема фиксации является одной из ключевых для иммуногистохимии, так как от нее в значительной степени зависят результаты реакции, и именно этот этап менее всего поддается контролю при использовании блоков из архива. При работе с патоморфологическим материалом общепринятой методикой считается фиксация в растворе 10% формалина. Однако, как показано, длительная формалиновая фиксация отрицательно влияет на результат окрашивания [6]. Кроме того, ТК некоторых млекопитающих и человека свойственна чувствительность содержимого гранул к альдегидной фиксации, вследствие чего значительная часть этих

### Сведения об авторах:

*Гусельникова Валерия Владимировна* (e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru), *Федорова Елена Анатольевна*, *Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12;

*Бекоева Светлана Анатольевна*, *Коржевская Валентина Федоровна*, кафедра судебной медицины, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

клеток становятся недоступными для гистохимических и иммуногистохимических методов идентификации [12, 18].

Другой причиной сложности изучения ТК является гетерогенность их популяции. У человека принято выделять две субпопуляции ТК, различающихся по составу нейтральных протеаз — ТК<sub>T</sub>, содержащие только триптазу и ТК<sub>ТХ</sub>, содержащие триптазу и химазу [2, 16]. Однако многочисленные данные экспериментов *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о способности субпопуляций ТК изменять свои фенотипические характеристики под действием различных факторов [13, 15]. Остается неясным вопрос, имеют ли указанные различия ТК функциональный или конститутивный характер. При этом ряд исследователей настаивают на том, что фенотипические, биохимические и функциональные различия между ТК, возникающие вследствие влияния факторов локального микроокружения, настолько велики, что позволяют говорить об отдельных субпопуляциях ТК конкретных органов и тканей [10]. Данное обстоятельство также затрудняет изучение ТК, так как методики, хорошо воспроизводимые при исследовании одних органов, могут оказаться менее пригодными при анализе других.

В связи с этим цель данного исследования — оценка результатов методических приемов, позволяющих эффективно идентифицировать ТК миокарда человека и определить их функциональное состояние.

Исследование проведено на образцах миокарда желудочков сердца, взятых у 14 людей (мужчин и женщин) в возрасте от 23 до 93 лет, умерших от различных заболеваний, из архива СПб ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы». Образцы были фиксированы в 10% растворе нейтрального формалина и после стандартной гистологической проводки залиты в парафин по общепринятой методике. С парафиновых блоков делали срезы толщиной 5 мкм. Для выявления ТК часть срезов окрашивали толуидиновым синим (БиоВитрум, Россия), красителем Гимзы (Германия) или альциановым синим (БиоВитрум, Россия). Окрашивание проводили по хорошо отработанному и описанному ранее методикам [6]. Для выявления ТК разной степени зрелости срезы окрашивали раствором альцианового синего G – сафранина O [24]. Для иммуногистохимического исследования были использованы кроличьи поликлональные антитела к синаптофизину—СФ (ready to use; Monosan, Нидерланды), мышинные моноклональные антитела к триптазе ТК человека (ready to use; Dako, Дания) и козы поликлональные антитела к химазе тучных клеток (Abscam, Великобритания). Выявление триптазы ТК для световой микроскопии проводили по ранее описанной методике [8]. В качестве вторичных реагентов использовали набор EnVision+System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). Для выявления химазы проводили инкубацию с первичными антителами в разведении 1:300 в течение 18 ч при 27 °С. Выявление комплекса антиген—антитело в этом случае осуществляли в 2 этапа. На 1-м этапе срезы инкубировали с вторичными антикозьими биотинилированными антителами (разведение 1:200, Dako, Дания) 60 мин при 27 °С, на 2-м этапе — со стрептовидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (реагент «Str/HRP» из набора LSAB 2 System-HRP, Dako, Дания) 30 мин при 27 °С. Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции в обоих случаях применяли 3'3-диаминобензидин (Dako, Дания). После проведения реакции часть срезов докрашивали 0,3% водным раствором астрового синего. Для одновременного выявления ТК и нервных терминалей применяли ранее описанную методику, основанную на комбинации метода гистохимической идентификации ТК альциановым синим и иммуногистохими-

ческой реакции на СФ [3]. В качестве вторичных реагентов в этом случае использовали HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System SPD-015 (Spring Bioscience, США). Для выявления продукта реакции также применяли раствор 3'3-диаминобензидина, приготовленный из двухкомпонентного набора (Dako, Дания). После иммуногистохимического окрашивания препараты обезживали, просветляли и заключали в перманентную среду Cytoseal 60 (Thermo Scientific, США) обычным способом. Анализ и фотографирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия), фотокамеры ICC50 и программы обработки изображений LAS EZ (Leica, Германия). Для конфокальной лазерной микроскопии использовали аналогичную методику выявления триптазы, но дополнительно вводили этап теплового демаскирования антигена в буфере S1700 (Dako, Дания). Для выявления комплекса антиген — антитело при конфокальной микроскопии после обработки реагентом EnVision+ Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания) проводили инкубацию с козьими антителами против HRP, конъюгированными с флюорохромом Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure Goat anti-horseradish Peroxidase, Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1:100). Препараты заключали в среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания). Анализ препаратов и фотосъемку проводили, используя конфокальный лазерный микроскоп LSM710 (Zeiss, Германия). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов осуществляли с применением компьютерных программ ZEN2012 и LSM Image Browser (Zeiss, Германия). При работе с конфокальным микроскопом был использован объектив C-Apochromat 40x (водная иммерсия). Возбуждали флюоресценцию Cy3 твердотельным лазером с длиной волны 561 нм.

На окрашенных толуидиновым синим срезах миокарда ТК идентифицировали по наличию в их цитоплазме метакроматических ярко-фиолетовых гранул (рис. 1, а). Данные клетки были локализованы в пределах соединительной ткани, часто в непосредственной близости от мелких кровеносных сосудов, а также между кардиомиоцитами. ТК разной локализации не имели существенных различий и характеризовались овальной, реже — круглой формой и размерами от 10 до 25 мкм, их цитоплазма была заполнена многочисленными плотно расположенными метакроматически окрашенными гранулами, часто маскирующими ядро. В ряде случаев выявлялись различия гранул по размеру и интенсивности окраски как в разных ТК, так и в пределах одной клетки. В некоторых ТК отмечены признаки частичной дегрануляции (см. рис. 1, а). Расположенные вне ТК гранулы были либо единичными и находились вблизи клетки (иногда — на значительном — до 10 мкм расстоянии от нее), либо многочисленными и тогда часто формировали вокруг ТК подобие ареола. ТК с признаками частичной дегрануляции были обнаружены во всех трех местах локализации, характерных для ТК миокарда. Иногда гранулы в клетке имели периферическое расположение — в этом случае ядро выявлялось в виде окрашенной в синий цвет структуры. По форме ядро ТК соответствовало форме клетки (овальное или круглое) и располагалось эксцентрично. Хорошо выявлялась структура ядра — участки эу- и гетерохроматина, 1–2 крупных ядрышка.

На срезах миокарда, окрашенных красителем Гимзы, ТК контрастно выявлялись на фоне розовых кардиомиоцитов и бледно-розовой соединительной ткани за счет насыщенного фиолетового цвета их гранул (см. рис. 1, б). Размеры, форма и локализация ТК совпадали с описанными при окраске толуидиновым синим. Зернистость ТК при использовании

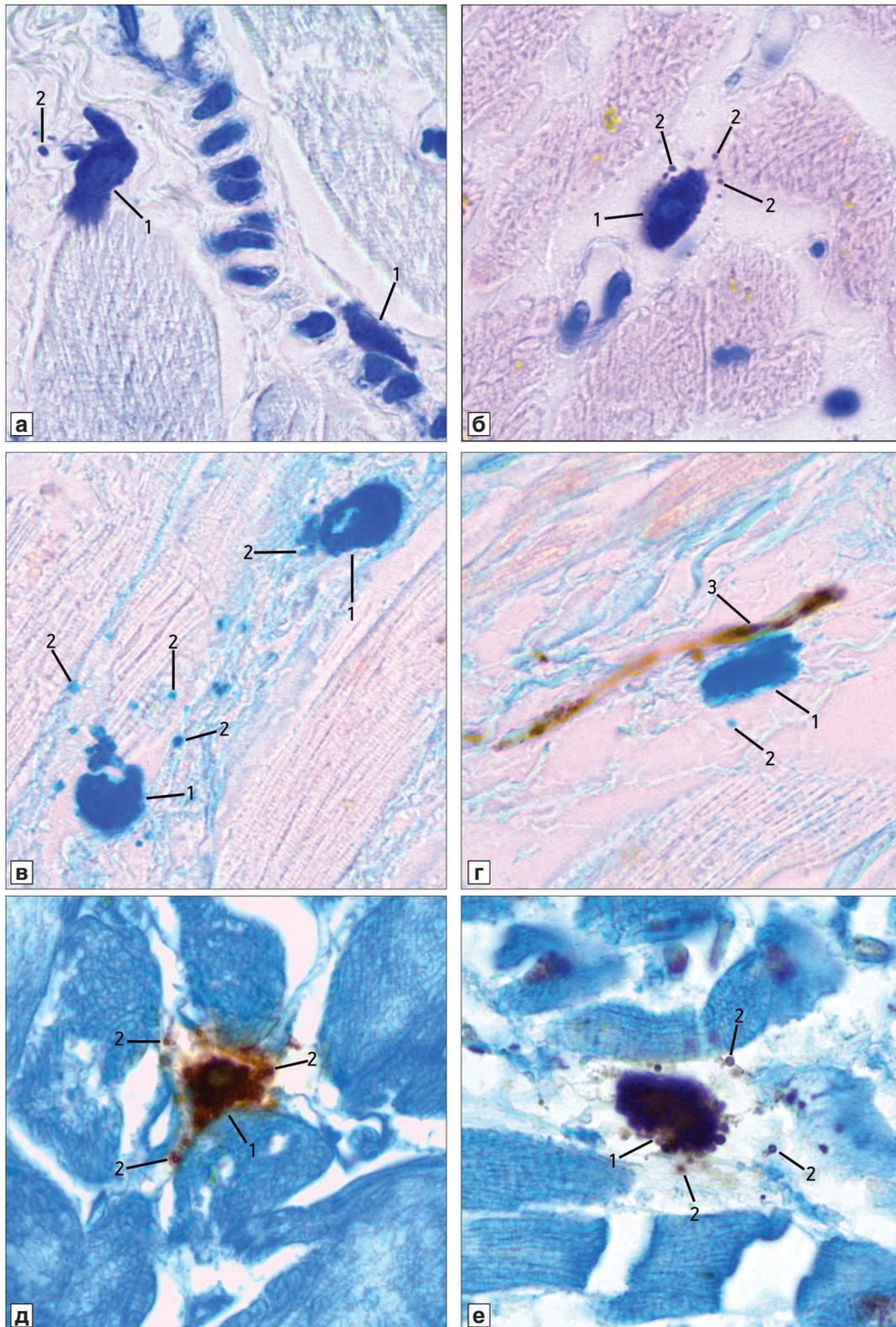


Рис. 1. Тучные клетки миокарда человека.

1 — тучные клетки; 2 — гранулы за пределами тучной клетки; 3 — синаптофизин-позитивная нервная терминаль. Окраска: а — толуидиновым синим; б — красителем Гимзы; в — альциановым синим; г — иммуногистохимическая реакция на синаптофизин с докраской альциановым синим; д — иммуногистохимическая реакция на триптазу тучных клеток с докраской астровым синим; е — иммуногистохимическая реакция на химазу тучных клеток с докраской астровым синим. Об. 100, ок. 10, масляная иммерсия

красителя Гимзы хорошо выражена, заметны различия в размерах гранул. Для большинства ТК характерно плотное расположение гранул в цитоплазме, в ряде случаев выявлялись отдельные гранулы, лежащие вне клетки, иногда на значительном расстоянии от нее (см. рис. 1, б). В некоторых ТК имелись более рыхлое расположение гранул и признаки частичной дегрануляции, которая выражалась в формировании шлейфа из гранул с одной из сторон или ареола из гранул вокруг ТК. Иногда выявлялось окрашенное в синий цвет ядро с ядрышками.

При окраске срезов альциановым синим с последующей дифференцировкой в уксусной кислоте ТК отчетливо выявлялись на слабо окрашенном фоне за счет ярко-бирюзовой окраски их цитоплазмы (см. рис. 1, в). Размеры и форма идентифицированных данным методом ТК совпадали с описанными при использовании других гистохимических красителей (толуидинового синего, азура II—эозина). В ТК с плотным расположением гранул цитоплазма при окраске альциановым синим приобретала однородное окрашивание (гранулярность была плохо выражена), в ряде случаев контуры клетки выглядели размытыми, не определялся полиморфизм гранул. При этом отдельные гранулы, лежащие вне ТК, имели относительно четкие границы и иногда вокруг нее формировали подобие ареола (см. рис. 1, в). В некоторых ТК определялось место расположения ядра в виде неокрашенного участка, локализованного эксцентрично и повторяющего форму клетки.

При окраске препаратов альциановым синим и сафранином ТК выявлялись на бледном фоне за счет окраски их цитоплазматических гранул. Обнаруженные ТК имели такие же морфологические характеристики и локализацию, что и ТК, выявленные другими гистохимическими методами. Однако данные клетки были единичны (1–2 клетки в поле зрения при объективе 40х) и характеризовались синей, сине-фиолетовой или фиолетовой окраской гранул. Гранулярность ТК отчетливо обнаруживалась, в ряде случаев были различимы признаки частичной дегрануляции, выраженные в той же форме, что и обнаруженные при использовании других гистохимических окрасок. В некоторых ТК выявлялось ядро, слабо окрашенное сафранином.

Для одновременного выявления на срезах миокарда ТК и нервных терминалей использовали ранее описанную методику, основанную на комбинации гистохимической идентификации ТК альциановым синим и иммуногистохимической реакции на СФ. ТК отчетливо выявляются за счет интенсивного окрашивания их цитоплазматических гранул альциановым синим в бирюзово-синий цвет (см. рис. 1, г). Морфологические характеристики обнаруженных ТК были идентичны описанным выше (при окраске препаратов только альциановым синим). СФ-позитивные нервные терминали (СФПТ), идентифицируемые по интенсивному окрашиванию реактивом в коричневый или черный цвет (см. рис. 1, г), обнаруживались преимущественно в пределах соединительнотканых прослоек, между кардиомиоцитами и вокруг кровеносных сосудов, где часто формировали сплетения. Дифференцировка препаратов в уксусной кислоте не влияла на результат иммуногистохимической реакции и окраску гранул ТК. На препаратах СФ-позитивные нервные терминали часто располагались в непосредственной близости от ТК, что создавало впечатление существования в сердце контактов между СФПТ и ТК (см. рис. 1, г). Подобное совместное расположение характерно для ТК во всех трех присущих им местах локализации.

При использовании метода идентификации ТК с помощью антител к триптазе они отчетливо выявлялись на срезах миокарда (см. рис. 1, д). Количество ТК, выявляемых в миокарде иммуногистохимически (до 20–25 клеток в поле зрения при объективе 40х), существенно превышало количество ТК, окрашивающихся различными гистохимическими красителями (до 10 клеток в таком же поле зрения). Форма, размеры и локализация ТК не отличались от описанных в ходе их гистохимических исследований, однако определялась тенденция соответствия ТК определенного строения конкретной локализации в пределах миокарда, что не было очевидно при использовании гистохимических окрасок. Так, более крупные размеры и сильно вытянутую форму имели ТК в составе широких соединительнотканых прослоек и между кардиомиоцитами, в то время как у оксососудистых ТК чаще были меньшие размеры (до 15 мкм) и овальная или круглая форма. При иммуногистохимической реакции в большинстве ТК выявлялись признаки частичной дегрануляции, выраженные в большей или меньшей степени: одни ТК имели размытые контуры, другие — характеризовались присутствием единичных или многочисленных внеклеточных гранул, формировавших подобие ареола вокруг ТК (см. рис. 1, д). Иногда эти признаки присутствовали одновременно, и клетка, имеющая нечеткие контуры, была окружена гранулами. Важно, что в некоторых гранулах ТК, расположенных как в пределах цитоплазмы клетки, так и вне ее, иммуногистохимическое окрашивание четко связано с их периферией в виде темного кольца вокруг неокрашенного центра. Наиболее отчетливо такое распределение триптазы в гранулах ТК выявлялось при использовании метода конфокальной лазерной микроскопии. ТК, обнаруженные данным методом, характеризуются теми же морфологическими признаками, что и ТК, выявленные гистохимически и иммуногистохимически с использованием световой микроскопии. Признаки частичной дегрануляции свойственны большинству обнаруженных ТК. В гранулах, находящихся как внутри клетки, так и за ее пределами, флюоресценция часто отчетливо связана с их периферией (рис. 2).

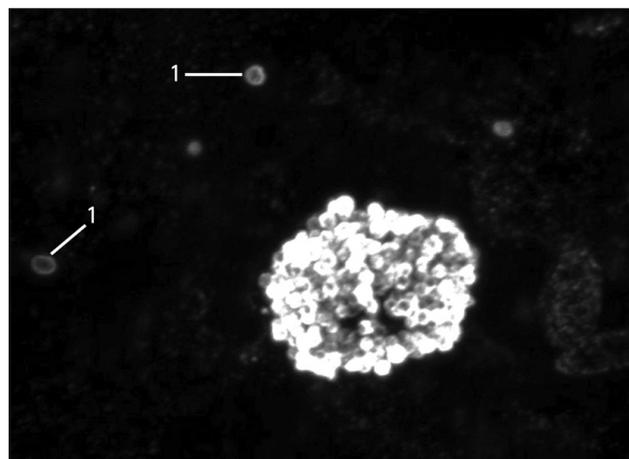


Рис. 2. Тучная клетка миокарда человека, содержащая триптазу, с признаками частичной дегрануляции.

1 — гранулы тучной клетки с периферической локализацией триптазы. Конфокальная микроскопия. Реакция на триптазу тучных клеток. Флюоресцентная визуализация продукта реакции с помощью индокарбоцианина (Cy3). Об.40, ок.10, водная иммерсия

При окраске препаратов иммуногистохимическим методом с использованием антител к химазе на срезах миокарда также были выявлены ТК (см. рис. 1, е). Количество выявляемых данным методом ТК составляет до 15 в поле зрения (при использовании объектива 40х). Форма, размеры и локализация ТК не отличались от описанных для ТК в ходе гистохимических исследований и иммуногистохимического выявления триптазы. Для большинства обнаруженных ТК были характерны признаки частичной дегрануляции в форме нечетких клеточных контуров, присутствия лежащих вне клетки отдельных или многочисленных гранул, формирующих подобие ареола вокруг ТК (см. рис. 1, е). Иногда, как и в случае реакции на триптазу, наблюдалась тенденция, хотя и не столь очевидная, сосредоточения иммуногистохимической окраски на периферии гранул ТК.

Использование методики окраски ТК толуидиновым синим дает хорошие результаты при их изучении в миокарде человека. Отсутствие в тканях сердца других компонентов, характеризующихся метахроматической окраской, кроме ТК, позволяет с высокой точностью идентифицировать данные клетки на окружающем их светлом фоне. Ортохроматическая окраска нуклеиновых кислот толуидиновым синим позволяет рассмотреть структуру ядра ТК, а также за счет окраски ядер других клеточных элементов миокарда сориентироваться в окружающих ТК тканевых структурах и точно описать локализацию ТК. Недостатком данной методики является слабая контрастность ТК для их подсчета при малом увеличении, а также свойство окраски выцветать в течение нескольких месяцев после заключения препарата.

Как и при окраске толуидиновым синим, использование красителя Гимзы позволяет сравнительно легко идентифицировать ТК в ткани миокарда человека и дать их морфологическую характеристику. Преимуществом данной окраски можно считать возможность лучше оценить общее состояние тканей сердца, выявить наличие патологических образований (кровоизлияний, прорастаний соединительной ткани и формирование соединительнотканного рубца, нейтро- или эозинофильной инфильтрации), что затруднительно сделать при окраске толуидиновым синим. Недостатком методики является невозможность точной идентификации ТК при малом увеличении микроскопа, а также очень насыщенная окраска ядер ТК, что порой мешает описанию их тонкой внутренней структуры.

Преимущество окраски ТК миокарда альциановым синим состоит в их очень контрастном окрашивании, что позволяет с высокой точностью идентифицировать эти клетки в ткани сердца при малом увеличении микроскопа (при использовании объектива 10х) и значительно облегчает их подсчет, допуская при этом использование автоматической системы. Слабое фоновое окрашивание прослоек соединительной ткани и кардиомиоцитов делает возможным описание ТК в соответствии с их локализацией. Однако данная методика окраски не позволяет выявить внутреннюю структуру ядра ТК, а также идентифицировать ядра клеток окружающей ткани, например, эндотелиоцитов, что затрудняет выявление мелких кровеносных сосудов и не дает возможности судить о совместной локализации ТК и сосудов в ткани миокарда. Кроме того, по сравнению с описанными выше методами гистохимического окрашивания ТК, окраска альциановым синим оказывается менее пригодной для описания их строения, не дает представления о размерах и плотности расположения гранул, а иногда и о размерах и форме самой клетки.

Результаты окрашивания препаратов миокарда альциановым синим—сафранином свидетельствуют о том, что данная

методика не может быть использована при исследовании ткани миокарда человека, фиксированной в формалине. В ряде исследований [4] было показано присутствие в миокарде у млекопитающих ТК разной степени зрелости: незрелых ТК, содержащих в гранулах несультатированный гепарин, окрашивающийся альциановым синим в синий цвет, и зрелых ТК с гранулами, содержащими высокосультатированный гепарин и окрашивающимися сафранином в красный цвет, а также ТК с промежуточной степенью зрелости гранул. В настоящем исследовании было показано присутствие в миокарде ТК, окрашенных альциановым синим в синий цвет, а также ТК с сине-фиолетовой и фиолетовой окраской, что, вероятно, является результатом совместной окраски гранул ТК альциановым синим и сафранином. Однако ТК, окрашенных исключительно сафранином в красный или коричнево-красный цвет, в данном исследовании обнаружено не было. Это может свидетельствовать либо об отсутствии популяции сафранин-позитивных ТК в миокарде человека, либо об изменении под действием формалина способности к связыванию сафранина. Наблюдаемая бледная общая окраска тканей миокарда позволяет предположить, что отсутствие окрашивающихся сафранином ТК связано именно с неподходящей фиксацией. Полученные результаты согласуются со сведениями о том, что наиболее подходящей фиксацией для данного метода является жидкость Карнуа [24]. Кроме того, не совсем понятно, насколько данная методика применима для окраски ТК человека, так как показано, что до 25% белкового содержимого гранул ТК человека составляют не гепарин или хондроитинсульфаты, как в случае ТК лабораторных млекопитающих, а нейтральные протеазы (химаза, триптаза) [25].

Использованный метод комбинированного окрашивания ТК и терминалей нервных волокон позволяет с высокой избирательностью сравнительно легко выявить в пределах одного среза одновременно ТК и СФПТ нервных волокон в миокарде человека. Несмотря на то, что оптимальной фиксацией для данной методики является цинк–этанол–формальдегид [3], полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода для окраски тканей после формалиновой фиксации. Результаты иммуногистохимического выявления нервных терминалей в миокарде по избирательности и интенсивности окраски сопоставимы с данными других исследований, проведенных с применением антител к СФ [3, 9]. Феномен совместной локализации ТК и СФПТ в миокарде интересен для обсуждения вопроса об их возможном взаимодействии и его роли в сердце в норме и при патологии.

Несомненным преимуществом использования иммуногистохимического метода выявления триптазы для идентификации ТК является его высокая специфичность и чувствительность, что, по-видимому, обуславливает большее количество обнаруженных ТК по сравнению с числом выявленных при использовании гистохимических методов окрашивания. Одной из причин таких различий в количестве ТК может быть также дегрануляция, вследствие которой ТК не выявляются гистохимически из-за выхода из их цитоплазмы в окружающую ткань гранул и содержащихся в них гликозаминогликанов, на окрашивании которых основано большинство гистохимических методов выявления ТК [7]. Однако использованная методика выявления триптазы ТК является менее подходящей для описания их тонкого строения по сравнению с гистохимическими методами окраски. Кроме того, как известно, часть ТК человека характеризуются отсутствием в гранулах триптазы и наличием в

качестве протеазы исключительно химазы [2, 16], в связи с чем результаты, полученные при использовании данного метода, не позволяют точно судить об общей численности популяции ТК миокарда. Поэтому важным обстоятельством при изучении популяции ТК является возможность идентификации обеих протеаз. Используемый в данном исследовании метод иммуногистохимического выявления химазы ТК позволяет с высокой избирательностью выявить ТК на препаратах миокарда человека. При этом показано, что количество выявляемых этим методом ТК меньше, чем при использовании антител к триптазе. Это может быть свидетельством присутствия в миокарде двух субпопуляций ТК — ТКт, содержащих только триптазу и ТКтх, содержащих обе протеазы (триптазу и химазу). Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что 90% ТК сердца человека относятся к ТКтх-типу, а ТКт составляют около 10% их числа. Показано, что подобное соотношение субпопуляций ТК характерно для миокарда человека как в норме, так и при различных патологических состояниях [26]. Остается неясным вопрос, имеют ли указанные различия ТК индуцируемый или конститутивный характер. Сложность его решения в отношении ТК человека обусловлена невозможностью проведения соответствующих экспериментов. Полученные на лабораторных млекопитающих многочисленные данные свидетельствуют о способности субпопуляций ТК у грызунов изменять (в ряде случаев — обратимо) свои фенотипические характеристики в зависимости от микроокружения [15]. Однако, поскольку субпопуляции ТК у человека и грызунов не являются полными аналогами [23], экстраполяция указанных данных на человека затруднительна.

Таким образом, при изучении ТК миокарда человека после альдегидной фиксации оптимальными для описания их строения оказываются методы окраски толуидиновым синим и красителем Гимзы, в то время как окраска альциановым синим может быть использована для упрощения подсчета ТК при малом увеличении микроскопа, а в сочетании с иммуногистохимическим выявлением СФ позволяет идентифицировать сочетанную локализацию ТК и нервных терминалей в миокарде человека. Окраску ТК с использованием комбинации альцианового синего и сафранина применять при изучении ТК миокарда человека не следует, поскольку полученные результаты не могут быть однозначно истолкованы. Методы иммуногистохимической идентификации являются наиболее избирательными при изучении ТК миокарда человека после фиксации материала в формалине и заливки в парафин. Среди использованных подходов наиболее полно все существующие популяции ТК миокарда позволяет выявить иммуногистохимическая реакция на триптазу. При этом возможен объективный учет дегранулирующих ТК.

Используемые в рамках настоящего исследования методы идентификации ТК могут быть применены для их изучения в различных органах и тканях человека. Однако следует учитывать возможность существования выраженной гетерогенности в популяции ТК, вследствие чего ТК разных органов могут существенно различаться по ряду фенотипических, биохимических и функциональных характеристик. По этой причине методы идентификации ТК, хорошо воспроизводимые при исследовании отдельных органов, могут оказаться менее пригодными при исследовании других. В связи с этим для изучения популяции ТК стромы какого-либо органа целесообразно использовать одновременно несколько методов идентификации ТК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток // *Морфология*. 1999. Т. 155, вып.2. С. 64–70.
2. Быков В.Л. Развитие и гетерогенность тучных клеток // *Морфология*. 2000. Т. 117, вып.2. С. 86–92.
3. Гусельникова В.В., Сухорукова Е.Г., Федорова Е.А. и др. Метод одновременного выявления тучных клеток и нервных терминалей в тимусе лабораторных млекопитающих // *Морфология*. 2014. Т. 145, вып.2. С. 70–73.
4. Ерохина И. Л., Мартынова М. Г., Моисеева О. М., Емельянова О.И. Активация тучных клеток при экспериментальном инфаркте миокарда у 3-недельных крыс // *Цитология*. 2006. Т. 48, № 8. С. 661–664.
5. Кондашевская М.В. Тучные клетки и гепарин — ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах // *Вестн. РАМН*. 2010. №6, С. 49–54.
6. Коржевский Д.Э. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии. СПб.: СпецЛит, 2013.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир. 1969.
8. Сухорукова Е.Г., Бекоева С.А., Коржевская В.Ф. и др. Диагностические возможности методов иммуногистохимии при гистологическом исследовании сердца // *Суд.-мед. эксперт*. 2013. Т. 56, №4. С. 38–40.
9. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Иннервация сердца крысы // *Морфология*. 2009. Т. 135, №2. С. 33–37.
10. Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г., Арташян О.С. Тучные клетки: физиология и патофизиология. М.: Медицина, 2011.
11. Akgul A., Skrabal C.A., Thompson L.O. et al. Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support // *J. Heart Lung Transplant*. 2004. Vol. 23. P. 709–715.
12. Asti R.N., Kurtdede A., Kurtdede N. et al. Mast cells in the dog skin: distribution, density, heterogeneity and influence of fixation techniques // *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2005. Vol. 52. P. 7–12.
13. Eguchi M., Nakahata T., Tsuji K., Furukawa T. Morphological and cytochemical changes in human mast cells during culture // *Med. Electron. Microsc.* 1997. Vol. 30. P. 25–30.
14. Engels W., Reiters P.H., Daemen M.J. et al. Transmural changes in mast cell density in rat heart after infarct induction in vivo // *J. Pathol.* 1995. Vol. 177. P. 423–429.
15. Gilead L., Bibi O., Razin E. Fibroblasts induce heparin synthesis in chondroitin sulfate E containing human bone marrow-derived mast cells. *Blood*. 1990. Vol. 76, № 6. P. 1188–1195.
16. Iran, A.-M.A., Schechter N.M., Craig S.S. et al. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. Vol. 83. P. 4464–4468.
17. Levick S.P., Melendez G.C., Plante E., McLarty J.L. et al. Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodeling // *Cardiovasc. Res*. 2011. Vol. 89. P. 12–19.

18. Marshall J.S., Ford G.P., Bell E.B. Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis // *Brit. J. Dermatol.* 1987. Vol. 117. P. 29–36.
19. Olivetti G., Lagrasta C., Ricci R. et al. Long-term pressure-induced cardiac hypertrophy: capillary and mast cell proliferation // *Amer. J. Physiol.* 1989. Vol. 257. P. 1766–1772.
20. Panizo A., Mindan F.J.P., Calindo M.F. et al. Are mast cells involved in hypertensive heart disease? // *J. Hypertension.* 1995. Vol. 13. P. 1201–1208.
21. Patella V., Marino I., Arbustini E. et al. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 971–978.
22. Petrovic D., Zorc M., Zorc-Pleskovic R., Vraspir-Porenta O. Morphometrical and stereological analysis of myocardial mast cells in myocarditi and dilated cardiomyopathy // *Folia Biol. (Praha).* 1999. Vol. 45. P. 63–66.
23. Ribatti D., Crivellato E. *Mast Cells and Tumours: from Biology to Clinic.* NY.: Springer. 2011.
24. Rohlich P., Csaba G. Alcian blue – safranin staining and ultrastructure of rat mast cell granules during degranulation // *Acta biol. Acad. Sci. Hung.* 1972. Vol. 23. P. 83–89.
25. Schwartz L.B., Irani A.M., Roller K. et al. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells // *J. Immunol.* 1987. Vol. 138, № 8. P. 2611–2615.
26. Sperr W.R., Bankl H.C., Mundigler G. et al. The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization. *Blood.* 1994. Vol. 84. P. 3876–3884.

Поступила в редакцию 06.06.2014  
Получена после доработки 04.02.2015

## HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF HUMAN MYOCARDIAL MAST CELLS

V.V.Gusel'nikova<sup>1,2</sup>, S.A.Bekoyeva<sup>4</sup>, V.F.Korzhevskaya<sup>4</sup>, Ye.A.Fyodorova<sup>1</sup>, D.E.Korzhevskiy<sup>1,3</sup>

This paper compares the results of application of various methods of histochemical and immunohistochemical staining of mast cells (MC) in human myocardium after formalin fixation and paraffin embedding of the material. It was shown that the optimal methods for description of their structure were toluidine blue staining and and Giemsa stain, while alcian blue staining represented the most suitable histochemical method for MC counting. In combination with immunohistochemical detection of synaptophysin, it could be used for identification of co-localization of MC and nerve terminals in the myocardium. Combined staining of MC with alcian blue and safranin is not suitable for human formalin-fixed myocardial MC. Immunohistochemical techniques of MC tryptase and chymase demonstration appear to be more sensitive when compared with histochemical methods, and allow the most comprehensive quantitative description of human myocardial MC population.

**Key words:** *mast cells, human myocardium, histochemistry, immunohistochemistry, confocal laser microscopy*

<sup>1</sup> Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St.Petersburg; <sup>2</sup> Department of Cytology and Histology, <sup>3</sup> Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St.Petersburg State University; <sup>4</sup> Department of Forensic Medicine, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, St.Petersburg