

УДК 57.086.16:572.783:576.53

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИЕ ХИМАЗУ, И ИХ ВЫЯВЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ АНТИТЕЛ

© 2024 г. А. А. Бекетова^{1, *}, О. В. Кирик¹, Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022, Россия

* E-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.07.2024

После доработки 30.08.2024

Принята к публикации 02.09.2024

В последние десятилетия уделяется особое внимание роли тучных клеток в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе внезапной сердечной смерти. Одним из компонентов гранул тучных клеток является химаза. Для ее иммуногистохимического выявления используют реагенты, обладающие различной специфичностью. Данное обстоятельство не позволяет точно оценить субпопуляции тучных клеток миокарда. Цель данного исследования состояла в оценке пригодности различных реагентов для селективного выявления тучных клеток миокарда и проверке гипотезы о существовании популяции тучных клеток, способных к окраске альциановым синим при негативной реакции на химазу. Анализ результатов использования различных протоколов для выявления тучных клеток показал, что, в сравнении с козьими поликлональными антителами к химазе, мышинные моноклональные антитела обладают большей специфичностью, а предварительное окрашивание срезов альциановым синим позволяет нивелировать неспецифическое мечение антителами липофусцина кардиомиоцитов. Кроме этого, все предложенные протоколы позволяют обнаружить морфологическую гетерогенность тучных клеток и их гранул в миокарде человека.

Ключевые слова: тучные клетки, химаза, миокард человека, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0041377124050066, **EDN:** DUOQAR

Тучные клетки с момента их открытия привлекают внимание исследователей в области как фундаментальной, так и клинической медицины. Данные клетки являются мультифункциональными, играя роль не только в регуляции соединительной ткани, но в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета (Цибулькина, Цибулькин, 2017), а также в модуляции работы центральной (Григорьев, Коржевский, 2021a) и периферической нервной системы (Theoharides et al., 2023). Однако кроме физиологической функции тучные клетки принимают участие в патологическом воспалении, в том числе нейровоспалении (Григорьев, Коржевский, 2021b), реакции гиперчувствительности первого типа, постинфарктном ремоделировании миокарда (Levick, Widiapradja, 2018; Juliano et al., 2020).

Значение тучных клеток в патологии сердечно-сосудистой системы не ограничивается фиброзированием миокарда: взаимное расположение тучных клеток и симпатических нервных

окончаний в сердце указывает на участие первых в формировании аритмий, исходом которых может стать внезапная сердечная смерть (Reid et al., 2011). Активация симпатических волокон происходит вследствие нескольких событий. Во-первых, выделение тучными клетками ренина запускает каскад локальной ренин-ангиотензиновой системы, итогом которого является активация рецепторов ангиотензина первого типа на мембране симпатических нервных волокон, что приводит к усилению экзцитоза норадреналина (Maskins et al., 2006). Во-вторых, аналогичный эффект оказывает химаза тучных клеток, обладающая свойствами ангиотензинпревращающего фермента (Urata et al., 1993). В-третьих, высвобождение гистамина из гранул тучных клеток, с одной стороны, приводит к активации аритмогенных гистаминовых H₁- и H₂-рецепторов, а с другой, антиаритмогенных гистаминовых H₃-рецепторов (Reid et al., 2011). Показано, что активация H₃-рецепторов происходит при наномолярных

концентрациях гистамина, тогда как активация H_1 - и H_2 -рецепторов требует микромолярных концентраций (Reid et al., 2011). Данный факт говорит в пользу модулирующей роли тучных клеток в развитии патологического процесса, то есть имеют место не только повреждающие эффекты, но и кардиопротективные. Однако популяция кардиальных тучных клеток и изменения в ней в ходе различных патологических процессов остается изученной не до конца.

Исследования прошлого века показали морфологическую и функциональную гетерогенность популяции тучных клеток. С момента определения содержимого гранул тучных клеток и развития иммуногистохимического метода ведущим признаком, позволяющим разделить тучные клетки на субпопуляции, стал спектр нейтральных протеаз гранул, а именно наличие в них исключительно триптазы или комбинации триптазы, химазы, карбоксипептидазы А3 и некоторых других протеаз. Согласно этому принципу, выделяют две субпопуляции тучных клеток — MC_T и MC_{TC} соответственно (Irani et al., 1986; Grigorev, Korzhevskii, 2021).

Несмотря на высокую селективность иммуногистохимического метода существует проблема взаимодействия реагентов, используемых для его исполнения, а также зависимость чувствительности антител от фиксирующего раствора (KleinJan et al., 1996). Более того, различные первичные антитела к протеазам гранул тучных клеток имеют разную селективность (Irani et al., 1989; Weidner, Austen, 1993). Данные обстоятельства приводят к различиям в оценке процентного соотношения субпопуляций тучных клеток в отдельных органах и тканях (Weidner, Austen, 1993; KleinJan et al., 1996).

Работы, описывающие субпопуляции тучных клеток миокарда человека, немногочисленны, однако в медицинском сообществе в последние 20 лет все больше возрастает интерес к роли тучных клеток в процессе ремоделирования миокарда (Kologrivova et al., 2021; Jin et al., 2022). Исследователи отдают ведущую роль в развитии патологии миокарда протеазам тучных клеток, в первую очередь химазе. С другой стороны, была открыта ферментативная активность химазы в отношении ангиотензина I, что раскрывает один из механизмов регуляции кровоснабжения тучными клетками, а также открывает новые мишени для терапии.

Из сказанного выше становится очевидной актуальность определения особенностей различных антител для иммунохимического выявления химазы тучных клеток. Цель данного исследования состояла в оценке пригодности различных реагентов для селективного выявления тучных клеток миокарда и проверке гипотезы о существовании популяции тучных клеток, способных к окраске альциановым синим при негативной реакции на химазу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования были выбраны срезы миокарда человека, полученные из Архива отдела общей и частной морфологии ФБГНУ Института экспериментальной медицины. Срезы были получены с парафиновых блоков образцов миокарда человека, фиксированных в формалине. Отдельно был выбран образец, фиксированный в цинк-этанол-формалине.

Процедуру иммуногистохимического исследования проводили согласно пяти различным протоколам в соответствии с используемыми первичными антителами, наличием процедуры теплового демаскирования, вторичными реагентами, а также наличием предварительного окрашивания альциановым синим. Особенности каждого протокола указаны в табл. 1. Срезы освобождали от парафина в ксилолах и регидратировали в спиртах нисходящей концентрации. Процедуру термического демаскирования антигена проводили в микроволновой печи путем трехкратного нагревания до температуры кипения буфера S1700 (Agilent, США), после чего раствор и срезы остужали до комнатной температуры. Далее для всех срезов проводили блокировку эндогенной пероксидазы 3%-ным раствором перекиси водорода в течение 10 мин путем нанесения его непосредственно на срез. После промывки срезов от раствора перекиси водорода в дистиллированной воде срезы оставляли на 5 мин в PBS. Срезы, обрабатываемые по протоколу № 5, после регидратации подвергали процедуре термического демаскирования антигена, затем окрашивали альциановым синим (Sigma-Aldrich, США) (методика описана ниже), после чего проводили блокировку эндогенной пероксидазы, как было описано выше. Затем проводили обработку блокирующими реагентами: Horse serum (Jackson ImmunoRe-

Таблица 1. Перечень первичных антител и других реагентов, использованных в соответствующих протоколах

№ протокола	Первичные антитела	Разведение	Блокирование неспецифической реакции	Вторичные реагенты	Термическое демаскирование	Окраска альциановым синим
1	Поликлональные козы антигена против химазы тучных клеток человека (ab111239; AbCam, Великобритания)	1 : 200	Horse serum (Jackson Immuno Research, США)	Авидин-биотинный набор VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (PK-8800; Vector Laboratories, США)	Отсутствовало	После проявления ИГХ-реакции DAB
2		1 : 300				
3			Блокирующие реагенты из набора Anti Rabbit, Mouse, Goat HRP-DAB Cell and Tissue Staining Kit (R&D System, США)	Реагенты из набора R&D и конъюгат стрептавидина и пероксидазы хрена	Нагревание в микроволновой печи в буфере S1700 (Agilent, США)	
4	Моноклональные мышинные антитела против химазы тучных клеток человека, клон CC1 (ab2377; AbCam, Великобритания)	1 : 600	Не применяли	MACH 2 Mouse (BioCare Medical, США)		
5						

search, США) наносили на срезы и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, блокирующие реагенты из набора Anti Rabbit, Mouse, Goat HRP-DAB Cell and Tissue Staining Kit (R&D System, США) использовали согласно инструкции. Срезы, обработанные первичными антителами, инкубировали в течение 20 ч при 27.5 °С. После отмывки первичных антител в PBS срезы обрабатывали вторичными реагентами. В протоколах № 1 и 2 реагенты авидин-биотинного набора VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (PK-8800, Vector Laboratories, США) наносили на 60 мин при 27.5 °С, после чего смывали PBS и наносили на срезы конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена на 30 мин при той же температуре. В протоколе № 3 вторичные реагенты из набора R&D наносили согласно инструкции, инкубацию с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена проводили аналогично указанному выше. Используемый в протоколах №№ 4 и 5 MACH 2 Mouse (BioCare Medical, США) инкубировали 60 мин

при 27.5 °С. Продукт реакции визуализировали с помощью DAB. Реакцию останавливали с помощью 3%-ного раствора перекиси водорода, после чего срезы погружали в воду.

После обработки DAB (или после термического демаскирования в протоколе № 5) производили подкраску срезов альциановым синим (Sigma-Aldrich, США) по следующей методике. На срезы наносили небольшое количество раствора красителя, помещали стекла во влажные камеры и инкубировали при 40 °С в течение 30 мин, после чего краситель удаляли со срезов путем стряхивания и последующего промывания в двух порциях дистиллированной воды.

Подкрашенные срезы заключали в среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США). Анализ цифровых изображений, полученных с помощью микроскопа Leica DM750 и камеры ICC50, проводили с использованием программного обеспечения Leica LAS EZ (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все перечисленные протоколы позволили выявить тучные клетки миокарда человека, причем визуальная оценка количества выявленных тучных клеток на срезах, полученных с одних и тех же образцов, но при использовании разных протоколов не выявила очевидных различий.

При использовании протоколов № 1–3 наблюдали интенсивную неспецифическую реакцию в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 1а–в), гладкомышечных клеток сосудов и эндотелиоцитов. Проведение термического демаскирования антигена при использовании вторичных антител из набора VECTASTAIN существенно не влияло на результат: разность интенсивности тучных клеток и фона не менялась, однако начинали неспецифически выявляться гранулы липофусцина в цитоплазме кардиомиоцитов. Стоит отметить, что во всех случаях и при использовании любых реагентов,

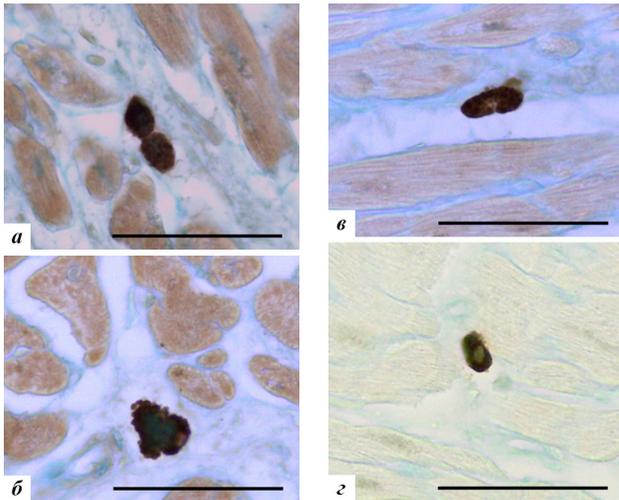


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического выявления химазы тучных клеток миокарда при использовании различных протоколов.

а – Использование козьих поликлональных антител, авидин-биотинового набора VECTASTAIN без термического демаскирования (протокол № 1); *б* – использование козьих поликлональных антител, авидин-биотинового набора VECTASTAIN, термическое демаскирование (протокол № 2); *в* – использование козьих поликлональных антител, вторичных реагентов из набора R&D, термическое демаскирование антигена (протокол № 3); *г* – предварительное окрашивание альциановым синим, мышинные моноклональные антитела, термическое демаскирование (протокол № 5). Увел. объектива 40×. Масштабный отрезок: 50 мкм.

проведение термического демаскирования антигена приводило к разной степени яркости окрашивания гранул липофусцина. Примечательно, что интенсивность окраски липофусцина при использовании мышинных моноклональных антител эквивалентна интенсивности окраски гранул тучных клеток, что затрудняет идентификацию последних при малом увеличении объектива микроскопа. Стоит также отметить, что материал, фиксированный в цинк-этанол-формалине, показал наиболее интенсивную окраску липофусцина в сравнении с материалом, фиксированном в формалине, что свидетельствует о влиянии способа фиксации на специфичность связывания антител.

Протокол № 3 (рис. 1г) показал наилучший результат среди протоколов, в которых используются козьи поликлональные антитела к химазе, что характеризуется сравнительно низким уровнем фона, неярким выявлением гранул липофусцина и сохраненной яркостью гранул тучных клеток. Недостатком данного протокола является его трудоемкость в связи с большим числом реагентов и удлинением времени его исполнения.

Результаты протоколов № 4 и 5 (рис. 1г; рис. 2) положительно отличаются от протоколов № 1–3 наличием минимального фона или отсутствием такового. Однако, как уже было замечено ранее, протокол № 4 имеет недостаток – неспецифическое выявление гранул липофусцина кардиомиоцитов. Данный недостаток полностью нивелируется предварительным окрашиванием альциановым синим (рис. 1г); на интенсивность окрашивания гранул тучных клеток данная процедура не влияет. Из дополнительных плюсов протоколы № 4 и 5 требуют меньшего числа реагентов, что значительно ускоряет их выполнение и уменьшает вероятность ошибки со стороны исполнителя.

Все протоколы позволили получить примерно одинаковое окрашивание гранул тучных клеток. Было выявлено, что на одном и том же срезе тучные клетки окрашиваются неравномерно (рис. 2). Условно можно выделить три группы: 1 – интенсивно окрашенные тучные клетки (рис. 2а), 2 – тучные клетки средней интенсивности окраски (рис. 2б) и 3 – слабоокрашенные тучные клетки. Тучные клетки первой группы характеризуются

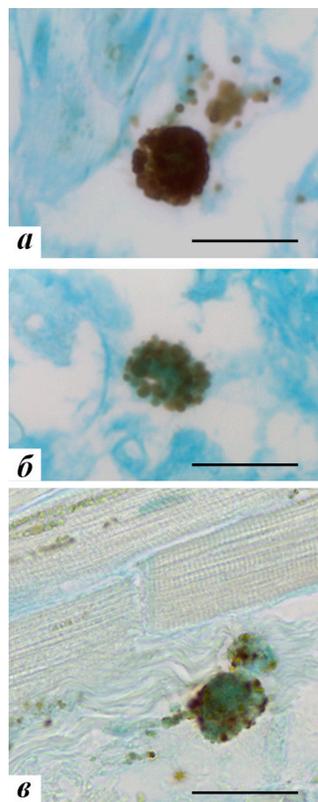


Рис. 2. Различная интенсивность иммуногистохимического мечения тучных клеток. Использован протокол № 4.

a – Дегранулирующая тучная клетка, наблюдаются гранулы, более интенсивно окрашенные по периферии; *б* – тучная клетка, в которой наблюдаются гранулы различного диаметра; *в* – тучная клетка, часть гранул которой не метится антителами к химазе. Увел. объектива: 100×. Масштабный отрезок: 20 мкм.

тем, что все их гранулы дают интенсивную положительную иммуногистохимическую реакцию. Для некоторых гранул характерна более интенсивная окраска по периферии (рис. 2*a, в*), для других – равномерная окраска. Часть клеток окрашивается настолько интенсивно, что дать оценку окрашенности отдельных гранул не представляется возможным. Большая часть гранул тучных клеток второй группы окрашена, при этом между гранулами наблюдаются участки цитоплазмы, окрашенные только альциановым синим. Для тучных клеток третьей группы характерно окрашивание гранул по периферии клетки и единичных гранул в центре клетки. Вне зависимости от группы тучные клетки содержали гранулы разного размера (рис. 2*б*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как было отмечено ранее, особенностью окрашивания крупных гранул тучных клеток являлась более интенсивная окраска по периферии гранулы, а также в центре с образованием химаза-позитивного ядра. Данные наблюдения согласуются с работами других авторов (Гусельникова и др., 2015; Атякшин и др., 2018; Atiakshin et al., 2023) и могут быть объяснены следующим образом. Ранее было показано, что зрелые гранулы тучных клеток образуются путем слияния гранул малого объема (програнул), синтезируемых комплексом Гольджи, и их объем зависит от продолжительности их созревания, которая может исчисляться месяцами (Hammel et al., 2010). Другие исследования показали, что для зрелых гранул характерно наличие плотного ядра, образованного комплексом ферментов и гликозаминогликанов (Arvan, Castle, 1998; Braga et al., 2007; Wernersson, Pejler, 2014). Концентрирование ферментов по периферии гранулы, как уже было сказано, отмечается исследователями, однако объяснение этого феномена предложено не было. Предположительно, внутригранулярная архитектура формируется согласно биофизическим свойствам молекул, образующих ее, и связана с наличием других молекул, участвующих в сборке гранул (Arvan, Castle, 1998). По мере созревания гранулы в ней накапливаются отрицательно заряженные молекулы протеогликанов и положительно заряженные молекулы протеаз, которые вступают в электростатическое взаимодействие (Mulloy et al., 2017). Вероятно, при достижении критической концентрации данных молекул и снижения pH внутригранулярной среды, сопровождающего процесс созревания гранул (Wernersson, Pejler, 2014), происходит «уплотнение» комплекса в результате, с одной стороны, усиления электростатического взаимодействия (Mulloy et al., 2017), а с другой стороны, фазового перехода (Alberti, 2017). Поскольку параметры внутригранулярной среды динамичны вследствие продолжающегося слияния програнул со зрелой гранулой, возможен сдвиг концентрации ферментов или протеогликанов, приводящий к обратному фазовому переходу (Alberti, 2017), затрагивающему околосмембранную часть гранулы. При этом

взаимодействие ферментов с протеогликанами ослабевает, и они переходят в растворенное состояние. Подобное объяснение является лишь предположением, требующим более детального изучения с точки зрения биофизики. Однако тот факт, что находящиеся вблизи мембраны ферменты активнее взаимодействуют с антителами, чем находящиеся в центральной области гранулы, свидетельствует в пользу большей доступности первых, что в свою очередь может быть обеспечено свободой от взаимодействия с другими молекулами.

Наличие как крупных, так и мелких гранул в тучных клетках можно объяснить стадией их созревания. Существование гранул малого размера можно рассмотреть и с позиции дегрануляции тучных клеток. Показано, что дегрануляция тучных клеток может осуществляться различными способами, и в том числе, путем так называемой *kiss and run* дегрануляции, подразумевающей приближение гранулы к плазматической мембране клетки и образование поры, через которую происходит выход содержимого гранулы, что сопровождается уменьшением объема ее содержимого. С другой стороны, существует явление постепенной дегрануляции — *piecemeal degranulation* (Crivellato et al., 2003) — для которого характерно образование везикул малого размера, диаметром 70–150 нм (Crivellato et al., 2003), путем отпочковывания от зрелых гранул (в среднем 1 мкм в диаметре). В связи с этим, наблюдаемые гранулы меньшего размера могут расцениваться как истощающиеся материнские гранулы. С другой стороны, есть мнение, что постепенная дегрануляция — это процесс, при котором отдельные гранулы сливаются с плазматической мембраной, образуя поры через которые происходит выделение компонентов гранул, но при этом не происходит слияние гранул между собой с образованием каналов дегрануляции (Blank, 2011). В этом случае объяснение остается тем же — выход содержимого гранул приводит к уменьшению объема гранул.

К вопросу о разнообразии размеров гранул можно подойти с другой стороны, взяв во внимание существование тучных клеток разной иммуногистохимической реактивности. В работах по двойному маркированию ферментов гранул тучных клеток было выявлено, что в одной клетке сосуществуют гранулы,

содержащие как сразу несколько ферментов, так и только один из выявляемых (Atiakshin et al., 2023). В связи с этим можно предположить, что для тучных клеток справедливо наличие сортировки компонентов гранул в процессе созревания. Для клеток, имеющих секреторные гранулы, описано два механизма избирательного наполнения гранул: сортировка по входу (*sorting for entry*) и сортировка по удержанию (*sorting for retention*) (von Zastrow et al., 1989; Arvan, Castle, 1998). Согласно первому механизму в состав гранулы компоненты включаются согласно спектру мембранных рецепторов, то есть созревание гранулы сопряжено с накоплением в ней специфических белков и небелковых компонентов. Второй механизм подразумевает изменение рН внутригранулярной среды, которое приводит к конденсации белков, что способствует их удержанию, или не приводит к таковой, что определяет выведение молекул из состава гранулы. Выведение в этом случае осуществляется посредством рецепторного взаимодействия молекул и образования везикулы, которая отделяется от созревающей гранулы и может быть использована для построения других гранул или утилизирована. Насколько справедливы эти механизмы в контексте тучных клеток человека, к сожалению, неясно, а потому данный вопрос требует дальнейшего изучения.

В ходе анализа срезов не были выявлены тучные клетки, окрашивающиеся альциановым синим и дающие негативную реакцию на химазу, что косвенно указывает на преобладание субпопуляции химаза-позитивных тучных клеток в миокарде. Эти данные согласуются с более ранними исследованиями распределения субпопуляций тучных клеток сердца человека (Spert et al., 1994). Стоит отметить, что высока вероятность положительной реакции указанных выше клеток в отношении триптазы, поскольку некоторые исследования показывают наличие в тучных клетках гранул, содержащих только один из выявляемых ферментов (Atiakshin et al., 2023). При этом, обнаруженные химаза-негативные гранулы могут расцениваться, как потенциально содержащие триптазу. Однако не стоит исключать возможность, что клетки, проявившие слабую химаза-позитивную реакцию в представленных в данной статье протоколах, могли не проявить

таковой в протоколах двойного маркирования специфических ферментов тучных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе результатов представленных в данной статье протоколов установлено, что использование козьих поликлональных антител к химазе тучных клеток человека сопряжено со значительной трудоемкостью протокола и неудовлетворительно высоким уровнем неспецифического фона, в то время как мышиные моноклональные антитела обеспечивают селективность выявления химазы без фона, простоту и скорость выполнения протокола, что создает преимущество для использования данного типа антител. Несмотря на различный уровень фона все протоколы позволяют выявить морфологическую гетерогенность популяции тучных клеток миокарда человека и их гранул. Тем не менее молекулярные механизмы образования, созревания и экзоцитоза гранул тучных клеток – процессы, лежащие в основе морфологической гетерогенности, – остаются неясными, а вопрос функциональной значимости различий в распределении субпопуляций тучных клеток миокарда – открытым.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины (проект FGWG-2024-0015).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б., Тиманн М. 2018. Протеазы тучных клеток в формировании специфического тканевого микроокружения: патогенетические и диагностические аспекты. *Терапия*. Т. 24. № 6. С. 128. (Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. 2018. Mast cell proteases in formation of the specific tissue

microenvironment: pathogenic and diagnostic aspects. *Therapy*. V. 24. P. 128.)

<https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2018.6.128-140>
Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2021. Тучные клетки в головном мозге позвоночных – локализация и функции. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. Т. 57. № 1. С. 17. (Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. 2021. Mast cells in the vertebrate brain: localization and functions. *J. Evol. Biochem. Physiol.* V. 57. P. 17.)

<https://doi.org/10.31857/S0044452921010046>
Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2021. Тучные клетки и нейровоспаление в патогенезе нервных и психических заболеваний. *Медицинский академический журнал*. Т. 21. № 2. С. 7. (Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. 2021. Mast cells and neuroinflammation in pathogenesis of neurologic and psychiatric diseases. *Medical Academic Journal*. V. 21. № 2. P. 7.)
<https://doi.org/10.17816/MAJ63228>

Гусельникова В.В., Бекоева С.А., Коржевская В.Ф., Федорова Е.А., Коржевский Д.Э. 2015. Гистохимическая и иммуногистохимическая идентификация тучных клеток миокарда человека. *Морфология*. Т. 147. № 2. С. 80. (Gusel'nikova V.V., Bekoyeva S.A., Korzhevskaya V.F., Fyodorova Y.A., Korzhevskiy D.E. 2015. Histochemical and immunohistochemical identification of human myocardial mast cells. *Morfologiya*. V. 147. № 2. P. 80.)

Цибулькина В.Н., Цибулькин Н.А. 2017. Тучная клетка как полифункциональный элемент иммунной системы. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. Т. 49. № 2. С. 4. (Tsybulkina V.N., Tsybulkin N.A. 2017. Mast cell as poly-functional element of immune system. *Allergol. Immunol. Pediatr.* V. 49. № 2. P. 4.)

Alberti S. 2017. Phase separation in biology. *Cur Biol*. V. 27. Art. ID R1097.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.069>

Arvan P., Castle D. 1998. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J*. V. 332. P. 593.
<https://doi.org/10.1042/bj3320593>

Atiakshin D., Patsap O., Kostin A., Mikhalyova L., Buchwalow I., Tiemann M. 2023. Mast cell tryptase and carboxypeptidase A3 in the formation of ovarian endometrioid cysts. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24: 6498.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076498>

Braga T., Grujic M., Lukinius A., Hellman L., Abrink M., Pejler G. 2007. Serglycin proteoglycan is required for secretory granule integrity in mucosal mast cells. *Biochemical J*. V. 403. P. 49.
<https://doi.org/10.1042/BJ20061257>

Blank U. 2011. The mechanisms of exocytosis in mast cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 716. P. 107.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9533-9_7

- Crivellato E., Nico B., Mallardi F., Beltrami C. A., Ribatti D.* 2003. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat. Rec. Part A.* V. 274. P. 778.
<https://doi.org/10.1002/ar.a.10095>
- Grigorev I.P., Korzhevskii D.E.* 2021. Modern imaging technologies of mast cells for diology and medicine (Review). *Sovrem. Tekhnologii Med.* V. 13. P. 93.
<https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10>
- Hammel I., Lagunoff D., Galli S.J.* 2010. Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J. Cell. Mol. Med.* V. 14. P. 1904.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01071.x>
- Irani A.A., Schechter N.M., Craig S.S., DeBlois G., Schwartz L.B.* 1986. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 83. P. 4464.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4464>
- Irani A.M., Bradford T.R., Kepley C.L., Schechter N.M., Schwartz L.B.* 1989. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* V. 37. P. 1509.
<https://doi.org/10.1177/37.10.2674273>
- Jin J., Jiang Y., Chakrabarti S., Su Z.* 2022. Cardiac mast cells: a two-head regulator in cardiac homeostasis and pathogenesis following injury. *Front. Immunol.* V. 13. Art. ID 963444.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963444>
- Juliano G.R., Skaf M.F., Ramalho L.S., Juliano G.R., Torquato B.G.S., Oliveira M.S., Oliveira F.A., Espíndula A.P., Cavellani C.L., Teixeira V.P.A., Ferraz M.L.D.F.* 2020. Analysis of mast cells and myocardial fibrosis in autopsied patients with hypertensive heart disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia.* V. 39. P. 89.
<https://doi.org/10.1016/j.repc.2019.11.003>
- KleinJan A., Godthelp T., Blom H.M., Fokkens W.J.* 1996. Fixation with Carnoy's fluid reduces the number of chymase-positive mast cells: not all chymase-positive mast cells are also positive for tryptase. *Allergy.* V. 51. P. 614.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1996.tb04681.x>
- Kologrivova I., Shtatolkina M., Suslova T., Ryabov V.* 2021. Cells of the immune system in cardiac remodeling: Main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Front. Immunol.* V. 12: 664457.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664457>
- Levick S.P., Widiapradja A.* 2018. Mast cells: Key contributors to cardiac fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19: 231.
<https://doi.org/10.3390/ijms19010231>
- Mackins C.J., Kano S., Seyedi N., Schäfer U., Reid A.C., Machida T., Silver R.B., Levi R.* 2006. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J. Clin. Inv.* V. 116. P. 1063.
<https://doi.org/10.1172/JCI25713>
- Mulloy B., Lever R., Page C.P.* 2017. Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj J.* V. 34. P. 351.
<https://doi.org/10.1007/s10719-016-9749-0>
- Reid A.C., Brazin J.A., Morrey C., Silver R.B., Levi R.* 2011. Targeting cardiac mast cells: pharmacological modulation of the local renin-angiotensin system. *Curr. Pharm. Des.* V. 17. P. 3744.
<https://doi.org/10.2174/138161211798357908>
- Sperr W.R., Bankl H.C., Mundigler G., Klappacher G., Grossschmidt K., Agis H., Simon P., Lauffer P., Imhof M., Radaszkiewicz T., Glogar D., Lechner K., Valent P.* 1994. The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization. *Blood.* V. 84. P. 3876.
- Theoharides T.C., Twahir A., Kempuraj D.* 2023. Mast cells in the autonomic nervous system and potential role in disorders with dysautonomia and neuroinflammation. *Ann. Allergy, Asthma, Immunol.* V. 132. P. 440.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2023.10.032>
- Urata H., Boehm K.D., Philip A., Kinoshita A., Gabrovsek J., Bumpus F.M., Husain A.* 1993. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J. Clin. Inv.* V. 91. P. 1269.
<https://doi.org/10.1172/JCI116325>
- Weidner N., Austen K.F.* 1993. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol. Res. Pract.* V. 189. P. 156.
[https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80086-5](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80086-5)
- Wernersson S., Pejler G.* 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* V. 14. P. 478.
<https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Von Zastrow M., Castle A.M., Castle J.D.* 1989. Ammonium chloride alters secretory protein sorting within the maturing exocrine storage compartment. *J. Biol. Chem.* V. 264. P. 6566.

HUMAN MYOCARDIAL MAST CELLS CONTAINING CHYMASE AND THEIR DETECTION USING VARIOUS ANTIBODIES

A. A. Beketova^a, *, O. V. Kirik^a, D. E. Korzhevskii^a

^a *Institute of Experimental Medicine, 197022, St. Petersburg, Russia*

* *E-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru*

In last decades, special attention has been paid to the role of mast cells in the pathogenesis of cardiovascular diseases, including sudden cardiac death. One of the components of mast cell granules is chymase. For its specific detection, various reagents for immunohistochemistry, which have different specificity, are used. This circumstance does not allow us to accurately assess the subpopulations of myocardial mast cells. The purpose of this study was to evaluate the suitability of various reagents to selective detection of myocardial mast cells and to test the hypothesis of the existence of a population of mast cells staining with alcian blue and having chymase negative reaction. Analysis of the results of the various protocols presented in this work showed that, in comparison with goat polyclonal antibodies to chymase, mouse monoclonal antibodies have greater specificity, and preliminary staining of sections with alcian blue makes it possible to neutralize the nonspecific detection of cardiomyocyte lipofuscin. In addition, all the proposed protocols make it possible to detect the morphological heterogeneity of mast cells and their granules in the human myocardium.

Keywords: mast cells, chymase, human myocardium, immunohistochemistry