



Атякшин Д.А.^{1,6} ✉, Николаева Е.А.², Грицевская Д.Ю.², Семячкина А.Н.², Костин А.А.¹, Володькин А.В.¹, Морозов С.Л.^{2,7}, Игнатюк М.А.¹, Михалева Л.М.³, Сухова М.С.⁴, Бухвалов И.Б.^{1,5}

¹ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

² Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

⁴ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

⁵ Институт гематопатологии, Гамбург, Германия

⁶ Научно-исследовательский институт экспериментальной биологии и медицины Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

⁷ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Фенотип тучных клеток дермы кожи при синдроме Марфана в аспекте ремоделирования внеклеточного матрикса

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Атякшин Д.А., Николаева Е.А.; анализ данных и написание текста – Атякшин Д.А., Николаева Е.А., Грицевская Д.Ю., Семячкина А.Н., Костин А.А., Володькин А.В., Морозов С.Л., Игнатюк М.А., Михалева Л.М., Сухова М.С., Бухвалов И.Б.; научное редактирование – Атякшин Д.А., Николаева Е.А., Морозов С.Л.

Финансирование: исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания FSSF-2023-0046.

Для цитирования: Атякшин Д.А., Николаева Е.А., Грицевская Д.Ю., Семячкина А.Н., Костин А.А., Володькин А.В., Морозов С.Л., Игнатюк М.А., Михалева Л.М., Сухова М.С., Бухвалов И.Б. Фенотип тучных клеток дермы кожи при синдроме Марфана в аспекте ремоделирования внеклеточного матрикса. *Педиатрия Восточная Европа*. 2024;12(2):180–200. <https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.2.001>

Подана: 04.04.2024

Принята: 16.05.2024

Контакты: earth-mars38@yandex.ru

Резюме

Введение. Синдром Марфана (СМ) – наследственное заболевание, обусловленное мутацией в гене FBN1, приводящей к синтезу аномального гликопротеина фибриллина 1, нарушениям структурных и регуляторных свойств соединительной ткани, прежде всего эластических волокон. Несмотря на высокий потенциал тучных клеток (ТК) к ремоделированию внеклеточного матрикса, их патогенетическое значение при синдроме Марфана до сих пор не рассматривалось.

Цель. Выявить особенности структуры популяции тучных клеток кожи детей с синдромом Марфана, включая закономерности пространственной архитектуры

интраорганный гистотопографии и патогенетическое значение специфических протеаз в механизмах ремоделирования волокнистого компонента внеклеточного матрикса дермы.

Материалы и методы. Исследование было выполнено на биоматериале кожи, взятом за период 2022–2023 гг. при биопсии наружной поверхности верхней трети плеча у пациентов с синдромом Марфана, с дальнейшим гистохимическим и иммуногистохимическим окрашиванием и подсчетом абсолютного числа тучных клеток и других клеток, соотношения площадей эластических и коллагеновых волокон, а также определением профиля специфических протеаз тучных клеток при мультиплексном окрашивании триптазы, химазы и карбоксипептидазы А3.

Результаты. Анализ популяции ТК кожи детей с синдромом Марфана выявил существенное возрастание численности интраорганный популяции с сохранением преимущественного профиля специфических протеаз Триптаза⁺Химаза⁺СРАЗ⁺. Гистотопографический анализ показал достоверное возрастание частоты солокализации ТК с эластическими волокнами, прежде всего с их аномальными участками, а также с αSMA⁺ клетками и фибробластами. С точки зрения пространственной архитектуры распределения в коже ТК при наследственной патологии создавали многоклеточные кластеры, синхронизирующие деятельность клеток тканевого микроокружения и способствующие созданию тканевых ниш профиброзного фенотипа. Выявлено возрастание экспрессии в ТК специфических протеаз, TGF-β и гепарина с таргетной секрецией веществ к аномальным областям эластических волокон. Обсуждаются вопросы специфичной роли ТК в ремоделировании стромального ландшафта соединительной ткани при СМ. Впервые затрагивается вопрос участия ТК в тензометрии тканевого микроокружения кожи. Полученные результаты целесообразно учитывать при терапии клинических проявлений синдрома Марфана в других патогенетически значимых структурах внутренних органов, в том числе аорте, сухожилиях, хрящах и паренхиматозных органах.

Ключевые слова: синдром Марфана, тучные клетки, кожа, триптаза, химаза, карбоксипептидаза А3, гепарин, эластические и коллагеновые волокна, внеклеточный матрикс, ремоделирование, фиброз

Dmitriy A. Atyakshin^{1,6}✉, Ekaterina A. Nikolaeva², Daria Yu. Gritsevskaya², Alla N. Semyachkina², Andrey A. Kostin¹, Artem V. Volodkin¹, Sergey L. Morozov^{2,7}, Mikhail A. Ignatyuk¹, Lyudmila M. Mikhaleva³, Maria S. Sukhova⁴, Igor B. Bukhvalov^{1,5}

¹ Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of the Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

⁴ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

⁵ Institute for Hematopathology, Hamburg, Germany

⁶ Research Institute of Experimental Biology and Medicine of the Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

⁷ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Phenotype of Skin Dermal Mast Cells in Marfan Syndrome in Terms of Extracellular Matrix Remodeling

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design – Dmitriy A. Atyakshin, Ekaterina A. Nikolaeva; data analysis and text writing – Dmitriy A. Atyakshin, Ekaterina A. Nikolaeva, Daria Yu. Gritsevskaya, Alla N. Semyachkina, Andrey A. Kostin, Artem V. Volodkin, Sergey L. Morozov, Mikhail A. Ignatyuk, Lyudmila M. Mikhaleva, Maria S. Sukhova, Igor B. Bukhvalov; scientific editing – Dmitriy A. Atyakshin, Ekaterina A. Nikolaeva, Sergey L. Morozov.

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the state assignment FSSF-2023-0046.

For citation: Atyakshin D., Nikolaeva E., Gritsevskaya D., Semyachkina A., Kostin A., Volodkin A., Morozov S., Ignatyuk M., Mikhaleva L., Sukhova M., Bukhvalov I. Phenotype of Skin Dermal Mast Cells in Marfan Syndrome in Terms of Extracellular Matrix Remodeling. *Pediatrics Eastern Europe*. 2024;12(2):180–200. <https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.2.001>

Submitted: 04.04.2024

Accepted: 16.05.2024

Contacts: earth-mars38@yandex.ru

Abstract

Introduction. Marfan syndrome (SM) is a hereditary disease caused by a mutation in FBN1 gene, leading to the synthesis of abnormal glycoprotein fibrillin 1, disturbances in the structural and regulatory properties of connective tissue, primarily, in elastic fibers. Despite the high potential of mast cells (MCs) to remodel the extracellular matrix, their pathogenetic significance in Marfan syndrome has not yet been considered.

Purpose. To identify features of the population structure of mast cells in the skin of children with Marfan syndrome, including patterns of spatial architecture of intraorganic histotopography and pathogenetic significance of specific proteases in the mechanisms of remodeling of the fibrous component of the extracellular matrix of the dermis.

Materials and methods. The study was performed using skin biomaterial taken between 2022 and 2023 from biopsies of the outer surface of the upper third of the shoulder in patients with Marfan syndrome, with further histochemical and immunohistochemical staining and counting of the absolute number of mast cells and other cells, the area ratio of elastic and collagen fibers, as well as determining the profile of specific mast cell proteases by multiplex staining of tryptase, chymase and carboxypeptidase A3.

Results. The analysis of the MC population of the skin of children with Marfan syndrome revealed a significant increase in the size of the intraorgan population while maintaining the predominant profile of specific proteases Tryptase+Chymase+CPA3+. The histotopographic analysis showed a significant increase in the frequency of colocalization of MCs with elastic fibers, primarily with their abnormal areas, as well as with α SMA+ cells and fibroblasts. In terms of spatial architecture of distribution in the skin, MCs in hereditary pathology created multicellular clusters synchronizing cells activity in the tissue microenvironment and contributing to formation of tissue niches of profibrotic phenotype. An increase in the expression of specific proteases, TGF- β and heparin in MCs with targeted secretion of substances to abnormal areas of elastic fibers was revealed. The specific role of MCs in the remodeling of the stromal landscape of connective tissue in SM is discussed. For the first time, the issue of MCs involvement in tensometry of skin tissue microenvironment is raised. It is advisable to take into account the obtained results when treating clinical manifestations of Marfan syndrome in other pathogenetically significant structures of internal organs, including the aorta, tendons, cartilage and parenchymal organs.

Keywords: Marfan syndrome, mast cells, skin, tryptase, chymase, carboxypeptidase A3, heparin, elastic and collagen fibers, extracellular matrix, remodeling, fibrosis

■ ВВЕДЕНИЕ

Синдром Марфана (СМ) является одним из первых состояний, классифицированных как наследственное заболевание соединительной ткани. Распространенность СМ – 1 на 3000–5000 человек в общей популяции с аутосомно-доминантным типом наследования [1]. В основе СМ лежат мутации в гене FBN1 (хромосомная локализация 15q21.1), кодирующем гликопротеин фибриллин 1 [2]. Фибриллин 1 распределен во внеклеточном матриксе соединительной ткани, принимает участие в образовании микрофибрилл и процессинге эластических волокон (ЭВ). Мономеры фибриллина 1 создают условия формирования из тропоэластина зрелых ЭВ [3]. При этом микрофибриллы выступают в качестве каркаса для эластина и поддерживают процесс сборки с регуляцией функциональной архитектуры ЭВ [4, 5]. Эластические волокна обеспечивают внеклеточный матрикс специфичной пластичностью, играющей важную роль в коже, оболочках кровеносных сосудов, связках, сухожилиях, хрящах, «мягких скелетах» паренхиматозных органов и других структурах. Изменения, обнаруживаемые в коже у большинства пациентов с СМ, прежде всего заключаются в образовании аномальных микрофибрилл фибриллина 1 [2]. В фибробластах детей с неонатальной формой СМ выявлены укорочение и фрагментация микрофибрилл [6]. Исследование фибробластов при СМ показало снижение синтеза, секреции и интеграции фибриллина 1 во внеклеточный матрикс [7]. Моделирование заболевания на лабораторных грызунах выявило снижение плотности ЭВ и дезорганизацию микрофибрилл в роговице мыши. Помимо структурного значения фибриллин 1 обладает регуляторной функцией, влияя на хранение, высвобождение и активирование трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), обладающего, в свою очередь, широкой палитрой биологических эффектов [8–10].

Тучные клетки (ТК) являются важным компонентом иммунной системы с наиболее известными эффектами в иницировании и патогенезе аллергических заболеваний [11–13]. В то же время физиологическое значение ТК и роль в развитии патобиологических процессов выходят далеко за реализацию как врожденного, так и адаптивного иммунитета [14–16]. Известна роль ТК в фиброзе и ремоделировании внеклеточного матрикса [17–19], что указывает на тесную вовлеченность в патогенетические механизмы СМ с точки зрения состояния соединительной ткани. ТК принимают участие в формировании фиброзных ниш, координируя соответствующие преобразования клеточных и внеклеточных компонентов тканевого микроокружения. Во многом это обеспечивается таргетной секрецией веществ с высокой биологической активностью, включая специфические протеазы, создающие необходимые условия как по демонтажу волокнистых структур, так и по фибриллогенезу коллагена [19]. При этом ТК способны принимать участие как в деградации, так и в новообразовании волокон, выступая в роли скульпторов фенотипа локального тканевого микроокружения [15, 18, 19]. Синтез большого количества цитокинов и факторов роста дает возможность ТК активно воздействовать на клетки – продуценты коллагена и эластина, адаптируя состав внеклеточного матрикса для функционирования в определенных условиях внешней среды [20, 21]. Таким образом, предполагаемая вовлеченность ТК в патогенез СМ на уровне стромального ландшафта тканевого микроокружения представляет большой интерес с точки зрения фармакологического воздействия. Тем более что при СМ аномальные микрофибриллы в той или иной степени лишены функции структурных «тензометров» тканей, изменяя способность как стромальных, так и иммунокомпетентных клеток дермы к адекватному мониторингу состояния интегративно-буферной метаболической среды, включая ответы на механические и гравитационные воздействия. В то же время исследования ТК при синдроме Марфана до настоящего времени не проводились.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить особенности структуры популяции тучных клеток кожи детей с синдромом Марфана, включая закономерности пространственной архитектуры интраорганных гистотопографии и патогенетическое значение специфических протеаз в механизмах ремоделирования волокнистого компонента внеклеточного матрикса дермы.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на биоматериале кожи, взятом за период 2022–2023 гг. при биопсии наружной поверхности верхней трети плеча у пациентов с СМ в Научно-исследовательском клиническом институте педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. В группу пациентов с СМ входили родители и дети, в том числе: мама 45 лет и ее дочь возраста 4 лет (далее – пациенты № 1 и № 2 соответственно), девочка 11 лет и мальчик 12 лет (далее – пациенты № 3 и № 4 соответственно), мама 44 лет, ее сын возраста 13 лет и дочь 11 лет (далее – пациенты № 5, № 6 и № 7 соответственно). Диагноз синдрома Марфана был установлен в соответствии с Ghent criteria 2010 г. [22]. Кожа без наследственной патологии была обследована у двоих детей возраста 11–12 лет (далее – норма № 1 и норма № 2).

Настоящий проект выполнен в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта и одобрен локальным этическим комитетом НИКИ педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева от 18.11.2022 (Москва, Россия). От всех испытуемых было получено информированное согласие.

Пробоподготовка биоматериала для гистологического исследования проводилась в соответствии со стандартными подходами, позволяющими подготовить парафиновые срезы для дальнейшего гистохимического и иммуногистохимического окрашивания с толщиной 5 и 2 мкм соответственно [23–25]. Список использованных первичных антител представлен в табл. 1, вторичных антител, компонентов систем детекции и других реагентов – в табл. 2. Мультиплексное иммуногистохимическое окрашивание для одновременной детекции специфических протеаз ТК с дальнейшей мультиспектральной визуализацией выполнялось в соответствии с рекомендациями фирмы Akoya Biosciences (США) по использованию флуорохромов серии OPAL для аналитической системы количественной патологии Mantra 2, включая оборудование для демаскировки антигенов EZ – Retriever® System, MW015-IR (BioGenex, США). Для одновременной детекции ТК, ЭВ и коллагеновых волокон в исследовании впервые разработан комбинированный протокол, включающий в себя стандартную иммуногистохимическую детекцию триптазы (табл. 1), а также гистохимическое окрашивание волокнистого компонента внеклеточного матрикса с помощью методик Вейгерта и Ван Гизона (табл. 2). Соотношение эластических и коллагеновых волокон в коже оценивали после их окрашивания с помощью комбинированной гистохимической методики Вейгерта и Ван Гизона согласно рекомендациям производителя (табл. 2).

Гистохимическое окрашивание кожи толуидиновым синим, раствором Гимзы, по протоколу Пикро-Маллори, методике Вейгерта, гематоксилином и эозином, а также комбинированным методом Вейгерта и Ван Гизона проводилось согласно инструкциям производителя (табл. 2).

Окрашенные срезы исследовали на моторизованном микроскопе ZEISS Axio Imager.Z2, используя для фотодокументирования объективы Zeiss alpha Plan-Apochrom 100×/1,46 Oil DIC M27, Zeiss Plan-Apochrom 150×/1,35 Glyc DIC Corr M27,

Таблица 1
Первичные антитела, использованные в исследовании
Table 1
Primary antibodies used in the study

Антитела к мишеням	Характеристика антител	Каталожный номер	Разведение	Производитель
Триптаза	Мышинные моноклональные	#ab2378	1:3000	AbCam, United Kingdom
Карбоксипептидаза А3 (CPA3)	Кроличьи поликлональные	#ab251696	1:2000	AbCam, United Kingdom
Химаза	Мышинные моноклональные	#ab2377	1:3000	AbCam, United Kingdom
TGF-β	Кроличьи поликлональные	#ab215715	1:500	AbCam, United Kingdom
αSMA	Мышинные моноклональные	#ab7817	1:3000	AbCam, United Kingdom

Таблица 2
Список вторичных антител и других реагентов
Table 2
List of secondary antibodies and other reagents

Вторичные антитела и другие реагенты	Производитель	Разведение	Метка
Козьи антитела к IgG мыши (#ab97035)	AbCam, United Kingdom	1/300	Cy3
Козьи антитела к IgG кролика (#ab150077)	AbCam, United Kingdom	1/300	Alexa Fluor 488
Opal Polymer HRP Ms+Rb (#ARH1001EA)	Akoya Biosciences, USA	ready-to-use	Opal 480 Reagent Pack (#FP1500001KT)
Opal Polymer HRP Ms+Rb (#ARH1001EA)	Akoya Biosciences, USA	ready-to-use	Opal 570 Reagent Pack (#FP1488001KT)
Opal Polymer HRP Ms+Rb (#ARH1001EA)	Akoya Biosciences, USA	ready-to-use	Opal 690 Reagent Pack (#FP1497001KT)
AmpliStain™ anti-Mouse 1-Step HRP (#AS-M1-HRP)	SDT GmbH, Baesweiler, Germany	ready-to-use	HRP
AmpliStain™ anti-Rabbit 1-Step HRP (#AS-R1-HRP)	SDT GmbH, Baesweiler, Germany	ready-to-use	HRP
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, #D9542-5MG)	Sigma, Hamburg, Germany	5 µg/mL	–
VECTASHIELD® Mounting Medium (#H-1000)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	ready-to-use	–
DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4100)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	ready-to-use	DAB
Гематоксилин Майера (Biovitrum, #05-002)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–
Эозин Y 1% водный (Biovitrum, #05-010/S)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–
Раствор Гимзы (Biovitrum, #21-023)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–
Толуидиновый синий (Biovitrum, #07-002)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–
Пикро-Маллори (Biovitrum, #21-036)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–
Окрашивание по Вейгерту (Biovitrum, #21-030)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–
Окрашивание по Вейгерту и Ван Гизону (Biovitrum, #21-020)	ErgoProduction LLC, Russia	ready-to-use	–

цветную и монохромную камеры ZEISS Axiocam 712 color и ZEISS Axiocam 712 mono. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения «Zen 3.0 Light Microscopy Software Package», «ZEN Module Bundle Intellesis & Analysis for Light Microscopy», «ZEN Module Z Stack Hardware» (Carl Zeiss Vision, Германия). Некоторые микрофотографии были получены с помощью конфокального микроскопа Nikon D-Eclipse C1 Si на базе Nikon Eclipse 90i. Для определения профиля специфических протеаз ТК при множественной иммунодетекции триптазы, химазы и карбокси-пептидазы A3 с помощью флуорохромов OPAL 690, OPAL 480 и OPAL 570 соответственно использовали систему для мультиплексной визуализации Mantra 2 (Akoya Biosciences, USA) на базе микроскопа Olympus BX43.

Планиметрический анализ для выявления количества ТК на единице площади кожи, абсолютного числа ТК и других клеток, соотношения площадей эластических и коллагеновых волокон, а также определение профиля специфических протеаз тучных клеток при мультиплексном окрашивании триптазы, химазы и карбоксипептидазы А3 с определением уровней экспрессии «высокий», «умеренный» и «низкий» выполняли с помощью программного продукта QuPath [26]. Сканирование окрашенных срезов на объективе ×40 проводилось на оборудовании ScanScope CS (Leica Biosystems, USA) и моторизованном микроскопе ZEISS Axio Imager.Z2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тучные клетки кожи без наследственной патологии

ТК кожи детей без наследственной патологии представляли собой мелкие клетки размером от 7 до 12–15 мкм, гранулы которых были небольших размеров (до 0,5–0,7 мкм в диаметре) и заполнены гепарином и специфическими протеазами (рис. 1). Наиболее часто ТК сопровождали сосуды дермы, располагаясь поблизости базальной мембраны эндотелиальных клеток. Как правило, более мелкие ТК локализовались в сетчатом слое дермы, тогда как в ретикулярном слое находились крупные ТК с хорошо различимым секреторным материалом в гранулах. ТК могли взаимодействовать одновременно с несколькими фибробластами и фиброцитами (рис. 1В). Иногда контактирующие друг с другом ТК формировали группы на значительной протяженности (до 50 мкм и более в плоскости наблюдения), образуя функциональную цепочку, связывающую определенные тканевые структуры в единый функциональный кластер (рис. 1Е, 1Н).

Таблица 3
Содержание тучных клеток в коже пациентов с синдромом Марфана
Table 3
Content of mast cells in the skin of patients with Marfan syndrome

Пациенты	Характеристики исследованного образца дермы кожи				
	Площадь (мм²)	Общее количество клеток (абсолютное содержание)	Количество тучных клеток (абсолютное содержание)	Относительное содержание тучных клеток (в %)	Кол-во тучных клеток (на мм²)
Тучные клетки дермы с высоким уровнем экспрессии карбоксипептидазы А3					
Пациент № 1*	3,9	2025	414	20,4	107,2
Пациент № 2	2,4	2110	347	16,4	144,5
Пациент № 3	4,1	1807	216	11,95	52,8
Пациент № 4	2,9	1582	288	18,2	96,3
Пациент № 5**	2,7	1225	197	16,8	74,1
Пациент № 6	3,4	1998	299	14,96	88
Пациент № 7	2,4	2335	215	9,20	88,1
Норма № 1	13,1	9892	1080	10,9	82,4
Норма № 2	18,5	12 970	1298	10	70,2
Тучные клетки дермы с высоким уровнем экспрессии триптазы					
Пациент № 1*	3,8	2096	464	22,1	120,8
Пациент № 2	2,2	2367	464	19,6	210,9
Пациент № 3	4,2	1606	293	18,2	69,7
Пациент № 4	3,1	2085	476	22,8	155

Окончание таблицы 3

Пациент № 5**	3,6	2467	365	14,8	100,3
Пациент № 6	3,9	3618	559	15,5	143,7
Пациент № 7	2,8	4100	375	9,15	133
Норма № 1	12,6	9622	1123	11,7	89,1
Норма № 2	17,8	13 004	1203	9,25	67,58
Тучные клетки дермы с высоким уровнем экспрессии химазы					
Пациент № 1*	3,0	1796	174	9,68	58
Пациент № 2	2,4	1924	265	13,7	110,4
Пациент № 3	3,3	1832	228	12,8	69
Пациент № 4	3,1	1921	159	8,27	51,3
Пациент № 5**	3,7	1422	215	15,1	58,1
Пациент № 6	4,2	1863	301	16,5	71,7
Пациент № 7	2,7	2526	250	9,89	92,6
Норма № 1	11,8	9554	588	6,14	49,8
Норма № 2	17,4	15 350	1007	6,5	57,9
Клетки дермы с высоким уровнем экспрессии CD117					
Пациент № 1*	3,5	1618	291	15,2	82,9
Пациент № 2	2,2	2043	354	17,3	160,9
Пациент № 3	3,6	1226	111	9,0	30,8
Пациент № 4	2,3	1398	295	21,1	128,2
Пациент № 5**	3,8	3006	375	12,47	98,7
Пациент № 6	4,2	2836	418	14,7	99,5
Пациент № 7	3,0	3241	326	10,1	107,7
Норма № 1	11,0	5115	367	7,2	33,4
Норма № 2	12,0	7428	413	5,6	34,4

Примечания: * мама пациента № 2; ** мама пациентов № 6 и № 7.

Таблица 4
Профиль коллагеновых и эластических волокон в коже пациентов с синдромом Марфана (методика: одновременное окрашивание по методу Вейгерта и Ван Гизона)
Table 4
Profile of collagen and elastic fibers in the skin of patients with Marfan syndrome (technique: simultaneous staining using the Weigert and Van Gieson method)

Пациенты	Характеристики волокнистого компонента дермы кожи				
	Общая площадь волокнистого компонента дер- мы кожи (мм ²)	Коллагеновые волокна		Эластические волокна	
		Интеграль- ная площадь (мм ²)	Относитель- ное содержа- ние (в %)	Интеграль- ная пло- щадь (мм ²)	Относитель- ное содержа- ние (в %)
Пациент № 1*	0,66	0,49	74,2	0,17	25,8
Пациент № 2	1,42	1,06	74,65	0,36	25,35
Пациент № 3	2,83	2,51	88,7	0,32	11,3
Пациент № 4	1,83	1,41	77	0,42	23,0
Пациент № 5**	1,74	1,41	81	0,33	19,0
Пациент № 6	2,13	1,76	82,6	0,37	17,4
Пациент № 7	1,92	1,44	75	0,48	25
Норма № 1	8,58	6,82	79,5	1,76	20,5
Норма № 2	12,09	9,17	75,85	2,92	24,15

Примечания: * мама пациента № 2; ** мама пациентов № 6 и № 7.

Таблица 5
Планиметрические показатели гистотопографии триптаза-позитивных тучных клеток в коже пациентов с синдромом Марфана
Table 5
Planimetric parameters of histotopography of tryptase-positive mast cells in the skin of patients with Marfan syndrome

Пациенты	Частота непосредственной солокализации ТК с клетками и волокнами дермы (в %)			
	Волокнистый компонент внеклеточного матрикса ¹		αSMA ⁺ клетки ²	Фибробласты ³
	Эластические волокна	Коллагеновые волокна		
Пациент № 1*	35,5	64,5	21,2	22,4
Пациент № 2	36,2	63,8	56,4	22,3
Пациент № 3	39,4	60,6	21,7	31,1
Пациент № 4	37,5	62,5	25,6	30,6
Пациент № 5**	38,0	62,0	14,8	18,4
Пациент № 6	37,9	62,1	55,6	26,7
Пациент № 7	32,6	67,4	30,4	15,7
Норма № 1	15,6	84,4	12,4	23,1
Норма № 2	22,7	77,3	14,2	15,6

Примечания: * мама пациента № 2; ** мама пациентов № 6 и № 7. Методики окрашивания: ¹ мультиплексная детекция триптазы, эластических и коллагеновых волокон, данные получены при учете ТК, контактирующих с волокнистым компонентом; ² мультиплексная иммуногистохимическая детекция триптазы и αSMA; ³ окрашивание по Гимзе.

ТК обладали вариабельностью формы цитоплазмы. Могли встречаться как вытянутые ТК с распространяющимися на значительные расстояния отростками (до 10–30 мкм только в поле зрения), так и более округлые ТК с хорошо различимыми гранулами (рис. 1А, D). При метакроматическом окрашивании гранулы выглядели весьма мелкими, иногда напоминая пылевидную зернистость (рис. 1А–С). ТК с хорошо дифференцированными и заполненными гранулами в цитоплазме встречались довольно редко. Чаще всего расположение гранул в цитоплазме было диффузным с превалирующей аккумуляцией в примембранной области.

Интересным представлялось обнаружение участков дермы кожи, в которых между пучками коллагеновых волокон выявлялись отдельно расположенные гранулы и тонкие безъядерные участки цитоплазмы ТК, заполненные гранулами (рис. 1D). Как правило, они повторяли ход пучков волокон и располагались между ними. Размеры ТК возрастали в более глубоких слоях дермы. ТК солокализовались с другими клетками дермы, включая фибробласты (рис. 1А–D). Иногда ТК располагались одновременно с несколькими клетками дермы. Часть ТК функционировала в глубоких слоях дермы кожи и контактировала исключительно с волокнами. При метакроматической детекции выявлялось взаимодействие с волокнистым компонентом внеклеточного матрикса дермы, хотя более объективно можно было видеть только пучки коллагеновых волокон (рис. 1А–D). Некоторые ТК обладали довольно вытянутым и тонким отростком, толщина которого соответствовала среднему размеру одной секреторной гранулы.

Относительное количество ТК с высоким содержанием триптазы и карбокси-пептидазы А3 составляло около 10% от всех клеток дермы кожи, тогда как

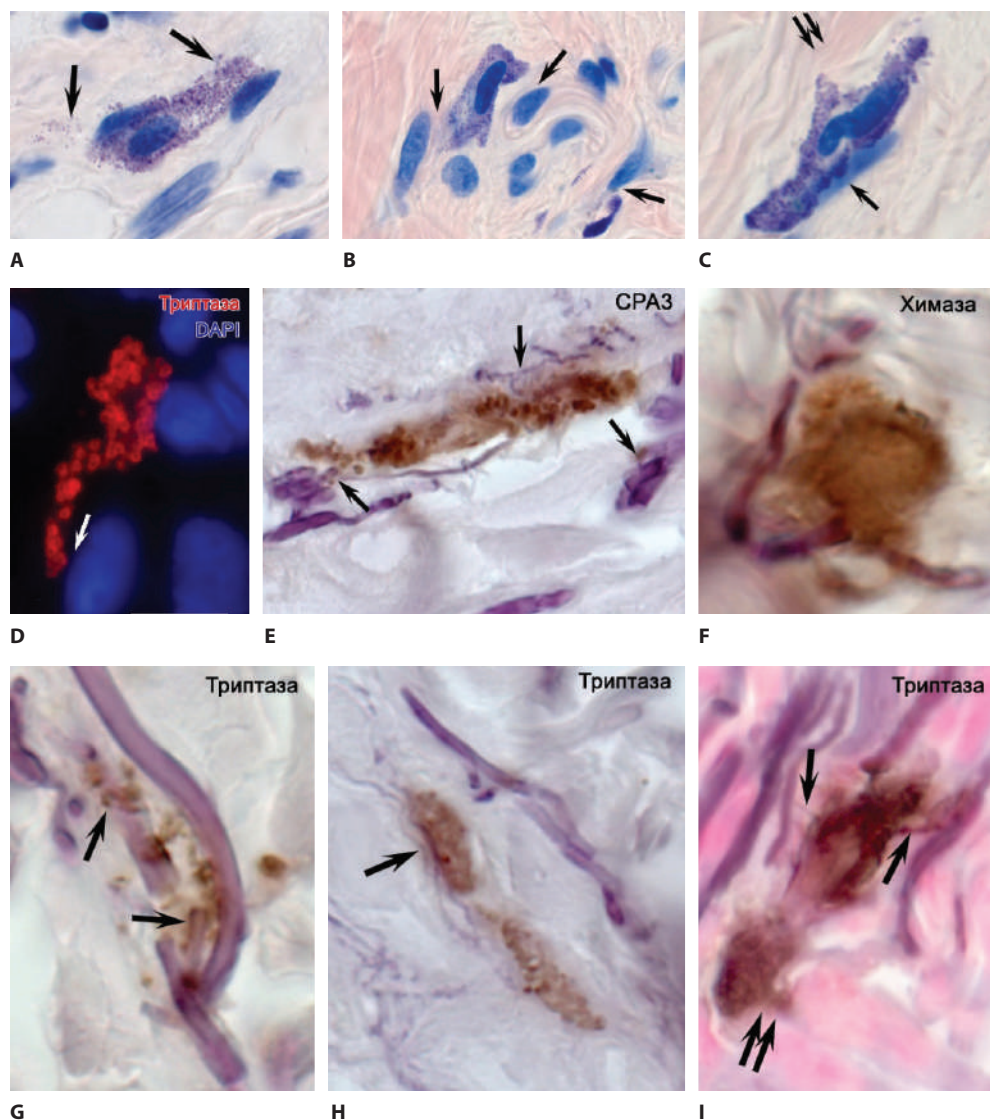


Рис. 1. Тучные клетки кожи детей без наследственной патологии. Методики: А–С – окрашивание раствором Гимзы; D – иммунофлуоресцентная детекция триптазы; E–I – окрашивание по методике Вейгерта, комбинированное с иммуногистохимической детекцией триптазы; I – комбинированное окрашивание по методике Вейгерта и Ван Гизона с иммуногистохимической детекцией триптазы

Примечания: А – две соприкасающиеся ТК с признаками секреции (указано стрелкой). В – соллокализация ТК с фибробластами (указаны стрелкой). С – ТК удлиненной формы, контактирующая с фиброцитами (предположительно, указано стрелкой) и коллагеновыми волокнами (указано двойной стрелкой). D – автономные триптаза-позитивные гранулы ТК с аккумуляцией в перичеллюлярном пространстве около фибробласта. E – направленная секреция карбоксипептидазы А3 к эластическим волокнам (указано стрелкой). F – прилегание химаза-позитивной ТК к эластическим волокнам с таргетной секрецией протеазы (указано стрелкой). G – триптаза-позитивные гранулы ТК окружают толстые эластические волокна (указаны стрелкой). H – прилегание триптаза-позитивной ТК к тонким эластическим волокнам (указано стрелкой). I – таргетная секреция триптазы к эластическим волокнам (указано стрелкой) и коллагеновым волокнам (указано двойной стрелкой). Шкала: 5 мкм.

► **Fig. 1. Mast cells in the skin of children without hereditary pathology. Methods: A–C – staining with Giemsa solution; D – immunofluorescent detection of tryptase; E–I – Weigert staining combined with immunohistochemical detection of tryptase; I – combined staining according to the method of Weigert and Van Gieson with immunohistochemical detection of tryptase**

Notes: A – two touching MCs with signs of secretion (indicated by an arrow). B – colocalization of MCs with fibroblasts (indicated by an arrow). C – MC of an elongated shape, in contact with fibrocytes (presumably indicated by an arrow) and collagen fibers (indicated by a double arrow). D – autonomous tryptase-positive MC granules with accumulation in the pericellular space near the fibroblast. E – directed secretion of carboxypeptidase A3 in elastic fibers (indicated by an arrow). F – adherence of chymase-positive mast cells to elastic fibers with targeted secretion of protease (indicated by an arrow). G – tryptase-positive MC granules are surrounded by thick elastic fibers (indicated by an arrow). H – adhesion of tryptase-positive MC to thin elastic fibers (indicated by an arrow). I – targeted tryptase secretion to elastic fibers (indicated by an arrow) and collagen fibers (indicated by a double arrow). Scale bar: 5 μ m.

химаза-позитивных ТК и CD117⁺ было меньше (табл. 3). Мультиплексное иммуногистохимическое окрашивание с одновременной детекцией специфических протеаз показало, что преобладающее число ТК в коже обладало экспрессией всех специфических протеаз, несмотря на низкое содержание химазы в некоторых ТК.

Интересной представлялась сококализация ТК с коллагеновыми и эластическими волокнами. Мы обнаруживали не только прилегание ТК к волокнистому компоненту внеклеточного матрикса, но и активную волокно-ориентированную секрецию специфических протеаз (рис. 1E–I). Как правило, более толстые эластические и коллагеновые волокна наблюдались в области сетчатого слоя дермы, тогда как более тонкие – в ретикулярном слое. В целом, ТК более часто соприкасались с коллагеновыми волокнами по сравнению с эластическими (табл. 5). Частота сококализации ТК с α SMA⁺ клетками была достаточно редкой, и чаще всего это выявлялось при взаимодействии со стенкой сосудов дермы кожи (табл. 5).

Фенотип тучных клеток при синдроме Марфана

При СМ прежде всего необходимо обратить внимание на возрастание объема интраорганный популяции ТК. Это было совершенно очевидно как при детекции специфических протеаз – триптазы, химазы, карбоксипептидазы A3, так и при детекции CD117 или метакроматическом окрашивании (табл. 3). Особенно существенно, практически в два раза, увеличивалось содержание ТК с высоким содержанием триптазы и CD117⁺ (табл. 3). При этом увеличение числа триптаза-позитивных ТК могло достигать уровня 1/5 от всех других клеток дермы кожи, что дает возможность рассматривать ТК при СМ в качестве основных регуляторов иммунного и стромального ландшафта кожи.

Определение профиля специфических протеаз выявило характерный для нормы преимущественный фенотип Триптаза⁺Химаза⁺CPA3⁺, с низкой экспрессией химазы в части ТК (рис. 3A). Обращало на себя внимание частое выявление узких безъядерных участков цитоплазмы ТК на значительном расстоянии, в которых могли располагаться максимум две секреторные гранулы по толщине (рис. 2A). Более того, создавалось впечатление, что такие гранулосодержащие участки цитоплазмы ТК могли переходить друг в друга, хотя небольшая толщина исследуемого гистологического среза не позволяла увидеть в исследуемом объеме такую функциональную непрерывность (рис. 2A).

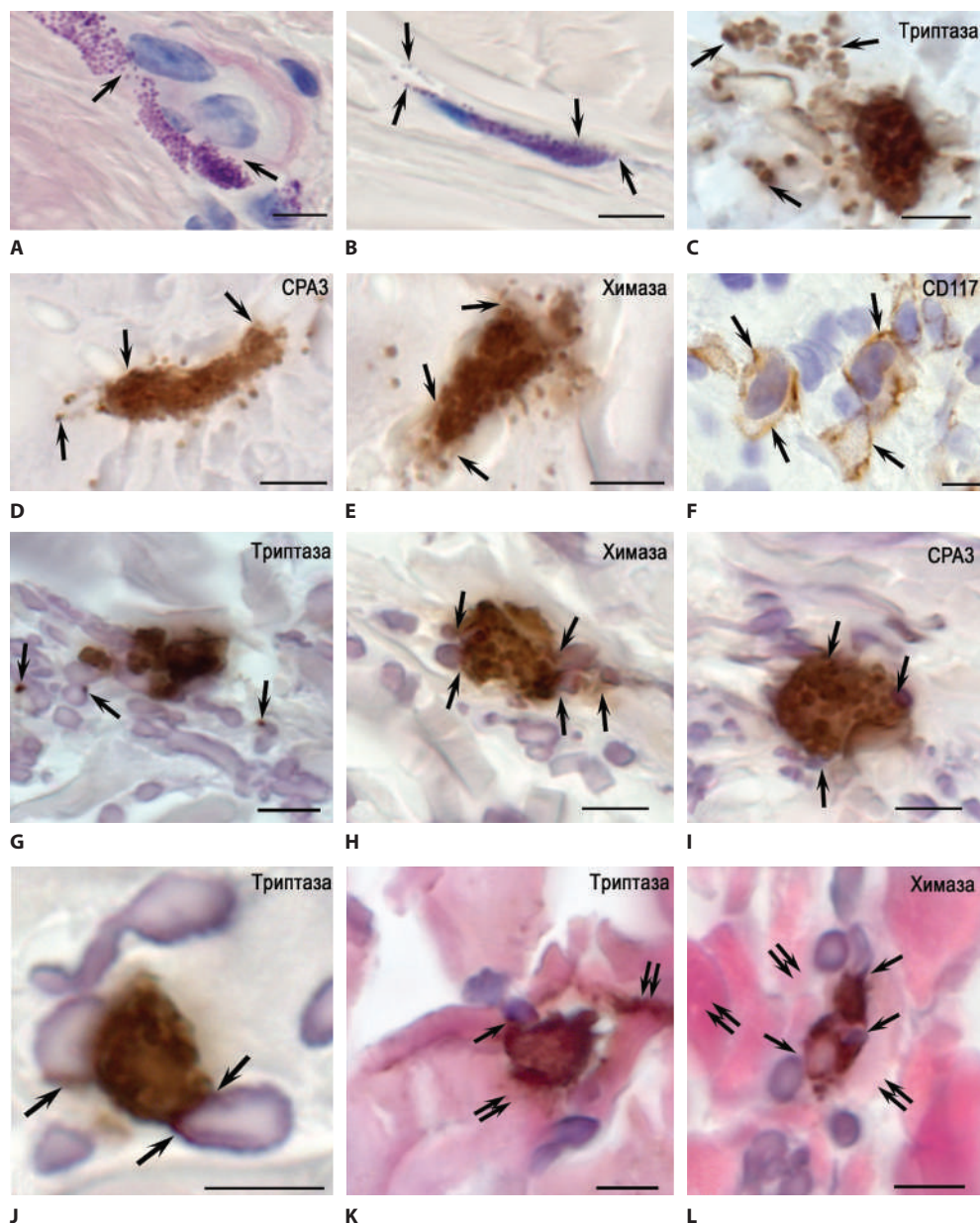


Рис. 2. Тучные клетки в ремоделировании тканевого микроокружения дермы кожи пациентов с синдромом Марфана. Методики: А, В – гистохимическое окрашивание раствором Гимзы (А) и толуидиновым синим (В); С–F – иммунохимическая детекция триптазы (С), карбоксипептидазы А3 (D), химазы (Е) и CD117 (F); G–J – окрашивание по методике Вейгера, комбинированное с иммуногистохимической детекцией триптазы (G, J), химазы (H) и карбоксипептидазы А3 (I); K, L – комбинированное окрашивание по методике Вейгера и Ван Гизона с иммуногистохимической детекцией триптазы (K) и химазы (L)

Примечания: А – контактирующие тучные клетки взаимодействуют с фибробластами (указано стрелкой). В – направленная секреция гранул тучной клетки вытянутой формы к эластическому волокну (указано стрелкой). С – триптаза

- в составе секреторных гранул распространяется во внеклеточном матриксе дермы кожи (указано стрелкой). D – активная таргетная секреция CPA3 к эластическим волокнам (указано стрелкой). Прилежание гранул ТК к эластическим волокнам. E – секреция химазы к волокнам дермы кожи. F – периферическая локализация CD117 в иммунопозитивных клетках дермы (указано стрелкой). G – локализация ТК в зоне эластических волокон с аномальным строением, контактирование отдельных мелких гранул с волокнами (указано стрелкой). H – таргетная дегрануляция химазы ТК к определенным локусам эластических волокон (указано стрелкой). I – направленная секреция карбоксипептидазы A3 к локусам эластических волокон различной толщины (указано стрелкой). J – взаимодействие трипазы с внешним компонентом эластических волокон из аномальных микрофибрилл с накоплением протеазы на поверхности. K – активное поступление трипазы в область соприкосновения с коллагеновыми (указано двойной стрелкой) и эластическими (указано стрелкой) волокнами. L – ТК взаимодействует с эластическими волокнами (указано стрелкой) в окружении коллагеновых волокон (указано двойной стрелкой). Шкала: 5 мкм.

Fig. 2. Mast cells in the remodeling of the tissue microenvironment of the skin dermis of patients with Marfan syndrome. Methods: A, B – histochemical staining with Giemsa solution (A) and toluidine blue (B); C–F – immunochemical detection of tryptase (C), carboxypeptidase A3 (D), chymase (E) and CD117 (F); G–J – staining according to the Weigert method, combined with immunohistochemical detection of tryptase (G, J), chymase (H) and carboxypeptidase A3 (I); K, L – combined staining according to the method of Weigert and Van Gieson with immunohistochemical detection of tryptase (K) and chymase (L)

Notes: A – contacting mast cells interact with fibroblasts (indicated by an arrow). B – directed secretion of elongated mast cell granules to the elastic fiber (indicated by an arrow). C – tryptase, as part of secretory granules, is distributed in the extracellular matrix of the skin dermis (indicated by an arrow). D – active targeted secretion of CPA3 to elastic fibers (indicated by an arrow). Adherence of TC granules to elastic fibers. E – secretion of chymase to the fibers of the dermis of the skin. F – peripheral localization of CD117 in immunopositive dermal cells (indicated by arrow). G – localization of MC in the zone of elastic fibers with an abnormal structure, contact of individual small granules with fibers (indicated by an arrow). H – targeted degranulation of MC chymase to certain elastic fiber loci (indicated by an arrow). I – directed secretion of carboxypeptidase A3 to loci of elastic fibers of various thicknesses (indicated by an arrow). J – interaction of tryptase with the external component of elastic fibers from abnormal microfibrils with accumulation of protease on the surface. K – active entry of tryptase into the area of contact with collagen (indicated by a double arrow) and elastic (indicated by an arrow) fibers. L – TC interacts with elastic fibers (indicated by an arrow) surrounded by collagen fibers (indicated by a double arrow). Scale bar: 5 µm.

При анализе соотношения коллагеновых и эластических волокон у детей с СМ заметное снижение содержания эластического компонента было выявлено только у двух пациентов (№ 3 и № 6) (табл. 4), у остальных обследованных не удалось обнаружить каких-либо значимых количественных особенностей этого показателя по сравнению с характеристиками кожи без наследственной патологии (табл. 4). С другой стороны, стоит отметить, что при сохранении близкого к норме интегральной площади ЭВ в коже пациентов с СМ мы выявили особенности их гистотопографического распределения. Прежде всего это касалось высокой вариабельности толщины ЭВ на протяжении, а также отличия пространственного ландшафта сети эластической матрицы с неровным рельефом поверхности некоторых волокон (рис. 2G–L).

Важным признаком стало обнаружение у детей с СМ возрастания интенсивности миграции ТК к эластическому каркасу кожи. ТК значительно чаще встречались в тесном контакте с ЭВ у всех пациентов (табл. 5, рис. 2). При этом необходимо отметить высокую секреторную активность ТК, прилежащих к волокнистому компоненту внеклеточного матрикса (рис. 2). На микрофотографиях можно видеть, насколько активно секреция протеаз сопровождалась их локализацией вокруг ЭВ (рис. 2C–E, G–L). Иногда создавалось впечатление полного окружения ЭВ секреторным материалом. В частности, протеаза-позитивные секреторные гранулы распространялись по поверхности ЭВ на значительные расстояния, фактически прилегая к их внешнему слою – главному локусу расположения дефектных микрофибрилл фибриллина 1.

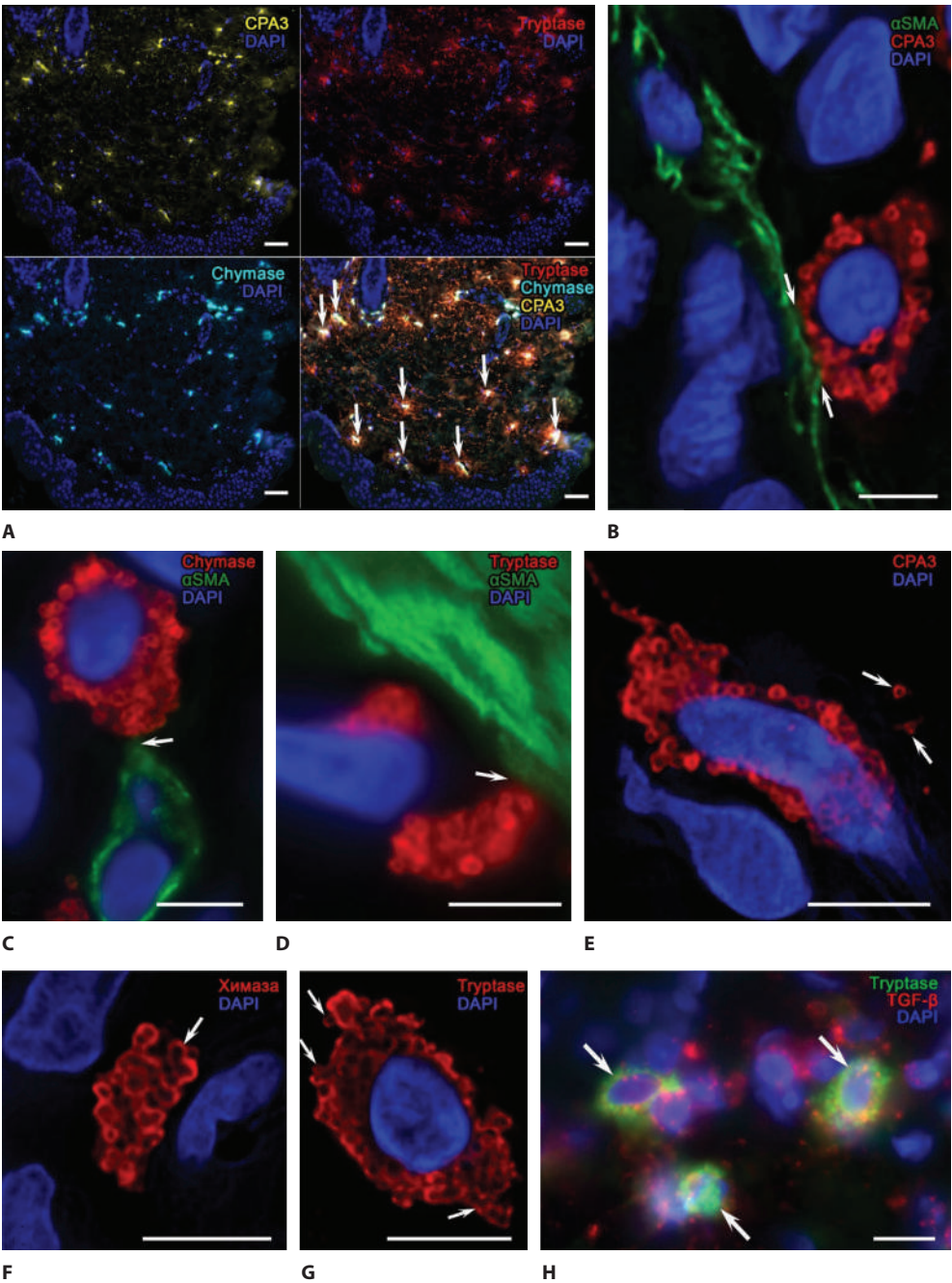


Рис. 3. Секреторный профиль тучных клеток кожи при синдроме Марфана. Методика: мультиплексное иммуногистохимическое окрашивание с одновременной детекцией специфических протеаз (А), αSMA и CPA3 (В), αSMA и химазы (С) и αSMA и триптазы (D), триптазы и TGF-β (H), моноплексная иммуногистохимическая детекция CPA3 (Е), химазы (F) и триптазы (G) ▶

- Примечания: А – ТК дермы кожи с преимущественным профилем Триптаза+Химаза+CPA3+ (указаны стрелкой). В–D – со-локализация ТК с α SMA+ клетками в составе различных тканевых компонентов кожи (указано стрелкой). Е–G – варианты секреции специфических протеаз ТК, включая автономные CPA3+ гранулы во внеклеточном матриксе кожи (Е) (указано стрелкой), крупный фрагмент цитоплазмы ТК с признаками активной секреции химазы (F) (указано стрелкой), отшнуровывающиеся в межклеточное вещество гранулы с триптазой (G). Высокий уровень экспрессии TGF- β в тучных клетках дермы кожи (указано стрелкой). Шкала: А – 50 мкм, остальные – 5 мкм.

Fig. 3. Secretory profile of skin mast cells in Marfan syndrome. Methodology: multiplex immunohistochemical staining with simultaneous detection of specific proteases (A), α SMA and CPA3 (B), α SMA and chymase (C) and α SMA and tryptase (D), tryptase and TGF β (H), monoplex immunohistochemical detection of CPA3 (E), chymases (F) and tryptases (G)

Notes: A – MCs of the skin dermis with a predominant profile of Tryptase+Chymase+CPA3+ (indicated by an arrow). B–D – colocalization of MCs with α -SMA+ cells in various tissue components of the skin (indicated by an arrow). E–G – variants of secretion of specific MC proteases, including autonomous CPA3+ granules in the extracellular matrix of the skin (E) (indicated by an arrow), a large fragment of MC cytoplasm with signs of active secretion of chymase (F) (indicated by an arrow), granules with tryptase released into the intercellular substance (G). High level of TGF- β expression in skin dermal mast cells (indicated by arrow). Scale: A – 50 μ m, others – 5 μ m.

В некоторых случаях ТК фактически выполняли роль проводника между ЭВ, соединяя их друг с другом (рис. 2J, L). Встречались и вытянутые ТК, контактирующие с несколькими фибробластами дермы кожи, и с признаками таргетной секреции. Специфические протеазы в составе автономных гранул аккумулировались в различных локусах внеклеточного матрикса. Довольно часто встречались как единичные гранулы ТК вокруг волокнистого компонента (рис. 2B, C, G), так и накопление в обширных полях тканевого микроокружения с созданием индуктивных зон вокруг фибробластов и волокон.

В тучных клетках при СМ более интенсивно наблюдалась экспрессия CD117, который располагался в области плазматической мембраны ТК, включая цитоплазматические выросты (рис. 2F). Это свидетельствует о большей способности ТК популяции кожи при СМ к дальнейшей дифференцировке, развитию и выживанию. Кроме того, необходимо отметить повышенный биогенез в ТК TGF- β (рис. 3H). В популяции ТК чаще встречалось умеренное или высокое содержание TGF- β . Гистотопография ТК с высоким уровнем TGF- β характеризовалась более частым расположением в паракринной зоне волокнистого компонента дермы кожи, а также клеток фибробластического дифферона.

При планиметрическом анализе было выявлено, что у некоторых пациентов с СМ свыше половины ТК в той или иной степени были солокализированы с фибробластами, либо в формате прямого контакта, либо в зоне распространения паракринных эффектов.

Солокализация с фибробластами часто сопровождалась активной секрецией биологических активных веществ в составе гранул (рис. 3B, E, F), в том числе триптазы, химазы и карбоксипептидазы А3. Довольно часто создавалось впечатление транспорта секреторных гранул ТК непосредственно к ядрам фибробластов.

Необходимо отметить, что в коже детей с СМ выявлялись островки гладкомышечной ткани. ТК редко выявлялись внутри гладких мышц, располагаясь преимущественно вокруг мышечных пластов (рис. 3D). Очевидно, что данный факт послужил

причиной возрастания частоты контактирования ТК с α SMA-позитивными клетками дермы кожи при СМ (табл. 5). Иногда ТК располагались во внеклеточном матриксе между островками гладкомышечной ткани и сосудистым руслом. При этом формирование контактирующих с ТК определенных тяжей увеличивало площадь соприкосновения с α SMA-позитивными элементами в коже. Наблюдалось непосредственное контактирование протеаза-содержащих секреторных гранул ТК с гладкими миоцитами в составе стенки посткапиллярных венул (рис. 3В).

ТК формировали функциональные цепочки на более длительных расстояниях, выступая проводником между большим числом фибробластов и других клеток дермы (рис. 2, 3). При этом составные компоненты таких «цепочек» могли сопровождать эластические волокна. ТК более часто контактировали друг с другом и с волокнистым компонентом в дерме кожи, иногда фактически переходя в волокно (рис. 2Н). Такие картины по сравнению с контролем встречались гораздо чаще.

ТК у детей с СМ находились в более активном состоянии секреторных путей (рис. 2, 3). Активная дегрануляция сопровождалась отшнуровыванием небольших гранулярных образований от более крупных секреторных гранул, находящихся на периферии ТК (рис. 3Г), а также внутрицитоплазматическим объединением гранул друг с другом (рис. 3Ф) или секрецией отдельных гранул (рис. 3Е). В некоторых случаях происходило образование нанотрубочек, заполненных триптазой и направленных к мишеням тканевого микроокружения, включая α SMA-позитивные клетки.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку кожа, по мнению некоторых авторов, может являться «окном» в наследственные заболевания соединительной ткани [27], исследование ее клеточного компонента при СМ вполне обоснованно. При этом в последние годы все более привлекательными объектами внимания при наследственно обусловленных патологиях соединительной ткани становятся ТК в связи с высоким функциональным потенциалом к регуляции местного гомеостаза. Параметры молекулярного портрета ТК, включая пространственные аспекты гистотопографии в тканевом микроокружении, приносят важные уточняющие детали в механизмы изменения стромального и иммунного ландшафтов вследствие мутации в гене FBN1. В определенном смысле тучные клетки при наследственной патологии становятся одними из ключевых скульпторов фенотипа соединительной ткани. С большой долей вероятности можно предположить, что выявленные особенности гистофизиологии ТК в коже могут быть аналогичными и для соединительной ткани других органов, поскольку изменения макромолекулярного строения микрофибрилл не обладают органоспецифичностью.

Эластическая сеть кожи состоит из пучков микрофибрилл (окситалановые волокна), выходящих из дермоэпителиального соединения в соединительную ткань, в которой они взаимодействуют с тонкими эластинсодержащими волокнами (элауниновые волокна) и образуют в более глубоких слоях дермы сеть из ЭВ толстого калибра.

Микрофибриллы в составе ЭВ рассматриваются как структурные «тензометры», конформационные изменения которых при механическом растяжении способны опосредованно через интегриновые рецепторы модифицировать миграцию, функциональную активность и дифференцировку клеток [4]. В данном аспекте влияние ТК на эластический компонент дермы представляет особый интерес, поскольку таргетная секреция к ЭВ в первую очередь приводит к контактированию секретома,

в том числе гепарина и специфических протеаз, с фибриллином 1 и микрофибриллами. Вот почему заслуживает дальнейшего исследования вопрос о возможности ТК компенсировать утраченные физиологические тензометрические свойства ЭВ с помощью формирования пространственных кластеров в соединительнотканной основе кожи. Действительно, обнаруженные нами гистологические признаки свидетельствуют о более активном при СМ участии ТК в объединении клеток иммунного и стромального ландшафтов с координацией компонентов интегративно-буферной метаболической среды на значительной площади.

Отдельного внимания заслуживает вопрос о биологическом значении воздействия ТК на эластические волокна при СМ. Известны деградирующие эффекты ТК на ЭВ, которые были показаны при некоторых эластинопатиях, в частности средне-дермальном эластолизе, характеризующихся избирательной потерей ЭВ в средней области дермы кожи [28]. При формировании кожных стрий на ультраструктурном уровне была показана тесная сококализация дегранулирующих ТК с фрагментированными ЭВ [29]. При этом ЭВ были дезорганизованы, имели неровные края и/или признаки эластолиза и утрачивали характерную периферическую локализацию микрофиламентов [29]. В проведенном исследовании мы обнаружили микроскопические признаки изменения рельефа ЭВ. При этом теоретическая способность ТК к деградации ЭВ подтверждается продукцией в них соответствующих ферментов, в том числе эластаз и катепсина G [30–35]. Наблюдаемая нами активная секреция триптазы, химазы, карбоксипептидазы А3 и гепарина непосредственно к ЭВ может подтверждать их прямую вовлеченность в метаболизм волокнистого компонента дермы кожи. Однако в связи с этим встает закономерный вопрос об отсутствии обнаружения в проведенном исследовании значимых изменений в относительном соотношении эластических и коллагеновых волокон. Только у двух пациентов мы обнаружили снижение относительного содержания ЭВ в дерме кожи. Более того, наши данные не совпадают с результатами моделирования СМ на мышах, обнаружившими значительное снижение объемной плотности эластина и коллагена и более тонкую дерму кожи [36]. Возможно, это связано с отличиями патогенеза СМ у человека и лабораторных животных, а также с выраженностью проявлений наследственной патологии у обследованных пациентов. Кроме того, в плане дискуссии можно поставить вопрос о возможности ресинтеза тучными клетками ЭВ после их деградации до определенных структурных единиц, которые впоследствии могут быть использованы для сборки новых ЭВ. В таком случае вполне объяснимым становится факт отсутствия существенного снижения интегральной площади ЭВ в изученном биоматериале кожи пациентов с СМ. Ранее мы рассматривали способность ТК принимать участие в фибриллогенезе коллагена за счет прямых и опосредованных эффектов [19, 37].

Возможно, данный аспект можно распространить и на механизмы ремоделирования ЭВ, поскольку известно влияние гепарансульфата на активность взаимодействия молекул фибриллина 1 при полимеризации линейных микрофибрилл [4, 38]. Сходства гепарансульфата и гепарина усиливают потенциал ТК в процессинге ЭВ, поскольку ТК являются единственным продуцентом гепарина в организме [39, 40]. В таком аспекте увеличение численности ТК можно рассматривать как компенсаторную реакцию, связанную с необходимостью создания дополнительной прочности внеклеточного матрикса кожи.

С другой стороны, необходимо учитывать роль ТК в формировании фиброзных изменений. В частности, показано, что при СМ формирование фиброзных ниш в скелетных мышцах обусловлено мутациями в гене *FBN1*, что приводит к повышенному накоплению коллагеновых волокон и фибробластов [41]. Были обнаружены гистологические доказательства развития миокардиального фиброза у мышей с моделированием СМ, а также повышение уровня биомаркеров диффузного миокардиального фиброза у детей и подростков с СМ [42]. После лучевой терапии у пациента с СМ развился обширный фиброз [43]. В аорте у пациентов с СМ обнаружена повышенная экспрессия маркеров сократительных белков, в том числе α -актина гладких мышц, накопления коллагена I типа, фрагментация, потеря или пролиферация межламинарных ЭВ и накопление кислых мукополисахаридов [44, 45]. В нашем исследовании показана активная секреция специфических протеаз ТК – триптазы, химазы и карбоксипептидазы А3, которые обладают различными молекулярными мишенями в локальном тканевом микроокружении для формирования профиброгенных эффектов [46–48].

Поскольку СМ представляет собой патофизиологию фибриллина 1, следует ожидать, что в определенной степени будет нарушаться как архитектура межклеточных взаимодействий, так и механизмы контактирования с компонентами внеклеточного матрикса. Аномальный и вследствие этого дисфункциональный фибриллин 1 не способствует образованию латентного TGF- β -связывающего белка и аккумуляции TGF- β в экстрацеллюлярном матриксе, что приводит к его ускоренному высвобождению из депо [2, 49]. После активизации TGF- β взаимодействует с семейством соответствующих рецепторов, регулируя ангиогенез, пролиферацию и дифференцировку клеток, апоптоз, регенерацию, ремоделирование структуры и состава внеклеточного матрикса [50, 51]. Ряд исследований показал принципиальную возможность TGF- β индуцировать чрезмерное образование коллагена, деградацию ЭВ, а также усиливать пролиферацию и миграцию гладких миоцитов [52, 53]. Наши данные подтверждают усиление синтеза TGF- β в ТК у пациентов с СМ. При этом следует отметить, что ТК начинают более активно доставлять данный фактор роста к тканевым мишеням, таким образом, видимо, компенсируя отсутствие его в тканевых депо (нишах). Очевидно, что такое состояние интегративно-буферной метаболической среды тканевого микроокружения провоцирует активизацию синтеза TGF- β в ТК, направленную миграцию и таргетную секрецию к внеклеточным и клеточным мишеням.

Увеличение количества клеток кожи с высоким уровнем экспрессии CD117 позволяет сделать вывод о том, что при синдроме Марфана популяция ТК обладает значительным потенциалом к дальнейшей дифференцировке, росту, выживаемости и поддержанию стабильно высокого уровня функциональной активности. Возрастание численности ТК при СМ служит объективным основанием для активного участия в метаболизме стромального ландшафта дермы кожи. В то же время данный факт следует рассматривать как определенный базис для формирования искаженных иммунных реакций при СМ и особенностей активации при воздействии внешних и внутренних стимулов. Интенсивная секреция, включая специфические протеазы, подчеркивает роль в формировании фиброзного фона внеклеточного матрикса в ответ на снижение прочности эластического компонента. Ранее мы приводили очевидные свидетельства участия ТК в фибриллогенезе коллагена и образования коллагеновых волокон, включая данные электронной микроскопии [19]. В данном

аспекте компенсаторные функции ТК могут трансформироваться в патологические, что объясняет развитие фиброза в других органах, обнаруженного в ряде исследований [41–45].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тучные клетки кожи при синдроме Марфана активно вовлечены в метаболизм соединительной ткани и структурное моделирование волокнистых компонентов. Увеличение числа ТК и усиление таргетной секреции специфических протеаз к эластическим волокнам, очевидно, представляет собой один из механизмов компенсаторных реакций по нивелированию нарушения биоинформационной и пространственной функций аномального фибриллина 1. Формирование при СМ фиброзного фона локальных тканевых ниш в коже, индуцированное деятельностью ТК, несет в себе риски формирования аналогичных изменений и в других органах, что необходимо учитывать при разработке алгоритмов персонализированной медицины.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pyeritz R.E. Recent progress in understanding the natural and clinical histories of the Marfan syndrome. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26:423–428.
2. Zeigler S.M., Sloan B., Jones J.A. Pathophysiology and Pathogenesis of Marfan Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1348:185–206. doi: 10.1007/978-3-030-80614-9_8
3. Wheeler J.B., Ikonomidis J.S., Jones J.A. Connective Tissue Disorders and Cardiovascular Complications: The Indomitable Role of Transforming Growth Factor- β Signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1348:161–184. doi: 10.1007/978-3-030-80614-9_7
4. Kiely C.M. Fell-Muir Lecture: Fibrillin microfibrils: structural tensometers of elastic tissues? *Int J Exp Pathol*. 2017;98(4):172–190. doi: 10.1111/iep.12239
5. Wagenseil J.E., Mecham R.P. New insights into elastic fiber assembly. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*. 2007;81(4):229–240. Available at: <https://doi.org/10.1002/bdrc.20111>
6. Godfrey M. From fluorescence to the gene: the skin in the Marfan syndrome. *J Invest Dermatol*. 1994;103(5):585–625. doi: 10.1111/1523-1747.ep12399055/
7. Milewicz D.M., Pyeritz R.E., Crawford E.S., Byers P.H. Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular-matrix formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. *J Clin Invest*. 1992;89:79–86.
8. Ramirez F., Sakai L.Y., Dietz H.C., Rifkin D.B. Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol Genomics*. 2004;19(2):151–4. doi: 10.1152/physiolgenomics.00092.2004
9. Ramirez F., Sakai L.Y. Biogenesis and function of fibrillin assemblies. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):71–82. doi: 10.1007/s00441-009-0822-x
10. Peng D., Fu M., Wang M., Wei Y., Wei X. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022;21(1):104. doi: 10.1186/s12943-022-01569-x
11. Klein O., Sagi-Eisenberg R. Anaphylactic Degranulation of Mast Cells: Focus on Compound Exocytosis. *J Immunol Res*. 2019;18:2019:9542656. doi: 10.1155/2019/9542656
12. Shefler I., Salamon P., Mekori Y.A. Extracellular Vesicles as Emerging Players in Intercellular Communication: Relevance in Mast Cell-Mediated Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2021;25:22(17):9176. doi: 10.3390/ijms22179176
13. Elieh Ali Komi D., Kuebler W.M. Significance of Mast Cell Formed Extracellular Traps in Microbial Defense. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022;62:160–179. doi: 10.1007/s12016-021-08861-6
14. Theoharides T.C., Kavalioti M., Tsilioni I. Mast Cells, Stress, Fear and Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2019;24(20(15)):3611. doi: 10.3390/ijms20153611
15. Elieh Ali Komi D., Wohrl S., Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58:342–365. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2
16. Lyons J.J., Metcalfe D.D. Targeting Mast Cells with Biologics. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2020;40(4):667–685. doi: 10.1016/j.jiac.2020.06.007
17. Hügler T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13999. doi: 10.4414/SMW.2014.13999
18. Bradding P., Pejler G. The controversial role of mast cells in fibrosis. *Immunol Rev*. 2018;282(1):198–231. doi: 10.1111/imr.12626
19. Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2020;154(1):21–40. doi: 10.1007/s00418-020-01875-9
20. Mukai K., Tsai M., Saito H., Galli S.J. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282(1):121–150. doi: 10.1111/imr.12634
21. Galli S.J., Gaudenzio N., Tsai M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:49–77. doi: 10.1146/annurev-immunol-071719-094903
22. Loeys B.L., Dietz H.C., Braverman A.C., Callewaert B.L., De Backer J. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of medical genetics*. 2010;47(7):476–485. Available at: <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.072785>
23. Buchwalow I., Samoilova V., Boecker W., Tiemann M. Multiple immunolabeling with antibodies from the same host species in combination with tyramide signal amplification. *Acta Histochem*. 2018;120:405–411.
24. Buchwalow I., Samoilova V., Boecker W., Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: Fallacies and facts. *Sci. Rep*. 2011;1:28.

25. Buchwalow I.B., Boecker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*, 1st ed. Springer: Heidelberg, Germany. 2010; 153 p.
26. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G., James J.A., Salto-Tellez M., Hamilton P.W. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5
27. Holbrook K.A., Byers P.H. Skin is a window on heritable disorders of connective tissue. *Am J Med Genet*. 1989;34(1):105–21. doi: 10.1002/ajmg.1320340118
28. Fimiani M., Mazzatenta C., Alessandrini C., Paola M., Paola C., Andreassi L. Mid-dermal elastolysis: an ultrastructural and biochemical study. *Arch Dermatol Res*. 1995;287(2):152–7. doi: 10.1007/BF01262324
29. Sheu H.M., Yu H.S., Chang C.H. Mast cell degranulation and elastolysis in the early stage of striae distensae. *J Cutan Pathol*. 1991;18(6):410–6. doi: 10.1111/j.1600-0560.1991.tb01376.x
30. Boudier C., Godeau G., Homebeck W., Robert L., Bieth J.G. The elastolytic activity of cathepsin G: an ex vivo study with dermal elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;4(6):497–503. doi: 10.1165/ajrcmb.4.6.497
31. Blanco I., Bérizte N., Argüelles M., Cárcaba V., Fernández F., Janciauskiene S., Oikonomopoulou K., de Serres F.J., Fernández-Bustillo E., Hollenberg M.D. Abnormal overexpression of mastocytes in skin biopsies of fibromyalgia patients. *Clin Rheumatol*. 2010;29(12):1403–12. doi: 10.1007/s10067-010-1474-7
32. Xing W., Austen K.F., Gurish M.F., Jones T.G. Protease phenotype of constitutive connective tissue and of induced mucosal mast cells in mice is regulated by the tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(34):14210–5. doi: 10.1073/pnas.1111048108
33. Schmelzer C.E., Jung M.C., Wohlrab J., Neubert R.H., Heinz A. Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *FEBS J*. 2012;279(22):4191–200. doi: 10.1111/febs.12012
34. Thorpe M., Fu Z., Albat E., Akula S., de Garavilla L., Kervinen J., Hellman L. Extended cleavage specificities of mast cell proteases 1 and 2 from golden hamster: Classical chymase and an elastolytic protease comparable to rat and mouse MCP-5. *PLoS One*. 2018;13(12):e0207826. doi: 10.1371/journal.pone.0207826
35. Gudmann N.S., Manon-Jensen T., Sand J.M.B., Diefenbach C., Sun S., Danielsen A., Karsdal M.A., Leeming D.J. Lung tissue destruction by proteinase 3 and cathepsin G mediated elastin degradation is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(3):1284–1290. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.038
36. Cui J.Z., Tehrani A.Y., Jett K.A., Bernatchez P., van Breemen C., Esfandiari M. Quantification of aortic and cutaneous elastin and collagen morphology in Marfan syndrome by multiphoton microscopy. *J Struct Biol*. 2014;187(3):242–253. doi: 10.1016/j.jsb.2014.07.003
37. Atiakshin D., Soboleva M., Nikityuk D., Alexeeva N., Klochova S., Kostin A., Shishkina V., Buchwalow I., Tiemann M. Mast Cells in Regeneration of the Skin in Burn Wound with Special Emphasis on Molecular Hydrogen Effect. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(3):348. doi: 10.3390/ph16030348
38. Mayer G., Hamelin J., Asselin M.C., Pasquato A., Marcinkiewicz E., Tang M., Tabibzadeh S., Seidah N.G. The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *J Biol Chem*. 2008;283(4):2373–84. doi: 10.1074/jbc.M708763200
39. Shriver Z., Capila I., Venkataraman G., Sasisekharan R. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;207:159–76. doi: 10.1007/978-3-642-23056-1_8
40. Meneghetti M.C., Hughes A.J., Rudd T.R., Nader H.B., Powell A.K., Yates E.A., Lima M.A. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface*. 2015;12(110):0589. doi: 10.1098/rsif.2015.0589
41. Tomaz da Silva M., Santos A.R., Koike T.E., Nascimento T.L., Rozanski A. The fibrotic niche impairs satellite cell function and muscle regeneration in mouse models of Marfan syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2023;237(1):e13889. Available at: <https://doi.org/10.1111/apha.13889>
42. Karur G.R., Pagano J.J., Bradley T., Lam C.Z., Seed M., Yoo S.J., Grosse-Wortmann L. Diffuse Myocardial Fibrosis in Children and Adolescents With Marfan Syndrome and Loays-Dietz Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(18):2279–2281. doi: 10.1016/j.jacc.2018.07.095
43. Suarez E.M., Knackstedt R.J., Jenrette J.M. Significant fibrosis after radiation therapy in a patient with Marfan syndrome. *Radiat Oncol J*. 2014;32(3):208–12. doi: 10.3857/roj.2014.32.3.208
44. Crosas-Molist E., Meirelles T., López-Luque J., Serra-Peinado C., Selva J. Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):960–72. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304412
45. Yuan S.M., Ma H.H., Zhang R.S., Jing H. Transforming growth factor- β signaling pathway in Marfan's syndrome: a preliminary histopathological study. *Vasa*. 2011;40(5):369–74. doi: 10.1024/0301-1526/a000133
46. Atiakshin D., Buchwalow I., Samoilova V., Tiemann M. Trypsinase is a polyfunctional component of mast cells. *Histochem Cell Biol*. 2018;149(5):461–477. doi: 10.1007/s00418-018-1659-8
47. Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol*. 2019;152(4):253–269. doi: 10.1007/s00418-019-01803-6
48. Atiakshin D., Kostin A., Trotsenko I., Samoilova V., Buchwalow I., Tiemann M. Carboxypeptidase A3 – A Key Component of the Protease Phenotype of Mast Cells. *Cells*. 2022;11(3):570. doi: 10.3390/cells11030570
49. Chaudhry S.S., Cain S.A., Morgan A., Dallas S.L., Shuttleworth C.A., Kiely C.M. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGF β 1. *J Cell Biol*. 2007;176(3):355–367. doi: 10.1083/jcb.200608167
50. Chandiran K., Cauley L.S. The diverse effects of transforming growth factor- β and SMAD signaling pathways during the CTL response. *Front Immunol*. 2023;14:1199671. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199671
51. Chen P.Y., Qin L., Simons M. TGF β signaling pathways in human health and disease. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1113061. doi: 10.3389/fmolb.2023.1113061
52. Nataatmadja M., West J., West M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I371–377. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000927
53. Matt P., Schoenhoff F., Habashi J. Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation*. 2009;120(6):526–532. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841981