

# СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2021.13.4.10

УДК 616–097

Поступила 11.01.2021 г.



**И.П. Григорьев**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии;

**Д.Э. Коржевский**, д.м.н., профессор РАН, зав. лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии

Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, С.-Петербург, 197376

Тучные клетки играют важную роль в защите организма от аллергенов, патогенов и паразитов, участвуя в развитии воспаления. В то же время имеются данные об их причастности к патогенезу ряда atopических, аутоиммунных, а также сердечно-сосудистых, онкологических, нервных и других заболеваний (аллергии, астмы, экземы, ринита, анафилаксии, мастоцитоза, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта и легких, мигрени и т.д.). Диагностика многих заболеваний и изучение функций тучных клеток в норме и патологии требуют их выявления, вследствие чего особую важность приобретает знание о методах адекватной визуализации этих клеток у разных видов животных и человека.

В настоящем обзоре представлены данные об основных методах визуализации тучных клеток: ферментно-гистохимическом, иммуногистохимическом, а также гистохимии с использованием гистологических красителей. Основные гистологические красители соединяются с гепарином и другими кислотными мукополисахаридами, содержащимися в тучных клетках, и окрашивают их метакроматически. К их числу относятся толуидиновый синий, метиленовый синий (в том числе в составе краски Май-Грюнвальда–Гимзы), тионин, пинацианол и др. Сафранин и флуоресцентные красители берберин и авидин также соединяются с гепарином. Для маркирования мукозных и незрелых тучных клеток необходимо более продолжительное окрашивание гистологическими красителями или окраска альциановым синим.

Более современные методы — ферментно-гистохимический и особенно иммуногистохимический — позволяют высокоизбирательно выявлять тучные клетки с помощью реакции на триптазу или химазу (специфичные для данных клеток протеазы). При иммуногистохимическом исследовании триптаза и химаза следует учитывать видовые различия распределения этих протеаз в тучных клетках человека и животных для адекватного их выявления. Иммуногистохимическая реакция на рецептор к иммуноглобулину E (FcεRI) и рецептор c-kit не специфична для тучных клеток, но последняя важна для демонстрации их пролиферации при нормальном и злокачественном росте.

В обзоре обсуждается также правильная фиксация биологического материала, что имеет большое значение для гистохимического и иммуногистохимического выявления тучных клеток.

Отмечено, что в качестве новых технологических подходов для анализа различных популяций тучных клеток применяются флуоресцентные методы иммуногистохимии и многомаркерный анализ в сочетании с конфокальной микроскопией.

**Ключевые слова:** тучные клетки; гистохимия; иммуногистохимия; толуидиновый синий; сафранин; альциановый синий; триптаза; химаза.

**Как цитировать:** Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(4): 93–109, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10>

## English

## Modern Imaging Technologies of Mast Cells for Biology and Medicine (Review)

**I.P. Grigorev**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology;

**D.E. Korzhevskii**, MD, PhD, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology

Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova St., Saint Petersburg, 197376, Russia

**Для контактов:** Григорьев Игорь Павлович, e-mail: [ipg-iem@yandex.ru](mailto:ipg-iem@yandex.ru)

Mast cells play an important role in the body defense against allergens, pathogens, and parasites by participating in inflammation development. However, there is evidence for their contributing to the pathogenesis of a number of atopic, autoimmune, as well as cardiovascular, oncologic, neurologic, and other diseases (allergy, asthma, eczema, rhinitis, anaphylaxis, mastocytosis, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, inflammatory gastrointestinal and pulmonary diseases, migraine, etc.). The diagnosis of many diseases and the study of mast cell functions in health and disease require their identification; so, the knowledge on adequate imaging techniques for mast cells in humans and different species of animals is of particular importance.

The present review summarizes the data on major methods of mast cell imaging: enzyme histochemistry, immunohistochemistry, as well as histochemistry using histological stains. The main histological stains bind to heparin and other acidic mucopolysaccharides contained in mast cells and stain them metachromatically. Among these are toluidine blue, methylene blue (including that contained in May-Grünwald-Giemsa stain), thionin, pinacyanol, and others. Safranin and fluorescent dyes: berberine and avidin — also bind to heparin. Longer staining with histological dyes or alcian blue staining is needed to label mucosal and immature mast cells.

Advanced techniques — enzyme histochemistry and especially immunohistochemistry — enable to detect mast cells high-selectively using a reaction to tryptases and chymases (specific proteases of these cells). In the immunohistochemical study of tryptases and chymases, species-specific differences in the distribution of the proteases in mast cells of humans and animals should be taken into account for their adequate detection. The immunohistochemical reaction to immunoglobulin E receptor (FcεRI) and c-kit receptor is not specific to mast cells, although the latter is important to demonstrate their proliferation in normal and malignant growth.

Correct fixation of biological material is also discussed in the review as it is of great significance for histochemical and immunohistochemical mast cell detection.

Fluorescent methods of immunohistochemistry and a multimarker analysis in combination with confocal microscopy are reported to be new technological approaches currently used to study various mast cell populations.

**Key words:** mast cells; histochemistry; immunohistochemistry; toluidine blue; safranin; alcian blue; tryptase; chymase.

## Введение

Тучные клетки (тканевые базофилы, мастоциты, лаброциты) происходят из гематопоэтических стволовых клеток и встречаются практически во всех органах и тканях. Основной их функцией является поддержание гомеостаза органов в условиях разнообразных внешних воздействий. Они продуцируют и накапливают большое число медиаторов, которые высвобождаются в процессе активации тучных клеток, вызывая разнообразные реакции в окружающей ткани. В частности, реагируя на поступление вредоносных агентов (аллергены, патогены, паразиты), тучные клетки участвуют в инициации воспалительного ответа и в процессах посттравматической регенерации [1–3]. По неизвестным на сегодняшний день причинам тучные клетки могут вызывать неконтролируемую воспалительную реакцию, которая приводит к развитию atopических заболеваний, таких как бронхиальная астма, экзема, аллергический ринит [1, 4, 5]. Пролиферация и накопление тучных клеток являются главными признаками такого заболевания человека, как мастоцитоз [6]. Скопление тучных клеток в синовиальной ткани при ревматоидном артрите указывает на их возможное участие в развитии этого хронического воспалительного заболевания [7]. Мастоциты скапливаются в атеросклеротических бляшках и, вероятно, играют важную роль в развитии инфаркта и инсульта [4, 8, 9]. Показано участие тучных клеток в патогенезе эндометриоза, болезни Крона и синдрома воспаленного кишечника, в развитии фиброза легких и печени [8, 10, 11]. Некоторые из секретируемых ими медиаторов могут способствовать развитию опухолей, стимулируя ангиогенез и злокачественный рост клеток, другие — вызывать апоптоз

опухолевых клеток [9, 12]. В последнее время активно обсуждается вопрос о причастности тучных клеток к патогенезу целого ряда нервных и психических заболеваний (рассеянного склероза, мигрени, бокового амиотрофического склероза, расстройств аутистического спектра, депрессии и др.) [8, 13–15].

Поскольку мастоциты обеспечивают жизненно важные функции и участвуют в патогенезе многих заболеваний, им посвящено большое количество научных работ, как клинических, так и выполненных на экспериментальных моделях болезней. Многие результаты, касающиеся выявления тучных клеток в тканях человека и животных, представляются противоречивыми в связи с методическими ограничениями и особенностями трактовки данных цитологического и гистологического исследований, в частности при сопоставлении результатов, полученных на разных видах животных и на человеке. Поэтому особую важность приобретает знание о методах, используемых для адекватной визуализации мастоцитов у разных видов животных и человека и в разных условиях.

Исходя из этого, **цель настоящего обзора** — проанализировать технологические особенности способов идентификации тучных клеток человека и животных для правильного подбора информативных методов при проведении научных и диагностических исследований.

## Морфологические и биохимические характеристики тучных клеток

Мастоциты не обладают особой, характерной только для этого вида клеток формой и локализацией, поэтому их визуализируют на гистологических препаратах

опосредованно, выявляя вещества, специфичные для данных клеток, с помощью методов гистохимии и иммуногистохимии. В цитоплазме тучных клеток расположены многочисленные крупные гранулы, в которых содержится множество (свыше двухсот) различных соединений, включая биогенные амины (гистамин, серотонин, дофамин), протеогликаны (серглицин), мукополисахариды (гепарин, хондроитинсульфат), протеазы (триптазы, химазы, карбоксипептидаза А), цитокины, ростовые факторы, гормоны и другие биологически активные соединения [1, 10, 16–18].

Тучные клетки в отдельных органах существенно различаются по составу медиаторов [19]. Различие в сродстве к красителям у гранул тучных клеток разных органов дало основание Л. Энербеку еще в 1966 г. разделить эти клетки у грызунов на два типа: слизистые, или мукозные, и соединительнотканнные, или серозные [20, 21]. Сопоставление распределения и медиаторного состава тучных клеток грызунов и человека позволяет применить данную классификацию к мастоцитам других видов животных и человека.

Состав медиаторов, содержащихся в гранулах мастоцитов разных типов, различен. В соединительнотканнных тучных клетках содержится большое количество гепарина, тогда как в слизистых он практически отсутствует, однако в них много других кислых мукополисахаридов — хондроитинсульфата А и дерматансульфата (ранее называвшегося хондроитинсульфатом В), которые не найдены в соединительнотканнных мастоцитах [1, 22]. Следует отметить, что гепарин в организме человека обнаружен исключительно в тучных клетках, причем он составляет около 75% от общего количества мукополисахаридов тучных клеток, а хондроитинсульфаты — остальную их часть [23, 24].

### Гистохимическое выявление тучных клеток

Обилие в секреторных гранулах сульфатированных гликозаминогликанов, в первую очередь гепарина, и локализация их преимущественно в тучных клетках позволяют избирательно визуализировать эти клетки с помощью гистохимических окрасок. Отрицательно заряженные сульфатные группы гликозаминогликанов взаимодействуют с основными анилиновыми красителями, например с толуидиновым синим, метиленовым синим или тионином. При этом ковалентно соединившаяся с сульфатированными гликозаминогликанами молекула красителя изменяет свой цвет, и тучные клетки окрашиваются метахроматически, т.е. отлично от ортохроматического цвета самого красителя [25]. Гистохимический метод метахроматического окрашивания в различных вариантах широко используется для выявления мастоцитов на гистологических препаратах, так как он относительно прост, недорог, эффективен и применим практически к любым тканям животных и человека. Однако выявляемость мастоцитов существенно зависит от множества факторов: типа и зрелости тучных клеток, типа исследуемой ткани,

вида животного, используемого красителя, pH инкубационного раствора и продолжительности окрашивания, вида фиксирующей жидкости, времени фиксации и способа окончательной обработки окрашенных препаратов [21, 26–33]. Для выявления тучных клеток чаще всего используют метахроматическую окраску толуидиновым синим или красителем Романовского (по Май-Грюнвальду–Гимзе), а также комбинированную окраску альциановым синим и сафранином.

При окраске **толуидиновым синим** тучные клетки проявляют интенсивную темно-фиолетовую метахромазию в отличие от клеток других типов, которые окрашиваются синим цветом (ортохроматически). Широкое применение толуидинового синего привело к созданию нескольких вариантов окраски и позволило обнаружить ряд особенностей и ограничений данного метода. Толуидиновый синий для метахроматического выявления тучных клеток используется в трех основных разновидностях: 1) 0,5% нейтральный водный раствор; 2) 0,5% кислый раствор (pH=0,3–4,0); 3) 0,5% кислый раствор на 70° этаноле (так называемый толуидиновый синий по протоколу Luna [34]). Для более эффективного окрашивания тучных клеток предпочтительнее применять кислый раствор толуидинового синего с pH=0,3–4,0 [21, 35].

Важно иметь в виду, что гепарин, с которым соединяется толуидиновый синий, содержится в малом количестве в мукозных мастоцитах и в большом количестве — в зрелых соединительнотканнных тучных клетках; в незрелых клетках его содержание низкое и нарастает по мере дифференцировки клеток [36, 37]. Вследствие этого зрелые соединительнотканнные тучные клетки окрашиваются метахроматически толуидиновым синим наиболее интенсивно и быстро, тогда как для мукозных и незрелых соединительнотканнных мастоцитов требуется продолжительное окрашивание — до 2 и даже 5 сут [30, 38, 39]. Для точного подсчета количества тучных клеток и получения корректных результатов необходимо стандартизировать время окраски.

Окрашиваемость тучных клеток толуидиновым синим зависит от метода фиксации. После фиксации в 10% формалине хорошо окрашиваются толуидиновым синим соединительнотканнные тучные клетки в различных органах разных видов животных и человека, но слабо или вовсе не окрашиваются мукозные мастоциты [30, 32, 40, 41]. Для улучшения окраски мукозных мастоцитов было предложено промывать фиксированные в формалине образцы в трет-бутаноле [42], однако лучшие результаты дает использование неальдегидного (неформалинового) фиксатора. Во многих исследованиях продемонстрировано, что фиксирующий раствор Карнуа позволяет выявить больше тучных клеток (в том числе мукозных) при окрашивании толуидиновым синим, чем фиксаторы, приготовленные на основе формальдегида [35, 38, 43, 44]. Помимо жидкости Карнуа, хорошо сохраняют метахромазию тучных клеток фиксаторы, содержащие

металлы: основной ацетат свинца, который также называют фиксатором Mota [20, 35, 45], и цинксодержащие фиксаторы [46–52].

Следует иметь в виду, что толуидиновый синий, помимо тучных клеток, может вызывать метахромию во внутриклеточных гранулах макрофагов и базофильных гранулоцитов, а также в бокаловидных клетках кишечника у человека и животных [30, 52, 53].

**Альциановый синий** в комбинации с **сафранином О** (который обычно называют просто сафранином) также широко используется для визуализации тучных клеток. Достоинство данного метода в том, что он позволяет одновременно выявлять тучные клетки серозного и мукозного типов. Альциановый синий окрашивает тучные клетки мукозного типа синим цветом, а сафранин избирательно окрашивает серозные тучные клетки в красный и розовый цвет. Это обусловлено тем, что сафранин связывается с сильно сульфатированными гликозаминогликанами, включая гепарин, который характерен для соединительнотканых тучных клеток, а альциановый синий окрашивает гранулы тучных клеток, содержащие слабо сульфатированные гликозаминогликаны, главным образом предшественники гепарина, и хондроитинсульфат Е, которые типичны для слизистых тучных клеток [32, 42, 54]. Следовательно, гранулы мастоцитов, которые окрашиваются в розовый и красный цвет сафранином, содержат гепарин, а окрашиваемые в синий цвет альциановым синим его не содержат.

Кроме того, учитывая распределение гепарина в зрелых и незрелых мастоцитах, их можно дифференцировать с помощью комплексной окраски альциановым синим/сафранином: зрелые (соединительнотканые) мастоциты окрашиваются в розовый цвет сафранином, а незрелые (соединительнотканые и слизистые) — в синий цвет альциановым синим. По мере созревания соединительнотканых мастоцитов происходит постепенный сдвиг в их окрашивании, и на промежуточном этапе часть гранул окрашивается сафранином в розовый цвет, но остается синий ободок окраски альциановым синим или цитоплазма приобретает сиреневый цвет, тогда как зрелые и незрелые мукозные мастоциты сохраняют синюю окраску альциановым синим [55–58].

Альциановый синий выявляет больше тучных клеток при низких значениях pH: например, при pH=1,0 он окрашивает больше мастоцитов, чем при pH=3,5. Эффективность окрашивания клеток с помощью альцианового синего и сафранина зависит от способа фиксации: предпочтительнее применять неальдегидный фиксатор (например, раствор Карнуа или фиксатор Mota) [26, 41, 59].

При использовании альцианового синего следует иметь в виду, что он окрашивает в кишечнике не только тучные, но и бокаловидные клетки [43, 52], а в воздухоносных путях — бокаловидные клетки и клетки Клара [60, 61].

Комбинированная окраска препаратов альциановым синим и эозином по Сухоруковой и Ворончихину позволяет одновременно выявить тучные клетки и эозинофильные лейкоциты — основные клеточные популяции, участвующие в патогенезе бронхиальной астмы [62].

В некоторых случаях для выявления мастоцитов в комбинации альцианового синего и сафранина первый краситель заменяют на **астровый синий**. Астровый синий, как и альциановый синий, относится к группе медьсодержащих фталоцианиновых красителей и при соответствующих условиях применения окрашивает тучные клетки более селективно, чем некоторые другие красители, включая толуидиновый синий, и не дает фоновой окраски [63, 64]. При использовании в комбинации с сафранином астровый синий, как и альциановый синий, окрашивает незрелые и/или мукозные тучные клетки, тогда как сафранин красит гепаринсодержащие зрелые серозные мастоциты [21, 39]. Подобно другим красителям астровый синий хорошо окрашивает тучные клетки после фиксации не в формалине, а в жидкости Карнуа либо в фиксаторе Mota [63].

Нередко для выявления тучных клеток используют краситель Романовского в разных вариантах окрашивания гистологического материала. Так, при окраске по **Май-Грюнвальду–Гимзе** цитоплазма тучных клеток приобретает темно-синий цвет, а гранулы окрашиваются метахроматически в красный цвет [45]. Этот метод хорошо выявляет мукозные тучные клетки, причем иногда с большей эффективностью, чем окраска толуидиновым синим, альциановым синим, астровым синим или при применении ферментно-гистохимического либо иммуногистохимического методов (см. ниже) [53, 65–67]. Следует заметить, что, хотя окраска тучных клеток по Май-Грюнвальду–Гимзе высокоизбирательна, эта процедура занимает больше времени, чем окраска толуидиновым синим [67].

В большом количестве исследований используют самостоятельно основной компонент краски Романовского и Май-Грюнвальда–Гимзе — метиленовый синий и продукты его окисления, которые образуются в данном красителе — азур А и азур Б (синоним — азур I). Метахроматическая окраска мастоцитов с помощью **метиленового синего** распространена достаточно широко, он избирательно маркирует тучные клетки, давая меньшую фоновую окраску, чем, например, альциановый синий [52, 68, 69]. Метиленовый синий окрашивает больше мастоцитов после фиксации в жидкости Карнуа или фиксаторе Mota, чем в формалине [68, 70].

**Азур А** упоминается в различных руководствах как часто применяемая краска для визуализации тучных клеток, однако на самом деле он используется редко. Продемонстрировано, что азур А выявляет серозные и мукозные мастоциты так же хорошо, как и другие красители (а также при использовании ферментно-гистохимического метода), причем при более низком

показателе рН (0,5–1,0) азур А выявляет больше мастоцитов, чем при рН=3,0–4,0 [20, 71]. Интересно, что при рН=0,5 азур А красит тучные клетки ортохроматически, а при повышении рН до 4,0 наблюдается сдвиг к метахромазии [20]. Есть данные, что азуром А в отличие от других красителей не удастся покрасить мастоциты в мозге крыс [72].

Реже для метахроматической окраски мастоцитов используют другие красители: **крезиловый фиолетовый** [73] или **тионин**. Тионин уступает по эффективности выявления тучных клеток толуидиновому синему и дает по сравнению с ним более сильную фоновую окраску [72, 74, 75]. Имеются данные об эффективном окрашивании тучных клеток **бриллиантовым зеленым** [76], **метилловым зеленым** [77] и **метиленовым зеленым** [78].

В 1958 г. российский гистолог М.Г. Шубич предложил использовать 0,5% кислый раствор **основного коричневого** (синоним — бисмарк коричневый) для избирательного окрашивания тучных клеток [79]. Данный краситель соединяется с кислыми мукополисахаридами и контрастно прокрашивает гранулы тучных клеток желто-коричневым цветом без окрашивания ядра и клеток других типов. Препараты хорошо окрашиваются независимо от использованного фиксатора (абсолютного спирта, спирт-формола, 4% раствора основного ацетата свинца, смеси ацетата свинца и формалина и т.д.). Метод прост и избирательно выявляет мастоциты не хуже толуидинового синего [80, 81].

Карбоцианиновый краситель пинацианол в комбинации с эритрозином (**пинацианол–эритрозинат**) известен как селективный краситель тучных клеток, который используется в гистологической практике для метахроматической окраски мастоцитов человека и животных. В материале, фиксированном в формалине, пинацианол–эритрозинат выявляет больше мастоцитов, чем толуидиновый синий [82, 83]. Однако данный краситель хуже, чем толуидиновый синий, прокрашивает цитоплазму, не позволяя четко визуализировать гранулы [82]. Недостатком пинацианола является его высокая чувствительность к теплу и свету, вследствие чего окрашенные им препараты быстро обесцвечиваются.

Предложен метод окраски тучных клеток индикатором изменения кислотности — **ферроином**. Метод прост в использовании и выявляет тучные клетки не менее эффективно, чем толуидиновый синий или альциановый синий–сафранин [84].

**Непригоден** для селективной окраски тучных клеток главный гистологический метод окраски — **гематоксилином и эозином** [85]. Гематоксилин не обладает сродством к компонентам гранул тучных клеток, поэтому его часто применяют для подкраски клеточных ядер при иммуногистохимическом окрашивании мастоцитов.

Помимо классических гистологических красок для визуализации соединительнотканых тучных клеток используют флуоресцирующие красители, в пер-

вую очередь **сульфат берберина**. Берберин — это катионный краситель, который обладает высоким сродством к гепарину и слабой собственной флуоресцентностью, но после связывания с гепарином испускает сильную желтую флуоресценцию [30, 44, 86]. Интенсивность флуоресценции берберина прямо пропорциональна количеству гепарина, что позволяет использовать его не только для маркирования зрелых соединительнотканых мастоцитов, содержащих гепарин, на гистологических препаратах [55, 56], но и для цитофлуорометрических измерений количества гепарина в тучных клетках [54]. Цитоплазматические гранулы мастоцитов флуоресцируют под действием берберина более контрастно в сравнении с фоновой тканью при низких рН красителя (1,2–2,0). Берберин применяют для маркирования мастоцитов не только во флуоресцентной, но и в световой микроскопии: он окрашивает тучные клетки в красно-коричневый цвет [87]. Поскольку берберин метит только серозные (гепаринсодержащие) тучные клетки, его используют в комбинации с альциановым синим для дифференциальной окраски серозных (берберин) и мукозных (альциановым синим) тучных клеток [21] либо параллельно с толуидиновым синим, что позволяет из общей популяции мастоцитов, окрашиваемых толуидиновым синим, вычленивать серозные мастоциты, меченные берберин [88, 89].

Окраска берберин [88, 89]. Окраска берберин чувствительна к способу фиксации: забуференный нейтральный формалин почти полностью подавляет флуоресценцию, для успешного ее выявления рекомендуется фиксатор Карнуа [41, 90]. Следует иметь в виду, что, хотя берберин хорошо окрашивает мастоциты мышей и крыс, он, по некоторым данным [43, 44], не вызывает флуоресценцию в соединительнотканых тучных клетках морской свинки и в коже человека. Недостатком данного красителя является недолговечность препаратов из-за кратковременной флуоресценции берберина.

С гепарином, содержащимся в гранулах соединительнотканых тучных клеток, помимо берберина селективно связывается гликопротеид **авидин** [91]. Благодаря этому свойству авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, флуоресцеином изоцианатом (FITC), родамином или другой меткой, используется для выявления соединительнотканых тучных клеток в световом или флуоресцентном микроскопе. Избирательность связывания авидина с гепарином доказывается применением гепариназы — фермента, который разрушает гепарин и полностью предотвращает окрашивание срезов авидином [92]. Авидин связывается с гепарином не только избирательно, но и количественно, т.е. интенсивность флуоресценции авидина, конъюгированного с флуоресцеином, пропорциональна количеству гепарина в гранулах мастоцитов, что используется для получения данных о количестве гепарина и гепаринсодержащих гранул в тучных клетках [92]. С помощью связывания авидина с гепарином удается наблюдать процесс

дегрануляции — высвобождения секреторных гранул из тучных клеток [86, 93, 94].

За счет высокой аффинности к гепарину авидин выявляет соединительнотканые тучные клетки не менее, а иногда и более эффективно, чем толуидиновый синий [38, 44, 71]. Он превосходит и берберин, поскольку для него не было обнаружено видоспецифичных ограничений окраски мастоцитов: авидин способен метить серозные тучные клетки, полученные не только у мышей и крыс, но и, в отличие от берберина, у человека и морской свинки [44, 95]. Важно иметь в виду, что аффинность авидина к гепарину настолько высока, что он может связываться с гепарином даже находясь в составе авидин–биотин–пероксидазного комплекса, который используется в иммуногистохимической работе, не связанной с изучением тучных клеток, в результате чего происходит неспецифическое окрашивание тучных клеток. Для предотвращения этого артефакта были разработаны специальные методы [96]. Визуализация мастоцитов авидином дает лучшие результаты после фиксации ткани в жидкости Карнуа в сравнении с формалинсодержащим фиксатором [44].

Иногда для визуализации тучных клеток используют **акридиновый оранжевый**, который соединяется с гранулами тучных клеток, и они начинают испускать оранжево-желтую флуоресценцию. Помимо этого, он окрашивает гранулы мастоцитов в оранжевый цвет в проходящем свете, что позволяет наблюдать меченные им объекты на гистологических препаратах в светооптическом микроскопе. Есть данные, что акридиновый оранжевый может образовывать связи с гепарином и, вероятно, поэтому окрашивает серозные, но не мукозные мастоциты [41]. Способность акридинового оранжевого соединяться с цитоплазматическими гранулами используется для исследования процессов дегрануляции в норме и при апоптотическом разрушении мастоцитов [97].

Следует иметь в виду, что флуоресценция акридинового оранжевого кратковременна. Но главная проблема его применения заключается в том, что он в качестве катионного красителя соединяется с различными кислотными везикулами, лизосомами и нуклеиновыми кислотами [98]. Вследствие этого акридиновый оранжевый индуцирует флуоресценцию нуклеиновых кислот в ядре, а также окрашивает везикулы и лизосомы в клетках различной природы [98, 99], что свидетельствует о низкой специфичности данного красителя по отношению к тучным клеткам.

Вышеописанные виды гистохимической окраски тучных клеток основаны на соединении основного красителя с гепарином и другими кислыми мукополисахаридами, однако гепарин, хотя и в меньшем количестве, содержится и в базофильных лейкоцитах (базофилах), которые также окрашиваются основными красителями. Для преодоления этого недостатка разработаны более специфичные для идентификации мастоцитов ферментно-гистохимический и иммуногистохимический методы, которые базируются на выявлении специфичных для мастоцитов ферментов — **триптазы** и **химазы**. Это сериновые протеазы, которые обладают соответственно трипсиноподобными или химотрипсиноподобными свойствами и составляют до 35–50% всех белков мастоцитов [33, 100]. Триптаза и химаза были обнаружены в базофилах, но в концентрации на два порядка ниже, чем в мастоцитах [101]. Поэтому при использовании иммуногистохимических методов с амплификацией сигнала, достаточной для выявления тучных клеток, базофильные гранулоциты не выявляются.

В соответствии с наличием тех или иных сериновых протеаз тучные клетки подразделяют на содержащие триптазу, химазу или оба фермента сразу. У человека соединительнотканые тучные клетки продуцируют и хранят в секреторных гранулах триптазу и химазу, а мукозные — только триптазу (табл. 1) [100, 102].

Тучные клетки лабораторных грызунов существенно отличаются по составу содержащихся в них протеаз от мастоцитов человека: в мукозных мастоцитах человека содержится только триптаза, а у грызунов — только химаза; серозные тучные клетки содержат триптазу и химазу и у человека, и у грызунов. У мышей серозные тучные клетки синтезируют и хранят в гранулах две химазы — протеазы мышинных тучных клеток-4 и -5 (mMCP-4 и mMCP-5) и две триптазы — mMCP-6 и mMCP-7, тогда как мукозные тучные клетки продуцируют только химазы, причем отличные от тех, что содержатся в соединительнотканых мастоцитах (mMCP-1 и mMCP-2), и не синтезируют триптазы [100, 102]. У крыс серозные тучные клетки также содержат триптазу и химазу: два вида триптазы — протеазы крысиных тучных клеток rMCP-6 и rMCP-7 — и две химазы — rMCP-1 и rMCP-5, а мукозные мастоциты экспрессируют несколько различных химаз (протеазы крысиных тучных клеток rMCP-2, -3, -4, -8, -9, -10), но не содержат триптазу [18, 103].

Видоспецифичные протеазы обнаружены также у

Т а б л и ц а 1

**Сериновые протеазы тучных клеток человека и лабораторных животных**

Вид	Серозные тучные клетки		Мукозные тучные клетки	
	Триптазы	Химазы	Триптазы	Химазы
Человек	Триптаза	Химаза	Триптаза	Нет
Мышь	mMCP-6, mMCP-7	mMCP-4, mMCP-5	Нет	mMCP-1, mMCP-2
Крыса	rMCP-6, rMCP-7	rMCP-1, rMCP-5	Нет	rMCP-2, -3, -4, -8, -9, -10

морских свинок, кроликов, монгольских песчанок, золотистых хомяков, кошек, собак и других видов животных [104, 105], причем паттерн распределения химаз и протеаз в серозных и мукозных тучных клетках у разных видов животных различен. Этот факт определяет невозможность межвидовой стандартизации иммуногистохимических методов выявления тучных клеток, при которых маркируются их цитоспецифические ферменты.

### Ферментно-гистохимический метод

Полезным методом маркирования специфических ферментов тучных клеток является ферментно-гистохимический. В середине XX в. в тучных клетках была выявлена специфическая для них эстеразная (хлорацетатэстеразная) активность, локализацию которой можно определить с помощью ферментно-гистохимической реакции Ледера. Для этого используют нафтол-AS-D-хлорацетат в качестве специфического субстрата и свежеприготовленную диазониевую краску: гранатовый прочный GBC, синий прочный BB (ББ), прочный красно-фиолетовый LB, парарозанилин или фуксин основной. Ферментативный гидролиз сложноэфирных связей тучноклеточной эстеразой высвобождает из субстрата нафтол, который соединяется с диазониевым красителем, образуя сильно окрашенные отложения в месте активности фермента, тем самым маркируя тучные клетки [85]. Достоинство этого метода: в отличие от многих других ферментно-гистохимических реакций, данную реакцию можно успешно проводить на парафиновых срезах ткани [85].

Как и другие гистохимические реакции, хлорацетатэстеразная реакция зависит от способа фиксации исследуемой ткани, однако сведения на этот счет противоречивы: проводя реакцию Ледера после фиксации в формалине, жидкости Карнуа или растворе Mota, разные авторы получили совершенно различные результаты [42, 70, 106].

Клетки, которые маркируются с помощью хлорацетатэстеразной реакции, также окрашиваются метакроматически толуидиновым синим, красителем Гимзы или альциановым синим, что свидетельствует об их тучноклеточной природе [42, 106, 107]. Однако наряду с мастоцитами хлорацетатэстеразная реакция (как правило, с низкой интенсивностью) обнаруживается в полиморфноядерных лейкоцитах [106].

Есть данные, свидетельствующие, что нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразная реакция отражает активность химазы и таким образом локализация продуктов данной ферментно-гистохимической реакции соответствует местам локализации химазы в мастоцитах [69, 106]. Исходя из этого и учитывая распределение химазы в разных видах тучных клеток (см. табл. 1), можно полагать, что хлорацетатэстеразная реакция позволяет выявить у человека только серозные тучные клетки, а у мышей и крыс — и серозные, и мукозные мастоциты.

Некоторые другие химотриптические протеазы, например эластаза и катепсин G, обладают субстратной специфичностью химазы, причем располагаются как в мастоцитах, так и в других типах клеток у человека и у животных, поэтому хлорацетатэстеразная реакция может выявлять больше клеток, чем на самом деле существует химазосодержащих мастоцитов в изучаемой области [29, 69, 108]. Чтобы преодолеть этот недостаток, были созданы субстраты (пептидные соединения), более селективные для химазы, а также субстраты, специфические для триптазы, что позволило проводить ферментно-гистохимическую реакцию для выявления локализации химазы или триптазы с высокой избирательностью [38, 41, 109]. Специфичность ферментно-гистохимической реакции на химазу и триптазу может быть проверена с использованием различных ингибиторов протеаз: например, гистохимическую реакцию на химазу блокирует химостатин, ингибитор трипсина сои и фенилметилсульфонилфторид, на триптазу — лейпептин и некоторые другие олигопептиды [106, 110].

Важно подчеркнуть, что с помощью данной реакции визуализируются активные ферменты, способные расщеплять специфические для них субстраты. Однако есть данные, что часть химазы и триптазы в мастоцитах находится в неактивном состоянии и потому не выявляется с помощью ферментно-гистохимической реакции [108, 109]. В этом случае неактивные, равно как и активные ферменты могут быть определены методом иммуногистохимии.

### Иммуногистохимия

Иммуногистохимия — это, безусловно, наиболее чувствительный и селективный, но вместе с тем дорогостоящий, трудоемкий и технически сложный способ идентификации тучных клеток. Как и другими методами, в данном случае выявляются соединения, избирательно присущие тучным клеткам, к числу которых в первую очередь относятся триптаза и химаза. Как уже упоминалось, данные ферменты обладают видовой специфичностью, потому антитела к ним также специфичны для каждого вида. Конъюгированные с соответствующей меткой, эти антитела можно выявлять на препаратах с помощью световой, флуоресцентной и электронной микроскопии.

Именно иммуногистохимический метод показал, что тучные клетки человека делятся на две группы: триптаза-иммунореактивные (TK<sub>T</sub>) и химаза-иммунореактивные (TK<sub>TX</sub>). Распределение в тканях организма TK<sub>T</sub> соответствует распределению мукозных мастоцитов (преимущественно в легких и слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта), а TK<sub>TX</sub> — соединительнотканых тучных клеток (в коже, подслизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, перитонеальной жидкости) [95, 101, 111]. Таким образом, иммуногистохимическое выявление триптазы позволяет обнаруживать всю популяцию тучных клеток

в тканях человека, в то время как дополнительное иммуоокрашивание на химазу помогает идентифицировать подтип тучных клеток. Помимо двух указанных подтипов в некоторых тучных клетках человека с помощью иммуногистохимии (а также ферментно-гистохимического метода) определялась только химаза (без триптазы): ТК<sub>x</sub> были описаны в плаценте, легких, слизистой и подслизистой оболочках желудочно-кишечного тракта, почках, коже и конъюнктиве [95, 112–115]. Однако вопрос о существовании в организме человека субпопуляции химаза-иммуноположительных/триптаза-иммунонегативных мастоцитов остается дискуссионным, поскольку рядом других исследователей были получены противоположные результаты [116, 117]. Не исключено, что обнаружение химаза-иммуноположительных/триптаза-иммунонегативных тучных клеток связано со слабой экспрессией триптазы в отдельных мастоцитах и/или сложностью выявления триптазы (как и химазы) методом иммуногистохимии при использовании двойного мечения, где большое значение имеет правильно выбранное время инкубации с соответствующим антителом [31, 118].

В настоящее время имеются коммерчески доступные видоспецифичные антитела к некоторым химазам и триптазам мышей и крыс, которые используются в иммуногистохимических исследованиях как маркеры определенной подгруппы тучных клеток [87, 108, 119, 120]. Антитела к триптазе и химазе человека, мышей или крыс в соответствии с рекомендациями производителей и данными исследователей можно использовать для иммуногистохимического изучения мастоцитов других видов животных, однако возможность такого использования антител требует специального тестирования в каждом отдельном случае. В некоторых случаях учитывается генетическая информация об ортологичных протеазах — таких, которые кодируются идентичным геном у двух разных видов животных. Например, для иммуногистохимического выявления мышьи химазы mMCP-4 успешно использовались антитела к ортологичной крысиной химазе rMCP-1 [108].

При использовании иммуногистохимии для получения адекватных результатов имеет значение способ фиксации материала. Сопоставление влияния фиксации в формалине, жидкости Карнуа, этаноле и других фиксаторах на результаты иммуногистохимического выявления тучных клеток дало противоречивые результаты [70, 111]. По нашим наблюдениям, применение цинксодержащих фиксирующих растворов позволяет получить наилучшие результаты. При проведении иммуногистохимических реакций на ферменты тучных клеток следует учитывать, что триптаза и химаза экспрессируются достаточно поздно при дифференцировке мастоцитов, вследствие чего антитела против этих протеаз не могут быть использованы для идентификации незрелых тучных клеток.

Иногда для маркирования тучных клеток применяют иммуногистохимическую реакцию на рецепторный

белок *c-kit* (синоним — CD117) — тирозинкиназный трансмембранный рецептор, лигандом которого является фактор стволовых клеток. Установлено, что взаимодействие данного лиганда с рецептором *c-kit* регулирует миграцию, созревание и пролиферацию тучных клеток *in vivo* и *in vitro* [6, 75, 121]. Рецепторный белок *c-kit* наблюдается не только в растущих мастоцитах, как можно было бы ожидать, исходя из установленных функций, но и в зрелых тучных клетках, поэтому антитела к белку *c-kit* позволяют иммуногистохимически определять большую часть популяции таких клеток. Для некоторых тканей и видов животных показано, что иммуногистохимическая реакция на *c-kit* выявляет тучные клетки лучше, чем окраска толудиновым синим [122], и не менее эффективно, чем иммуногистохимия на триптазу [123]. Однако в других исследованиях обнаружено, что данный маркер недостаточно специфичен и с помощью антител к *c-kit* удается визуализировать только часть тучных клеток, иммуноположительных на триптазу или химазу [124, 125], и наоборот, только часть *c-kit*-иммунореактивных клеток была также иммуноположительной на триптазу или химазу [125]. Это связано с тем, что рецептор *c-kit* помимо мастоцитов выявляется в стволовых и половых клетках, в эпителиальных клетках потовых желез, протоков грудной железы, почечных и семенных канальцев, интерстициальных клетках Кахала, меланоцитах и базальных клетках эпидермиса, некоторых нейронах и глиоцитах головного мозга [126–128]. Отличительной особенностью локализации *c-kit* в тучных клетках является их расположение на мембране, тогда как в клетках другой природы *c-kit* локализован в цитоплазме [129].

Кроме этого, рецепторный белок *c-kit* интенсивно экспрессируется в опухолях разной природы, его детекция с помощью иммуногистохимии имеет диагностическое значение [126, 127, 130–132]. Таким образом, этот белок можно признать факультативным маркером тучных клеток: *c-kit*-иммуноположительные клетки с большой вероятностью, но не обязательно могут быть мастоцитами.

Некоторые другие компоненты, типичные для тучных клеток, также используются как возможные маркеры мастоцитов. Один из них — **высокоаффинный рецептор к иммуноглобулину E (FcεRI)**, который, как правило, соэкспрессируется с белком *c-kit* в зрелых тучных клетках [2, 6]. При иммуногистохимическом исследовании большинство тучных клеток, окрашенных с использованием реакции на триптазу или химазу, также обнаруживают положительную реакцию и на FcεRI [125, 133]. Однако в некоторых частях организма, например в легких у человека, лишь малая часть мастоцитов FcεRI иммунореактивна [133]. Кроме того, во всех исследованных тканях наблюдается значительное количество FcεRI-иммунореактивных клеток, которые были триптаза- и/или химаза-иммунонегативными [125], что не удивительно, поскольку FcεRI помимо мастоцитов также обнаружен в базофи-



лах, моноцитах, эозинофилах и эпидермальных клетках Лангерганса [134, 135]. Таким образом, хотя FcεRI является типичным компонентом тучных клеток, его, как и c-kit, нельзя признать селективным маркером мастоцитов.

Иммуногистохимия на **гистамин** предлагалась для детекции тучных клеток в разных органах человека и животных [87, 136, 137]. Однако данный метод имеет существенный недостаток, связанный с тем, что гистамин содержится не во всех тучных клетках [137, 138], но присутствует в значительных количествах в нейронах, энтерохромаффинных клетках пищеварительного тракта, базофилах, нейтрофилах, моноцитах/макрофагах и дендритных клетках [139, 140]. Эти данные свидетельствуют о том, что иммуногистохимическая (равно как и гистохимическая) реакция на гистамин не может считаться надежным и селективным методом выявления тучных клеток.

**Серотонин** (как и ключевой фермент синтеза серотонина триптофангидроксилаза) содержится в тучных клетках животных и человека. Основная информация по этому вопросу получена в исследованиях на животных, данные о серотонине в мастоцитах человека крайне немногочисленны. У грызунов серотонин обнаружен преимущественно в соединительнотканых мастоцитах [33, 141]. В некоторых работах серотонин не удалось выявить с помощью иммуногистохимии в тучных клетках кожи кошек и собак [138, 142], а в головном мозге экспериментальных животных и птиц он наблюдался лишь в части тучных клеток [120, 143, 144]. В то же время серотонин встречается помимо мастоцитов во многих других типах клеток в разных органах человека и животных. Среди них — энтерохромаффинные клетки желудочно-кишечного тракта, которые производят подавляющее большинство серотонина в организме; различные эндокринные клетки легких, надпочечников, простаты, придатка яичка [145–148]; серотонинергические нейроны центральной и периферической нервной системы [149, 150]; вкусовые рецепторные клетки III типа и гломусные клетки каротидных телец [151, 152]. Серотонин содержится в эпителиоцитах выстилки выводных протоков различных желез [148], трофобласте и децидуальных клетках плаценты человека [153], кератиоцитах, фибробластах, меланоцитах и, возможно, в других клетках кожи [154, 155], в синовиальных фибробластах [156], тромбоцитах, лимфоцитах и моноцитах [157]. Таким образом, хотя серотонин был продемонстрирован в тучных клетках животных и человека, он не специфичен для мастоцитов и не является их селективным маркером.

Получение специфических антител к **гепарину** позволило проводить иммуногистохимические исследования данного компонента гранул тучных клеток. С помощью этого метода достоверно показано, что гепарин содержится не во всех, а только в соединительнотканых мастоцитах [120, 158], поэтому иммуногистохимия на гепарин может использоваться для установления типа тучных клеток [158]. Однако дан-

ный метод значительно более трудоемкий и дорогой, чем общепринятые гистохимические методы выявления гепарина.

Для визуализации тучных клеток предлагалась и иммуногистохимическая реакция на **рецептор фактора роста эндотелия сосудов-1 (VEGFR-1)** [159]. Однако данные о наличии этого рецептора на тучных клетках немногочисленны, а частота встречаемости его на мастоцитах неизвестна. В то же время установлено, что VEGFR-1 выявляется в эндотелиальных клетках сосудов, эпителиальных клетках матки и бронхов, пневмоцитах 2-го типа, цитотрофобласте, интерстициальных клетках семенников, Т-лимфоцитах, моноцитах, клетках микроглии и астроглии и некоторых других [160–163]. Кроме того, VEGFR-1 интенсивно экспрессируется в опухолевых клетках разной локализации, что предлагается использовать в диагностических и терапевтических целях [164, 165]. Вследствие этого нет оснований считать данный рецептор достаточно селективным маркером для надежной идентификации тучных клеток.

Среди технических приемов, которые используются для непосредственной визуализации тучных клеток у животных и человека, наиболее распространенным и простым является микроскопия окрашенных препаратов в проходящем свете видимого диапазона. Менее распространены флуоресцентная микроскопия и электронная микроскопия. Наиболее информативным подходом, позволяющим получить максимум сведений о структуре и функциональном состоянии отдельных тучных клеток, является использование флуоресцентной иммуногистохимии в сочетании с многомаркерной конфокальной микроскопией [154, 166–168].

## Заключение

Результаты критического анализа всего комплекса методов и гистотехнологических приемов, используемых для визуализации тучных клеток в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике, можно представить в виде таблицы (табл. 2), из которой следует, что наиболее часто в качестве маркеров тучных клеток человека используются гисто- и иммуногистохимические реакции на 10 компонентов, характерных для тучных клеток и ограниченного числа других клеточных элементов.

Часть методов, которые используются для визуализации тучных клеток у человека, могут успешно применяться и для выявления тучных клеток лабораторных животных, что необходимо при создании адекватных биологических моделей заболеваний человека, протекающих с развитием воспалительной реакции. К сожалению, наиболее специфичные методы, основанные на использовании иммуногистохимических реакций на триптазу и химазу тучных клеток человека, не могут быть применены для выявления тучных клеток у животных. Это связано как с различиями наборов ферментов тучных клеток у разных видов млекопитающих

Таблица 2

## Маркеры тучных клеток человека и методы их выявления

Маркеры	Клеточный тип	Метод окраски	Дополнительно окрашиваемые структуры	Примечания
1. Сульфатированные гликозаминогликаны (включая гепарин)	Зрелые серозные мастоциты, часть слизистых мастоцитов	<b>Толуидиновый синий</b> <b>Метиленовый синий</b> Тионин <b>Сафранин О</b> Основной коричневый Метиленовый зеленый Азур А Май-Грюнвальд–Гимза	Макрофаги, базофильные гранулоциты, бокаловидные клетки, клетки Клара	Окраска толуидиновым синим и метиленовым синим — наиболее простой и эффективный метод выявления большинства мастоцитов
2. Гепарин	Зрелые серозные мастоциты	<b>Берберин</b> <b>Авидин</b> Акридиновый оранжевый Иммуногистохимия	Базофильные гранулоциты Для авидина — любые клетки, содержащие биотин	Берберин, авидин — высокоселективные маркеры гепарина, но берберин не вызывает флуоресценцию в мастоцитах кожи человека
3. Хондроитинсульфат Е	Мукозные и незрелые мастоциты	<b>Альциановый синий</b> Астровый синий	Компоненты межклеточного вещества соединительной ткани	Часто используются в комбинации с сафранином О для одновременного выявления мукозных и серозных мастоцитов
4. Триптаза	Серозные и мукозные мастоциты	Реакция Ледера <b>Иммуногистохимия</b>	Отсутствуют	Иммуногистохимия на триптазу — наиболее эффективный метод выявления мастоцитов человека  Реакция Ледера выявляет только активный фермент
5. Химаза	Серозные мастоциты	Реакция Ледера <b>Иммуногистохимия</b>	Отсутствуют	Реакция Ледера выявляет только активный фермент
6. c-kit (CD117)	Мастоциты	Иммуногистохимия	Стволовые, половые, эпителиальные клетки, интерстициальные клетки Кахаля, меланоциты и базальные клетки кожи, нейроны, глиоциты	Используется также как онко-маркер
7. Рецептор к иммуноглобулину Е (FcεRI)	Мастоциты	Иммуногистохимия	Базофильные гранулоциты, моноциты, эозинофилы, эпидермальные клетки Лангерганса	
8. Гистамин	Мастоциты (преимущественно серозные)	Иммуногистохимия Гистохимия	Отдельные нейроны, гистаминсодержащие эпителиальные эндокриноциты желудка, базофильные гранулоциты, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки	
9. Серотонин	Мастоциты (преимущественно серозные)	Иммуногистохимия Гистохимия	Нейроны, вкусовые рецепторные клетки, гломусные клетки каротидных телец, энтерохромаффинные клетки, трофобласт, децидуальные клетки, кератиноциты, фибробласты, меланоциты, тромбоциты	
10. Рецептор фактора роста эндотелия сосудов-1 (VEGFR-1)	Мастоциты	Иммуногистохимия	Эндотелиальные клетки сосудов, эпителиальные клетки матки и бронхов, пневмоциты 2-го типа, цитотрофобласт, интерстициальные клетки семенников, Т-лимфоциты, моноциты, микро- и астроглия, нейроны	Используется также как онко-маркер

Примечание: жирным шрифтом выделены наиболее эффективные методы выявления маркеров тучных клеток, обладающих наибольшей цитоспецифичностью; под номерами 6–10 указаны менее селективные маркеры тучных клеток, использование которых может привести к получению ошибочных результатов.

и человека, так и с низкой степенью гомологии генов, кодирующих изучаемые белки, что ведет к необходимости использования разных наборов видоспецифичных антител.

Большое значение для гистохимического и иммуногистохимического выявления тучных клеток имеет правильная фиксация биологического материала. Мастоциты, особенно мукозные, лучше окрашиваются анилиновыми красителями после использования фиксирующей жидкости Карнуа и фиксаторов, содержащих соли таких металлов, как свинец и цинк. Для иммуногистохимического выявления тучных клеток пригодна непродолжительная фиксация материала в формалине, но наилучшие результаты могут быть получены при использовании цинксодержащих фиксирующих растворов.

Наиболее важным технологическим подходом является применение флуоресцентных методов иммуногистохимии и многомаркерного анализа в сочетании с конфокальной микроскопией. Из нерешенных проблем визуализации тучных клеток можно отметить отсутствие четко стандартизированных подходов для надежного их выявления у разных видов лабораторных животных, что может вносить элемент неопределенности при анализе результатов экспериментальных исследований.

**Вклад авторов.** Все авторы принимали равное участие в написании статьи.

**Финансирование исследования.** Работа финансировалась из средств государственного задания Института экспериментальной медицины.

**Конфликт интересов.** Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

## Литература/References

- Elieh Ali Komi D., Wohrl S., Bielory L. Mast cell biology at molecular level: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2020; 58(3): 342–365, <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08769-2>.
- Metz M., Maurer M. Mast cells — key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 2007; 28: 234–241, <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.03.003>.
- Piliponsky A.M., Acharya M., Shubin N.J. Mast cells in viral, bacterial, and fungal infection immunity. *Int J Mol Sci* 2019; 20(12): 2851, <https://doi.org/10.3390/ijms20122851>.
- Krystal-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G. Mast cell: a multi-functional master cell. *Front Immunol* 2016; 6: 620, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>.
- Olivera A., Beaven M.A., Metcalfe D.D. Mast cells signal their importance in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142(2): 381–393, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.034>.
- Metcalfe D.D. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112(4): 946–956, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-078097>.
- Rivellese F., Nerviani A., Rossi F.W., Marone G., Matucci-Cerinic M., de Paulis A., Pitzalis C. Mast cells in rheumatoid arthritis: friends or foes? *Autoimmun Rev* 2017; 16(6): 557–563, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.04.001>.
- da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10): 698–738, <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>.
- Varricchi G., de Paulis A., Marone G., Galli S.J. Future needs in mast cell biology. *Int J Mol Sci* 2019; 20(18): 4397, <https://doi.org/10.3390/ijms20184397>.
- Кутукова Н.А., Назаров П.Г. Тучные клетки: роль в воспалении, восстановлении тканей и развитии фиброза. *Цитокины и воспаление* 2014; 13(2): 11–20.
- Kutukova N.A., Nazarov P.G. Mast cells: a role in inflammation, tissue repair and fibrosis. *Citokiny i vospalenie* 2014; 13(2): 11–20.
- Binda M.M., Donnez J., Dolmans M.M. Targeting mast cells: a new way to treat endometriosis. *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21(1): 67–75, <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1260548>.
- Aller M.A., Arias A., Arias J.I., Arias J. Carcinogenesis: the cancer cell-mast cell connection. *Inflamm Res* 2019; 68(2): 103–116, <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1201-4>.
- Jones M.K., Nair A.A., Gupta M. Mast cells in neurodegenerative disease. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 171, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00171>.
- Girolamo F., Coppola C., Ribatti D. Immunoregulatory effect of mast cells influenced by microbes in neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun* 2017; 65: 68–89, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.017>.
- Kempuraj D., Thangavel R., Selvakumar G.P., Zaheer S., Ahmed M.E., Raikwar S.P., Zahoor H., Saeed D., Natteru P.A., Iyer S., Zaheer A. Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 216, <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00216>.
- Быков В.Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток. *Морфология* 1999; 115(2): 64–72.
- Bykov V.L. Secretory mechanisms and secretory products of mast cells. *Morfologiya* 1999; 115(2): 64–72.
- 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, <https://doi.org/10.1111/imr.12634>.
- Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(7): 478–494, <https://doi.org/10.1038/nri3690>.
- Frossi B., Mion F., Sibilano R., Danelli L., Pucillo C.E.M. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev* 2018; 282(1): 35–46, <https://doi.org/10.1111/imr.12636>.
- Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 66(3): 289–302, <https://doi.org/10.1111/apm.1966.66.3.289>.
- Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 66(3): 303–312, <https://doi.org/10.1111/apm.1966.66.3.303>.
- Féger F., Varadaradjalou S., Gao Z., Abraham S.N., Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol* 2002; 23(3): 151–158, [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)02156-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)02156-1).
- Church M.K., Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(2): 155–160, [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)70089-7](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)70089-7).
- Dvorak A.M. Ultrastructural studies of human basophils

- and mast cells. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(9): 1043–1070, <https://doi.org/10.1369/jhc.5R6647.2005>.
25. Humphries D.E., Wong G.W., Friend D.S., Gurish M.F., Qiu W.T., Huang C., Sharpe A.H., Stevens R.L. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 1999; 400(6746): 769–772, <https://doi.org/10.1038/23481>.
26. Гусельникова В.В., Бекоева С.А., Коржевская В.Ф., Фёдорова Е.А., Коржевский Д.Э. Гистохимическая и иммуногистохимическая идентификация тучных клеток миокарда человека. *Морфология* 2015; 147(1): 80–86.
- Gusel'nikova V.V., Bekoyeva S.A., Korzhevskaya V.F., Fyodorova Y.A., Korzhevskiy D.E. Histochemical and immunohistochemical identification of human myocardial mast cells. *Morfologiya* 2015; 147(1): 80–86.
27. Фёдорова Е.А., Григорьев И.П., Сырцова М.А., Суфияева Д.А., Новикова А.Д., Коржевский Д.Э. Выявление морфологических признаков дегрануляции тучных клеток сосудистого сплетения головного мозга человека с использованием различных методов окраски и иммуногистохимии. *Морфология* 2018; 153(2): 70–75.
- Fyodorova Ye.A., Grigoriyev I.P., Syrtzova M.A., Sufiyeva D.A., Novikova A.D., Korzhevskiy D.E. Detection of morphological signs of mast cell degranulation in the human choroid plexus using different staining methods and immunohistochemistry. *Morfologiya* 2018; 153(2): 70–75.
28. Fedorova E.A., Sufieva D.A., Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Mast cells of the human pineal gland. *Adv Gerontol* 2019; 9(1): 62–66, <https://doi.org/10.1134/s2079057019010053>.
29. Atiakshin D., Samoilova V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. *Histochem Cell Biol* 2017; 147(6): 683–694, <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1547-7>.
30. Beil W.J., Schulz M., McEuen A.R., Buckley M.G., Walls A.F. Number, fixation properties, dye-binding and protease expression of duodenal mast cells: comparisons between healthy subjects and patients with gastritis or Crohn's disease. *Histochem J* 1997; 29(10): 759–773, <https://doi.org/10.1023/a:1026421303260>.
31. Buckley M., Walls A.F. Identification of mast cells and mast cell subpopulations. *Methods Mol Med* 2008; 138: 285–297, [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0_24).
32. Wingren U., Enerbäck L. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan. *Histochem J* 1983; 15(6): 571–582, <https://doi.org/10.1007/bf01954148>.
33. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997; 61(3): 233–245, <https://doi.org/10.1002/jlb.61.3.233>.
34. Luna L.G. *Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts*. Gaithersburg, MD: American Histolabs Inc., Publishing Division; 1992; p. 311–312.
35. Hamouzova P., Cizek P., Bartoskova A., Novotny R. Different fixative solutions in the detection of mast cells in the canine and feline reproductive organs. *Folia Morphol (Warsz)* 2020; 79(2): 265–271, <https://doi.org/10.5603/fm.a2019.0097>.
36. Kolset S.O., Prydz K., Pejler G. Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 2004; 379(2): 217–227, <https://doi.org/10.1042/bj20031230>.
37. Duelli A., Rönnerberg E., Waern I., Ringvall M., Kolset S.O., Pejler G. Mast cell differentiation and activation is closely linked to expression of genes coding for the serglycin proteoglycan core protein and a distinct set of chondroitin sulfate and heparin sulfotransferases. *J Immunol* 2009; 183(11): 7073–7083, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900309>.
38. Frangogiannis N.G., Burns A.R., Michael L.H., Entman M.L. Histochemical and morphological characteristics of canine cardiac mast cells. *Histochem J* 1999; 31(4): 221–229, <https://doi.org/10.1023/a:1003541332070>.
39. Matsson L. Presence of mast cells in various oral mucosal sites in juvenile and adult rats. *Scand J Dent Res* 1993; 101(5): 292–298, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1993.tb01123.x>.
40. Broome M., Villarreal B. Differential staining of mast cells with toluidine blue. *J Histotechnol* 2012; 35(1): 27–30, <https://doi.org/10.1179/2046023611y.0000000006>.
41. Xu L.R., Carr M.M., Bland A.P., Hall G.A. Histochemistry and morphology of porcine mast cells. *Histochem J* 1993; 25(7): 516–522, <https://doi.org/10.1007/bf00159288>.
42. Valchanov K.P., Proctor G.B., Hartley R.H., Paterson K.L., Shori D.K. Enzyme histochemistry of rat mast cell tryptase. *Histochem J* 1998; 30(2): 97–103, <https://doi.org/10.1023/a:1003231000051>.
43. Ghanem N.S., Assem E.S.K., Leung K.B.P., Pearce F.L. Guinea pig mast cells: comparative study on morphology, fixation and staining properties. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 85(3): 351–357, <https://doi.org/10.1159/000234531>.
44. Markey A.C., Churchill L.J., MacDonald D.M. Human cutaneous mast cells — a study of fixative and staining reactions in normal skin. *Br J Dermatol* 1989; 120(5): 625–631, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1989.tb01347.x>.
45. Bandara G., Metcalfe D.D., Kirshenbaum A.S. Growth of human mast cells from bone marrow and peripheral blood-derived CD34<sup>+</sup> pluripotent hematopoietic cells. *Methods Mol Biol* 2015; 1220: 155–162, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_10).
46. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 156–165, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>.
47. Gusel'nikova V.V., Sukhorukova E.G., Fedorova E.A., Polevshchikov A.V., Korzhevskii D.E. A method for the simultaneous detection of mast cells and nerve terminals in the thymus in laboratory mammals. *Neurosci Behav Physiol* 2015; 45(4): 371–374, <https://doi.org/10.1007/s11055-015-0084-x>.
48. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология* 2006; 129(1): 85–86.
- Korzhevskii D.E., Grigorev I.P., Otellin V.A. Application of zinc-containing dehydrating fixatives for neurohistological studies. *Morfologiya* 2006; 129(1): 85–86.
49. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gilerovich E.G., Petrova E.S., Kirik O.V., Grigor'ev I.P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Neurosci Behav Physiol* 2014; 44(5): 542–545, <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9948-8>.
50. Петрова Е.С., Колос Е.А., Чумасов Е.И. Исследование тучных клеток в поджелудочной железе молодых и стареющих крыс. *Международный вестник ветеринарии* 2018; 1: 54–59.

- Petrova E.S., Kolos E.A., Chumasov E.I. Comparative study of the mast cells in the pancreas of young and aged rats. *Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii* 2018, 1: 54–59.
51. Сергеева Е.С., Гусельникова В.В., Ермолаева Л.А., Беликов А.В., Федотов Д.Ю., Суфиева Д.А., Семьяшкина Ю.В., Антропова М.М., Коржевский Д.Э. Участие миофибробластов и тучных клеток в процессе восстановления слизистой оболочки ротовой полости после лазерного фракционного воздействия. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2019; 8(1): 59–67, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-59-67>.
- Sergeeva E.S., Gusel'nikova V.V., Ermolaeva L.A., Belikov A.V., Fedotov D.Yu., Sufieva D.A., Semyashkina Yu.V., Antropova M.M., Korzhevskii D.E. The role of myofibroblasts and mast cells in oral mucosa repair after fractional laser treatment. *Zurnal anatomii i gistopatologii* 2019; 8(1): 59–67, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-59-67>.
52. Rieger J., Twardziok S., Huenigen H., Hirschberg R.M., Plendl J. Porcine intestinal mast cells. Evaluation of different fixatives for histochemical staining techniques considering tissue shrinkage. *Eur J Histochem* 2013; 57(3): e21, <https://doi.org/10.4081/ejh.2013.e21>.
53. Leclere M., Desnoyers M., Beauchamp G., Lavoie J.P. Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Intern Med* 2006; 20(2): 377–381, [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[377:cofsmf\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[377:cofsmf]2.0.co;2).
54. Enerbäck L. Berberine sulphate binding to mast cell polyanions: a cytofluorometric method for the quantitation of heparin. *Histochemistry* 1974; 42(4): 301–313, <https://doi.org/10.1007/bf00492678>.
55. Chen X.J., Enerbäck L. Immature peritoneal mast cells in neonatal rats express the CTMC phenotype, as well as functional IgE receptors. *APMIS* 1999; 107(10): 957–965, <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01497.x>.
56. Feyerabend T.B., Hausser H., Tietz A., Blum C., Hellman L., Straus A.H., Takahashi H.K., Morgan E.S., Dvorak A.M., Fehling H.J., Rodewald H.R. Loss of histochemical identity in mast cells lacking carboxypeptidase A. *Mol Cell Biol* 2005; 25(14): 6199–6210, <https://doi.org/10.1128/mcb.25.14.6199-6210.2005>.
57. Galli S.J. New insights into “the riddle of the mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; 62(1): 5–33.
58. Janicki J.S., Brower G.L., Levick S.P. The emerging prominence of the cardiac mast cell as a potent mediator of adverse myocardial remodeling. *Methods Mol Biol* 2015; 1220: 121–139, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_8).
59. Becker A.B., Chung K.F., McDonald D.M., Lazarus S.C., Frick O.L., Gold W.M. Mast cell heterogeneity in dog skin. *Anat Rec* 1985; 213(4): 477–531, <https://doi.org/10.1002/ar.1092130402>.
60. Ворончихин П.А., Сырцова М.А., Талантов С.В., Ерохина И.Л., Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Оковитый С.В., Куликов А.В. Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы. *Биомедицина* 2013; 1(2): 42–51.
- Voronchikhin P.A., Syrtcova M.A., Talantov S.V., Erokhina I.L., Korzhevskiy D.E., Sukhorukova E.G., Okovityy S.V., Kulikov A.V. Effect of metoprolol and bisoprolol on the course of experimental bronchial asthma. *Biomedicina* 2013; 1(2): 42–51.
61. Yang B., Yu S., Cui Y., He J., Jin X., Wang R. Morphological analysis of the lung of neonatal yak. *Anat Histol Embryol* 2010; 39(2): 138–151, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2009.00988.x>.
62. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г. Гистохимические методы окрашивания гистологических препаратов. В кн.: Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Григорьев И.П. *Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии*. СПб: СпецЛит; 2013; с. 85–96.
- Korzhevskiy D.E., Sukhorukova E.G. Gistokhimicheskie metody okrashivaniya gistologicheskikh preparatov. V kn.: Korzhevskiy D.E., Gilerovich E.G., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Grigor'ev I.P. *Morfologicheskaya diagnostika. Podgotovka materiala dlya gistologicheskogo issledovaniya i elektronnoy mikroskopii* [Histochemical methods of staining histological preparations. In: Korzhevskiy D.E., Gilerovich E.G., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Grigor'ev I.P. Morphological diagnostics. Preparation of material for histological examination and electron microscopy]. Saint Petersburg: SpetsLit; 2013; p. 85–96.
63. Blaies D.M., Williams J.F. A simplified method for staining mast cells with astra blue. *Stain Technol* 1981; 56(2): 91–94, <https://doi.org/10.3109/10520298109067288>.
64. Sharma R., Saxena S. Comparative study of the presence of mast cells in periapical granulomas and periapical cysts by toluidine blue and astra blue: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1): 59–63, [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(03\)00378-0](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(03)00378-0).
65. Атякшин Д.А., Бурцева А.С., Соколов Д.А. Оценка эффективности выявления тучных клеток в тощей кишке монгольских песчанок с помощью гистохимических методов. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2016; 5(4): 85–89, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2016-5-4-85-89>.
- Atyakshin D.A., Burtseva A.S., Sokolov D.A. Evaluation of the effectiveness of mast cells detection in mongolian gerbils jejunum mucosa using histochemical methods. *Zurnal anatomii i gistopatologii* 2016; 5(4): 85–89, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2016-5-4-85-89>.
66. Атякшин Д.А., Герасимова О.А., Мешкова В.Ю., Самодурова Н.Ю., Самойленко Т.В., Шишкина В.В. Новый гистохимический подход для оценки экспрессии триптазы в популяции тучных клеток. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2020; 9(3): 94–101, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2020-9-3-94-101>.
- Atyakshin D.A., Gerasimova O.A., Meshkova V.Yu., Samodurova N.Yu., Samoilenko T.V., Shishkina V.V. Novel histochemical approach for evaluation of tryptase expression in the mast cell population. *Zurnal anatomii i gistopatologii* 2020; 9(3): 94–101, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2020-9-3-94-101>.
67. Mutsaddi S., Kotrashetti V.S., Nayak R.S., Pattanshetty S.M. Comparison of histochemical staining techniques for detecting mast cells in oral lesions. *Biotech Histochem* 2019; 94(6): 459–468, <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1597986>.
68. Al-Zghoul M.B., Al-Rukibat R.K., Alghadi M., Caceci T., Bani Ismail Z. Distribution and density of mast cells in camel small intestine and influence of fixation techniques. *Eur J Histochem* 2008; 52(4): 237–241, <https://doi.org/10.4081/1222>.
69. Matin R., Tam E.K., Nadel J.A., Caughey G.H.

Distribution of chymase-containing mast cells in human bronchi. *J Histochem Cytochem* 1992; 40(6): 781–786, <https://doi.org/10.1177/40.6.1588024>.

70. Kube P., Audigé L., Küther K., Welle M. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochem Cell Biol* 1998; 110(2): 129–135, <https://doi.org/10.1007/s004180050274>.

71. Simoes J.P.C., Schoning P., Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol* 1994; 31(6): 637–647, <https://doi.org/10.1177/030098589403100602>.

72. Menétrey D., Dubayle D. A one-step dual-labeling method for antigen detection in mast cells. *Histochem Cell Biol* 2003; 120(5): 435–442, <https://doi.org/10.1007/s00418-003-0581-9>.

73. Takahashi N., Tarumi W., Hamada N., Ishizuka B., Itoh M.T. Cresyl violet stains mast cells selectively: its application to counterstaining in immunohistochemistry. *Zool Sci* 2017; 34(2): 147–150, <https://doi.org/10.2108/zs160162>.

74. Joseph S., Das S., Chand R., Roopa R., Thomas I.M. Comparison of toluidine blue vs thionin for mast cells in rat mesentery using Carnoy's fixative. *J Anat Soc India* 2003; 52(2): 166–167.

75. Zhou Y., Pan P., Yao L., Su M., He P., Niu N., McNutt M.A., Gu J. CD117-positive cells of the heart: progenitor cells or mast cells? *J Histochem Cytochem* 2010; 58(4): 309–316, <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.955146>.

76. Атякшин Д.А. Гистохимические подходы к оценке участия в регуляции состояния волокнистого компонента межклеточного матрикса соединительной ткани кожи. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2018; 7(3): 100–112, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-3-100-112>.

Atyakshin D.A. Histochemical approaches to the evaluation of the participation of mast cells in the regulation of the fibrous component of the intercellular matrix of skin connective tissue. *Zurnal anatomii i gistopatologii* 2018; 7(3): 100–112, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-3-100-112>.

77. Hals E. Some methods for fluorochromation and staining of rat mast cells with basic dyes. *Eur J Oral Sci* 1970; 78(1–4): 301–310, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1970.tb02077.x>.

78. Abdalkhani A., Sellers R., Gent J., Wulitich H., Childress S., Stein B., Boissy R.E., Wysolmerski J.J., Foley J. Nipple connective tissue and its development: insights from the K14-PTHrP mouse. *Mech Dev* 2002; 115(1–2): 63–77, [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00092-8](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00092-8).

79. Шубич М.Г. Новая методика элективного окрашивания тучных клеток. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1958; 46(12): 110.

Shubich M.G. A new selective method of staining mast cells. *Byulleten eksperimentalnoi biologii i meditsiny* 1958; 46(12): 110.

80. Atanasova D., Dandov A., Kirov T., Lazarov N. Mast cells in the rat carotid body. *Acta Morphol Anthropol* 2018; 25(1–2): 11–15.

81. Spatz M. Bismarck brown as a selective stain for mast cells. *Am J Clin Pathol* 1960; 34(3): 285–287, [https://doi.org/10.1093/ajcp/34.3\\_ts.285](https://doi.org/10.1093/ajcp/34.3_ts.285).

82. Florenzano F., Bentivoglio M. Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat thalamus: a light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *J Comp Neurol* 2000; 424(4): 651–669, [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000904\)424:4<651::aid-cne7>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000904)424:4<651::aid-cne7>3.0.co;2-g).

83. Krüger P.G., Bø L., Myhr K.M., Karlsen Å.E., Taule A., Nyland H.I., Mørk S. Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedures. *Acta Neurol Scand* 1990; 81(1): 31–36, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1990.tb00927.x>.

84. Tomasi V.H., Orrea S.C., Raimondi A.R., Itoiz M.E. A new technique for staining mast cells using ferroin. *Biotech Histochem* 2003; 78(5): 255–259, <https://doi.org/10.1080/10520290310501630458>.

85. Shukla S.A., Veerappan R., Whittimore J.S., Ellen Miller L., Youngberg G.A. Mast cell ultrastructure and staining in tissue. *Methods Mol Biol* 2006; 315: 63–76, <https://doi.org/10.1385/1-59259-967-2-063>.

86. Reber L.L., Sibilano R., Starkl P., Roers A., Grimbaldston M.A., Tsai M., Gaudenzio N., Galli S.J. Imaging protective mast cells in living mice during severe contact hypersensitivity. *JCI Insight* 2017; 2(9): e92900, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92900>.

87. Rozniecki J.J., Dimitriadou V., Lambrecht-Hall M., Pang X., Theoharides T.C. Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell–neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Res* 1999; 849(1–2): 1–15, [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01855-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01855-7).

88. Stefanov I.S., Vodenicharov A.P., Tsandev N.S., Sevrieva D. Histochemical study of heparin-positive mast cells in the terminal part of porcine ductus choledochus and papilla duodeni major. *Anat Histol Embryol* 2015; 45(5): 386–391, <https://doi.org/10.1111/ahe.12207>.

89. Vodenicharov A., Tsandev N., Kostadinov G., Stefanov I. Comparative study of heparin- and toluidine blue positive mast cells in porcine lumbar spinal ganglia. *Bulg J Vet Med* 2018; 21(4): 391–396, <https://doi.org/10.15547/bjvm.1090>.

90. Harem M.K., Liman N. Histochemical method for demonstrating quail mast cell types simultaneously. *Biotech Histochem* 2009; 84(6): 275–282, <https://doi.org/10.3109/10520290902991394>.

91. Kett W.C., Osmond R.I., Moe L., Skett S.E., Kinnear B.F., Coombe D.R. Avidin is a heparin-binding protein. Affinity, specificity and structural analysis. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1620(1–3): 225–234, [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00539-1).

92. Zhang Y., Ramos B.F., Jakschik B.A. Augmentation of reverse arthus reaction by mast cells in mice. *J Clin Invest* 1991; 88(3): 841–846, <https://doi.org/10.1172/jci115385>.

93. Folkerts J., Gaudenzio N., Maurer M., Hendriks R.W., Stadhouders R., Tam S.Y., Galli S.J. Rapid identification of human mast cell degranulation regulators using functional genomics coupled to high-resolution confocal microscopy. *Nat Protoc* 2020; 15(3): 1285–1310, <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0288-6>.

94. Joulia R., L'Faqihi F.E., Valitutti S., Espinosa E. IL-33 fine tunes mast cell degranulation and chemokine production at the single-cell level. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(2): 497–509.E10, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.049>.

95. Weidner N., Austen K.F. 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* 1993; 189(2): 156–162, [https://doi.org/10.1016/s0344-0338\(11\)80086-5](https://doi.org/10.1016/s0344-0338(11)80086-5).

96. Jones C.J.P., Mosley S.M., Jeffrey I.J.M., Stoddart R.W. Elimination of the non-specific binding of avidin to tissue

- sections. *Histochem J* 1987; 19(5): 264–268, <https://doi.org/10.1007/bf01675685>.
97. Spirkoski J., Melo F.R., Grujic M., Calounova G., Lundequist A., Wernersson S., Pejler G. Mast cell apoptosis induced by siramesine, a sigma-2 receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 2012; 84(12): 1671–1680, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.028>.
98. Ivanova S., Repnik U., Bojic L., Petelin A., Turk V., Turk B. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol* 2008; 442: 183–199, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(08\)01409-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(08)01409-2).
99. Williams R.M., Webb W.W. Single granule pH cycling in antigen-induced mast cell secretion. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 21: 3839–3850.
100. Pejler G., Rönnerberg E., Waern I., Wernersson S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 2010; 115(24): 4981–4990, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-257287>.
101. Irani A.M., Schwartz L.B. Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy* 1989; 19(2): 143–155, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1989.tb02357.x>.
102. Miller H.R.P., Pemberton A.D. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* 2002; 105(4): 375–390, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01375.x>.
103. Lützelshwab C., Pejler G., Aveskogh M., Hellman L. Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J Exp Med* 1997; 185(1): 13–29, <https://doi.org/10.1084/jem.185.1.13>.
104. 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, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207826>.
105. Zhongwei Y., Akula S., Fu Z., de Garavilla L., Kervinen J., Thorpe M., Hellman L. Extended cleavage specificities of rabbit and guinea pig mast cell chymases: two highly specific Leu-ases. *Int J Mol Sci* 2019; 20(24): 6340, <https://doi.org/10.3390/ijms20246340>.
106. Huntley J.F., Newlands G.F., Gibson S., Ferguson A., Miller H.R. Histochemical demonstration of chymotrypsin like serine esterases in mucosal mast cells in four species including man. *J Clin Pathol* 1985; 38(4): 375–384, <https://doi.org/10.1136/jcp.38.4.375>.
107. Farrugia B.L., Whitelock J.M., O'Grady R., Caterson B., Lord M.S. Mast cells produce a unique chondroitin sulfate epitope. *J Histochem Cytochem* 2016; 64(2): 85–98, <https://doi.org/10.1369/0022155415620649>.
108. Wolters P.J., Pham C.T., Muilenburg D.J., Ley T.J., Caughey G.H. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem* 2001; 276(21): 18551–18556, <https://doi.org/10.1074/jbc.m100223200>.
109. Noviana D., Kono F., Nagakui Y., Shimizu H., Mamba K., Makimura S., Horii Y. Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochem J* 2001; 33(11–12): 597–603, <https://doi.org/10.1023/a:1016324515108>.
110. Algermissen B., Bauer F., Schadendorf D., Kropp J.D., Czarnetzki B.M. Analysis of mast cell subpopulations (MCT, MCTC) in cutaneous inflammation using novel enzyme-histochemical staining techniques. *Exp Dermatol* 1994; 3(6): 290–297, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1994.tb00291.x>.
111. Buckley M.G., McEuen A.R., Walls A.F. The detection of mast cell subpopulations in formalin-fixed human tissues using a new monoclonal antibody specific for chymase. *J Pathol* 1999; 189(1): 138–143, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199909\)189:1<138::aid-path400>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<138::aid-path400>3.0.co;2-h).
112. Атякшин Д.А., Аралова М.В., Глухов А.А. Молекулярно-биологические особенности секретома тучных клеток кожи нижних конечностей при формировании трофических язв различной этиологии. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2019; 8(1): 14–24, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-14-24>.
- Атыакшин Д.А., Аралова М.В., Глухов А.А. Molecular biological peculiarities of the mast cells secretome of the lower limb skin in trophic ulcers of various etiologies. *Zurnal anatomii i gistopatologii* 2019; 8(1): 14–24, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-14-24>.
113. Енькова Е.В., Атякшин Д.А., Гайская О.В., Хоперская О.В. Оценка популяции тучных клеток децидуальной ткани и статуса витамина D у женщин с неразвивающейся беременностью в эмбриональном периоде. *Вестник новых медицинских технологий* 2018; 25(3): 21–27, <https://doi.org/10.24411/1609-2163-2018-16141>.
- Enkova E.V., Atiakshin D.A., Gaiskaya O.V., Hoperskaya O.V. Evaluation of the population of the mast cells of the decidual tissue and the status of vitamin D in women with undeveloped pregnancy in the embryonic period. *Vestnik novykh medicinskih tehnologij* 2018; 25(3): 21–27, <https://doi.org/10.24411/1609-2163-2018-16141>.
114. Yamada M., Ueda M., Naruko T., Tanabe S., Han Y.S., Ikura Y., Ogami M., Takai S., Miyazaki M. Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int* 2001; 59(4): 1374–1381, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590041374.x>.
115. Yao L., Baltatzis S., Zafirakis P., Livir-Rallatos C., Voudouri A., Markomichelakis N., Zhao T., Foster C.S. Human mast cell subtypes in conjunctiva of patients with atopic keratoconjunctivitis, ocular cicatricial pemphigoid and Stevens–Johnson syndrome. *Ocul Immunol Inflamm* 2003; 11(3): 211–222, <https://doi.org/10.1076/ocii.11.3.211.17353>.
116. Beil W.J., Pammer J. In situ detection of the mast cell proteases chymase and tryptase in human lung tissue using light and electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 2001; 116(6): 483–493, <https://doi.org/10.1007/s00418-001-0339-1>.
117. Solari V., Unemoto K., Piaseczna Piotrowska A., Puri P. Increased expression of mast cells in reflux nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2004; 19(2): 157–163, <https://doi.org/10.1007/s00467-003-1323-x>.
118. Walls A.F., Amalinei C. Detection of mast cells and basophils by immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 2020; 2163: 263–280, [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0696-4\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0696-4_22).
119. Grandi D., Massi M., Morini G. Long-term peripheral infusion of nociceptin/orphanin FQ promotes hyperplasia, activation and migration of mucosal mast cells in the rat gastric fundus. *Peptides* 2011; 32(4): 729–736, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.012>.
120. Korkmaz O.T., Tunçel N., Oncü E.M., Şahintürk V., Çelik M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells. *J Mol Neurosci* 2010; 41(2): 278–287, <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9307-3>.

121. Lennartsson J., Rönstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* 2012; 92(4): 1619–1649, <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>.
122. Patel N., Mohammadi A., Rhatigan R. A comparative analysis of mast cell quantification in five common dermatoses: lichen simplex chronicus, psoriasis, lichen planus, lupus, and insect bite/allergic contact dermatitis/nummular dermatitis. *ISRN Dermatol* 2012; 2012: 759630, <https://doi.org/10.5402/2012/759630>.
123. Kotov G., Landzhov B., Stamenov N., Stanchev S., Iliev A. Changes in the number of mast cells, expression of fibroblast growth factor-2 and extent of interstitial fibrosis in established and advanced hypertensive heart disease. *Ann Anat* 2020; 232: 151564, <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2020.151564>.
124. Атыкшин Д.А., Никитюк Д.Б., Ключкова С.В., Алексеева Н.Т., Бурцева А.С. Участие тучных клеток в адаптации желудка монгольских песчанок к гравитационному фактору. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2018; 7(1): 14–26, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-1-14-26>.
- Atyakshin D.A., Nikityuk D.B., Klochkova S.V., Alexeeva N.T., Burtseva A.S. The participation of mast cells in adaptation of the stomach of mongolian gerbils to the gravitational factor. *Zurnal anatomii i gistopatologii* 2018; 7(1): 14–26, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-1-14-26>.
125. Qi J.C., Li L., Li Y., Moore K., Madigan M.C., Katsoulotos G., Krilis S.A. An antibody raised against in vitro-derived human mast cells identifies mature mast cells and a population of cells that are FcεRI<sup>+</sup>, tryptase<sup>-</sup>, and chymase<sup>-</sup> in a variety of human tissues. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(5): 643–653, <https://doi.org/10.1177/002215540305100510>.
126. Arber D.A., Tamayo R., Weiss L.M. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998; 29(5): 498–504, [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(98\)90066-1](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(98)90066-1).
127. Lammie A., Drobnjak M., Gerald W., Saad A., Cote R., Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(11): 1417–1425, <https://doi.org/10.1177/42.11.7523489>.
128. Miettinen M., Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13(3): 205–220, <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000173054.83414.22>.
129. Ribatti D. The staining of mast cells: a historical overview. *Int Arch Allergy Immunol* 2018; 176(1): 55–60, <https://doi.org/10.1159/000487538>.
130. Medinger M., Kleinschmidt M., Mross K., Wehmeyer B., Unger C., Schaefer H.E., Weber R., Azemar M. c-kit (CD117) expression in human tumors and its prognostic value: an immunohistochemical analysis. *Pathol Oncol Res* 2010; 16(3): 295–301, <https://doi.org/10.1007/s12253-010-9247-9>.
131. Pilloni L., Bianco P., Difelice E., Cabras S., Castellanos M.E., Atzori L., Ferrelì C., Mulas P., Nemolato S., Faa G. The usefulness of c-Kit in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions. *Eur J Histochem* 2011; 55(2): e20, <https://doi.org/10.4081/ejh.2011.e20>.
132. Sailasuta A., Ketpun D., Piyaviriyakul P., Theerawatanasirikul S., Theewasutrakul P., Rungsipipat A. The relevance of CD117-immunocytochemistry staining patterns to mutational exon-11 in c-kit detected by PCR from fine-needle aspirated canine mast cell tumor cells. *Vet Med Int* 2014; 2014: 787498, <https://doi.org/10.1155/2014/787498>.
133. Andersson C.K., Bergqvist A., Mori M., Mauad T., Bjermer L., Erjefält J.S. Mast cell-associated alveolar inflammation in patients with atopic uncontrolled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(4): 905–912.E127, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.022>.
134. Stone K.D., Prussin C., Metcalfe D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2): S73–S80, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>.
135. Ying S., Barata L.T., Meng Q., Grant J., Barkans J., Durham S.R., Kay A.B. High-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI)-bearing eosinophils, mast cells, macrophages and Langerhans' cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Immunology* 1998; 93(2): 281–288, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00418.x>.
136. Johansson O., Virtanen M., Hilliges M., Yang Q. Histamine immunohistochemistry: a new and highly sensitive method for studying cutaneous mast cells. *Histochem J* 1992; 24(5): 283–287, <https://doi.org/10.1007/bf01046843>.
137. Manning K.A., Pienkowski T.P., Uhlrich D.J. Histaminergic and non-histamine-immunoreactive mast cells within the cat lateral geniculate complex examined with light and electron microscopy. *Neuroscience* 1994; 63(1): 191–206, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90016-7).
138. Mallett C.L., Northrup N.C., Saba C.F., Rodriguez C.O., Rassnick K.M., Gieger T.L., Childress M.O., Howerth E.W. Immunohistochemical characterization of feline mast cell tumors. *Vet Pathol* 2013; 50(1): 106–109, <https://doi.org/10.1177/0300985812441032>.
139. Alcañiz L., Vega A., Chacón P., El Bekay R., Ventura I., Aroca R., Blanca M., Bergstralh D.T., Monteseirín J. Histamine production by human neutrophils. *FASEB J* 2013; 27(7): 2902–2910, <https://doi.org/10.1096/fj.12-223867>.
140. Walker A.K., Park W.M., Chuang J.C., Perello M., Sakata I., Osborne-Lawrence S., Zigman J.M. Characterization of gastric and neuronal histaminergic populations using a transgenic mouse model. *PLoS One* 2013; 8(3): e60276, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060276>.
141. Stead R.H., Perdue M.H., Blennerhassett M.G., Kakuta Y., Sestini P., Bienenstock J. The innervation of mast cells. In: *The neuroendocrine-immune network*. Freier S. (editor). Boca Raton: CRC Press; 1990; p. 19–37.
142. Fernandez N.J., West K.H., Jackson M.L., Kidney B.A. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Vet Pathol* 2005; 42(4): 437–445, <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-437>.
143. Michaloudi H.C., Papadopoulos G.C. Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. *J Anat* 1999; 195(4): 577–586, <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19540577.x>.
144. Wilhelm M. Neuro-immune interactions in the dove brain. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172(1): 173–180, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.03.018>.
145. Berger M., Gray J.A., Roth B.L. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; 60: 355–366, <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>.
146. Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M., Queiroz D.B., Padilla P., Avellar M.C., Manzano P.R., Manjarrez-Gutiérrez G., Gutiérrez-Ospina G. Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies.



*J Androl* 2007; 28(1): 136–149, <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000653>.

**147.** Livermore S., Zhou Y., Pan J., Yeger H., Nurse C.A., Cutz E. Pulmonary neuroepithelial bodies are polymodal airway sensors: evidence for CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sensing. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308(8): L807–L815, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00208.2014>.

**148.** Pai V.P., Marshall A.M. Intraluminal volume homeostasis: a common serotonergic mechanism among diverse epithelia. *Commun Integr Biol* 2011; 4(5): 532–537.

**149.** Okamoto T., Barton M.J., Hennig G.W., Birch G.C., Grainger N., Corrigan R.D., Koh S.D., Sanders K.M., Smith T.K. Extensive projections of myenteric serotonergic neurons suggest they comprise the central processing unit in the colon. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26(4): 556–570, <https://doi.org/10.1111/nmo.12302>.

**150.** Okaty B.W., Commons K.G., Dymecki S.M. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat Rev Neurosci* 2019; 20(7): 397–424, <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>.

**151.** Pan H.R., Tian M., Xue J.B., Li S.M., Luo X.C., Huang X., Chen Z.H., Huang L. Mammalian taste bud cells utilize extragemmal 5-hydroxy-L-tryptophan to biosynthesize the neurotransmitter serotonin. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 461, <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00461>.

**152.** Yokoyama T., Misuzu Y.Y., Yamamoto Y. Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter in the carotid body of the rat. *Histochem Cell Biol* 2012; 140(2): 147–155, <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1066-5>.

**153.** Ranzil S., Ellery S., Walker D.W., Vaillancourt C., Alfaidy N., Bonnin A., Borg A., Wallace E.M., Ebeling P.R., Erwich J.J., Murthi P. Disrupted placental serotonin synthetic pathway and increased placental serotonin: potential implications in the pathogenesis of human fetal growth restriction. *Placenta* 2019; 84: 74–83, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.05.012>.

**154.** He W., Wang X.Y., Shi H., Bai W.Z., Cheng B., Su Y.S., Yu X.C., Jing X.H., Zhu B. Cutaneous neurogenic inflammation in the sensitized acupoints induced by gastric mucosal injury in rats. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 141, <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1580-z>.

**155.** Slominski A.T., Kim T.K., Kleszczyński K., Semak I., Janjetovic Z., Sweatman T., Skobowiat C., Steketee J.D., Lin Z., Postlethwaite A., Li W., Reiter R.J., Tobin D.J. Characterization of serotonin and N-acetylserotonin systems in the human epidermis and skin cells. *J Pineal Res* 2020; 68(2): e12626, <https://doi.org/10.1111/jpi.12626>.

**156.** Maeda T., Miura Y., Fukuda K., Hayashi S., Kurosaka M. Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Mol Med Rep* 2015; 12(4): 5191–5196, <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4097>.

**157.** Ni W., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(7): 575–583, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04410.x>.

**158.** Craig S.S., Irani A.M., Metcalfe D.D., Schwartz L.B. Ultrastructural localization of heparin to human mast cells of the MCTC and MCT types by labeling with antithrombin III-gold. *Lab Invest* 1993; 69(5): 552–561.

**159.** Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Идентификация тучных клеток в гистологическом препарате. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2019; 12(1): 97–100, <https://doi.org/10.17513/mjpf.12961>.

Shurygina I.A., Shurygin M.G. Mast cell identification method for histological study. *Mezhdunarodnyj zurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij* 2019; 12(1): 97–100, <https://doi.org/10.17513/mjpf.12961>.

**160.** Cárdenas-Rivera A., Campero-Romero A.N., Heras-Romero Y., Penagos-Puig A., Rincón-Heredia R., Tovar-Y-Romo L.B. Early post-stroke activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 hinders the receptor 1-dependent neuroprotection afforded by the endogenous ligand. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 270, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00270>.

**161.** Fehrenbach H., Haase M., Kasper M., Koslowski R., Schuh D., Müller M. Alterations in the immunohistochemical distribution patterns of vascular endothelial growth factor receptors Flk1 and Flt1 in bleomycin-induced rat lung fibrosis. *Virchows Arch* 1999; 435(1): 20–31, <https://doi.org/10.1007/s004280050390>.

**162.** Leplina O., Smetanenko E., Tikhonova M., Batorov E., Tyrinova T., Pasma N., Ostanin A., Chernykh E. Binding of the placental growth factor to VEGF receptor type 1 modulates human T cell functions. *J Leukoc Biol* 2020; 108(3): 1013–1024, <https://doi.org/10.1002/jlb.2a0420-723rr>.

**163.** Scarpellini F., Klinger F.G., Rossi G., Sbracia M. Immunohistochemical study on the expression of G-CSF, G-CSFR, VEGF, VEGFR-1, Foxp3 in first trimester trophoblast of recurrent pregnancy loss in pregnancies treated with G-CSF and controls. *Int J Mol Sci* 2019; 21(1): 285, <https://doi.org/10.3390/ijms21010285>.

**164.** Тырсина Е.Г., Никулицкий С.И., Иншаков А.Н., Рябая О.О. VEGF-R1 как потенциальная молекулярная мишень для противоопухолевой терапии. *Доклады Академии наук* 2018; 478(2): 236–239, <https://doi.org/10.7868/s086956521802024x>.

Tyrsina E.G., Nikulitskiy S.I., Inshakov A.N., Ryabaya O.O. VEGF-R1 as a potential molecular target for anticancer therapy. *Doklady Akademii nauk* 2018; 478(1): 18–20, <https://doi.org/10.1134/s1607672918010052>.

**165.** Mason C.A., Carter L.M., Mandleywala K., de Souza Franca P.D., Meyer J.P., Mamun T., Backer J.M., Backer M.V., Reiner T., Lewis J.S. Imaging early-stage metastases using an <sup>18</sup>F-labeled VEGFR-1-specific single chain VEGF mutant. *Mol Imaging Biol* 2021; 23(3): 340–349, <https://doi.org/10.1007/s11307-020-01555-z>.

**166.** Chen L.Z., Kan Y., Zhang Z.Y., Wang Y.L., Zhang X.N., Wang X.Y., He W., Jing X.H. Neuropeptide initiated mast cell activation by transcutaneous electrical acupoint stimulation of acupoint LI4 in rats. *Sci Rep* 2018; 8(1): 13921, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32048-3>.

**167.** Khalil M., Ronda J., Weintraub M., Jain K., Silver R., Silverman A.J. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Res* 2007; 1171: 18–29, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.034>.

**168.** Tikoo S., Barki N., Jain R., Zulkhernain N.S., Buhner S., Schemann M., Weninger W. Imaging of mast cells. *Immun Rev* 2018; 282(1): 58–72, <https://doi.org/10.1111/imr.12631>.