

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПРИЗНАКИ ГИБЕЛИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК АУТОТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО ЛИМФАТИЧЕСКОГО СЕРДЦА ВЗРОСЛОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*

© 2019 г. М. И. Крылова*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

**E-mail: marina.krylova51@mail.ru*

Поступила в редакцию 13.05.2019 г.

После доработки 17.06.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Лимфатические сердца лягушки – это полые пульсирующие органы 1–2 мм в диаметре, обеспечивающие перекачивание лимфы в венозную систему. В работе их использовали в качестве экспериментальной модели для изучения процессов инициации и развития асептического воспаления в поврежденных тканях и некрозоподобной гибели тучных клеток (ТК). Исследована ультраструктура поврежденных и гибнущих ТК в поперечно-полосатой мышечной ткани заднего лимфатического сердца взрослой лягушки в условиях временной ишемии (гипоксии), вызванной аутооттрансплантацией данного органа в собственное ложе. Обнаружено, что в пределах временного промежутка от 3-х сут до 6-ти нед. после аутооттрансплантации лимфатического сердца поврежденные ТК гибнут путем онкотического некроза. На ранних стадиях онкотического некроза происходит набухание клеток и их мембранных органелл (кроме цитоплазматических секреторных гранул), дилатация перинуклеарного пространства, отпочковывание от внешней ядерной мембраны пузырьков, усыпанных рибосомами, обогащение гетерохроматином ядер некоторых ТК. Для поздних стадий онкотического некроза характерен распад плазматической мембраны, выход интактных и структурно малоизмененных секреторных гранул в экстрацеллюлярное пространство, кариолизис. Присутствие предположительно ядерного материала обнаружено в расширенных перинуклеарных пространствах некоторых поврежденных и гибнущих ТК. Отмечен выход пузырьков шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР) в экстрацеллюлярное пространство в местах локального нарушения целостности плазматической мембраны еще нераспавшихся ТК. Проведенное на ультраструктурном уровне иммуоцитохимическое мечение ТК с помощью антител к гистамину, субстанции Р (SP) и предсердному натрийуретическому пептиду (ANP) выявило локализацию частиц золота как над секреторными гранулами, расположенными в цитоплазме поврежденных и гибнущих клеток, так и над гранулами, вышедшими в экстрацеллюлярное пространство после распада ТК. Данные, полученные в настоящем исследовании, позволяют предположить, что ТК, гибнущие путем онкотического некроза, могут принимать участие в инициации и развитии асептического воспалительного процесса в аутооттрансплантированном лимфатическом сердце лягушки и являться источником аларминов, способствующих развитию воспаления.

Ключевые слова: аутооттрансплантация, лимфатическое сердце, тучная клетка, онкотический некроз, асептическое воспаление, гомеостаз секреторных гранул, иммулокализация предсердного натрийуретического пептида, гистамина и субстанции Р, лягушка

DOI: 10.1134/S0041377119090074

Тучные клетки (ТК) – это многофункциональные тканевые иммунные клетки, встречающиеся во всех васкуляризованных тканях позвоночных. Обширный экспериментальный материал, полученный при изучении онтогенеза, морфологии и физиологии ТК позвоночных, собран и проанализирован в многочисленных обзорах (Metcalf et al., 1997; Vassari et al., 2011; da Silva et al., 2014 и др.). Особое внимание исследователей, как правило, уделено ТК

грызунов и человека. Так, установлен факт гематопоэтического происхождения ТК (Kitamura et al., 1977; Chen et al., 2005; Jamur et al., 2005). Много работ посвящено идентификации и характеристикам циркулирующих в крови недифференцированных коммитированных клеток-предшественников ТК (Maanika et al., 2013; Dahlin et al., 2016; Schmetzer et al., 2016). Показано, что ТК играют ключевую роль в аллергических реакциях (Galli et al., 2008; Galli, Tsai, 2012) и являются эффекторными клетками иммунной системы (Marshall et al., 2004; Galli et al., 2005; Galli, Tsai, 2010; Cardamone et al., 2016). Большое внимание уделено вовлеченности ТК в ряд хронических воспалитель-

Принятые сокращения: ТК – тучные клетки, ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум, ANP – предсердный натрийуретический пептид, SP – субстанция Р.

ных заболеваний (Theoharides et al., 2012; Bonnekoh et al., 2018; Bradding et al., 2018), а также участие ТК в процессах тканевой репарации (Noli, Miolo, 2001; Egozi et al., 2003; Wulf, Wilgus, 2013).

Известно, что ТК живут долго (от нескольких недель до нескольких месяцев) и гибнут путем апоптоза. Многие экспериментальные работы сфокусированы на выявлении механизмов регуляции апоптоза ТК как в условиях нормы, так и патологии (Metcalf et al., 1995; Mekori et al., 2001; Paivandy et al., 2017; Reinhardt et al., 2018). Гибели ТК путем некроза уделено значительно меньше внимания (Park et al., 2000; Mello et al., 2012).

Данные о ТК низших позвоночных, а именно бесхвостых амфибий, малочисленны и фрагментарны. Основные результаты экспериментальных исследований, касающиеся морфологии и функциональной активности ТК лягушки, подробно освещены в обзоре Баккари (Vaccari et al., 2011). Следует напомнить, что у лягушек с использованием методов гистохимии идентифицированы два главных подтипа ТК: соединительнотканые ТК и мукозные ТК. Исследование ультраструктуры ТК выявило тонкое строение секреторных гранул, имеющих округлую, овальную и иногда веретеновидную форму. Показано, что гранулы состоят из двух частей: электронно-плотного компонента и матрикса, обладающего низкой электронной плотностью. Электронно-плотный компонент гранул представлен преимущественно ламеллярными паракристаллиновыми структурами различной величины и формы, в то время как внутригранулярный матрикс – тонко-гранулярным или ячеистым материалом. Ультраструктура секреторных гранул лягушки уникальна, она отличается от тонкого строения гранул ТК грызунов и человека (Chieffi Vaccari et al., 1998).

В качестве дополнения хотелось бы отметить, что, в отличие от млекопитающих, в крови развивающейся и взрослой лягушки присутствуют циркулирующие дифференцированные ТК (Csaba et al., 1970; Крылова, 2009, 2010, 2016). Обнаружено, что гибель ТК во время резорбции хвоста у головастика лягушки происходит, как правило, путем некроза (Крылова, 2010). С помощью иммуноцитохимических методов продемонстрирована локализация гистамина, ANP, SP и Hsp70 в цитоплазматических секреторных гранулах ТК лягушки (Chieffi Vaccari et al., 1998; Крылова, 2006, 2010, 2016).

Морфологические и ультраструктурные признаки активации ТК лягушки были изучены в экспериментах после электрической стимуляции подъязычного нерва (Monteforte et al., 2001), повреждения периферического нервного волокна (Esposito et al., 2002), а также механического травмирования поперечно-полосатой мышечной ткани лимфатического сердца взрослой лягушки (Крылова, 2016).

Данные о форме гибели ТК у взрослой лягушки в экспериментах, связанных с повреждением того или

иного органа, в известной нам литературе отсутствуют. В свете вышесказанного, задача настоящей работы состояла в определении формы клеточной гибели, характерной для ТК взрослой лягушки. Для этого исследовали ультраструктуру поврежденных и гибнущих ТК с использованием экспериментальных моделей, связанных с аутотрансплантацией задних лимфатических сердец лягушки в собственное ложе без нанесения органу механической травмы и в сочетании с надрезанием передней стенки сердца. Метод иммуноэлектронной цитохимии был использован для выявления локализации в гранулах поврежденных и гибнущих ТК ANP-, SP- и гистамин-иммунореактивного материала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве экспериментального материала использовали задние лимфатические сердца, полученные от взрослых самцов лягушки *Rana temporaria* массой 30–40 г. Под эфирным наркозом у лягушки выделяли лимфатическое сердце (с одной стороны от копчика) и подсаживали его вновь в собственное ложе. В ряде случаев сочетали аутотрансплантацию лимфатического сердца с механическим повреждением (надрезанием) его мышечной стенки. Контролем служили лимфатические сердца неоперированных животных. Работу проводили в зимнее время на лягушках, адаптированных к комнатным условиям содержания.

Электронная микроскопия. Лимфатические сердца от 3 лягушек на каждый временной срок эксперимента фиксировали через 3, 5, 12 сут, а также 3 и 6 нед. после аутотрансплантации. Нормальные и оперированные лимфатические сердца фиксировали в течение 2 ч при 4°C в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на какодильном буфере (pH 7.4). Затем образцы постфиксировали в 1%-ном OsO₄ при 4°C в течение 1 ч, дегидратировали в этаноле возрастающей концентрации, проводили через ацетон и заключали в эпоксидную смолу Аралдит. Ультратонкие срезы (толщиной 80–100 нм) изготавливали на LKB-Ultratome III и контрастировали их растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Материал просматривали в электронном микроскопе Zeiss LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия. Для иммуноэлектронного мечения ультратонких срезов использовали материал, обработанный по стандартной методике, применяемой для электронно-микроскопических исследований. Ультратонкие срезы, изготовленные на LKB-Ultratome III, помещали на никелевые сеточки. До иммуноцитохимической обработки для увеличения гидрофильности смолы срезы выдерживали в течение 20 мин в 3%-ном растворе перекиси водорода. В качестве первичных антител использовали поликлональные антитела против ANP крысы – анти-г-ANP (1–28) (Peninsula

Lab., Inc., США), поликлональные антитела против гистамина (Abscam, Великобритания) и поликлональные антитела против SP (Peninsula Lab., Inc., США). Конечное разведение антител к ANP — 1 : 2000, антител к гистамину — 1 : 100, к SP — 1 : 1000. Вместо вторичных антител при работе с антителами к ANP использовали белок А (Sigma, США), конъюгированный с коллоидным золотом (диаметр гранул 10 нм), при рабочем разведении 1 : 20. При работе с антителами против гистамина и SP в качестве вторичных антител использовали козы антитела против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные с коллоидным золотом (диаметр частиц 10 нм) (Sigma, США) при разведении 1 : 20. Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 сут при 4°C, со вторичными антителами срезы — в течение 1 ч при комнатной температуре. Контрастировали срезы растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Материал просматривали в электронном микроскопе Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Контролем служили срезы, прошедшие обработку без применения первичных антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Задние лимфатические сердца лягушки — это небольшие полые пульсирующие органы (1–2 мм в диаметре), расположенные под кожей в небольших углублениях по обе стороны от копчика. Лимфатические сердца обеспечивают перекачивание лимфы в венозную систему.

Аутоотрансплантация заднего лимфатического сердца в собственное ложе приводит к временной ишемии и денервации органа, что создает патологические условия для функционирования всех типов клеток, составляющих его мышечную стенку.

В течение первых 3–5-ти сут после аутоотрансплантации интактного лимфатического сердца в собственное ложе в его мышечной стенке повсеместно можно обнаружить небольшие очаги повреждения, состоящие из малочисленных дегенерирующих поперечно-полосатых мышечных волокон. К концу 1-ой и в течение всей 2-ой нед. количество поврежденных волокон заметно увеличивается. Ультраструктура мышечных волокон свидетельствует о

гибели части из них. Деструктивные процессы замечены в саркоплазме другой части дегенерирующих мышечных волокон. Однако, сохранность структуры их ядер и целостности плазматической мембраны скорее свидетельствует в пользу жизнеспособности этих волокон. К концу 2-ой нед. после операции в таких обратимо дегенерирующих мышечных волокнах обнаружены признаки активации. Происходит “эухроматинизация” мышечных ядер, увеличение размеров ядрышек; в саркоплазме нередки картины саркомерогенеза и миофибриллогенеза.

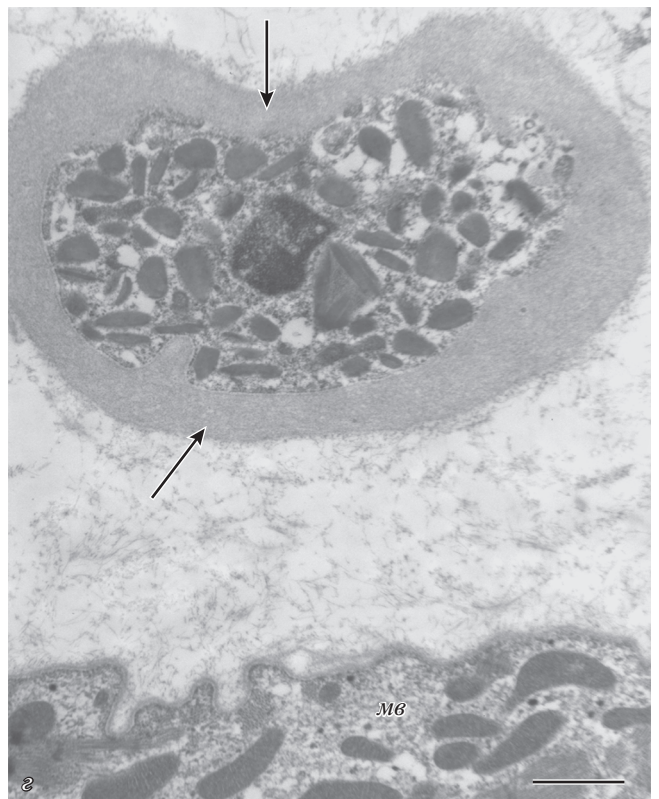
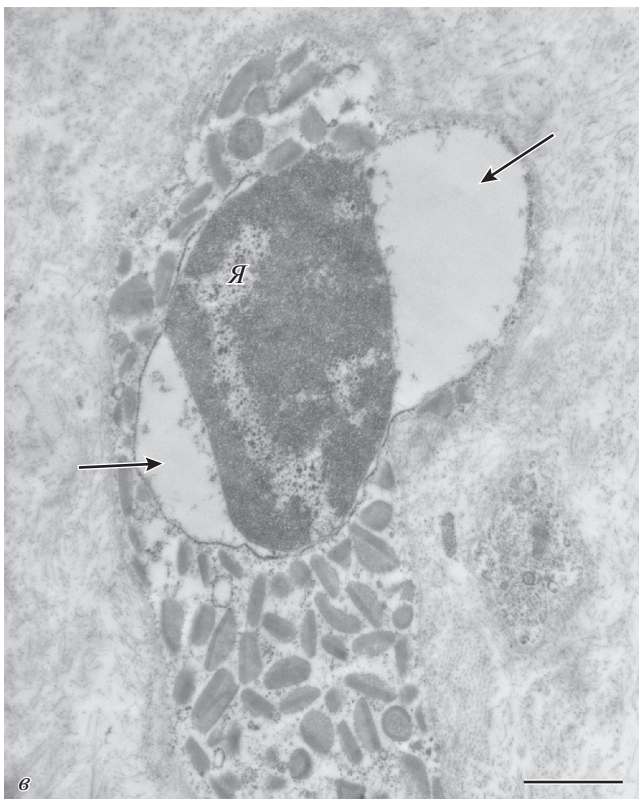
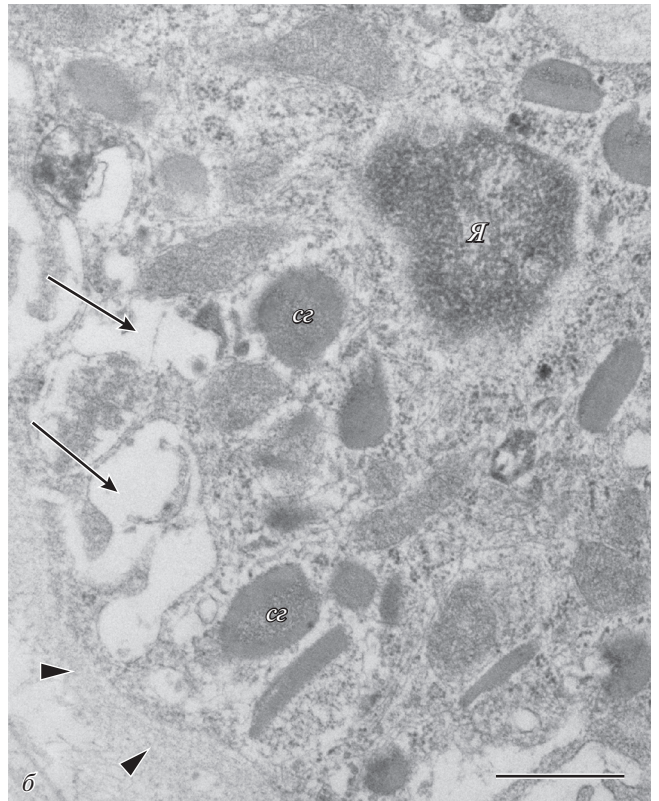
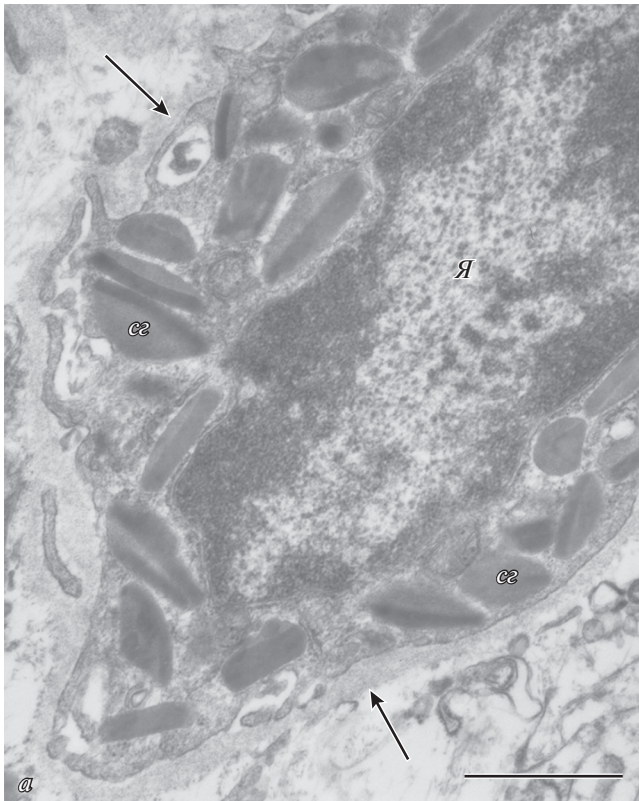
Разгар регенераторных процессов в трансплантированном лимфатическом сердце приходится на 3–4-ю нед. после операции. Прогрессирующая мышечная дифференцировка связана со слиянием микробластов и формированием молодых многоядерных мышечных трубочек *de novo*.

В целом описанная реакция мышечной ткани интактного лимфатического сердца на аутоотрансплантацию органа характерна и для лимфатического сердца с надрезанной стенкой. Механическое травмирование мышц лимфатического сердца, как правило, способствует стимуляции регенераторного процесса.

Краткое описание состояния мышц аутоотрансплантированного сердца, временно лишённого кровоснабжения и иннервации, необходимо для оценки микроокружения, в котором оказались ТК, населяющие интерстициальную ткань данного органа. Следует отметить, что по мере развития деструктивных процессов в стенке трансплантированного органа между мышечными волокнами появляются нейтрофилы и макрофаги, отмечается набухание многих клеток, развивается интерстициальный отек.

Ядро неактивированной (находящейся в покое) тучной клетки неоперированной лягушки обогащено гетерохроматином, а в цитоплазме многочисленные секреторные гранулы, как правило, с неизменным содержанием, довольно плотно прилегают друг к другу (рис. 1а). Среди других цитоплазматических органелл следует отметить аппарат Гольджи, центриоли, одиночные каналы ШЭР, небольшое количество митохондрий, микротрубочки и микрофиламенты. Небольшое по величине ядрышко по-

Рис. 1. Ультраструктура резидентных тучных клеток (ТК) мышечной стенки лимфатического сердца лягушки *Rana temporaria*. а — Ультратонкий срез неактивированной тучной клетки интактного лимфатического сердца; ядро обогащено гетерохроматином; гетерогенные и полиморфные секреторные гранулы плотно упакованы в цитоплазме; видны небольшие поверхностные цитоплазматические отростки; стрелки указывают на базальную пластинку. б — Ультратонкий срез умеренно активированной тучной клетки, к признакам повреждения которой следует отнести отсутствие плотной упаковки гранул в цитоплазме, возможно, в результате набухания последней; стрелки указывают на поверхностные лакуны, которые образовались в результате ранее прошедшей частичной дегрануляции путем экзоцитоза; головки стрелок — на разрыхленную базальную пластинку; 3-и сут после аутоотрансплантации лимфатического сердца. в — Общий вид поврежденной тучной клетки, 5-ые сут после аутоотрансплантации лимфатического сердца; основной ультраструктурный признак повреждения клетки — чрезмерная дилатация перинуклеарного пространства (стрелки); большинство цитоплазматических гранул сохраняют интактную ультраструктуру; в ядре преобладает гетерохроматин. г — Ультратонкий срез поврежденной тучной клетки, расположенной рядом с мышечным волокном (мв); 9-ые сут после операции; обращает на себя внимание высокая степень набухания базальной пластинки тучной клетки (стрелки); в цитоплазме тучной клетки большая часть секреторных гранул сохраняет свою интактную морфологию. сг — Секреторные гранулы; Я — ядро тучной клетки. Масштабные отрезки — 1 (а, в), 0,5 (б) и 4 (г) мкм.



падает в срез редко. С поверхности резидентная тучная клетка покрыта базальной пластинкой.

На 3–5-ые сут после аутотрансплантации лимфатического сердца ультраструктура многих ТК заметно отличается от таковой, приведенной выше. Так, появляются ТК с признаками активации, свидетельствующими о ранее прошедшей частичной дегрануляции с секрецией содержимого гранул путем экзоцитоза. На поверхности таких клеток характерно образование лакун, количество гранул в цитоплазме уменьшается. Увеличение расстояния между гранулами может свидетельствовать о набухании клетки (рис. 1б). Происходит разрыхление базальной пластинки, толщина которой визуальнo увеличивается (рис. 1з). Последние ультраструктурные признаки могут свидетельствовать о повреждении ранее активированных ТК.

С 5-ых сут после операции чаще встречаются ТК с ультраструктурными изменениями, характерными только для поврежденных клеток. Отмечается набухание цитоплазмы (рис. 1в, г, 3в) и базальной пластинки (рис. 1з), дилатация перинуклеарного пространства (рис. 1в, 2а, в, 3в), повышение степени “гетерохроматинизации” некоторых ядер (рис. 2а, 3в). Однако сохранность целостности плазматической мембраны и ядерной оболочки (рис. 1в, г, 2а, 3в), скорее, свидетельствует в пользу жизнеспособности таких ТК. В это же самое время в мышечной стенке аутотрансплантированного лимфатического сердца появляются капилляры, заполненные эритроцитами (рис. 4а).

Исходя из полученных данных, к наиболее ранним ультраструктурным проявлениям повреждения ТК, перечисленным выше, следует также отнести фрагментацию цистерн аппарата Гольджи на вакуоли, трансформацию канальцев ШЭР в пузырьки (рис. 2а, б), незначительное набухание митохондрий. Для ядерной оболочки характерно расширение перинуклеарного пространства (рис. 1в, 2а, 3в) и возможное содержание в нем ядерного материала, а также отпочковывание от внешней ядерной мембраны везикул, усыпанных рибосомами (рис. 3в, г).

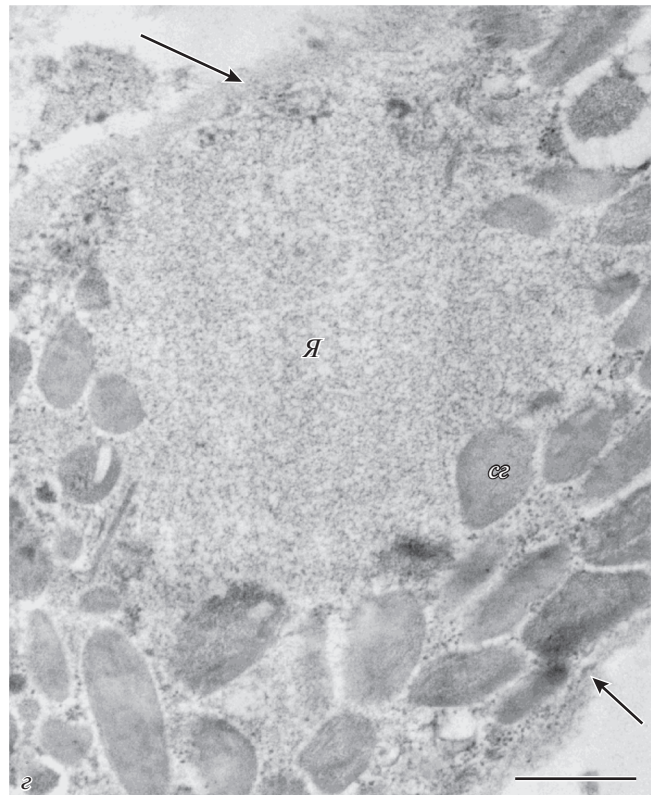
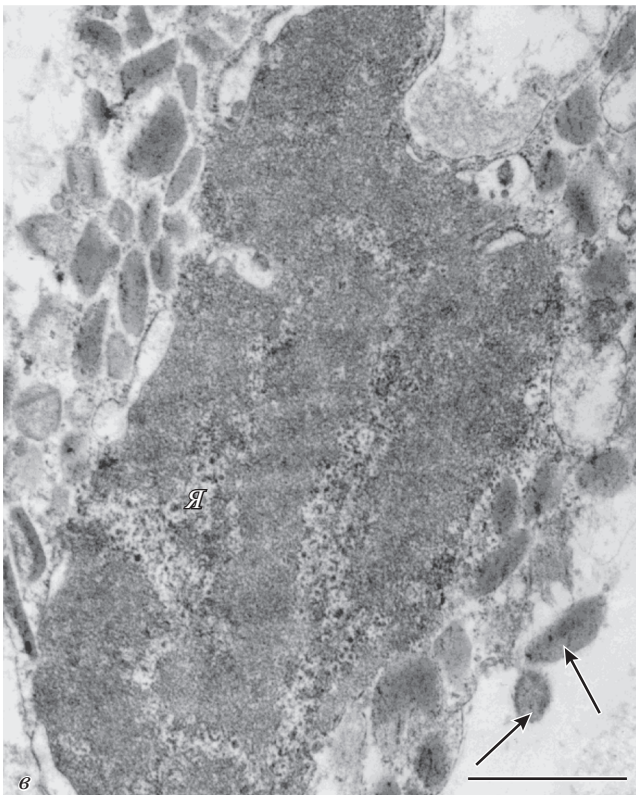
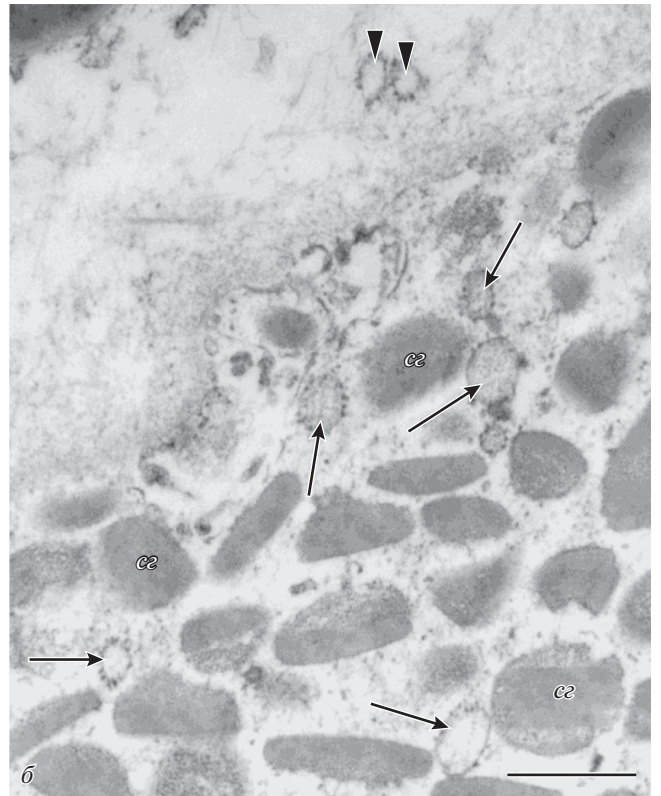
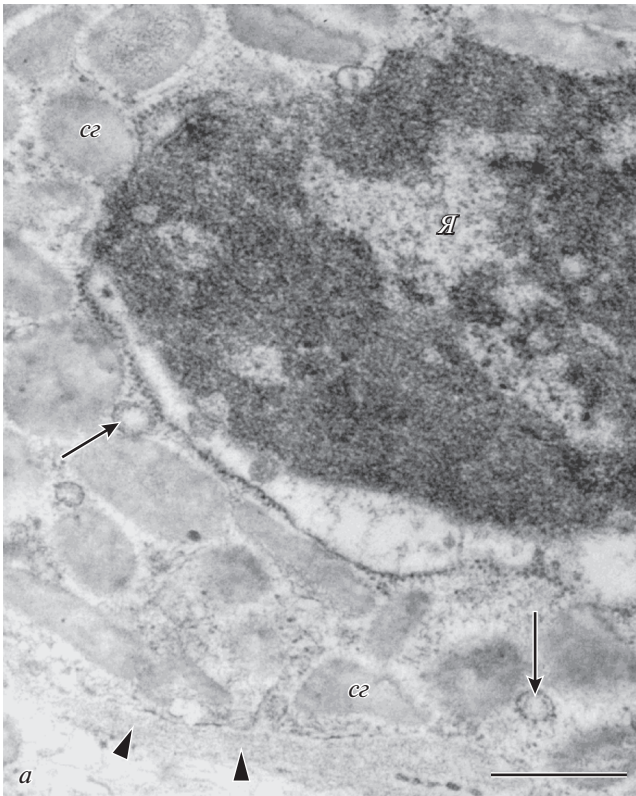
Привлекают к себе внимание ТК с распавшейся плазматической мембраной (рис. 2в, г, 3а, б), что од-

нозначно свидетельствует о необратимости процесса их деградации. Следует отметить, что ультраструктурные изменения, которые сопровождают гибель ТК, не всегда одинаковы для всех клеток данного типа. Например, хроматин в гибнущих ТК может быть в основном конденсирован (рис. 2в), может быть сегрегирован на эу- и гетерохроматин (рис. 4б, в), подобно хроматину ядер ТК, находящихся в покое (рис. 1а), может быть в диспергированном состоянии (рис. 3а, б), а может быть подвергнут лизису (рис. 2г, 5а, б). Мы не видели в ТК ни выраженного кариопикноза, ни кариорексиса.

После распада плазматической мембраны и базальной пластинки цитоплазматические секреторные гранулы с малоизмененным и неизменным содержимым можно обнаружить как в экстрацеллюлярном пространстве рядом с погибшей тучной клеткой (рис. 2в, 3а, б, 4в), так и на некотором отдалении от нее в межклеточном пространстве в окружении коллагеновых фибрилл (рис. 4г). При сохранении базальной пластинки секреторные гранулы некоторое время еще сохраняются в пределах набухшей прозрачной цитоплазмы необратимо поврежденных ТК (рис. 2г, 4б).

Обращают на себя внимание ТК с кариолизисом и преобладанием в цитоплазме секреторных гранул с неизменной ультраструктурой (рис. 2г, 5а, б). При этом целостность плазматической мембраны таких ТК может быть, как сохранена (рис. 5а), так и нарушена (рис. 5б). Нередко отмечается близкое расположение ТК и нейтрофилов. В ряде случаев выявлен тесный контакт “мембрана к мембране” распадающегося нейтрофила (в результате некроза) и погибающей тучной клетки (рис. 5а). Отмечается повышенная конденсация хроматина ядра нейтрофила, исчезновение ядерных долек, нарушение целостности плазматической мембраны и выброс его цитоплазматических секреторных гранул в экстрацеллюлярное пространство (рис. 5а). Нередко некоторые гранулы нейтрофила располагаются вблизи от распадающейся тучной клетки (рис. 5а, б). В материале лизированного ядра тучной клетки (рис. 5б) иногда можно встретить пучки фибрина.

Рис. 2. Поврежденные и гибнущие ТК в аутотрансплантированном лимфатическом сердце лягушки. а – Фрагмент поврежденной тучной клетки; обратите внимание на обилие гетерохроматина в ядре; в расширенном перинуклеарном пространстве поврежденной тучной клетки видны нити и округлые тельца умеренной электронной плотности, возможно, имеющие ядерное происхождение; *стрелки* указывают на небольшие пузырьки, расположенные в цитоплазме и принадлежащие к системе шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР); *головки стрелок* – на набухшую базальную пластинку. б – Фрагмент цитоплазмы поврежденной тучной клетки; в набухшей цитоплазме хорошо видны пузырьки системы ШЭР (*стрелки*); в полости некоторых пузырьков содержится материал умеренной электронной плотности; *головки стрелок* указывают на два пузырька, оказавшихся в экстрацеллюлярном пространстве в результате локального разрушения плазматической мембраны. в – Погибшая тучная клетка частично лишена плазматической мембраны; обратите внимание на обилие конденсированного хроматина в ядре клетки и характерные расширения перинуклеарного пространства; *стрелки* указывают на две секреторные гранулы, вышедшие в экстрацеллюлярное пространство в результате распада плазматической мембраны и базальной пластинки клетки. г – Кариолизис в погибшей тучной клетке; секреторные гранулы интактной ультраструктуры окружают материал лизированного ядра и расположены в цитоплазме клетки, лишенной плазматической мембраны, но сохранившей базальную пластинку (*стрелки*). 5-ые сут после аутотрансплантации лимфатического сердца. сг – Секреторные гранулы, Я – ядро. Масштабные стрелки – 0.5 (а, б, г) и 1 (в) мкм.



В реактивной зоне, прилегающей к месту надреза мышечной стенки лимфатического сердца, проведенного до аутотрансплантации органа, можно встретить небольшие по величине молодые ТК, лишенные базальной пластинки и содержащие ограниченное количество секреторных гранул в небольшом ободке цитоплазмы, опоясывающем ядро с характерным для ядер ТК примембранным расположением гетерохроматина (рис. 6а). Обращают на себя внимание одиночные тонкие цитоплазматические отростки, отходящие от поверхности таких ТК и отсутствие периферических лакун.

В этой же зоне можно обнаружить активированные травмой резидентные ТК, окруженные набухшей базальной пластинкой. Наличие на поверхности этих ТК лакун может свидетельствовать о ранее прошедшей дегрануляции ТК, которая в некоторых случаях могла быть и тотальной (рис. 6б). Для крупного ядра такой резидентной тучной клетки характерен диспергированный хроматин и отсутствие периферических примембранных отложений гетерохроматина. В тонком ободке цитоплазмы описываемых ТК можно обнаружить развитый аппарат Гольджи, в некоторых периферических вакуолях которого нередко содержится электронно-плотный материал. Это образуются програнулы. В цитоплазме можно наблюдать немногочисленные незрелые, лишенные электронно-плотного компонента, секреторные гранулы, одиночные каналцы ШЭР, митохондрии и пучки микрофиламентов (рис. 6б). Подобная ультраструктура резидентной тучной клетки может свидетельствовать о нахождении ее в состоянии регрануляции.

Иммуноцитохимические данные, полученные при использовании антител к гистамину, ANP и SP, показали наличие частиц золота над неизмененными и незначительно измененными секреторными гранулами поврежденных и погибших ТК (рис. 3б, г, 5в, г). В качестве отрицательного контроля использовали срезы, не подвергшиеся обработке первыми антителами.

ОБСУЖДЕНИЕ

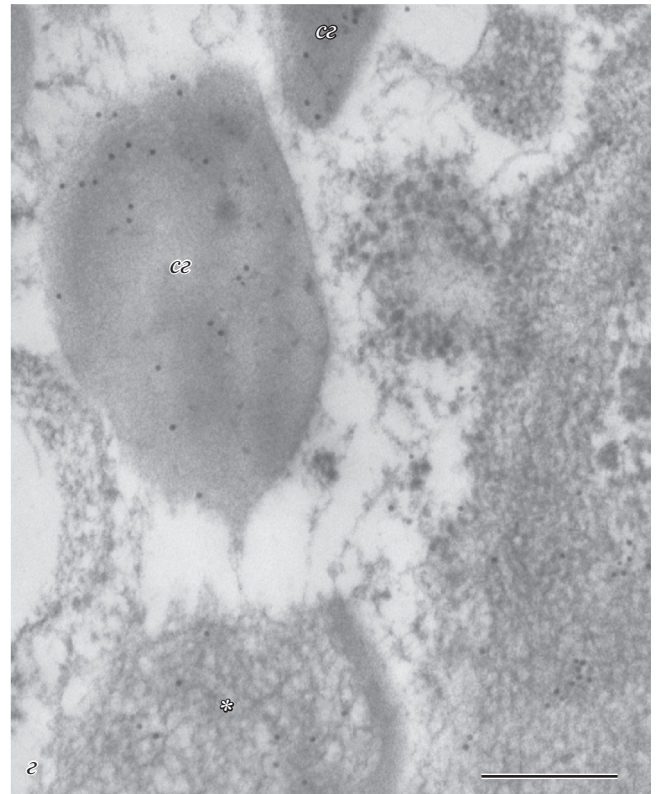
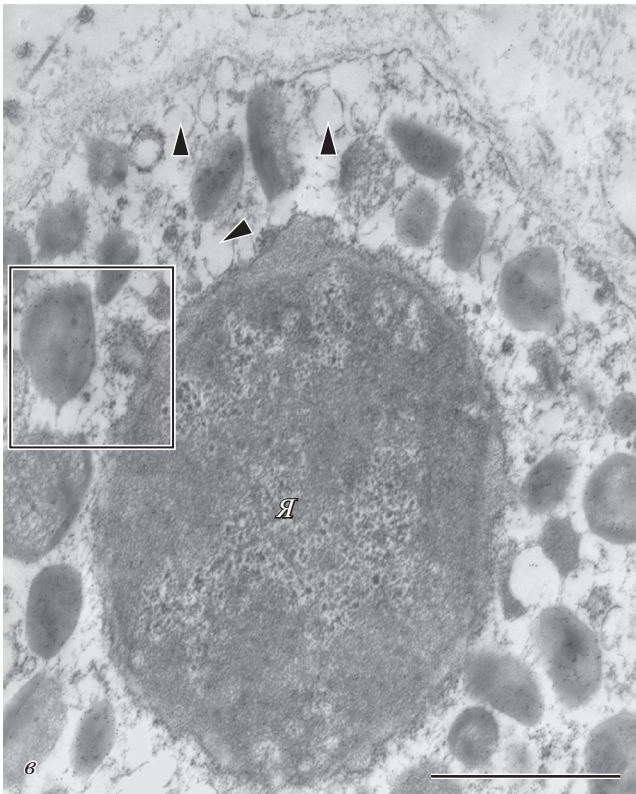
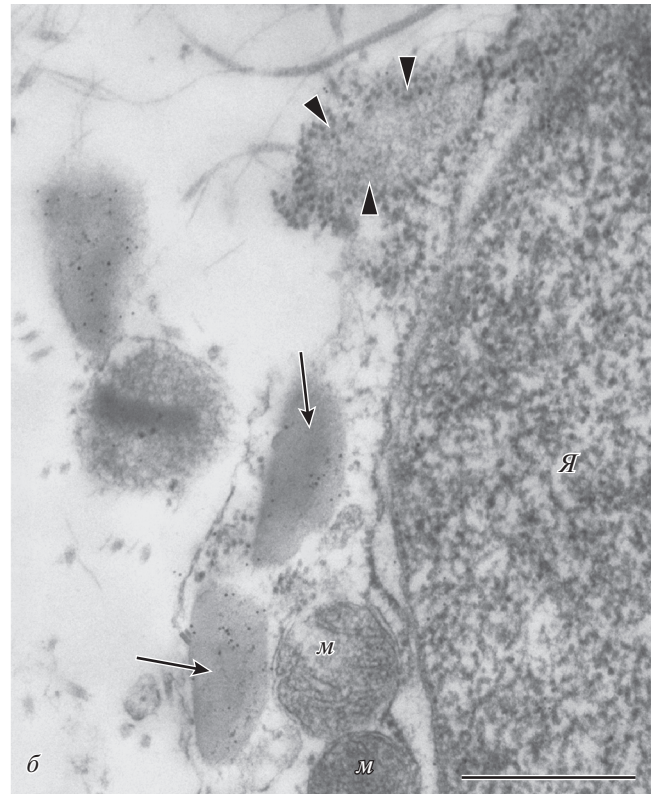
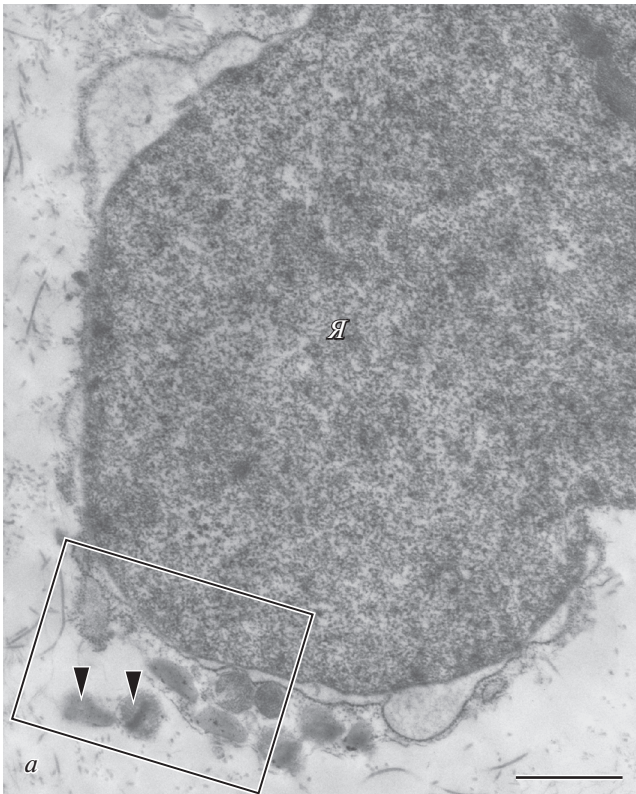
В настоящей работе исследовали ультраструктурные характеристики поврежденных и гибнущих резидентных ТК в поперечно-полосатой мышце аутотрансплантированного лимфатического сердца взрослой лягушки.

Ранее при изучении реакции поперечно-полосатых мышечных волокон на аутотрансплантацию лимфатического сердца мы обнаружили в стенке органа сосуществование необратимо дегенерирующих мышечных волокон, относительно нормальных (малоизмененных) мышечных волокон и обратимо дегенерирующих мышечных волокон с признаками ядерной и саркоплазматической реактивации (Крылова, 1997). Массовой гибели мышечных волокон в результате временной ишемии и денервации обнаружено не было. Вероятно, незначительная величина лимфатического сердца (1–2 мм в диаметре) позволяет питательным веществам и кислороду легко диффундировать из окружающей среды с периферии в более глубоко лежащие слои стенки органа. Кроме того, не исключено быстрое врастание капилляров в тонкую стенку лимфатического сердца. Также следует иметь в виду, что у амфибий, впадающих в зимнюю спячку, метаболизм настроен на работу в анаэробных условиях (Студитский, 1977).

По данным настоящей работы, ультраструктурные характеристики резидентных ТК мышечной стенки аутотрансплантированного лимфатического сердца так же разнообразны. Независимо от времени, прошедшего с момента операции (от 3-х сут до 6 нед. после аутотрансплантации), в стенке лимфатического сердца в одно и то же время можно встретить неактивированные ТК и ТК с признаками ранее прошедшей частичной дегрануляции (условно активированные ТК). Также можно обнаружить ТК на разных стадиях обратимого и необратимого повреждения (оценивали по сохранности целостности плазматической мембраны).

Мы не останавливаемся на обсуждении вопросов, связанных с денервацией лимфатического серд-

Рис. 3. Ядро и перинуклеарная цитоплазма погибшей (а, б) и поврежденной (в, г) ТК; 3-я (а, б) и 6-я (в, г) нед. после аутотрансплантации лимфатического сердца. а – Общий вид погибшей тучной клетки; обратите внимание на почти полное отсутствие гетерохроматина в ядре, а также на отсутствие плазматической мембраны и базальной пластинки; небольшая группа, состоящая из немногочисленных секреторных гранул и нескольких митохондрий, расположена около ядра; в целом цитоплазма погибшей тучной клетки отсутствует; *головки стрелок* указывают на две секреторные гранулы, расположенные на некотором расстоянии от ядра. б – Участок, выделенный рамкой на рис. 3а; диспергированное состояние хроматина в ядре погибшей тучной клетки, возможно, предшествует лизису ядерного материала; специфическое ANP-иммунореактивное окрашивание интактных на вид секреторных гранул (*стрелки*) погибшей тучной клетки; усыпанный рибосомами растянутый пузырек (головки стрелок) заполнен материалом умеренной электронной плотности и, по-видимому, возник в результате выпячивания внешней ядерной мембраны этой клетки. в – Общий вид поврежденной тучной клетки; обращает на себя внимание набухшая цитоплазма, в которой встречаются разрушенные пузырьки ШЭР (*головки стрелок*); плазматическая мембрана и базальная пластинка сохранены; в ядре явно преобладает гетерохроматин; перинуклеарное пространство расширено незначительно и в нем содержится материал умеренной электронной плотности. г – Фрагмент поврежденной тучной клетки, выделенный рамкой на рис. 3в; хорошо видно, как от внешней ядерной мембраны отпочковывается пузырек, усыпанный рибосомами и, видимо, содержащий материал, присутствующий в перинуклеарном пространстве; локализация ANP-иммунореактивного материала в неизмененных цитоплазматических секреторных гранулах (*сг*), редкие частицы золота видны над ячеистым материалом измененной гранулы (*звездочка*). м – Митохондрия, Я – ядро. Масштабные отрезки – 1 (а, в), 0,5 (б) и 0,2 (г) мкм.



ца, так как в большей степени постденервационные изменения касаются дегенеративных и регенераторных процессов, происходящих в поперечно-полосатых мышечных волокнах данного органа (Крылова, 1997). Следует особо отметить, что ТК в мышечной стенке лимфатического сердца не образуют скопления и гибнут индивидуально, как правило, оказавшись либо в мелком очаге поврежденных мышц, либо рядом с ним.

Несмотря на то, что в настоящее время насчитывают уже 34 формы клеточной смерти (Liu et al., 2018), очевидным остается участие трех различных способов клеточной гибели в разнообразных физиологических и патологических процессах у позвоночных. Имеются в виду три главных морфологических типа клеточной смерти: “апоптозный”, “аутофагический” и “не-лизосомный вакуолярный” (онкотический некроз) (Clarke, 1990).

В настоящей работе мы обнаружили только один морфологический тип клеточной гибели, к характерным признакам которой можно отнести тенденцию к увеличению количества конденсированного хроматина в ядре, набухание и распад внутриклеточных органелл (за исключением цитоплазматических секреторных гранул), кариолизис, нарушение целостности плазматической мембраны и выход внутриклеточного содержимого в экстрацеллюлярное пространство. Полученные нами данные позволяют заключить, что ТК в мышечной стенке аутоотрансплантированного лимфатического сердца взрослой лягушки на исследованных сроках после экспериментального воздействия гибнут путем некроза. Собственно некрозу, если под этим термином понимать необратимый процесс распада клетки с образованием клеточного дебриса, предшествует стадия набухания тучной клетки – онкоз. Ранние этапы онкоза принято считать обратимыми (Majno, Joris, 1995; Trump et al., 1997).

Специфику морфологических признаков онкоза ТК лягушки мы видим в часто наблюдаемых расширениях перинуклеарного пространства и отпочковывании от внешней ядерной мембраны пузырьков, усыпанных рибосомами, и в ряде случаев, возможно, содержащих ядерный материал. Очевидно, что описанные пузырьки принадлежат к системе ШЭР.

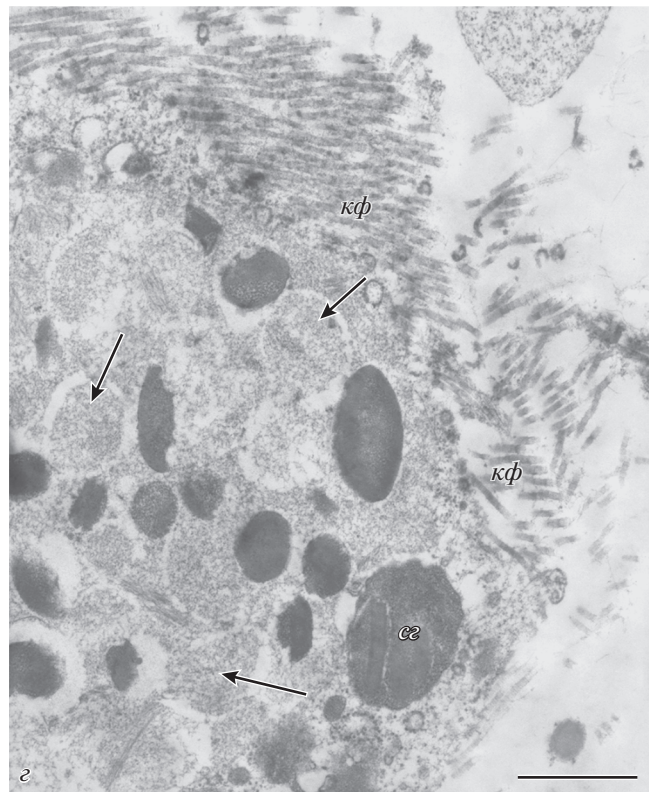
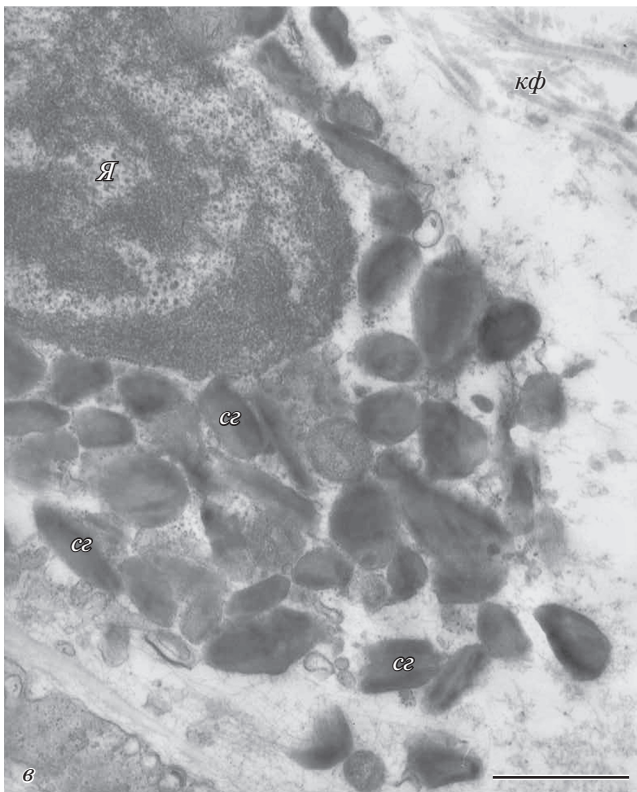
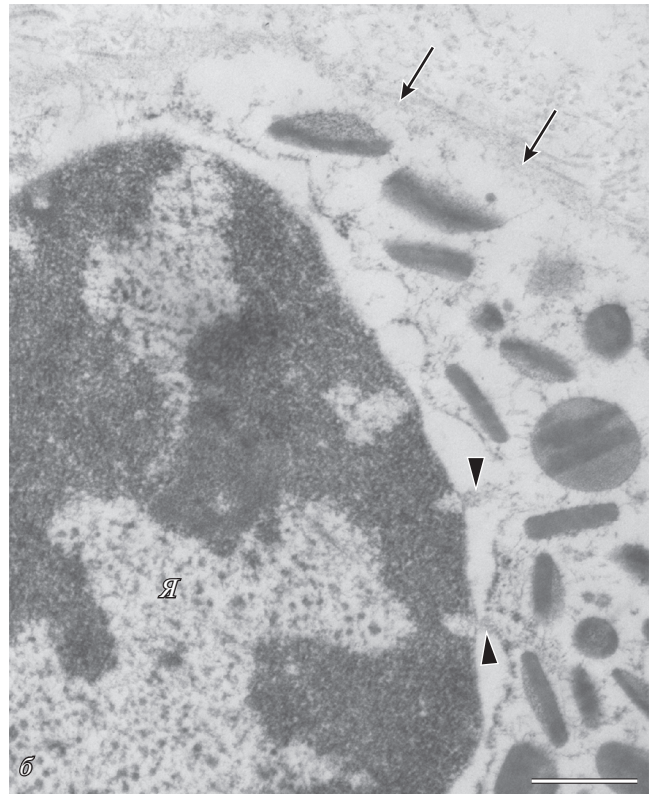
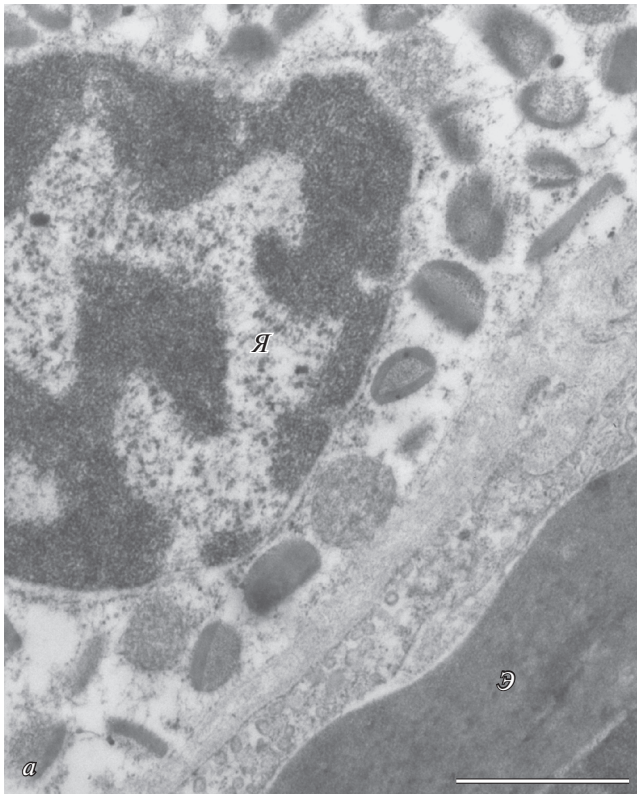
Цитоплазматические пузырьки, образовавшиеся в результате трансформации в них канальцев ШЭР, часто распадаются уже в цитоплазме. Тем не менее, сохранившие свою целостность пузырьки удается обнаружить под плазматической мембраной и даже в экстрацеллюлярном пространстве (в случае локального разрушения плазматической мембраны еще до полного распада тучной клетки). Недавние исследования показали, что ядерные молекулы (не-гистоновый ядерный протеин – HMGB1, ДНК, гистоны) поврежденных и умирающих путем некроза клеток, оказавшись в межклеточном пространстве, сами становятся значимыми медиаторами воспаления (Pisetsky, 2014; Silk et al., 2017; Szatmary et al., 2018).

Точка “невозврата” онкотического некроза – распад плазматической мембраны. Следует заметить, что, даже обладая этим общим ультраструктурным признаком клеточной смерти, каждая тучная клетка, тем не менее, гибнет “по-своему”. Очевидно, что многое зависит от первоначального функционального состояния клетки, а также от ее микроокружения.

Гибель ТК аутоотрансплантированного лимфатического сердца путем некроза вполне закономерна. Известно, что ишемия любого органа приводит к гипоксии в тканях. Можно предположить, что в ТК, как и в других клетках, аутоотрансплантированного лимфатического сердца при гипоксии снижается синтез АТФ. Гипоксию принято рассматривать как наиболее распространенную причину повреждения и гибели клеток путем некроза в условиях энергодиффицита.

Полагаем, что обнаруженная в настоящей работе форма клеточной гибели ТК лягушки представляет собой первичный нерегулируемый онкотический некроз. Интересно, что морфологические признаки онкоза (набухание клетки и мембранных цитоплазматических органелл, нарушение целостности плазматической мембраны и высвобождение внутриклеточного содержимого в экстрацеллюлярное пространство) характерны и для одной из форм регулируемой некротической клеточной гибели – некроптоза (Vanden Berghe et al., 2010). Поскольку на морфологическом уровне отличить онкотический некроз от некроптоза не представляется возмож-

Рис. 4. Ультраструктурные особенности поврежденной (а) и гибнущих (б, в, г) ТК аутоотрансплантированного лимфатического сердца. а – Фрагмент поврежденной тучной клетки, расположенной рядом с капилляром, в мышечной стенке лимфатического сердца; 5-е сут после операции; в ядре ярко выражена сегрегация хроматина на эу- и гетерохроматин; отсутствует плотная упаковка секреторных гранул в цитоплазме, что может свидетельствовать об обводненности последней. б – Гибнущая тучная клетка; 5-е сут после операции; хорошо выражена сегрегация хроматина на эу- и гетерохроматин, однако отсутствует плазматическая мембрана и целостность внешней ядерной мембраны явно нарушена; видно выделение (экструзия) ядерного материала в набухшую цитоплазму (головки стрелок); целостность базальной пластинки сохранена (стрелки). в – Гибнущая тучная клетка; 12-е сут после операции; в ядре присутствует как эу-, так и гетерохроматин, внешняя ядерная мембрана частично разрушена; хотя плазматическая мембрана и базальная пластинка отсутствуют, тем не менее секреторные гранулы неизменной ультраструктуры все еще сконцентрированы вокруг ядра в цитоплазме. г – Секреторные гранулы, оказавшиеся в межклеточном пространстве после разрушения тучной клетки, постепенно теряют характерную для них ультраструктуру (стрелки); многочисленная группа секреторных гранул в экстрацеллюлярном пространстве окружена коллагеновыми фибриллами. кф – Коллагеновые фибриллы, сг – секреторные гранулы, Э – эритроцит, Я – ядро. Масштабные отрезки – 1 (а, в, г) и 0.5 (б) мкм.



ным, в настоящее время основное внимание исследователей сфокусировано на идентификации молекулярных биомаркеров некроптоза и на возможностях регулирования их активности (He et al., 2016; Wallach et al., 2016).

Влияние гипоксии на функциональную активность ТК интенсивно исследуется в течение последнего десятилетия. Получены данные о хорошей переносимости ТК человека кратковременной (в течение нескольких дней) гипоксии в экспериментах, проведенных *in vitro* (Gulliksson et al., 2010). Показано, что ТК в условиях гипоксии выживают и сохраняют реактивность на внешние стимулы. При этом собственно гипоксия не приводит ТК к дегрануляции, но увеличивает секрецию IL-6, который, действуя аутокринно (паракринно) способствует выживанию ТК (Gulliksson et al., 2010; Möllerherm et al., 2017). К сожалению, данных о влиянии гипоксии на ТК лягушки как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo* в известной нам литературе мы не обнаружили.

Присутствие условно активированных ТК в мышечной стенке аутоотрансплантированного лимфатического сердца может свидетельствовать о появлении во время операции или непосредственно после нее внешних стимулов, вызвавших активацию ТК и их частичную дегрануляцию с выделением содержимого гранул в процессе регулируемой секреции, т.е. путем экзоцитоза.

Известно, что ТК очень чувствительны к внешним патогенным воздействиям, а также одними из первых реагируют на повреждение и гибель окружающих их клеток (Enoksson et al., 2011). Из всех известных к настоящему времени сигналов тревоги (аларминов) ТК мыши и человека реагируют только на IL-33 – ядерный цитокин, принадлежащий IL-1 семейству цитокинов. IL-33 выделяется в экстрацеллюлярное пространство в результате некротической смерти эндотелиальных, эпителиальных и фибробластоподобных клеток (Moussion et al., 2008). Во внеклеточной среде IL-33 функционирует как сигнал тревоги (алармин) и узнается иммунными клетками, которые впоследствии запускают воспалительный процесс (Bianchi et al., 2007). ТК узнают IL-33 через IL-33-рецептор ST2, расположенный на

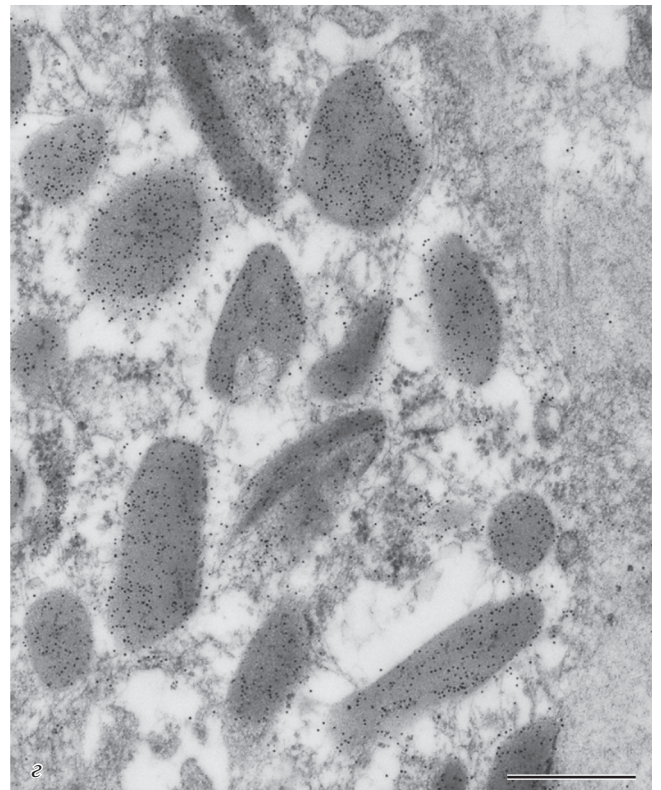
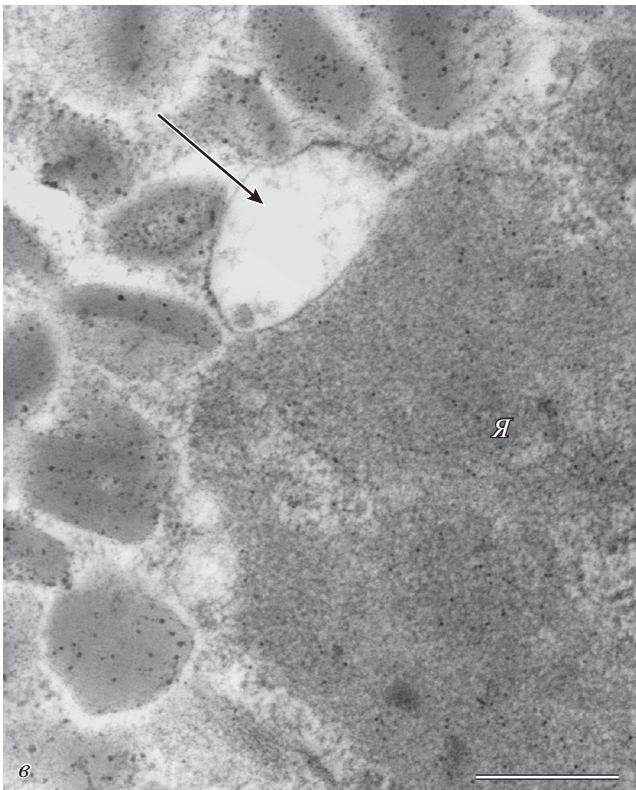
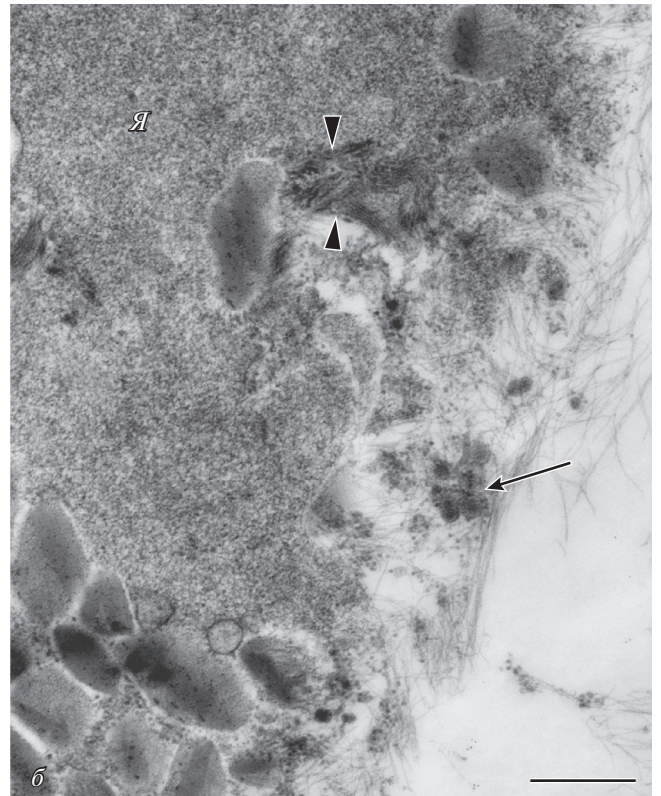
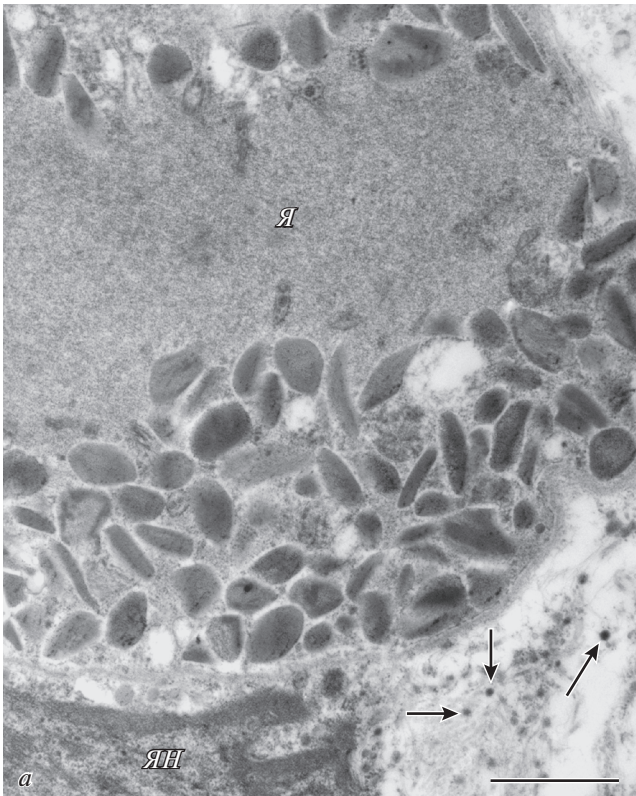
их поверхности. Установлено, что IL-33 стимулирует ТК к продукции и секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, выделение которых из ТК осуществляется, однако, без дегрануляции последних (Moulin et al., 2007; Enoksson et al., 2011). Тем не менее, IL-33 может усиливать дегрануляцию ТК, опосредованную IgE (Jouliа et al., 2017).

Недавно обнаружено, что наличие молочной кислоты в микроокружении тучной клетки (закисление микроокружения) подавляет простимулированную IL-33 продукцию тучной клеткой провоспалительных цитокинов (Abebayehu et al., 2016). Таким образом, была выявлена возможность изменения поведения ТК в воспалительных процессах при различных заболеваниях.

Присутствие в микроокружении ТК аутоотрансплантированного лимфатического сердца поврежденных и гибнущих путем некроза клеток может вызвать повреждение и гибель самих ТК. Так, в тучной клетке, находящейся в тесном контакте с распадающимся нейтрофилом, был обнаружен кариолизис. При этом никаких признаков онкоза в цитоплазме мы не выявили. Можно предположить, что секреторные гранулы погибшего путем некроза нейтрофила, разбросанные в экстрацеллюлярном пространстве вблизи описываемой тучной клетки, являются источником сильнодействующих токсинов, которые в первую очередь повреждают ядро. Известно, что при быстро развивающемся некрозе ядро подвергается лизису, минуя пикнотическую стадию. Не исключена возможность и случайного совпадения во времени и пространстве гибели двух, контактирующих друг с другом клеток, принадлежащих к системе врожденного иммунитета. Взаимоотношения ТК и нейтрофилов в условиях гипоксии заслуживают дальнейшего изучения.

Внешние силы, инициирующие некроз, как правило, приводят к быстрому разрушению клеточного гомеостаза. Из результатов нашего исследования следует, что единственной цитоплазматической органеллой, которая сохраняет свой гомеостаз в течение всего периода некротической гибели ТК лягушки, является секреторная гранула. Действительно, и на ранней онкотической стадии, и в период распада

Рис. 5. Кариолизис в погибающих ТК и иммуноцитохимическая локализация гистамина и субстанции P (SP) в секреторных гранулах поврежденных ТК. *а* – Кариолизис в тучной клетке; 5-е сут после аутоотрансплантации лимфатического сердца; тучная клетка плотно контактирует “мембрана к мембране” с погибающим нейтрофилом; плазматическая мембрана и базальная пластинка тучной клетки сохранены; набухание цитоплазмы отсутствует; секреторные гранулы интактной ультраструктуры плотно упакованы в цитоплазме; в экстрацеллюлярном пространстве рядом с погибающей тучной клеткой хорошо видны секреторные гранулы (стрелки) распавшегося нейтрофила. *б* – Кариолизис в тучной клетке; 5-е сут после операции; разрушена плазматическая мембрана и базальная пластинка; секреторные гранулы интактной ультраструктуры сконцентрированы вокруг лизированного ядерного материала; со стороны экстрацеллюлярного пространства видны нейтрофильные секреторные гранулы (стрелка) и тонкие нити, возможно, фибрина; головки стрелок указывают на пучок фибрина в измененном ядерном материале. *в* – специфическое гистамин-иммунореактивное окрашивание секреторных гранул поврежденной тучной клетки; 5-е сут после операции; в ядре много конденсированного хроматина; стрелка указывает на локальное расширение перинуклеарного пространства; секреторные гранулы интактной ультраструктуры. *г* – Иммуноцитохимическая локализация SP в секреторных гранулах поврежденной тучной клетки; 3-я нед. после аутоотрансплантации механически поврежденного лимфатического сердца; в набухшей цитоплазме секреторные гранулы в основном интактной ультраструктуры далеко расположены друг от друга. *я* – Ядро, *ЯН* – ядро нейтрофила. Масштабные отрезки – 1 (*а*), 0,5 (*б*, *г*) и 0,3 (*в*) мкм.



тучной клетки большинство цитоплазматических секреторных гранул выглядят морфологически интактными. Проведенные иммуноцитохимические исследования показали, что на всех этапах онкотического некроза, даже находясь после распада клетки в экстрацеллюлярном пространстве, гранулы метятся с помощью антител к гистамину. На 3–6-ой нед. после ауотрансплантации лимфатического сердца, условно активированные ТК (после частичной дегрануляции и незавершенного экзоцитоза), находящиеся в состоянии онкоза, метятся антителами против SP и ANP. Следует отметить, что ТК, находящиеся в активированном состоянии и секретирующих содержимое цитоплазматических гранул путем экзоцитоза, мы не обнаружили.

Давно известно, что внутренняя среда секреторных гранул тучной клетки имеет низкие значения pH (5.2–6.1) (Lagunoff, Rickard, 1983; De Young et al., 1987). Недавно экспериментально было установлено, что защелачивание среды в гранулах ТК вызывает как морфологические изменения гранул (набухание гранул, превращение их в крупные вакуоли), так и изменения в составе и активности гранулярного содержимого. Таким образом, была выявлена исключительная роль низких значений pH (внутригранулярный ацидоз) в регуляции гомеостаза секреторных гранул тучной клетки (Pejler et al., 2017). По-видимому, и ацидоз цитоплазмы, который развивается в процессе онкотического некроза тучной клетки лягушки в условиях умеренной временной гипоксии, должен только способствовать сохранению постоянства внутренней среды в секреторных гранулах.

Не исключено, что в сохранении гомеостаза секреторных гранул поврежденных и гибнущих ТК определенную роль играет и белок теплового шока Hsp70. Ранее нами была выявлена иммунолокализация Hsp70 в секреторных гранулах ТК сеголеток травяной лягушки (Крылова, 2010). Известно, что Hsp70, стабилизируя проницаемость лизосомных мембран, не допускает выхода содержимого лизосом в цитоплазму и таким образом обеспечивает жизнеспособность опухолевых клеток (Gyrd-Hansen et al., 2004). Следует отметить, что секреторные гранулы ТК нередко рассматривают в качестве секреторных лизосом (Wernersson, Pejler, 2014).

В связи с сохранением гомеостаза секреторных гранул в процессе гибели ТК лягушки путем онкотического некроза возникает ряд вопросов. Что происходит с гранулами, вышедшими в экстрацеллюлярное пространство? Сохраняют ли заключенные в них преформированные медиаторы свою активность? Если молекулы медиаторов разрушаются, то они вряд ли могут принимать участие в дальнейшем развитии асептического воспаления и рассматриваться в качестве аларминов. В контексте этих вопросов представляет интерес изучение возможности гибели

ТК млекопитающих в условиях *in vivo* не только путем апоптоза, но и путем онкотического некроза.

В фокусе нашего внимания оказалась также реактивная зона, прилегающая к месту механического повреждения мышечной стенки ауотрансплантированного лимфатического сердца. В этой зоне через 2 нед. после операции мы обнаружили присутствие небольших, состоящих из 3–4 клеток, редко встречающихся групп ТК. В отличие от зрелых резидентных ТК, населяющих интерстициальную ткань лимфатического сердца, ТК, входящие в состав этих групп, обладают цитоплазматическими отростками, узким ободком цитоплазмы, окружающим ядро, а также ограниченным количеством секреторных гранул. Важно подчеркнуть, что у описываемых ТК отсутствуют базальная пластинка и поверхностные лакуны. Последние, как известно, появляются на поверхности тучной клетки лягушки в результате ранее прошедшей дегрануляции.

Поскольку делящихся митозом ТК мы не обнаружили, то предполагаем возможность миграции из кровеносных сосудов, проросших в стенку оперированного лимфатического сердца, либо коммитированных предшественников ТК и их дальнейшую дифференцировку в интерстициальной ткани, либо миграцию дифференцированных циркулирующих ТК. Следует отметить, что присутствие коммитированных недифференцированных предшественников ТК в крови лягушки еще не установлено. В связи с этим вопрос о происхождении морфологически незрелых ТК в механически поврежденной стенке ауотрансплантированного лимфатического сердца остается пока открытым.

В реактивной зоне механически поврежденной мышечной стенки ауотрансплантированного лимфатического сердца на 12-е сут после операции были обнаружены резидентные ТК в состоянии регрануляции. В узком ободке цитоплазмы таких ТК, как правило, отсутствуют зрелые гранулы, но можно обнаружить одиночные програнулы, незрелые гранулы и хорошо развитый аппарат Гольджи. Подобные ультраструктурные изменения могут свидетельствовать о том, что после ранее прошедшей активации, завершившейся тотальной дегрануляцией, ТК приступили к биогенезу цитоплазматических секреторных гранул. Связь столь мощной активации ТК с самой процедурой ауотрансплантации (влияние стресса), механическим повреждением мышечной стенки лимфатического сердца и действием различных стимулов, активирующих ТК, или их сочетанием в процессе эксперимента, пока остается неустановленной.

В заключение хочется еще раз подчеркнуть, что в настоящем исследовании выявлены ультраструктурные признаки онкотической некрозоподобной гибели ТК лягушки в условиях временной ишемии (гипоксии). В настоящее время некротическую ги-

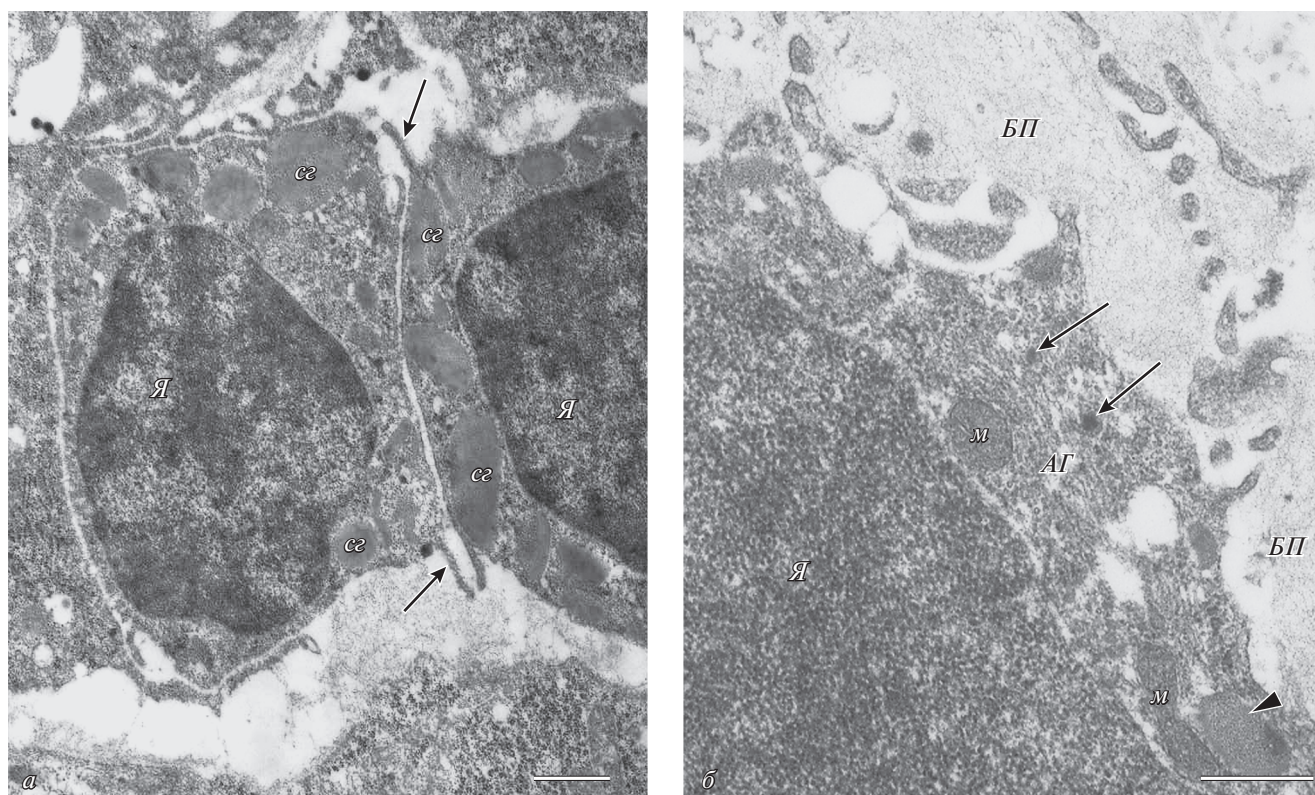


Рис. 6. Молодые ТК и зрелая резидентная тучная клетка в мышечной стенке поврежденного аутотрансплантированного лимфатического сердца. *а* – Две молодые ТК расположены в реактивной зоне аутотрансплантированного лимфатического сердца; 2 нед. после операции; у клеток отсутствует базальная пластинка; ядро крупное; тонкий ободок цитоплазмы содержит небольшое количество зрелых секреторных гранул; обратите внимание на немногочисленные тонкие цитоплазматические отростки (стрелки): наличие подобных отростков при отсутствии базальной пластинки – типичные ультраструктурные характеристики циркулирующих ТК. *б* – Фрагмент резидентной тучной клетки, ранее подвергшейся тотальной дегрануляции путем завершеного экзоцитоза; базальная пластинка утолщена и разрыхлена; видны поверхностные лакуны; в тонком ободке цитоплазмы обращает на себя внимание аппарат Гольджи (АГ); пузырьки, расположенные рядом с аппаратом Гольджи, содержат материал програнул (стрелки); головка стрелки указывает на незрелую секреторную гранулу, в которой отсутствует электронно-плотный компонент, характерный для зрелой гранулы, в цитоплазме встречаются митохондрии (м) и свободные рибосомы. БП – Базальная пластинка, сг – секреторные гранулы, Я – ядро. Масштабные отрезки – 1 (*а*) и 0.5 (*б*) мкм.

бель клетки рассматривают как фактор, способный инициировать воспалительный процесс в поврежденной ткани (Rock, Kono, 2008; Chen, Nuñez, 2010; Shen et al., 2013). Установлено, что внутриклеточные молекулы, оказавшись в экстрацеллюлярном пространстве в результате распада погибших клеток, стимулируют тканевые резидентные иммунные клетки, как правило, ТК и макрофаги к синтезу и секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. На основании полученных нами результатов предполагаем, что и сами ТК в состоянии некротической смерти могут выделять алармины. К сожалению, данные о некрозе ТК у грызунов и человека крайне ограничены и не учитывают возможность влияния аларминов распадающихся ТК на окружающие их клетки в условиях *in vivo* в течение воспалительных процессов, сопутствующих многим болезням человека.

Очевидно, что в настоящей работе неохваченными остались многие вопросы, связанные с повре-

ждением, гибелью, активацией и регрануляцией ТК, а также обновлением их популяции в мышечной ткани аутотрансплантированного лимфатического сердца взрослой лягушки. Надеемся, что будущие комплексные (ультраструктурные, иммуноцитохимические, биохимические, молекулярно-биологические) исследования роли жизнеспособных и некротизированных ТК в различных поврежденных тканях как низших, так и высших позвоночных обогатят наши знания о механизмах развития асептических воспалительных процессов и возможностях их регулирования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен д.б.н. Д.С. Боголюбову за конструктивное обсуждение результатов работы и благодарен О.И. Емельяновой за техническую помощь при подготовке рукописи к печати.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по государственному заданию № 0124-2018-0003 (рег. ЦИТиС № АААА-А17-117032350035-4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Автор заявляет, что все манипуляции с животными были проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крылова М.И.* 1997. Реакция мышечной ткани лимфатического сердца взрослой травяной лягушки на ауто-трансплантацию. Исследование методами электронной микроскопии и электронно-микроскопической автордиографии. Цитология. 39(10) : 969–978. (*Krylova M.I.* 1997. Reaction of lymph heart muscle of the adult frog to free grafting. Electron microscopy and electron microscope autoradiographical studies. Tsitologiya. 39(10) : 969–978.)
- Крылова М.И.* 2006. Иммуноцитохимическая локализация предсердного натрийуретического пептида в тучных клетках взрослой травяной лягушки *Rana temporaria*. Докл. РАН. 406(3) : 425–427. (*Krylova M.I.* 2006. Immunocytochemical localization of atrial natriuretic peptide in mast cells of adult brown frog *Rana temporaria*. Dok. Biol. Sci. 406 : 79–81.)
- Крылова М.И.* 2009. Резидентные и циркулирующие тучные клетки в пропульсаторных органах лягушки *Rana temporaria*. Цитология. 51(10) : 838–848. (*Krylova M.I.* 2009. Resident and circulating mast cells in propulsive organs of the frog *Rana temporaria*. Cell Tiss. Biol. 4(5) : 490–499.)
- Крылова М.И.* 2010. Тучные клетки лимфатических сердец в онтогенезе лягушек *Rana temporaria*. Цитология. 52(9) : 749–759. (*Krylova M.I.* 2010. Mast cells of lymph hearts during ontogenesis of frog *Rana temporaria*. Tsitologiya. 52(9) : 749–759.)
- Крылова М.И.* 2016. Тучные клетки в поврежденной поперечно-полосатой мышце лимфатического сердца взрослой лягушки: ультраструктурное, иммуноцитохимическое и автордиографическое исследование. Цитология. 58(9) : 688–698. (*Krylova M.I.* 2017. Mast cells in damaged striated muscle of lymph heart in the adult frog: an ultrastructural, immunocytochemical and autoradiographic study. Cell Tiss. Biol. 11(2) : 123–132.)
- Студитский А.Н.* 1977. Трансплантация мышц у животных. М.: Медицина. 233 с. (*Studitsky A.N.* 1977. Transplantation of animal muscles. M. : Medicina. 233 p.)
- Abebayehu D., Spence A.J., Qayum A.A., Taruselli M.T., McLeod J.J., Caslin H.L., Chumanovich A.P., Kolawole E.M., Paranjape A., Baker B., Ndaw V.S., Barntein B.O., Oskerit-zian C.A., Sell S.A., Ryan J.J.* 2016. Lactic acid suppresses IL-33-mediated mast cell inflammatory responses via hypoxia-inducible factor-1 α -dependent miR-155 suppression. J. Immunol. 197 : 2909–2917.
- Baccari G.C., Pinelli C., Santillo A., Minucci S., Rastogi R.K.* 2011. Mast cells in nonmammalian vertebrates: An overview. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 290 : 1–53.
- Bianchi M.E.* 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. J. Leukoc. Biol. 81 : 1–5.
- Bonnekoh H., Scheffel J., Kambe N., Krause K.* 2018. The role of mast cells in autoinflammation. Immun. Rev. 282 : 262–275.
- Bradding P., Pejler G.* 2018. The controversial role of mast cells in fibrosis. Immunol. Rev. 282 : 198–231.
- Cardamone C., Parente R., Feo G.D., Triggiani M.* 2016. Mast cell as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. Immunol. Lett. 178 : 10–14.
- Chen C.C., Grimbaldston M.A., Tsai M., Welssman I.L., Galli S.J.* 2005. Identification of mast cell progenitors in adult mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102 : 11408–11413.
- Chen G.Y., Nuñez G.* 2010. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. Nat. Rev. Immunol. 10 : 826–837.
- Chieffi Baccari G., de Paulis A., Di Matteo L., Gentile M., Marone G., Minucci S.* 1998. *In situ* characterization of mast cells in the frog *Rana esculenta*. Cell Tissue Res. 292 : 151–162.
- Clarke P.G.* 1990. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. 181 : 195–213.
- Csaba G., Oldh I., Kapa E.* 1970. Phylogenesis of mast cells. II. Ultrastructure of mast cells in the frog. Acta Boil. Acad. Sci. Hung. 21 : 255–264.
- Dahlin J.S., Malinowski A., Öhrvik H., Sandelin M., Janson C., Alving K., Hallgren J.* 2016. Lin[−] CD34hi CD117int/hi FcεRI⁺ cells in human blood constitute a rare population of mast cell progenitors. Blood. 127 : 383–391.
- De Young M.B., Nemeth E.F., Scarpa A.* 1987. Measurement of the internal pH of mast cell granules using microvolumetric fluorescent and isotopic techniques. Arch. Biochem. Biophys. 254 : 222–233.
- Egozi E.I., Ferreira A.M., Burns A.L., Gamelli R.L., Dipietro I.A.* 2003. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. Wound Repair Regen. 11 : 46–54.
- Enoksson M., Lyberg K., Möller-Westerberg C., Fallon P.G., Nilsson G., Lunderius-Andersson C.* 2011. Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. J. Immunol. 186 : 2523–2528.
- Esposito B., De Santis A., Monteforte R., Baccari G.C.* 2002. Mast cells in Wallerian degeneration: Morphologic and ultrastructural changes. J. Comp. Neurol. 445 : 199–210.
- Galli S.J., Nakae S., Tsai M.* 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. Nat. Immunol. 6 : 135–142.
- Galli S.J., Tsai M., Piliponsky A.M.* 2008. The development of allergic inflammation. Nature. 454 : 445–454.
- Galli S.J., Tsai M.* 2010. Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. Eur. J. Immunol. 40 : 1843–1851.
- Galli S.J., Tsai M.* 2012. IgE and mast cells in allergic disease. Nat. Med. 18 : 693–704.

- Gulliksson M., Carvalho R.F., Ulleras E., Nilsson G. 2010. Mast cell survival and mediator secretion in response to hypoxia. *PLoS One*. 5 : e12360.
- Gyrd-Hansen M., Nylandsted J., Jäättelä M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cancer viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*. 3 : 1484–1485.
- He S., Huang S., Shen Z. 2016. Biomarkers for the detection of necroptosis. *Cell. Mol. Life Sci*. 73 : 2177–2181.
- Jamur M.C., Grodzki A.C., Berenstein E.H., Hamawy M.M., Siraganian R.P., Oliver C. 2005. Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*. 105 : 4282–4289.
- Joulia R., L'Faqih F.E., Valitutti S., Espinosa E. 2017. IL-33 fine tunes mast cell degranulation and chemokine production at the single-cell level. *J. Allergy Clin. Immunol*. 140 : 497–509.
- Kitamura Y., Shimada M., Hatanaka K., Mijano Y. 1977. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*. 268 : 442–443.
- Lagunoff D., Rickard A. 1983. Evidence for control of mast cell granule protease in situ by low pH. *Exp. Cell Res*. 144 : 353–360.
- Liu X., Yang W., Guan Z., Yu W., Fan B., Xu N., Liao D.J. 2018. There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell Biosci*. 2018. 8 : 6.
- Maaninka K., Lappalainen J., Kovanen P.T. 2013. Human mast cells arise from a common circulating progenitor. *J. Allergy Clin. Immunol*. 132 : 463–469.
- Majno G., Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*. 146 : 3–15.
- Marshall J.S., Jawdat D.M. 2004. Mast cells in innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol*. 114 : 21–27.
- Mekori Y.A., Gilfillian A.M., Akin C., Hartmann K., Metcalfe D.D. 2001. Human mast cell apoptosis is regulated through Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Clin. Immunol*. 21 : 171–174.
- Melo F.R., Grujic M., Spirkoski J., Calounova G., Pejler F. 2012. Serglycin proteoglycan promotes apoptotic versus necrotic cell death in mast cells. *J. Biol. Chem*. 287 : 18142–18152.
- Metcalfe D.D., Mekori J.A., Rottem M. 1995. Mast cell ontogeny and apoptosis. *Exp. Dermatol*. 4 (Pt. 2) : 227–230.
- Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y.A. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev*. 77 : 1033–1079.
- Möllerherm H., Branitzki-Heinemann K., Brogden G., Elamin A.A., Oehlmann W., Fuhrmann H., Singh M., Naim H.Y., von Kockritz-Blickwede M. 2017. Hypoxia modulates the response of mast cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Front. Immunol*. 8 : 541.
- Monteforte R., De Santis A., Chieffi Baccari G. 2001. Morphological changes in frog mast cells induced by nerve stimulation *in vivo*. *Neurosci. Lett*. 315 : 77–80.
- Moulin D., Donzé O., Talabot-Ayer D., Mézin F. Palmer G., Gabay C. 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine*. 40 : 216–225.
- Moussion C., Ortega N., Girard J.P. 2008. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells *in vivo*: A novel “alarm-in”? *PLoS One*. 3 : e3331.
- Noli C., Miolo A. 2001. The mast cell in wound healing. *Vet. Dermatol*. 12 : 303–313.
- Paivandy A., Sandelin M., Igelström H., Landelius P., Janson C., Melo F.R., Pejler G. 2017. Induction of human lung mast cell apoptosis by granule permeabilization: A novel approach for targeting mast cell. *Front. Immunol*. 8 : 1645.
- Park B.S., Kim G.C., Back S.J., Kim N.D., Kim Y.S., Kim S.K., Jeong M.H., Lim Y.J., Yoo Y.H. 2000. Murine bone marrow-derived mast cells exhibit evidence of both apoptosis and oncosis after IL-3 deprivation. 29 : 51–60.
- Pejler G., Hu Frisk J.M., Sjöstrom D., Paivandy A., Ohrvik H. 2017. Acidic pH is essential for maintaining mast cell secretory granule homeostasis. *Cell Death Dis*. 8 : e2785.
- Pisetsky D.S. 2014. The translocation of nuclear molecules during inflammation and cell death. *Antioxid. Redox Signal*. 20 : 1117–1125.
- Reinhart R., Rohner L., Wicki S., Fux M., Kaufmann T. 2018. BH3 mimetics efficiently induce apoptosis in mouse basophils and mast cells. *Cell Death Differ*. 25 : 204–216.
- Rock K.L., Kono H. 2008. The inflammatory response to cell death. *Ann. Rev. Pathol*. 3 : 99–126.
- Schmetzer O., Valentin P., Church M.K., Maurer M., Siebenhaar F. 2016. Murine and human mast cell progenitors. *Eur. J. Pharmacol*. 778 : 2–10.
- Shen H., Kreisel D., Goldstein D.R. 2013. Processes of sterile inflammation. *J. Immunol*. 191 : 2857–2863.
- Silk E., Zhao H., Weng H., Ma D. 2017. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis*. 8 : e2812.
- da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C. 2014. Mast cell function: A new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem*. 62 : 698–738.
- Szatmary P., Huang W., Criddle D., Tepikin A., Sutton R. 2018. Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders. *J. Cell Mol. Med*. 22 : 4617–4629.
- Theoharides T.C., Alysandratos K.D., Angelidou A., Delivanis D.A., Sismanopoulos N., Zhang B., Asadi S., Vasiadi M., Weng Z., Miniati A., Kalogeromitros D. 2012. Mast cells and inflammation. *Biochem. Biophys. Acta*. 1822 : 21–33.
- Trump B.F., Berezsky I.K., Chang S.H., Phelps P.C. 1997. The pathways of cell death: Oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol*. 25 : 82–88.
- Vanden Berghe T., Vanlagenakker N., Patrhoens E., Deckers W., Devos M., Festjens N., Guerin C.J., Brunk U.T., Declercq W., Vandenaabeele P. 2010. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*. 17 : 922–930.
- Wallach D., Kang T.B., Dillon C.P., Green D.R. 2016. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science*. 352 : aaf2154.
- Wernersson S., Pejler G. 2014. Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nat. Rev. Immunol*. 14 : 478–94.
- Wulff B.C., Wilgus T.A. 2013. Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye? *Exp. Dermatol*. 22 : 507–510.

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF MAST CELL DEATH IN AUTOTRASPLANTED LYMPH HEART OF ADULT FROG *RANA TEMPORARIA*

M. I. Krylova*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

**E-mail: marina.krylova51@mail.ru*

Lymph hearts of the frog are hollow, pulsating organs, 1–2 mm in diameter, allowing the lymph to be pumped into the venous system. In this work, lymph hearts of the frog were used as an experimental model for studying the processes of initiation and development of sterile inflammation in damaged tissues and necrosis-like death of mast cells (MCs). The ultrastructure of damaged and dying MCs in the striated muscle tissue of posterior lymph heart of adult frog were studied in conditions of temporary ischemia (hypoxia) caused by autotransplantation of this organ into its own bed. It was found that damaged MCs die by oncotic necrosis pathway during the time interval from 3 days to 6 weeks after autotransplantation of the lymph hearts. The early stages of frog MC oncosis are characterized by swelling of cytoplasmic membrane organelles (except cytoplasmic secretory granules), dilatation of the perinuclear space, budding of ribosome-coated vesicles from the outer nuclear membrane, and greater chromatin condensation in the nucleus of some MCs. Later stages of oncotic necrosis are characterized by disintegration of the plasma membrane, release of cytoplasmic secretory granules, largely intact morphologically, into the extracellular space, and karyolysis. The presence of presumably nuclear material is found in the extended perinuclear space of some damaged and dying MCs. The release of bubbles of the rough endoplasmic reticulum into the extracellular space of still undestroyed MCs in places of local disintegration of the plasma membrane was noted. Immunocytochemical labeling of MCs at the ultrastructural level using antibodies against histamine, substance P (SP) and atrial natriuretic peptide (ANP) revealed the localization of gold particles both on secretory granules located in the cytoplasm of damaged and dying cells and on the granules that released into the extracellular space after disintegration of the MCs. The data obtained in this study suggest that MCs dying by oncotic necrosis may be involved in the initiation and development of a sterile inflammatory process in autotransplanted lymph hearts of the frog and produce alarmins promoting the development of inflammation.

Keywords: autotransplantation, lymph heart, mast cell, oncotic necrosis, sterile inflammation, homeostasis of secretory granules, immunolocalization of histamine, atrial natriuretic peptide and substance P, frog